

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y GENÓMICA DEL MIELOMA MÚLTIPLE.

TESIS DOCTORAL

CRISTINA LARGO IGLESIAS

Madrid, 2007

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y GENÓMICA DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Tesis doctoral presentada por Cristina Largo Iglesias,
Licenciada en Biología y Bioquímica, para optar al grado de Doctor.

Madrid, 2007

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Grupo de Citogenética Molecular



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo de Citogenética Molecular del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), bajo la supervisión de Juan C. Cigudosa García.



Dr. Juan C Cigudosa, Jefe del Grupo de Citogenética Molecular del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como director y Dr. Javier Benítez, Director del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como tutor,

CERTIFICAN:

Que Doña Cristina Largo Iglesias ha realizado el presente trabajo: “**Caracterización genética y genómica del mieloma múltiple.**” que a nuestro juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biología**, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado.

Madrid, Diciembre 2006.

Vº Bº de la director y tutor de la Tesis

Director de la Tesis:
Juan C Cigudosa

Tutor:
Javier Benítez

Este trabajo ha sido realizado con las siguientes ayudas: “Ayudas para la realización de Tesis Doctoral del Departamento de Educación y Cultura del Gobierno de Navarra” y “G03/136 Red temática FIS: mieloma múltiple y otras gammapatías monoclonales”.

A mis padres, Ángel y Pili .

A mis hermanas, Ainhoa y Elisabet.

A Álvaro

AGRADECIMIENTOS.

Con este manuscrito termina una etapa, que a pesar de haber sido dura, me ha dado muchas satisfacciones y me ha permitido desarrollarme, aprender y conocer a mucha gente. Sin embargo, esto no es un final, sino una transición para el comienzo de una nueva etapa llena de incertidumbre y retos. A lo largo de estos últimos cinco años de tesis he conocido a mucha gente que me ha apoyado y ayudado, así que muchas gracias a todos. No me gustaría olvidarme de nadie, pero pido disculpas de antemano por si esto sucediera. Para intentar evitarlo comenzaré desde el principio.

Esta etapa de mi vida comenzó en el 2001 en el Departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Allí, además de comenzar a entender la investigación, tuve la oportunidad de impartir clases como profesora ayudante. Agradezco a todos los profesores del Departamento de Genética, María José, Lola, Marina, José Luís y Javier, la oportunidad que me brindaron allí, especialmente a Lola y María José por prestarme su ayuda y comprensión en los momentos más duros, y por seguir mostrándolo durante todo este tiempo. No puedo olvidarme de todos mis compañeros, pero sobre todo, tengo que agradecer su apoyo y amistad a Borja, “mi hermanico”, a José Pablo por sus consejos técnicos, y a Mikel, por su amistad desde que comencé la carrera.

Este trabajo se ha desarrollado en el Grupo de Citogenética Molecular del CNIO, a donde llegué en el 2003. Así que en primer lugar, tengo que dar las gracias a mi jefe, Juan Cruz Cigudosa, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por haber confiado en mí desde el principio, y sobre todo, por haberme enseñado tanto de ciencia, sin olvidarse de darnos un trato humano. También doy las gracias al Dr. Javier Benítez director del Programa de Genética del Cáncer Humano por haberme permitido formarme en esta disciplina.

Me gustaría agradecer, en especial, a todo el Grupo de Citogenética Molecular su amistad, cariño y apoyo. A las chicas Carmen, Mamen, Carol, Gloria, Bibiana y Sara, y los cada vez menos numerosos chicos, Javi y Francesco. Tampoco quiero olvidarme de los que ya no están en el *labo*, Sandra, Sergio y David a los que echamos de menos. Aunque me hubiese gustado agradecerlos uno a uno, sería muy largo, así que muchas gracias, habéis sido un gran apoyo y sin vuestra ayuda, consejos y el cuarto oscuro esto no hubiera sido posible.

También quiero dar las gracias a todos los integrantes del Departamento de Genética Humana, constituido por los laboratorios de Genética Humana, Endocrino, CEGEN y Cáncer Familiar, donde he aprendido muchas cosas y he hecho amigos. En especial a Lorenzo, porque ha formado parte de nuestro laboratorio desde el principio y sin sus anécdotas no hubiera sido lo mismo. Muchas gracias a todos.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Anticuerpos Monoclonales, en especial a Fran y Giovanna, por enseñarme y ayudarme con los western e IHQ.

A mis amigas de Pamplona: Elena, Amaia, Susana, Yolanda, Itziar y Paula. Gracias por seguir siendo mis amigas desde la carrera a pesar de la distancia, por las cenas de los viernes en las que cada vez hemos ido siendo menos y por vuestros consejos. A Paula, en especial, por transmitirme siempre esa energía positiva y ganas de luchar, sigue siendo así y no te rindas.

A mi “familia” en Madrid. En especial a Clara y Chony, sin olvidarme de Mikko, aunque no esté aquí, y a todos los que hemos conocido. Por que hemos pasado muy buenos momentos juntos en fiestas y en viajes, pero sobre todo por me habéis cuidado cuando lo he necesitado. Gracias por hacerme sentir como en casa. Como dice la canción “...*son mis amigos, y en la calle pasábamos las horas...*” (Amaral). Por ello, ¡muchas gracias!

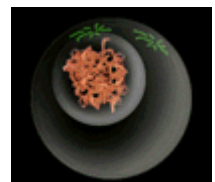
A Álvaro. Porque a pesar de que no he conseguido explicarte como se pintan los cromosomas de colores, sin tu apoyo, comprensión, cariño y alegría esto no hubiera sido posible. Gracias por estar a mi lado, por hacerme ver que hay más cosas además de la tesis. Por las fiestas, por la convivencia y por esos maravillosos viajes, por todo. Espero que tú, como yo, nunca olvides las tardes de invierno en Madrid.

Por último y más importante, y a quienes dedico esta tesis, a mi familia. A mis padres, Ángel y Pili, por quererme, educarme y apoyarme en todo momento. Sin vuestro apoyo no estaría donde estoy, y no tengo palabras para agradeceréoslo. A mis hermanas, Ainhoa y Elisabet. A Ainhoa porque siempre has estado a mi lado. A Eli, por ser la pequeña y la alegría de la casa, aunque no haya pasado mucho tiempo contigo.

¡¡Muchas gracias a todos!!

Cristina

ÍNDICE



<i>ÍNDICE</i>	<i>I</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>IX</i>
<i>Relación de tablas</i>	<i>XIII</i>
<i>Relación de figuras</i>	<i>XV</i>
<i>Abstract</i>	<i>XVII</i>
<i>Resumen</i>	<i>XIX</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1. El cáncer	3
2. Las neoplasias de células B	5
2.1. Neoplasias de células B maduras	5
2.2. Clasificación de las neoplasias de células plasmáticas	5
3. El mieloma múltiple	6
3.1. Epidemiología	7
3.2. Etiología	7
3.3. Origen celular y mielomagénesis	8
3.3.1. Desarrollo de las células B	8
3.3.1. Origen de las células mielomatosas	10
3.4. Interacción con el micro-ambiente de la médula ósea	11
3.5. Diagnóstico y clasificación	13
3.5.1. Manifestaciones clínicas	13
3.5.2. Morfología	14
3.5.3. Inmunofenotipo	14
3.5.4. Diagnóstico y estadios clínicos	15
3.5.4. Variantes clínicas	16
3.6 Genética del mieloma múltiple	16
3.6.1. Antecedentes citogenéticos del MM	16
3.6.1.1. Translocaciones cromosómicas que afectan a los genes de Ig	18
3.6.1.2. Cambios numéricos: aneuploidía	21
3.6.1.3. Alteraciones en el cromosoma 13 ($\Delta 13$)	22
3.6.1.4. Ganancias de 1q	23
3.6.2. Otros eventos oncogénicos en MM	23
3.6.2. Perfiles de expresión génica en MM	24
3.6.3. La expresión de ciclinas D es un evento temprano en el desarrollo de MM	25
3.7. Factores pronósticos	27
3.8. Tratamiento	29

OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS I: IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRES- EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE.	43
1. Líneas celulares de mieloma múltiple	43
1.1. Extracción de ADN.	43
1.2. Extracción ARN.	44
1.3. Obtención de suspensiones citogenéticas.	45
1.4. Extracción de proteínas totales.	45
1.5. Obtención de citospines.....	45
2. Hibridación in situ fluorescente (FISH)	46
2.1. Obtención de sondas para FISH.	46
2.1.1. Diseño de las sondas.	46
2.1.2. Cultivo de los clones bacterianos.	47
2.1.3. Extracción del ADN plasmídico.	47
2.1.4. Marcaje de la sonda.....	48
2.2. Protocolo de FISH.	50
2.2.1. Preparación de la sonda.....	50
2.2.2. Preparación de la muestra.	50
2.2.3. Hibridación, desnaturalización e incubación.	50
2.2.4. Lavados post-hibridación.	50
2.2.5. Captura y análisis de las imágenes.....	51
2.2.6. Descripción de las sondas utilizadas.	51
3. Hibridación genómica comparada (CGH)	52
3.1. Marcaje de los ADN mediante desplazamiento de mella.....	53
3.2. Preparación de la sonda.	54
3.3. Preparación de las metafases normales.	54
3.4. Hibridación.	55
3.5. Lavados y tinción de contraste.	55
3.6. Captura y análisis de las imágenes.	55
4. Arrays de ADN complementario: Oncochip CNIO.	56
4.1. Perfiles de expresión génica en el Oncochip CNIO.	57
4.1.1. Marcaje de ARN.	57
4.1.2. Pre-tratamiento de los cristales.	60
4.1.3. Hibridación de los microarrays.	60
4.1.4. Lavados post hibridación.	61
4.1.5. Obtención y análisis de las imágenes.....	61
4.1.6. Análisis de los arrays de expresión.	62

4.2. Arrays de CGH sobre el Oncochip CNIO.	64
4.2.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.	65
4.2.2. Marcaje de ADN mediante cebado aleatorio (random priming).	66
4.2.3. Preparación de la sonda.	67
4.2.4. Pre-tratamiento de los cristales.	67
4.2.5. Hibridación de los microarrays.	67
4.2.6. Lavados post hibridación.	67
4.2.7. Establecimiento de los límites de ganancias y pérdidas.	68
4.2.8. Determinación de ganancias y pérdidas con el programa CGH-Plotter.	69
4.3. Identificación de genes ganados/amplificados y sobre-expresados.	70
5. PCR a tiempo real con sondas taqman (qRT-PCR).	70
5.1. Retrotranscripción.	71
5.2. PCR con sondas Taqman®.	72
5.3. Análisis de los resultados.	73
6. Western blotting.	73
6.1. SDS-PAGE.	74
6.2. Transferencia a la membrana de nitrocelulosa.	75
6.3. Incubación con los anticuerpos y detección.	75
7. Inmunohistoquímica.	76
MATERIAL Y MÉTODOS II: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.	
78	
8. Pacientes de mieloma múltiple.	78
9. Arrays de CGH de oligonucleótidos.	79
9.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.	79
9.2. Marcaje mediante cebado aleatorio.	79
9.3. Preparación de la sonda.	80
9.4. Hibridación.	80
9.5. Lavados post hibridación.	80
9.7.1. Determinación de las variaciones en el número de copias.	81
9.7.2. Definición de las regiones mínimas comunes.	82
9.7.3. Identificación de mielomas hiperdiploides y no-hiperdiploides mediante aCGH.	82
9.7.4. Análisis bioinformático y estadístico.	82
10. Cariotipo espectral (SKY).	83
10.1. Tratamiento de la muestra.	85
10.2. Desnaturalización de los cromosomas.	85
10.3. Desnaturalización de la sonda.	85
10.4. Hibridación.	85
10.5. Detección y lavados.	85
10.6. Captura y análisis.	86

RESULTADOS	89
-------------------------	-----------

RESULTADOS I. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE..... **91**

1. Caracterización de las translocaciones cromosómicas de los genes de Ig y su relación con los perfiles de expresión.	91
2. Caracterización de las variaciones en el número de copias y sobre-expresión de genes	95
2.1. Hibridación genómica comparada (CGH) convencional.....	95
2.2. Determinación de las variaciones en el número de copias mediante aCGH en el Oncochip del CNIO.	96
2.3. Identificación de genes ganados/amplificados y sobre-expresados.....	98
3. Análisis del estado de amplificación y expresión de c-MYC, BCL2 y MALTI	103

RESULTADOS II. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE MUESTRAS PRIMARIAS DE MIELOMA. **107**

4. Identificación de las translocaciones cromosómicas de los genes de inmunoglobulinas en muestras primarias de MM.	107
5. Caracterización de los perfiles genómicos en muestras primarias MM.	108
5.1. Descripción general de los resultados obtenidos.....	108
5.2. Identificación de regiones mínimas comunes (RMC).....	112
5.3. Identificación de distintos tipos de mielomas en función de las RMC.	114
5.4. Amplificaciones y deleciones homocigóticas.....	116
5.3. Caracterización de un nuevo marcador citogenético en Xq21-qter.....	118

DISCUSIÓN	123
------------------------	------------

DISCUSIÓN I. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE. **125**

1. Caracterización de las translocaciones de Ig en líneas de MM	125
2. Perfiles de expresión génica en las líneas celulares de MM	125
3. Identificación de genes ganados y sobre-expresados.	126
4. Estudio de genes candidatos	128
4.1. <i>C-MYC</i>	129
4.2. <i>MALTI</i> y <i>BCL2</i> se encuentran amplificados en 18q21.....	130

DISCUSIÓN II: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.	133
5. Perfiles genómicos en mieloma múltiple	133
6. Diferencias entre casos H y NH	134
7. Análisis de las regiones mínimas comunes.	135
7.1. Regiones Míminas Comunes.	135
7.2 Identificación de distintos grupos basados en las RMC.	138
8. Amplificaciones y deleciones homocigóticas en MM	139
8.1. Amplificaciones.	139
8.2. Deleciones homocigóticas.	140
9. Caracterización de la duplicación en Xq21-qter.	143
CONCLUSIONES	145
REFERENCIAS	151
ANEXO I	169
ANEXO II	197

Ab	Anticuerpo (antibody)
aCGH	arrays de CGH
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
amp	Amplificación
Antifade	1,4 diazabicyclo-(2.2.2)-octano
ARN	Ácido ribonucleico
BAC	Cromosoma artificial de bacteria (Bacterial Artificial Chromosome)
BCL2	B-cell CLL/Lymphoma 2
BCR	B cell receptor
bp	Pares de bases (base pair)
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CCND3	Ciclina D3
CCNE1	Ciclina E1
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
CGH	Hibridación Genómica Comparada (Comparative Genomic Hybridization)
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
C-MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CNV	Variaciones en el número de copias (Copy Number Variations)
CP	Células plasmáticas
Cr	Cromosoma
Cy3	Cianina -3
Cy5	Cianina -5
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamino-2 fenilindol
dATP	2' Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2' Desoxicitosina 5'-trifosfato
del	delección
der	Derivado
dGTP	2' Desoxiguanosina 5'-trifosfato
DLBCL	Linfoma B difuso de células grandes
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	2' desoxinucleósido 5'-trifosfato
dTTP	2' Desoxitimidita 5'-trifosfato
dup	Duplicación
dUTP	2' Desoxiuridina 5'-trifosfato
ECP	Enfermedad de cadenas pesadas
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
ERK	Extracellular receptor kinase
EST	Etiquetas de secuencia conocida (Expressed Sequence Tags)
FAS	TNF receptor superfamily member 6

FAS-L	Ligando de FAS
FGFR3	Fibroblast growth factor 3
FICT	Isotiocianato de fluoresceína
FISH	Hibridación in situ con Fluorescencia (Fluorencence in situ Hybridization)
FL	Linfoma folicular
gan	ganancia
GMSI	Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto
GO	Gene ontology
GST	Gen supresor de tumores
H	Hiperdiploide
HRP	Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
HYDIN	Hydrocephalus inducing homolog (mouse)
IAP	Inhibitor of apoptosis
ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ig	Inmunoglobulinas
IGF	Insulin-like growth factor
IGH	Gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas
IGL	Gen de la cadena ligera lambda de inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-6	Inter-leuquina 6
ITGB7	Integrina B7
JAK	Janus kinase
Kb	Kilobase
MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog B
MALT	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa
MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1
MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
Mb	Megabase
MI-FISH	FISH-multicolor.
MM	Mieloma múltiple
MMP	Metaloproteinasa
MMSET	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
MYEOV	Myeloma Over-expressed Gene
NH	No- hiperdiploide
NHL	Linfoma no-Hodgkin
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón salino fosfatado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
PEG	Perfiles de expresión génica
PETHEMA	Programa para el estudio de la terapéutica en hemopatía maligna
PEX7	Peroxisomal biogenesis factor 7
PORIMIN	Pro-oncosis receptor inducing membrane injury
PSA	Persulfato amónico
qRT-PCR	PCR acoplada a transcripción inversa cuantitativa a tiempo real.
RB	Gen del retinoblastoma

RMC	Región mínima común
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción inversa (Reverse Transcriptase PCR)
SBF	Suero bovino fetal
SDF	Stromal cell–derived factor
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
SKY	Cariotipo espectral (Spectral Karyotyping)
SOTA	Self Organizing Tree Algorithm
SSC	Solución salina de citrato de sodio.
STAT	Signal transducer and activators of transcription
SYK	Spleen tyrosine kinase
t	Translocación
T.A	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamina
TGFB	Transforming growth factor beta
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
VCAM	Vascular cell adhesión molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YAP1	Yes-associated protein 1

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias de células plasmáticas de acuerdo con la clasificación de la OMS (Grogan and Spier, 2001).	6
Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de MM según Durie et al., 2003.....	15
Tabla 3. Nuevo sistema de estadificación del ISS (Greipp et al., 2005).	16
Tabla 4. Alteraciones genéticas observadas en mieloma	17
Tabla 5. Genes frecuentemente translocados con los genes de Ig en MM (Kuehl and Bergsagel, 2002).	18
Tabla 6. Grupos de mieloma definidos por la aneuploidía.....	22
Tabla 7. Resumen los eventos oncogénicos más importantes en MM.	24
Tabla 8. Clasificación TC (Bergsagel and Kuehl, 2005).....	27
Tabla 9. Factores pronósticos en MM (Durie et al., 2003; Greipp et al., 2005).....	28
Tabla 10. Nuevos agentes terapéuticos en MM (Hideshima et al., 2003).....	31
Tabla 11. Características de las líneas celulares.....	43
Tabla 12. Sondas utilizadas en el análisis de FISH en líneas celulares.....	52
Tabla 13. Genes incluidos en el Oncochip	57
Tabla 14. Reactivos necesarios en el marcaje de ARN mediante retro-transcripción.....	58
Tabla 15. Genes analizados y sondas Taqman® utilizadas.....	72
Tabla 16. Descripción de los pacientes.	78
Tabla 17. Clasificación de las líneas celulares de MM de acuerdo a las translocaciones y a los datos de expresión obtenidos mediante arrays de expresión y qRT-PCR.	92
Tabla 18. Genes ganados/amplificados (ratio aCGH >1.22) y sobre-expresados (ratio array de expresión >2) en al menos dos de las líneas celulares.	99
Tabla 19. Resultados de FISH y qRT-PCR de los genes C-MYC, BCL2 y MALT1.	104
Tabla 20. Caracterización mediante bandas G, FISH y aCGH de los casos de MM.....	107
Tabla 21. Distribución del número y tipo de CNV en los diferentes grupos de mieloma.....	112
Tabla 22. Descripción de las 68 RMC identificadas en MM.	113
Tabla 23. Descripción de las amplificaciones y deleciones homocigóticas encontradas en MM.	117

Relación de figuras

Figura 1. Desarrollo de las células B (Adaptado de Kuehl y Bergsagel, 2002).....	9
Figura 2. Cascadas de señalización celular dirigidas por la interacción de las células de MM con las células del estroma de la médula ósea (Hideshima et al., 2005).....	12
Figura 3. Osteolisis en el MM.....	13
Figura 4. Eventos oncogénicos en MM.....	26
Figura 5. Opciones terapéuticas del MM (Durie et al., 2003; Kyle and Rajkumar, 2004).	30
Figura 6. Marcaje de ADN mediante desplazamiento de la mella.....	48
Figura 7. Esquema de la CGH.....	53
Figura 8. ADNs marcados mediante desplazamiento de la mella.....	54
Figura 9. Esquema de marcaje de ARN mediante retrotranscripción.	58
Figura 10. Esquema del marcaje mediante random priming.....	66
Figura 11. Variaciones en el número de copias del cromosoma X con arrays de ADNc..	69
Figura 12. Esquema de la técnica de SKY.	84
Figura 13: Esquema de MI-FISH aplicado a las líneas celulares.....	91
Figura 14. Agrupamiento de las líneas a partir de los 166 genes identificados ($p>0.05$) después del análisis supervisado respecto a los grupos TC.	94
Figura 15. Resumen de los resultados de CGH de las 9 líneas celulares incluidas en el estudio. ..	95
Figura 16. Ideogramas de los cromosomas 1, 7, 8, 11 & 18 que representan las regiones de ganancia/amplificación en las 9 líneas celulares.....	94.
Figura 17. Representación gráfica de los resultados de la herramienta FatiGO..	102
Figura 18. FISH de la línea celular SK-MM-2.....	105
Figura 19. Imágenes de inmunohistoquímica de tres de las líneas de mieloma analizadas.	106
Figura 20. Western Blotting de las líneas de MM con el Ab MALT1 (RON 169A1D7).	106
Figura 21. Perfil de aCGH de uno de los casos.....	106
Figura 22. Agrupamiento no supervisado de las muestras MM utilizando las CNV más frecuentes.	110
Figura 23. Clustering no supervisado utilizando las 68 RMC..	115
Figura 24. Patrón de hibridación del cromosoma X en los casos con ganancia de en Xq21-qter.	118
Figura 25. Resultados de las hibridaciones de la sonda de Xq21.....	119
Figura 26. Análisis de los casos #20 y L363 mediante aCGH, SKY y FISH.	120
Figure 27. Grupos de mielomas obtenidos mediante perfiles genómicos	139

Multiple myeloma (MM) is a clonal plasma cell neoplasia with a wide variability in clinical features, response to treatment, and survival times among patients. It is characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow, monoclonal immunoglobulin secretion and the presence of osteolytic lesions. Although much advance has been made in the management of multiple myeloma in the last decade, it remains to be an incurable disease, with a median survival of 2-3 years, and 10-14% survival 10 years after diagnosis. Clues to understanding the pathogenesis of myeloma are coming from two directions. The first one is the close interaction of MM cells with bone marrow stromal cells necessary for survival, growth and differentiation of plasma cells. The second aspect is chromosomal aberrations, present in virtually all MM, which are either chromosome translocations involving the *IGH* locus and a cellular oncogene; gain and/or losses of chromosomes or specific genomic regions, or a combination of both types of aberrations. The understanding of the significance of various translocations in MM has increased, but little is known about the role of gains and losses. Of particular interest is gene over-expression associated with genomic gains or amplifications. These events, frequently observed in other types of cancer, have been used as therapeutic targets.

First, we characterized nine multiple myeloma cell lines (HMCL) by fluorescent *in situ* hybridization, by comparative genomic hybridization (CGH) and by cDNA microarrays for gene expression profiling and copy number changes. After identifying the *IGH* translocations present in the cell lines, we conducted an expression-profiling analysis in order to identify over-expressed and repressed genes. The supervised clustering analysis identified 166 genes with significantly different expression among the cell lines harbouring *MMSET/FGFR3* (4p16), *MAF* and *CCND1* (11q13) rearrangements. Then, array CGH was performed in order to establish the gained and amplified regions. This technology allows the direct comparison of the copy number variation and the expression of the genes. Five chromosomes (1, 7, 8, 11 and 18) recurrently affected by gains/amplifications in primary samples and cell lines were analyzed in detail and thirteen recurrent gained/amplified regions were identified. Sixty amplified and over-expressed genes were found within those gained regions and 25 (42%) of them were only over-expressed when amplified; moreover, six showed a significant association between over-expression and gain/amplification. For validation with alternative methods (FISH and qRT-PCR) three genes, *C-MYC*, *MALT1* and *BCL2*, were chosen because of their relevance in lymphoid malignancies. This validation

allowed the identification of the co-amplification and the over-expression for genes located within the same amplicon, such as *MALT1* and *BCL2*.

Secondly, we carried out a genomic characterization of MM primary samples by means of a high resolution arrayCGH (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), with more than 40.000 probes. We analyzed 26 MM primary samples after their enrichment in CD138-positive plasma cells. Although most of the samples showed a normal karyotype at the time of diagnosis, our approach identified copy number imbalances in all cases. Furthermore, 68 smallest overlapping regions of imbalance were identified and bioinformatics strategies were optimized to perform the data analysis. The unsupervised clustering of these DNA genomic profiles was able to segregate hyperdiploid (H-MM) from non-hyperdiploid cases and, furthermore, allowed the identification of two H-MM subgroups based on the presence of gains in chromosome 7. An additional analysis showed that structural chromosome rearrangements were more frequently seen in H-MM. Additionally, we identified the same Xq21 duplication in nearly 20% of the cases that was originated through unbalanced chromosome translocations. High level amplifications and homozygous deletions were recurrently observed in our series and they involved genes with meaningful function in cancer biology.

In summary, the parallel analysis of gene copy number variations and expression levels by cDNA microarray in MM allowed an efficient identification of genes whose expression levels are elevated because of their increased copy number. This is the first time that *MALT1* and *BCL2* have been shown to be over-expressed and amplified in MM. The high resolution aCGH on primary samples allowed us to identify copy number changes in 100% of the samples. We segregated different MM subgroups based on their genomic profiles. We also characterized the presence and nature of genomic regions affected by homozygous deletions and amplifications in MM.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas con una gran variabilidad en las características clínicas, respuesta al tratamiento y supervivencia. Esta neoplasia se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea, la secreción de inmunoglobulina monoclonal y la presencia de lesiones óseas. A pesar de los numerosos avances realizados en los últimos diez años en el tratamiento de los pacientes, el MM continúa siendo una enfermedad incurable con una supervivencia media de 2-3 años, y una supervivencia a los diez años del 10-14%. Existen dos aspectos importantes en la patogénesis del mieloma múltiple. El primero es la estrecha interacción de las células de mieloma con las células del estroma de la médula ósea, la cual es necesaria para la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las células plasmáticas. En segundo lugar, hay que reconocer que las alteraciones genéticas están virtualmente presentes en todos los mielomas. Estas alteraciones genéticas pueden consistir tanto en translocaciones cromosómicas equilibradas, que implican a los genes de Ig y a un oncogén, como en ganancias y/o pérdidas de cromosomas o regiones cromosómicas específicas, o como en la combinación de ambos tipos de alteraciones. Cada vez aumenta más el conocimiento sobre el papel que juegan las translocaciones en mieloma, sin embargo se conoce menos del papel que juegan las ganancias y las pérdidas. Las ganancias o amplificaciones genómicas son eventos de especial interés si están asociados a sobre-expresión de un gen o algunos genes que están situados en esa región. Estos eventos se han observado frecuentemente en distintos tipos de tumores y han sido utilizados para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

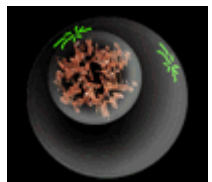
En primer lugar caracterizamos nueve líneas celulares de mieloma mediante hibridación in situ con fluorescencia, hibridación genómica comparada y arrays de ADNc para la identificación de las variaciones en el número de copias (aCGH) y el análisis de los perfiles de expresión génica. Después de la caracterización de las translocaciones de inmunoglobulinas, realizamos los estudios de expresión génica. Las líneas pertenecían a tres grupos basados en la presencia de translocaciones específicas, *MMSET/FGFR3* (4p16), *MAF* y *CCND1* (11q13). Basándonos en estos grupos realizamos un análisis de agrupamiento supervisado en el cual identificamos 166 genes expresados diferencialmente entre los grupos. Con los aCGH establecimos las regiones de ganancia y pérdida y enfocamos el estudio en los cinco cromosomas (1, 7, 8, 11 y 18) que estaban recurrentemente ganados y/o amplificados. Encontramos 13 regiones de

ganancia/amplificación en estos cromosomas e identificamos 60 genes recurrentemente sobre-expresados dentro de estas regiones. 25 (42%) de estos genes únicamente aparecían sobre-expresados en las líneas celulares que presentaban ganancia/amplificación, más aún, encontramos seis genes que presentaban una asociación significativa entre la amplificación y la sobre-expresión. Validamos tres genes candidatos, *C-MYC*, *MALT1* y *BCL2*, mediante técnicas alternativas (FISH y qRT-PCR) y esta validación permitió identificar que los genes *MALT1* y *BCL2*, localizados en 18q21, se encuentran en el mismo amplicón y que se sobre-expresan simultáneamente.

También hemos llevado a cabo un análisis de los perfiles genómicos de muestras primarias de MM con arrays de CGH de alta resolución, que contiene más de 40000 sondas. Se analizaron 26 muestras primarias enriquecidas en células plasmáticas con el marcador de superficie CD-138. A pesar de que la mayoría de las muestras mostraron un cariotipo normal al diagnóstico, nuestra estrategia permitió la identificación de variaciones en el número de copias en todas las muestras analizadas. Además identificamos 68 regiones mínimas comunes de ganancias y pérdidas para los análisis posteriores. El análisis de agrupamiento no supervisado fue capaz de separar los casos hiperdiploides de los no-hiperdiploides, más aún identificó dos subgrupos de mielomas hiperdiploides en función de la presencia de ganancias en el cromosoma 7. También observamos que las alteraciones estructurales son muy frecuentes en MM hiperdiploides. Además, identificamos una duplicación en el cromosoma X (Xq21-qter) en el 20% de los casos y demostramos mediante FISH y SKY que esta duplicación es el resultado de translocaciones no equilibradas. Por último y de gran interés, hemos identificado amplificaciones y deleciones homocigóticas que incluyen genes de interés en la biología del cáncer.

Resumiendo, en análisis paralelo de las variaciones del número de copias y niveles de expresión mediante arrays de ADNc ha permitido una identificación eficiente de genes cuya expresión se eleva a consecuencia de un aumento en el número de copias. Por primera vez en mieloma hemos demostrado que *MALT1* y *BCL2* están sobre-expresados y co-amplificados en mieloma. Por otro lado, el análisis de muestras primarias mediante arrays de CGH de alta resolución ha permitido la identificación de variaciones en el número de copias en todos los casos. También hemos podido segregar diferentes grupos de mielomas en función de sus perfiles genómicos y se ha hecho posible la identificación de deleciones homocigóticas y amplificaciones de gran relevancia genética en MM.

INTRODUCCIÓN



1. EL CÁNCER.

El cáncer no es una única enfermedad, sino que engloba una gran variedad de tumores malignos cuyo origen está en el crecimiento descontrolado de las células. Esta proliferación genera una masa de células que puede invadir los tejidos adyacentes o tejidos más lejanos (metástasis). Su desarrollo es esencialmente autónomo, crecientemente maligno y, si no se trata, invariablemente fatal.

El cáncer es una enfermedad genética que, al contrario de otras enfermedades genéticas, se supone que no está causado por un único defecto en un gen. Solamente se desarrolla un cáncer invasivo cuando hay varios genes alterados. Los tumores humanos progresan por la acumulación de alteraciones en los genes denominados guardianes (*gatekeepers*) y porteros (*caretakers*). Los primeros son oncogenes o genes supresores de tumores (GST) implicados en la regulación del crecimiento celular, diferenciación o de la apoptosis. Los porteros son genes que no regulan directamente el crecimiento del tumor, sino que están implicados en el mantenimiento de la integridad genómica (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Una mutación es cualquier cambio que ocurre en la secuencia del genoma y eso incluye cambios de una sola base en su secuencia así como las grandes y pequeñas ganancias y pérdidas, las inserciones y las translocaciones. Los **oncogenes** generalmente mutan de modo que el gen se activa constitutivamente o en condiciones en las que el alelo salvaje no lo haría. Esta activación puede ser el resultado de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones puntuales que afectan residuos cruciales que regulan la actividad del producto del gen. Generalmente, una sola mutación activadora en uno de los alelos es suficiente para que le confiera una ventaja en el crecimiento celular.

Al contrario, las mutaciones en los **GST** reducen la actividad del producto de ese gen. Esta inactivación es debida a mutaciones que afectan a residuos que son cruciales en su actividad, son mutaciones que pueden generar proteínas truncadas, o incluso deleciones o inserciones de tamaño variable. La inactivación también puede obedecer a un silenciamiento de su expresión debido a modificaciones epigenéticas. Se ha propuesto que para que esta inactivación sea efectiva ambos alelos deben estar alterados, sin embargo, estudios recientes ha sugerido que la inactivación de uno sólo de los alelos puede conferir esa ventaja selectiva (haploinsuficiencia) (Santarosa and Ashworth, 2004).

Los genes porteros son genes que mantienen la integridad celular. Este grupo de genes está compuesto por genes que intervienen en los sistemas de reparación de desapareamientos (MMR), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación por escisión de base (BER) que intervienen en la reparación de errores que ocurren durante la replicación del ADN o errores inducidos por la exposición a agentes mutagénicos. Estos genes de mantenimiento mantienen las alteraciones genéticas al mínimo y cuando se inactivan, la tasa de mutación aumenta contribuyendo a la progresión tumoral (Friedberg, 2003). Estos genes también tienen que mutarse bialélicamente para tener un efecto patogénico.

Las mutaciones en cualquiera de estos tres tipos de genes pueden ocurrir en la línea germinal, y generar una predisposición al cáncer, o darse en células somáticas, dando lugar a tumores esporádicos (Knudson, 2002). La primera mutación en uno de los oncogenes o GST que cause una expansión clonal inicia el proceso neoplásico, las siguientes mutaciones darán lugar a la expansión y progresión del tumor.

Existe otro tipo de inestabilidad genómica, que se encuentra en la mayoría de los tumores, y es denominada inestabilidad cromosómica (CIN). Esta CIN es debida a ganancias y/o pérdidas de cromosomas enteros, o fragmentos largos de los cromosomas durante la división celular (Kops et al., 2005), como consecuencia, aparece un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) y una alta tasa de pérdida de heterocigosidad (LOH). Estos cambios en el contenido genómico pueden ser ventajosos para la célula tumoral, por ejemplo, eliminando el alelo funcional de un GST. Los mecanismos por los que aparece esta CIN aún son desconocidos, aunque se han propuesto varios genes y vías candidatas como los genes que regulan el ciclo celular, la crisis telomérica y centrosómica. Tampoco está claro si la CIN es simplemente un estado inespecífico que ocurre espontáneamente durante la formación del tumor o si es un evento temprano que contribuye a la formación del tumor. No obstante hay evidencias, como el hallazgo de aneuploidía en condiciones pre-neoplásicas, la mayor frecuencia de inestabilidad genética en líneas celulares aneuploides y la presencia de mutaciones en genes que controlan los puntos de control de la mitosis, que sugieren que la aneuploidía juega un papel activo en la carcinogénesis (Kops et al., 2005).

Resumiendo, el cáncer es esencialmente una enfermedad genética en la que aparecen defectos genéticos específicos asociados a una predisposición a su génesis, progresión y metástasis en diferentes tipos de neoplasias. La identificación precisa de estas alteraciones

contribuye en la detección temprana, el diagnóstico, el pronóstico y tratamiento de las neoplasias.

2. LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B.

En las últimas décadas los patólogos y otros especialistas han intentado encontrar un buen método para clasificar los desórdenes hematológicos. En 1997, la *Asociación Europea de Patología* y la *Sociedad de Hematopatología* desarrollaron una nueva clasificación de desórdenes hematológicos para la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Harris et al., 2000). Esta clasificación se basa en criterios morfológicos, genéticos, clínicos y relacionados con el inmunofenotipo.

2.1. NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS.

Según la OMS las neoplasias de células B maduras son aquellas que presentan una proliferación clonal de los linfocitos en diferentes estadios de diferenciación. Respecto a sus características biológicas y clínicas, este grupo de neoplasias engloba tipos con una naturaleza muy heterogénea. Las neoplasias de células B maduras engloban el 90% de las neoplasias linfoides y suponen el 4% de los casos de cáncer anuales (Armitage and Weisenburger, 1998; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). Los tipos más comunes son el Linfoma Folicular (FL) y Linfoma B Difuso de Células Grandes (DLBCL), que juntos representan el 50% de los Linfomas No-Hodgkin (NHL) (Armitage and Weisenburger, 1998; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). Por otro lado, los mielomas múltiples (MM) de células plasmáticas representan el 15% de neoplasias hematológicas (Devesa et al., 1987).

2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS.

Las neoplasias de células plasmáticas (CP) engloban una gran cantidad de enfermedades caracterizadas por la proliferación monoclonal de células B terminalmente diferenciadas que secretan inmunoglobulinas (Ig). Estas neoplasias se caracterizan por secretar una única Ig homogénea conocida como componente M, o monoclonal o proteína M, que es detectable en el suero y orina de los pacientes mediante electroforesis. Puede tratarse de procesos malignos (mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström) o procesos benignos o premalignos, como es, esencialmente, la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) (Grogan and Spier, 2001). Este tipo de neoplasias engloba un número elevado de entidades clínico- patológicas, algunas son plasmacíticas mientras que,

otras contienen tanto linfocitos como CP. Además, las variantes de mieloma incluyen síndromes definidos por el tejido de deposición de Ig. En la tabla 1 se muestra un resumen de la clasificación de neoplasias de células plasmáticas.

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias de células plasmáticas de acuerdo con la clasificación de la OMS (Grogan and Spier, 2001).

Síndrome	Variantes	Localización	%
Mieloma de CP			
Variantes	Mieloma no secretor Mieloma quiescente Mieloma indolente Leucemia de células plasmáticas	Médula ósea de vértebras, costillas, cráneo, pelvis, fémur, clavícula y escápula.	90%
	Lesión precursora		
Plasmacitoma	Plasmacitoma solitario del hueso	Similar al mieloma de CP.	5%
	Plasmacitoma extramedular		3-5%
Enfermedades de depósito de Ig monoclonal	Amiloidosis primaria	Corazón, hígado, riñones, intestino, lengua, nervios y huesos.	Rara
	Enfermedad de depósito de cadenas ligeras y pesadas	Riñones, hígado, corazón, nervios, vasos sanguíneos y articulaciones.	Rara
	Síndrome de POEMS	Médula ósea.	1-2%
Enfermedad de cadenas pesadas (ECP)	ECP gamma	Nódulos linfáticos, anillo de Waldeyer, médula ósea, hígado, bazo y sangre periférica.	Rara
	ECP alfa	Gastrointestinal principalmente intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos. Tracto respiratorio.	Rara
	ECP mu	Bazo, hígado, médula ósea y sangre periférica.	Muy rara

3. EL MIELOMA MÚLTIPLE.

El mieloma múltiple (MM), también conocido como mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler, es un síndrome neoplásico secretor de Ig, que se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas derivadas de los últimos estadios de las células B. El clon de CP prolifera en la médula ósea y produce grandes cantidades de proteína M que es detectable en suero y orina en el 98% de los pacientes (Blade et al., 1998). La producción excesiva de proteína M puede dar lugar a un fallo renal producido por la proteinuria de Bence Jones y por hiperviscosidad de la sangre debida a la acumulación de

la proteína M. La acumulación de CP en la médula ósea puede reemplazar la producción de células B secretoras de Ig normales, lo cual da lugar a un aumento de la tasa de infecciones en los pacientes. Por otro lado, las células malignas, frecuentemente, invaden el tejido óseo adyacente, lo que produce una destrucción ósea que conlleva la presencia de dolor y fracturas óseas en los pacientes. Ocasionalmente, las células de mieloma pueden invadir múltiples tejidos y producir otros síntomas (International Myeloma Working Group, 2003).

Generalmente, el MM es precedido por una condición premaligna, la llamada GMSI, que puede permanecer estable durante años y que progresa a MM con una tasa del 1% al año (Kyle and Rajkumar, 1999). Hay por ello, evidencias de que el MM progresa como un proceso con múltiples pasos (*multistep process*) cuya manifestación inicial es la GMSI (Hallek et al., 1998).

A pesar de los avances en el tratamiento de los pacientes con MM en la última década, el mieloma continúa siendo una enfermedad incurable (Kyle et al., 2004), que tiene una supervivencia media de 2-3 años y una supervivencia del 10-15% a los 10 años (Kyle et al., 2003; Phekoo et al., 2004).

3.1. EPIDEMIOLOGÍA.

El MM constituye alrededor del 15% de todas las neoplasias hematológicas y el 1% de todos los cánceres (Greenlee et al., 2000). La tasa de incidencia en Europa y EEUU varía de 2.4 a 3.4 casos por 100.000 habitantes y año (Cartwright et al., 1999; Phekoo et al., 2004). El MM es una enfermedad relacionada con la edad, siendo más frecuente a partir de los 60-70 años, así, el 40% de los pacientes tienen menos de 60 años y tan sólo el 2% son menores de 40 años. La incidencia en hombres es superior que en mujeres en personas mayores de 50 años. La incidencia de MM, respecto a la caucásica, es mayor en la población afro-americana y menor en la población asiática (Bowden et al., 1993). Por otro lado, los datos de incidencia de GMSI son limitados, aunque parecen ser similares a las tasas de incidencia del MM (Landgren et al., 2006). La prevalencia de GMSI también aumenta con la edad y progresa a MM con una tasa del 1% al año.

3.2. ETIOLOGÍA.

La etiología del MM es poco conocida. En los últimos años se han realizado numerosos estudios epidemiológicos que evalúan diferentes factores de riesgo (Morgan et al., 2002), sin embargo, se han encontrado muy pocas asociaciones consistentes entre

factores de predisposición ambiental y genética y el desarrollo del mieloma. Entre estos factores podemos destacar:

- Factores genéticos. Hay líneas de evidencia que sugieren posibles nexos de unión entre la predisposición genética y el mieloma. Las personas con historias familiares de mieloma en parientes de primer grado presentan un riesgo 3 a 6 mayor de padecer mieloma (Brown et al., 1999). También hay estudios que han asociado ciertos polimorfismos del TNF α y TNF β con un riesgo incrementado de desarrollar GMSI y MM (Davies et al., 2000).

- Disfunción inmune. Algunos autores consideran que una estimulación antigénica persistente de las células B, con el tiempo, puede proporcionar la oportunidad de desembocar en una transformación neoplásica (Morgan et al., 2002). Se ha analizado la posible relación del MM con algunas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide (Eriksson, 1993), con condiciones alérgicas (Lewis et al., 1994) y con enfermedades musculoesqueléticas (Doody et al., 1992). Por otro lado, también se ha observado que los pacientes con SIDA tienen un riesgo de padecer mieloma de 4.5 veces mayor (Goedert et al., 1998).

- Exposiciones ambientales y a radiaciones ionizantes. Algunos estudios apuntan hacia la asociación entre MM y algunas sustancias químicas como benceno (Bergsagel et al., 1999), disolventes (Blair et al., 1998) o las radiaciones ionizantes (Cuzick, 1981). Igualmente, el riesgo de padecer MM parece ser mayor si existen exposiciones ocupacionales relacionadas con la agricultura, refinerías, industrias del corcho, del metal, del plástico o de la madera, o si se ha trabajado como conductor de camiones (Demers et al., 1993; Linet et al., 1987).

- Estilo de vida. Se ha correlacionado el nivel socio-económico bajo, el consumo de tabaco y de alcohol con un elevado riesgo de padecer mieloma (Baris et al., 2000; Brown et al., 1992). Por el contrario, parece que una dieta rica en pescados y fibra podría proteger del desarrollo de mieloma (Chatenoud et al., 1998; Fritschi et al., 2004).

3.3. ORIGEN CELULAR Y MIELOMAGÉNESIS.

3.3.1. Desarrollo de las células B.

La hematopoyesis es un proceso dinámico que consiste en la formación y desarrollo de células sanguíneas a partir de la célula madre pluripotencial (*stem cell*) de la médula ósea. Estas células madre representan una población celular con capacidad de auto-regeneración, de modo que durante la vida adulta se mantienen homeostáticamente, y por

otro lado, son capaces de diferenciarse y dar lugar a un tipo particular de células, linfoides o mieloides. Las células madre mieloides dan lugar a las células precursoras de eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y plaquetas, mientras que los progenitores linfoides dan lugar a los linfocitos T o B (Bell, 1992).

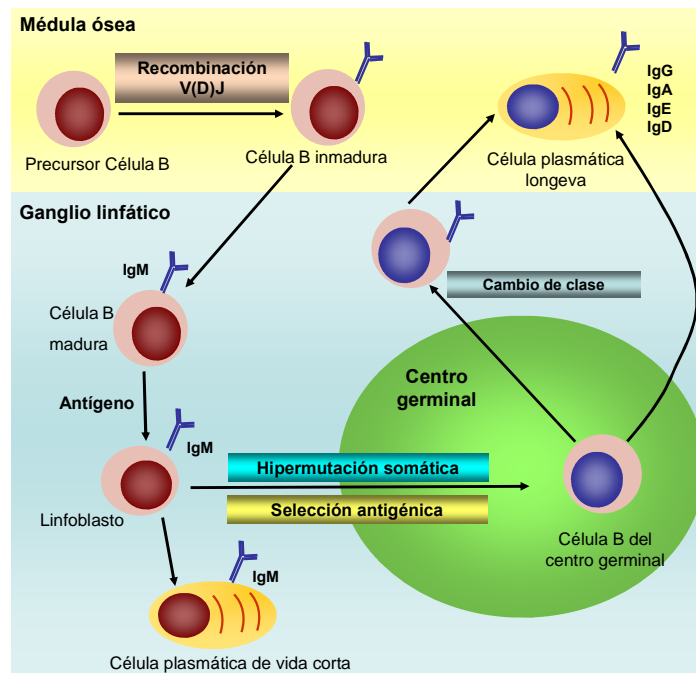


Figura 1. Desarrollo de las células B (Adaptado de Kuehl y Bergsagel, 2002).

El desarrollo de las células B comienza en la médula ósea mediante recombinaciones de los *loci* de las cadenas pesadas (*IGH*) y ligeras (*IGL*) de las Ig en las células B progenitoras (Figura 1). Estas recombinaciones V(D)J dan lugar a numerosas combinaciones de los segmentos V, D y J de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig en los precursores de células B de la médula ósea, produciendo receptores de antígenos funcionales (Tonegawa, 1983). La expresión de estas Ig de membrana, del tipo IgM o IgD, es muy importante en el desarrollo y supervivencia de las células B. Algunas de estas células pueden expresar una Ig de membrana funcional y abandonar la médula ósea, para dar lugar a las células B maduras, pero que no han tenido contacto con el antígeno (*naive B cells*), otras células no producirán una Ig funcional y morirán mediante apoptosis (Rajewsky, 1996). La interacción de las células B maduras con el antígeno hará que estas células proliferen y se diferencien. La primera respuesta al antígeno es inespecífica y se da mediante la diferenciación de los linfoblastos a células plasmáticas pre-germinales, que tienen una vida media corta, tienen receptores de antígeno de baja afinidad y presenta un

isotipo IgM (Calame et al., 2003). El resto de los linfoblastos activados por el antígeno pueden entrar en el centro germinal y sufrir los procesos de hipermutación somática y selección antigénica. Estas células B del centro germinal, que expresan receptores de antígeno de alta afinidad, se seleccionan para sobrevivir y diferenciarse a células B memoria o a células plasmáticas post-centro germinal. Las células post-centro germinal (incluyendo las derivadas de las células B memoria) que hayan sufrido el proceso de cambio de clase, regresan a la médula ósea, donde residen como células no proliferantes, diferenciadas y de larga vida (>30 días o incluso años) (Calame, 2001).

3.3.1. Origen de las células mielomatosas.

Aproximadamente el 80 % de los tumores de células B emergen de células B del centro germinal o de células post-centro germinal, lo cual indica que es importante para su desarrollo la inestabilidad genética intrínseca de las células B que se desencadena en el centro germinal (Kuehl and Bergsagel, 2002). Las CP mielomatosas expresan las mismas cadenas pesadas y ligeras de Ig que la proteína M detectada en el suero u orina de estos pacientes. Además, estos reordenamientos presentan hipermutaciones somáticas que no tienen variaciones intraclonales. Este patrón de hipermutación somática sugiere que las CP mielomatosas han sufrido el proceso de selección antigénica en el centro germinal y que la expansión clonal ha sucedido en células B post-germinales (Alexanian et al., 1990). Asimismo, las células mielomatosas se parecen a las células plasmáticas normales, y parecen relativamente quiescentes (Drewinko et al., 1981). Por ello, no está claro si estas células tienen la capacidad proliferante necesaria para la iniciación, mantenimiento y progresión del mieloma.

Estudios realizados en células mononucleares de sangre periférica, han demostrado la existencia de unas células B circulantes que no ha sufrido el cambio de clase y que son clonalmente idénticas a las células mielomatosas de la médula (células B clonotípicas) (Matsui et al., 2004). Estas células no expresan CD138, un marcador de CP normales y tumorales, pero sin embargo expresan CD20 y Ig de superficie (Tarte et al., 2002), lo cual sugiere que su origen está en células B que no han sufrido cambio de clase pero sí mutación somática. Se ha propuesto que estas células B clonotípicas representarían a las células con capacidad de proliferación en estos tumores considerándolas las células madre de mieloma (Tarte et al., 2002). Sin embargo, estos precursores deberían llevar a cabo el cambio de clase y continuar la diferenciación hasta las CP que establecen el tumor. Alternativamente, podría ser que estas células B fuesen células B memoria en las que

todavía no ha ocurrido el evento neoplásico final, o que los isotipos pre y post cambio de clase se expresen en las mismas células como resultado de un cambio de clase aberrante (Guikema et al., 2004). No obstante, todas estas hipótesis tienen que ser confirmadas.

3.4. INTERACCIÓN CON EL MICRO-AMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA.

Un aspecto muy importante en la patogenia del mieloma, es la estrecha interacción de las CP de mieloma con el micro-ambiente de la médula ósea. Las CP mielomatosas intramedulares dependen del micro-ambiente de la médula ósea para su supervivencia, crecimiento y diferenciación. Esta interacción tiene efecto sobre otros fenómenos biológicos: migración de las CP a la médula ósea; secreción de factores paracrinos que modulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de la masa tumoral; la angiogénesis; la aparición de lesiones óseas; la inmunodeficiencia y la anemia (Kuehl and Bergsagel, 2002). Estas interacciones entre las CP del mieloma y las células del estroma de la médula ósea están mediadas por la secreción de varias citoquinas, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión (Figura 2) que pueden modular la activación de diferentes cascadas de señalización.

La citoquina más importante en el MM es la IL-6. Las células de mieloma dependen de la secreción de esta citoquina por parte de las células del estroma (Urashima et al., 1996). Ellas mismas secretan otros factores que inducen la secreción de IL-6 por las células del estroma. La IL-6 activa vías de señalización específicas que promueven la proliferación (vía RAF/ERK) y la inhibición de la apoptosis (vías JAK/STAT y PI3K/Akt) (Hideshima et al., 2005) (Figura 2). Existen otros factores (TNF α , VEGF, SDF-1 α , M-CSF, bFGF) que regulan la expresión de IL-6 mediante la activación de NF κ B (Hideshima et al., 2002). Además, la secreción de otras citoquinas, como IGF-1, pueden cooperar con la IL-6 e inducir la proliferación de las células mielomatosas (Klein et al., 2003)

La adhesión de las células de MM a las células del estroma esta mediada por el efecto de la activación de TNF α , que activa la transcripción de moléculas de adhesión (LFA1 y VLA-4 en las CP y ICAM1 y VCAM1 en las células del estroma) mediado por la activación de NF κ B (Hideshima et al., 2005).

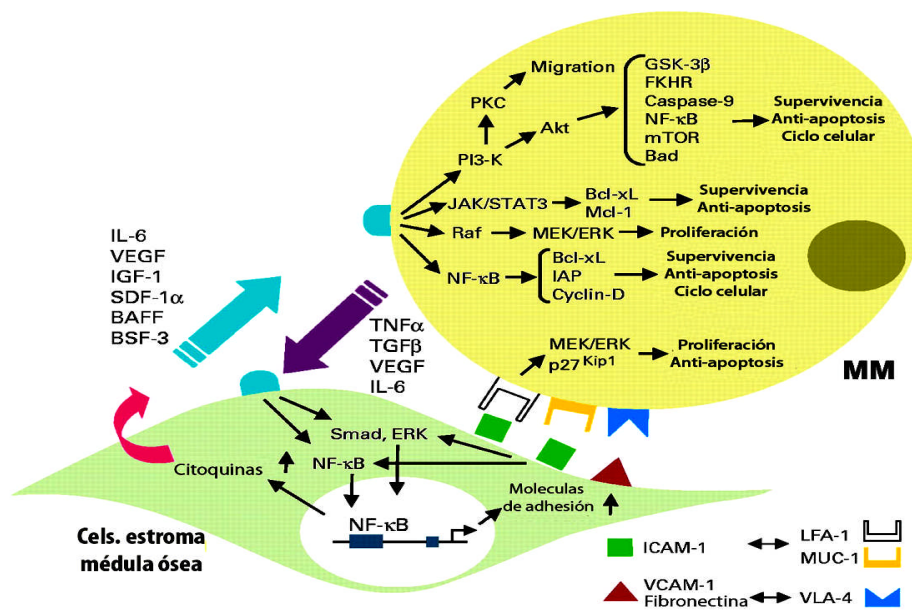


Figura 2. Cascadas de señalización celular dirigidas por la interacción de las células del MM con las células del estroma de la médula ósea (Hideshima et al., 2005). La unión de las células de MM a las células del estroma de la médula ósea desencadena el crecimiento celular, la supervivencia, la resistencia a drogas y la migración mediada por la adhesión y la secreción de citoquinas. Estas células de MM regulan la expresión de citoquinas de las células de estroma y las propias células mielomatosas. Estas citoquinas activan tres vías de señalización celular (ERK, JAK/STAT3, y/o PI3-K/Akt) y sus dianas, que incluyen citoquinas (IL-6, IGF-1, VEGF) y proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL, IAPs, Mcl-1) en las CP de mieloma. La activación de NFκB, mediada por la adhesión, incrementa la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) en las células del estroma y del mieloma lo cual potencia aún más la unión de las células mielomatosas al estroma y se secretan más citoquinas.

La angiogénesis en el MM está mediada por la secreción de VEGF y bFGF por parte de las células de MM, y puede que algunas otras células lo potencien. Sin embargo, no se conoce el evento que inicia la cascada angiogénica (Kuehl and Bergsagel, 2002). El VEGF junto con SDF-1 también induce la migración de las células de MM dentro de la médula ósea, lo cual parece estar mediado por vía de la activación de PKC (Hideshima et al., 2005).

Uno de los mayores problemas clínicos es la aparición de lesiones osteolíticas. Aún no se comprenden muy bien los mecanismos que las causan, pero se sabe que ocurre debido a un desequilibrio entre RANKL y OPG. RANKL y OPG se producen en los osteoblastos y en las células del estroma. RANKL se une a su receptor RANK en células precursoras de los osteoclastos, lo cual induce el desarrollo de los osteoclastos. Por otro lado, se conoce que el OPG es un inhibidor de RANKL. Las células mielomatosas

producen un desequilibrio entre OPG/RANKL mediante la secreción de MIP-1- α . Así las altas concentraciones de RANKL junto con las bajas concentraciones de OPG conducen a una activación de los osteoclastos y a la aparición de lesiones óseas (Figura 3). Existen otras citoquinas que han sido implicadas en este proceso como la IL-6, IL-11 y TNF α (Seidl et al., 2003).

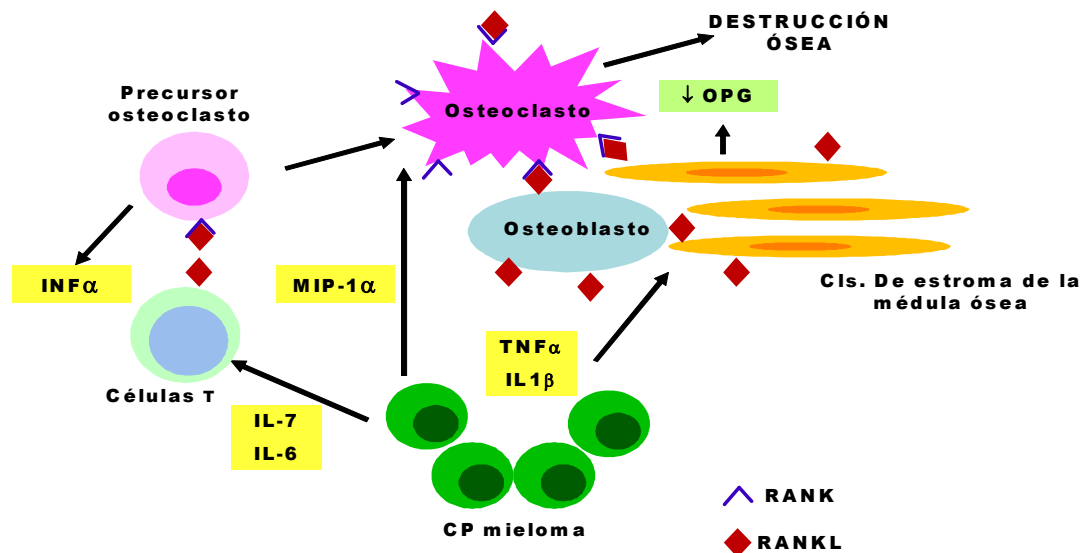


Figura 3. Osteólisis en el MM. Las células de MM producen factores que producen un desequilibrio entre RANKL/OPG lo cuál conlleva la activación de los osteoclastos y la degradación ósea (Seidl et al., 2003).

3.5. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN.

3.5.1. Manifestaciones clínicas.

Los síntomas más observados en MM son la fatiga, el dolor óseo, las infecciones recurrentes, insuficiencia renal y anemia (Kyle et al., 2003). La anemia es la mayor manifestación del mieloma y se produce como consecuencia de la producción inadecuada de células de la serie roja por deficiencia de eritropoyetina derivada del marcado desplazamiento de células de la médula ósea por el clon tumoral y por la insuficiencia renal que le acompaña (Kyle et al., 2003). La insuficiencia renal ocurre como consecuencia de la acumulación de cadenas ligeras de Ig en los túbulos distales y colectores del riñón, así como por la hipercalcemia e hipercalciuria que acompañan a las lesiones óseas. Las infecciones se producen por un desplazamiento en la producción de Ig normal. (Grogan et al., 2001).

La proteína M de tipo IgG aparece en el 50% de los pacientes, la de tipo IgA alrededor del 20%. El 15% de los pacientes pueden presentar Ig monoclonal de cadenas

ligeras y el 1-2% de los pacientes presentan gammapatías biclonales (Kyle et al., 2003). Son muy pocos los pacientes que presentan componente M de tipo IgD o IgM. Finalmente, hay un grupo pequeño de pacientes con mielomas no secretores (Guikema et al., 2004; Kyle et al., 2003).

3.5.2. Morfología.

El diagnóstico de MM se realiza cuando más de un 10% de la médula ósea está ocupada por CP malignas que pueden aparecer en grumos, nódulos o láminas. Las CP de mieloma pueden ser tanto células maduras como inmaduras, así como pleomórficas o anaplásicas (Grogan and Spier, 2001). Las CP maduras suelen tener forma ovalada con un citoplasma muy basófilo y el núcleo redondo y excéntrico, que se caracteriza porque la heterocromatina se dispone como ruedas de carreta. Su citoplasma se caracteriza por un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso responsable de la basofilia de su citoplasma y por un aparato de Golgi yuxtannuclear muy desarrollado. Por otro lado, las CP inmaduras presentan una cromatina nuclear dispersa, un elevado ratio núcleo/citoplasma y un nucleolo prominente. También se pueden encontrar células multinucleadas, lobuladas y pleomórficas (Grogan and Spier, 2001).

Ocasionalmente, las CP de mieloma circulan en sangre periférica (leucemia de células plasmáticas). Estas células pueden ser blastos maduros o inmaduros y en algunos casos pueden mostrar una morfología linfoide (García-Sanz et al., 1999).

3.5.3. Inmunofenotipo.

Las CP de mieloma expresan Ig citoplasmática monotípica y no expresan Ig de superficie. Los isotipos de Ig más frecuentes son IgG e IgA, seguidos por IgD e IgM en ese orden. Alrededor del 15% de los MM expresan exclusivamente cadenas ligeras de Ig. Generalmente, las CP malignas no expresan los marcadores CD19 ni CD20 (Mateo et al., 2005), mientras que sí expresan CD38, BCR (CD79a), CD56/58 y p63 (Van Camp et al., 1990). Al igual que las células plasmáticas normales expresan CD138 (Wijdenes et al., 1996). Las células B clonotípicas circulantes muestran un patrón diferente: no expresan CD138 pero en cambio expresan CD19 entre otros (Guikema et al., 2004; Matsui et al., 2004). Finalmente, las CP malignas pueden presentar la co-expresión aberrante de antígenos mielomonocíticos (Grogan et al., 1989).

3.5.4. Diagnóstico y estadios clínicos.

El diagnóstico de MM requiere la integración de datos de laboratorio, morfológicos y radiográficos. Se han utilizado varios criterios para el diagnóstico del mieloma. En la tabla 2 se muestran los criterios propuestos por *The International Myeloma Foundation* y *The International Myeloma Working Group* (Durie et al., 2003).

Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de MM según Durie et al., 2003.

1	Presencia de $\geq 10\%$ CP monoclonales en médula ósea y/o presencia de un plasmacitoma demostrado mediante biopsia
2	Presencia de proteína M en suero u orina ^a
3	Que se observe alguno de los siguientes síntomas relacionados con el mieloma ^b . [C] Elevación del calcio sanguíneo por encima de 10.5 mg/l o el nivel superior normal. [R] Insuficiencia renal (creatinina en suero > 2 mg/dl) [A] Anemia (hemoglobina < 10 g/dl o 2 g o el nivel superior normal) [B] Presencia de lesiones osteolíticas u osteoporosis ^c .

^a Si no se detecta proteína M (mieloma no secretor) se requiere que haya $\geq 30\%$ CP monoclonales en médula ósea y/o presencia de un plasmacitoma demostrado mediante biopsia.

^b Pueden ocurrir disfunciones en otros órganos y que necesiten tratamiento. Esas disfunciones son suficientes para clasificarlo como mieloma si se demuestra que está relacionado con el mieloma.

^c Si se observa un plasmacitoma solitario o solo osteoporosis sin fracturas óseas como criterios únicos de definición se requiere que haya al menos 30% de CP en médula ósea.

El sistema de estadificación más utilizado ha sido la clasificación de Durie- Salmon (Durie and Salmon, 1975). Esta estadificación está basada en los niveles de hemoglobina, calcio en suero, producción de proteína M y la afectación ósea, que son parámetros que correlacionan bien con la masa de células plasmáticas del mieloma. De este modo se establecen tres estadios: estadio I, son pacientes sin lesiones óseas, niveles normales de hemoglobina, y calcio, y presentan niveles bajos de proteína M; estadio III, son pacientes que presentan múltiples lesiones óseas, y niveles altos de proteína M y calcio, y niveles bajos de hemoglobina; los pacientes del estadio II presentan valores intermedios. Además cada grupo se puede clasificar en función de la función renal.

Se han realizado más intentos de mejorar la clasificación propuesta por Durie y Salmon, pero no han sido ampliamente adoptados. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado otro sistema de estadificación denominado *International Staging System (ISS)* (Greipp et al., 2005) (Tabla 3) que está basado en los niveles de β_2 -microglobulina y albúmina en suero. Estos criterios de clasificación y estadificación del mieloma también han sido utilizados como factores para intentar predecir el pronóstico de los pacientes.

Tabla 3. Nuevo sistema de estadificación del ISS (Greipp et al., 2005).

Estadio	Criterio	Supervivencia media (meses)
I	β_2 -microglobulina en suero < 3.5 mg/l Albúmina en suero \geq 3.5 g/dl	62
II	Ni estadios I ni III.	44
III	β_2 -microglobulina en suero \geq 5.5 mg/l	29

3.5.4. Variantes clínicas.

Como hemos indicado en la tabla 1 existen variantes clínicas del mieloma. Generalmente, aunque no siempre, el mieloma múltiple está precedido por una fase premaligna estable denominada GMSI (Kyle and Rajkumar, 2002) que se caracteriza por presentar una expansión de CP monoclonales discreta, una concentración de proteína M <3 g/dl, y los pacientes no muestran síntomas relacionados con MM (Kyle and Rajkumar, 2002). También existen casos de mieloma de células plasmáticas raros (1-5%) que no secretan Ig (Kyle et al., 2003), mielomas no secretores.

Por otro lado los mielomas quiescentes e indolentes representan dos variantes clínicas asintomáticas de MM caracterizadas por tener periodos largos de enfermedad estable, pero que cumplen los criterios diagnósticos del MM (Durie et al., 2003).

Por último, una fracción reducida de los pacientes infiltra sitios extramedulares, como la sangre, líquido pleural y la piel. El mieloma extramedular es la forma más agresiva del MM y cuando invade la sangre se le denomina leucemia de células plasmáticas (PCL) primaria o secundaria, dependiendo de si estaba precedido o no por un MM intramedular (García-Sanz et al., 1999).

3.6 GENÉTICA DEL MIELOMA MÚLTIPLE.

Investigaciones recientes han mostrado que las CP del mieloma presentan una gran variedad de anomalías genéticas y citogenéticas complejas. Estas anomalías cromosómicas de las CP parecen dar características importantes a estas células, permitiendo la clasificación citogenética que divide la enfermedad en grupos discretos.

3.6.1. Antecedentes citogenéticos del MM.

Desde que comenzaron los estudios citogenéticos en MM, se ha demostrado que es una enfermedad heterogénea en lo relativo a sus alteraciones cromosómicas. El análisis del MM mediante cariotipos de bandas G es difícil, ya que el número de CP que infiltran en la medula ósea es bajo, tienen un bajo índice mitótico (se dividen muy poco) y muchas de las

alteraciones presentes son crípticas, como por ejemplo los reordenamientos con la banda cromosómica 14q32 (*IGH*). Todo esto hace que tan solo el 30% de los cariotipos sean informativos, lo cual subestima el número de cambios cromosómicos en MM. El desarrollo de técnicas de citogenética molecular como el FISH, CGH y SKY ha permitido identificar alteraciones cromosómicas en gran parte de los casos. La tabla 4 muestra algunos estudios realizados en mieloma mediante técnicas convencionales y moleculares.

Tabla 4. Alteraciones genéticas observadas en mieloma

Cr	Calasanz ¹ CC (%) +	Smadja ² CC (%)	Lai ³ CC (%)*+	Nilsson ⁴ CC (%)* +	Cremer ⁵ FISH (%)	Liebisch ⁶ FISH (%)	Cigudosa ⁷ CGH (%)	Liebisch ⁶ CGH (%)	Gutiérrez ⁸ CGH (%)*
Ganancias									
1	1q (5)	1q (48)		1q10-44 (13)	1q21 (44)	1p (15)		1q21-23, 1q25-31 (26)	1p (10) 1q (45)
2			2 (11)						
3	3 (6)	3 (35)	3 (44)	3 (18)					3q (16)
4	4 (6)	4q (5)							4q (10)
5	5 (10)	5 (36)	5 (26)	5 (20)				5 (11)	5q (24)
6	6 (6)		6 (11)			6q (15)		6p21 (11)	6q (12)
7	7 (8)	7 (30)	7 (21)	7 (19)					7q (14)
8	8 (3)								8q (10)
9	9 (10)	9 (47)	9 (39)	9 (27)	9q34 (61)		9q (10)	9p (11) 9q31-qter (15)	9q (24)
11	11 (17)	11 (41)	11 (27)	11 (20)	11q23 (57)	11q (42)	11q (20)	11q23 (25)	11q (22)
12	12 (3)						12q24 (10)		12q (10)
15	15 (11)	15 (40)	15 (29)	15 (24)	15q22 (63)		15q13 (10)	15 (11)	15q (22)
17	17 (10)					17p (14)	17q22-24 (10)		17q (10)
18	18 (5)	18 (16)	18 (17)	18 (10)				18q (11)	
19	19 (8)	19 (45)	19 (35)	19 (22)	19q13 (61)		19p (30)		19q (18)
21	21 (6)	21 (25)	21 (17)	21 (15)					
22							22q (10)		22q (10)
X									Xq (10)
Pérdidas									
1	1p (9)	1p (33)		1p (17)				1p21 (13)	1p (10)
6	6q21 (10)	6q (12)		6q21(11)	6q21 (16)	6q (21)	6q21 (13)	6q (15)	6q (10)
8	8(3)	8 (12)	8 (20)		8p12 (21)			8p21 (15)	8p (10)
10	10 (3)		10 (12)						
12		11q (5)	12 (11)						
13	13 (8)	13 (47)	13 (33)	13 (27)	13q14 (54)	13q (41)	13q14-21 (30)	13q14-21 (37)	13q (39)
14	14 (7)	14q (10)	14 (20)	14 (12)					14q (12)
15			15 (12)						
16	16q (9)	16 (19)		16 (14)			16 (17)		16q (18)
17	17p13 (3) 17 (3)	17 (12)			17p13 (26)				
20			20 (14)						
22	22q11 (13)	22 (12)			22q11 (25)				
X	X (7)	X (22)	X (23)	X (17)				X (15)	

* Solo muestran las alteraciones con una frecuencia superior al 10%. + El porcentaje únicamente incluye a los casos alterados. CC: citogenética convencional; FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia; CGH: hibridación genómica comparada. ¹Calasanz et al., 1997a, n:280; ²Smadja et al., 1998, n:81; ³Lai et al., 1995, n: 129; ⁴Nilsson et al., 2003, n:78; ⁵Cremer et al., 2005, n:81; ⁶Liebisch et al., 2003, n (FISH): 43, n (CGH):46; ⁷Cigudosa et al., 1998, n:25; ⁸Gutierrez et al., 2004, n:74.

3.6.1.1. Translocaciones cromosómicas que afectan a los genes de Ig.

Una de las alteraciones genéticas más frecuentes descrita en MM es la presencia de translocaciones cromosómicas, que en células B implican de forma recurrente elementos reguladores de la transcripción de los genes de Ig y a diversos oncogenes. Esta relocalización resulta habitualmente en la sobre-expresión de esos oncogenes. Las células B normales sufren roturas de ADN de doble cadena como consecuencia de la recombinación V(D)J, cambio de clase e hipermutación somática que son esenciales para producir Ig funcionales y que podrían predisponer a la aparición de translocaciones cromosómicas. En el MM las translocaciones generalmente están producidas por errores en el proceso de cambio de clase, aunque a veces pueden ser debidas a errores en el proceso de hipermutación somática que sufren en los centros germinales (Kuehl and Bergsagel, 2002).

Las translocaciones que afectan al gen de *IGH* (14q32) están presentes en el 50% de los MM (Kuehl and Bergsagel, 2002) y se ha sugerido que son un evento temprano en el desarrollo del MM (Bergsagel et al., 2005). También se han observado translocaciones de locus de *IGLλ* (22q12) en el 10% de los casos. El MM presenta una gran variedad de diferentes translocaciones con diferentes cromosomas. Algunas de estas translocaciones son recurrentes (Tabla 5), mas del 40% de los tumores involucran 5 bandas cromosómicas de modo recurrente: 11q13 (*CCND1*), 4p16 (*FGFR3* y *MMSET*), 6p21 (*CCND3*), 16q23 (*MAF*) y 20q11 (*MAFB*) (Tabla 5).

Tabla 5. Genes frecuentemente translocados con los genes de Ig en MM (Kuehl and Bergsagel, 2002).

Banda cromosómica	Gen	Incidencia
11q13	<i>CCND1</i>	15-20%
6p21	<i>CCND3</i>	5%
4p16	<i>FGFR3</i> y <i>MMSET</i>	10-20%
16q23	<i>MAF</i>	5-10%
6p25	<i>IRF4</i>	5%
20q11	<i>MAFB</i>	2-5%
8q24	<i>MYC</i>	1%
1q21	<i>IRTA1/IRTA2</i>	1-2%

• t(11;14)(q13;q32) IGH/CCND1.

La t(11;14)(q13;q32) es la translocación más frecuentemente encontrada en MM y representa el 15-20% de los casos (Kuehl and Bergsagel, 2002). Los puntos de rotura se encuentran en una región de 360 Kb entre el gen *CCND1* y *MYEOV* (Ronchetti et al., 1999). Como resultado de la translocación, el gen *CCND1* se yuxtapone al regulador de la transcripción 3' del gen *IGH* en el der(14), llevando a su sobre-expresión (Chesi et al., 1996). La *CCND1* promueve la progresión de las células de fase G1 a la fase S y se sospecha que la sobre-expresión podría promover el crecimiento celular en el MM. Sin embargo, hay otras evidencias que atribuyen a *CCND1* otras funciones en MM, podría actuar como un regulador de la transcripción que afectaría a numerosos factores de transcripción como MyoD, STAT3 y DMP1 (Bernards, 1999; Bienvenu et al., 2005). Por otro lado, la presencia de otro regulador de la transcripción de *IGH* en el der(11) podría alterar la expresión de *MYEOV*, que se ha visto sobre-expresado en líneas celulares de mieloma con translocaciones 11q13 (Janssen et al., 2000) y en algunos casos de muestras primarias y en algunos casos de muestras primarias (Specht et al., 2004).

• t(4;14)(p16.3;q32.3) IGH/FGFR3-MMSET.

La translocación t(4;14)(p16;q32) aparece en el 10-20% de los pacientes (Avet-Loiseau et al., 1998; Fonseca et al., 2003b; Gertz et al., 2005). En el cromosoma 4 los puntos de rotura se encuentran en una región de 50-100 Kb centromérica al *locus* de *FGFR3* y dentro de los intrones 5' del *locus* *MMSET* (Chesi et al., 1998b). Se ha descrito que como consecuencia de esta translocación ambos genes son sobre-expresados. También se ha observado que en el 25% de los casos no se detecta expresión de *FGFR3* generalmente, por la pérdida del der(14) (Keats et al., 2003; Santra et al., 2003). Se ha descrito en líneas celulares de plasmacitomas murinos que la expresión ectópica de *FGFR3* promueve la proliferación celular (Plowright et al., 2000). Por otro lado, la expresión mantenida y consistente del gen *MMSET* del der(4) (Santra et al., 2003) lo hace un buen oncogen candidato en esta translocación, aunque, su papel en mieloma sigue siendo desconocido.

• t(14;16)(q32;q23) IGH/MAF.

La t(14;16) se detecta en el 5-10% de los pacientes con MM y en el 25% de las líneas celulares. También se ha descrito una variante t(16;22) que yuxtapone a MAF con *IGL* en la línea celular RPMI-8226 (Bergsagel and Kuehl, 2001; Chesi et al., 1998a). El punto de

rotura en 16q23 se encuentra en una región de 556-1350 Kb centromérica a *MAF*. Como resultado de esta translocación, *MAF* es sobre-expresado. (Chesi et al., 1998a). El gen *MAF* es un miembro de la familia de factores de transcripción de cremallera de leucinas que está involucrado en un gran número de procesos celulares, que incluyen la proliferación y diferenciación celular (Blank and Andrews, 1997). Recientemente Hurt et al (Hurt et al., 2004) han encontrado que alrededor de la mitad de los pacientes sobre-expresan *MAF* y no todos presentan esta translocación. Los autores demostraron que la expresión de *MAF* activaba la expresión de diferentes genes entre los cuales se encontraban *CCND2*, *CCR1* y la *ITGB7*.

• **t(14;20)(q32;q12) IGH/MAFB.**

La t(14;20) se encuentra en el 2-5% de los pacientes con MM y en el 12% de las líneas celulares de MM (Hanamura et al., 2001; Kuehl and Bergsagel, 2002). Los puntos de rotura en el der(20) se encuentran en una región centromérica de *MAFB* a unas 0.5-1 Mb (Hanamura et al., 2001). Mediante esta translocación *MAFB* se yuxtapone a uno de los *enhancers* de *IGH* y se produce su sobre-expresión. *MAFB* pertenece a la misma familia de factores de transcripción de MAF y se ha observado que también activa la expresión de *CCND2* e *ITGB7* (Hurt et al., 2004; Mattioli et al., 2005).

Estos datos sugieren que las translocaciones de los genes *MAF* están involucrados en la patogénesis del mieloma en dos aspectos: en la interacción de las CP con el micro-ambiente de la médula ósea mediante la activación de moléculas de adhesión y quimiotaxis y, por otro, en la regulación del ciclo celular mediante la activación de la expresión de *CCND2*.

• **t(6;14)(p21;q32) IGH/CCND3.**

Esta translocación se puede detectar en aproximadamente el 5% de los casos de MM (Sawyer et al., 2001; Shaughnessy et al., 2001). El punto de rotura en el cromosoma 6p21 se encuentra en una región de 150 Kb centromérica a *CCND3* y como consecuencia de la translocación se produce la expresión ectópica de este gen. El gen *CCND3*, junto con *CCND1* y *CCND2*, está implicado en el control del ciclo celular, aunque su papel en el MM aun no es conocido.

• **Otras translocaciones.**

Alrededor del 20-30% de los pacientes presentan translocaciones con otras regiones cromosómicas con una frecuencia del 1% o menor (Kuehl and Bergsagel, 2002). Sería de

gran interés poder identificar si estas translocaciones son primarias o secundarias y su naturaleza, aunque no sean recurrentes.

- **Translocaciones de C-MYC en MM.**

Las translocaciones de los genes de Ig con el gen *C-MYC* juegan un papel crucial en el linfoma de Burkitt, sin embargo, en mieloma la desregulación de *C-MYC* puede estar mediada por otros mecanismos (Avet-Loiseau et al., 2001; Bergsagel and Kuehl, 2001) y jugar un papel biológico diferente. Se ha observado que hay alteraciones de *C-MYC* en el 50-88% de las líneas celulares de mieloma y que su frecuencia en muestras primarias varía desde un 15% hasta el 45% (Avet-Loiseau et al., 2001; Fabris et al., 2003; Shou et al., 2000). Las alteraciones de *C-MYC* en mieloma se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad por lo que se considera que estos eventos están asociados con la progresión tumoral. Además de las translocaciones recíprocas simples con los genes de Ig, se han observado reordenamientos complejos que involucran tres cromosomas así como amplificaciones, duplicaciones, inversiones y deleciones (Fabris et al., 2003; Shou et al., 2000). Como consecuencia se ha observado la sobre-expresión de *C-MYC* a nivel de ARNm en casos con estos reordenamientos (Fabris et al., 2003; Kakkis et al., 1989; Shou et al., 2000). No obstante, no se conoce el papel de la expresión de *C-MYC* en MM.

3.6.1.2. Cambios numéricos: aneuploidía.

Otra característica de la genética del mieloma múltiple es la alta frecuencia con la que aparece la aneuploidía (Calasanz et al., 1997a; Dewald et al., 1985; Fonseca et al., 2004; Sawyer et al., 1995; Smadja et al., 1998), es decir, ganancias y pérdidas de cromosomas enteros. Las trisomías más frecuentes son 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, y 21 y las monosomías más frecuentes son las de los cromosomas 13, 14, 16, y 22. La prevalencia de la aneuploidía es independiente del estadio de la enfermedad. Globalmente, la aneuploidía segrega a los pacientes en cuatro subgrupos: hipodiploides, pseudodiploides, hiperdiploides y casi tetraploides (o hipotetraploides). Estos grupos se definen por el número de cromosomas que presentan (Debes-Marun et al., 2003; Smadja et al., 1998) o en función del contenido de ADN (Orfao et al., 1994) (Tabla 6).

Tabla 6. Grupos de mieloma definidos por la aneuploidía.

Grupo	N° cromosomas	Índice contenido ADN
Hipodiploides	< 44	< 0.95
Pseudodiploides	45-47	0.95-1.05
Hiperdiploides	48-75	1.05-1.75
Hipotetraploides	> 75	> 1.75

Se observa que las alteraciones numéricas presentan patrones de asociación específicos (Fonseca et al., 2004). Los cariotipos hipotetraploides parecen ser duplicaciones $4n$ de alteraciones que aparecen frecuentemente en células con cariotipos pseudodiploides o hipodiploides. Es por esto que los cariotipos hipodiploides, pseudodiploides y los hipotetraploides se han clasificado juntos como cariotipos no-hiperdiploides (NH) (Debes-Marun et al., 2003; Smadja et al., 1998). Estos mielomas NH se caracterizan por una alta prevalencia de translocaciones de *IGH* (casi el 85% de los casos) y la presencia de deleciones 13q (Debes-Marun et al., 2003; Fonseca et al., 2003a). Por otro lado, los cariotipos hiperdiploides (H) se asocian con ganancias de cromosomas específicos 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, y 21 y presentan una menor prevalencia de translocaciones de *IGH* y reordenamientos cromosómicos estructurales (Smadja et al., 2003).

3.6.1.3. Alteraciones en el cromosoma 13 ($\Delta 13$).

Las deleciones en el cromosoma 13 ($\Delta 13$) tienen una alta frecuencia en MM y en otras neoplasias de CP (Avet-Loiseau et al., 1999; Drach and Kaufmann, 2002). Las deleciones en el cromosoma 13 se detectan en el 50% de los pacientes con cariotipos anormales. Con la incorporación de la técnica de FISH en interfase se sabe que las $\Delta 13$ ocurren en todos los estadios de las neoplasias de CP, desde la GMSI hasta MM (Avet-Loiseau et al., 1999).

La mayoría de los casos presentan monosomía del cromosoma 13, aunque se ha visto que hay deleciones intersticiales que predominantemente involucran la banda cromosómica 13q14, aunque también se han identificado regiones mínimas de deleción en 13q34 (Avet-Loiseau et al., 2000; Elnenaei et al., 2003; Fonseca et al., 2001; Nomdedeu et al., 2002). También se ha observado que las deleciones bialélicas son raras y ningún estudio ha descartado la posibilidad de que sean otros los *loci* involucrados en la deleción.

Parece de gran importancia distinguir el significado de la presencia de $\Delta 13$ y su valor pronóstico en mielomas H o NH para poder entender mejor el papel de esta alteración independientemente del estado de la ploidía. Por último, hay que destacar que aún no se ha identificado una consecuencia genética específica asociada a $\Delta 13$.

3.6.1.4. Ganancias de 1q.

Las alteraciones en el cromosoma 1 son una de las alteraciones estructurales más frecuentes en la mayoría de las neoplasias hematológicas (Higgins and Fonseca, 2005) y aparece en el 50% de los casos de MM (Sawyer et al., 1995). Estudios realizados mediante CGH han demostrado que la ganancia/amplificación en 1q involucra de modo recurrente la región 1q21 (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2001). Estos reordenamientos en 1q pueden aparecer en forma de isocromosomas, amplificaciones o “*jumping translocations*” (Sawyer et al., 2005; Sawyer et al., 1998b). Se ha sugerido que las ganancias de 1q están relacionadas con un mal pronóstico y una progresión agresiva de la enfermedad (Cremer et al., 2005; Hanamura et al., 2006; Shaughnessy, 2005). El gen *PDZK1* se localiza en 1q21 y se ha relacionado su ganancia y sobre-expresión con la resistencia a fármacos (Inoue et al., 2004). También se han correlacionado los niveles de expresión del gen *CSK1B*, que juega un papel crucial en la progresión del ciclo celular, con los niveles de amplificación de 1q21 (Shaughnessy, 2005).

3.6.2. Otros eventos oncogénicos en MM.

Además de las alteraciones genéticas como translocaciones y cambios numéricos, también se han observado mutaciones y deleciones en genes como *FGFR3*, genes *RAS*, *PTEN* y *FAS*. Generalmente estas alteraciones aparecen en la progresión de la enfermedad (Kuehl and Bergsagel, 2002). La tabla 7 resume los genes que pueden encontrarse mutados o delecionados en MM.

Tabla 7. Resumen los eventos oncogénicos más importantes en MM.

Gen	Alteración	Efecto	Referencias
<i>FGFR3</i>	Mutaciones puntuales.	Activación: las células son independientes de IL-6 para la supervivencia y la proliferación celular.	Intini et al., 2001 Fracchiolla et al., 1998 Plowright et al., 2000.
<i>H-RAS</i> y <i>K-RAS</i>	Mutaciones puntuales.	Activación: las células son independientes de IL-6 para la supervivencia y la proliferación celular.	Liu et al., 1996
<i>TP53</i>	Delección 17p13 (10%). Mutaciones puntuales, (20-40%).	Inactivación <i>TP53</i> .	Drach et al., 1998 Drach et al., 2000 Fonseca et al., 2004
<i>RB</i>	Delección monoalélica de <i>RB</i> mediante las delecciones del cromosoma 13.	Aún no está claro cual es el papel de <i>RB</i> en el MM.	Fonseca et al., 2004
<i>FAS</i>	Mutaciones puntuales.	Impiden la unión de FAS-L: el receptor FAS no es funcional o no se expresa, por lo no se activa la apoptosis.	Hahne et al., 1996
<i>BCL-2</i>	¿?	Sobre-expresión, resistencia a fármacos.	Ong et al., 1995 Pettersson et al., 1992
<i>PTEN</i>	Mutaciones puntuales, líneas celulares. Delecciones 5% casos.	Inactivación.	Hyun et al., 2000 Chang et al., 2006a

También se ha observado que la hipermetilación de promotores génicos es un evento frecuente en MM. Se ha observado hipermetilación de los genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *SOCS1* en el 75% (*p15* y *p16*), 67% y 63% de los pacientes y líneas celulares de MM. Las proteínas *p15* y *p16* son reguladores del ciclo celular que está involucrado en la inhibición de la progresión de G1, la proteína codificada por *DAPK* regula la apoptosis inducida por interferón y las proteína *SOCS1* parece estar involucrada en la vía JAK/STAT suprimiendo la señalización mediante IL-6.

3.6.2. Perfiles de expresión génica en MM.

Han sido numerosos los estudios de perfiles de expresión génica (PEG) que se han realizado en MM (Margalit et al., 2005; Shaughnessy, 2003). El primer estudio de microarrays en mieloma identificó cuatro subgrupos de mielomas (Zhan et al., 2002), de MM1 a MM4, y encontraron correlaciones de los PEG entre unos subgrupos específicos y las CP normales, los perfiles de GMSI con el grupo MM1 y líneas celulares con el MM4. Además de esto, en este estudio se encontró una correlación entre el PEG de determinados genes y las translocaciones de Ig, así como, describieron un grupo de genes que discriminan entre las células de MM y las CP normales. En otros estudios, también han

comparado la expresión de CP normales con las CP de mieloma, utilizando tanto arrays de ADNc u oligonucleótidos, y han propuesto genes sobre-expresados como nuevas dianas terapéuticas (Claudio et al., 2002; De Vos et al., 2001; De Vos et al., 2002). Posteriormente, se ha estudiado la correlación entre los cuatro grupos de MM descritos anteriormente y los diferentes estadios de diferenciación de células B (las células B de amígdala, CP de amígdala y CP de médula ósea) (Zhan et al., 2003).

En otro estudio compararon los PEG de pacientes con lesiones óseas y de pacientes sin lesiones óseas en el momento del diagnóstico, demostrando que solo había cuatro genes sobre-expresados diferencialmente en los pacientes con lesiones, y entre ellos encontraron el gen *DKK1* que está asociado a la formación de estas lesiones (Tian et al., 2003).

Hay estudios que han intentado correlacionar los PEG con las ganancias y pérdidas de cromosomas detectadas mediante FISH (Shaughnessy et al., 2003). Se ha observado que la mayoría de los genes con la expresión alterada en el cromosoma 13, presentaban una represión de la expresión. También, han realizado análisis que han estudiado los PEG de determinadas translocaciones (Agnelli et al., 2005; Dring et al., 2004; Hurt et al., 2004) o que han intentado clasificar los pacientes en función de las translocaciones (Fabris et al., 2005; Mattioli et al., 2005). Estos estudios mediante el análisis de PEG están siendo cada vez más numerosos en MM, y muchos también estudian el efecto de distintas drogas en líneas celulares.

3.6.3. La expresión de ciclinas D es un evento temprano en el desarrollo de MM.

Se han propuesto dos vías oncogénicas en MM y en GMSI: una vía NH, asociada con una alta prevalencia de translocaciones de *IGH* y la vía H que esta asociada con la presencia de trisomías. Diferentes estudios de PEG han mostrado que la expresión de ARNm *CCND1*, *CCND2* y *CCND3* en pacientes con GMSI y MM es superior a la de CP normales (Tarte et al., 2002; Zhan et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado que la mayoría de las GMSI y MM desregulan alguna de las ciclinas D (Bergsagel et al., 2005). Al menos un 25% de los casos desregula las ciclinas mediante translocación directa de los genes *CCND1* o *CCND3* con los genes de Ig, o mediante translocación de los genes *MAF* con las Ig que da lugar a la expresión de *CCND2*. Además, aunque no se conoce bien el mecanismo, parece que la mayoría de los mielomas con t(4;14) también muestran una expresión de *CCND2* aumentada. El 40% de los tumores expresa *CCND1* y la mayoría son mielomas H que no presentan la t(11,14). También, se han observado casos que expresan

CCND2 en ausencia de translocaciones (Figura 4) y solamente un 2% de los casos no expresan ninguna de las tres ciclinas D (Bergsagel et al., 2005). Parece que esta desregulación de las ciclinas D en GMSI y MM, por ambos mecanismos, es un evento patogénico temprano y de unificación, si no iniciador del MM ya que parece que confiere la capacidad de responder mejor a estímulos de proliferación a las células. La expresión de una de las ciclinas D facilitaría la activación de CDK4 o CDK6, que fosforila a RB, liberando a E2F, lo cual permitiría la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular (Figura 4).

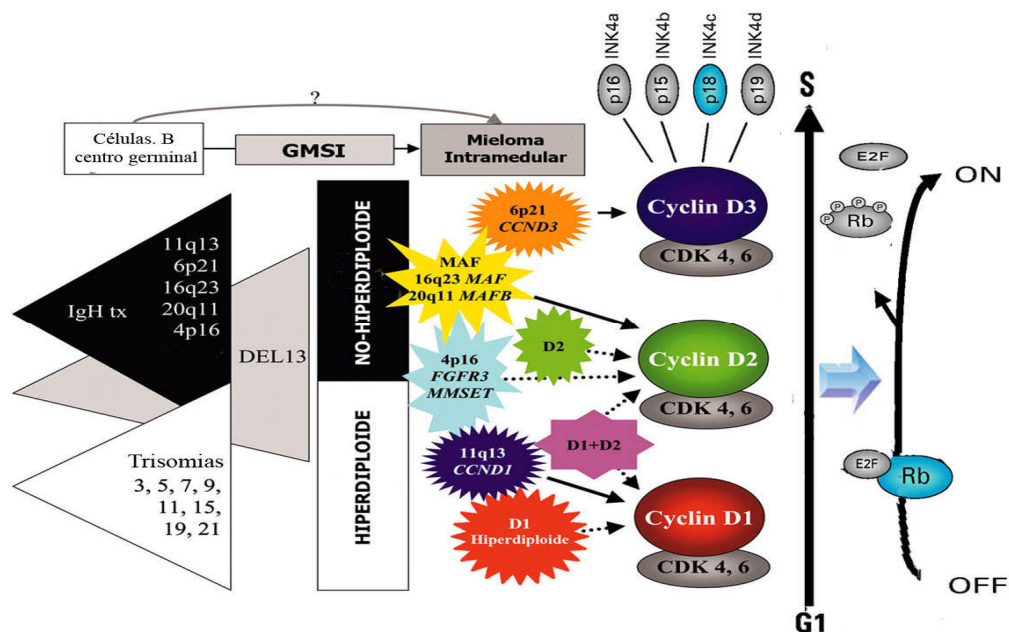


Figura 4. Eventos oncogénicos en MM. Los eventos oncogénicos más tempranos parecen involucrar tres vías que se superponen y que probablemente ocurran en las células B del centro germinal. Además de las vías parcialmente superpuestas de mielomas NH o H, la deleción del cromosoma 13 puede aparecer en ambos grupos, aunque parece que la prevalencia de $\Delta 13$ es mayor en los mielomas NH. Todas estas alteraciones conducen a la desregulación de una de las ciclinas D por diferentes mecanismos, lo cual permite una clasificación basada en las vías oncogénicas implicadas en la desregulación de una de las ciclinas D (grupos TC). La expresión de las ciclinas D activa las proteínas CDK4 ó 6 lo cual permite la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. Figura tomada y modificada de Bergsagel & Kuehl 2005 y Bergsagel et al. 2005.

Recientemente el análisis supervisado de PEG ha mostrado la base para una clasificación molecular del MM. De este modo se ha propuesto una clasificación que integra todos estos datos denominada TC (translocación/ciclina D). Brevemente, los tumores se dividen en ocho grupos TC: 11q13, 6p21, 4p16, MAF, D1, D1+D2, D2, y NONE (Tabla 8). Los tumores de los grupos 11q13 y 6p21 expresan niveles altos de *CCND1* y *CCND3* como resultado de la translocación con Ig; los tumores D1 expresan

ectópicamente niveles moderados de *CCND1*, y no presentan la t(11;14); el grupo D1+D2 además de expresar *CCND1* expresa niveles moderados de *CCND2*; el grupo TC D2 se caracteriza por expresar niveles de *CCND2* superiores a las CP normales; los grupos 4p16 y MAF expresan *CCND2* como resultado indirecto de estas translocaciones y finalmente un pequeño porcentaje de los casos no expresa ninguna de las tres ciclinas D.

Tabla 8. Clasificación TC (Bergsagel and Kuehl, 2005).

Grupo	t	Genes punto de rotura	Ploidía	Ciclina D	%	Pronóstico
11q13	11q13	CCND1	D, NH	CCND1	16	Bueno
D1	-----	-----	H	CCND1	34	Bueno
D1 +D2	-----	-----	H	CCND1 + CCND2	6	? Malo
D2	-----	-----	H, NH	CCND2	17	?
4p16	4p16	FGFR3/MMSET	NH > H	CCND2	15	Malo
MAF	16q13	MAF	NH	CCND2	5	Malo
	20q11	MAFB			2	
6p21	6p21	CCND3	NH	CCND3	3	? Bueno
NONE	-----	-----	NH	-----	2	? Bueno

t: translocación, D: diploide, NH: no-hiperdiploide; H: hiperdiploide; %: porcentaje.

A pesar de la progresión de los tumores, estos grupos presentan un PEG diferencial y se han observado diferencias en la prevalencia de lesiones óseas, frecuencia de recaídas y progresión extramedular del tumor. Por ejemplo, el grupo TC D1 parece menos frecuente en PCL y en líneas celulares, por lo que parece que tiene una mayor dependencia de la interacción con las células del estroma de la medula ósea. Por otro lado, los grupos TC 6p21, TC 11q13, TC D1 y TC D1+D2 presentan una alta frecuencia de lesiones óseas mientras que en los grupos TC 4p16 y MAF es menor. También se ha propuesto que los grupos TC presentan un comportamiento clínico distinto (Bergsagel et al., 2005). No obstante, aunque esta clasificación representa a casi todos los GMSI y MM puede necesitar de modificaciones según se vayan identificando nuevos factores de iniciación y progresión, que además podrían ayudar en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

3.7. FACTORES PRONÓSTICOS.

Se han identificado numerosos factores pronósticos de los que se ha demostrado su utilidad para aconsejar a los pacientes (Tabla 9). De acuerdo con los sistemas de estadificación de mieloma de Durie y Salmon y del ISS, los pacientes con estadios iniciales

tienen una tasa de supervivencia mayor que aquellos con una enfermedad avanzada (Durie and Salmon, 1975; Greipp et al., 2005) Por otro lado, también se tienen que considerar variables clínicas o de laboratorio como la edad, el estado físico, el número de plaquetas, los niveles de hemoglobina, los niveles de albúmina, creatinina y calcio en suero (Durie et al., 2003; Greipp et al., 2005). Sin embargo, hay otros factores como los niveles de β 2-microglobulina y el índice de células plasmáticas proliferantes en médula ósea (*bone marrow plasma cell labeling index*) de los que se ha demostrado repetidamente que tienen un valor pronóstico independiente (Greipp et al., 2005; Rajkumar and Greipp, 1999). La presencia de células con morfología plasmablástica, los niveles altos de lactato deshidrogenasa (LDH), la presencia de CP circulantes también son otros factores pronósticos en MM (Durie et al., 2003; Greipp et al., 2005).

Tabla 9. Factores pronósticos en MM (Durie et al., 2003; Greipp et al., 2005).

Factor	Pronóstico
Clínicos	
Edad	Joven- mejor
Estado físico	Bajo-peor
Test de laboratorio	
β 2-microglobulina	Alto- peor
Albúmina en suero	Bajo-peor
Creatinina en suero	Elevado-peor
Niveles LDH	Elevado-peor
Proteína C reactiva	Elevado-peor
Hemoglobina	Bajo-peor
Plaquetas	Bajo-peor
Test especializados	
Índice de células plasmáticas proliferantes	Alto-peor
Morfología células plasmáticas	Plasmablástico-peor
Estadio DS/ISS	
	Enfermedad avanzada- peor
	Extramedular- peor.
Citogenética	
t(4;14)	Peor
t(14;16)	Peor
t(11;14)	Mejor
del 13q	Peor ?
Ploidía	Hipodiploidía- peor
del 17p13	Peor

Al igual que en otras neoplasias hematológicas la citogenética se ha convertido en uno de los hallazgos más importantes en el estudio de los factores pronósticos. Es por ello que actualmente el análisis citogenético es obligatorio en pacientes con mieloma. Se ha mostrado que la presencia de Δ 13 en pacientes tratados con quimioterapia a altas dosis, seguido de trasplantes autólogos, está asociado con una menor supervivencia (Tricot et al., 1995; Tricot et al., 1997). Este efecto adverso también se ha observado en pacientes

tratados con terapia convencional (Fonseca et al., 2002b; Zojer et al., 2000). Se ha sugerido que el impacto pronóstico de la deleción 13 es superior cuando es detectado en citogenética convencional, comparado con la técnica de FISH, ya que en la citogenética convencional las CP no solo reflejan la alteración cromosómica sino que también reflejan la capacidad de proliferación. A pesar de que existen numerosas publicaciones en las que la detección de las monosomías 13 mediante FISH tiene relevancia pronóstica (Fonseca et al., 2002b; Fonseca et al., 2001; Zojer et al., 2000), estudios recientes sugieren que las deleciones en el cromosoma 13 podrían no ser tan importantes como las t(4;14), t(14;16) y la deleción de 17p13 para estimar la supervivencia (Chang et al., 2005; Chng et al., 2006b; Gertz et al., 2005).

Se han descrito ciertas alteraciones que repetidamente confieren peor supervivencia, entre ellas se incluyen t(4;14), t(14;16) y del 17p13 (*TP53*) (Fonseca et al., 2003a; Gertz et al., 2005; Moreau et al., 2002). Al contrario, la presencia de la t(11;14) parece tener un pronóstico favorable (Fonseca et al., 2002a). Además, la presencia de cariotipos complejos, así como hipodiploides se ha asociado con una mala respuesta al tratamiento. Otros factores potenciales de mal pronóstico son alteraciones en el cromosoma 1 y deleciones del cromosoma 22 (Calasanz et al., 1997b; Debes-Marun et al., 2003). Por otro lado, las trisomías de los cromosomas 9, 11 y 17 parecen tener una influencia favorable en el pronóstico (Perez-Simon et al., 1998).

3.8. TRATAMIENTO.

A pesar de los avances en el tratamiento del mieloma, esta neoplasia sigue siendo incurable, aunque se han mejorado las tasas de remisión completa (RC) y de supervivencia global (SG) (Barlogie et al., 2004). Actualmente, para el tratamiento de pacientes al diagnóstico de MM, se utiliza una variada combinación de drogas. De este modo el mayor número de RC se logra después de los tratamientos de altas dosis (HDT) (Davies et al., 2001; Levy et al., 2005). La combinación de HDT con los trasplantes autólogos de células madre ha conseguido aumentar la respuesta y la supervivencia, no obstante el 90% de los pacientes recaen (Durie et al., 2003). Por otro lado, el grupo Cooperativo Español (PETHEMA) realizó un ensayo clínico prospectivo que mostró que la intensificación de la HDT en los pacientes que habían respondido a la quimioterapia inicial, aumenta significativamente la tasa de RC pero no tiene un impacto en la supervivencia libre de progresión ni en la supervivencia global (Blade et al., 2005).

La Fundación Internacional de Mieloma (*The International Myeloma Foundation*) ha desarrollado un esquema para el tratamiento del Mieloma (Figura 5). El tratamiento de inducción es diferente en los pacientes que son elegibles para realizar un trasplante autólogo de los que no son elegibles para el trasplante. Para alargar la remisión y supervivencia de los pacientes, se realiza un tratamiento de consolidación. Este tratamiento consiste en el trasplante de células madre autólogas, bien dobles o en tándem, en los pacientes legibles para trasplante, mientras que los pacientes que no son transplantados reciben un tratamiento con agentes alquilantes. Después de alcanzar la respuesta parcial o total, se puede dar una terapia de mantenimiento (Durie et al., 2003; Kyle and Rajkumar, 2004).

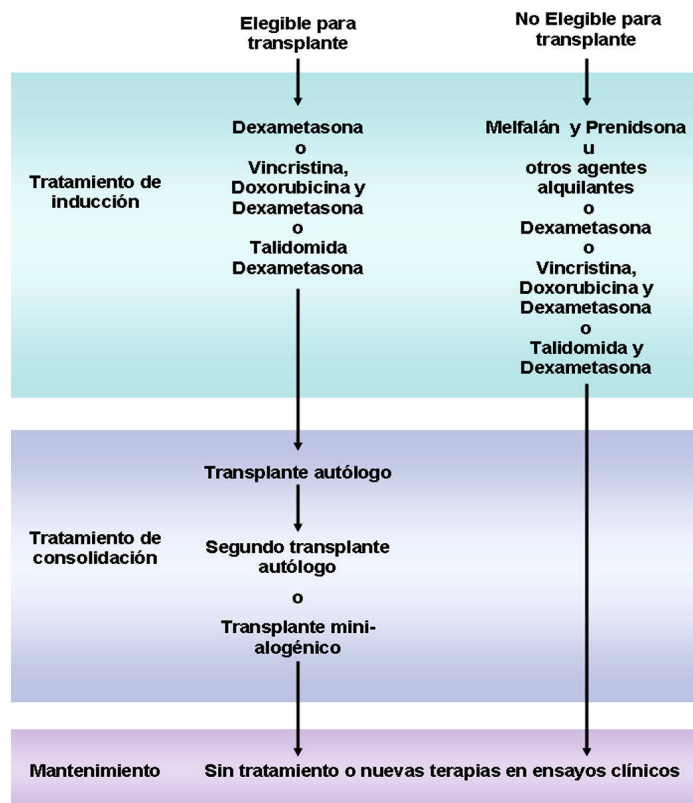


Figura 5. Opciones terapéuticas del MM (Durie et al., 2003; Kyle and Rajkumar, 2004).

Sin embargo, después del tratamiento, casi todos los pacientes recaen y necesitan ser tratados. Si las recaídas ocurren después de seis meses se le puede administrar la misma terapia inicial o un nuevo trasplante (Kyle and Rajkumar, 2004). Actualmente existen múltiples ensayos clínicos que estudian la eficacia de nuevas terapias (Richardson et al., 2005; San Miguel et al., 2006). Además del tratamiento de la enfermedad en sí, los

pacientes también reciben terapias de apoyo o para las complicaciones que adquieren a lo largo de la enfermedad (Durie et al., 2003).

A pesar de los tratamientos existentes, actualmente se siguen buscando nuevos agentes terapéuticos frente al MM. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología del mieloma han permitido identificar las vías específicas que intervienen en la señalización, e interacción del mieloma con el micro-ambiente de la médula ósea. Algunas de las proteínas de estas vías se han convertido en dianas terapéuticas potenciales, y se están desarrollando drogas específicas que bloqueen su función (Tabla 10), algunas de ellas se encuentran en ensayos clínicos para evaluar su aplicación en MM. (Hideshima and Anderson, 2002; Hideshima et al., 2002; Hideshima et al., 2003)

Tabla 10. Nuevos agentes terapéuticos en MM (Hideshima et al., 2003)

1. Agentes que bloquean las células mielomatosas y las interacciones de las células de MM con el micro-ambiente de la médula ósea.

Talidomida y análogos (IMiDs, S-3APG)*
 Inhibidores del proteosoma (PS-341)*
 Trióxido de arsénico *
 2- metoxiestradiol (2-ME2)*
 Inhibidores de aciltransferasas de ácido lisofosfatídico

2. Agentes que bloquean los circuitos que intervienen en el crecimiento y supervivencia de las células de MM.

Inhibidores de tirosinas quinasa del VEGFR (PTK787/ZK222584)
 Inhibidores de farnesil transferasas*.
 Inhibidores de deacetilasas de histonas (SAHA, LAQ824)
 Inhibidores de hsp90 (geldanamicina)
 Inhibidores de telomerasa (Telomestatin)
 Agentes estabilizadores de microtúbulos (Epothilone B)
 Oligonucleótidos antisentido de Bcl-2 (GenasenseTM) *

3. Agentes que bloquean el micro-ambiente de la médula ósea

Inhibidores de IKB quinasa (PS-1145)
 Inhibidores de p38 MAPK (VX-745)
 Neovastat (AE-941) *

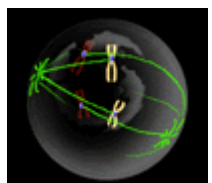
4. Agentes que bloquean receptores de superficie.

Ligando de Apo 2
 Inhibidor del receptor de IGF-1 (ADW)
 Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas)
 Ab anti-CD20 (rituximab)*

* En ensayos clínicos.

Por último, se están explorando dos vías, una para incrementar la tasas de respuesta total con los métodos disponibles, para poder encontrar una cura de MM, y la otra que pretende controlar el mieloma mediante el tratamiento con agentes convencionales y los nuevos para intentar mantenerlo como una enfermedad crónica (Kyle and Rajkumar, 2004).

OBJETIVOS



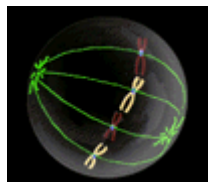
El mieloma múltiple es una enfermedad heterogénea respecto a la evolución clínica y respuesta al tratamiento. Para entender la patogénesis del mieloma se tienen que observar, al menos, dos elementos: el primero es la estrecha interacción de las células del mieloma con las células del estroma médula ósea, lo que permite, su crecimiento, diferenciación y supervivencia. En segundo lugar, hay que reconocer que las alteraciones genéticas están virtualmente presentes en todos los mielomas. Estas alteraciones genéticas pueden ser translocaciones, que implican a los genes de Ig y a un oncogen, ganancias y/o pérdidas de cromosomas o regiones cromosómicas específicas, o una combinación de ambos tipos de alteraciones. Cada vez va aumentando más el conocimiento sobre el papel que juegan las translocaciones en mieloma, sin embargo, se conoce menos el papel que juegan las ganancias y las pérdidas.

Las ganancias o amplificaciones genómicas son eventos de especial interés si están asociados a sobre-expresión de un gen o algunos genes que están situados en esa región. Estos eventos se han observado frecuentemente en distintos tipos de tumores y han sido utilizados para el diseño de nuevos agentes terapéuticos. Por ejemplo, en cáncer de mama se ha observado la sobre-expresión de Her2/Neu asociada a la amplificación genómica en un 15-20 % de los casos, esta proteína representa la diana terapéutica de la terapia con Trastuzumab. Por lo tanto, la identificación de genes que se encuentran ganados y/o amplificados y se expresan de forma ectópica o excesiva en el MM, podría ofrecer un nuevo espectro de dianas terapéuticas.

Por otro lado, la identificación de estas regiones de ganancia y pérdida con nuevas técnicas de citogenética molecular puede ayudar en la comprensión de la patogénesis del mieloma. Así mismo, podrían encontrarse nuevos marcadores de pronósticos o ayudar en la estratificación de los pacientes. Por todo ello nuestros objetivos son:

1. Identificación de la sobre-expresión de genes en regiones con ganancia/amplificación del número de copias en líneas celulares de mieloma.
 - 1.1. Caracterización de las líneas celulares mediante citogenética molecular (CGH y FISH) para la determinación de ganancias/pérdidas y de las translocaciones de Ig presentes en las líneas.
 - 1.2. Análisis de los perfiles de expresión génica de las líneas de MM mediante arrays de ADNc, para la identificación de genes sobre-expresados y reprimidos.
 - 1.3. Determinación de las variaciones en el número de copias genómicas en las líneas de MM mediante arrays de CGH en chips de ADNc.
 - 1.4. Validación de resultados de los genes candidatos mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), PCR a tiempo real e inmunohistoquímica (IHQ).
2. Caracterización de las variaciones en el número de copias (perfiles genómicos) de muestras primarias de MM enriquecidas en células plasmáticas, mediante arrays de oligonucleótidos de alta resolución.
 - 2.1. Identificación de regiones mínimas comunes para identificación de nuevos genes candidatos.
 - 2.2. Determinación de subgrupos de mieloma basados en los resultados de los perfiles genómicos.
 - 2.3. Caracterización de nuevos marcadores genéticos identificados mediante el análisis de los perfiles genómicos.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS I: IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE.

1. LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE.

Se obtuvieron nueve líneas celulares de MM (RPMI-8226, SK-MM-2, U-266, OPM-2, JJN-3, LP-1, NCI-H929, KARPAS-620 y L-363) del DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) y se cultivaron según las condiciones especificadas para cada una de ellas (Tabla 11). Se incubaron a 37°C con 5% CO₂

Tabla 11. Características de las líneas celulares.

Línea celular	Tipo celular	Medio cultivo
JJN-3 (Jackson et al., 1989)	PCL	40% Iscove's MDM+ 40% DMEM +20% SBF.
KARPAS-620 (Nacheva et al., 1990)	PCL	80% RPMI 1640 +20% SBF+IL6.
L-363 (Diehl et al., 1978)	PCL	85% RPMI 1640 +15% SBF.
LP-1 (Pegoraro et al., 1989)	MM	80% Iscove's MDM +20% SBF
NCI-H929 (Gazdar et al., 1986)	MM	80% RPMI 1640 +20% SBF+IL6.
OPM-2 (Katagiri et al., 1985)	MM	90% RPMI 1640 +10% SBF.
RPMI-8226 (Katagiri et al., 1985)	MM	90% RPMI 1640 +10% SBF.
SK-MM-2 (Eton et al., 1989)	PCL	90% RPMI 1640 +10% SBF.
U-266 (Nilsson, 1970)	MM	90% RPMI 1640 +10% SBF.

1.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Para los ensayos con microarrays es necesario una gran cantidad de ADN que se extrajo con *DNAzol® Genomic Isolation Reagent* (Molecular Research Cancer Center, Inc, Cincinnati, OH) siguiendo el protocolo proporcionado por los proveedores. Brevemente:

- Se centrifuga la suspensión de células para recoger el pellet.
- Se añade 1 ml de DNAzol® y se mezcla con la pipeta hasta que no haya grumos.

Se incubó 2 horas a temperatura ambiente (T.A.) en agitación.

- Se centrifuga 10 min. a 10000 rpm. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio.

- Se añaden 500 µl de etanol absoluto a -20°C por cada ml de *DNAzol*® utilizado, se mezcla por inversión hasta ver el ovillo de ADN. Se centrifuga 5 min. a 13000 rpm y se lava el pellet con 500 µl de etanol al 70% frío (-20°C).

- El ADN se resuspende en TE 0.1% (Tris 10mM, EDTA 1mM).

- Se verifica la calidad del ADN en un gel de agarosa al 1% (m/v) y se mide la concentración en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Innovadyne Technologies, Inc, Santa Rosa, California).

1.2. EXTRACCIÓN ARN.

En la extracción de ARN total se utilizó el reactivo *Tri Reagent*® (Molecular Research Cancer Center, Inc, Cincinnati, OH). Debido a la labilidad del ARN en todo momento las muestras se mantienen en hielo y las centrifugaciones se hacen a 4°C .

- Se centrifuga la suspensión celular para obtener el pellet y se lava dos veces con 1.5 ml de PBS 1X+DEPC 0.1 %.

- Poco a poco se va añadiendo 1 ml de *Tri Reagent*®. Se homogeneiza hasta que todo el pellet se haya disgregado y se incuba 15 min. a T.A. para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.

- Se añaden 200 µl de cloroformo por cada ml de *Tri Reagent*® utilizado y se mezcla por inversión. La mezcla se incuba 5 min. a T.A. y se centrifuga 10 min. a velocidad máxima

- La fase acuosa (fase superior) se pasa a un tubo limpio sin tocar la interfase. Se añaden 500 µl de isopropanol por cada ml de *Tri Reagent*® utilizado y se mezcla por inversión. Se incuba en hielo de 30 a 60 min. Se centrifuga 20 min. a velocidad máxima y se elimina el sobrenadante.

- El pellet de ARN se lava con etanol 70% frío (-20°C). Se retira el sobrenadante y se resuspende en 20 µl H_2O ultrapura libre de ARNasas.

- Por último se comprueba la calidad del ARN en un gel de agarosa 1.2% (m/v) y se mide la concentración en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Innovadyne Technologies, Inc, Santa Rosa, California).

1.3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CITOGÉNÉTICAS.

Para los estudios de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se obtuvieron suspensiones citogenéticas de las nueve líneas. Brevemente, se separan 10 ml de las células en cultivo y se detiene la mitosis añadiendo colchicina (0.1 µg/ml, 1.5 horas, 37°C; GIBCO, Strachclyde, UK) para obtener un número elevado de células cuyo ciclo celular está detenido en metafase. Se provoca un choque hipotónico con KCl 75 mM, (30 min., 37°C) y después de sucesivos lavados se fija con metanol/ acético (3:1) antes de hacer las extensiones sobre los portas.

1.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Se lavan las células 2 veces en PBS frío a 100 rpm durante 5 min. y se elimina el exceso de PBS. Después las células se lisan con 200 µl de tampón de lisis 1X en la cámara fría, en la noria durante 1 hora. Se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Si no obtenemos pellet se vuelve a centrifugar, se recoge el sobrenadante y se mide la concentración con en el NanoDrop® ND-1000 (Innovadyne Technologies, Inc, Santa Rosa, California).

Tampón de Lisis 2X: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl. 1% Igepal I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).

Buffer de Lisis 1x: 40 µl Inhibidor de Proteasas 25X (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 460 µl de agua destilada y 500 µl tampón de lisis 2X

1.5. OBTENCIÓN DE CITOSPINES.

- Se separa una alícuota de células en cultivo y se centrifuga a 900 g durante 5 min. El pellet se diluye a 5×10^4 células/ 200 µl en PBS1X suplementado con 10% SBF.

- Se preparan los cristales con los filtros ThermoShandon (Thermo Electron Corporation), y los embudos.

- Se añaden 200 µl de la suspensión de células en cada pocillo y se centrifuga 5 min. a 10000 rpm en la centrifuga Shandon Cytospin® 3.

- Se dejan secar toda la noche y se fijan sumergiendolos en acetona durante 10 min. Se dejan secar a T.A. al menos media hora y se congelan a -20°C si no los vamos a usar en seguida.

2. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).

La hibridación *in situ* fluorescente permite la localización de secuencias de ADN específicas sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y tejidos congelados o parafinados. Esta técnica se basa en la hibridación de un fragmento de ADN marcado con un fluorocromo (sonda) sobre su secuencia complementaria del genoma de la muestra. Existen tres tipos de sondas:

- Sondas centroméricas: hibridan con las regiones centroméricas de los cromosomas. Estas sondas permiten detectar alteraciones numéricas (ganancias o pérdidas de cromosomas enteros).
- Sondas de pintado cromosómico: son aquellas que hibridan a lo largo de todo un cromosoma y permiten detectar alteraciones numéricas y estructurales sobre metafases.
- Sondas de secuencia única: estas sondas hibridan con una región específica del cromosoma, que puede ser un gen u otra región.

Las sondas empleadas pueden ser comerciales para la detección de alteraciones típicas en el diagnóstico y sondas obtenidas a partir de cromosomas artificiales (BACs generalmente) que son marcados fluorescentemente mediante el método desplazamiento de la mella (*Nick translation*).

2.1. OBTENCIÓN DE SONIDAS PARA FISH.

2.1.1. Diseño de las sondas.

A partir de la secuenciación del genoma humano se ha generado una gran cantidad de información sobre librerías de clones, tanto localizados como secuenciados que son de gran utilidad en la citogenética molecular. Actualmente se puede obtener información de las regiones cromosómicas en distintas bases de datos: *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *Nacional Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el buscador genómico de la Universidad de Santa Cruz de California (UCSC) (<http://www.genome.cse.ucsc.edu/index.html>). Estos buscadores permiten la localización de clones que cubran las regiones de interés, ya que muestran la posición relativa de los genes y los distintos BACs (cromosomas artificiales derivados de bacterias) y PACs (cromosomas artificiales derivados de P1). Los BACs son los más utilizados. Estos clones permiten el aislamiento de fragmentos de ADN plasmídico de entre 100-200 Kb que son lo suficientemente grandes para utilizarlos en estudios de FISH. Estos cromosomas

artificiales se pueden adquirir fácilmente en *Children Hospital Oakland Research Institut* (<http://www.chori.org/bacpac/>) o en *CalTech BAC* (<http://www.informa.bio.caltech.edu/>).

2.1.2. Cultivo de los clones bacterianos.

Los clones se suministran en LB sólido e inestable que limita su viabilidad. A partir de estos clones bacterianos se realiza un cultivo en medio sólido para el aislamiento de colonias, mediante una siembra por agotamiento de asa, a 37°C toda la noche. El medio utilizado es LB (Luria Bertani, 10 g/l *Bacto-tryptone*, 7.5 g/l *Bacto Yeast Extract* y 10 g/l NaCl a pH 7.5) suplementado con cloranfenicol 20 µg/ml o kanamicina 25 µg/ml dependiendo del tipo de clon utilizado. Para obtener una cantidad suficiente de ADN se seleccionó una de las colonias y se cultivó en 10 ml de LB líquido suplementado con antibiótico, durante toda la noche, a 37°C con agitación (250 rpm).

Para preservar los clones se congelan dos viales de cada clon con 800 µl del cultivo líquido, con 200 µl de glicerol estéril. Los sucesivos cultivos se realizan a partir de estos reservorios.

2.1.3. Extracción del ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el método de lisis alcalina. Brevemente, las bacterias se someten a una lisis de la membrana bacteriana. Después se solubilizan las proteínas con un detergente y las membranas se precipitan con isopropanol. Finalmente los plásmidos son precipitados con acetato sódico y etanol absoluto. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se centrifuga el medio con las bacterias durante 10 min. a 4000 rpm. Se elimina el medio de cultivo y nos quedamos con el pellet bacteriano.
- Se resuspende el pellet con 300 µl de GTE (Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH=8, EDTA 10 mM). Se transfiere la suspensión celular a un tubo limpio y poco a poco se añade 600 µl de solución alcalina (0.2 N NaOH, 1% SDS) recién hecha. Se mezcla por inversión varias veces y se incuba 5 min. en hielo.
- Para separar las proteínas y el ADN bacteriano de los plásmidos, se añaden 500 µl de acetato amónico 7.5 M. Se mezcla inmediatamente invirtiendo varias veces y se deja en hielo durante 10 min.
- Para eliminar el precipitado se centrifuga a 13000 rpm durante 20 min. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y se repite este paso.

- El ADN plasmídico se precipita añadiendo 700 µl de isopropanol. El pellet de ADN se resuspende en 100 µl de agua y se trata con 1 µl de ARNasa (10 mg/ml) durante media hora a 37°C para eliminar el ARN bacteriano que ha precipitado.

- Volver a precipitar los BACs con 1/10 volúmenes acetato sódico (3 M y pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Incubar a -80°C durante 20 min. Centrifugar 15 min. a 14000 rpm y lavar con etanol 70%.

- Resuspender en agua estéril (100 µl). Medir la concentración en NanoDrop® ND-1000 (Innovadyne Technologies, Inc, Santa Rosa, California) y se comprueba la calidad cargando 5 µl en un gel de agarosa (1% m/v).

2.1.4. Marcaje de la sonda.

Una vez extraídos los ADN de interés, se procede al marcaje mediante el método de desplazamiento de la mella (*nick translation*). El marcaje consiste en la incorporación de dUTPs conjugados con fluorocromos en el ADN. Este marcaje es posible gracias a la acción de dos enzimas, ADNasa I y ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. La ADNasa I tiene actividad endonucleasa, es capaz de producir mellas al azar en el ADN. Estas roturas permiten la adición de nuevos nucleótidos, que pueden estar conjugados con fluorocromos, mediado por la actividad polimerasa 5'→3' de la ADN polimerasa I. Al mismo tiempo se eliminan los nucleótidos adyacentes mediante la actividad 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. De este modo la mella se va desplazando en sentido 5'→3' (Figura 6). Cuando se encuentran cortes en las dos hebras, el ADN se fragmenta. Como los fragmentos se producen al azar, el ADN se marca uniformemente.

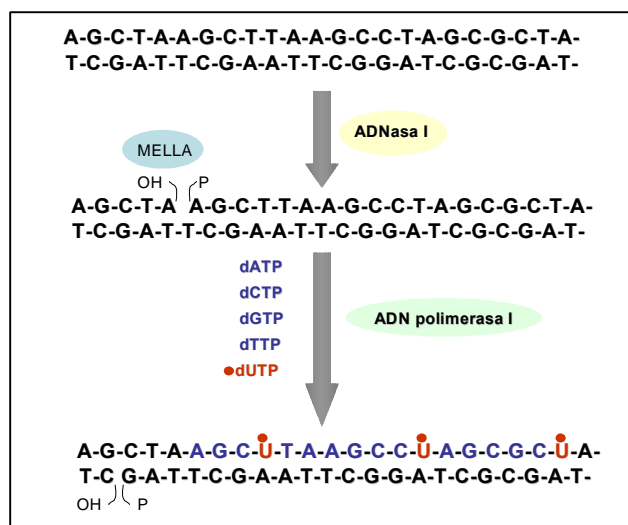


Figura 6. Marcaje de ADN mediante desplazamiento de la mella. La ADNasa I introduce mellas al eliminar el enlace fosfodiéster entre las bases; se genera un extremo 3'OH y un 5' con un fosfato libre. La ADN polimerasa incorpora los nuevos nucleótidos en sentido 5'→3' mientras va desplazando la mella eliminando nucleótidos a partir del extremo 5' libre

El marcaje se realiza con *CGH Nick Translation Kit* (Vysis, Downers Grove, USA). Este kit incluye las enzimas ADNasa I y ADN polimerasa I, el tampón de reacción 10X y los dNTPs sin conjugar. Brevemente el protocolo es el siguiente:

- Se prepara la mezcla de dNTPs 0.1 mM mezclando 10 µl de dATP 0.3 mM, 10 µl dGTP 0.3 mM y 10 µl dCTP 0.3 mM.
- Preparar la solución de dTTP 0.1 mM diluyendo tres veces los dTTPs 0.3 mM con agua.
- Se prepara el SpectrumGreen (SG) o SpectrumRed (SR) dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) 0.2mM. El dUTP viene liofilizado, se resuspende con 50 µl de agua estéril y después, se diluyen 10 µl de dUTP (SG o SR) con 40 µl de agua estéril.
- En un tubo se mezclan:

ADN	XµL
Tampón 10x	5µl
dNTPs 0.1mM	5µl
dTTP 0.1mM	5µl
SR/ SG dUTP 0.2mM	2µl
Enzimas	10µl
H ₂ O.	Yµl
Volumen final	50µl

- La mezcla se incuba durante 2 horas a 15°C. Después se carga un gel de agarosa 1% (m/v) para comprobar que los fragmentos se encuentran 250 pb-1000 pb, si está muy por encima volver a incubar un poco más.

- Cuando los fragmentos se encuentran en el tamaño adecuado la mezcla se incuba a 70°C durante 10 min. para que se produzca la ruptura de la enzima.

- Después, el ADN se purifica con *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Se añaden 5 volúmenes de tampón PB, se pone la mezcla en la columna y se centrifuga a 13000 rpm durante un min. En esta centrifugación se eliminan los nucleótidos no incorporados que podrían interferir en la hibridación posterior. Se lava con 750 µl de buffer PE y centrifugar 1 min. El ADN marcado se eluye con 100 µl de agua estéril a 65°C.

- Finalmente, se precipita la sonda junto con 20 µl de Human Cot-1[®] DNA (1 µg/µl) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), con etanol absoluto y acetato sódico (3

M, pH 5), se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se resuspende en 10 µl de agua estéril. El Cot 1 son secuencias de ADN que bloquean secuencias repetitivas.

2.2. PROTOCOLO DE FISH.

Los estudios de FISH se realizaron sobre suspensiones citogenéticas obtenidas a partir de las líneas.

2.2.1. Preparación de la sonda.

Un µl de cada sonda se diluye con 7 µl de tampón de hibridación LSI/WCP (Vysis, Downers Grove, USA), que contiene dextrán sulfato, formamida y SSC pH 7, y 2 µl de agua. La mezcla de hibridación se incuba a 37°C durante una media hora para el pre-anillamiento.

2.2.2. Preparación de la muestra.

Las extensiones se envejecen en una placa térmica a 90°C durante 10 min. Después se deshidratan, pasando los portas por una serie de alcoholes de gradación creciente (70%, 80% y 100%) durante 3 min. en cada uno. Se dejan secar a temperatura ambiente.

2.2.3. Hibridación, desnaturalización e incubación.

La mezcla de hibridación previamente preparada se añade sobre el portaobjetos, se coloca un cubreobjetos cuyo tamaño depende de la extensión del área de hibridación y se desnaturalizan en un solo paso tanto la sonda como la muestra, calentando los cristales a 75°C durante 1min. Se incuba toda la noche en una estufa a 37°C dentro de una cámara húmeda.

2.2.4. Lavados post-hibridación.

En los experimentos de hibridación se producen uniones inespecíficas que se deben eliminar para que no interfieran de modo negativo en el análisis. La restricción de un lavado depende de la concentración de sales, la concentración de detergente y la temperatura. Un lavado será más restrictivo cuanto menor sea la concentración salina, mayor la de detergente y cuanto más alta sea la temperatura.

El primer lavado consiste en una solución de 0.4XSSC con 0.3% de NP-40 a 75°C durante dos minutos. Después se introduce en otro coplin que contiene una solución de 2XSSC con 0.1% de NP.40 a T.A., 5 min. en agitación. Finalmente, se lavan en PBD1X a T.A. Se deja escurrir el exceso de PBD1X.

Como tinción de contraste se utiliza una mezcla 1:1 de DAPI (Vysis, Downers Grove, USA) y solución antidecaimiento o *antifade* (Qbiogene, Heidelberg, Alemania). El DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol) se intercala en el ADN y permite su visualización de color azul cuando se excita con una longitud de onda determinada.

2.2.5. Captura y análisis de las imágenes.

Para la captura de imágenes se utilizó un microscopio epifluorescente (Olympus AX60) acoplado a una cámara digital (Sensys). La captura y posterior análisis de las imágenes se realizó con el programa *CytoVision Image Analysis System software* (Applied Imaging, Newcastle, UK). Se analizaron entre 100 y 200 núcleos.

2.2.6. Descripción de las sondas utilizadas.

En este apartado utilizamos la técnica de FISH para la determinación de las translocaciones de Ig presentes en las líneas así como para la validación de los genes candidatos obtenidos mediante los arrays. Para la identificación de las translocaciones más frecuentes de Ig se utilizó un ensayo de FISH multicolor (MI-FISH) desarrollado en el Departamento de Genética de la Universidad de Navarra (Saez et al., 2006b). Este ensayo combina sondas de los genes FGFR3/MMSET, MAF, CCND3, MAFB (Tabla 2) con sondas comerciales LSI IGH/CCND1 (Vysis, Downers Grove, IL) o LSI IGH break apart probe (Vysis, Downers Grove, IL). También se incluyó en el estudio una sonda IGL break apart para determinar si había casos con translocaciones de *IGL* y alguno de estos genes.

Para el análisis de los genes identificados como ganados y sobre-expresados se utilizaron las siguientes sondas: LSI MYC Break Apart probe (Vysis, Downers Grove, IL), BCL2/IGH probe (Cancer Genetics Inc., Milford MA, USA) y MALT1 break apart (Tabla 12).

Tabla 12. Sondas utilizadas en el análisis de FISH en líneas celulares.

Banda	Locus	Clones/Sonda
14q32	<i>IGH</i>	LSI <i>IGH</i> break apart probe (Vysis)
14q32/11q13	<i>IGH/CCND1</i>	LSI <i>IGH/CCND1</i> (Vysis)
22q12	<i>IGL</i>	<i>IGL</i> break apart (Martin-Subero et al., 2002)
4p16	<i>FGFR3/MMSET</i>	CTD-3056L2 RP11-1132M4 RP11-572O17
16q23	<i>MAF</i>	RP11-571O6 RP11-264M12 RP11-281J9 RP11-70D24 RP11-345M22
20q12	<i>MAFB</i>	RP4-616B8 RP3-404H4 RP4-644L1 RP1-94E24
18q21	<i>MALT1</i>	RP11-153F20 RP11-845C23 RP11-1151B14 RP11-675P24 RP11-350K6

3. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH).

La CGH (por las siglas en inglés Comparative Genomic Hybridization), que fue descrita a principio de los noventa (Kallioniemi et al., 1992), se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs, (tumoral y control normal) marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas normales que permite la detección de ganancias y pérdidas en todo el genoma. La resolución media es de 10 Mb (Kallioniemi et al., 1994) aunque con los nuevos programas de alta resolución podría llegarse hasta una resolución 3Mb (Kirchhoff et al., 1999a). Esta técnica emplea ADN del tumor, obviando la necesidad de células en crecimiento. En resumen: se marca el ADN del tumor con un fluorocromo verde y un ADN normal (control) con un fluorocromo rojo. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación *in situ* sobre cromosomas metafásicos normales. Ambos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, el resultado final son cromosomas amarillos. En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor, y la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Al contrario, si el tumor contiene

una delección (pérdida), la región delecionada del tumor aparecerá en rojo, ya que habrá más cantidad de ADN normal (rojo) para hibridar en esa región cromosómica.

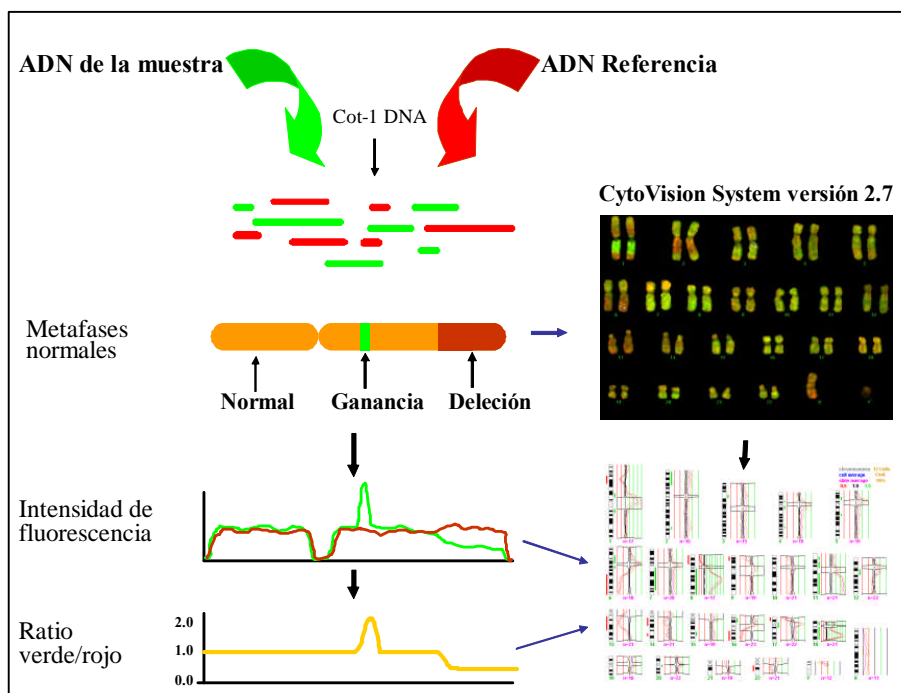


Figura 7. Esquema de la CGH. Las muestras se marcan diferencialmente, en rojo el control y en verde la muestra, y se co-hibridan sobre cromosomas metafásicos. Una vez colocados se calcula la intensidad de fluorescencia de cada canal a lo largo del cromosoma y después se calcula el ratio verde/rojo, que nos proporciona los perfiles de ganancia y pérdida.

3.1. MARCAJE DE LOS ADN MEDIANTE DESPLAZAMIENTO DE MELLA.

El marcaje se realiza mediante el método de desplazamiento de mella (ver apartado MM 2.1.4). Brevemente, se marca 1 µg ADN genómico de las líneas con SpectrumGreen-dUTP con el *CGH Nick Translation Kit* (Vysis, Downers Grove, USA). Como ADN de referencia se utilizó ADN marcado con SpectrunRed-dUTP (Vysis, Downers Grove, USA). Los fragmentos óptimos para CGH deben estar entre 2000-250 pb (Figura 8).

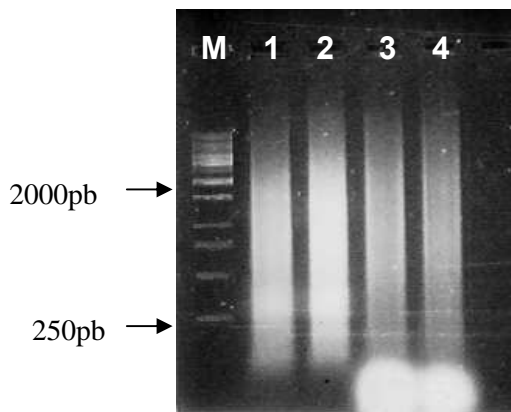


Figura 8. ADNs marcados mediante desplazamiento de la mella. M: marcador de peso molecular 1Kb (Promega Corporation, Madison, WI, USA). 1 y 2: DNA marcado con SR-dUTP. 3 y 4: DNA marcado con SG dUTP

3.2. PREPARACIÓN DE LA SONDA.

Se mezclan los ADN marcados en cantidades equimolares junto con ADN Cot-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La mezcla se precipita con 1/10 volúmenes de acetato sódico (3 M, pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantiene toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifuga durante 30 min. a 13000 rpm a 4°C . Se retira el sobrenadante y se deja secar el ADN, en oscuridad. A continuación la sonda se resuspende en 7 μl de tampón de hibridación LSI/WCP (Vysis, Downers Grove, USA) y 3 μl de agua. Finalmente se desnaturaliza a 80°C durante 10 minutos, y después se incuba a 37°C durante al menos media hora para el pre-anillamiento.

3.3. PREPARACIÓN DE LAS METAFASES NORMALES.

Como diana de nuestra sonda se utilizan portaobjetos con suspensiones citogenéticas de individuos sanos. La calidad de las metafases debe ser óptima. No deben presentar citoplasma, los cromosomas deben estar expandidos, tener una longitud que alcance la resolución de 400-500 bandas y no deben ser refringentes al observarlos en un microscopio de contraste, esto indica que pueden desnaturalizarse con facilidad (Karhu et al., 1997). Por todo ello, se utilizaron preparaciones citogenéticas con metafases normales de varón comerciales (Vysis, Downers Grove, USA).

Las preparaciones se deshidratan metiéndolas en una serie de alcoholes de gradación creciente (70%, 80% y 100%) durante 3 min. en cada uno. Se dejan secar y se pasan a la solución de formamida (35 ml formamida desionizada, 5 ml 20XSSC y 10 ml de agua) a 80°C durante 1 min. para desnaturalizar los cromosomas, inmediatamente se deshidratan con una nueva serie de alcoholes fríos (-20°C). Se dejan secar a T.A.

3.4. HIBRIDACIÓN.

La sonda se añade sobre el portaobjetos con metafases masculinas normales y se deja hibridar en una cámara húmeda dentro de una estufa a 37°C entre 48 a 72 horas.

3.5. LAVADOS Y TINCIÓN DE CONTRASTE.

Como en el protocolo de FISH, los cristales se pasan por una solución de 0.4XSSC con 0.3% de NP-40 a 75°C durante dos minutos. Después, se ponen en una solución de 2XSSC con 0.1% de NP.40 a T.A., 5 min. en agitación. Finalmente, se lavan en PBD1X a T.A. dos minutos más. Se deja escurrir el exceso de PBD1X y los cromosomas tiñen con 20 µl de DAPI con *antifade*.

3.6. CAPTURA Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.

Una vez realizados los lavados, se procedió a la captura de 10 a 15 metafases de cada caso con la cámara digital CCD (Photometrics, Inc., Tucson, AZ, USA) acoplada a un microscopio Olympus AX60 de epifluorescencia. Los ratios de señal verde/rojo se calcularon utilizando el software *CytoVision system versión 2.7* para el análisis de CGH de alta resolución (HR-CGH). Este método de análisis de CGH se basa en los intervalos de referencia estándar dinámicos para cada muestra. Este método permite una mayor resolución en la detección de alteraciones, hasta 3Mb, y permite el estudio de las regiones excluidas en los sistemas tradicionales, 1p, 19, 22 y las regiones teloméricas (Kirchhoff et al., 1998; Kirchhoff et al., 2001; Kirchhoff et al., 1999b). El cálculo de los ratios de las intensidades se realiza una vez que se hayan ordenado los cromosomas adecuadamente. En general, un cociente cercano a 1, indica que la cantidad de ADN en esa región es la misma en la muestras como en el control; cuando el ratio es superior a 1.2 hay mayor cantidad de ADN de la muestra, por lo que la intensidad del verde es mayor y eso representa una ganancia de la región; por el contrario cuando el ratio es menor de 0.8 hay una menor cantidad de ADN de la muestra, por lo que la intensidad será mayor en el canal rojo, por lo que habrá una pérdida en esa región. Sin embargo, cuando utilizamos la CGH de alta resolución se compara la media de los perfiles de los ratios de cada caso, con un intervalo de confianza del 95%, con la media de los perfiles de controles normales con el mismo intervalo de confianza. Las regiones alteradas son aquellas en que los intervalos de confianza de la muestra y el control no se superponen.

4. ARRAYS DE ADN COMPLEMENTARIO: ONCOCHIP CNIO.

Tras los éxitos conseguidos con los diferentes proyectos de secuenciación de genomas completos de distintos organismos, una de las herramientas desarrolladas con mayor capacidad para el estudio de la expresión génica es la de los microarrays de ADN. Los microarrays permiten estudiar de forma simultánea la expresión de miles de genes, abarcando en muchos casos incluso genomas completos, midiendo cualitativa y cuantitativamente los niveles de ARN mensajero. El objeto de estudio puede ser muy amplio y variado: desde caracterizar una determinada patología (frecuentemente en distintos tumores) o determinar la respuesta ante un determinado estímulo biológico, genético o químico (el efecto de una droga o fármaco). Se trata de una técnica que utiliza una superficie de cristal de pequeñas dimensiones similar a un portaobjetos de microscopía, a la que se unen fragmentos de oligonucleótidos o de ADNc, que se hibridan con fragmentos de ADNc de muestras control y problema obtenidas de los ARNs extraídos de las células a analizar y que se marcan con fluorocromos diferentes (Schena et al., 1995). Para la realización de los experimentos de microarrays el centro dispone de un Oncochip que consta de 7237 clones de ADNc correspondientes a 6386 genes de los cuales 5253 representan genes conocidos relacionados con el proceso tumoral, y 1984 corresponden a ESTs (Tabla 13). Una relación de los genes se encuentra recogida en <http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip>. La hibridación se hace de modo competitivo, usando una referencia con la que se comparan los niveles de expresión de cada gen. El ARNm de la muestra y de la referencia se marcan diferencialmente con Cy5 (rojo) y Cy3 (verde). De este modo si un gen está sobre-expresado en la muestra problema predominará el color rojo en ese punto, debido a que se unió más ADNc problema marcado con Cy5. Por el contrario, si el punto aparece de color verde podremos decir que dicho gen tiene niveles de expresión más bajos que la referencia.

Tabla 13. Genes incluidos en el *Oncochip*

<i>Grupo funcional</i>	<i>Nº de Genes</i>	<i>Tejidos Neoplásicos</i>	<i>Nº de Genes</i>
Moléculas de adhesión	94	Cáncer de Mama	1.988
Angiogénesis	72	Leucemia Mieloide Crónica	448
Apoptosis	166	Linfoma B	1.083
Control del Ciclo Celular	245	Linfoma T	1.302
Estructura Celular y Citoesqueleto	104	Melanoma	279
Diferenciación y Desarrollo	167	Cáncer de Ovario	1.595
Genes relacionados con Cáncer Hereditario	57	Cáncer de Endometrio	1.648
Genes relacionados con Respuesta a drogas	231	Cáncer de Tiroides	1.669
Factores de Crecimiento y Receptores	129	Cáncer de Pulmón	158
Hormonas	89	Cáncer de Próstata	8
Transducción de señales	274	<i>Tejidos Normales</i>	<i>Nº de Genes</i>
Metastasis e Invasión	120	Tejido Adiposo	8
Respuesta Inmune	210	Células Endoteliales	4
Oncogenes/Proto-Oncogenes	227	Células Epiteliales	29
Genes Ribosomales relacionados con Cáncer	3	Fibroblastos	18
Respuesta al Estrés	113	Macrófagos	62
Factores de Transcripción	105	<i>LOH y CGH</i>	<i>Nº de Genes</i>
Genes Supresores de Tumores	114	Regiones CGH (9q34, 11q13, 13q14.3-q21, 19q13.1)	622
Vía de Ubiquitinación y Chaperonas	144	Regiones LOH (1p32-36, 9p21-23, 9q22-34, 10q23-24, 14q32)	1.194
Genes Virales relacionados con Cáncer	90		
Metabolismo	15		
<i>Varios</i>	21		

4.1. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL ONCOHIP CNIO.

4.1.1. Marcaje de ARN.

El marcaje directo de ARN requiere unos 30 µg. En general, el ARN de muestras de paciente, se amplifica y después se marca, en nuestro caso eludimos la amplificación ya que las muestras de ARN procedían de líneas celulares. Brevemente, a partir del ARN se sintetiza ADNc, mediante la enzima *Superscript Reverse Transcriptase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), al que se van incorporando los fluorocromos (Amersham Biosciences, Cambridge, UK), Cy3-dUTP (color verde) para la referencia y Cy5-dUTP (color rojo) para las muestras problema. El ARN de referencia utilizado fue un pool de líneas celulares (*Universal Reference Total RNA*; Stratagene, La Jolla, CA), que asegura

que todos los casos estén enfrentados exactamente a la misma referencia, permitiendo la comparación entre las muestras.

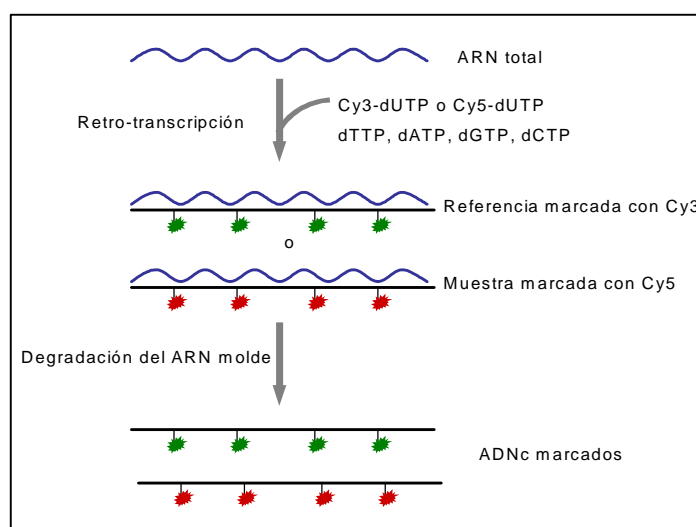


Figura 9. Esquema de marcaje de ARN mediante retrotranscripción.

Reacción de retrotranscripción

Para una hibridación necesitamos marcar ARN de la muestra y ARN de referencia en cantidades equimolares con Cy5-dUTP (muestras) Cy3-dUTP (referencia) (Figura 9). El marcaje se hace en paralelo en tubos separados.

Tabla 14. Reactivos necesarios en el marcaje de ARN mediante retro-transcripción.

Oligo d(T) ₁₂₋₁₈ (Promega, Madison, WI, USA)	
Kit Superscript TM Rnase H- reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)	
FluoroLink Cy5-dUTP, 25 nmol (Amersham Biosciences, Cambridge, UK)	
FluoroLink Cy3-dUTP, 25 nmol (Amersham Biosciences, Cambridge, UK)	
Mezcla dNTPs (baja concentración de dTTPs 25:5)	100 mM dCTP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).....25 µl (25 mM)
	100 mM dATP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).....25 µl (25 mM)
	100 mM dGTP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).....25 µl (25 mM)
	100mM dTTP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).....5 µl (5 mM)
	Agua libre ARNasas.....20 µl
RNasin Ribonuclease Inhibitor 10000 U (Promega, Madison, WI, USA)	

- En un tubo, se añaden 30 µg de ARN, en un volumen máximo de 11 µl, y 2.5 µl Oligo d(T)₁₂₋₁₈. Se desnaturaliza a 70°C entre 5 y 10 min. Una vez desnaturalizados los tubos se pasan inmediatamente a hielo.

• Durante el proceso de desnaturalización, preparamos dos mezclas madre de marcaje, una para las referencias y otra para las muestras. Por cada tubo de marcaje se añade:

First Strand Buffer (5X)	5 µl
DTT (0,1M)	2.5 µl
dNTPs (25:5)	0.5 µl
Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (10mM)	1.5 µl
RNasin (40 U/µl)	0.75 µl
Enzima SuperScript II (200 U/µl)	1.25 µl
Volumen final	11.5 µl

• La solución madre se precalienta a 42°C y se reparten 11.5 µl de cada a las muestras previamente desnaturalizadas en función del marcaje previsto. Se mezcla y se incuba a 42°C durante dos horas.

Degradación del ARN molde.

El ARN utilizado como molde se degrada mediante la adición de 12.3 µl de NaOH (0.1 N) a cada tubo. La mezcla se incuba a 70°C durante 10 min. y después se neutraliza el pH añadiendo 12.5 µl de HCl (0.1 N).

Purificación.

La purificación es necesaria para eliminar los fluoróforos no unidos al ADNc. Se lleva a cabo utilizando las columnas del *CyScribeTM GFXTM Purification Kit* (Amersham Biosciences, Cambridge, UK) siguiendo el protocolo del proveedor.

• Cada reacción de marcaje se pasa a una columna y se añaden 500 µl de tampón de captura. No incubar más de 10 min. con el tampón de captura ya que se reducirá la cantidad de ADNc recuperado. Se mezcla y se centrifuga a velocidad máxima durante 30 segundos.

• Se elimina el líquido y se añaden 600 µl de tampón de lavado a cada columna. Se centrifuga a velocidad máxima durante 30 segundos. Repetir este lavado dos veces más. Después de los tres lavados se centrifuga durante 10 segundos más para eliminar completamente el tampón de lavado.

• Se transfieren las columnas GFX a tubos de 15 ml añaden 60 µl de tampón de elución a 65° C. Se incuba durante 5 min. y se centrifuga a velocidad máxima 1 min. Repetir este paso.

Precipitación de la muestra.

- Se combinan los productos purificados (marcados con Cy3 y Cy5) que van a hibridarse juntos y se le añaden 20 µl *Human Cot-1 ADN* 1 µg/µl (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se añaden 1/10 volúmenes de acetato sódico (3 M, pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba -80° C durante 1 hora o se puede dejar también toda la noche a -20°C.

- Se centrifuga a velocidad máxima durante 15 min. a 4°C, se elimina el sobrenadante y se deja secar 5 min. en oscuridad

- Se resuspende en 42 µl de tampón de hibridación *SlideHyb Hybridization Buffer* (Ambion Inc, Austin, EEUU) y se añaden 10 µg de ADNpolydA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) y 4 µg de ARNt de levadura (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

- La sonda de ADNc se desnaturaliza antes de aplicarla sobre el array calentándola a 95° C durante 3 minutos.

4.1.2. Pre-tratamiento de los cristales.

- Los cristales se sacan de la cámara de vacío y se lavan a T.A. en agitación con una solución de 0.1%.SDS. Después se enjuagan con agua a T.A. Este lavado es necesario para evitar la aparición de “cometas” tras la hibridación.

- Para desnaturalizar las sondas del cristal, éstos se meten 2 min. en agua hirviendo. Se vuelven a enjuagar con agua y se secan mediante centrifugación (se meten en un falcon de 50 ml y se centrifugan 5 min. a 800 g.)

- Una vez secos se realiza la **pre-hibridación**. Se incuban los cristales en la solución de pre-hibridación (4XSSC, 0.1% SDS y 0.002% BSA) durante 1 hora a 65°C. Se enjuaga con agua y se vuelven a desnaturalizar en agua hirviendo.

4.1.3. Hibridación de los microarrays.

- Se rellenan de agua los pocillos de la cámara de hibridación (Corning, New York, EEUU) y se aplica la mezcla de hibridación sobre la cara impresa del microarray. Para obtener una distribución homogénea de la muestra marcada sobre el array se recomienda depositar la mezcla de hibridación en varias zonas del área impresa del cristal.

- Se cubre rápidamente con el cubreobjetos *Hybri-slips 22x60mm* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) de forma que solape con la superficie impresa para

evitar la evaporación y precipitación de la solución de hibridación. También hay que evitar que la sonda se desborde y que aparezcan burbujas.

- Se coloca el cristal en la cámara de hibridación y se sella la cámara. Se incuba a 42° C de 15 a 20 horas en estufa.

4.1.4. Lavados post hibridación.

- Se preparan los tampones de lavado y se precalienta a 42°C.

Tampón 1: Low Stringency Wash Buffer (2X SSC, 0.5 % SDS):		Tampón 2: High Stringency Wash Buffer (0.5X SSC, 0.5 % SDS)	
20XSSC	150 ml	20XSSC	37.5 ml
10% SDS	75 ml	10% SDS	75 ml
H ₂ O	1275 ml	H ₂ O	1387.5 ml
Volumen final	1500 ml	Volumen final	1500 ml

- Durante los lavados es de máxima importancia prevenir el secado de los cristales para evitar un fuerte ruido de fondo. Asimismo, conviene que los lavados se hagan protegiendo los cristales de la luz, por lo que se recomienda cubrir los recipientes con papel de aluminio.

- Se abre la cámara de hibridación evitando movimientos bruscos que desplacen el cubre encima del cristal y para despegar el cubre se sumerge cada microarray en 50 ml del tampón 1, precalentado a 42° C. Una vez quitado poner el cristal en la gradilla.

- Se realizan 3 lavados con **tampón 1** alternando 10 min. en estufa 42°C con 5 min. en agitación a T.A.

- Se realizan otros 3 lavados similares con el **tampón 2**.

- Se mete cada cristal en un tubo falcon de 50 ml con la etiqueta del código de barras de cada microarray hacia abajo, se centrifugan 5 min. a 800 g para secar los cristales. Se sacan los cristales de los tubos falcon y se guardan en oscuridad hasta que sean escaneados.

4.1.5. Obtención y análisis de las imágenes.

Después de llevar a cabo la hibridación, los arrays son escaneados. La mayoría de los escáneres empleados, usan láseres que irradian los píxeles uno a uno. El escáner de fluorescencia que utilizado es del modelo Agilent 2565AA (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) que resuelve la fluorescencia en función de coordenadas espaciales. Se generaron imágenes TIFF de 16 bits para cada canal 543 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5). Una

vez escaneado el chip se procesa y analiza.

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa el GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA). Este programa permite la conversión de las intensidades emitidas por los fluorocromos a valores numéricos, que permitirán su análisis. Una vez ajustadas las plantillas que nos permiten identificar cada punto, eliminamos manualmente los puntos con mala calidad (las señales contaminadas, motas de polvo, partículas, fibras, pelos,...), o que tengan baja intensidad. Para corregir, en mayor o menor medida, la fuente de variación existente en los experimentos de microarrays es necesario realizar una normalización de los datos. La normalización se realizó ajustando los valores de los ratios de Cy3/Cy5 de cada punto a la mediana de los valores de todos los ratios presentes en el array. El factor de normalización entre la señal roja y la señal verde es el parámetro a considerar para aceptar o descartar definitivamente una hibridación. Este factor debe ser igual a la unidad o estar cerca de ella. Después se extrajo una hoja de resultados en formato xls (Excel), para el posterior análisis de datos.

4.1.6. Análisis de los arrays de expresión.

Para el análisis de los datos de expresión se utilizó el paquete informático GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) (Herrero et al., 2003; Vaquerizas et al., 2005). Este paquete consta de diferentes módulos que permiten hacer un preprocesamiento de los datos, análisis de *clustering*, expresión diferencial, anotación y predictores.



Pre-procesamiento de los datos.

Esta herramienta permite procesar y filtrar los datos antes de su análisis. El adecuado pre-procesamiento de los patrones de expresión es un paso indispensable para llevar los análisis mediante *clustering* (agrupamiento). El *Pre-procesador* incluye, entre otras, las siguientes funciones:

- **Transformación logarítmica de la escala.** Generalmente los ratios se convierten en escala Log₂.

- **Tratamiento de las réplicas.** Para cada uno de los genes impreso en el array existen réplicas. Estas réplicas pueden ser el mismo fragmento de PCR que está dos o más veces en el array, o fragmentos de PCR distintos, pero, pertenecientes al mismo fragmento de ADNc. Con esta herramienta se pueden unir las réplicas calculando la media o la mediana y obtener un solo valor de ratio para cada gen. Sin embargo, también puede haber incongruencias entre las réplicas (por mala hibridación de algún punto) por lo que también permite eliminar del cálculo aquellos puntos inconsistentes con los demás, se define un

valor umbral de distancia máxima entre la réplica y la mediana de todas las réplicas para ese gen, aquellos puntos que superan el umbral se eliminan del estudio.

- **Eliminación de patrones planos.** El patrón o perfil de expresión de un gen consiste en los distintos valores de ratio que toma a lo largo de las muestras. Los patrones planos son aquellos que no tienen variaciones entre las muestras. Esta herramienta permite eliminar estos patrones que generan ruido en los análisis posteriores. Se pueden eliminar por distintos métodos: 1- por el **número de picos** (muestras) que superan un umbral de ratio; 2- por las **desviación estándar** y 3- por la **raíz de la media cuadrada (*root mean square*)**. El programa elimina todos aquellos patrones que no superen las condiciones establecidas, quedándonos así con patrones que muestran puntos distintos entre la muestras.

- Este programa también permite seleccionar listas de genes que queramos analizar.



SOTA (Self-Organizing Tree Algorithm).

Este algoritmo permite el análisis de los datos mediante *clustering* jerárquico *no supervisado* (Herrero et al., 2001). Este es uno de los algoritmos que se pueden utilizar en este paquete informático. Es una red neural no supervisada con una topología de árbol binario que permite el agrupamiento de las muestras en función de los perfiles de expresión y, a su vez, se agrupan los genes que tienen perfiles similares. Este paquete permite la utilización varios coeficientes para calcular la distancia en los agrupamientos (tanto de las muestras como de los genes). Los dendrogramas de las muestras se realizaron con la distancia UPGMA euclídea y para las distancias de los genes se utilizó el coeficiente de correlación lineal. Las distancias euclídeas agrupan los patrones dependiendo de los niveles de activación o represión y las distancias de correlación lineal agrupan patrones con tendencias similares.



POMELO.

Esta herramienta permite el análisis de genes diferencialmente expresados en diferentes grupos de muestras previamente establecidos. Debido al gran número de hipótesis planteadas (tantas como genes incluidos), esta no es una tarea trivial. El POMELO está diseñado para controlar el problema de los tests múltiples incluyendo 4 métodos para ajustar la probabilidad (p); dos controlan el *Family Wise Error Rate* y dos que controlan el *False Discovery Rate*. Estos ajustes pueden aplicarse a 5 test estadísticos distintos: **test de t**, utilizado para comparar dos condiciones; test de **ANOVA**, para testar tres o más condiciones; **regresión lineal**, para examinar si la expresión de los genes esta

relacionada con la variación de una variable continua; **análisis de supervivencia** y **test exacto de Fisher** para el análisis de tablas de contingencia con variables categóricas.

FatiGO.

Este programa permite obtener las anotaciones de Gene Ontology (GO) para los listados de genes que se introducen en el sistema. Calcula la distribución de la frecuencia de los genes en cada una de los niveles GO. Por otro lado también permite comparar los GO de dos listas de genes para ver funciones sobre-representadas en una de las listas.

InSilico CGH.

Este programa permite representar los clones en su localización en el genoma. Además, representa proporcionalmente los ratios pudiéndose observar las regiones genómicas con más sobre-expresión que otras. También puede utilizarse en los aCGH.

4.2. ARRAYS DE CGH SOBRE EL ONCOHIP CNIO.

El desarrollo y progresión del cáncer, son procesos que conllevan una acumulación de cambios genéticos, como la presencia de translocaciones, amplificaciones y deleciones que afectan genes críticos que están implicados en los procesos crecimiento, diferenciación y muerte celular. Las técnicas de citogenética molecular, CGH y SKY, han sido útiles para diseccionar la complejidad molecular de estos cambios cromosómicos en tumores. Sin embargo, la resolución de estas técnicas es limitada y no permite una directa comparación con los niveles de expresión de los genes implicados en estos reordenamientos. El uso de fragmentos de ADN inmovilizados en un cristal en formato de array ha reemplazado la CGH sobre cromosomas metafásicos, y ha sido un avance significativo, que ha aumentado la resolución e la técnica. A pesar de que se han desarrollado numerosas plataformas para llevar a cabo estos arrays de CGH (aCGH), todos tienen un principio común que es la detección de alteraciones del número de copias entre dos muestras. Las distintas plataformas varían en general, en el tamaño del fragmento de ADN impreso en el cristal y en la cobertura del genoma:

1- Arrays basados en clones de insertos largos. Los arrays más frecuentes son los que utilizan BACs (Pinkel et al., 1998; Solinas-Toldo et al., 1997). Cada BAC impreso en el array tiene entre 100-200 Kb de tamaño. La resolución es a nivel de Mb, pero es una técnica muy robusta para la detección de las señales de hibridación y los BAC no se limitan a regiones del genoma con genes anotados.

2- Arrays de ADNc. A finales de los noventa Pollack et al (Pollack et al., 1999) adaptaron la técnica de array de ADNc y la implementaron para CGH hibridando ADN genómico sobre el este tipo array. Esto permite una directa comparación de los niveles de expresión de un determinado gen (cuando se hibrida ARN sobre el array) y las variaciones en el número de copias del mismo (cuando se hibrida ADN genómico).

3- Arrays de oligonucleótidos. Al principio se han utilizado los arrays de oligonucleótidos cortos (23-25 nucleótidos) diseñados para el análisis de SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) para medir la variaciones en el número de copias {Bignell, 2004 #28}. Actualmente existen plataformas de oligonucleótidos largos (60-70 nucleótidos) diseñadas para mejorar la hibridación en aCGH (Barrett et al., 2004; Brennan et al., 2004; Carvalho et al., 2004). Estos diseños permiten evitar las secuencias repetitivas de genoma.

Utilizamos los arrays de ADNc para hibridar el ADN de las líneas para poder comparar directamente los niveles de expresión de un gen y sus variaciones en el número de copias. Los experimentos se realizaron como en estudios anteriores con ligeras modificaciones (Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999).

4.2.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Para facilitar el marcaje el ADN genómico se digiere con las enzimas de restricción AluI y RsaI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania). Brevemente:

- Se resuspenden 8 µg de ADN genómico en 42.5 µl de dH₂O en un tubo de 1.5 ml. Se añaden 5 µl de 10X -Buffer Y+/ tango y 1.25 µl (12.5 unidades) de AluI y 1.25 µl (12.5 unidades) de RsaI. Se incuba toda la noche a 37°C.

- El ADN se purifica con *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Se añaden 5 volúmenes de tampón PB y se pone la mezcla en la columna. Se centrifuga a 13000 rpm durante un min. Se lava con 750 µl de buffer PE y centrifugar 1 min. El ADN digerido se eluye con 100 µl de agua estéril a 65°C.

- Se testan 5 µl en un gel de agarosa 1.2% (m/v) para comprobar si ha habido digestión. El ADN concentra en Speed-Vacuum a un volumen aproximado de 21 µl.

4.2.2. Marcaje de ADN mediante cebado aleatorio (random priming).

El marcaje se realizó con el kit *BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido). Este kit incluye una mezcla de octámeros que se unen aleatoriamente al ADN y después el fragmento Klenow de la exopolimerasa de *E.coli* los utiliza para la amplificación ya que tiene actividad polimerasa. A medida que se da la polimerización se van añadiendo los dUTP marcados con Cy5 o Cy3 (Figura 10).

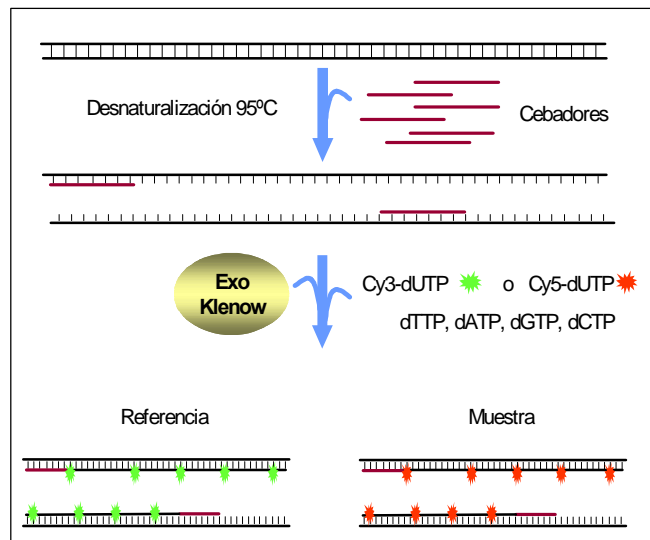


Figura 10. Esquema del marcaje mediante *random priming*. La muestra se desnaturaliza en presencia de cebadores y se deja renaturalizar para que se produzca la unión. Después se añaden la enzima y nucleótidos. La enzima utiliza los cebadores para sintetizar una nueva cadena a la que se le van añadiendo los nucleótidos marcados.

El protocolo es el siguiente:

- El producto de digestión se lleva a 21 μ l y se mezcla con 20 μ l de 2.5X *Random Primer Mix*. La mezcla se desnaturaliza a 95°C durante 5 min. Después, se pone en hielo y a cada tubo se le añaden:

10X dUTP mix	5 μ l
Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (10mM)	3 μ l
Exo-Klenow	1 μ l
Volumen final	50 μ l

- Se incuba dos horas a 37°C. La reacción se para añadiendo 5 μ l de EDTA 0.5 M, pH 8 (solución de parada).

- El ADN marcado se purifica utilizando columnas microcon YM-30 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU). Se añaden 450 μ l de TE 0.1% (Tris 10mM, EDTA 1mM), pH 7.4 a cada reacción de marcaje, se coloca la muestra en el filtro y centrifuga 10 min. a 10000 rpm. Se invierte la columna en un tubo limpio y se centrifuga a 10000 rpm 1 min. Se mezclan las sondas Cy3 y Cy5 en un tubo nuevo, se añaden 50 μ l de ADN Cot I (1

mg/ml), 10 µl de ARN de levadura (10 mg/ml), 4 µl de Poly dA (5 mg/ml), 4 µl de Poly dT (5 mg/ml) y 350 µl de TE 0.1% (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), pH 7.4. Se concentran en un nuevo Microcon YM-30 (10000 rpm, 10 min.).

4.2.3. Preparación de la sonda.

- Se añaden 1/10 volúmenes de acetato sódico (3 M, pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (-20°C). Se incuba a -80°C al menos 30 min. Se centrifuga a velocidad máxima durante 15 min. a 4°C. Se elimina el sobrenadante.

- La sonda se resuspende en 40 µl de SlideHyb Hybridization Buffer (Ambion Inc, Austin, TX, USA) precalentado a 68°C y 10 µl agua estéril y se desnaturaliza a 95°C durante 2-3 min. Se centrifuga y se deja 42°C hasta la hibridación.

4.2.4. Pre-tratamiento de los cristales.

El pre-tratamiento es similar el realizado para la hibridación de ARN (apartado MM.4.1). Brevemente, los cristales se lavan con 0.1% SDS, se desnaturalizan hirviéndolos 2 min. en agua y se pre-hibridan con la solución de pre-hibridación (4X SSC, 0.1% SDS y 0.002% BSA) durante 1 hora a 65°C. Se enjuagan con agua y se vuelven a desnaturalizar en agua hirviendo.

4.2.5. Hibridación de los microarrays.

La hibridación se realiza del mismo modo descrito en el apartado MM.4.1. Brevemente, se aplica la sonda sobre el array y se cubre el cubreobjetos *Hybri-slips 22x60mm* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Se coloca el cristal en la cámara de hibridación y se sella la cámara. Se incuba a 50°C de 15 a 20 horas en estufa.

4.2.6. Lavados post hibridación.

Para los lavados de los arrays de CGH se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado MM.4.1.4, variando la temperatura a 50°C. Brevemente:

- Se despega el cubre sumergiendo cada microarray en 50 ml del tampón 1 de lavado, pre-calentado a 50°C. Una vez quitado poner el cristal en la gradilla.

- Se realizan 3 lavados con **tampón 1** a alternando 10 min. en estufa 50°C con 5 min. en agitador a T.A.

- Se realizan otros 3 lavados similares con el **tampón 2**. Se seca el cristal por centrifugación.

Lectura del resultado.

La fluorescencia de emisión, en ambos canales se mide en cada punto mediante un scanner confocal Agilent Array Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) del mismo modo que el descrito los arrays de expresión. El tratamiento de la imagen se realizó mediante el GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA). Se filtraron manualmente los puntos de mala calidad y baja intensidad.

4.2.7. Establecimiento de los límites de ganancias y pérdidas.

Los ratios de fluorescencia se ordenan en función de su localización espacial en el genoma, lo que permite identificar cambios en el número de copias de ADN. Esto es posible dado que a los clones incluidos en el array se les asignan las posiciones de acuerdo con el orden establecido de acuerdo a la versión de Julio de 2003 de la University of California-Santa Cruz Biotechnology Human Genome Working Draft (<http://genome.ucsc.edu/>). Así, los ADNcs incluidos en el array no solo representan genes de potencial interés en la oncogénesis (p Ej.: oncogenes en los amplicones), además permiten una precisa delimitación de las regiones de ganancia y pérdida.

Para la determinación de las ganancias y pérdidas en los CGH- arrays, se hibridaron 5 arrays con muestras con un número creciente de cromosomas X (de 1 a 5), como ya se había realizado en otros estudios (Pollack et al., 1999). Se observó que había una relación lineal entre el número de copias y los ratios de fluorescencia de los clones del cromosoma X (Figura 11). Se estimaron los puntos de corte de ganancia de una copia en 1.22 ($\log_2=0.29$) y de pérdida de una copia en 0.85 ($\log_2=-0.24$) con los datos obtenidos en estas hibridaciones. Se consideró un clon como amplificado cuando el ratio de fluorescencia superaba 1.61 ($\log_2=0.68$), más de cinco copias.

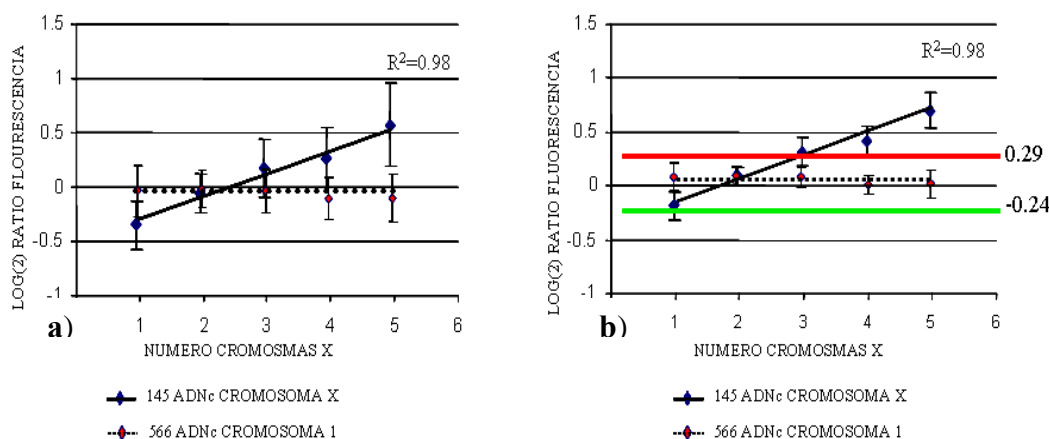


Figura 11. Variaciones en el número de copias del cromosoma X con arrays de ADNc. A) Representación del \log_2 de los ratios de fluorescencia de la media de los clones respecto al número de copias de cromosomas X. Se calculó la media de los ratios de fluorescencia de los clones del cromosoma X y del cromosoma 1. Los ratios del cromosoma X aumentan de modo lineal al aumentar el número de copias, los del cromosoma 1 se mantienen constantes. **B)** Representación del \log_2 ratios de fluorescencia de las medias corridas de tres clones consecutivos calculados para cada clon respecto al número de copias de cromosomas X. Se calculó la media corrida para cada clon (tres clones consecutivos) y después se calculó la media de las medias corridas para el cromosoma X y el cromosoma 1. Los valores se suavizan y permiten establecer los límites de ganancia y pérdida en 1.22 ($\log_2 = 0.29$) en 0.85 ($\log_2 = -0.24$) respectivamente.

4.2.8. Determinación de ganancias y pérdidas con el programa CGH-Plotter.

Además de estos puntos de corte se utilizó el programa CGH-Plotter (Autio et al., 2003) para determinar los amplicones y deleciones recurrentes. Este programa permite, por un lado, representar los clones en su localización genómica y por otro, la rápida delimitación de las variaciones en el número de copias en los aCGH. El programa utiliza tres algoritmos: medias corridas, “k-means clustering” y programación dinámica. El programa asume que las variaciones en el número de copias en cáncer abarcan regiones grandes, así los ratios de los números de copia de una muestra se pueden considerar señales que consisten en niveles constantes, que son los que hay que determinar. Los niveles por encima de la referencia (baseline) son los amplicones y los que están por debajo, las deleciones. El programa emplea un procedimiento de tres niveles para detectar los niveles constantes:

1- **Filtrado de los datos.** Con este paso se reduce el efecto del ruido de los datos. El filtrado se puede hacer por medias o medianas corridas y también se puede determinar el número de clones que se quiere incluir en el cálculo.

2- **“k-means clustering”.** Este algoritmo estima el máximo de variaciones de cada cromosoma dependiendo de una constante C que se puede variar. Lo mejor para establecer esta C es tener algún amplicon conocido y ajustarla en función de los datos y del ruido de los datos. Después, se agrupan los datos en k grupos. K en este caso es de tres (amplificado, delecionado y sin cambios). También se pueden modificar los umbrales de ratio de ganancia y pérdida y ajustarlos a los obtenidos en nuestras hibridaciones.

3- **Programación dinámica.** Encuentra los niveles constantes con la menor distancia, que viene determinada por los grupos y la constante C. Esta programación utiliza la propiedad de Markov, asegurando que la distancia entre los puntos no depende del camino recorrido.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS/AMPLIFICADOS Y SOBRE-EXPRESADOS.

Para determinar que genes se encontraban ganados/amplificados y sobre-expresados, seleccionamos aquellos genes que en aCGH tuviesen un ratio de fluorescencia superior 1.22 (dentro de las regiones definidas como ganadas en el CGH-plotter) y como sobre-expresados aquellos con un ratio de fluorescencia superior a 2 en los arrays de expresión. Además queríamos que fuese algo recurrente así que al menos tenía que ocurrir en dos de las nueve líneas celulares.

5. PCR A TIEMPO REAL CON SONDAS TAQMAN (qRT-PCR).

La PCR a tiempo real es una técnica precisa y potente para cuantificar la cantidad de molde (ADNc) que se ha usado en una reacción de PCR. Las reacciones de PCR siguen una cinética exponencial en la que generalmente se analiza la cantidad de ADN presente en la muestra en el punto final de la reacción (*plateau*). En este momento, la cantidad de producto depende de la cantidad de reactivos (cebadores, dNTPs, actividad de la polimerasa) presentes en la muestra inicial pero no depende ya exclusivamente de la cantidad de molde inicial. El único punto de la reacción en que la cantidad de molde determina el desarrollo de la PCR es el punto de inicio de la amplificación exponencial. Una reacción en la que haya más molde producirá más pronto (en un ciclo más temprano) la cantidad de ADN necesaria para ser detectada. Este momento o ciclo se denomina ciclo

umbral (Ct). La PCR cuantitativa a tiempo real aprovecha el fenómeno de la fluorescencia para medir la cantidad de producto a tiempo real. El termociclador que se utiliza está acoplado a un láser y un detector, que registran el aumento de fluorescencia en el tubo. Los dos tipos de reactivos fluorescentes más extendidos son:

- **Agentes intercalantes:** son moléculas fluorescentes que se introducen en la doble hélice de ADN con alta afinidad pero tienen una afinidad menor por las cadenas simples.

- **Sondas tipo TaqMan[®]:** en este caso el reactivo fluorescente es la sonda, un oligonucleótido cuya secuencia se encuentra entre la de los cebadores. Esta molécula tiene dos fluoróforos anclados, uno en cada extremo. El primero de ellos es fluorescente y el segundo es un *quencher* o “apagador” de fluorescencia. Cuando la PCR progresa, el *quencher* y el fluoróforo se separan y éste comienza a emitir fluorescencia.

La síntesis de ADNc o retro-transcripción es un paso crítico puesto que se requiere que sea un proceso lineal (para que sea reflejo de la cantidad de ARN de partida) y de una eficiencia adecuada y reproducible. Cuantificar la cantidad de ADNc, que se pone en el experimento, es difícil, por lo que, se suele emplear un control con el fin de normalizar la medida obtenida por la cantidad de ADNc de partida (control endógeno). El control endógeno es un gen cuya expresión se mide en paralelo con nuestro gen problema, del que sabemos que tiene una expresión constante en nuestras muestras. En nuestro caso utilizamos el gen de la β -actina, como control endógeno. Además en este tipo de estudios conviene medir cada ADNc al menos por duplicado para comprobar la reproducibilidad intra-experimento.

5.1. RETROTRANSCRIPCIÓN.

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc partimos de 1 μ g de ARN que previamente desnaturalizamos, 65°C durante 5 min., para evitar la formación de estructuras secundarias. La reacción se llevó a cabo con la transcriptasa reversa *SuperScript IITM Rnase H* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y hexámeros al azar (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) incubando a 42°C durante 45 min., en un volumen final de 20 μ l. Después se incubó 15 min. a 70°C para inactivar la enzima.

5.2. PCR CON SONDAS TAQMAN®.

• Una vez hemos obtenido el ADNc de las muestras se realiza la reacción de PCR con las sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un termociclador *ABI prism 7900 system* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las sondas y cebadores (Tabla 15) de cada gen analizado se obtuvieron de *Assay-on-Demand Gene Expression Products* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 15. Genes analizados y sondas Taqman® utilizadas.

Gen	Sonda	Localización (exones / pb)
CCND1	hs00277039_m1	2-3 / 625
CCND2	hs00153380_m1	3-4 / 845
C-MYC	hs00153408_m1	2-3 / 1328
MALT1	hs01120046_m1	9-10 / 1442
BCL2	hs00153350_m1	2-3 / 1028
β-ACTINA	hs99999903_m1	1 / 36

• Como tejido control, se utilizo ARN obtenido de células plasmáticas CD138 + obtenidas de amígdala (Medina et al., 2002).

• La curva estándar se realizó con diluciones seriadas de ADNc del *Universal Reference Total RNA* (Stratagene): sin diluir (1), 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500. De cada muestra y control se realizan dos diluciones 1/20 y 1/100. Todas las diluciones se ponen por triplicado.

• Para cada muestra preparamos la siguiente mezcla:

Master Mix (Taqman®)	6 µl
Sonda Taqman	0.6 µl
Agua	3 µl
ADNc	2.4 µl
Volumen final	12 µl

• Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las recomendadas para las sondas Taqman®: 2 min./50°C, 10 min./95°C y 40 ciclos de 15 s /95° C y 1 min./60° C.

5.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Como resultado de nuestro experimento vamos a obtener una medida de fluorescencia, que queremos traducir en medida de cantidad. Para eso hemos utilizado una curva estándar, con cantidades conocidas de molde. La curva estándar elegida debe tener varios puntos entre los que deben amplificar todas las muestras puesto que, es el único rango en el que podemos asegurar que la amplificación sea lineal. Al normalizar con la curva estándar obtenemos medidas de expresión relativas. Las medidas relativas nos sirven simplemente para relativizar la expresión de nuestra muestra problema. Al final de nuestro experimento, los resultados que el programa ofrece generan un gráfico, en el que se representa el incremento de fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Con estos datos, el programa genera un fichero de informe (“Experimental Report”) en el que se registra cada muestra, qué tipo de muestra es, los valores de expresión fijados para la curva estándar y el valor de expresión calculado para cada muestra problema. Este fichero puede ser almacenado y procesado posteriormente en Excel, donde han de hacerse las normalizaciones. Así, para calcular el valor de expresión real de cada muestra, la expresión del gen problema se calcula haciendo la media de las réplicas y dividiéndola entre la expresión del control endógeno.

6. WESTERN BLOTTING.

La técnica de *western blotting* permite detectar la presencia, cantidad y calidad de un antígeno en una mezcla compleja. Primero se debe preparar el lisado a partir de una línea celular concreta o de un determinado tejido que exprese el antígeno específico y separarlos mediante SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o nylon mediante el uso de la corriente eléctrica. Una vez acabada la transferencia, la membrana es cortada en tiras e incubada con el anticuerpo (Ab) de la proteína interés. Para visualizar la proteína reconocida por nuestro anticuerpo debemos incubar la membrana con un Ab secundario marcado que nos permita su visualización. Los anticuerpos se pueden marcar para permitir su detección, lo cual implica la unión covalente al dominio Fc de moléculas o átomos fácilmente detectables, tales como:

- ^{125}I , y emisores γ que se detectan con contador de centelleo o autoradiografía.

- Conjugación con enzimas en la región Fc: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, etc que suministrando el sustrato correspondiente dan productos

coloreados insolubles, o sustratos que producen luz que es detectada con una película fotográfica.

- Conjugados con Biotina, que después es detectada con avidina/streptavidina acopladas a algún otro tipo de marcador.

6.1. SDS-PAGE.

• Se prepara el *gel de separación* según la proporción deseada según la tabla siguiente, y se introduce entre los cristales. Se añade butanol en la parte superior para que esta quede recta, y se deja 20 min para que se produzca la polimerización. Después se lava con agua para eliminar los restos de butanol.

Porcentaje de Acrilamida	7.5%	9%	10%	12.5%	15%
gel 0.75 mm	1	1	1	1	1
1M TrisHCl, pH 8.8	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (Proteogel-Pronadisa)	1 ml	1.2 ml	1.33 ml	1.67 ml	2 ml
H ₂ O	1.94 ml	1.74 ml	1.61 ml	1.27 ml	0.94 ml
10% SDS	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10%PSA	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

• Se prepara el gel de concentración y se introduce entre los cristales, se colocan los peines y se espera 30 min.

Porcentaje de Acrilamida	3 %
gel 0.75 mm	1
1M TrisHCl, pH 6.8	0.5 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	200 µl
H ₂ O	1.272 ml
10% SDS	18 µl
TEMED	2.5 µl
10%PSA	7.5 µl

• Después se introduce el gel en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad Mini-Protean II Dual Slab Cell) y se llena con tampón de carrera 1X.

Tampón de carrera 10X: 30 g Tris Base, 144 g Glicina y llenar con agua hasta 1L.

Tampón de carrera 1X: 50 ml Tampón de carrera 10X, 5 ml de SDS 10% y enrasar hasta 500 ml con agua destilada.

- Se prepara el lisado celular añadiendo 15 µl tampón de carga 2X y PBS1X hasta un volumen final de 30 µl por pocillo.

Tampón de carga 2X: TrisHCl pH 6.8 (100mM), SDS 4%, Azul de Bromofenol (0.2%), Glicerol (20%), 10% mercaptoetanol y agua destilada.

- Se centrifugan las muestras y se hierven 5 min a 95°C, dar un pulso y cargar en el gel. En una de los pocillos ponemos el marcador de peso molecular *Amersham-Rainbow marker* (Amersham). Se conecta la cubeta a la fuente a 100 V durante 90 min

6.2. TRANSFERENCIA A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA.

- Se saca el gel de los cristales con cuidado y se lava en tampón de transferencia durante 10 min.

Tampón de transferencia: 25 mM Tris (3.02 g/l), 0.2 M Glycina (15 g), 2% de metanol (20 ml/l).

- Se prepara la membrana de nitrocelulosa. Se lava con metanol (pase rápido) y se incuba 10 min en tampón de transferencia 10 min.

- Se prepara el sándwich de transferencia, empezando por el lado negro se pone una esponja, papel de filtro, el gel, la membrana, papel de filtro, otra esponja. Una vez colocada la membrana sobre el gel es aconsejable pasar sobre ésta una pipeta a modo de rodillo para eliminar las burbujas que puedan quedar

- El sándwich se mete en la cubeta (BIO-Rad Mini Trans-Blot Transfer cell) se llenar con tampón de transferencia y se conecta a la fuente a 200 mA durante 2 horas (en la cámara fría), si se prefiere se puede mantener toda la noche a 20 mA.

- Se saca la membrana y se lava en **tampón de lavado** (PBS 1X, Tween 0.1%).

6.3. INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS Y DETECCIÓN.

- Se incuba en **tampón de bloqueo** (PBS 1X, Tween 0.1%, 1% BSA ó 2.5% de leche en polvo desnatada) durante 2 horas o toda la noche en cámara fría en ambos casos y después se lava con tampón de lavado.

- Se incuba la membrana con el Ab deseado durante 2 horas a temperatura ambiente y se lava 3 veces con tampón de lavado, 10 min cada uno.

- Se incubación con el Ab secundario (Santa Cruz-goat anti mouse HRP conjugated) 1:500 en 10% SBF en tampón de lavado, durante 1 hora a T.A.. Se lava 3 veces con tampón de lavado, 10 min. cada lavado.

- Para el revelado se usa el kit de quimioluminiscencia *ECLTM Wester Blotting Análisis System* (Amersham). Se prepara la solución reveladores mezclando en una proporción de (1:1) el tampón 1 y el tampón 2 del kit. Después la membrana se baña en la solución reveladora durante 3 min.

- Se mete la membrana en el cassette y ya en la cámara oscura se coloca una película encima de la misma, y se deja de 1.5 a 10 minutos de exposición (hacer distintos tiempos en distintas películas) y la película se revela en la máquina reveladora.

7. INMUNOHISTOQUÍMICA.

La inmunohistoquímica (IHQ) se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una sustancia que se puede transformar en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. El complejo antígeno anticuerpo, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc) permite ser localizado e identificado dentro de la muestra a estudiar. En las técnicas de inmunoenzimáticas se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro permitiendo una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul).

La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronósticos de neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de tumores con anticuerpos monoclonales. Un elemento importante a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina. Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de congelación. El espectro de anticuerpos disponibles comercialmente crece día a día y actualmente es posible encontrar marcadores para una amplia gama de antígenos.

Nosotros utilizamos un Ab secundario conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) con DAB (diaminobenzidina) como sustrato según el siguiente protocolo.

- Se aíslan los cortes de parafina o congelado o los citospines de las células con un rotulador *Dako pen* (Dako, Copenhague, Dinamarca).

- Se añaden 100 μ l del Ab primario sin dejar burbujas y se deja incubando durante 30 min. en una cámara húmeda para que no se sequen. Después se lavan con PBS 1X durante 5 min.

- Se añaden 100 μ l del Ab secundario *goat anti- Mouse/ anti-rabbit HRP* ((Dako, Copenhagen, Dinamarca), en una dilución 1:50 en PBS, dependiendo del Ab primario. Se incuba otros 30 min. y después se lavan con PBS 1X durante 5 min.

- Se preparar el DAB justo antes de utilizarla. Se mezclan 100 μ l DAB + Cromógeno (X50) (Dako, Copenhagen, Dinamarca) por cada 12 ml de tampón sustrato de HRP (Dako, Copenhagen, Dinamarca). Se añaden 100 μ l a cada muestra y se incuba 5 min. Después se lava durante dos min. con agua del grifo y se tiñen con hematoxilina, 30 segundos si el Ab es nuclear y un min. si el Ab es citoplasmático. Las preparaciones se montan con *Microscopy Aquatex* (Merck, Alemania) y se dejan secar 20 min.

MATERIAL Y MÉTODOS II: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.

8. PACIENTES DE MIELOMA MÚLTIPLE.

Se incluyeron en el estudio 26 muestras de pacientes de MM al diagnóstico (Tabla 16). Las muestras se obtuvieron de los restos del material de medula ósea del servicio de citogenética del departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Estas muestras se seleccionaron positivamente para el marcador de células plasmáticas CD138 mediante MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CACell) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido hasta la extracción del ADN. El ADN de las muestras se extrajo utilizando *DNeasy tissue kit* (Qiagen, Germantown, MD).

Tabla 16. Descripción de los pacientes.

Caso	H/M (edad)	Tratamiento	Respuesta	Cariotipo al diagnóstico
1	H (78)	GEMM2000	NO	46,XY / 45,X,-Y
2	H (66)	GEMM2000	NO	46,XY
3	H (39)	GEMM2000	SI	46,XY
4	H (61)	GEMM2000	SI	46,XY
5	M (67)	NT	x	46,XX
6	H (71)	GEMM2000	NO	46,XY
7	H (73)	GEMM2000	NO	46,XY
8	M (75)	NT	x	46,XX
9	H (68)	GEMM2000	NO	57,XY<3n>,-1,der(6)t(1q;6q)x2, -8,-13,-14,-16, -17,-18,-20
10	H (70)	GEMM2000	SI	46,XY
11	H (72)	GEMM2000	SI	46,XY
12	H (58)	GEMM2000	SI	46,XY
13	M (34)	GEMM2000	SI	NA
14	M (67)	GEMM2000	SI	46,XX
15	H (57)	GEMM2000	SI	46,XY
16	H (67)	Talidomida vs placebo	SI	46,XY
17	M (52)	GEMM2000	SI	46,XX,inv(9)(q11q13) [100%]
18	H (85)	NT	x	46,XY
19	M (62)	GEMM2000	SI	46,XX
20	H (59)	GEMM2000	NO	46,XY,der(1p),+3,+5,der(8p),der(9p),-13,add(13p),add(14)(q32),+15,er(16q),der(20q),+mar [100%]
21	M (66)	GEMM2000	SI	46,XX[67%]50,XX,add(1)(p36),der(3q),t(3;3)(q?:q?),+7,add(12)(p13),der(14q),+mar [33%]
22	M (71)	GEMM2000	SI	46,XX
23	H (73)	GEMM2000	SI	46,XY
24	H (81)	GEMM2000	SI	46,XY
25	M (74)	GEMM2000	SI	NA
26	M (54)	GEMM2000	NO	45,X,-X[87%] 51,XX, der(1)(p?),+3,+5,+7,+8,-9,+11,der(14)(q?), add(16)(p?),+18 [13%]

9. ARRAYS DE CGH DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Para el análisis mediante aCGH de las muestra primarias de MM, nos decidimos por una plataforma comercial: *Agilent Human Genome CGH Microarray 44K*. Esta plataforma contiene 44000 oligonucleótidos de 60 bp específicamente diseñados para aCGH de alta resolución. Las oligonucleótidos están diseñados tanto en secuencias codificantes (exones) como no-codificantes (intrones y regiones intergénicas) pero evitando secuencias repetitivas. La resolución espacial media es de unas 75 kb. Sin embargo, el array está centrado en el estudio de genes relacionados con cáncer, por ello hay al menos una sonda en los genes conocidos y hay tres sondas en los genes relacionados con cáncer.

9.1. DIGESTIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

El protocolo de marcaje es similar al utilizado en los arrays de ADNc. Brevemente, se digieren entre 1 y 2 µg el ADN genómico con las enzimas de restricción AluI y RsaI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania) durante dos horas a 37°C.

El ADN digerido se purifica con *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

9.2. MARCAJE MEDIANTE CEBADO ALEATORIO.

El marcaje se realizó con el kit *Bioprime[®] Array CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen). Como referencia se utilizó un pool de ADN de mujeres. El protocolo es similar al marcaje de ADNc (MM.4.2.2). Brevemente, en un tubo se mezclan 21 µl de ADN digerido y 20 µl de 2.5X *Random Primer Mix*. La mezcla se desnaturaliza a 95°C durante 5 min. Se añaden 5 µl de 10X DUTP mix, 3 µl Cy3-dUTP (referencia) o Cy5-dUTP (muestras) y 1 µl de enzima Exo-Klenow. Se incuba dos horas a 37°C. La reacción se para añadiendo 5 µl de EDTA 0.5 M, pH 8.

El ADN marcado se purifica utilizando columnas microcon YM-30 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU). Se añaden 450 µl de TE 0.1% (Tris 10mM, EDTA 1mM), pH 7.4 a cada reacción de marcaje, se coloca la muestra en la columna y centrifuga 10 min. a 10000 rpm. Se mide la concertación de ADN y la incorporación de los fluorocromos con Nanodrop. Se mezclan la muestra y la referencia en un tubo, se añaden 400 µl de TE 0.1% y se concentran en un nuevo Microcon YM-30 (10000rpm, 10min).

9.3. PREPARACIÓN DE LA SONDA.

Para la preparación de la sonda se utilizó el *Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit* (Agilent Technologies, Inc.). La mezcla de ADN marcados se lleva a 150 μ l con agua y se le añaden 50 μ l de ADN Cot-1 humano (Roche), 50 μ l de *Control Targets 10X* y 250 μ l de Buffer de Hibridación 2X de Agilent. La sonda se desnaturaliza a 95°C durante 5 min. y se deja media hora a 37°C. Después se centrifuga 5 min. a velocidad máxima.

9.4. HIBRIDACIÓN.

Se coloca el *gasket slide* (cristal sellado con una goma) en la cámara de hibridación. Se ponen 490 μ l de la sonda sobre el cristal. Se saca un array y se coloca sobre el otro, como un sándwich, con la cara que lleva el array impreso hacia dentro para que esté en contacto con la sonda. Se cierra la cámara de hibridación y se mete en el horno a 65°C y a 10 rpm para que la sonda se vaya moviendo por el array. Se incuba 40 horas.

9.5. LAVADOS POST HIBRIDACIÓN.

- El día anterior a los lavados se preparan los tampones de lavado siguientes y el tampón 2 se pone en una estufa a 37°C para que se caliente:

Reactivos	Tampón 1(1L) (0.5X SSPE, 0.005% N-lauroylsarcosine)	Tampón 2 (1L) (0.1X SSPE, 0.005% N-lauroylsarcosine)
SSPE 20X	25ml	5ml
20% N-lauroylsarcosine	250 μ l	250 μ l
H ₂ O	974.75ml	994.75ml

- Se sacan las cámaras del horno y se saca el sándwich de cristales. Se sumergen en una cubeta con tampón 1 y se abre en sándwich con unas pinzas. El array se coloca en una gradilla sumergida en tampón 1.

- Se coloca la gradilla en una nueva cubeta con Tampón 1 y se lava con agitación magnética durante 5 min a T.A.

- Se pasa la gradilla a una cubeta con tampón 2 a 37°C y se lava durante 1 min con agitación magnética.

- Se pasa la gradilla a una cubeta con acetonitrilo puro (Romil Teknokroma) se deja 30 segundos y se saca muy despacio para que los cristales salgan secos.

- Después los cristales se escanean en un escáner confocal, *Agilent Array Scanner* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), copiar para obtener las intensidades de fluorescencia de emisión, en ambos canales.

9.6. TRATAMIENTO DE LAS IMÁGENES.

Las imágenes de los arrays se transformaron a intensidades de fluorescencia con el programa Feature Extraction, version 8.1 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Para la normalización de los datos se utilizó una normalización lineal. Este programa no ofrece los datos como el \log_{10} de los ratios de fluorescencia entre el Cy5 (rojo)/Cy3 (verde).

9.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

9.7.1. Determinación de las variaciones en el número de copias.

Los datos se analizaron utilizando el programa *Agilent CGH Analytics 3.2.25*. Con este programa medimos la dispersión del ruido de los log ratios con el algoritmo DLR Spread (*Derivative Log Ratio Spread*). El DLR Spread estima la dispersión del ruido del log ratio calculando la dispersión que hay entre los diferenciales de log ratio entre dos clones consecutivos a lo largo de todo el cromosoma. Cuando el valor de DLR Spread es menor de 0.3 unidades de log se considera que hay poco ruido y la hibridación es de buena calidad.

Este programa también tiene algoritmos para determinar las variaciones en el número de copias (CNV) de ganancias y pérdidas. Para ello utilizamos el algoritmo *Z-score* (valor de Z). El *Z-score* es un método de estimación útil en la determinación de regiones ganadas/perdidas estadísticamente interesantes. Nosotros podemos variar dos parámetros que influyen en el cálculo del *Z-score*: la ventana de media corrida y el umbral de *Z-score*. Para establecer las CNV de ganancias y pérdidas utilizamos una ventana de media corrida de 500 Kb, es decir calcula la media de los clones que están en esas regiones para cada punto, suavizando así los perfiles y un umbral *Z-score* de superior a 2.5.

Definimos una CNV como el conjunto de clones consecutivos (al menos 3) que cambian en el mismo sentido de modo simultáneo, es decir que supera el *Z-score* definido y en el mismo sentido, positivo o negativo. Para delimitar las regiones se obtuvieron los valores de *Z-score* para cada punto ordenados por su posición cromosómica y se identificaron las CNV de cada caso. La amplificaciones y deleciones homocigóticas se definieron como clones consecutivos que, además de haberlas definido como CNV con el *Z-score*, tenían un ratio en \log_{10} mayor de 0.3 (unas cinco copias del gen) para

amplificaciones y un ratio \log_{10} inferior a -1 para las deleciones homocigóticas. Además se calculó el número de CNV y la mediana del tamaño de las CNV. De este modo las CNV se clasificaron en cambios numéricos, que es decir ganancias o pérdidas de cromosomas enteros, y cambios estructurales. Este último grupo se dividió en dos grupos en función de si la región afectada era mayor o menor de 3 Mb que es la resolución de la CGH convencional de alta resolución (Kirchhoff et al., 1999a).

9.7.2. Definición de las regiones mínimas comunes.

Para obtener una imagen general de las aberraciones existentes en mieloma y para estudios posteriores con otras herramientas, determinamos las regiones mínimas recurrentes. Las regiones mínimas comunes (RMC) se identificaron de modo independiente para las ganancias y para las pérdidas. Las RMC consisten en las regiones más pequeñas que aparecen de modo recurrente (en al menos dos casos) en nuestra serie. Es decir, las CNV más frecuentes definidas por el mínimo número de clones alterados. Después cada caso se categorizó en función de la presencia o ausencia de la RMC correspondiente (0=ausencia, 1=presencia).

9.7.3. Identificación de mielomas hiperdiploides y no-hiperdiploides mediante aCGH.

Definimos los casos que pertenecen al grupo de mielomas H y NH basándonos en los resultados obtenidos mediante las hibridaciones de los aCGH. Como hemos visto, los mielomas H son aquellos que tienen un número modal de cromosomas que oscila entre 48-74; el resto se consideraron como mielomas NH. A cada uno de los casos se le asignó un valor CNS (copy number score) del modo siguiente. Cuando un cromosoma entero se encontraba ganado se le asignaba un valor de 3, cuando estaba perdido se le asignó un valor de 1 y cuando no mostraba cambios se le asignó un valor de 2. Se calculó la suma de los valores CNS de cada cromosoma para cada caso y si el valor oscilaba entre 48 y 74 se consideró como un caso H y si el resultado se encontraba fuera de este rango se consideró NH.

9.7.4. Análisis bioinformático y estadístico.

Para los análisis de agrupamiento (*clustering*) y anotaciones GO se utilizó el paquete informático GEPAS Suite (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) (Vaquerizas et al., 2005). Los análisis *no supervisados* se llevaron a cabo con el algoritmo SOTA; se utilizó el método UPGMA con distancias euclídeas para el análisis de las muestras y el de correlación lineal para el agrupamiento de las regiones. Estos análisis se realizaron con los CNV más frecuentes y con las RMCs para identificar grupos distintos.

La herramienta POMELO se utilizó después del *clustering* no supervisado para la identificación de regiones asociadas a cada grupo (test exacto de Fisher). Se consideró una región como estadísticamente significativa cuando la *p* ajustada era inferior a 0.05. Se utilizó la herramienta *FatiGO* (Al-Shahrour et al., 2005) para el análisis de las anotaciones GO.

Para la comparación estadística de las diferencias en el número de CNV en distintos grupos se utilizó el test de U Mann-Whitney con el paquete informático SPSS v 13.0.

10. CARIOTIPO ESPECTRAL (SKY).

El cariotipo espectral (SKY-FISH) (Schrock et al., 1996) es una técnica de citogenética molecular desarrollada recientemente. Su fundamento técnico es sencillo, consiste en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos, de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás. Esta técnica, por tanto, pinta a cada cromosoma de un color. El “cocktail” de 24 sondas de pintado cromosómico obtenido tras el marcaje, se hibrida sobre los cromosomas de las metafases de la muestra, si hay un cromosoma anómalo no se obtiene un color uniforme, sino que se observarán los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación. Es una forma de realizar un cariotipo, pero teñido no con bandas G sino con colores, de forma que podamos clasificar las alteraciones de forma unívoca (Figura 12).

El cariotipo multicolor se ha sido muy útil en neoplasias hematológicas, donde no es difícil obtener metafases tumorales. Se han podido caracterizar correctamente translocaciones complejas, y también detectar alteraciones cromosómicas crípticas en cariotipos aparentemente normales. Esto ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas, lo que ha facilitado la búsqueda de nuevos genes implicados (Rao et al., 1998; Sawyer et al., 1998a). Su uso en tumores sólidos es más limitado por la necesidad de obtener metafases de calidad

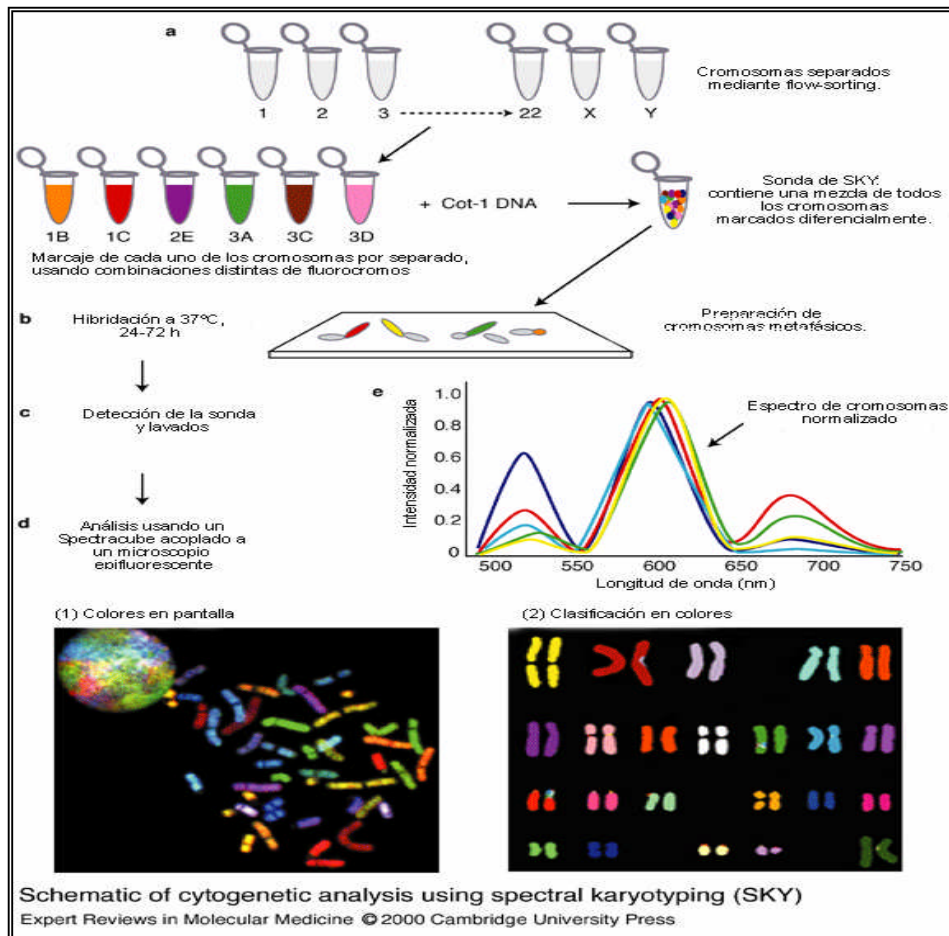


Figura 12. Esquema de la técnica de SKY.

La técnica se lleva a cabo con el kit de *SKY Paint™ Mixture* (Applied Spectral Imaging Ltd, Migdal HaEmek, Israel). Este kit contiene cinco viales:

- Vial 1: Sonda de SKY generada a partir de la amplificación mediante DOP-PCR de cada uno de los cromosomas separados mediante *flow sorting*. Para el marcaje se utiliza una combinación fluorocromos y haptenos, Rodamina, *Spectrum Green*, Rojo Texas, *Spectrum Orange*, Cy5 y Cy5.5, que cuya combinación genera los 24 colores.
- Vial 2: reactivo de bloqueo que sirve para reducir la señal de fondo.
- Vial 3: reactivo de detección de Cy5. Contiene Ac anti-digoxigenina y estreptoavidina marcada con Cy5.
- Vial 4: reactivo de detección de Cy5.5. Contiene Ac anti-ratón marcados con Cy5.5.
- Vial 5: Solución de DAPI- *antifade*.

10.1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Esta técnica se realiza sobre portaobjetos que tiene suspensiones citogenéticas similares a las de la FISH. Para eliminar las membranas plasmáticas que han podido quedar y permitir una buena hibridación de las sondas, las muestras se tratan con pepsina.

- En un coplin se precalienta la solución de pepsina (50 ml de 0.01M HCl, 10 µl de pepsina a 100mg/ml) a 37°C. Los portas se incuban en la pepsina de 3s a 5s.
- Se realizan dos lavados en PBS1X a T.A. durante 5 min. cada uno.
- Se pasan los portas a un nuevo coplin con PBS1X / MgCl₂ (50 mM) a T.A. durante 5 min.
- Se pasan los portas a un coplin que contiene formaldehído 1% y se incuban 10 min. T.A. Se lavan con PBS1X durante 5 min.
- Finalmente se deshidratan los portas en etanol de 70%, 80%, 100% 2 min. en cada uno. Los cristales se secan al aire.

10.2. DESNATURALIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS.

Se calientan 40 ml de solución de desnaturalización (35 ml formamida desionizada, 5 ml 20XSSC y 10 ml de agua) a 70°C ± 2 en un coplin. Se dejan en esta solución entre 1.5-2 min. Los portas, sin los cubres, se deshidratan inmediatamente en una serie de alcoholes (70%, 80%, 100%) fríos (-20°C).

10.3. DESNATURALIZACIÓN DE LA SONDA.

El contenido de la sonda de *SKY PaintTM Mixture* (Vial 1) se centrifuga brevemente y se cogen 10 µl por cada porta que se vaya a hibridar. Se desnaturaliza por incubación en un baño de agua a 80°C durante 7 min., después, se incuba a 37°C durante una hora.

10.4. HIBRIDACIÓN.

La sonda se pone sobre el área del porta que queremos hibridar y se cubre con un cubreobjetos de 24x24mm sin dejar burbujas de aire. La incubación se realiza poniendo los cristales en una cámara húmeda dentro de una estufa a 37°C durante 36-48h.

10.5. DETECCIÓN Y LAVADOS.

Para eliminar la sonda no unida y detectar la hibridación se van añadiendo los viales del kit se van realizando los lavados. El protocolo es el siguiente:

- Se sacan los portas de la cámara húmeda y se elimina cuidadosamente el cubre. Se lavan 3 veces con la solución de lavado I (50% formamida en 2X SSC) a 45°C durante 5 min.

- Se hacen dos lavados más con la solución de lavado II (1X SSC) a 45°C durante 5 min. y se continúa con la solución de lavado III (4X SSC/ 0.1% Tween 20) durante 2 min.

- Después del lavado con la solución II se deja que drene el fluido de los portas y se añaden 80 µl de tampón I (Vial 3), se pone un cubre de plástico (24x60 mm²) y se incuba a 37°C durante 45 min. Se realizan 3 lavados con la solución de lavado III (4XSSC/ 0.1% Tween 20) a 45°C durante 3 min. cada uno.

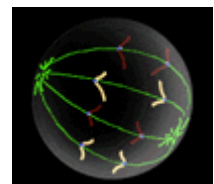
- Se aplican otros 80 µl de tampón II (vial 4), se pone un cubre de plástico (24x60mm) y se incuba a 37°C durante 45 min. Se lavan 3 veces con la solución de lavado III (4XSSC/ 0.1% Tween 20) a 45°C durante 3 min. cada lavado. Finalmente, se lavan en agua destilada brevemente y se deja drenar.

- Para poder identificar los cromosomas se las muestras se tiñen con 20 µl DAPI/Antifade (vial 5), poner un cubre de cristal (24x60 mm²).

10.6. CAPTURA Y ANÁLISIS.

Una vez montados los cristales hibridados se procede a la captura de imágenes, para su posterior análisis. Las imágenes se adquieren mediante un microscopio Axioplan 2, con un filtro adaptado para SKY, acoplado a una cámara digital, Spectracube® (Applied Spectral Imaging Ltd, Migdal HaEmek, Israel) donde todo ello es controlado a través de un programa informático, SKYView® (Applied Spectral Imaging Ltd, Migdal HaEmek, Israel). Se analizaron un mínimo de 10 metafases por caso.

RESULTADOS



RESULTADOS I. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE.

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS DE LOS GENES DE IG Y SU RELACIÓN CON LOS PERFILES DE EXPRESIÓN.

Mediante un estudio de FISH con múltiples sondas (MI-FISH) (Saez et al., 2006b; Saez et al., 2006d) se han caracterizado las translocaciones cromosómicas que afectan a los genes de Ig. El ensayo multi FISH utilizado contiene una combinación de sondas diseñadas para detectar la mayoría de las translocaciones recíprocas de las cadenas pesadas (*IGH*) y ligeras (*IGL*) de las Ig con diferentes oncogenes implicados en la patogénesis del MM. En la figura 13 se muestra un esquema del diseño de dichas sondas. Mediante este análisis se observaron translocaciones de los genes de Ig en todas las líneas celulares (Tabla 17 y Figura 13): tres de las líneas mostraban reordenamientos de *IGH* con *CCND1*; cuatro de *IGH* con *FGFR3/MMSET*, incluyendo la línea SK-MM-2 que presentaba simultáneamente ambas translocaciones (translocaciones bialélicas de *IGH* con los genes *CCND1* y *FGFR3/MMSET*); y las tres líneas restantes, presentaban reordenamientos de *IGH* o *IGL* con *MAF* o *MAFB*.

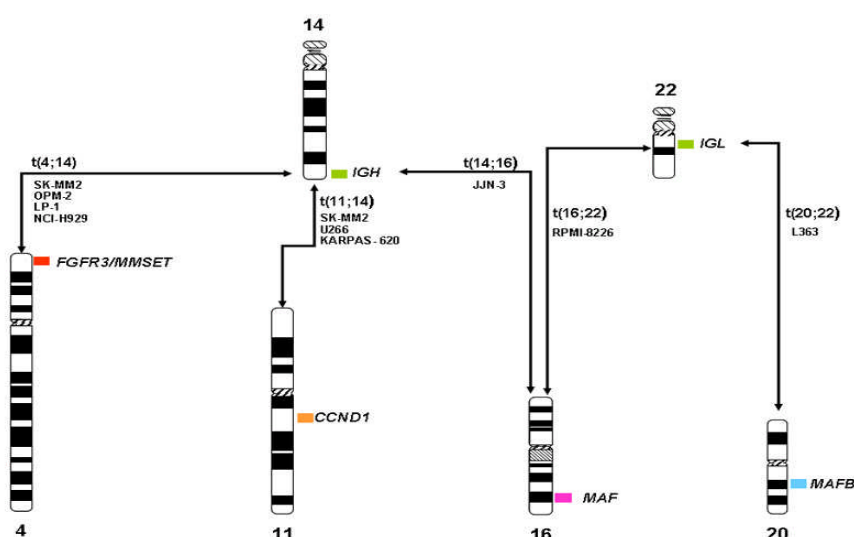


Figura 13. Esquema de MI-FISH aplicado a las líneas celulares. Se muestran los ideogramas de los cromosomas involucrados en estas translocaciones y en cada uno de ellos se muestra el punto de rotura y los genes involucrados en estas translocaciones.

Diversos estudios han demostrado que los reordenamientos de los genes *MAF* y *FGFR3/MMSET* llevan a la sobre-expresión de *CCND2* (Dring et al., 2004; Hurt et al., 2004) y, por supuesto, las translocaciones de *IGH* con *CCND1* resulta en la sobre-expresión de ciclina D1 (Chesi et al., 1996; Seto et al., 1992; Troussard et al., 2000). Estos datos, junto a las alteraciones genéticas, se utilizan para una nueva clasificación de los mielomas, grupos TC (Bergsagel and Kuehl, 2005; Hideshima et al., 2004). Esta clasificación integra los datos de expresión génica y la expresión de las ciclinas D1, D2 y D3, con los datos citogenéticos (Bergsagel et al., 2005; Hideshima et al., 2004). Brevemente, este sistema divide los mielomas en ocho grupos - 11q13, 6p21, 4p16, maf, D1, D1+D2, D2 y NONE – que parecen estar definidos por eventos oncogénicos tempranos y tal vez iniciadores. Por ello, estudiamos también la expresión de estos genes en nuestro análisis expresión mediante array de ADNc y lo validamos mediante qRT-PCR. De este modo confirmamos los resultados esperados (Tabla 17) y clasificamos las líneas en los grupos TC correspondientes.

Tabla 17. Clasificación de las líneas celulares de MM de acuerdo a las translocaciones y a los datos de expresión obtenidos mediante arrays de expresión y qRT-PCR.

Línea celular	Translocación	Genes involucrados	CCND1 ⁽¹⁾	CCND2 ⁽¹⁾	Grupo ciclina ⁽²⁾	Clasificación TC ⁽³⁾
U-266	ins(11;14)	<i>CCND1/IGH</i>	+	+	D1/D2	11q13
KARPAS-620 *	t(11;14)	<i>CCND1/IGH</i>	+	-	D1	11q13
SK-MM-2	t(4;14) t(11;14)	<i>FGFR3/MMSET/IGH</i> <i>CCND1/IGH</i>	+	-	D1	4p16 11q13
OPM-2	t(4;14)	<i>FGFR3/MMSET/IGH</i>	-	+	D2	4p16
LP-1	t(4;14)	<i>FGFR3/MMSET/IGH</i>	-	+	D2	4p16
NCI-H929	t(4;14)	<i>FGFR3/MMSET/IGH</i>	+	+	D2	4p16
RPMI-8226	t(16;22)	<i>MAF/IGL</i>	-	+	D2	maf
JJN-3	t(14;16)	<i>IGH/MAF</i>	-	+	D2	maf
L-363	t(20;22)	<i>MAFB/IGL</i>	-	+	D2	maf

(1) Niveles de expresión de *CCND1* y *CCND2* medidos mediante qRT-PCR. (2) Determinado a partir de los datos de los arrays de expresión. (3) Clasificación de las líneas en los grupos TC integrando los datos de expresión y la translocación identificada. * Presenta también una t(8;14) compleja.

Además, una vez realizada la caracterización de las líneas mediante FISH, se realizaron estudios de expresión génica con el OncoChip del CNIO. Estos microarrays permiten estudiar de forma simultánea la expresión de miles de genes simultáneamente y establecer patrones de expresión. La técnica se basa en la hibridación competitiva de ADNc marcados fluorescentemente de modo distinto de la muestra a analizar (Cy5) y el control (Cy3). Para determinar si los patrones de expresión obtenidos discriminaban grupos diferentes dentro de las líneas se realizó un *clustering* jerárquico no supervisado con el algoritmo SOTA (ver MM 4.1.6). El análisis de los datos mediante *clustering* jerárquico no supervisado no detectó ningún subgrupo dentro de las líneas en relación con las translocaciones de Ig presentes o la expresión de ciclinas, debido a que son muestras de líneas celulares con otros muchos cambios genómicos y a que el tamaño de la muestra es pequeño. Por ello, se realizó un análisis supervisado, en el cual se definen los grupos de antemano y se estudia si hay genes que se expresan de un modo distinto entre los grupos. Los grupos se realizaron utilizando la clasificación TC recientemente descrita partiendo de los datos de expresión de los arrays y las qRT-PCR y de la caracterización de las translocaciones de Ig mediante FISH. Con estos datos se observó que las líneas estudiadas pertenecían a tres de los grupos TC (Tabla 17): 11q13, 4p16, y maf. La línea SK-MM-2 se clasificó en el grupo 11q13 porque tenía una t(11;14), además de la t(4;14), sobre-expresa *CCND1* pero no expresaba ni *CCND2*, ni *FGFR3*, ni *MMSET*. Mediante este análisis hallamos 166 genes ($p < 0.05$) (Figura 14 y Anexo I) que se expresaban de modo distinto entre los tres grupos. Entre ellos nos encontramos los genes *CCND1*, *FGFR3* y *CCR1*, que es un gen diana de la vía de maf (Hurt et al., 2004) sobre-expresados en sus respectivas ramas (Figura 14).

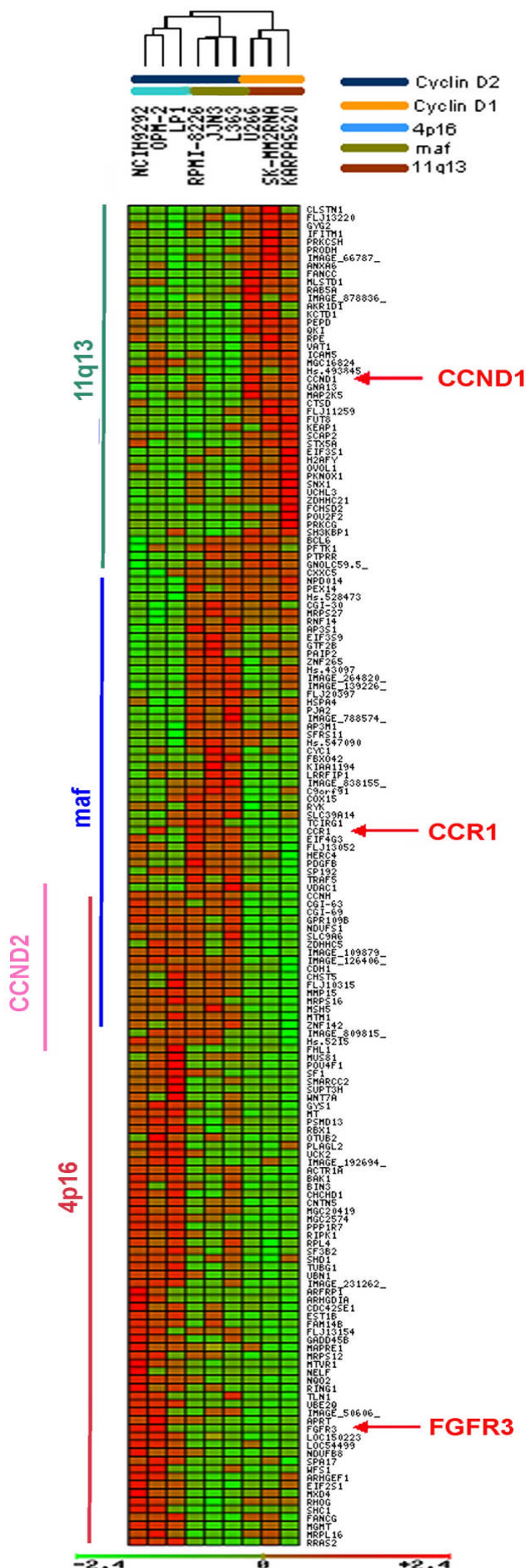


Figura 14. Agrupamiento de las líneas a partir de los 166 genes identificados ($p > 0.05$) después del análisis supervisado respecto a los grupos TC. Se realizó un análisis de multi test con la herramienta bioinformática denominada POMELO, y se identificaron 166 genes ($p < 0.05$) que se expresaban de modo diferente entre los tres grupos. Después, se llevo a cabo un *clustering* jerárquico no supervisado utilizando el algoritmo Self Organising Tree Algorithm (SOTA) con esos genes. Se observan dos ramas principales que se corresponden con las vías de la ciclina D2 y ciclina D1. La rama de las líneas que sobre-expresan *CCND2* se divide en los grupos de maf y 4p16, junto con la rama de *CCND1* (grupo 11q13) se observan los tres perfiles de expresión pertenecientes los tres grupos TC estudiados. La imagen muestra el perfil de expresión de estos 166 genes para cada una de las líneas. Se pueden observar los genes sobre-expresados en el grupo 11q13, los que se expresan específicamente en los grupos maf y 4p16 y los que son comunes a estos dos vías que serían los que se expresan en todas las líneas con sobre-expresión de *CCND2*.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS Y SOBRE-EXPRESIÓN DE GENES.

2.1. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH) CONVENCIONAL.

Como primer paso para establecer las ganancias y pérdidas de material genético las nueve líneas celulares se estudiaron mediante CGH convencional. Esta técnica se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs marcados diferencialmente sobre cromosomas metafásicos normales, lo que permite la detección de ganancias y pérdidas a lo largo del genoma. Con esta técnica observamos que las nueve líneas presentaban un gran número de ganancias y pérdidas (Anexo I). Identificamos 160 ganancias y 130 pérdidas en total. Las regiones más frecuentemente ganadas fueron 1q (100%), 7q (89%), 4q (89%), 8q (78%), 15q (78%), 11q (78%) y 18q (78%). Las amplificaciones de alto nivel se encontraron en 1q21-q32, 8q21-q23, 11q14-q25, 18q11-q22, 7q21-q32, 1p13-p21, 2p23, 3q26, 5p14-p15.3, 7p21-p22 y 13q32-q34. Las regiones de pérdida más frecuentes fueron 13q (100%), 6q (89%), 14q (78%), 9p (67%), 2q (67%) y 1p (67%) (Figura 15).

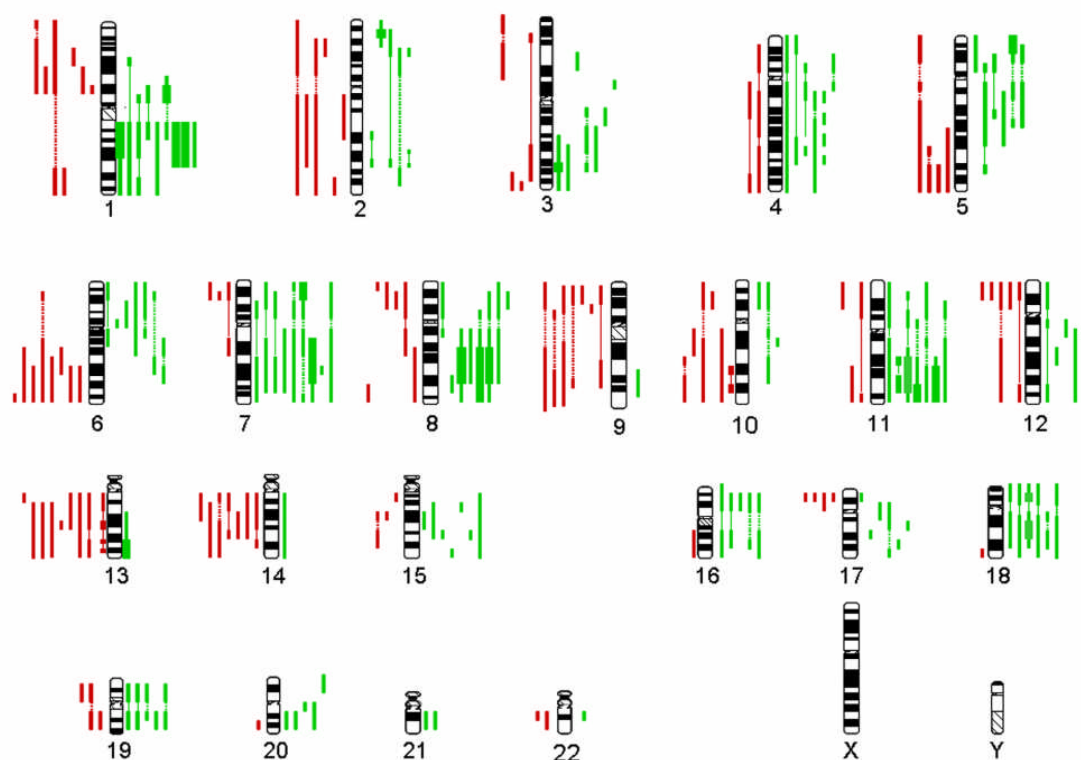


Figura 15. Resumen de los resultados de CGH de las 9 líneas celulares incluidas en el estudio. Las barras rojas de la izquierda indican las regiones de pérdida y las verdes de la derecha regiones de ganancia. Las barras verdes más gruesas indican regiones de amplificación.

2.2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS MEDIANTE aCGH EN EL ONCHIP DEL CNIO.

Para definir las ganancias y pérdidas de material genético con una mayor resolución que permita, en la medida de lo posible, el estudio de los genes implicados, se realizaron estudios de arrays de CGH (aCGH). Este ensayo se basa en la hibridación competitiva de un ADN problema con otro ADN control, que han sido marcados diferencialmente, sobre un cristal que tiene impresos fragmentos de, en este caso, ADNc, en lugar de cromosomas metafásicos, lo cual permite detectar variaciones en el número de copias de los genes incluidos en el array. Estos ensayos, junto con los de arrays de expresión permiten una comparación directa de los genes con variaciones en el número de copias y su expresión. Para hacer que la determinación de las ganancias y pérdidas en los aCGH fuesen sistemáticas, se hibridaron arrays con muestras con un número creciente de cromosomas X (de 1 a 5) (Pollack et al., 1999). De este modo se determinó que los umbrales de ganancia y amplificación estaban en ratios de fluorescencia (Cy5/Cy3) superiores a 1.22 y 1.61 (más de 5 copias), respectivamente, y los de pérdidas en ratios de fluorescencia (Cy5/Cy3) por debajo de 0.85.

Para la delimitación de las regiones de ganancia/amplificación con los aCGH nos centramos en el estudio de los cromosomas 1, 7, 8, 11 y 18, ya que presentaban amplicones en CGH-convencional y son cromosomas con ganancias frecuentes en muestras primarias (Bergsagel et al., 2005; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2004). Las regiones de ganancia/amplificación se determinaron utilizando los umbrales establecidos previamente y se analizaron con el programa CGH-Plotter (Autio et al., 2003). De este modo identificamos trece regiones de ganancia/amplificación en las siguientes regiones (Figura 16): 1p32.2-p13.2, 1q22-q42.3, 7p14.3-p22, 7q21, 11-q35, 7q35-q36, 8q11-q12.3, 8q21.3-q24, 11p13-p15, 11q13.3-q14.3, 11q24.2-q25, 18p11-p11.31 y 18q12.3-q23. Algunas de estas regiones de ganancia afectaban a brazos cromosómicos casi por completo. Dentro de estas regiones pudimos identificar sub-regiones que presentaban un nivel distinto de amplificación.

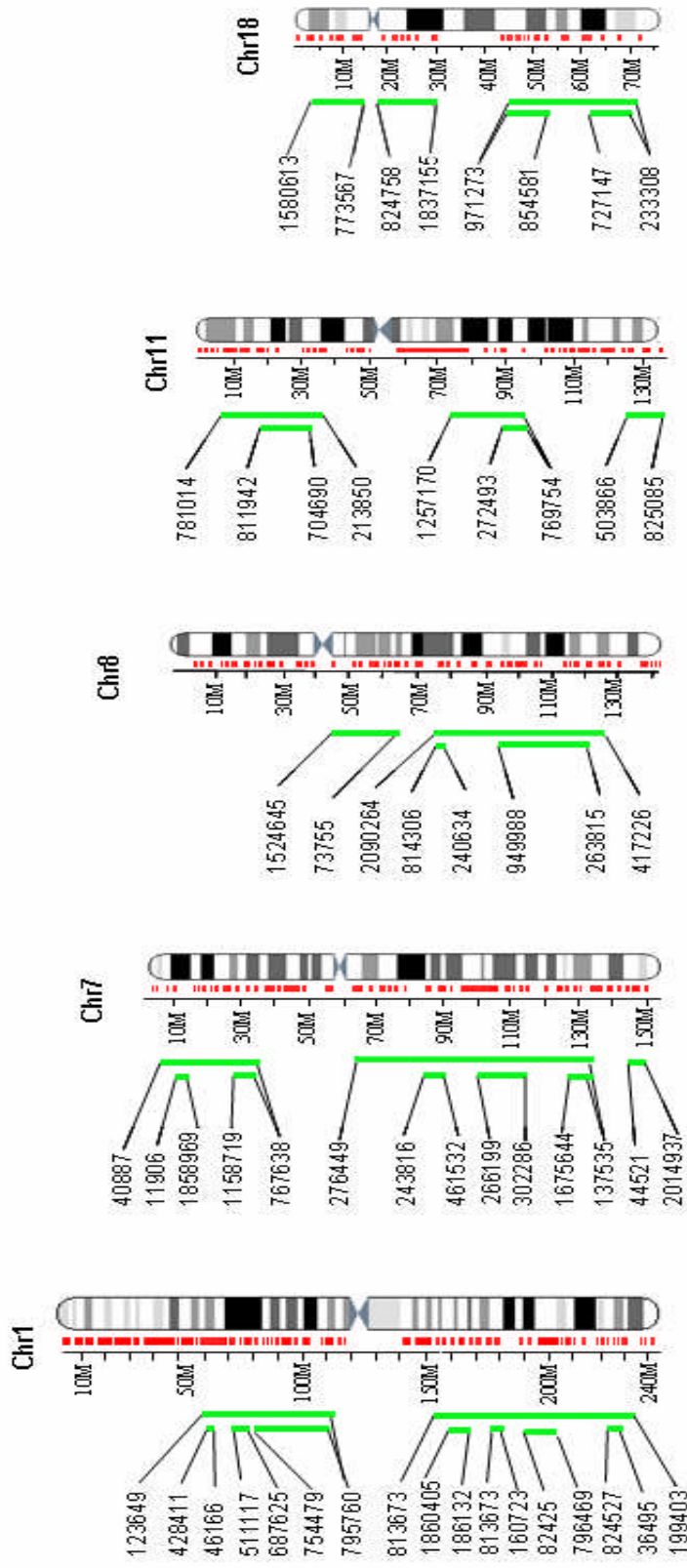


Figura 16. Ideogramas de los cromosomas 1, 7, 8, 11 & 18 que representan las regiones de ganancia/amplificación en las 9 líneas celulares. La línea roja de la izquierda representa la cobertura de los clones en el OncoChip para cada cromosoma. La cobertura no es homogénea en todos los cromosomas y se pueden encontrar algunos huecos que se han tenido en cuenta al definir las regiones de ganancia. Las barras verdes de la izquierda delimitan las regiones de ganancia. También se muestran las regiones mínimas de amplificación. Se muestra el nombre del primer y último clon (IMAGE) de las regiones.

2.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS/AMPLIFICADOS Y SOBRE-EXPRESADOS.

Una vez determinadas las regiones de ganancia y de pérdida, se cruzaron estos datos con los datos obtenidos en el análisis de perfiles de expresión (R.1), para poder identificar los genes que simultáneamente se encuentran ganados/amplificados y sobre-expresados en los cromosomas estudiados. A diferencia de los umbrales de ganancia y pérdida de los aCGH, el umbral de sobre-expresión para los perfiles de expresión se estableció en un ratio de fluorescencia (Cy5/Cy3) superior a 2. Se seleccionaron aquellos genes que cumplían ambas condiciones de forma recurrente (en al menos dos líneas). De este modo se identificaron 60 genes que cumplían estas condiciones (Tabla 18). También se calculó el porcentaje de líneas celulares que sobre-expresaban un gen cuando éste se encontraba ganado y el porcentaje de líneas que sobre-expresaban ese mismo gen en las líneas que no presentaban la ganancia. Así, pudimos observar que había 25 genes que únicamente se sobre-expresaban en líneas que ganaban esa región (son los genes sombreados en la Tabla 18). También encontramos seis genes, *CHI3L1*, *ELMO1*, *BNIP3L*, *PLAG1*, *LOC157567* y *VPS28*, que mostraban una asociación significativa (Test de Fisher $p < 0.05$) (marcados con * en la Tabla 18) entre la sobre-expresión y la presencia de ganancia/amplificación. Más aún, encontramos que nueve genes (*NFIA*, *AIM2*, *LOC54499*, *SELL*, *PTPN7*, *PURB*, *TRRAP*, *RAB30* y *C18orf8*) (marcados con ³ en la Tabla 18) estaban amplificados en todas las líneas que presentaban un aumento en el número de copias, que otros 15 (marcados con ⁴ en la Tabla 18) estaban exclusivamente ganados en líneas que presentaban alteraciones y el resto de genes presentaban tanto ganancias como amplificaciones (Tabla 18).

Tabla 18. Genes ganados/amplificados (ratio aCGH >1.22) y sobre-expresados (ratio array de expresión >2) en al menos dos de las líneas celulares.**Tabla 18.1. Genes ganados/amplificados y sobre-expresados en el cromosoma 1.**

Gen	Descripción	Banda	Inicio (bp)	% de líneas con sobre-expresión	
				Ganados ¹	No ganados ²
<i>NFLA</i> ³	KIAA0485 protein	1p31.3-p31.2	60471035	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>LMO4</i>	LIM domain only 4	1p22.3	86963064	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>DISC1</i> ⁴	Disrupted in schizophrenia 1	1p22	92149953	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>EST</i> ⁴	IMAGE: 683331	1p22.1	93013822	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>CD53</i> ⁴	CD53 antigen	1p31-p12	110282336	100% (2/2)	57% (4/7)
<i>ESTIB</i> ⁴	Est1p-like protein B	1q22	151984237	100% (2/2)	29% (2/7)
<i>AIM2</i> ³	Absent in melanoma 2	1q22	154764543	67% (2/3)	50% (3/6)
<i>Ufc1</i> ⁴	Ufm1-conjugating enzyme 1	1q23.1	156855810	67% (2/3)	50% (3/6)
<i>CAPON</i>	C-terminal PDZ domain ligand of neuronal nitric oxide synthase	1q23.1-q23.2	157785645	40% (2/5)	25% (1/4)
<i>LOC54499</i> ³	Putative membrane protein	1q22-q25	161347624	40% (2/5)	50% (2/4)
<i>SELL</i> ³	Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1q23-q25	165310642	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>PTPN7</i> ³	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	1q32.1	197550033	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>CHI3L1</i> ^{*4}	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1q32.1	198577702	67% (2/3)	17% (1/6)
<i>GUK1</i>	Guanylate kinase 1	1q32-q41	224066618	50% (2/4)	20% (1/5)

Tabla 18.2. Genes ganados/amplificados y sobre-expresados en el cromosoma 7.

Gen	Descripción	Banda	Inicio (bp)	% de líneas con sobre-expresión	
				Ganados ¹	No ganados ²
<i>ELMO1</i> ^{*4}	Engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, <i>C. elegans</i>)	7p14.1	36540538	100% (3/3)	0% (0/6)
<i>PURB</i> ³	Purine-rich element binding protein B	7p13	44562097	100% (2/2)	14% (1/7)
<i>GUSB</i>	Glucuronidase, beta	7q21.11	64065460	66% (2/3)	17% (1/6)
<i>PFTK1</i>	PFTAIRE protein kinase 1	7q21.1	88873959	50% (2/4)	40% (2/5)
<i>CDK6</i> ⁴	Cyclin-dependent kinase 6	7q21.2	90888487	75% (3/4)	20% (1/5)
<i>TRRAP</i> ³	Transformation/transcription domain-associated protein	7q22.1	97010689	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>SRPK2</i>	SFRS protein kinase 2	7q22.3	103240523	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>EST</i> ⁴	IMAGE:624347	7q22.3	104785450	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>EST</i>	IMAGE:462229	7q31	115393089	33% (2/6)	33% (1/3)
<i>MLL3</i>	B melanoma antigen family, member 4	7q34-q36	150080292	40% (2/5)	0% (0/4)

Tabla 18.3. Genes ganados/amplificados y sobre-expresados en el cromosoma 8.

Gen	Descripción	Banda	Inicio (bp)	% de líneas con sobre-expresión	
				Ganados ¹	No ganados ²
<i>BNIP3L</i> *	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	8p21	26594052	100% (2/2)	0% (0/7)
<i>CEBPD</i> ⁴	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	8q11	48536540	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>LYN</i>	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	8q12.1	56731374	57% (4/7)	50% (1/2)
<i>PLAG1</i> * ⁴	Pleiomorphic adenoma gene 1	8q12.1	57236036	100% (5/5)	25% (1/4)
<i>GGH</i>	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.1	63867237	22% (2/9)	-
<i>EST</i>	IMAGE:323274	8q13.1	67480390	50% (4/8)	0% (0/1)
<i>TPD52</i>	Tumor protein D52	8q21	80995889	100% (7/7)	50% (1/2)
<i>FLJ14007</i>	Hypothetical protein FLJ14007	8q21.13	82662132	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>EST</i>	IMAGE: 809828	8q21.2	86086919	33% (2/6)	33% (1/3)
<i>TP53INP1</i>	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	8q22	95910144	100% (4/4)	80% (4/5)
<i>LOC157567</i> *	Hypothetical protein LOC157567	8q22.3	101603041	83% (5/6)	0% (0/3)
<i>CTHRC1</i>	Collagen triple helix repeat containing 1	8q22.3	104452013	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>LRP12</i>	Low density lipoprotein-related protein 12	8q22.2-q23.1	105569698	43% (3/7)	100% (2/2)
<i>EIF3S3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma.	8q24.11	117718260	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>EST</i>	IMAGE:1284498	8q24.12	119375502	100% (8/8)	0% (0/1)
<i>MRPL13</i>	Mitochondrial ribosomal protein L13	8q24.12	121466001	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>FLJ14825</i>	Hypothetical protein FLJ14825	8q24.13	124290005	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>ZHX1</i>	Zinc fingers and homeoboxes 1	8q24.13	124318757	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>FBXO32</i>	F-box protein 32	8q24.13	124567904	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	8q24.13	128836577	71% (5/7)	0% (0/2)
<i>CYCI</i> ⁴	Cytochrome c-1	8q24.3	145286499	100% (2/2)	29% (2/7)
<i>VPS28</i> * ⁴	Vacuolar protein sorting 28 (yeast)	8q24.3	145686880	100% (2/2)	0% (0/7)

Tabla 18.4. Genes ganados/amplificados y sobre-expresados en el cromosoma 11.

Gen	Descripción	Banda	Inicio (bp)	% de líneas con sobre-expresión	
				Ganados ¹	No ganados ²
<i>GAS2</i>	Growth arrest-specific 2	11p14.3-15.2	23497753	75% (3/4)	40% (2/5)
<i>WNT11</i> ⁴	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	11q13.5	77436402	100% (3/3)	33% (2/6)
<i>RAB30</i> ³	RAB30, member RAS oncogene family	11q12-q14	84231298	50% (2/4)	100% (5/5)
<i>PICALM</i>	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	11q14	87284417	100% (3/3)	33% (2/6)
<i>PANX1</i>	Pannexin 1	11q14.3	95369855	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>POU2AF1</i>	POU domain, class 2, associating factor 1	11q23.1	112735138	100% (3/3)	83% (5/6)
<i>FLII</i>	Friend leukemia virus integration 1	11q24	130076675	57% (4/7)	0% (0/2)

Tabla 18.5. Genes ganados/amplificados y sobre-expresados en el cromosoma 18.

Gen	Descripción	Banda	Inicio (bp)	% de líneas con sobre-expresión	
				Ganados ¹	No ganados ²
<i>C18orf8</i> ³	Chromosome 18 open reading frame 8	18q11.2	20815018	86% (6/7)	0% (0/2)
<i>KCTD1</i> ⁴	Potassium channel tetramerisation domain containing 1	18q12.1	23766411	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>DCC</i>	Deleted in colorectal carcinoma	18q21.3	50213955	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>TCF4</i>	Transcription factor 4	18q21.1	52797605	67% (4/6)	67% (2/3)
<i>MALT1</i>	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation.	18q21	56312726	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>EST</i>	IMAGE: 845609	18q21.31	56781141	67% (2/3)	33% (2/6)
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	18q21.3	60763885	100% (6/6)	67% (2/3)

EST: Expressed Sequence Tags para identificarlos se proporciona el nombre del clon (IMAGE Clone_ID).

Las celdas sombreadas indican genes que únicamente presentan sobre-expresión en líneas celulares que presentan ganancias/ amplificaciones.

¹ Porcentaje de líneas que presenta de modo simultáneo sobre-expresión del gen y ganancia/amplificación.

² Porcentaje de líneas que presenta sobre-expresión del gen, pero no presenta ganancias en esa región.

³ Genes amplificados (aCGH ratio > 1.61) en todas las líneas que presentan ganancia genómica.

⁴ Genes ganados (aCGH ratio > 1.22, <1.61) en todas las líneas que presentan ganancia genómica.

* Genes que presentan una asociación entre la presencia de ganancias/amplificaciones y la sobre-expresión (Test de Fisher p <0.05).

Por otro lado se asignó el término de *Gene Ontology* (GO) más apropiado a cada uno de los 60 genes ganados y sobre-expresados utilizando el interfaz FatiGO (Al-Shahrour et al., 2005; Herrero et al., 2004). Entre los más representativos encontramos términos GO relacionados con el crecimiento y mantenimiento celular (GO:0007165), genes de transducción de señales (GO:0008151), de muerte celular (GO:0008219) y genes relacionados con la regulación de la muerte celular programada (GO:0043067). Además, los genes asociados a muerte celular - *BCL2*, *MALT1*, *DCC*, *ELMO1*, *GAS2* y *BNIP3L*- estaban significativamente ($p=0.024$) sobre representados en nuestra lista con respecto a los términos GO de los genes incluidos en nuestro array (Figura 17).

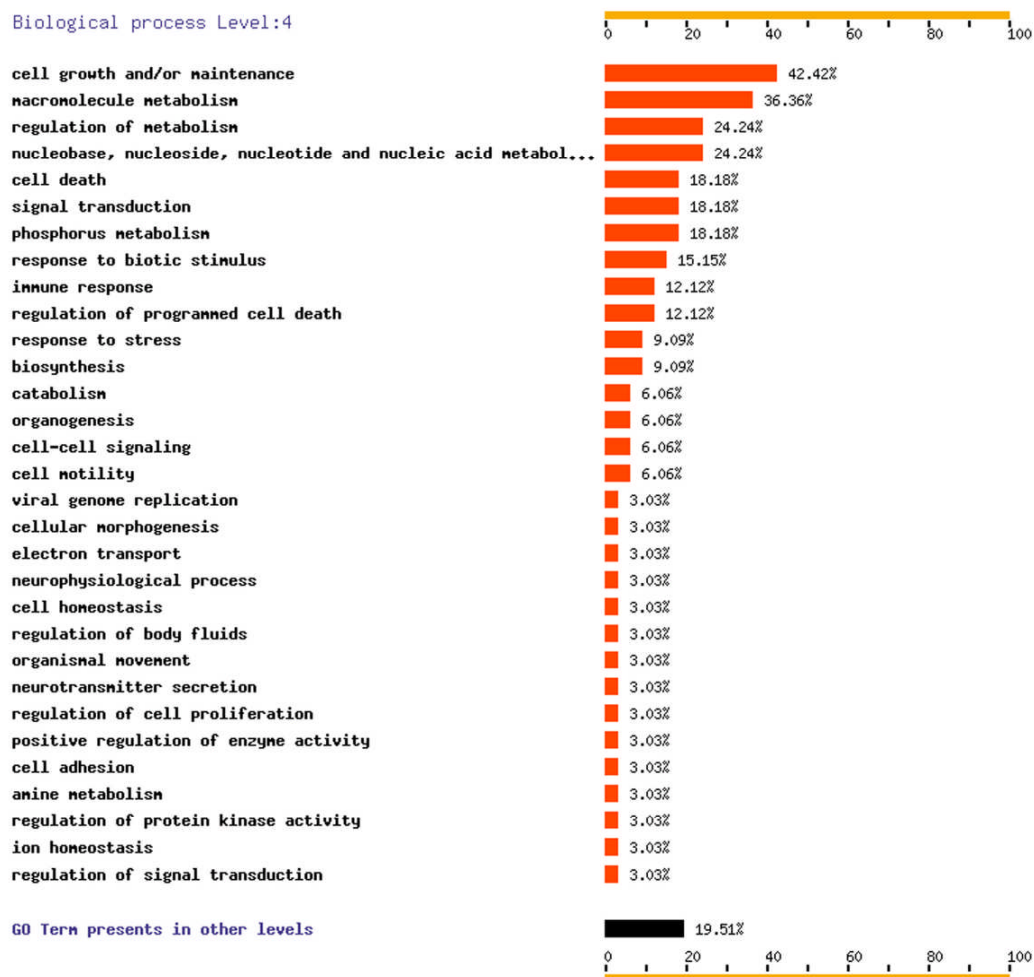


Figura 17. Representación gráfica de los resultados de la herramienta FatiGO. Introducimos el listado de genes ganados /sobre-expresados que obtuvimos para buscar los términos GO más frecuentes.

Finalmente, siguiendo la misma estrategia, también se han identificados aquellos genes cuya expresión está reducida como consecuencia de su pérdida a nivel genómico en

los cromosomas frecuentemente delecionados (6, 9, 13 y 14). Esto nos ha permitido obtener una visión más completa de tanto los posibles oncogenes y genes supresores de tumores asociados con esta patología (Anexo I).

3. ANÁLISIS DEL ESTADO DE AMPLIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE *C-MYC*, *BCL2* Y *MALT1*.

Para la validación de los resultados obtenidos en los arrays se emplean técnicas alternativas como son el FISH para la detección de ganancias, pérdidas y translocaciones de ADN genómico o qRT-PCR para determinar los niveles de expresión a nivel de ARNm. Para realizar estos análisis se eligieron tres genes, *c-MYC*, *BCL2* y *MALT1*, tanto por su relevancia en patologías linfoides como por lo novedoso del hallazgo de la sobre-expresión *MALT1* en MM. La sobre expresión se determinó comparando la expresión de cada gen con la expresión de dicho gen en ARNm obtenido de células plasmáticas normales de amígdala (Medina et al., 2002). Los resultados mostraron una alta concordancia entre los experimentos (Tabla 19). Como se puede observar en la tabla 19, cuatro de las nueve líneas (SK-MM-2, LP-1, Karpas-620, OPM-2) presentaban una sobre-expresión *c-MYC*. Este gen se encontró simultáneamente ganado y translocado en estas líneas y no se observó sobre-expresión en las líneas que solo presentaban la ganancia (JJN-3) o sólo la translocación (L-363). El análisis de FISH con la sonda de *MALT1 break apart* demostró que *MALT1* presentaba copias extra del gen en siete líneas. Una de las líneas celulares, SK-MM-2, presentaba una clara amplificación (más de 10 copias) que confirmaba los resultados de los aCGH. Cuatro de estas líneas mostraban sobre-expresión de *MALT1* mediante qRT-PCR. Además, se observó que una línea, U266, presentaba sobre-expresión de *MALT1* aunque no presentaba ni ganancias ni translocaciones de este gen. Las mismas líneas celulares que presentaban un número extra de copias de *MALT1* tenían un aumento el número de copias de *BCL2*, mostrándose por primera vez la co-amplificación de ambos genes en el cromosoma 18 (Figura 18). Más aún, cinco de las líneas con ganancia de *BCL2* lo sobre-expresaban, y U266 que no tenía ni ganancias ni translocaciones de *BCL2*, también lo sobre-expresaba. En resumen, por FISH hemos demostrado que *MALT1* y *BCL2* se encuentran ganados en las mismas 7 líneas y, por primera vez en MM, hemos demostrado mediante qRT-PCR la sobre-expresión simultánea de ambos genes en 3 de estas 7 líneas (SK-MM2, OPM-2 y LP-1) con ganancia /amplificación y la sobre-expresión de ambos genes en U266 que no presenta alteraciones en el cromosoma 18q21.

Tabla 19. Resultados de FISH y qRT-PCR de los genes *C-MYC*, *BCL2* y *MALT1*.

Línea celular	Ploidía	<i>C-MYC</i>			<i>MALT1</i>			<i>BCL2</i>		
		FISH	% cls con ganancia	qRT-PCR	FISH	% cls con ganancia	qRT-PCR	FISH	% cls con ganancia	qRT-PCR
SK-MM-2	3	G+T	100	4.82*	A	100	2.84*	A	100	62.1*
U-266	2	N	0	0.06	N	8	6.71*	N	4	18.2*
OPM-2	3	G+T	100	2.26*	G	75	3.05*	G	88	7.69*
RPMI-8226	3	N	0	1.75	G	58	1.59	G	77	4.89
JJN 3	2-3	G	87	1.31	G	98	1.10	G	69	2.57
L-363	2-3	N+T	0	1.51	N	10	1.93	N	7	9.40*
LP-1	2-3	A+T	95	5.16*	G	89	6.41*	G	75	26.4*
KARPAS-620	3	A+T	100	2.15*	G	96	2.09*	G	98	4.00
NCI H-929	2	N/D	0	1.31	G	70	1.55	G	70	5.34*
CP Amígdala	-	-	-	1.09	-	-	1.23	-	-	3.42

A: amplificado, G: ganado, N: sin cambios, D: delecionado, T: translocado, CP: células plasmáticas, * Sobre-expresado. Se consideró un gen como ganado cuando en el estudio de FISH se observo una señal más que la ploidía y amplificado cuando se observaban más de 6 señales. La sobre-expresión se considero cuando superaba en 1.6 veces los niveles de expresión de las CP normales.

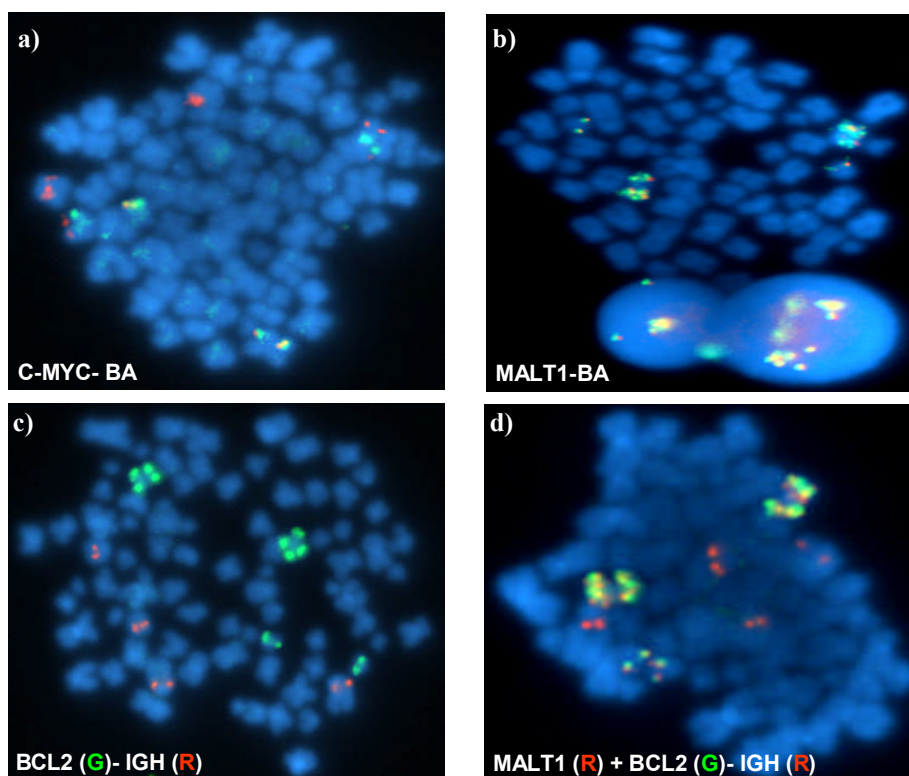


Figura 18. FISH de la línea celular SK-MM-2. Se validaron los resultados del array mediante FISH con las sondas para a) la sonda C-MYC-break apart, que permitió en este caso observar reordenamientos de C-MYC y seis copias del gen.; b) la sonda MALT1-break apart, permitió la identificación de una amplificación (más de diez copias) del *MALT1*; c) la sonda BCL2-IGH, permitió observar más de 10 copias de *BCL2* con un patrón similar al de *MALT1*. d) La co-hibridación de la sonda de MALT1, marcada en rojo, y la sonda BCL2-IGH permitió demostrar que MALT1 y BCL2 se encontraban co-amplificados en el mismo amplicon.

Para comprobar si la expresión de Bcl-2 y MALT1 a nivel de proteína estaban de acuerdo con los niveles de ARNm se realizaron experimentos de *Western Blotting* e Inmunohistoquímica (IHQ). Estos estudios permiten detectar la presencia y cantidad de la proteína de interés en un extracto celular en el caso de *Western Blotting* y también su localización celular en el caso de la IHQ. Para la proteína Bcl-2 utilizamos un Ab que funcionaba en ensayos de IHQ. De este modo pudimos obtener una buena correspondencia entre los niveles de proteína Bcl-2, los niveles de ARNm y ganancia /amplificación (Figura 19)

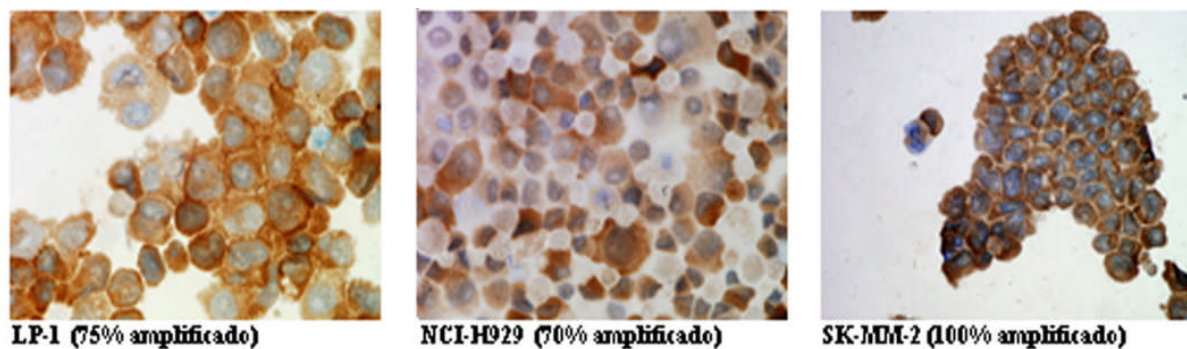


Figura 19. Imágenes de inmunohistoquímica de tres de las líneas de mieloma analizadas. Para este estudio se utilizó un anticuerpo anti Bcl-2 (clon 124, cortesía de Prof. David Y. Mason, dilución 1:1). Con este experimento se demuestra que la sobre-expresión de Bcl-2 es concordante con el nivel de la ganancia genómica. Entre paréntesis se indica el porcentaje de células con ganancia de *BCL2*.

En el caso de MALT1, no se pudo estudiar mediante IHQ y se realizaron *Western Blotting*, en colaboración con la Unidad de Anticuerpos Monoclonales, que está desarrollando un anticuerpo monoclonal que funcione tanto en *Western Blotting* como IHQ. Utilizamos el clon MALT1 (RON 169A1D7) y observamos niveles muy altos en la líneas SK-MM-2, JJN-3 y U266 (Figura 20). Las demás líneas celulares mostraban niveles más bajos y variables. En líneas generales hay correspondencia con los niveles de ARNm aunque hay algunas discrepancias, sin embargo la línea SK-MM-2 que presentaba un amplicón en *MALT1* tiene unos niveles muy altos de esta proteína.

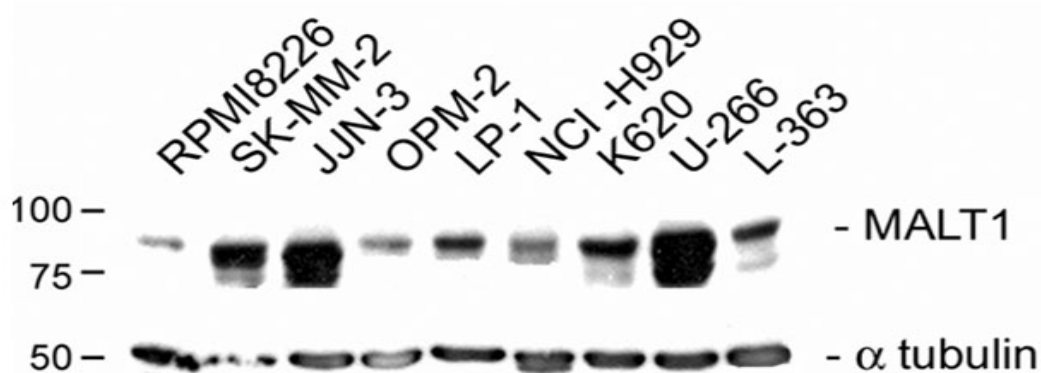


Figura 20. *Western Blotting* de las líneas de MM con el Ab MALT1 (RON 169A1D7). Se observa que hay tres líneas que tienen niveles muy altos de expresión de MALT1.

RESULTADOS II. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE MUESTRAS PRIMARIAS DE MIELOMA.

4. IDENTIFICACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS DE LOS GENES DE INMUNOGLOBULINAS EN MUESTRAS PRIMARIAS DE MM.

El estudio de muestras primarias se realizó a partir de una serie de 26 pacientes diagnosticados con MM. Para determinar si los casos incluidos en nuestra serie presentaban translocaciones en alguno de los genes de Ig, se realizaron ensayos de FISH sobre suspensiones citogenéticas obtenidas al diagnóstico. Se utilizaron dos sondas de rotura (break apart), correspondientes al gen *IGH* (Vysis, Downers Grove, IL) y al gen *IGL* (Martin-Subero et al., 2002). De este modo observamos nueve casos que presentaban reordenamientos de *IGH* y dos casos más presentaban reordenamientos de *IGL* (Tabla 20)

Tabla 20. Caracterización mediante bandas G, FISH y aCGH de los casos de MM.

Caso	Cariotipo al diagnóstico	t Ig	Ploidía	1q+	13q-	gan Xq21
1	46,XY / 45,X,-Y	-	H	-	-	-
2	46,XY	-	H	-	-	+
3	46,XY	IGH+	NH	-	-	-
4	46,XY	-	NH	+	-	+
5	46,XX	-	NH	-	-	-
6	46,XY	IGH+	NH	+	+	-
7	46,XY	IGH+	NH	-	-	-
8	46,XX	-	NH	-	+	-
9	57,XY<3n>,-1,der(6)t(1q;6q)x2,-8,-13,-14,-16,-17,-18,-20	IGL+	H	+	-	-
10	46,XY	-	H	-	+	-
11	46,XY	IGL+	H	+	+	+
12	46,XY	-	NH	+	+	-
13	NA	IGH+	NH	-	+	-
14	46,XX	IGH+	NH	-	-	-
15	46,XY	IGH+	NH	-	+	-
16	46,XY	-	NH	-	-	-
17	46,XX,inv(9)(q11q13) [100%]	-	H	+	-	-
18	46,XY	-	H	-	-	-
19	46,XX	-	H	+	+	+
20	46,XY,der(1p),+3,+5,der(8p),der(9p),-13,add(13p),add(14)(q32),+15,er(16q),der(20q),+mar [100%]	-	H	+	+	+
21	46,XX[67%]50,XX,add(1)(p36),der(3q),t(3;3)(q?:q?),+7,add(12)(p13),der(14q),+mar [33%]	-	H	-	-	-
22	46,XX	IGH+	NH	-	+	-
23	46,XY	-	H	-	-	-
24	46,XY	IGH+	H	-	-	-
25	NA	IGH+	NH	+	-	-
26	45,X,-X[87%] 51,XX, der(1)(p?),+3,+5,+7,+8,-9,+11,der(14)(q?), add(16)(p?),+18 [13%]	-	H	+	-	-

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES GENÓMICOS EN MUESTRAS PRIMARIAS MM.

5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

La infiltración de células plasmáticas (CP) en médula ósea de un paciente diagnosticado con MM es baja, llegando en el mejor de los casos a superar el 20%. Por ello, para una buena caracterización genómica, se seleccionaron positivamente CP con el marcador de superficie CD138 mediante el método conocido como MACS (Miltenyi et al., 1990). Este método permite el enriquecimiento de la muestra en células plasmáticas, aumentando la potencia de la técnica para detectar cambios genómicos. Todas las muestras mostraron al menos un 70% de CP después del enriquecimiento. Se han realizado algunos estudios de CGH convencional con muestras de MM en los cuales también se enriquece las muestras en CP (Gutierrez et al., 2004; Gutierrez et al., 2001; Nomdedeu et al., 2002; Rosinol et al., 2005), pero la mayoría de los estudios no lo hacían (Avet-Loiseau et al., 1997b; Cigudosa et al., 1998; Liebisch et al., 2003). La sensibilidad de la CGH convencional está limitada por la resolución microscópica, esto es, es necesario que una alteración genómica implique una región de 5-10 Mb para ser detectada. Nuestro proyecto, sin embargo, va a utilizar una estrategia de aCGH con una resolución media de 75 Kb. Se ha utilizado la plataforma de aCGH de Agilent que consta de 44000 oligonucleótidos repartidos de forma bastante uniforme por el genoma, incluyendo tanto secuencias codificantes como no-codificantes (MM.9).

A pesar de que al diagnóstico solamente un 15% de los casos (Tabla 20) mostraban cariotipos alterados, esta aproximación de aCGH de alta resolución ha permitido identificar variaciones en el número de copias (CNV) en todos los casos estudiados. En la figura 21 se muestra un ejemplo de los perfiles de aCGH obtenidos mediante esta tecnología para uno de los casos. Siguiendo esta estrategia, se identificaron un total de 270 CNV cuya frecuencia variaba de 2 a 26 CNV por caso, 145 se correspondían con ganancias y 125 con pérdidas. La mediana del tamaño de las alteraciones fue de 36 Mb, oscilando entre 0.026 Mb y 199 Mb. Las ganancias más frecuentes afectaban a los cromosomas 19 (65%), 9 (42%), 15 (42%), 5 (38%), 3 (38%), 7 (35%) y 1q (38%), y las pérdidas afectaban 13q (38%), 8p (35%), 16p (31%), 22q (31%) y 1p (27%) (Anexo I).

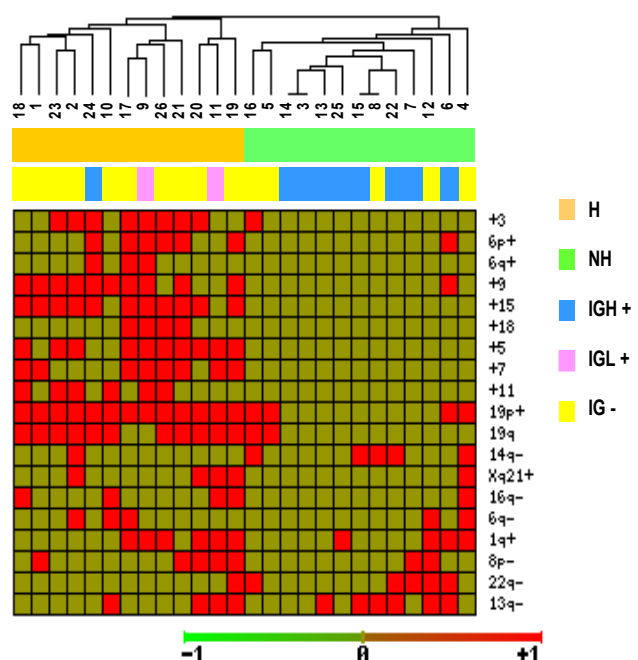


Figura 21. Perfil de aCGH de uno de los casos. Las barras a la izquierda de los perfiles indican regiones de pérdida, y las de la derecha indican regiones de ganancia.

Se conocen dos categorías de mielomas: los mielomas hiperdiploides (H) y los no-hiperdiploides (NH). Los primeros, como ya hemos visto, se caracterizan por tener un número modal de cromosomas que oscila entre 48 y 74 que, en general, es debido a la presencia de trisomías en los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19; por otro lado, los mielomas NH no presentan este genotipo. En este trabajo clasificamos los mielomas como H o NH en función de los resultados obtenidos en los aCGH. Como explicamos en el apartado MM 9.7.3, asignamos un valor de 1, 2 y 3 dependiendo de si pierde, no cambia o gana un cromosoma entero. La suma de los valores de todos los cromosomas de cada caso nos permite saber si es H (entre 48 y 75) o NH (el resto). De este modo observamos que la mitad de las muestras eran H y la otra mitad NH (Tabla 20 y Figura 22).

El estudio de aCGH comenzó definiendo las CNV de cada caso, y, con las alteraciones más frecuentes encontradas, realizamos un análisis de *clustering* jerárquico no supervisado para buscar grupos que se diferencien por la presencia/ausencia de esas alteraciones (Figura 22). Para realizar este análisis se categorizaron las alteraciones en códigos de 1 ó 0 dependiendo de la presencia o ausencia de la alteración en cada uno de los casos. Mediante esta aproximación fuimos capaces de separar los casos H de los NH (Figura 22). Este análisis demostró que los casos con translocaciones de *IGH* se asocian con los casos NH y que las translocaciones de *IGL* sólo aparecen en el grupo de mielomas. También observamos 10 casos que presentaban deleciones en 13q y 10 casos que presentaban ganancias en 1q que son alteraciones descritas frecuentemente en MM (Tabla 20 y Figura 22) distribuidas por ambos grupos.

Figura 22. Agrupamiento no supervisado de las muestras MM utilizando las CNV más frecuentes. El análisis es capaz de separar los casos H de los NH. Los casos H agrupan trisomías de los cromosomas 19, 15, 11, 9, 7, 5 y 3. Las deleciones de 13q y las ganancias en 1q se distribuyen en ambos grupos. IGH +: presentan reordenamientos del gen *IGH*; IGL+: presentan reordenamientos del gen *IGL*; IG-: no presentan reordenamientos de ninguno de los dos.



Se observaron dos tipos de CNV: **cambios numéricos** que afectaban a cromosomas enteros, tanto ganancias como pérdidas; y **alteraciones estructurales** que afectan a regiones cromosómicas. Este segundo grupo lo dividimos en dos sub-grupos dependiendo del tamaño de la CNV: aquellos que afectan regiones mayores de 3 Mb (**>3 Mb**) y los que tienen afectadas regiones más pequeñas que 3 Mb (**<3 Mb**). Las CNV más frecuentes fueron las alteraciones estructurales >3 Mb (41.5% de los cambios), seguidas por los cambios numéricos (31.1%). Hay que destacar, por otro lado, que el 4% de las CNV se deben a amplificaciones de alto nivel y el 3% a deleciones homocigóticas. Cuando comparamos el tipo de alteraciones en los grupos H y NH, encontramos que, como era de esperar, los cambios numéricos eran significativamente ($p < 0.001$) más frecuentes en el grupo de H debido a una frecuencia más alta de trisomías en estos casos. Sin embargo, parece que las monosomías son más frecuentes en el grupo de mielomas NH ($p = 0.076$) aunque no es estadísticamente significativo. En el caso de cambios estructurales, encontramos que las ganancias >3Mb eran significativamente más frecuentes en los mielomas H ($p: 0.037$). El resto de cambios se distribuía homogéneamente entre ambos grupos. También comparamos qué tipo de cambios eran más frecuentes en función de la presencia de translocaciones de *IGH*. Observamos que las ganancias de cromosomas enteros ($p: 0.001$) y las alteraciones estructurales >3Mb ($p: 0.004$) eran significativamente más frecuentes en aquellos casos que no presentaban reordenamientos de *IGH* (Tabla 21) que, en su mayoría, se corresponden con casos de mielomas H.

Tabla 21. Distribución del número y tipo de CNV en los diferentes grupos de mieloma.

	Nº CNV Numéricos	Nº CNV Estructurales >3Mb	Nº CNV Estructurales <3Mb	Nº CNV Totales
Ganancias	74	50	21	145
Pérdidas	10	62	53	125
Total	84	112	74	270
	Nº CNV Numéricos	Nº CNV Estructurales >3Mb	Nº CNV Estructurales <3Mb	Nº CNV Totales
IGH+ (9 casos)				
Ganancias	5*	5*	9	19
Pérdidas	6	6*	16	28
Total	11*	11*	25	47
IGH- (16 casos)				
Ganancias	69*	45*	12	126
Pérdidas	4	56*	37	97
Total	73*	101*	49	223
	Nº CNV Numéricos	Nº CNV Estructurales >3Mb	Nº CNV Estructurales <3Mb	Nº CNV Totales
H-MM (13 casos)				
Ganancias	69*	36*	4	109
Pérdidas	2	36	26	64
Total	71*	72	30	173
NH-MM (13 casos)				
Ganancias	5*	14*	17	36
Pérdidas	8	26	27	61
Total	13*	40	44	97

* Diferencias estadísticamente significativas (U Mann-Whitney).

5.2. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES MÍNIMAS COMUNES (RMC).

Para obtener una relación de las regiones afectadas comúnmente en los mielomas, definimos las regiones mínimas comunes (RMC) para las ganancias y las pérdidas. Las RMC se definen como la región mínima que aparece ganada o perdida para el porcentaje más alto de casos. De este modo, identificamos 68 RMC, 33 se correspondían con ganancias y el resto, 35, con pérdidas (Tabla 22). La RMC más frecuente en las ganancias fue la RMC de 19p12.12-pter (65%) seguida por las ganancias en 9q34, 19q13 y 19q13.2 (50%) y las RMC de pérdidas más frecuentes aparecieron en 13q12-q21 (38%), 13q12.12 (35%), 8p12-p22 (27%) y 16p13.12 (23%). El tamaño medio de las RMC es de 1.5 Mb, pero varía de 0.026 Mb a 102 Mb, es decir, en algunos casos las RMC abarcan regiones muy pequeñas, unos pocos genes, pero en otros casos abarcan cromosomas o brazos cromosómicos enteros. Estas RMC son representativas de los cambios que ocurren en MM y podrían proporcionar un método fiable para la identificación de nuevos genes candidatos en estas regiones, especialmente cuando las regiones son pequeñas e incluyen pocos genes.

Por ejemplo la delección de 16p13.12, presente en el 23% de los casos, tan sólo incluye un gen, *ERCC4*, que está involucrado en la reparación y que se ha descrito como un gen modificador del riesgo en cáncer de mama.

Tabla 22. Descripción de las 68 RMC identificadas en MM.

GANANCIAS					DELECCIONES				
Cr	Región	Inicio	Tamaño (Mb)	%	Cr	Región	Inicio	Tamaño (Mb)	%
1	1q	142902432	102.520	38	1	1p36.32	1536308	5.000	8
3	3pter ¹	224727	3.337	35	1	1p36.12	23265113	0.604	8
3	3q11-q22 ¹	108062308	32.496	38	1	1p33 ³	50669458	3.014	8
3	3q26-qter ¹	197698952	1.593	42	1	1p31.1 ³	80821425	2.856	12
5	5p-q13.2 ¹	148243	73.955	38	1	1p21.3-p31.1	84171854	12.042	12
5	5q21.11q-ter ¹	96057266	84.560	38	1	1p12-p21.1	103799708	14.591	15
6	6p22.1-25.2	352463	26.129	23	3	3p24.3	24930353	0.880	12
6	6q12	64228424	3.086	15	4	4p16.2 ³	1661893	0.184	12
6	6q12	69403244	1.154	15	4	4p15.33 ³	13019621	0.285	12
7	7p21.1 ^{1,2}	5637996	0.178	35	4	4p15.31-p15.1 ³	16751089	14.070	8
7	7p21.1 ^{1,2}	11853187	0.515	35	4	4p13 ³	44691513	1.538	8
7	7p21.1 ^{1,2}	16776548	0.337	31	4	4q13.2-q22.1	66059589	26.058	8
7	7p14.1 ^{1,2}	36074495	0.333	35	6	6q23.2	136920041	0.341	12
7	7q ^{1,2}	61960303	96.628	27	6	6q26 ³	160608251	0.522	15
8	8q23.3-q24.21	117725989	8.097	12	7	7p22	1263119	0.093	8
8	8q24.21 ³	128548643	0.407	15	8	8p12-p22	13991907	13.105	27
9	9q22.2	89830592	1.734	42	8	8p11.22	37847079	0.527	19
9	9q34.2 ¹	132972692	0.043	50	8	8q23.1	107376988	0.545	8
11	11q13.2-q13.4	68821295	7.553	31	9	9p21.3	21067574	0.786	8
11	11q23.2-qter ¹	114350685	19.601	35	11	11q22.1	100828925	1.492	8
15	15 ¹	19109124	81.060	42	12	12p13.32	3509030	0.820	8
16	16q22.2	69322931	0.553	8	12	12p12.1	21152676	0.400	12
17	17p13.2	3632698	1.334	12	12	12q21.33	86882565	0.906	8
17	17p11	16763408	0.663	15	13	13q12.12	19140499	0.376	35
17	17q21.32	41458670	0.242	23	13	13q12-q21	45637710	20.455	38
18	18	170229	75.913	15	14	14q13.2-q21.3	30209271	16.915	12
19	19p13.12-pter ¹	232080	17.754	65	14	14q24.2	68763265	14.399	15
19	19q13	34522544	1.330	50	14	14q32.32	101569155	1.268	15
19	19q13.2 ¹	42921103	0.673	50	16	16p13.2	3646249	0.601	8
20	20q11.22	31714033	0.387	8	16	16p13.12	13923497	0.026	23
21	21q21.1	15295891	4.694	12	16	16q24.2 ³	83644296	1.600	23
X	Xq21.333-q25	97661774	26.092	19	17	17p13.2-p12	7054388	9.209	15
X	Xq25-qter	126030916	28.374	19	20	20q12	37664253	0.577	8
					22	22q11.22	21004565	0.344	19
					22	22q12.1	22555378	5.501	23

Cr: Cromosoma, %: porcentaje de casos que presentan esa RMC.¹ RMC estadísticamente significativas que en los casos H (p <0.05). ² RMC que aparecen en uno de los grupos H. ³ RMC que aparecen en uno de los grupos de NH.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE MIELOMAS EN FUNCIÓN DE LAS RMC.

El análisis mediante *clustering* no supervisado es una herramienta muy útil que permite determinar si la muestra segrega en diferentes grupos en función de las alteraciones. Cuando se observan diferentes subgrupos se pueden comparar mediante un análisis supervisado para determinar qué alteraciones son más frecuentes en cada grupo. Por ello, para determinar si los casos se separaban en diferentes grupos, a cada caso se le asignó una cadena de valores 0 y 1 dependiendo de la ausencia o presencia de cada una de las 68 RMC. Con esta matriz de datos realizamos un análisis de *clustering* no supervisado con el programa SOTA (Figura 23). Después, comparamos los grupos obtenidos mediante un análisis supervisado, para determinar las regiones que aparecen específicamente en cada uno de los grupos predefinidos por el *clustering* no supervisado en este caso. El análisis no supervisado, de nuevo, separó los casos H y los NH. Mediante el análisis supervisado de estos dos grupos, observamos que las ganancias de RMC de los cromosomas 15, 5, 19, 3, 9,7 y 11q, en este orden, se encontraban con una mayor frecuencia ($p < 0.05$) en los casos H, que las translocaciones de *IGH* eran más frecuentes en los casos NH ($p:0.011$) y las translocaciones de *IGL* solamente aparecían en el grupo H. Además de esto, el análisis no supervisado fue capaz de discriminar dos subgrupos de casos H y NH. En el caso del grupo H uno de los subgrupos presentaba una mayor número de casos con ganancias de RMC del cromosoma 7 ($p < 0.05$), que es lo que diferencia a ambos grupos (Ver regiones significativas en la tabla 22) y no presentaban las translocaciones que involucren al gen de *IGL* (Figura 23). En el caso del grupo de NH, también observamos dos ramas, una de ellas, que tan sólo incluía dos casos, se caracterizaba por la presencia de un mayor número de CNV, como por la presencia de ganancias en 8q24.21 (*c-MYC*), y la ausencia de translocaciones de *IGH*.

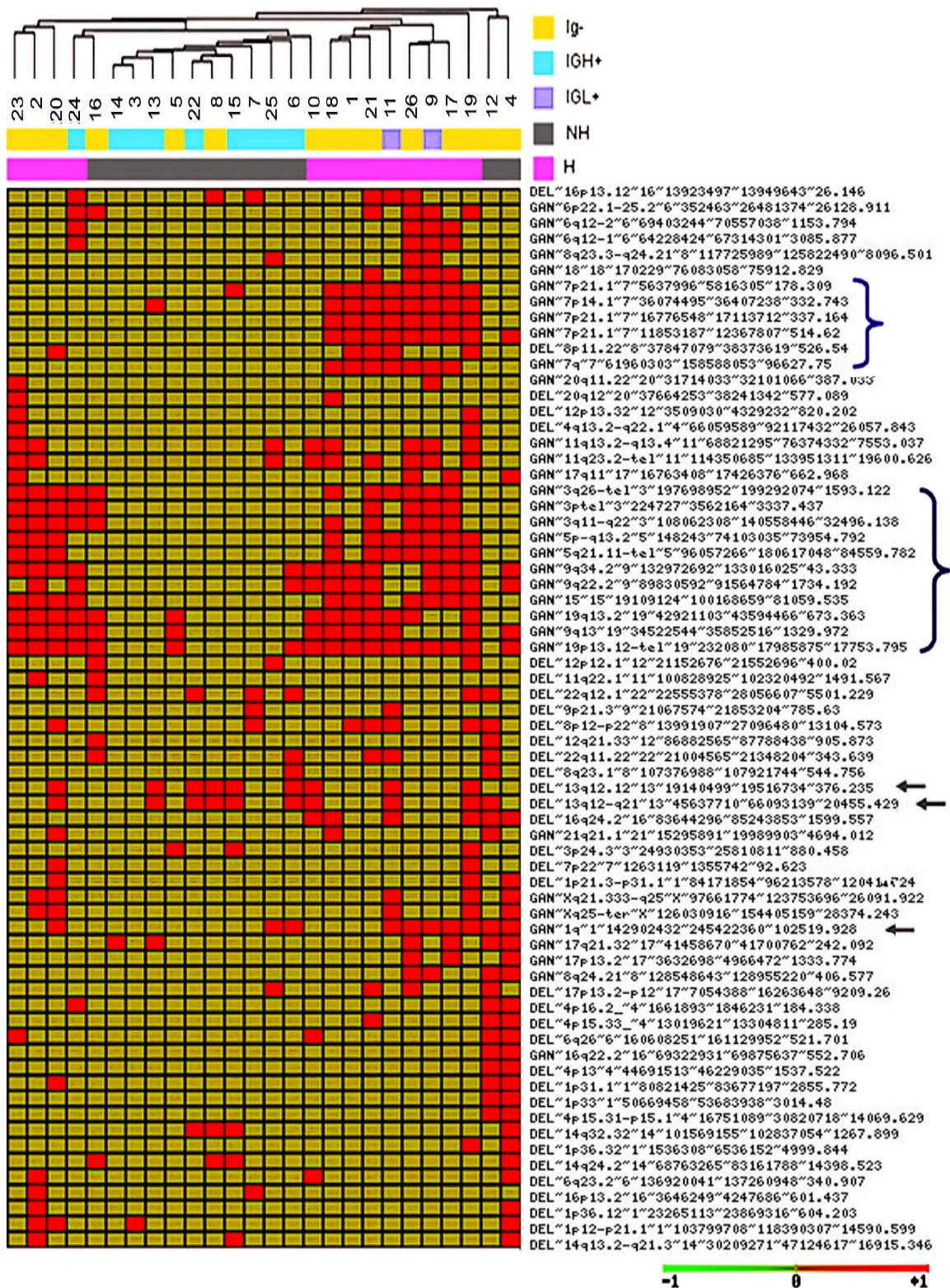


Figura 23. Clustering no supervisado utilizando las 68 RMC. Este análisis muestra una heterogeneidad en la muestras de mieloma, basada en grupos genéticos distintos. El análisis separa los casos H de los NH, pero además separa los casos H en dos ramas. Llaves azules: RMC estadísticamente diferentes entre H y NH. Las flechas grises señalan las deleciones en 13q y las ganancias en 1q.

5.4. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES HOMOCIGÓTICAS.

Como hemos remarcado en la descripción general de los cambios, encontramos que el 4% de las CNV se deben a amplificaciones de alto nivel y el 3% a deleciones homocigóticas. Este tipo de CNV son regiones de interés para la búsqueda de nuevos genes candidatos, oncogenes en las amplificaciones y genes supresores de tumor en las deleciones homocigóticas. Estas CNV aparecieron tanto en casos H como NH, pero en general se encontraron en casos que acumulaban un alto número de CNV.

Identificamos nueve amplificaciones diferentes que aparecían distribuidas en seis casos (Tabla 23). La mayoría de estas amplificaciones aparecen como regiones frecuentemente ganadas en otros casos. Dentro de estas regiones de amplificación se pueden encontrar oncogenes como *SYK*, en el amplicon de 9q22.2, y *CCNE1*, en 19q13, entre otros. Estudiamos los términos GO de los genes incluidos en las amplificaciones y encontramos que el 31% estaba relacionados con la transducción de señales (GO: 0007165), entre estos genes encontramos a *DIRAS2*, *ADORA2B*, *TNFRSF13B*, *RALGDS*, *CCNE1* y *SYK*.

Además de las amplificaciones encontramos seis deleciones homocigóticas. De nuevo, estas deleciones homocigóticas aparecían en otras muestras, pero como pérdidas de una copia (Tabla 23). En estas regiones de pérdida se localizan metaloproteinasas y quinasas de la vía de MAPK. En general, los genes localizados en estas deleciones estaban relacionados con procesos fisiológicos celulares (GO:0050875), aunque algunos de ellos estaban más específicamente relacionados con muerte celular (GO:0008219) y con la transducción de señales (GO:007165) como por ejemplo *BIRC2*, *BIRC3* y *MAP3K5*; y otros son metaloendopeptidasas (GO:0008237), como *MMP8*, *MMP10*, *MMP1* y *MMP13*. Entre estas deleciones identificamos una deleción de 376 kb en el cr. 13, centromérica a *RB-1*. Esta región incluye cuatro genes. Mediante cariotipo espectral (SKY) (Figura 26) observamos faltaba un cr 13 y el otro, estaba translocado por esa región con un cr. 14. Esta deleción homocigótica también a parecía en el caso #15, el cual se perdían dos clones consecutivos que cubren el gen *ZNF198*.

Tabla 23. Descripción de las amplificaciones y deleciones homocigóticas encontradas en MM.

AMPLIFICACIONES						
Cr	Región	Inicio (pb)	Tamaño (Mb)	Casos A	% casos G	Genes en la región
6	6q12-1	64228424	3.086	#26	11.5	<i>PTP4A1, PHF3, LOC389405, EGFL11</i>
6	6q12-2	69403244	1.154	#26	11.5	<i>BAI3, C6orf209</i>
9	9q22.2	89830592	1.734	#4	30.8	<i>LOC340515, DIRAS2, SYK, BF510209, AUH, NFIL3, ROR2</i>
9	9q34.2	132972692	0.043	#20, #19 ¹	42.3	<i>CEL, RALGDS</i>
14	14q21.1	44463153	0.372	#14	0	<i>BTBD5, KIAA0423, PRPF39, FKBP3, C14orf106</i>
16	16q22.2	69441287	0.312	#4	3.8	<i>HYDIN</i>
17	17p13.2	3632698	1.334	#26	7.7	<i>HSA277841, CAMKK1, P2RX1, ATP2A3, ZZEF1, ANKFY1, UBE2G1, MYBBP1A, FLJ90165, ALOX15, PELP1, ARRB2, CXCL16, ZMYND15, TM4SF5, LOC284013, PSMB6, PLD2, MINK1, CHRNE, GP1BA, SLC25A11, RNF167, PFN1, ENO3, SPAG7, CAMTA2, INCA1, KIF1C, GPR172B, FLJ30726, ZNF232</i>
17	17q11	15589242	1.837	#23, #26 ¹	7.7	<i>FLJ40244, ADORA2B, TTC19, NCOR1, PIGL, PRR6, TRPV2, FLJ35696, ZNF287, ZNF624, FLJ36492, TNFRSF13B, M-RIP, LOC201164, FLCN, COPS3, NT5M, MED9, RASD1, PENT</i>
19	19q13	34522544	1.299	#4	46.2	<i>LOC284395, POP4, PLEKHF1, C19orf12, CCNE1, C19orf2, ZNF536</i>

DELECIONES HOMOCIGÓTICAS						
Cr	Región	Inicio (pb)	Tamaño (Mb)	Casos Del Hom.	% Del Hem.	Genes en la región
6	6q23.2	137061308	0.199	#4	7.7	<i>MAP3K5, PEX7</i>
11	11q22.1	100828925	1.491	#2	3.8	<i>TRPC6, ANGPTL5, KIAA1377, YAP1, BIRC3, BIRC2, PORIMIN, MMP7, MMP20, MMP27, MMP8, MMP10, MMP1, MMP3, MMP12, MMP13</i>
13	13q12	19140499	0.376	#20, #15 ²	26.9	<i>HSMPP8, PSPC1, ZNF237, ZNF198</i>
22	22q11.22	20994020	0.354	#12	15.4	<i>IGLC2, SUHW2, SUHW1, PRAME</i>
X	Xq21.31-21.33	86728457	10.933	#4	0	<i>PABPC5, NAP1L3, FLJ37659, DIAPH2, CPXCRI, KLHL4, PCDH11X</i>
X	Xq25	123753696	2.090	#4	0	<i>WDR40B</i>

¹ Se muestra las RMC de amplificación. ² el caso #15 muestra dos clones consecutivos perdidos homocigóticamente que cubren el gen *ZNF198*. A: amplificado, G: ganado, Del. Hom. Deleción homocigótica, Del Hem.: Deleción hemicigótica.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MARCADOR CITOGENÉTICO EN XQ21-QTER.

Esta aproximación genómica también permitió la identificación de nuevas alteraciones en esta serie. Se observó un patrón de hibridación en el cromosoma X correspondiente a la presencia de ganancia de material genético en la región Xq21-qter en 5 de los 26 casos (Tabla 20 y Figura 24). Cuatro de los casos eran hombres y uno de ellos mujer (ver MM.8). Se buscó esta alteración en la serie de líneas celulares que habíamos analizado mediante arrays de ADNc y confirmamos esta ganancia en una de las líneas, L363 (Figura 24). Ninguno de los casos presentaba translocaciones de *IGH* y solamente el caso #11 y la línea L363 presentaban translocaciones que involucraban al gen *IGL*. Además, la mayoría de los casos con esta ganancia presentaban un número alto de CNV. Los puntos de rotura de la ganancia se agrupaban en torno a 10 Mb en Xq21.33 (entre aproximadamente 86122579 bp y 98277428 bp) donde se localizan los siguientes genes *KLHL4*, *TGIF2LX*, *PABPC5*, *PCDH11X*, *NAP1L3* y *DIAPH2*.

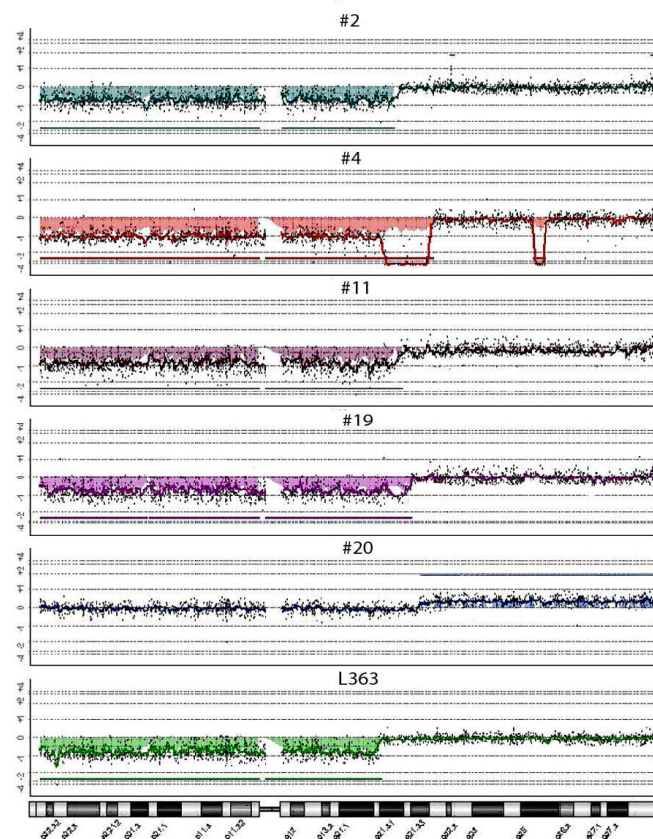


Figura 24. Patrón de hibridación del cromosoma X en los casos con ganancia de en Xq21-qter. Como ADN de referencia se utilizó un pool de mujeres sanas. Todos los casos menos el #19 eran varones, para los cuales el patrón de hibridación esperado para el cromosoma X se correspondía con la pérdida completa de ese cromosoma.

Para validar la ganancia en esta serie y poder estudiarla si fuese de interés en otras series nuevas, desarrollamos un ensayo de FISH que permite detectar esta ganancia en preparaciones citogenéticas. Marcamos en verde los BACs (RP11-775C10, RP11-187H16), situados en la región centromérica del punto de rotura, y por otro lado, marcamos en rojo los BACs (RP11-309N21, RP11-103B8) situados en una región telomérica al punto de rotura pero cercana al mismo. Se analizaron los cinco casos y la línea celular L363 y se obtuvieron los resultados esperados (Figura 25). Mediante este ensayo observamos que en el caso #20 y en línea L363 el fragmento duplicado se encontraba translocado con un cromosoma marcador. No se pudo determinar este mismo patrón en el resto de los casos ya que las suspensiones citogenéticas utilizadas para el estudio no mostraron metafases alteradas, pero sí fuimos capaces de ver las ganancias en núcleos en interfase (Figura 25).

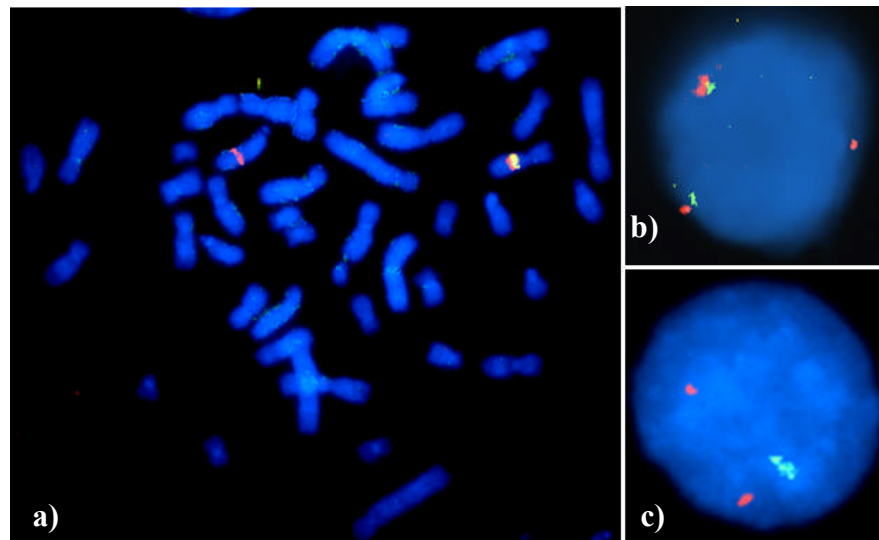
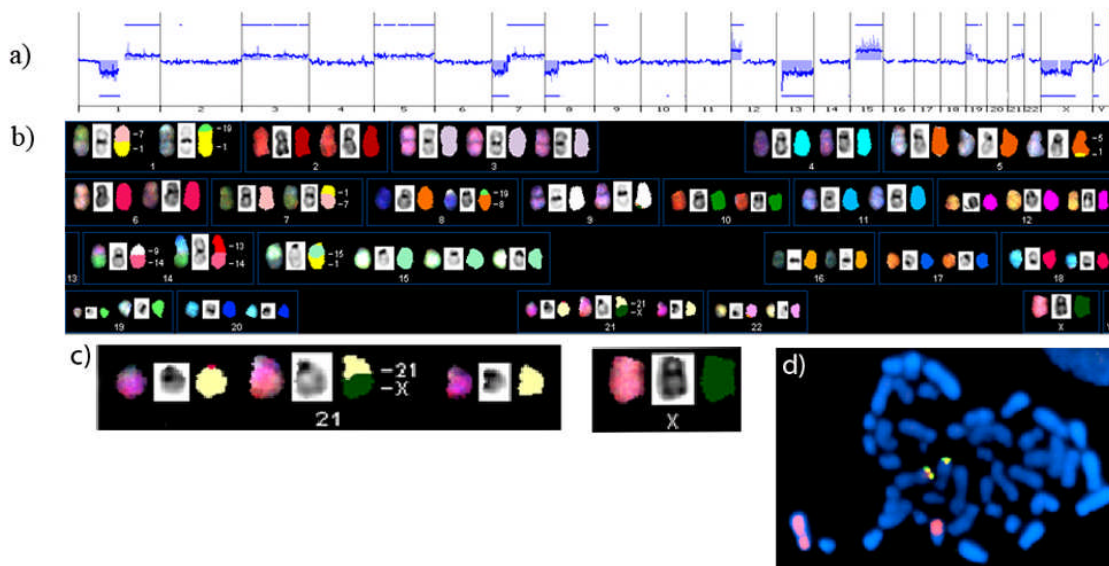


Figura 25. Resultados de la hibridaciones de la sonda de Xq21. a) Metafase de la líneas celular L363. Se observan una señal verde y otra roja en un cromosoma X y una señal roja extra en un cromosoma marcador. b y c) Casos #19 y #2 en núcleos interfásicos. El caso #19 es una mujer por lo que se observan dos señales verdes y tres rojas y el caso #2 es un hombre en el que se puede ver una señal roja extra.

Para identificar los cromosomas que estaban implicados en estas translocaciones llevamos a cabo un análisis mediante SKY. Esta técnica nos permite “colorear” cada cromosoma de modo distinto y así poder identificar los cromosomas involucrados en reordenamientos cromosómicos. Para poder llevar a cabo esta técnica es imprescindible obtener cromosomas metafásicos. Por ello solo se llevo a cabo en la línea celular L363 y en el caso #20 (Figura 26). La línea L363 presentaba una translocación con el cromosoma 14, t(X;14)(q21.33;q31.1). El punto de rotura en ele cromosoma 14 se determinó por su

perfil de CGH, presenta una pérdida, y por que realizamos un ensayo de FISH que combinaba una sonda de pintado cromosómica del cromosoma X con la sonda de *IGH* (Figura 26). No obstante el caso 20 no presentaba la misma translocación, en este caso los cromosomas implicados eran el cromosoma X y el 21, $t(X;21)(q21.33;q22.3)$. También confirmamos que la *IGH* no estaba implicada en estos reordenamientos (Figura 26). De este modo demostramos que estas ganancias se originan como consecuencia de translocaciones no balanceadas con puntos de rotura en Xq21.3.

Caso #20



L363

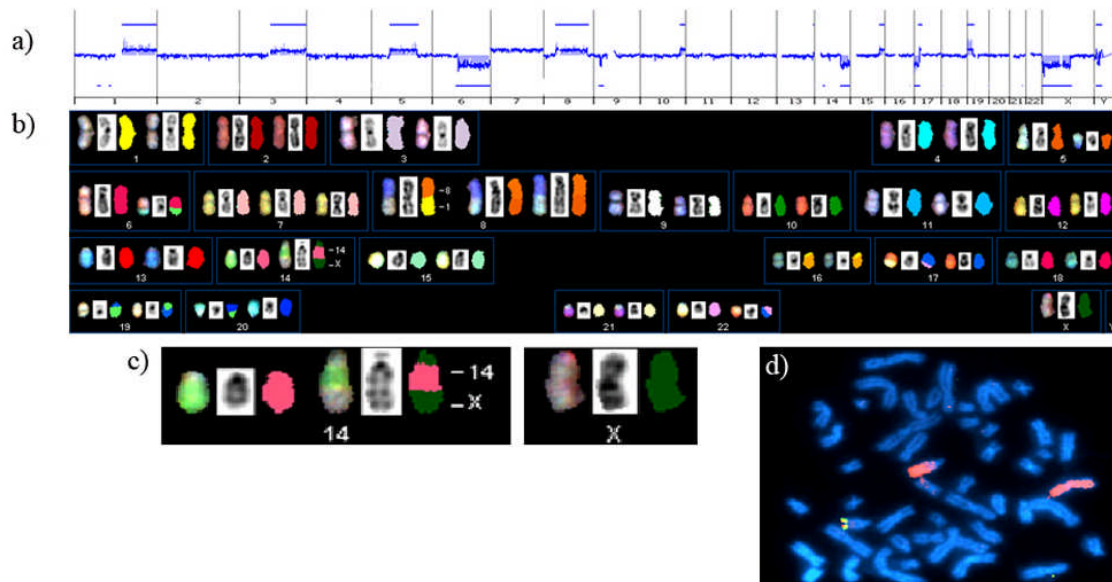
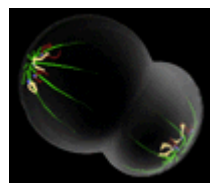


Figura 26. Análisis de los casos #20 y L363 mediante aCGH, SKY y FISH. a) Perfil de aCGH de los casos. **b)** Cariotipo espectral de una de las metafases de cada uno de los casos. **c)** $t(X;21)$ y $t(X;14)$ mediante SKY. **d)** Hibridación de la sonda *IGH* y sonda de pintado cromosómico del cromosoma X (en rojo).

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN I. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE.

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES DE IG EN LÍNEAS DE MM.

En este estudio se ha caracterizado genéticamente un panel representativo de líneas celulares de mieloma. Mediante el ensayo de MI-FISH para MM, diseñado en el Departamento de Genética de la Universidad de Navarra, hemos demostrado que las nueve líneas presentan al menos una translocación de Ig. Las mayoría de las translocaciones presentes en las líneas son las descritas por los autores anteriormente (Boersma-Vreugdenhil et al., 2004; Chesi et al., 1998a; Chesi et al., 1998b; Ronchetti et al., 1999), pero además el ensayo MI-FISH permitió la identificación de una translocación bialélica, t(4;14) y t(11;14), en la línea SK-MM-2. Estas translocaciones bialélicas son infrecuentes en MM (Magrangeas et al., 2004; Ross et al., 2005), Ross et al describieron 4 casos, en una serie de 228, donde los cuatro casos presentaban una t(4;14) en uno de los alelos. Además de en esta línea, en colaboración con el Departamento de Genética se encontró otro una muestra de un paciente con las mismas translocaciones que la línea, pero no expresaban los mismos alelos: la línea expresa *CCND1* y el caso expresa *FGFR3* y *MMSET* (Saez et al., 2006a). Se ha propuesto que estas dos translocaciones por separado confieren un pronóstico diferente, la t(4;14)n tiene un peor pronóstico que la t(11;14) (Bergsagel and Kuehl, 2003; Fonseca et al., 2002a) por ello es importante una buena caracterización de las translocaciones por ejemplo para poder clasificarlos como un grupo TC determinado.

2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MM.

Existen numerosas publicaciones que analizan los perfiles de expresión génica (PEG) de muestras primarias de pacientes con MM junto con líneas celulares (Shaughnessy, 2003). A pesar de que nuestro objetivo principal consistía en la identificación de genes ganados y sobre-expresados, también analizamos los PEG observados en las líneas mediante un *clustering* no supervisado para ver si se observaba algún tipo de agrupamiento en función de sus perfiles de expresión. Este análisis no resultó en una segregación de grupos de líneas cuyos PEG dependiesen de alguno de los factores descritos, las

translocaciones de Ig o la expresión de ciclinas D. Nosotros especulamos que esto puede ser debido a la naturaleza de las líneas en sí mismas, que, por un lado, representan estadios avanzados de la enfermedad y como consecuencia de este estado avanzado o por la gran cantidad de pases de propagación presentan un alto número de variaciones en el número de copias (CNV) que pueden modificar los perfiles de expresión. Este patrón sin grupos definidos está de acuerdo con los PEG publicados en muestras primarias de MM de estadios avanzados, en los cuales, estas muestras avanzadas agrupan juntas pero no respecto a la translocación (Mattioli et al., 2005).

Después los datos se analizaron mediante sistemas supervisados de análisis de expresión diferencial utilizando los grupos TC como criterio de agrupación (Bergsagel et al., 2005). Nuestra serie de líneas celulares pertenecían a tres de los grupos TC, 11q13, 4p16 y MAF, y después de este análisis encontramos que había 166 genes que se expresan de modo distinto entre los tres grupos. Entre ellos encontramos los genes *CCND1*, *FGFR3* y *CCR1* sobre-expresados en las ramas de 11q13, 4p16 y MAF, respectivamente, que son algunos de los genes que se utilizan, junto con *CCND3*, *CCND2*, *ITGB7* y *CX3CR1*, para la clasificación TC (Bergsagel et al., 2005). La sobre-expresión de *CCND1* y *FGFR3* en los dos primeros grupos es consecuencia directa de las translocaciones con los genes de Ig previamente descritas (Chesi et al., 1996; Chesi et al., 1998b). Por otro lado, se ha observado que las líneas celulares con translocaciones de uno de los genes MAF inducen la expresión de varios genes entre ellos *CCR1* y *CCND2* (Hurt et al., 2004). También hemos observado la sobre-expresión de *MTVRI* y *RHOG* en las líneas 4p16, *MGC2574*, *FHL1* y *TRAF5* en el grupo MAF y los genes *MGC16824*, *PEX14*, *TRAF5* y *WFS1* en el grupo 11q13. La expresión de estos genes en estos grupos TC también se ha descrito (Bergsagel et al., 2005). Las translocaciones tienen un efecto en los perfiles de expresión pero no son los únicos ya que otras alteraciones, como la trisomías pueden modificarlos (Bergsagel et al., 2005). Sin embargo la identificación de genes que se expresan de modo distinto entre los grupos puede ayudar a la clasificación de los pacientes.

3. IDENTIFICACIÓN DE GENES GANADOS Y SOBRE-EXPRESADOS.

Las ganancias, pérdidas y amplificaciones de regiones cromosómicas son comunes en tumores. El análisis de estas variaciones a nivel genómico mediante CGH basada en cromosomas (también llamada CGH-convencional) es una técnica potente pero con una

resolución limitada a 10–20 Mb (Kallioniemi et al., 1992). Para mejorar esta resolución se han desarrollado técnicas de CGH basadas en matrices ordenadas de elementos génicos tipo BACs, ADNc y oligonucleótidos (Carvalho et al., 2004; Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999), denominada arrays de CGH (aCGH). En nuestro estudio combinamos la CGH convencional con los aCGH para poder identificar regiones de interés en las líneas celulares de mieloma. Nuestro estudio ha sido el primero en aplicar una plataforma de aCGH para identificar genes ganados y sobre-expresados en MM. Mediante la CGH convencional identificamos regiones de ganancia, pérdida y amplificaciones en las líneas de MM centrado así el estudio a los cromosomas 1, 7, 8, 11 y 18. Estos resultados de CGH están de acuerdo con las alteraciones observadas en muestras primarias de pacientes y líneas celulares (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2001; Inoue et al., 2004; Rao, 2005). De este modo identificamos trece regiones ganadas/amplificadas: algunas de ellas albergaban brazos cromosómicos enteros. Dentro de estas regiones encontramos diferentes sub-regiones con niveles distintos de amplificación. Este patrón de regiones extensas con sub-regiones más cortas con distintos niveles de amplificación también se ha observado en tumores sólidos, como el cáncer de mama, y líneas celulares (Pinkel et al., 1998; Ray et al., 2004).

Como en estudios anteriores en otros tumores (Hyman et al., 2002; Pollack et al., 1999), la utilización de la misma plataforma para el análisis de los PEG y aCGH permitió la comparación gen a gen de los niveles de expresión y de ganancia. De este modo, en las regiones mencionadas anteriormente, identificamos 60 genes ganados y sobre-expresados. Entre ellos encontramos genes que estaban relacionados con la regulación de la muerte celular (*BCL2*, *MALT1*, *DCC*, *ELMO1*, *GAS2* y *BNIP3L*). Se sabe que la sobre-expresión de *BCL2* es frecuente en MM pero no el mecanismo de sobre-expresión (Miguel-García et al., 1998; Ong et al., 1995; Pettersson et al., 1992). *BCL2* es un factor anti-apoptótico junto con *MALT1*, ambos podrían jugar un papel importante en la supervivencia de las células de MM. *BNIP3L*, *ELMO1* y *GAS2* también se han relacionado con la regulación de la apoptosis (Brancolini et al., 1992; Chen et al., 1997; Gumienny et al., 2001) Por el contrario *DCC*, un regulador de la apoptosis y la adhesión célula matriz extracelular, aparece deletado en cáncer colorrectal (Thiagalingam et al., 1996).

El mecanismo de sobre-expresión en 25 de estos 60 genes parece ser la ganancia/amplificación ya que sólo aparecen sobre-expresados en las líneas que presentan ganancias o amplificaciones, pero no en las líneas que no las presentan (Tabla 18, p. 97) El

resto de los genes también se encuentran sobre-expresados en líneas celulares que no presentan ganancias, lo cual apunta a otros mecanismos de sobre-expresión, como por ejemplo translocaciones y la hipometilación descritas en diferentes tumores. Además, encontramos seis genes, *CHI3L1*, *ELMO1*, *BNIP3L*, *PLAG1*, *LOC157576* y *VPS28*, que presentaban una asociación entre la presencia de ganancia/amplificación y el sobre-expresión. *ELMO1* es un gen relacionado con la movilidad celular y la muerte celular (apoptosis) y *PLAG1* y se ha encontrado translocado y sobre-expresado en tumores epiteliales (Astrom et al., 1999) y se ha descrito como sobre-expresado en mielomas del grupo TC 4p16 (Bergsagel et al., 2005). Este análisis de los genes ganados/amplificados y sobre-expresados ha demostrado que el mecanismo de sobre-expresión era exclusivamente amplificación en nueve genes y ganancia en 15 mientras que en los demás el mecanismo era indistinto. Esto nos indica que no solo las amplificaciones están asociadas con sobre-expresión, sino que las ganancias de bajo número de copias pueden tener el mismo efecto. Este hecho se ha demostrado en otros estudios, en uno observaban un aumento de la expresión de *CCND1* cuando detectaban polisomías de 11q (Fabris et al., 2005) y en otro estudio en cáncer de mama observaron que las ganancias presentaba variaciones en la expresión en un porcentaje similar a las amplificaciones, aunque los niveles no se mostraban tan altos (Hyman et al., 2002).

Por último, hay que considerar que a pesar de que caracterizamos las ganancias/amplificaciones en 1q, no observamos ganancia y sobre-expresión de *CKS1B*, un gen que se ha demostrado ganado y sobre-expresado en mieloma (Shaughnessy, 2005), que parece estar asociado a la progresión ya que las amplificaciones son mas frecuentes en MM avanzados y no aparecen en GMSI (Chang et al., 2006b; Hanamura et al., 2006), debido a que, desafortunadamente, este gen no está incluido en nuestra plataforma. Por lo que no hay que olvidar que la búsqueda de nuevos genes candidatos mediante estas tecnologías están limitadas por el número de genes contenidos en el diseño de la plataforma.

4. ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS.

Los ensayos de FISH y qRT-PCR se llevaron a cabo en los genes *C-MYC*, *BCL2* y *MALT1*. Estos genes se seleccionaron del listado de 60 genes ganados y sobre-expresados por su relevancia en neoplasias linfoides, en el caso de *C-MYC* y *BCL2*, y por la novedad de su expresión en MM en el caso de *MALT1*. Además el análisis de los términos GO

también mostraba a *MALT1* y *BCL2* entre la categoría de genes sobre-representados y cuya función estaba relacionada con la inhibición de la apoptosis. Por último, queríamos demostrar que *MALT1* y *BCL2*, que se encuentran a 5 Mb se amplificaban y sobre-expresaban conjuntamente. Los niveles de expresión de ARN se compararon con los niveles de expresión de un pool de ARN de CP obtenidas de amígdala. En general los resultados de FISH y aCGH eran concordantes en la mayoría de los casos aunque había algunas discrepancias atribuibles a los niveles de ploidía y oligoclonalidad de las líneas. La comparación de los niveles de expresión también mostraba concordancias en la mayoría de los casos pero observamos discrepancias, sobre todo en las líneas RPMI-8226, JJN-3 y OPM-2. Estas diferencias pueden ser debidas a que se han utilizado dos ARNs de referencia distintos en ambos experimentos. Para el PEG se utilizó con referencia un pool de ARN de Stratagene, mientras que en los experimentos de qRT-PCR se utilizaron como nivel basal de expresión los resultados de los ARN de un pool de CP de amígdala. El pool de Stratagene podría mostrar niveles basales de expresión diferentes a los de las CP normales, por ello a partir de ahora discutiremos los resultados de la expresión basándonos en los resultados de la qRT-PCR.

4.1. *C-MYC*.

El producto de gen *C-MYC* es una fosfoproteína nuclear multifuncional involucrada en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular, que funciona como un factor de transcripción de genes específicos. Las mutaciones, la sobre-expresión y los reordenamientos de *C-MYC* se han asociado con varios tumores hematopoyéticos, leucemias y linfomas, incluyendo el linfoma de Burkitt en el cual es característica la translocación de *C-MYC* con uno de los genes de Ig (Adams et al., 1983). Se ha observado que la desregulación de este gen *C-MYC* en MM puede estar mediada por reordenamientos más complejos. Mediante nuestro análisis encontramos 4 líneas (SK-MM-2, OPM-2, LP-1 y KARPAS-620) que presentaban sobre-expresión de *C-MYC* comparándolo con el nivel de expresión de CP de amígdala. Estas líneas presentaban simultáneamente translocaciones y ganancias/ amplificaciones de *C-MYC* lo que se ha descrito en linfomas B (Martin-Subero et al., 2005). No obstante no encontramos sobre-expresión de *C-MYC* en líneas que únicamente presentaban translocaciones o ganancias. Esto sugiere que o bien la expresión *C-MYC* requiere la combinación de ambos mecanismos o bien que no es el gen diana de los reordenamientos. Se ha observado que el gen *PVT1*, situado entre 100 y 500 Kb telomérico a *C-MYC*, se encuentra coamplificado en MM (Palumbo et al., 1990), no ha

sido confirmado en otros análisis ni nosotros no lo hemos detectado en nuestras líneas celulares ya que este gen no estaba en el array. Por otro lado, estos resultados de reordenamientos complejos de *C-MYC* muestran una buena correlación con los mostrados por otros autores en las mismas líneas (Fabris et al., 2003; Shou et al., 2000). Se ha descrito la expresión de *C-MYC* en todas las líneas celulares con reordenamientos, sin embargo no se han comparado los niveles de expresión de CP normales de amígdala (Fabris et al., 2003; Shou et al., 2000). Así se sabe que la incidencia de alteraciones en *C-MYC* es alta en líneas celulares de MM y en mielomas extramedulares y avanzados y sugiere que su activación induce un aumento de la capacidad de proliferación (Nobuyoshi et al., 1991). Los puntos de rotura de *C-MYC* en MM pueden estar a varias Mb del gen lo cual no descarta la posibilidad de que haya otros genes desregulados, sin embargo hay evidencia de que la expresión de ARNm de *C-MYC* sin importar el punto de rotura (Fabris 2003).

4.2. *MALT1* Y *BCL2* SE ENCUENTRAN AMPLIFICADOS EN 18Q21.

BCL2 es un factor de anti-apoptótico que se encuentra en la banda cromosómica 18q21. Los reordenamientos de la banda 18q21 son frecuentes en linfomas de células B no-Hodgkin (B-NHL). Alrededor del 80% de los linfomas foliculares (FL) y el 20-30% de los linfomas B difusos de células grandes (DLBCL) presentan la translocación t(14;18) (Offit and Chaganti, 1991) que conlleva la sobre-expresión de *BCL2*. Esta translocación es muy rara en MM pero se sabe que *BCL2* se sobre-expresa en la mayoría de los pacientes y líneas celulares (Ong et al., 1995; Pettersson et al., 1992). También se ha observado que la expresión de *BCL2* es mayor en estadios más avanzados del MM y se ha propuesto que su sobre-expresión incrementa la supervivencia de las células, previniéndolas de la apoptosis, y que, facilita o aumenta, de este modo, la posibilidad de adquirir alteraciones genéticas (Miguel-García et al., 1998). En nuestro estudio hemos observado que la ganancia/amplificación de *BCL2* está presente en siete líneas y que cinco de ellas sobre-expresan (SK-MM-2, OPM-2, LP-1, L363, y NCI-H929) este gen a nivel de ARNm y también a nivel de proteína. Las amplificaciones de la banda 18q21 también se han observado hasta en el 20% de los B-NHL (Amakawa et al., 1990; Monni et al., 1997) y se han propuesto como el mecanismo de sobre-expresión de *BCL2* en ausencia de la t(14;18). La línea U266 presenta niveles muy altos de *BCL2* pero no presenta ni translocaciones ni ganancias/amplificaciones en esa región, por lo que el mecanismo de sobre-expresión de esta línea debe ser otro como la hipometilación del promotor que ha sido descrita como

mecanismo de sobre-expresión de *BCL2* en leucemia linfática crónica (Hanada et al., 1993), la activación constitutiva de *NFκB* (Bharti et al., 2004), o la pérdida de *TP53* que inhibe su expresión (Iyer et al., 2003).

El gen *MALT1*, que se encuentra a 5 Mb centromérico del gen *BCL2*, se ha encontrado frecuentemente reordenado en translocaciones cromosómicas con los genes *API2* (Akagi et al., 1999; Dierlamm et al., 1999; Morgan et al., 1999) e *IGH* (Streubel et al., 2003) en linfomas MALT y también se ha visto amplificado en B-NHL (Sanchez-Izquierdo et al., 2003; Tarte et al., 2002). Las funciones del gen *MALT1* no se conocen del todo, pero se ha demostrado un papel sinérgico con *CARMA1* y *BCL10* en la señalización de NF-κB. En este estudio hemos encontrado siete líneas que presentan ganancia/amplificación de este gen y cuatro de ellas (SK-MM-2, OPM-2, LP-1 Y KARPAS-620) también presentan sobre-expresión cuando lo comparamos con los niveles normales de expresión de un pool de CP de amígdala. Ninguna de las líneas presentó translocaciones que afectasen a este gen y sin embargo la línea U266 también sobre-expresaba *MALT1* en ausencia de ganancias. Ho et al. (Ho et al., 2005) han demostrado que la sobre-expresión de *MALT1* en líneas celulares de linfomas de células B humanas produce un aumento en la actividad constitutiva de NF-κB, lo que resulta en un aumento de la proliferación y resistencia a la apoptosis inducida por FAS. Las ganancias /amplificaciones de *MALT1* han sido recientemente descritas en distintos tipos de B-NHL (Dijkman et al., 2006; Sanchez-Izquierdo et al., 2003).

Por primera vez en mieloma hemos demostrado que los genes *MALT1* y *BCL2* se encuentran co-amplificados en siete líneas celulares, y que presentan una sobre-expresión simultánea en tres de ellas (SK-MM-2, OPM-2 y LP-1) mientras que la línea U266 presentaba sobre-expresión de ambos genes sin presencia de reordenamientos en la región 18q21. Este fenómeno de co-amplificación y expresión simultánea de genes ha sido descrito en tumores de mama para los genes *ERBB2*, *GRB7* y *MLN64/CAB1* en el amplicón de 17q12-q21 (Kauraniemi et al., 2001; Pollack et al., 1999). Sánchez-Izquierdo et al (Sanchez-Izquierdo et al., 2003) han descrito un paciente con linfoma de tipo MALT gástrico que presentaba la amplificación de *MALT1* y *BCL2* pero no pudieron confirmar su sobre-expresión. Sin embargo, no observaron ninguna línea con expresión simultánea de ambos genes a pesar de que presentaban amplificaciones de 18q21. Estudios recientes en MM han descrito amplificaciones de 18q21 que incluyen *MALT1* y *BCL2* y los muestran

como candidatos sobre-expresados en la región confirmando nuestros resultados en líneas celulares (Carrasco et al., 2006).

Aunque en este análisis no se han incluidos análisis de muestras primarias, las líneas celulares representan al mayor grupos de translocaciones del mieloma. Este análisis paralelo de variaciones en el número de copias y los perfiles de expresión génica en mieloma ha permitido una identificación eficiente de los genes cuya expresión se eleva a consecuencia del aumento en el número de copias, permitiendo identificar una posibles dianas terapéuticas.

DISCUSIÓN II: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.

5. PERFILES GENÓMICOS EN MIELOMA MÚLTIPLE.

El mieloma múltiple se caracteriza por la presencia de una marcada inestabilidad genómica. El análisis del MM mediante citogenética convencional es difícil por varios motivos: la infiltración de células plasmáticas (CP) de mieloma en la medula ósea es baja y variable, esas células tienen un bajo índice de proliferación y porque, además, hay alteraciones que permanecen elusivas al análisis mediante métodos convencionales. Por todo ello, durante mucho tiempo se han subestimado los cambios en el cariotipo en el momento del diagnóstico (Pratt, 2002). Sin embargo, el conocimiento de la incidencia de las alteraciones así como sus asociaciones y organización, o no, en forma de patrones específicos podrían ser eventos clave para determinar el impacto de estas alteraciones en la patogénesis del MM. En este estudio hemos realizado un análisis de las variaciones en el número de copias (CNV) en mieloma múltiple. Para ello hemos utilizado una plataforma de aCGH de oligonucleótidos de alta resolución. A pesar de que, como era de esperar, la mayoría de las muestras presentaron un cariotipo normal en el momento del diagnóstico, fuimos capaces de detectar CNV en todos los casos analizados. Este tipo de resultados se debe a la combinación de dos factores, el enriquecimiento del contenido en CP mediante selección con el marcador CD138 y la alta resolución de la técnica que permite detectar alteraciones sub-microscópicas, no detectables con CGH-convencional. Las ganancias más frecuentes se detectaron en los cromosomas 19, 9, 15, 5, 3, 7 y 1q y las pérdidas en 13q, 8p, 16p, 22q y 1p. Estas regiones se han descrito previamente en estudios de CGH convencional (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2004; Liebisch et al., 2003), FISH (Cremer et al., 2005; Taberero et al., 1996) y aCGH de líneas celulares (Largo et al., 2006) y muestras primarias recientemente publicados (Carrasco et al., 2006; Walker et al., 2006). Además de alteraciones numéricas encontramos alteraciones estructurales de tamaños variable y amplificaciones y deleciones homocigóticas.

Además de observar las trisomías características del mieloma hemos observado que un 38.5% de los casos presentan ganancias en 1q. Los reordenamientos en 1q han sido ampliamente descritos en mieloma y linfomas y se han relacionado con la descondensación de la heterocromatina pericentromérica del cromosoma 1 (Le Baccon et al., 2001; Sawyer

et al., 2005; Sawyer et al., 1998b). Más recientemente, se han descritos genes como sobre-expresados en esta región. La ganancia y sobre-expresión del gen *PDZK1* se ha relacionado con la resistencia a la muerte celular inducida por melfalán, cisplatina y vincristina (Inoue et al., 2004). Por otro lado, se ha relacionado la ganancia genómica de la región 1q21 con la sobre-expresión del gen *CSK1B*, situados dentro de la misma y que juega un papel crucial en la progresión del ciclo celular (Shaughnessy, 2005). La amplificación de 1q21 se han asociado a la progresión de la enfermedad y con un peor pronóstico (Chang et al., 2006b; Hanamura et al., 2006; Shaughnessy, 2005).

Uno de los factores pronósticos adversos más estudiado en MM es la presencia de deleciones en 13q ($\Delta 13$). Las deleciones del cromosoma 13 se han descrito ampliamente en mieloma y recurrentemente se han asociado con un mal pronóstico. En general parece que la mitad de los casos presentan deleciones en este cromosoma y nosotros lo encontramos en una frecuencia similar, 38.5%. Se han realizado estudios que determinan la región mínima de deleción en 13q14 (Avet-Loiseau et al., 2000; Elnenaei et al., 2003; Fonseca et al., 2001; Nomdedeu et al., 2002), pero este punto lo discutiremos más adelante.

Se ha descrito extensivamente que existen fundamentalmente dos tipos de mielomas dependiendo del número de cromosomas que presentan, los mielomas hiperdiploides (H) y los no-hiperdiploides (NH) (Saez et al., 2004; Smadja et al., 1998). Numerosos estudios han intentado clasificar estos tipos de mieloma basados en técnicas de FISH (Chng et al., 2005; Cremer et al., 2005; Liebisch et al., 2003) utilizando combinaciones de sondas en las regiones frecuentemente ganadas en mielomas. Nosotros clasificamos los H y los NH basados en los resultados de aCGH. De este modo observamos que la mitad de los casos presentaban un patrón compatible con un cariotipo hiperdiploide, es decir, presentaban un CNS de entre 48-54 cromosomas con trisomías de los cromosomas 3, 5, 7, 9, 15 y 19 en la mayoría de los casos. El resto se consideró como casos NH. El análisis genómico resultó muy preciso. De hecho, el análisis de agrupamiento no supervisado realizado con las CNV más frecuentes discriminó estos dos grupos, sin ambigüedad.

6. DIFERENCIAS ENTRE CASOS H Y NH.

Numerosos estudios han intentado asociar la presencia de alteraciones genéticas como las $\Delta 13$, translocaciones de *IGH* y ganancias de 1q a los distintos grupos genéticos, H o NH, y se les ha intentado dar un valor pronóstico general y dentro de los grupos. Por ejemplo, sucesivamente se ha observado que las translocaciones de *IGH* y $\Delta 13$ están

asociadas a los mielomas con cariotipo NH (Chng et al., 2006a; Fonseca et al., 2003b; Smadja et al., 1998). Mediante FISH observamos que 9 casos presentaban reordenamientos de *IGH* y 2 casos de *IGL*. En nuestra serie, la presencia de translocaciones de *IGH* estaba asociada a los mielomas NH, únicamente un caso H presentaba translocaciones de *IGH*, sin embargo, los casos que presentaban reordenamientos con *IGL* resultaron ser H. Se ha sugerido que las translocaciones de Ig presentes en mielomas H podrían ser secundarias, ya que generalmente son translocaciones raras que no afectan a las regiones cromosómicas más frecuentes del MM y/o afectan a *IGL* (Debes-Marun et al., 2003; Fonseca et al., 2004; Smadja et al., 1998; Smadja et al., 2003). Se han propuesto dos rutas por en la génesis de neoplasias de CP. En la primera, la aparición de una translocación de *IGH* representaría la lesión inicial en los casos NH. En la segunda, la lesión genética inicial tiene que ser definida, pero debe permitir la acumulación de copias extra de cromosomas y una acumulación posterior de translocaciones de Ig secundarias (Fonseca et al., 2004; Fonseca et al., 2003b). La asociación entre $\Delta 13$ y el grado de ploidía se discute más adelante.

No sólo los cambios numéricos son eventos frecuentes en el mieloma. Además de las translocaciones de genes de Ig, encontramos CNV estructurales, aquellas que afectan a brazos cromosómicos o regiones específicas del genoma, que dividimos en dos grupos ($> 3\text{Mb}$, $< 3\text{Mb}$) en función de la resolución de la CGH-convencional. Esto es posible por que los aCGH de alta resolución, 44K en nuestro caso, sobrepasan los límites de resolución de la CGH-convencional que es de 3 Mb en las mejores condiciones (Kirchhoff et al., 1999a). Comparamos los distintos tipos de alteraciones en los grupos H y NH, encontramos que las trisomías eran más frecuentes en el grupo de H y las monosomías parecen ser más frecuentes en el grupo de mielomas NH. Sin embargo, encontramos que las ganancias $>3\text{Mb}$ eran significativamente más frecuentes en los mielomas H y el resto de alteraciones se distribuía homogéneamente entre ambos grupos. Hasta ahora se había propuesto que los cambios estructurales parecían ser más frecuentes en los mielomas NH (Fonseca et al., 2004; Smadja et al., 1998).

7. ANÁLISIS DE LAS REGIONES MÍNIMAS COMUNES.

7.1. REGIONES MÍNIMAS COMUNES.

Para poder describir el grupo de pacientes analizados y realizar los sucesivos estudios identificamos las regiones mínimas comunes (RMC). La identificación de estas RMC proporciona un método para la búsqueda de genes candidatos o para el diseño de

pruebas diagnósticas. En este estudio identificamos 68 RMC que pueden ser regiones de tamaño pequeño 260 Kb o brazos cromosómicos o cromosomas enteros. Muchas de las regiones mínimas que describimos en este trabajo han sido descritas en otros trabajos (Carrasco et al., 2006; Walker et al., 2006) para la búsqueda de genes candidatos. Muchas de estas RMC vienen definidas por amplificaciones y deleciones homocigóticas de las que hablaremos más adelante. Otras se encuentran dentro de los cromosomas más frecuentemente ganados. Debido a su elevado número a continuación se discuten, únicamente, algunos ejemplos:

Delección en 16q13.12.

Mediante la identificación de RMC hemos identificado genes como *ERCC4*, que se encuentra deletado en la región 16p13.12. Esta delección aparece en 6 casos. El gen *ERCC4* codifica una proteína que está involucrada en la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y se han identificado polimorfismos genéticos que modifican el riesgo de padecer cáncer de mama (Smith et al., 2003).

Regiones mínimas en 13q.

A pesar de que la mayoría de los casos que presentaban deleciones en el cromosoma 13 presentaban una monosomía (7/10), esta estrategia ha permitido identificar dos RMC. La primera RMC se localiza en 13q12.12 (0.376 Mb) y se define por la presencia de una delección homocigótica centromérica a *RB*, que incluye cuatro genes *HSMPP8*, *PSPCI*, *ZNF237* y *ZNF198*, de la que hablaremos en el apartado de amplificaciones y deleciones homocigóticas. La segunda RMC comprende una región de 20 Mb en 13q12-q21, que además de *RB* incluye numerosos genes, entre ellos los más estudiados *CLLD7*, *CLLD6*, *RFP2*, *DLEU* y *DLEU2*. Esta región ha sido ampliamente estudiada en MM (Cheng et al., 2006; Elnenaei et al., 2003; Nomdedeu et al., 2002; Shaughnessy et al., 2000) y en leucemia linfática crónica (Liu et al., 1995; Merup et al., 1998; van Everdink et al., 2003) sin que se haya propuesto un firme candidato con un papel biológico comprobado.

Delección en 4q12-22.1.

Recientemente se ha identificado una región de delección en 4q12-q22.1 mediante CGH-convencional en el 42% de los MM (Cheng et al., 2006). Nosotros también identificamos una región de delección en 4q13.2-q22.1, pero en un porcentaje mucho menor (8%). Las deleciones de 4q se han escrito raramente en MM, sin embargo se han descrito en leucemias de células plasmáticas y líneas celulares (Avet-Loiseau et al., 1997a). Cheng

et al, además de delimitar la región mínima, identifican que la expresión del gen *PF4* (4q13.3) se encuentra reprimida en los casos con la delección y que se encuentra hipermetilado en un alto porcentaje de casos y líneas celulares (Cheng et al., 2006). Este gen codifica un factor que inhibe la angiogénesis (Bikfalvi, 2004) y lo proponen como un nuevo GST en la región. Este gen también lo observamos perdido en nuestra serie en esta delección pero esta acompañado por un elevado número de genes ya que la región delecionada es extensa.

Ganancia 8q24.21.

El análisis de la RMC también ha mostrado que el 15% de los casos muestran una ganancia en la región de la RMC de 8q24.21, que siempre involucra a dos genes, *C-MYC* y *PVT1*. Las alteraciones del gen *C-MYC* en mieloma se han relacionado con reordenamientos complejos que pueden implicar duplicaciones y amplificaciones. Se ha observado que las alteraciones de *C-MYC* en muestras primarias se dan entre el 15% y el 45% de los casos (Avet-Loiseau et al., 2001; Fabris et al., 2003; Shou et al., 2000), confirmando nuestra frecuencia. Además también se ha descrito que el gen *PVT1*, situado entre 100 y 500 Kb telomérico a *C-MYC*, puede encontrarse co-amplificado con *C-MYC* en MM (Palumbo et al., 1990). Este hallazgo no había sido confirmado, pero nuestros resultados, y estudios recientes con aCGH (Carrasco, 2006), parecen apoyar este dato. Por último, las alteraciones de *C-MYC* en mieloma suelen observarse en estadios avanzados de la enfermedad por lo que se considera que estos eventos están asociados a la progresión tumoral.

Delección 17p13-p12.

Como último ejemplo de las RMC podemos ver que también hemos detectado una región delecionada en 17p13.2-p12, de unas 9 Mb, que entre otros genes incluye el gen *TP53*. El gen supresor tumoral *TP53* es el gen que con más frecuencia se encuentra mutado en cáncer, forma parte de las vías que aseguran el mantenimiento del genoma, bien permitiendo la reparación de ADN dañado o bien induciendo la apoptosis celular si el daño no puede ser reparado (Vogelstein et al., 2000). La inactivación del gen *TP53* por delección o por mutación parece ser un evento raro en MM, y está restringido a los estadios más tardíos de la progresión de la enfermedad. Las delecciones de 17p13 se han observado en el 10% de los pacientes, una frecuencia similar a la nuestra, y parece estar asociado a una supervivencia menor (Drach et al., 2000; Drach et al., 1998).

La identificación de RMC puede ser muy útil para la búsqueda de genes candidatos, sobre todo combinada con datos de expresión. También nos permite comparar entre las muestras y realizar análisis para la identificación de subgrupos. Además hemos identificado numerosas regiones dentro de regiones que ya se habían observado delimitando mejor la región mínima de alteración, y permite la identificación de regiones nuevas en MM.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE DISTINTOS GRUPOS BASADOS EN LAS RMC.

Uno de los objetivos de este estudio era intentar definir subgrupos de MM basándonos en las alteraciones genéticas detectadas mediante los aCGH. Para ello generamos una matriz de 0 y 1 (ausencia y presencia de RMC, respectivamente) con las 68 RMC. Mediante un análisis no supervisado de esta matriz fuimos capaces de diferenciar los casos NH de los H, más aun pudimos identificar dos sub-grupos de mielomas H. Esta heterogeneidad genética ha sido descrita recientemente con sistema de clasificaciones diferente (Carrasco et al., 2006). En nuestra serie hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de mielomas H que se dan en la presencia de ganancias en el cromosoma 7 (que se ha asociado a mal pronóstico en linfomas Burkitt (Garcia et al., 2003)), pero no observamos diferencias en las deleciones del cromosoma 13 y ganancias de 1q como se ha propuesto (Carrasco et al., 2006; Chng et al., 2006a) (Figura 27). En nuestra serie observamos que, además de ganancias en el cromosoma 7, algunos casos presentan deleciones en 13q (3 casos) y ganancias de 1q (5 casos) pero no existe una asociación estadísticamente significativa. Carrasco et al, muestran que el grupo con del 13q y ganancias de 1q presentan una peor supervivencia global y una peor supervivencia libre de enfermedad (Figura 27) que asocian a la presencia de estas alteraciones estas alteraciones, aunque también parece que en este grupo hay una mayor frecuencia de ganancias del cromosoma 7. Por otro lado, otro estudio posterior también identifica dos grupos de mielomas hiperdiploides con diferente pronóstico (Chng et al., 2006a). Estos autores observan que la presencia de translocaciones de *IGH*, pero no la presencia de deleciones 13q tiene un efecto negativo en la supervivencia. En nuestro caso también hay dos casos con translocaciones de *IGL* en el grupo con ganancias del cromosoma. De todos modos hay que confirmar los resultados obtenidos hasta el momento para poder esclarecer que regiones confieren un peor pronóstico a ese grupo de mielomas y así poder usarlo como criterio de estratificación de los pacientes.

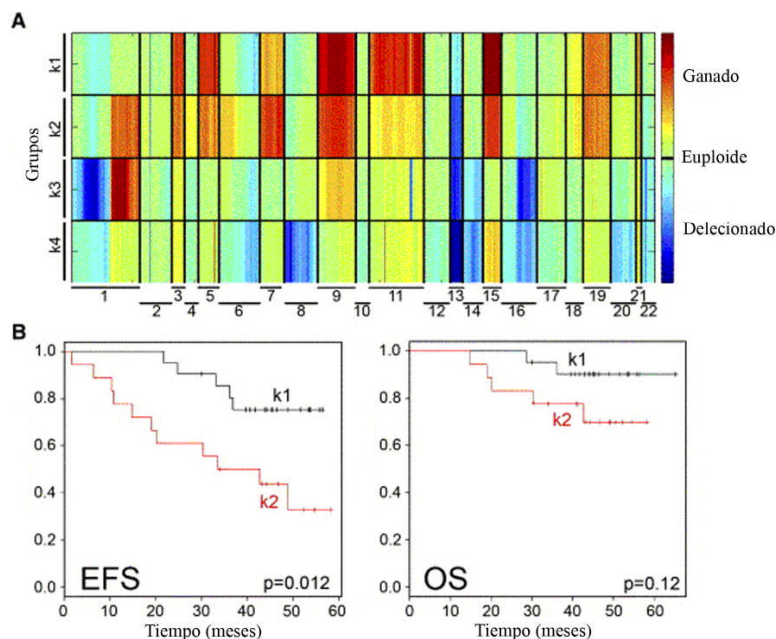


Figure 27. Grupos de mielomas obtenidos mediante perfiles genómicos (Carrasco et al., 2006). A) perfiles de aCGH de 67 muestras primarias. El eje x muestra el mapa genómico ordenado del cromosoma 1 al 22. El eje y muestra los grupos identificados. K1 y K2 representan los casos H y k3 y k4 los casos NH. Los colores indican el estado genómico: ganancias-rojo; euploide (normal)- amarillo/verde; delecionado- azul). B) Curvas de supervivencia libre de enfermedad (EFS) y supervivencia global (OS) para los pacientes k1 y k2. Los pacientes del grupo k1 s muestran una supervivencia libre de enfermedad mejor que K2 ($p = 0.012$), mientras que la supervivencia global no es estadísticamente significativa ($p = 0.12$).

8. AMPLIFICACIONES Y DELECIONES HOMOCIGÓTICAS EN MM.

La identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumor (GST) no es una tarea trivial, aunque el hallazgo de amplificaciones y deleciones homocigóticas, además de las RMC, es un buen punto de partida. En nuestro estudio encontramos diversas amplificaciones y deleciones homocigóticas que mostraban recurrencia como ganancias o deleciones de una copia en otros casos.

8.1. AMPLIFICACIONES.

Las regiones de amplificación son regiones candidatas para la búsqueda de oncogenes, genes sobre-expresados a consecuencia de la amplificación. Nuestro estudio no incluye datos de expresión por lo que proponemos una lista de genes candidatos en la tabla 23 (p. 115). Las amplificaciones encontradas se encuentran en las regiones 6p12 (dos

amplificaciones), 9q22.2, 9q34.2, 14q21.1, 16q22.2, 17p13.2, 17q11 y 19q13. Algunas de ellas, 9q22.2, 16q22.2, 19q13 no han sido descritas en MM y podrían incluir nuevos oncogenes candidatos.

Por ejemplo, el gen *SYK* (9q22.2) codifica una proteína tirosín-quinasa involucrada en la transmisión de señales mediada por los receptores de células B. Este gen se ha observado amplificado y sobre-expresado en muestras primarias y líneas celulares de linfomas del manto (Rinaldi, 2006) y cuando las líneas con esta amplificación se tratan con piceatanol se observa una parada en el crecimiento celular y la inducción de las apoptosis, apuntando que es un candidato para nuevas dianas terapéuticas.

Otra región de amplificación es 16q22.2 que solo incluye un gen denominado *HYDIN*. Este gen se ha relacionado con hidrocefalopatías congénitas (Davy and Robinson, 2003), pero no con cáncer.

Otro ejemplo es el gen *CCNE1*, que se ha encontrado amplificado y sobre-expresado en cáncer de endometrio (Cassia et al., 2003) y cáncer de vejiga (Richter et al., 2000). Este gen aparece ganado/amplificado en la mitad de los casos de MM y se sabe que regula la transición de G1 a S del ciclo celular.

8.2. DELECCIONES HOMOCIGÓTICAS.

Las regiones de deleciones homocigóticas apuntan hacia la existencia de nuevos GST en las mismas. Hemos encontrado deleciones homocigóticas en seis regiones, pero solo 4 han presentado recurrencia en otros casos (6q23.2, 11q22.1, 13q12, 22q11.22).

Delección en 6q23.2

Las deleciones de 6q son eventos frecuentes en una síndromes linfoproliferativos como la leucemia aguda linfoblástica, la leucemia linfática crónica, el MM, el DLBCL y FL (Taborelli et al., 2006). Se han identificado 3 regiones mínimas de delección que se han asociado a distintos tipos de linfomas: las deleciones de 6q21 se asocia con linfomas de alto grado; la delección en 6q23 con linfomas de bajo grado y las deleciones de 6q24-127 con linfomas de grado intermedio (Taborelli et al., 2006). Las deleciones en 6q se han descrito en alrededor de 10-15% de los MM, donde la región mínima se ha definido alrededor de 6q21 (Calasanz et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2004) o recientemente, en 6q23-qter (Walker et al., 2006). Nosotros hemos establecidos dos RMC en el brazo 6q, una en 6q23.2 definida por una delección homocigótica, y una RMC en 6q26 que incluye los genes *SLC22A2*, *LPAL2*, *LPA*. La región 6q23.2, delecionada en 12% de

los casos, incluye dos genes *MAP3K5* y *PEX7*. *MAP3K5*, también conocido como *ASK1* (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), es una proteína-quinasa involucrada en la vía de las MAP quinasas (Wang et al., 1996). Se ha observado que su sobre-expresión puede inducir apoptosis (Ichijo et al., 1997). Por otro lado, el gen *PEX7* codifica una proteína necesaria para el transporte de proteínas de la matriz dentro de los peroxisomas y se ha relacionado con enfermedades relacionadas con la biogénesis de los peroxisomas (Steinberg et al., 2006).

Delección 11q22.1.

Las deleciones en 11q se han observado con una frecuencia alrededor del 5% en MM (Carrasco et al., 2006; Smadja et al., 1998; Walker et al., 2006). Mediante este análisis hemos detectado una delección homocigótica en 11q22.1 en el 4% de los casos. Esta región incluye un grupo de metaloproteinasas (MMP), los genes *BIRC2* y *BIRC3*, *PORIMIN* e *YAPI*. Recientemente, mediante aCGH se ha identificado esta región como una región mínima delecionada en MM, en la que encuentran reprimidos los genes *PORIMIN*, *YAPI* y *MMP8* (Carrasco et al., 2006). Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas que se encargan del remodelado de la matriz extracelular y se sabe que juegan un papel importante en la fisiopatología tumoral. El gen *PORIMIN*, que se ha visto reprimido en casos con delección en esta región, está relacionado con la muerte celular mediante oncosis (Zhang et al., 1998). El gen *YAPI* codifica un co-activador de factores de transcripción que cuando es silenciado reduce o retrasa la apoptosis mediada por p73 (Basu et al., 2003; Strano et al., 2005). Además de estos últimos genes, en esta región también se encuentran los genes *BIRC3* y *BIRC2*, también conocidos como *API2* y *API1* respectivamente. Estos genes pertenecen a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis mediante unión a las caspasas (Liston et al., 2003), pero también tienen actividad ubiquitina E3 por lo que pueden promover la degradación de proteínas. Además, *API2* (*BIRC3*) se ha observado translocado con *MALT1* en linfomas de tipo MALT y en esta translocación frecuentemente se produce la delección crítica de *API1* (*BIRC2*) (Dierlamm et al., 1999). Se sabe que esta translocación activa la vía de *NFκB*, debido en parte a que *API2* pierde su dominio de ubiquitinación y Bcl-10 se acumula en el núcleo (Hu et al., 2006).

Delección 13q12

Como hemos descrito en el apartado de RMC en el cromosoma 13 hemos encontrado una nueva región mínima delimitada por la presencia de una delección homocigótica en el caso #20 en la región 13q12. Esta región incluye cuatro genes *HSMPP8*, *PSPC1*, *ZNF237* y *ZNF198*. En el caso #20 hemos demostrado, mediante SKY, que hay una monosomía del cromosoma 13 y que ese único cromosoma está involucrado en una translocación con el cromosoma 14 por esa región. En esta región el gen candidato podría ser *ZNF198* por que además del caso #20, observamos que el caso #15 mostraba dos clones consecutivos que cubren este gen, delecionados homocigóticamente. El gen *ZNF198* codifica una proteína con dedos de zinc cuya función no se conoce. Sin embargo este gen se ha encontrado fusionado a *FGFR1* en el síndrome t(8;13) leucemia/linfoma (Xiao et al., 1998), donde parece que el efecto oncogénico se produce por una activación de *FGFR1* mediada por la dimerización de la proteína de fusión por los dedos de zinc de *ZNF198* (Reiter et al., 1998).

Delección 22q11.2

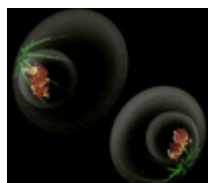
Hemos detectado una delección en 22q11.2 en el 19% de los casos de nuestra serie. Uno de los casos presentó una delección homocigótica que involucra los genes *IGLC2*, *SUHW1*, *SUHW2* y *PRAME*. El gen *IGLC2* se corresponde con la región son 2 de la cadena ligera lambda de las Ig, los genes *SUHW1* y *SUHW2* son proteínas de función desconocida que tienen homología con unas proteínas que reprimen la función de potenciación de la transcripción de los retrotransposones *Gypsy* en *Drosophila*, y el gen *PRAME*, un antígeno reconocido por células T citotóxicas en una línea celular de melanoma, se ha observado en numerosos tumores (cáncer de pulmón, cáncer renal, sarcomas) y en todas las leucemias agudas mieloblásticas con la translocación cromosómica t(8;21) (van Baren et al., 1998). Las deleciones en 22q11 se han encontrado entre el 10-25% de los pacientes con mieloma (Calasanz et al., 1997a; Cremer et al., 2005; Smadja et al., 1998) y los reordenamientos de 22q se han asociado con un mal pronóstico (Calasanz et al., 1997b). El gen *IGL* puede encontrarse translocado en el 10% de los pacientes, sin embargo recientemente se han detectado casos con reordenamientos de 22q11 que no involucran *IGL* (Saez et al., 2006c), por lo que podría localizarse en esta región un nuevo gen con un papel importante en MM.

9. CARACTERIZACIÓN DE LA DUPLICACIÓN EN Xq21-qter.

En cinco de los casos analizados encontramos una ganancia en el brazo largo del cromosoma X, con un punto de rotura recurrente localizado en Xq21.33. Además de estos casos identificamos que la línea L363 también presentaba ese patrón de hibridación. La mayoría de los casos que presentaban esta ganancia presentaban un número elevado de alteraciones (mediana de 18 alteraciones por caso) y todos menos el caso #4 resultaron ser hiperdiploides, y solamente el caso #11 y la líneas L36 presentaban translocaciones, en *IGL* en ambos casos. Las ganancias en Xq en NHL se han observado como un evento secundario (McDonald et al., 2000), esto junto con las características de los caso que las presentan apuntan a que podrían ser secundarias en mieloma. Desarrollamos un ensayo de FISH para validar esta alteración y confirmamos los resultados. Mediante SKY identificamos que el fragmento duplicado se encontraba involucrado en translocaciones al menos en el caso #20, t(X;21)(q21.33;q22.3), y en L363, t(X;14)(q21.33; q31.1) que no involucraban a el gen *IGH*. Numerosos estudios muestran ganancias en Xq en los perfiles de CGH en casos de mieloma, sin embargo ninguno hace referencia a su frecuencia o naturaleza (Cheng et al., 2006; Gutierrez et al., 2001; Inoue et al., 2004; Liebisch et al., 2003; Walker et al., 2006). También se han observado translocaciones con las bandas Xq21 y Xq22 mediante SKY (Sawyer et al., 1998a; Sawyer et al., 2001). Además existen varios sitios frágiles en la región de Xq12-q28 (Myllykangas et al., 2006).

En resumen, esta es la primera vez que se caracteriza la frecuencia de las ganancias en Xq21.33 y se caracteriza genéticamente mediante FISH y SKY, demostrando su origen en translocaciones no equilibradas.

CONCLUSIONES



Identificación de genes ganados y sobre-expresados en líneas celulares de MM:

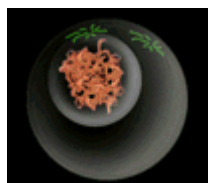
1. La caracterización de las translocaciones de Ig y el análisis de los perfiles de expresión génica en nueve líneas celulares de MM, agrupa las líneas analizadas en tres de los grupos TC (11q13, 4p16 y MAF), permitiendo la identificación 166 genes diferencialmente expresados entre estos grupos.
2. La combinación de análisis de las líneas celulares mediante hibridación genómica comparada convencional (CGH) y matrices o arrays de CGH, identifica trece regiones ganadas o amplificadas en los cromosomas 1, 7, 8, 11 y 18.
3. La combinación de los análisis de los perfiles de expresión con los arrays de CGH ha permitido identificar sesenta genes sobre-expresados en las regiones de ganancias/amplificación descritas en los cromosomas 1, 7, 8, 11 y 18.
 - a. Los genes asociados a muerte celular - *BCL2*, *MALT1*, *DCC*, *ELMO1*, *GAS2* y *BNIP3L*- estaban significativamente ($p=0.024$) sobre representados en nuestra lista.
 - b. Seis genes mostraron una asociación entre la sobre-expresión y la presencia de ganancia/amplificación. Nueve genes estaban amplificados en todas las líneas que presentaban un aumento en el número de copias, 15 estaban exclusivamente ganados en líneas que presentaban alteraciones y el resto de genes presentaban tanto ganancias como amplificaciones.
4. La validación de los resultados de los genes *c-MYC*, *MALT1* y *BCL2* mediante FISH y PCR cuantitativa ha mostrado un gran concordancia. *C-MYC* se sobre-expresa únicamente en las líneas celulares que presenten ganancias y translocaciones, las ganancias o translocaciones por separado no tienen un impacto en la expresión de *C-MYC*. Por primera vez en MM hemos demostrado que los genes *MALT1* y *BCL2* (en 18q21) se encuentran co-amplificados y co-expresado en tres líneas celulares (SK-MM-2, OPM-2 y LP-1).

Caracterización genómica de muestras primarias de mieloma múltiple:

5. El análisis de 26 muestras primarias de mieloma múltiple enriquecidas en células plasmáticas mediante arrays de CGH de alta resolución ha mostrado que todos los casos presentan variaciones en el número de copias. El análisis de las translocaciones de los genes de *IGL* e *IGH* mostró que la mitad de los casos muestran translocaciones en uno de los dos genes de Ig.

6. Identificamos 68 regiones mínimas comunes de ganancia y pérdida y mediante un análisis jerárquico no supervisado se segregaron los casos de mieloma hiperdiploides de los no-hiperdiploides. Más aún, se identificaron dos subgrupos de mielomas hiperdiploides, uno de ellos mostraba una alta frecuencia de ganancias en el cromosoma 7.
7. Se han identificado nueve amplificaciones y seis deleciones homocigóticas donde podrían encontrarse nuevos oncogenes y genes supresores de tumor relacionados con la biología del mieloma múltiple.
8. Se ha identificado una duplicación en Xq21.33-qter en 5 de 26 casos y en la línea celular L363. Esta es la primera vez que se caracteriza la frecuencia de las ganancias en Xq21.33 y se ha caracterizado genéticamente mediante FISH y SKY, demostrando su origen en translocaciones no equilibradas.

REFERENCIAS



1. Adams, J. M., Gerondakis, S., Webb, E., Corcoran, L. M., and Cory, S., 1983, Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(7):1982-6.
2. Agnelli, L., Biccato, S., Mattioli, M., Fabris, S., Intini, D., Verdelli, D., Baldini, L., Morabito, F., Callea, V., Lombardi, L., and Neri, A., 2005, Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations, *J Clin Oncol* **23**(29):7296-306.
3. Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M., and Seto, M., 1999, A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, *Oncogene* **18**(42):5785-94.
4. Alexanian, R., Barlogie, B., and Dixon, D., 1990, Renal failure in multiple myeloma. Pathogenesis and prognostic implications, *Arch Intern Med* **150**(8):1693-5.
5. Al-Shahrour, F., Minguez, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L., and Dopazo, J., 2005, BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments, *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue):W460-4.
6. Amakawa, R., Fukuhara, S., Ohno, H., Tanabe, S., Horii, M., Matsuyama, F., Kato, I., Kakita, T., and Nagauchi, O., 1990, Amplified and rearranged bcl-2 gene in two lymphoma cell lines, FL-218 and FL-318, carrying a 14;18 translocation, *Cancer Res* **50**(8):2423-8.
7. Armitage, J. O., and Weisenburger, D. D., 1998, New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, *J Clin Oncol* **16**(8):2780-95.
8. Astrom, A. K., Voz, M. L., Kas, K., Roijer, E., Wedell, B., Mandahl, N., Van de Ven, W., Mark, J., and Stenman, G., 1999, Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene, *Cancer Res* **59**(4):918-23.
9. Autio, R., Hautaniemi, S., Kauraniemi, P., Yli-Harja, O., Astola, J., Wolf, M., and Kallioniemi, A., 2003, CGH-Plotter: MATLAB toolbox for CGH-data analysis, *Bioinformatics* **19**(13):1714-15.
10. Avet-Loiseau, H., Andree-Ashley, L. E., Moore, D., 2nd, Mellerin, M. P., Feusner, J., Bataille, R., and Pallavicini, M. G., 1997a, Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization, *Genes Chromosomes Cancer* **19**(2):124-33.
11. Avet-Loiseau, H., Daviet, A., Sauner, S., and Bataille, R., 2000, Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13, *Br J Haematol* **111**:1116-1117.
12. Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Grosbois, B., and Bataille, R., 1999, 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome, *Cancer Res* **59**(18):4546-50.
13. Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L., and Bataille, R., 2001, Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors, *Blood* **98**(10):3082-6.
14. Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M. J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., Harousseau, J. L., and Bataille, R., 1998, High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies, *Cancer Res* **58**(24):5640-5.
15. Avet-Loiseau, H., Vigier, M., Moreau, A., Mellerin, M. P., Gaillard, F., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Milpied, N., 1997b, Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80% of follicular lymphomas, *Br J Haematol* **97**(1):119-22.
16. Baris, D., Brown, L. M., Silverman, D. T., Hayes, R., Hoover, R. N., Swanson, G. M., Dosemeci, M., Schwartz, A. G., Liff, J. M., Schoenberg, J. B., Pottern, L. M., Lubin, J., Greenberg, R. S., and Fraumeni, J. F., Jr., 2000, Socioeconomic status and multiple myeloma among US blacks and whites, *Am J Public Health* **90**(8):1277-81.
17. Barlogie, B., Shaughnessy, J., Tricot, G., Jacobson, J., Zangari, M., Anaissie, E., Walker, R., and Crowley, J., 2004, Treatment of multiple myeloma, *Blood* **103**(1):20-32.

18. Barrett, M. T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P. S., Yakhini, Z., Bruhn, L., and Laderman, S., 2004, Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(51):17765-70.
19. Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M., and Downward, J., 2003, Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis, *Mol Cell* **11**(1):11-23.
20. Bell, A. H., 1992, ematopoiesis: Morphology of Human Blood and Marrow Cells., *In:Harmening DM, editor. Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis. 2nd ed.*
21. *Philadelphia: F.A. Davis*:21-42.
22. Bergsagel, D. E., Wong, O., Bergsagel, P. L., Alexanian, R., Anderson, K., Kyle, R. A., and Raabe, G. K., 1999, Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence, *Blood* **94**(4):1174-82.
23. Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M., 2001, Chromosome translocations in multiple myeloma, *Oncogene* **20**(40):5611-22.
24. Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M., 2003, Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma, *Immunol Rev* **194**:96-104.
25. Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M., 2005, Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma, *J Clin Oncol* **23**(26):6333-8.
26. Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr., 2005, Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma, *Blood* **106**(1):296-303.
27. Bernards, R., 1999, CDK-independent activities of D type cyclins, *Biochim Biophys Acta* **1424**(2-3):M17-22.
28. Bharti, A. C., Shishodia, S., Reuben, J. M., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M., and Aggarwal, B. B., 2004, Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis, *Blood* **103**(8):3175-84.
29. Bienvenu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O., 2005, Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1, *Mol Biol Cell* **16**(4):1850-8.
30. Bikfalvi, A., 2004, Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis, *Semin Thromb Hemost* **30**(3):379-85.
31. Blade, J., Rosinol, L., Sureda, A., Ribera, J. M., Diaz-Mediavilla, J., Garcia-Larana, J., Mateos, M. V., Palomera, L., Fernandez-Calvo, J., Marti, J. M., Giraldo, P., Carbonell, F., Callis, M., Trujillo, J., Gardella, S., Moro, M. J., Barez, A., Soler, A., Font, L., Fontanillas, M., and San Miguel, J., 2005, High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA, *Blood* **106**(12):3755-9.
32. Blade, J., Samson, D., Reece, D., Apperley, J., Bjorkstrand, B., Gahrton, G., Gertz, M., Giral, S., Jagannath, S., and Vesole, D., 1998, Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant, *Br J Haematol* **102**(5):1115-23.
33. Blair, A., Hartge, P., Stewart, P. A., McAdams, M., and Lubin, J., 1998, Mortality and cancer incidence of aircraft maintenance workers exposed to trichloroethylene and other organic solvents and chemicals: extended follow up, *Occup Environ Med* **55**(3):161-71.
34. Blank, V., and Andrews, N. C., 1997, The Maf transcription factors: regulators of differentiation, *Trends Biochem Sci* **22**(11):437-41.
35. Boersma-Vreugdenhil, G. R., Kuipers, J., Van Stralen, E., Peeters, T., Michaux, L., Hagemeyer, A., Pearson, P. L., Clevers, H. C., and Bast, B. J., 2004, The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint, *Br J Haematol* **126**(3):355-63.
36. Bowden, M., Crawford, J., Cohen, H. J., and Noyama, O., 1993, A comparative study of monoclonal gammopathies and immunoglobulin levels in Japanese and United States elderly, *J Am Geriatr Soc* **41**(1):11-4.

37. Brancolini, C., Bottega, S., and Schneider, C., 1992, Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system, *J Cell Biol* **117**(6):1251-61.
38. Brennan, C., Zhang, Y., Leo, C., Feng, B., Cauwels, C., Aguirre, A. J., Kim, M., Protopopov, A., and Chin, L., 2004, High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray, *Cancer Res* **64**(14):4744-8.
39. Brown, L. M., Gibson, R., Burmeister, L. F., Schuman, L. M., Everett, G. D., and Blair, A., 1992, Alcohol consumption and risk of leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma, *Leuk Res* **16**(10):979-84.
40. Brown, L. M., Linet, M. S., Greenberg, R. S., Silverman, D. T., Hayes, R. B., Swanson, G. M., Schwartz, A. G., Schoenberg, J. B., Pottner, L. M., and Fraumeni, J. F., Jr., 1999, Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S, *Cancer* **85**(11):2385-90.
41. Calame, K. L., 2001, Plasma cells: finding new light at the end of B cell development, *Nat Immunol* **2**(12):1103-8.
42. Calame, K. L., Lin, K. I., and Tunyaplin, C., 2003, Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells, *Annu Rev Immunol* **21**:205-30.
43. Calasanz, M. J., Cigudosa, J. C., Odero, M. D., Ferreira, C., Ardanaz, M. T., Fraile, A., Carrasco, J. L., Sole, F., Cuesta, B., and Gullon, A., 1997a, Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations, *Genes Chromosomes Cancer* **18**(2):84-93.
44. Calasanz, M. J., Cigudosa, J. C., Odero, M. D., Garcia-Foncillas, J., Marin, J., Ardanaz, M. T., Rocha, E., and Gullon, A., 1997b, Hypodiploidy and 22q11 rearrangements at diagnosis are associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma, *Br J Haematol* **98**(2):418-25.
45. Carrasco, D. R., Tonon, G., Huang, Y., Zhang, Y., Sinha, R., Feng, B., Stewart, J. P., Zhan, F., Khatry, D., Protopopova, M., Protopopov, A., Sukhdeo, K., Hanamura, I., Stephens, O., Barlogie, B., Anderson, K. C., Chin, L., Shaughnessy, J. D., Jr., Brennan, C., and Depinho, R. A., 2006, High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients, *Cancer Cell* **9**(4):313-25.
46. Cartwright, R. A., Gilman, E. A., Nicholson, P., and Allon, D., 1999, Epidemiology of multiple myeloma in parts of England, 1984-1993, *Hematol Oncol* **17**(1):31-8.
47. Carvalho, B., Ouwerkerk, E., Meijer, G. A., and Ylstra, B., 2004, High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides, *J Clin Pathol* **57**(6):644-6.
48. Cassia, R., Moreno-Bueno, G., Rodriguez-Perales, S., Hardisson, D., Cigudosa, J. C., and Palacios, J., 2003, Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma, *J Pathol* **201**(4):589-95.
49. Chang, H., Qi, C., Yi, Q. L., Reece, D., and Stewart, A. K., 2005, p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation, *Blood* **105**(1):358-60.
50. Chang, H., Qi, X. Y., Claudio, J., Zhuang, L., Patterson, B., and Stewart, A. K., 2006a, Analysis of PTEN deletions and mutations in multiple myeloma, *Leuk Res* **30**(3):262-5.
51. Chang, H., Yeung, J., Xu, W., Ning, Y., and Patterson, B., 2006b, Significant increase of CKS1B amplification from monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma and plasma cell leukaemia as demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridisation, *Br J Haematol* **134**(6):613-5.
52. Chatenoud, L., Tavani, A., La Vecchia, C., Jacobs, D. R., Jr., Negri, E., Levi, F., and Franceschi, S., 1998, Whole grain food intake and cancer risk, *Int J Cancer* **77**(1):24-8.
53. Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R. C., Saxena, S., Gietz, R. D., and Greenberg, A. H., 1997, The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis, *J Exp Med* **186**(12):1975-83.
54. Cheng, S. H., Ng, M. H., Lau, K. M., Liu, H. S., Chan, J. C., Hui, A. B., Lo, K. W., Jiang, H., Hou, J., Chu, R. W., Wong, W. S., Chan, N. P., and Ng, H. K., 2006, 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*.
55. Chesi, M., Bergsagel, P. L., Brents, L. A., Smith, C. M., Gerhard, D. S., and Kuehl, W. M., 1996, Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines, *Blood* **88**(2):674-81.

56. Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., and Kuehl, W. M., 1998a, Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma, *Blood* **91**(12):4457-63.
57. Chesi, M., Nardini, E., Lim, R. S., Smith, K. D., Kuehl, W. M., and Bergsagel, P. L., 1998b, The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts, *Blood* **92**(9):3025-34.
58. Chng, W. J., Santana-Davila, R., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., Jalal, S. M., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Trendle, M. C., Jacobus, S., Blood, E., Oken, M. M., Henderson, K., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., and Fonseca, R., 2006a, Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations, *Leukemia* **20**(5):807-13.
59. Chng, W. J., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., Winkler, J. M., Jalal, S. M., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Trendle, M. C., Oken, M. M., Blood, E., Henderson, K., Santana-Davila, R., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., and Fonseca, R., 2005, A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS, *Blood* **106**(6):2156-61.
60. Chng, W. J., Winkler, J. M., Greipp, P. R., Jalal, S. M., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Trendle, M. C., Ahmann, G. J., Henderson, K., Blood, E., Oken, M. M., Hulbert, A., Van Wier, S. A., Santana-Davila, R., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., and Fonseca, R., 2006b, Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression, *Leuk Res* **30**(3):266-71.
61. Cigudosa, J. C., Rao, P. H., Calasanz, M. J., Odero, M. D., Michaeli, J., Jhanwar, S. C., and Chaganti, R. S., 1998, Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization, *Blood* **91**(8):3007-10.
62. Claudio, J. O., Masih-Khan, E., Tang, H., Goncalves, J., Voralia, M., Li, Z. H., Nadeem, V., Cukerman, E., Francisco-Pabalan, O., Liew, C. C., Woodgett, J. R., and Stewart, A. K., 2002, A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma, *Blood* **100**(6):2175-86.
63. Cremer, F. W., Bila, J., Buck, I., Kartal, M., Hose, D., Itrich, C., Benner, A., Raab, M. S., Theil, A. C., Moos, M., Goldschmidt, H., Bartram, C. R., and Jauch, A., 2005, Delineation of distinct subgroups of multiple myeloma and a model for clonal evolution based on interphase cytogenetics, *Genes Chromosomes Cancer* **44**(2):194-203.
64. Cuzick, J., 1981, Radiation-induced myelomatosis, *N Engl J Med* **304**(4):204-10.
65. Davies, F. E., Forsyth, P. D., Rawstron, A. C., Owen, R. G., Pratt, G., Evans, P. A., Richards, S. J., Drayson, M., Smith, G. M., Selby, P. J., Child, J. A., and Morgan, G. J., 2001, The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma, *Br J Haematol* **112**(3):814-9.
66. Davies, F. E., Rollinson, S. J., Rawstron, A. C., Roman, E., Richards, S., Drayson, M., Child, J. A., and Morgan, G. J., 2000, High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment, *J Clin Oncol* **18**(15):2843-51.
67. Davy, B. E., and Robinson, M. L., 2003, Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene, *Hum Mol Genet* **12**(10):1163-70.
68. De Vos, J., Couderc, G., Tarte, K., Jourdan, M., Requirand, G., Delteil, M. C., Rossi, J. F., Mechti, N., and Klein, B., 2001, Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays, *Blood* **98**(3):771-80.
69. De Vos, J., Thykjaer, T., Tarte, K., Ensslen, M., Raynaud, P., Requirand, G., Pellet, F., Pantesco, V., Reme, T., Jourdan, M., Rossi, J. F., Orntoft, T., and Klein, B., 2002, Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays, *Oncogene* **21**(44):6848-57.
70. Debes-Marun, C. S., Dewald, G. W., Bryant, S., Picken, E., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Winkler, J. M., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Rajkumar, S. V., Lust, J. A., Greipp, P. R., and Fonseca, R., 2003, Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma, *Leukemia* **17**(2):427-36.
71. Demers, P. A., Vaughan, T. L., Koepsell, T. D., Lyon, J. L., Swanson, G. M., Greenberg, R. S., and Weiss, N. S., 1993, A case-control study of multiple myeloma and occupation, *Am J Ind Med* **23**(4):629-39.

72. Devesa, S. S., Silverman, D. T., Young, J. L., Jr., Pollack, E. S., Brown, C. C., Horm, J. W., Percy, C. L., Myers, M. H., McKay, F. W., and Fraumeni, J. F., Jr., 1987, Cancer incidence and mortality trends among whites in the United States, 1947-84, *J Natl Cancer Inst* **79**(4):701-70.
73. Dewald, G. W., Kyle, R. A., Hicks, G. A., and Greipp, P. R., 1985, The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis, *Blood* **66**(2):380-90.
74. Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K. P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E., and Guggenheim, R., 1978, Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study, *Blut* **36**(6):331-8.
75. Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., and Marynen, P., 1999, The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6ssociated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas, *Blood* **93**(11):3601-9.
76. Dijkman, R., Tensen, C. P., Jordanova, E. S., Knijnenburg, J., Hoefnagel, J. J., Mulder, A. A., Rosenberg, C., Raap, A. K., Willemze, R., Szuhai, K., and Vermeer, M. H., 2006, Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma, *J Clin Oncol* **24**(2):296-305.
77. Doody, M. M., Linet, M. S., Glass, A. G., Friedman, G. D., Pottern, L. M., Boice, J. D., Jr., and Fraumeni, J. F., Jr., 1992, Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma following selected medical conditions, *Cancer Causes Control* **3**(5):449-56.
78. Drach, J., Ackerman, J., Kaufmann, H., Konigsberg, R., and Huber, H., 2000, Deletions of the p53 gene in multiple myeloma, *Br J Haematol* **108**(4):886.
79. Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H., and Huber, H., 1998, Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy, *Blood* **92**(3):802-9.
80. Drach, J., and Kaufmann, H., 2002, New developments and treatment in multiple myeloma: new insights on molecular biology, *Ann Oncol* **13 Suppl 4**:43-7.
81. Drewinko, B., Alexanian, R., Boyer, H., Barlogie, B., and Rubinow, S. I., 1981, The growth fraction of human myeloma cells, *Blood* **57**(2):333-8.
82. Dring, A. M., Davies, F. E., Fenton, J. A., Roddam, P. L., Scott, K., Gonzalez, D., Rollinson, S., Rawstron, A. C., Rees-Unwin, K. S., Li, C., Munshi, N. C., Anderson, K. C., and Morgan, G. J., 2004, A global expression-based analysis of the consequences of the t(4;14) translocation in myeloma, *Clin Cancer Res* **10**(17):5692-701.
83. Durie, B. G., Kyle, R. A., Belch, A., Bensinger, W., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Comenzo, R., Djulbegovic, B., Fantl, D., Gahrton, G., Harousseau, J. L., Hungria, V., Joshua, D., Ludwig, H., Mehta, J., Morales, A. R., Morgan, G., Nouel, A., Oken, M., Powles, R., Roodman, D., San Miguel, J., Shimizu, K., Singhal, S., Sirohi, B., Sonneveld, P., Tricot, G., and Van Ness, B., 2003, Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation, *Hematol J* **4**(6):379-98.
84. Durie, B. G., and Salmon, S. E., 1975, A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival, *Cancer* **36**(3):842-54.
85. Elnenaei, M. O., Hamoudi, R. A., Swansbury, J., Gruszka-Westwood, A. M., Brito-Babapulle, V., Matutes, E., and Catovsky, D., 2003, Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma, *Genes Chromosomes Cancer* **36**(1):99-106.
86. Eriksson, M., 1993, Rheumatoid arthritis as a risk factor for multiple myeloma: a case-control study, *Eur J Cancer* **29A**(2):259-63.
87. Eton, O., Scheinberg, D. A., and Houghton, A. N., 1989, Establishment and characterization of two human myeloma cell lines secreting kappa light chains, *Leukemia* **3**(10):729-35.
88. Fabris, S., Agnelli, L., Mattioli, M., Baldini, L., Ronchetti, D., Morabito, F., Verdelli, D., Nobili, L., Intini, D., Callea, V., Stelitano, C., Lombardi, L., and Neri, A., 2005, Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analyses, *Genes Chromosomes Cancer* **42**(2):117-27.

89. Fabris, S., Storlazzi, C. T., Baldini, L., Nobili, L., Lombardi, L., Maiolo, A. T., Rocchi, M., and Neri, A., 2003, Heterogeneous pattern of chromosomal breakpoints involving the MYC locus in multiple myeloma, *Genes Chromosomes Cancer* **37**(3):261-9.
90. Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Davies, F. E., Drach, J., Greipp, P. R., Kirsch, I. R., Kuehl, W. M., Hernandez, J. M., Minvielle, S., Pilarski, L. M., Shaughnessy, J. D., Jr., Stewart, A. K., and Avet-Loiseau, H., 2004, Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report, *Cancer Res* **64**(4):1546-58.
91. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Van Ness, B., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Bailey, R. J., and Greipp, P. R., 2003a, Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma, *Blood* **101**(11):4569-75.
92. Fonseca, R., Blood, E. A., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Bailey, R. J., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Hoyer, J. D., Harrington, D., Kay, N. E., Van Ness, B., and Greipp, P. R., 2002a, Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients, *Blood* **99**(10):3735-41.
93. Fonseca, R., Debes-Marun, C. S., Picken, E. B., Dewald, G. W., Bryant, S. C., Winkler, J. M., Blood, E., Oken, M. M., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., and Greipp, P. R., 2003b, The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma, *Blood* **102**(7):2562-7.
94. Fonseca, R., Harrington, D., Oken, M. M., Dewald, G. W., Bailey, R. J., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Blood, E. A., Rajkumar, S. V., Kay, N. E., Van Ness, B., and Greipp, P. R., 2002b, 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* **62**(3):715-20.
95. Fonseca, R., Oken, M. M., Harrington, D., Bailey, R. J., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Kay, N. E., Van Ness, B., Greipp, P. R., and Dewald, G. W., 2001, Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy, *Leukemia* **15**(6):981-6.
96. Fracchiolla, N. S., Luminari, S., Baldini, L., Lombardi, L., Maiolo, A. T., and Neri, A., 1998, FGFR3 gene mutations associated with human skeletal disorders occur rarely in multiple myeloma, *Blood* **92**(8):2987-9.
97. Friedberg, E. C., 2003, DNA damage and repair, *Nature* **421**(6921):436-40.
98. Fritschi, L., Ambrosini, G. L., Kliwer, E. V., and Johnson, K. C., 2004, Dietary fish intake and risk of leukaemia, multiple myeloma, and non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(4):532-7.
99. Garcia, J. L., Hernandez, J. M., Gutierrez, N. C., Flores, T., Gonzalez, D., Calasanz, M. J., Martinez-Climent, J. A., Piris, M. A., Lopez-Capitan, C., Gonzalez, M. B., Otero, M. D., and San Miguel, J. F., 2003, Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study, *Leukemia* **17**(10):2016-24.
100. Garcia-Sanz, R., Orfao, A., Gonzalez, M., Tabernero, M. D., Blade, J., Moro, M. J., Fernandez-Calvo, J., Sanz, M. A., Perez-Simon, J. A., Rasillo, A., and Miguel, J. F., 1999, Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics, *Blood* **93**(3):1032-7.
101. Gazdar, A. F., Oie, H. K., Kirsch, I. R., and Hollis, G. F., 1986, Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene, *Blood* **67**(6):1542-9.
102. Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., Litzow, M. R., Henderson, K. J., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., and Fonseca, R., 2005, 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* **106**(8):2837-40.
103. Goedert, J. J., Cote, T. R., Virgo, P., Scoppa, S. M., Kingma, D. W., Gail, M. H., Jaffe, E. S., and Biggar, R. J., 1998, Spectrum of AIDS-associated malignant disorders, *Lancet* **351**(9119):1833-9.
104. Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A., 2000, Cancer statistics, 2000, *CA Cancer J Clin* **50**(1):7-33.
105. Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R. A., Lahuerta, J. J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R.,

- Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., and Westin, J., 2005, International staging system for multiple myeloma, *J Clin Oncol* **23**(15):3412-20.
106. Grogan, T., and Spier, C., 2001, The B cell immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis., In: Knowles DM, editor. *Neoplastic Hematopathology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins*:1557-1587.
107. Grogan, T., Van Camp, B., Kyle, R., Müller-Hermelink, H., and Harris, N., 2001, Plasma cell neoplasms, In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press*:142-156.
108. Grogan, T. M., Durie, B. G., Spier, C. M., Richter, L., and Vela, E., 1989, Myelomonocytic antigen positive multiple myeloma, *Blood* **73**(3):763-9.
109. Guikema, J. E., Hovenga, S., Vellenga, E., and Bos, N. A., 2004, Heterogeneity in the multiple myeloma tumor clone, *Leuk Lymphoma* **45**(5):857-71.
110. Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., and Ravichandran, K. S., 2001, CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration, *Cell* **107**(1):27-41.
111. Gutierrez, N. C., Garcia, J. L., Hernandez, J. M., Lumbreras, E., Castellanos, M., Rasillo, A., Mateo, G., Perez, S., Orfao, A., and San Miguel, J. F., 2004, Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma, *Blood* **104**(9):2661-6.
112. Gutierrez, N. C., Hernandez, J. M., Garcia, J. L., Canizo, M. C., Gonzalez, M., Hernandez, J., Gonzalez, M. B., Garcia-Marcos, M. A., and San Miguel, J. F., 2001, Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization, *Leukemia* **15**(5):840-5.
113. Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H. R., and Tschopp, J., 1996, Activated B cells express functional Fas ligand, *Eur J Immunol* **26**(3):721-4.
114. Hallek, M., Bergsagel, P. L., and Anderson, K. C., 1998, Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood* **91**(1):3-21.
115. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C., 1993, bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **82**(6):1820-8.
116. Hanamura, I., Iida, S., Akano, Y., Hayami, Y., Kato, M., Miura, K., Harada, S., Banno, S., Wakita, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Shimizu, S., Sonta, S. I., Nitta, M., Taniwaki, M., and Ueda, R., 2001, Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations, *Jpn J Cancer Res* **92**(6):638-44.
117. 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., 2006, 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**(5):1724-32.
118. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D., 2000, The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997, *Histopathology* **36**(1):69-86.
119. Herrero, J., Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J. M., Santoyo, J., and Dopazo, J., 2003, GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis, *Nucleic Acids Res* **31**(13):3461-7.
120. Herrero, J., Valencia, A., and Dopazo, J., 2001, A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns, *Bioinformatics* **17**(2):126-36.
121. Herrero, J., Vaquerizas, J. M., Al-Shahrour, F., Conde, L., Mateos, A., Diaz-Uriarte, J. S., and Dopazo, J., 2004, New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS, *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue):W485-91.
122. Hideshima, T., and Anderson, K. C., 2002, Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma, *Nat Rev Cancer* **2**(12):927-37.

123. Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., and Anderson, K. C., 2004, Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications, *Blood* **104**(3):607-18.
124. Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., and Anderson, K. C., 2002, NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma, *J Biol Chem* **277**(19):16639-47.
125. Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., and Anderson, K. C., 2005, Cytokines and signal transduction, *Best Pract Res Clin Haematol* **18**(4):509-24.
126. Hideshima, T., Richardson, P., and Anderson, K. C., 2003, Novel therapeutic approaches for multiple myeloma, *Immunol Rev* **194**:164-76.
127. Higgins, M. J., and Fonseca, R., 2005, Genetics of multiple myeloma, *Best Pract Res Clin Haematol* **18**(4):525-36.
128. Ho, L., Davis, R. E., Conne, B., Chappuis, R., Berczy, M., Mhawech, P., Staudt, L. M., and Schwaller, J., 2005, MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-kappa B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells, *Blood* **105**(7):2891-9.
129. Hu, S., Alcivar, A., Qu, L., Tang, J., and Yang, X., 2006, CIAP2 inhibits anigen receptor signaling by targeting Bcl10 for degradation, *Cell Cycle* **5**(13):1438-42.
130. Hurt, E. M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A. L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., and Staudt, L. M., 2004, Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma, *Cancer Cell* **5**(2):191-9.
131. Hyman, E., Kauraniemi, P., Hautaniemi, S., Wolf, M., Mousses, S., Rozenblum, E., Ringner, M., Sauter, G., Monni, O., Elkahloun, A., Kallioniemi, O. P., and Kallioniemi, A., 2002, Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer, *Cancer Res* **62**(21):6240-5.
132. Hyun, T., Yam, A., Pece, S., Xie, X., Zhang, J., Miki, T., Gutkind, J. S., and Li, W., 2000, Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas, *Blood* **96**(10):3560-8.
133. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y., 1997, Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways, *Science* **275**(5296):90-4.
134. Inoue, J., Otsuki, T., Hirasawa, A., Imoto, I., Matsuo, Y., Shimizu, S., Taniwaki, M., and Inazawa, J., 2004, Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma, *Am J Pathol* **165**(1):71-81.
135. International Myeloma Working Group, 2003, Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group, *Br J Haematol* **121**(5):749-57.
136. Intini, D., Baldini, L., Fabris, S., Lombardi, L., Ciceri, G., Maiolo, A. T., and Neri, A., 2001, Analysis of FGFR3 gene mutations in multiple myeloma patients with t(4;14), *Br J Haematol* **114**(2):362-4.
137. Iyer, R., Ding, L., Batchu, R. B., Naugler, S., Shamma, M. A., and Munshi, N. C., 2003, Antisense p53 transduction leads to overexpression of bcl-2 and dexamethasone resistance in multiple myeloma, *Leuk Res* **27**(1):73-8.
138. Jackson, N., Lowe, J., Ball, J., Bromidge, E., Ling, N. R., Larkins, S., Griffith, M. J., and Franklin, I. M., 1989, Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2, *Clin Exp Immunol* **75**(1):93-9.
139. Janssen, J. W., Vaandrager, J. W., Heuser, T., Jauch, A., Kluin, P. M., Geelen, E., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Drexler, H. G., Otsuki, T., Bartram, C. R., and Schuurings, E., 2000, Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32), *Blood* **95**(8):2691-8.
140. Kakkis, E., Riggs, K. J., Gillespie, W., and Calame, K., 1989, A transcriptional repressor of c-myc, *Nature* **339**(6227):718-21.
141. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D., 1992, Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science* **258**(5083):818-21.

142. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., and Pinkel, D., 1994, Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors, *Genes Chromosomes Cancer* **10**(4):231-43.
143. Karhu, R., Kahkonen, M., Kuukasjarvi, T., Pennanen, S., Tirkkonen, M., and Kallioniemi, O., 1997, Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization, *Cytometry* **28**(3):198-205.
144. Katagiri, S., Yonezawa, T., Kuyama, J., Kanayama, Y., Nishida, K., Abe, T., Tamaki, T., Ohnishi, M., and Tarui, S., 1985, Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma, *Int J Cancer* **36**(2):241-6.
145. Kauraniemi, P., Barlund, M., Monni, O., and Kallioniemi, A., 2001, New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays, *Cancer Res* **61**(22):8235-40.
146. Keats, J. J., Reiman, T., Maxwell, C. A., Taylor, B. J., Larratt, L. M., Mant, M. J., Belch, A. R., and Pilarski, L. M., 2003, In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression, *Blood* **101**(4):1520-9.
147. Kirchhoff, M., Gerdes, T., Maahr, J., Rose, H., Bentz, M., Dohner, H., and Lundsteen, C., 1999a, Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals, *Genes Chromosomes Cancer* **25**(4):410-3.
148. Kirchhoff, M., Gerdes, T., Rose, H., Maahr, J., Ottesen, A. M., and Lundsteen, C., 1998, Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals, *Cytometry* **31**(3):163-73.
149. Kirchhoff, M., Rose, H., and Lundsteen, C., 2001, High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics, *J Med Genet* **38**(11):740-4.
150. Kirchhoff, M., Rose, H., Petersen, B. L., Maahr, J., Gerdes, T., Lundsteen, C., Bryndorf, T., Kryger-Baggesen, N., Christensen, L., Engelholm, S. A., and Philip, J., 1999b, Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma, *Genes Chromosomes Cancer* **24**(2):144-50.
151. Klein, B., Tarte, K., Jourdan, M., Mathouk, K., Moreaux, J., Jourdan, E., Legouffe, E., De Vos, J., and Rossi, J. F., 2003, Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells, *Int J Hematol* **78**(2):106-13.
152. Knudson, A. G., 2002, Cancer genetics, *Am J Med Genet* **111**(1):96-102.
153. Kops, G. J., Weaver, B. A., and Cleveland, D. W., 2005, On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint, *Nat Rev Cancer* **5**(10):773-85.
154. Kuehl, W. M., and Bergsagel, P. L., 2002, Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer* **2**(3):175-87.
155. Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M., and Greipp, P. R., 2003, Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma, *Mayo Clin Proc* **78**(1):21-33.
156. Kyle, R. A., and Rajkumar, S. V., 1999, Monoclonal gammopathies of undetermined significance, *Hematol Oncol Clin North Am* **13**(6):1181-202.
157. Kyle, R. A., and Rajkumar, S. V., 2002, Monoclonal gammopathies of undetermined significance, *Rev Clin Exp Hematol* **6**(3):225-52.
158. Kyle, R. A., and Rajkumar, S. V., 2004, Multiple myeloma, *N Engl J Med* **351**(18):1860-73.
159. Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., and Melton, L. J., 3rd, 2004, Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades, *Cancer* **101**(11):2667-74.
160. Lai, J. L., Zandacki, M., Mary, J. Y., Bernardi, F., Izydorczyk, V., Flactif, M., Morel, P., Jouet, J. P., Bauters, F., and Facon, T., 1995, Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis, *Blood* **85**(9):2490-7.
161. Landgren, O., Gridley, G., Turesson, I., Caporaso, N. E., Goldin, L. R., Baris, D., Fears, T. R., Hoover, R. N., and Linet, M. S., 2006, Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States, *Blood* **107**(3):904-6.

162. Largo, C., Alvarez, S., Saez, B., Blesa, D., Martin-Subero, J. I., Gonzalez-Garcia, I., Brieva, J. A., Dopazo, J., Siebert, R., Calasanz, M. J., and Cigudosa, J. C., 2006, Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma, *Haematologica* **91**(2):184-91.
163. Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmenjaud, E., Sotto, J. J., and Callanan, M., 2001, Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma, *Genes Chromosomes Cancer* **32**(3):250-64.
164. Levy, V., Katsahian, S., Femand, J. P., Mary, J. Y., and Chevret, S., 2005, A meta-analysis on data from 575 patients with multiple myeloma randomly assigned to either high-dose therapy or conventional therapy, *Medicine (Baltimore)* **84**(4):250-60.
165. Lewis, D. R., Pottern, L. M., Brown, L. M., Silverman, D. T., Hayes, R. B., Schoenberg, J. B., Greenberg, R. S., Swanson, G. M., Schwartz, A. G., Liff, J. M., and et al., 1994, Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation, *Cancer Causes Control* **5**(6):529-39.
166. Liebisch, P., Viardot, A., Bassermann, N., Wendl, C., Roth, K., Goldschmidt, H., Einsele, H., Straka, C., Stilgenbauer, S., Dohner, H., and Bentz, M., 2003, Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma, *Br J Haematol* **122**(2):193-201.
167. Linet, M. S., Harlow, S. D., and McLaughlin, J. K., 1987, A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use, *Cancer Res* **47**(11):2978-81.
168. Liston, P., Fong, W. G., and Korneluk, R. G., 2003, The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2, *Oncogene* **22**(53):8568-80.
169. Liu, P., Leong, T., Quam, L., Billadeau, D., Kay, N. E., Greipp, P., Kyle, R. A., Oken, M. M., and Van Ness, B., 1996, 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* **88**(7):2699-706.
170. Liu, Y., Hermanson, M., Grander, D., Merup, M., Wu, X., Heyman, M., Rasool, O., Juliusson, G., Gahrton, G., Detlofsson, R., Nikiforova, N., Buys, C., Soderhall, S., Yankovsky, N., Zabarovsky, E., and Einhorn, S., 1995, 13q deletions in lymphoid malignancies, *Blood* **86**(5):1911-5.
171. Magrangeas, F., Cormier, M. L., Descamps, G., Gouy, N., Lode, L., Mellerin, M. P., Harousseau, J. L., Bataille, R., Minvielle, S., and Avet-Loiseau, H., 2004, Light-chain only multiple myeloma is due to the absence of functional (productive) rearrangement of the IgH gene at the DNA level, *Blood* **103**(10):3869-75.
172. Margalit, O., Somech, R., Amariglio, N., and Rechavi, G., 2005, Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications, *Blood Rev* **19**(4):223-34.
173. Martin-Subero, J. I., Harder, L., Gesk, S., Schlegelberger, B., Grote, W., Martinez-Climent, J. A., Dyer, M. J., Novo, F. J., Calasanz, M. J., and Siebert, R., 2002, Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci, *Int J Cancer* **98**(3):470-4.
174. Martin-Subero, J. I., Odero, M. D., Hernandez, R., Cigudosa, J. C., Agirre, X., Saez, B., Sanz-Garcia, E., Ardanaz, M. T., Novo, F. J., Gascoyne, R. D., Calasanz, M. J., and Siebert, R., 2005, Amplification of IGH/MYC fusion in clinically aggressive IGH/BCL2-positive germinal center B-cell lymphomas, *Genes Chromosomes Cancer* **43**(4):414-23.
175. Mateo, G., Castellanos, M., Rasillo, A., Gutierrez, N. C., Montalban, M. A., Martin, M. L., Hernandez, J. M., Lopez-Berges, M. C., Montejano, L., Blade, J., Mateos, M. V., Sureda, A., de la Rubia, J., Diaz-Mediavilla, J., Pandiella, A., Lahuerta, J. J., Orfao, A., and San Miguel, J. F., 2005, Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma, *Clin Cancer Res* **11**(10):3661-7.
176. Matsui, W., Huff, C. A., Wang, Q., Malehorn, M. T., Barber, J., Tanhehco, Y., Smith, B. D., Civin, C. I., and Jones, R. J., 2004, Characterization of clonogenic multiple myeloma cells, *Blood* **103**(6):2332-6.
177. Mattioli, M., Agnelli, L., Fabris, S., Baldini, L., Morabito, F., Bicciato, S., Verdelli, D., Intini, D., Nobili, L., Cro, L., Pruneri, G., Callea, V., Stelitano, C., Maiolo, A. T., Lombardi, L., and Neri, A.,

- 2005, Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma, *Oncogene* **24**(15):2461-73.
178. McDonald, H. L., Gascoyne, R. D., Horsman, D., and Brown, C. J., 2000, Involvement of the X chromosome in non-Hodgkin lymphoma, *Genes Chromosomes Cancer* **28**(3):246-57.
179. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I., and Brieva, J. A., 2002, The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression, *Blood* **99**(6):2154-61.
180. Merup, M., Jansson, M., Corcoran, M., Liu, Y., Wu, X., Rasool, O., Stellan, B., Hermansson, M., Juliusson, G., Gahrton, G., and Einhorn, S., 1998, A FISH cosmid 'cocktail' for detection of 13q deletions in chronic lymphocytic leukaemia--comparison with cytogenetics and Southern hybridization, *Leukemia* **12**(5):705-9.
181. Miguel-Garcia, A., Orero, T., Matutes, E., Carbonell, F., Miguel-Sosa, A., Linares, M., Tarin, F., Herrera, M., Garcia-Talavera, J., and Carbonell-Ramon, F., 1998, bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study, *Haematologica* **83**(4):298-304.
182. Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A., 1990, High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* **11**(2):231-8.
183. Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., and Knuutila, S., 1997, BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma, *Blood* **90**(3):1168-74.
184. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Avet-Loiseau, H., 2002, Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy, *Blood* **100**(5):1579-83.
185. Morgan, G. J., Davies, F. E., and Linet, M., 2002, Myeloma aetiology and epidemiology, *Biomed Pharmacother* **56**(5):223-34.
186. Morgan, J. A., Yin, Y., Borowsky, A. D., Kuo, F., Nourmand, N., Koontz, J. I., Reynolds, C., Soreng, L., Griffin, C. A., Graeme-Cook, F., Harris, N. L., Weisenburger, D., Pinkus, G. S., Fletcher, J. A., and Sklar, J., 1999, Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18, *Cancer Res* **59**(24):6205-13.
187. Myllykangas, S., Himberg, J., Bohling, T., Nagy, B., Hollmen, J., and Knuutila, S., 2006, DNA copy number amplification profiling of human neoplasms, *Oncogene*.
188. Nacheva, E., Fischer, P. E., Sherrington, P. D., Labastide, W., Lawlor, E., Conneally, E., Blaney, C., Hayhoe, F. G., and Karpas, A., 1990, A new human plasma cell line, Karpas 620, with translocations involving chromosomes 1, 11 and 14, *Br J Haematol* **74**(1):70-6.
189. Nilsson, K., 1970, Long term culture of bone-marrow biopsies and peripheral blood leucocytes from patients with multiple myeloma, *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* **78**(4):492-3.
190. Nilsson, T., Hoglund, M., Lenhoff, S., Rylander, L., Turesson, I., Westin, J., Mitelman, F., and Johansson, B., 2003, A pooled analysis of karyotypic patterns, breakpoints and imbalances in 783 cytogenetically abnormal multiple myelomas reveals frequently involved chromosome segments as well as significant age- and sex-related differences, *Br J Haematol* **120**(6):960-9.
191. Nobuyoshi, M., Kawano, M., Tanaka, H., Ishikawa, H., Tanabe, O., Iwato, K., Asaoku, H., Sakai, A., and Kuramoto, A., 1991, Increased expression of the c-myc gene may be related to the aggressive transformation of human myeloma cells, *Br J Haematol* **77**(4):523-8.
192. Nomdedeu, J. F., Lasa, A., Ubeda, J., Saglio, G., Bellido, M., Casas, S., Carnicer, M. J., Aventin, A., Sureda, A., Sierra, J., and Baiget, M., 2002, Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma. A genotypic study, *Haematologica* **87**(8):828-35.
193. Offit, K., and Chaganti, R. S., 1991, Chromosomal aberrations in non-Hodgkin's lymphoma. Biologic and clinical correlations, *Hematol Oncol Clin North Am* **5**(5):853-69.
194. Ong, F., van Nieuwkoop, J. A., de Groot-Swings, G. M., Hermans, J., Harvey, M. S., Kluin, P. M., and Kluin-Nelemans, J. C., 1995, Bcl-2 protein expression is not related to short survival in multiple myeloma, *Leukemia* **9**(7):1282-4.
195. Orfao, A., Garcia-Sanz, R., Lopez-Berges, M. C., Belen Vidriales, M., Gonzalez, M., Caballero, M. D., and San Miguel, J. F., 1994, A new method for the analysis of plasma cell DNA content in

- multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique, *Cytometry* **17**(4):332-9.
196. Palumbo, A. P., Boccadoro, M., Battaglio, S., Corradini, P., Tsihchlis, P. N., Huebner, K., Pileri, A., and Croce, C. M., 1990, Human homologue of Moloney leukemia virus integration-4 locus (MLVI-4), located 20 kilobases 3' of the myc gene, is rearranged in multiple myelomas, *Cancer Res* **50**(20):6478-82.
197. Pegoraro, L., Malavasi, F., Bellone, G., Massaia, M., Boccadoro, M., Saglio, G., Guerrasio, A., Benetton, G., Lombardi, L., Coda, R., and et al., 1989, The human myeloma cell line LP-1: a versatile model in which to study early plasma-cell differentiation and c-myc activation, *Blood* **73**(4):1020-7.
198. Perez-Simon, J. A., Garcia-Sanz, R., Tabernero, M. D., Almeida, J., Gonzalez, M., Fernandez-Calvo, J., Moro, M. J., Hernandez, J. M., San Miguel, J. F., and Orfao, A., 1998, Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes, *Blood* **91**(9):3366-71.
199. Pettersson, M., Jernberg-Wiklund, H., Larsson, L. G., Sundstrom, C., Givol, I., Tsujimoto, Y., and Nilsson, K., 1992, Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells, *Blood* **79**(2):495-502.
200. Phekoo, K. J., Schey, S. A., Richards, M. A., Bevan, D. H., Bell, S., Gillett, D., and Moller, H., 2004, A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK, *Br J Haematol* **127**(3):299-304.
201. Pinkel, D., Segev, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W., and Albertson, D. G., 1998, High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nat Genet* **20**(2):207-11.
202. Plowright, E. E., Li, Z., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Barber, D. L., Branch, D. R., Hawley, R. G., and Stewart, A. K., 2000, Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis, *Blood* **95**(3):992-8.
203. Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., and Brown, P. O., 1999, Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays, *Nat Genet* **23**(1):41-6.
204. Rajewsky, K., 1996, Clonal selection and learning in the antibody system, *Nature* **381**(6585):751-8.
205. Rajkumar, S. V., and Greipp, P. R., 1999, Prognostic factors in multiple myeloma, *Hematol Oncol Clin North Am* **13**(6):1295-314, xi.
206. Rao, P. H., 2005, Comparative genomic hybridization for analysis of changes in DNA copy number in multiple myeloma, *Methods Mol Med* **113**:71-83.
207. Rao, P. H., Cigudosa, J. C., Ning, Y., Calasanz, M. J., Iida, S., Tagawa, S., Michaeli, J., Klein, B., Dalla-Favera, R., Jhanwar, S. C., Ried, T., and Chaganti, R. S., 1998, Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma, *Blood* **92**(5):1743-8.
208. Ray, M. E., Yang, Z. Q., Albertson, D., Kleer, C. G., Washburn, J. G., Macoska, J. A., and Ethier, S. P., 2004, Genomic and expression analysis of the 8p11-12 amplicon in human breast cancer cell lines, *Cancer Res* **64**(1):40-7.
209. Reiter, A., Sohal, J., Kulkarni, S., Chase, A., Macdonald, D. H., Aguiar, R. C., Goncalves, C., Hernandez, J. M., Jennings, B. A., Goldman, J. M., and Cross, N. C., 1998, Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the t(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome, *Blood* **92**(5):1735-42.
210. Richardson, P. G., Mitsiades, C. S., Hideshima, T., and Anderson, K. C., 2005, Novel biological therapies for the treatment of multiple myeloma, *Best Pract Res Clin Haematol* **18**(4):619-34.
211. Richter, J., Wagner, U., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, H., Rist, M., Wilber, K., Anabitarte, M., Hering, F., Hardmeier, T., Schonenberger, A., Flury, R., Jager, P., Fehr, J. L., Schraml, P., Moch, H., Mihatsch, M. J., Gasser, T., Kallioniemi, O. P., and Sauter, G., 2000, High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer, *Am J Pathol* **157**(3):787-94.
212. Ronchetti, D., Finelli, P., Richelda, R., Baldini, L., Rocchi, M., Viggiano, L., Cuneo, A., Bogni, S., Fabris, S., Lombardi, L., Maiolo, A. T., and Neri, A., 1999, Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma, *Blood* **93**(4):1330-7.

213. Rosinol, L., Carrio, A., Blade, J., Queralt, R., Aymerich, M., Cibeira, M. T., Esteve, J., Rozman, M., Campo, E., and Montserrat, E., 2005, Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma, *Br J Haematol* **130**(5):729-32.
214. Ross, F. M., Ibrahim, A. H., Vilain-Holmes, A., Winfield, M. O., Chiecchio, L., Protheroe, R. K., Strike, P., Gunasekera, J. L., Jones, A., Harrison, C. J., Morgan, G. J., and Cross, N. C., 2005, Age has a profound effect on the incidence and significance of chromosome abnormalities in myeloma, *Leukemia* **19**(9):1634-42.
215. Saez, B., Martín-Subero, J., Lahortiga, I., Largo, C., Larrayoz, M., Odero, M., Prosper, F., Cigudosa, J., Siebert, R., and Calasanz, M., 2006a, Simultaneous translocations of FGFR3/MMSET and CCND1 into two different IGH alleles in multiple myeloma: lack of concurrent activation of both proto-oncogenes., *Submitted for publication to: Cancer Genet Cytogenet*.
216. Saez, B., Martín-Subero, J., Odero, M., Prosper, F., Cigudosa, J., Schoch, R., Calasanz, M., and Siebert, R., 2006b, Multicolor interphase cytogenetics for the study of plasma cell dyscrasias., *J Mol Diagn (Submitted)*.
217. Saez, B., Martín-Subero, J. I., Guillen-Grima, F., Odero, M. D., Prosper, F., Cigudosa, J. C., Harder, L., Calasanz, M. J., and Siebert, R., 2004, Chromosomal abnormalities clustering in multiple myeloma reveals cytogenetic subgroups with nonrandom acquisition of chromosomal changes, *Leukemia* **18**(3):654-7.
218. Saez, B., Martín-Subero, J. I., Largo, C., Martín, M. C., Odero, M. D., Prosper, F., Siebert, R., Calasanz, M. J., and Cigudosa, J. C., 2006c, Identification of recurrent chromosomal breakpoints in multiple myeloma with complex karyotypes by combined G-banding, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization analyses, *Cancer Genet Cytogenet* **169**(2):143-9.
219. Saez, B., Martín-Subero, J. I., Odero, M. D., Prosper, F., Hernandez, R., Cigudosa, J. C., Siebert, R., and Calasanz, M. J., 2006d, Interphase FISH for the detection of breakpoints in IG loci and chromosomal changes with adverse prognostic impact in multiple myeloma with normal karyotypes, *Cancer Genet Cytogenet* **167**(2):183-5.
220. San Miguel, J., Blade, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Glasmacher, A., Jagannath, S., Lonial, S., Orłowski, R. Z., Sonneveld, P., and Ludwig, H., 2006, A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma, *Oncologist* **11**(1):51-61.
221. Sanchez-Izquierdo, D., Buchonnet, G., Siebert, R., Gascoyne, R. D., Climent, J., Karran, L., Marin, M., Blesa, D., Horsman, D., Rosenwald, A., Staudt, L. M., Albertson, D. G., Du, M. Q., Ye, H., Marynen, P., Garcia-Conde, J., Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martínez-Climent, J. A., 2003, MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma, *Blood* **101**(11):4539-46.
222. Santarosa, M., and Ashworth, A., 2004, Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way, *Biochim Biophys Acta* **1654**(2):105-22.
223. Santra, M., Zhan, F., Tian, E., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr., 2003, A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript, *Blood* **101**(6):2374-6.
224. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Munshi, N., Desikan, K. R., Singhal, S., Mehta, J., Siegel, D., Shaughnessy, J., and Barlogie, B., 1998a, Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping, *Blood* **92**(11):4269-78.
225. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Thomas, E. L., Swanson, C. M., Goosen, L. S., Sammartino, G., Gilliland, J. C., Munshi, N. C., Tricot, G., Shaughnessy, J. D., Jr., and Barlogie, B., 2001, Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma, *Br J Haematol* **112**(1):167-74.
226. Sawyer, J. R., Tricot, G., Lukacs, J. L., Binz, R. L., Tian, E., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr., 2005, Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q, *Genes Chromosomes Cancer* **42**(1):95-106.
227. Sawyer, J. R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S., and Barlogie, B., 1998b, Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin, *Blood* **91**(5):1732-41.
228. Sawyer, J. R., Waldron, J. A., Jagannath, S., and Barlogie, B., 1995, Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma, *Cancer Genet Cytogenet* **82**(1):41-9.
229. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* **270**(5235):467-70.

- 230.Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., Ning, Y., Ledbetter, D. H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., and Ried, T., 1996, Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes, *Science* **273**(5274):494-7.
- 231.Seidl, S., Kaufmann, H., and Drach, J., 2003, New insights into the pathophysiology of multiple myeloma, *Lancet Oncol* **4**(9):557-64.
- 232.Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S., Akao, Y., Utsumi, K. R., Kubonishi, I., Miyoshi, I., Ohtsuki, T., Yawata, Y., Namba, M., and et al., 1992, Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation, *Oncogene* **7**(7):1401-6.
- 233.Shaughnessy, J., 2005, Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma, *Hematology* **10 Suppl 1**:117-26.
- 234.Shaughnessy, J., Jr., 2003, Primer on medical genomics. Part IX: scientific and clinical applications of DNA microarrays--multiple myeloma as a disease model, *Mayo Clin Proc* **78**(9):1098-109.
- 235.Shaughnessy, J., Jr., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Bergsagel, P. L., and Kuehl, M., 2001, Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma, *Blood* **98**(1):217-23.
- 236.Shaughnessy, J., Jr., Tian, E., Sawyer, J., McCoy, J., Tricot, G., Jacobson, J., Anaissie, E., Zangari, M., Fassas, A., Muwalla, F., Morris, C., and Barlogie, B., 2003, Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II, *Br J Haematol* **120**(1):44-52.
- 237.Shaughnessy, J., Tian, E., Sawyer, J., Bumm, K., Landes, R., Badros, A., Morris, C., Tricot, G., Epstein, J., and Barlogie, B., 2000, High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH, *Blood* **96**(4):1505-11.
- 238.Shou, Y., Martelli, M. L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L. A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I. R., Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M., 2000, Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1):228-33.
- 239.Smadja, N. V., Fruchart, C., Isnard, F., Louvet, C., Dutel, J. L., Cheron, N., Grange, M. J., Monconduit, M., and Bastard, C., 1998, Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases, *Leukemia* **12**(6):960-9.
- 240.Smadja, N. V., Leroux, D., Soulier, J., Dumont, S., Arnould, C., Taviaux, S., Taillemite, J. L., and Bastard, C., 2003, Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases, *Genes Chromosomes Cancer* **38**(3):234-9.
- 241.Smith, T. R., Levine, E. A., Perrier, N. D., Miller, M. S., Freimanis, R. I., Lohman, K., Case, L. D., Xu, J., Mohrenweiser, H. W., and Hu, J. J., 2003, DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(11 Pt 1):1200-4.
- 242.Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., and Lichter, P., 1997, Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances, *Genes Chromosomes Cancer* **20**(4):399-407.
- 243.Specht, K., Haralambieva, E., Bink, K., Kremer, M., Mandl-Weber, S., Koch, I., Tomer, R., Hofler, H., Schuurig, E., Kluin, P. M., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L., 2004, Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels, *Blood* **104**(4):1120-6.
- 244.Steinberg, S. J., Dodt, G., Raymond, G. V., Braverman, N. E., Moser, A. B., and Moser, H. W., 2006, Peroxisome biogenesis disorders, *Biochim Biophys Acta*.
- 245.Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccarini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., Del Sal, G., Levrero, M., and Blandino, G., 2005, The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage, *Mol Cell* **18**(4):447-59.
- 246.Streubel, B., Lamprecht, A., Dierlamm, J., Cerroni, L., Stolte, M., Ott, G., Raderer, M., and Chott, A., 2003, T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma, *Blood* **101**(6):2335-9.
- 247.Tabernero, D., San Miguel, J. F., Garcia-Sanz, M., Najera, L., Garcia-Isidoro, M., Perez-Simon, J. A., Gonzalez, M., Wiegant, J., Raap, A. K., and Orfao, A., 1996, Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes, *Am J Pathol* **149**(1):153-61.

248. Taborelli, M., Tibiletti, M. G., Martin, V., Pozzi, B., Bertoni, F., and Capella, C., 2006, Chromosome band 6q deletion pattern in malignant lymphomas, *Cancer Genet Cytogenet* **165**(2):106-13.
249. Tarte, K., De Vos, J., Thykjaer, T., Zhan, F., Fiol, G., Costes, V., Reme, T., Legouffe, E., Rossi, J. F., Shaughnessy, J., Jr., Orntoft, T. F., and Klein, B., 2002, Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts, *Blood* **100**(4):1113-22.
250. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997, A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, *Blood* **89**(11):3909-18.
251. Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1996, Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers, *Nat Genet* **13**(3):343-6.
252. Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J. D., Jr., 2003, The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma, *N Engl J Med* **349**(26):2483-94.
253. Tonegawa, S., 1983, Somatic generation of antibody diversity, *Nature* **302**(5909):575-81.
254. Tricot, G., Barlogie, B., Jagannath, S., Bracy, D., Mattox, S., Vesole, D. H., Naucke, S., and Sawyer, J. R., 1995, Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities, *Blood* **86**(11):4250-6.
255. Tricot, G., Sawyer, J. R., Jagannath, S., Desikan, K. R., Siegel, D., Naucke, S., Mattox, S., Bracy, D., Munshi, N., and Barlogie, B., 1997, Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants, *J Clin Oncol* **15**(7):2659-66.
256. Troussard, X., Avet-Loiseau, H., Macro, M., Mellerin, M. P., Malet, M., Roussel, M., and Sola, B., 2000, Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma, *Hematol J* **1**(3):181-5.
257. Urashima, M., Ogata, A., Chauhan, D., Vidriales, M. B., Teoh, G., Hoshi, Y., Schlossman, R. L., DeCaprio, J. A., and Anderson, K. C., 1996, Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein, *Blood* **88**(6):2219-27.
258. van Baren, N., Chambost, H., Ferrant, A., Michaux, L., Ikeda, H., Millard, I., Olive, D., Boon, T., and Coulie, P. G., 1998, PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells, *Br J Haematol* **102**(5):1376-9.
259. Van Camp, B., Durie, B., Spier, C., De Waele, M., Van Riet, I., Vela, E., Frutiger, Y., Richter, L., and Grogan, T., 1990, Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19), *Blood* **76**:377-382.
260. van Everdink, W. J., Baranova, A., Lummen, C., Tyazhelova, T., Looman, M. W., Ivanov, D., Verlind, E., Pestova, A., Faber, H., van der Veen, A. Y., Yankovsky, N., Vellenga, E., and Buys, C. H., 2003, RFP2, c13ORF1, and FAM10A4 are the most likely tumor suppressor gene candidates for B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Genet Cytogenet* **146**(1):48-57.
261. Vaquerizas, J. M., Conde, L., Yankilevich, P., Cabezon, A., Minguez, P., Diaz-Uriarte, R., Al-Shahrour, F., Herrero, J., and Dopazo, J., 2005, GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data, *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue):W616-20.
262. Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med* **10**(8):789-99.
263. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J., 2000, Surfing the p53 network, *Nature* **408**(6810):307-10.
264. Walker, B. A., Leone, P. E., Jenner, M. W., Li, C., Gonzalez, D., Johnson, D. C., Ross, F. M., Davies, F. E., and Morgan, G. J., 2006, Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma, *Blood* **108**(5):1733-43.
265. Wang, X. S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T. H., Lichenstein, H., Zukowski, M., and Yao, Z., 1996, Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase, *J Biol Chem* **271**(49):31607-11.

266. Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clement, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., and Dore, J. M., 1996, A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1, *Br J Haematol* **94**(2):318-23.
267. Xiao, S., Nalabolu, S. R., Aster, J. C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E. S., Stone, R., Weissman, S. M., Hudson, T. J., and Fletcher, J. A., 1998, FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome, *Nat Genet* **18**(1):84-7.
268. Zhan, F., Hardin, J., Kordsmeier, B., Bumm, K., Zheng, M., Tian, E., Sanderson, R., Yang, Y., Wilson, C., Zangari, M., Anaissie, E., Morris, C., Muwalla, F., van Rhee, F., Fassas, A., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr., 2002, Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells, *Blood* **99**(5):1745-57.
269. Zhan, F., Tian, E., Bumm, K., Smith, R., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr., 2003, Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development, *Blood* **101**(3):1128-40.
270. Zhang, C., Xu, Y., Gu, J., and Schlossman, S. F., 1998, A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11):6290-5.
271. Zojer, N., Konigsberg, R., Ackermann, J., Fritz, E., Dallinger, S., Kromer, E., Kaufmann, H., Riedl, L., Gisslinger, H., Schreiber, S., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H., and Drach, J., 2000, Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization, *Blood* **95**(6):1925-30.

Tabla A1. 166 genes expresados diferencialmente entre los grupos TC.

Gen	Descripción
ACTR1A	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, contractin alpha (yeast)
ANXA6	Annexin A6
AP3M1	Adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit
AP3S1	Adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase
ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1
ARHG	Ras homolog gene family, member G (rho G)
ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
BIN3	Bridging integrator 3
CCND1	Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)
CCNH	Cyclin H
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
COX15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
CYC1	Cytochrome c-1
DJ465N24.2.1	NPD014 protein
DKFZP564G092	Hect domain and RLD 4
DKFZP586J1624	Nasal embryonic LHRH factor
DKFZP586K0524	Zinc finger, DHHC domain containing 5
EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa
EIF3S1	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 alpha, 35kDa
EIF3S9	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa
EIF4G3	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
FHL1	Four and a half LIM domains 1
FLJ10120	Hypothetical LOC388397
FLJ10315	Hypothetical protein FLJ10315
FLJ11259	Hypothetical protein FLJ11259
FLJ13052	NAD kinase
FLJ13154	Hypothetical protein FLJ13154
FLJ21032	-
FLJ21916	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2
FLJ22167	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5
GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
GTF2B	General transcription factor IIB
GYG2	Glycogenin 2
GYS1	Glycogen synthase 1 (muscle)
HM74	G protein-coupled receptor 109B
Hs.105096	Transcribed locus, strongly similar to XP_528497.1
Hs.121575	Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)
Hs.132706	Fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)
Hs.170226	Chromosome 9 open reading frame 91

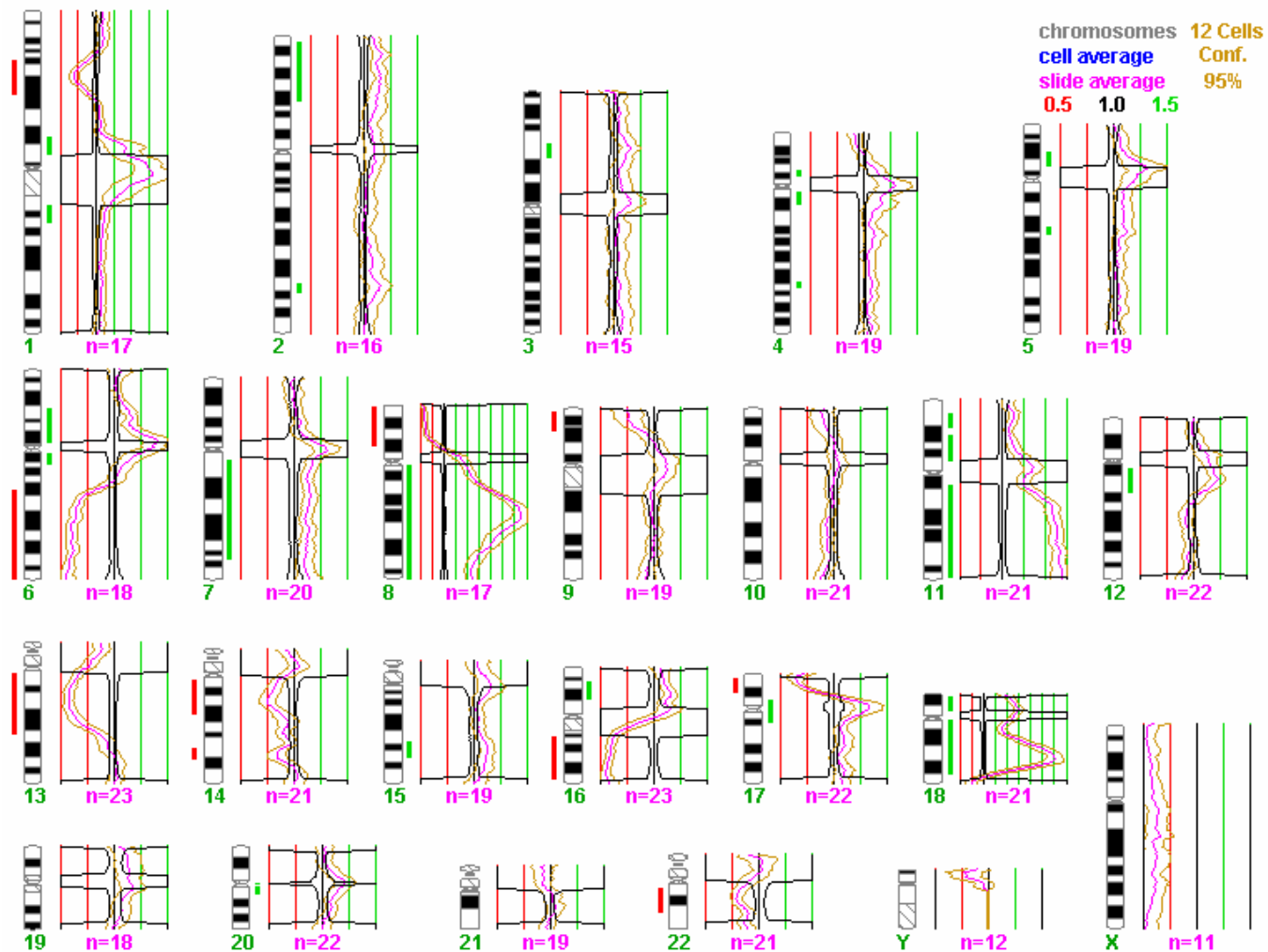
Hs.181174	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1
Hs.19414	Family with sequence similarity 14, member B
Hs.269828	H2A histone family, member Y
Hs.275245	Hypothetical protein FLJ13220
Hs.349111	Malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase, mitochondrial
Hs.349111	Malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase, mitochondrial
Hs.355651	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa
Hs.355952	Hypothetical protein LOC150223
Hs.41974	Fanconi anemia, complementation group C
Hs.44653	Zinc finger, DHHC domain containing 21
Hs.7307	Hypothetical protein BC012173
Hs.90037	Protein kinase C, gamma
Hs.9691	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
HSA243666	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative)
HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4
HSPC195	CXXC finger 5
HSPC213	-
HSPCA	Potassium channel tetramerisation domain containing 1
ICAM5	Intercellular adhesion molecule 5, telencephalin
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
IMAGE_115409	Ribosomal protein L4
IMAGE_122077	Putative membrane protein
IMAGE_130100	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
IMAGE_139226	Transcribed locus
IMAGE_231262	Transcribed locus
IMAGE_254058	Transcribed locus
IMAGE_264820	Transcribed locus
IMAGE_2781676	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
IMAGE_345158	Proline dehydrogenase (oxidase) 1
IMAGE_46231	Contactin 5
IMAGE_47647	Hypothetical protein FLJ20397
IMAGE_562927	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
IMAGE_788574	-
IMAGE_809815	-
IMAGE_83458	Aldo-keto reductase family 1, member D1 (delta 4-3-ketosteroid-5-beta-reductase)
KIAA0062	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
KIAA0132	Kelch-like ECH-associated protein 1
KIAA0438	Praja 2, RING-H2 motif containing
KIAA0769	FCH and double SH3 domains 2
KIAA0911	Calsyntenin 1
KIAA1089	Est1p-like protein B
KIAA1194	Carbon catabolite repression 4 protein
KIAA1332	F-box protein 42
LOC51102	Nuclear receptor binding factor 1
LOC51290	Male sterility domain containing 1
LOC51611	CGI-30 protein
LOC51629	CGI-69 protein
LOC56990	Full length insert cDNA YU10E03
MAD4	MAX dimerization protein 4

MAP2K5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5
MAPRE1	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
MGC16824	Esophageal cancer associated protein
MGC2574	Hypothetical protein MGC2574
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)
MMP24	Hypothetical LOC400843
MRPL16	Mitochondrial ribosomal protein L16
MRPS12	Mitochondrial ribosomal protein S12
MRPS16	Mitochondrial ribosomal protein S16
MRPS27	Mitochondrial ribosomal protein S27
MSH5	MutS homolog 5 (E. coli)
MTM1	Myotubularin 1
MTVR	Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 1
MUS81	MUS81 endonuclease homolog (yeast)
NAALADASEL	Sac3 homology domain 1 (S. cerevisiae)
NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2
OVOL1	Ovo-like 1(Drosophila)
PAIP2	Poly(A) binding protein interacting protein 2
PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)
PEPD	Peptidase D
PEX14	Peroxisomal biogenesis factor 14
PFTK1	PFTAIRE protein kinase 1
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)
PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1
PLAGL2	Pleiomorphic adenoma gene-like 2
POU2F1	POU domain, class 2, transcription factor 1
POU2F2	POU domain, class 2, transcription factor 2
POU4F1	POU domain, class 4, transcription factor 1
PPP1R7	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
PRKCSH	Protein kinase C substrate 80K-H
PSMD13	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R
QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family
RAP2B	Ras family small GTP binding protein
RBX1	Ring-box 1
RING1	Ring finger protein 1
RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
RNF14	Ring finger protein 14
RPE	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase
RYK	RYK receptor-like tyrosine kinase
SCAP2	Src family associated phosphoprotein 2
SF1	Splicing factor 1
SF3B2	Splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa
SFRS11	Splicing factor, arginine/serine-rich 11
SGNE1	secretory granule, neuroendocrine protein 1

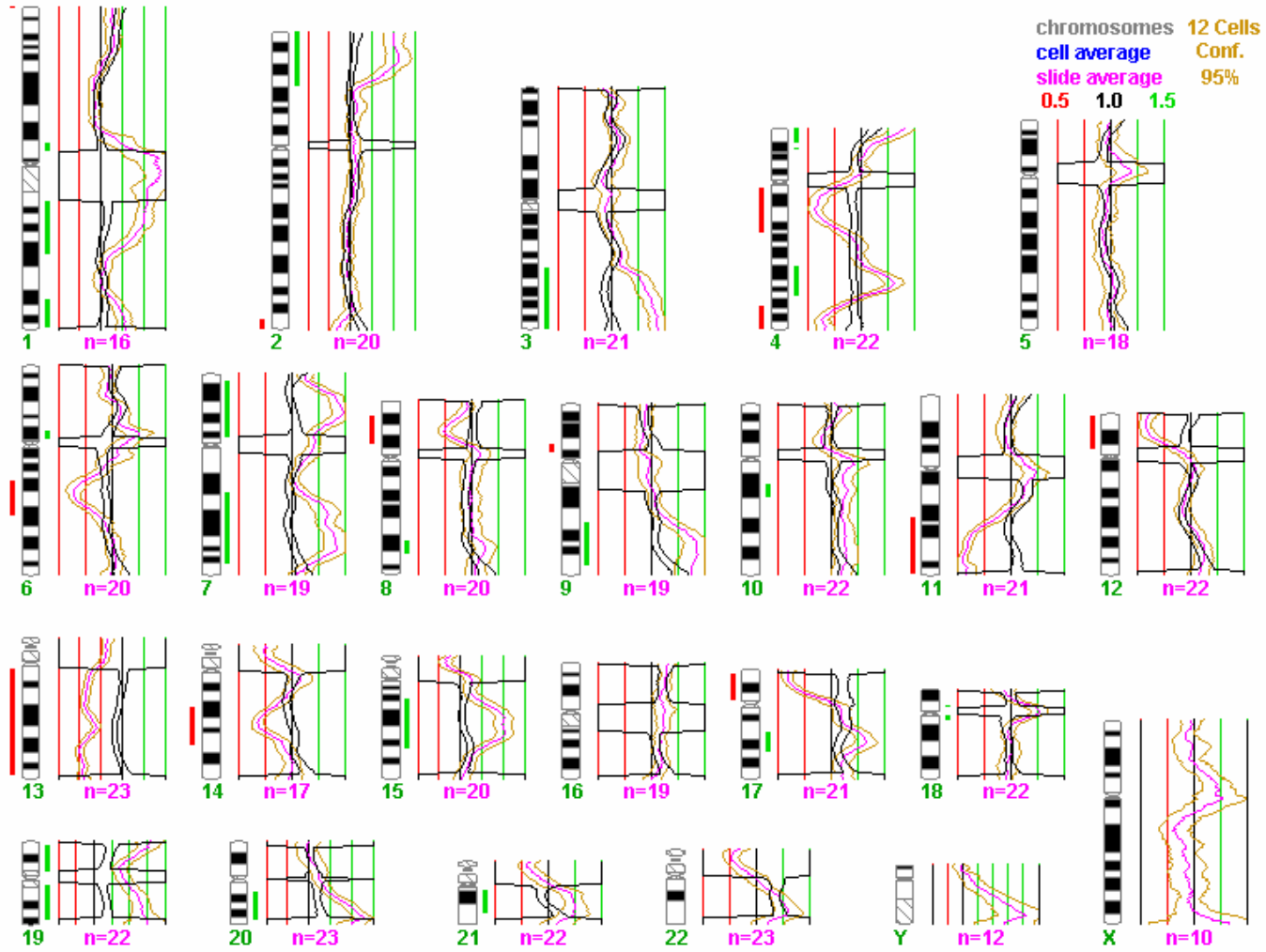
SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
SLC9A6	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 6
SMARCC2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
SNX1	Sorting nexin 1
SP192	Hypothetical protein SP192
SPA17	Sperm autoantigenic protein 17
SPEC1	CDC42 small effector 1
STX5A	Syntaxin 5A
SUPT3H	Suppressor of Ty 3 homolog (S. cerevisiae)
TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 protein a isoform 3
TLN1	Talin 1
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5
TRIP3	thyroid hormone receptor interactor 3
TUBG1	Tubulin, gamma 1
UBN1	Ubinuclein 1
UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
UMPK	Uridine-cytidine kinase 2
VATI	Vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1
WFS1	Wolfram syndrome 1 (wolframin)
ZNF142	Zinc finger protein 142 (clone pHZ-49)
ZNF265	Zinc finger protein 265

Figura AI : perfiles de CGH convencional de la líneas elulares de MM

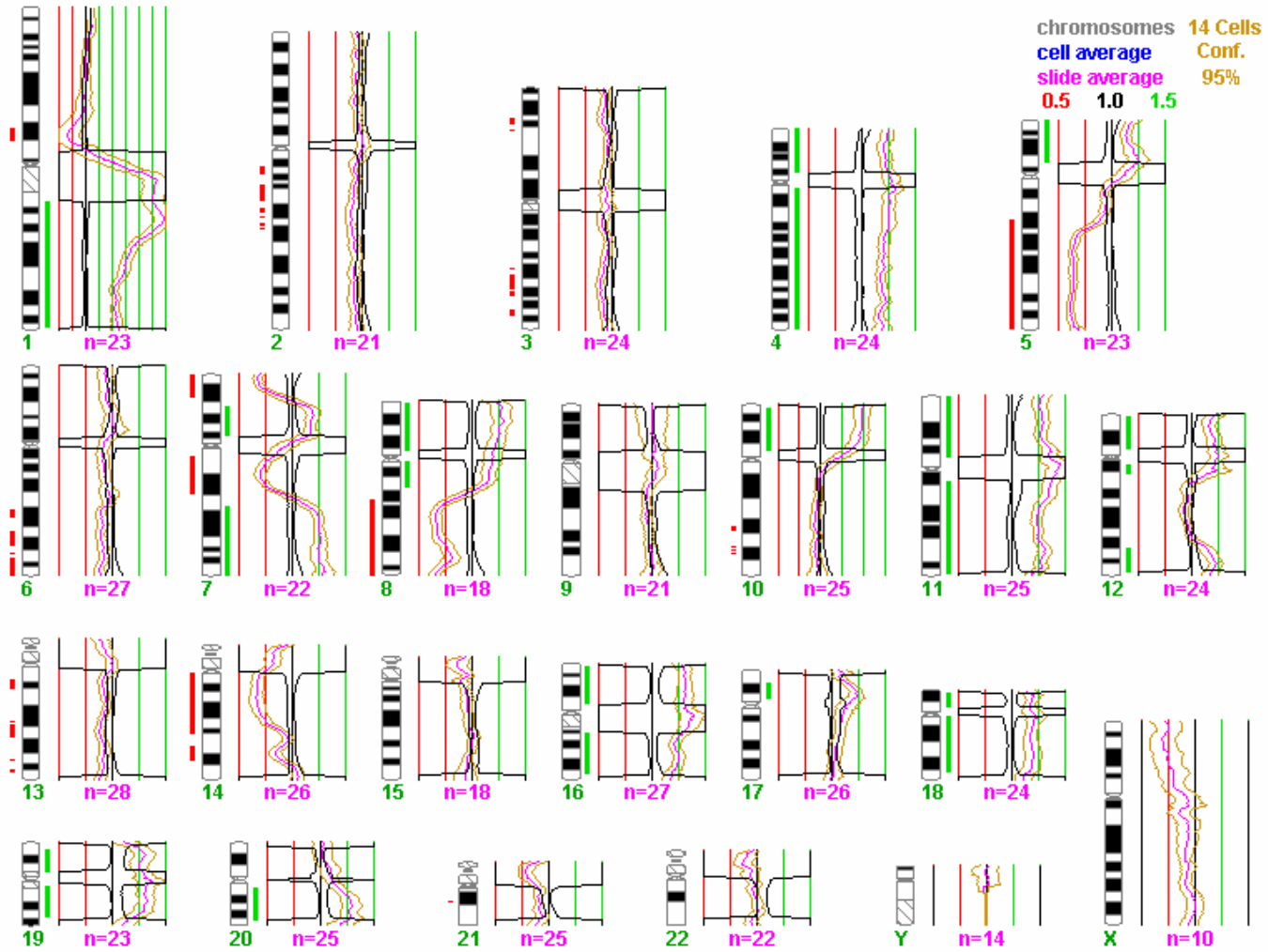
SK-MM-2



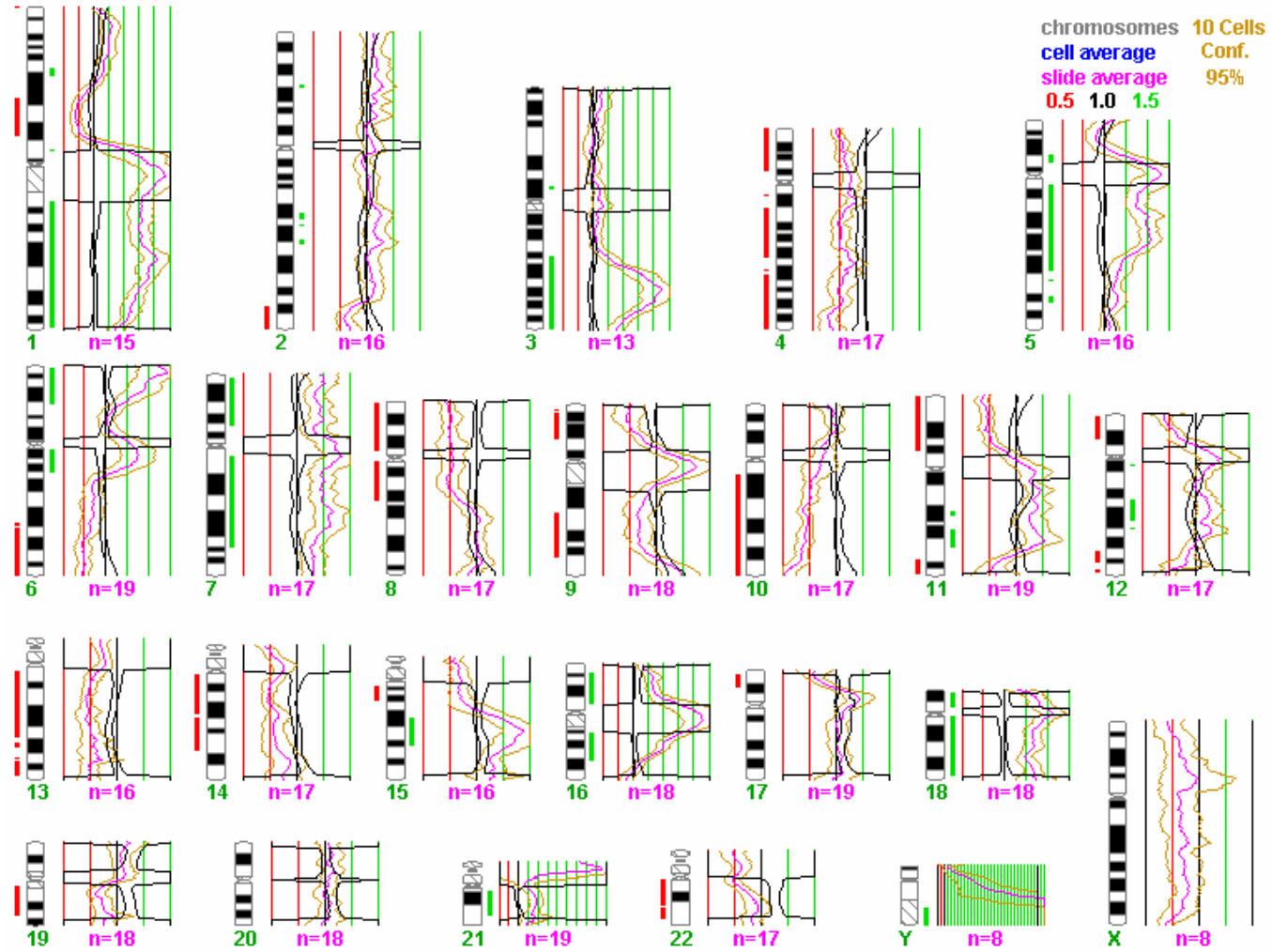
U266



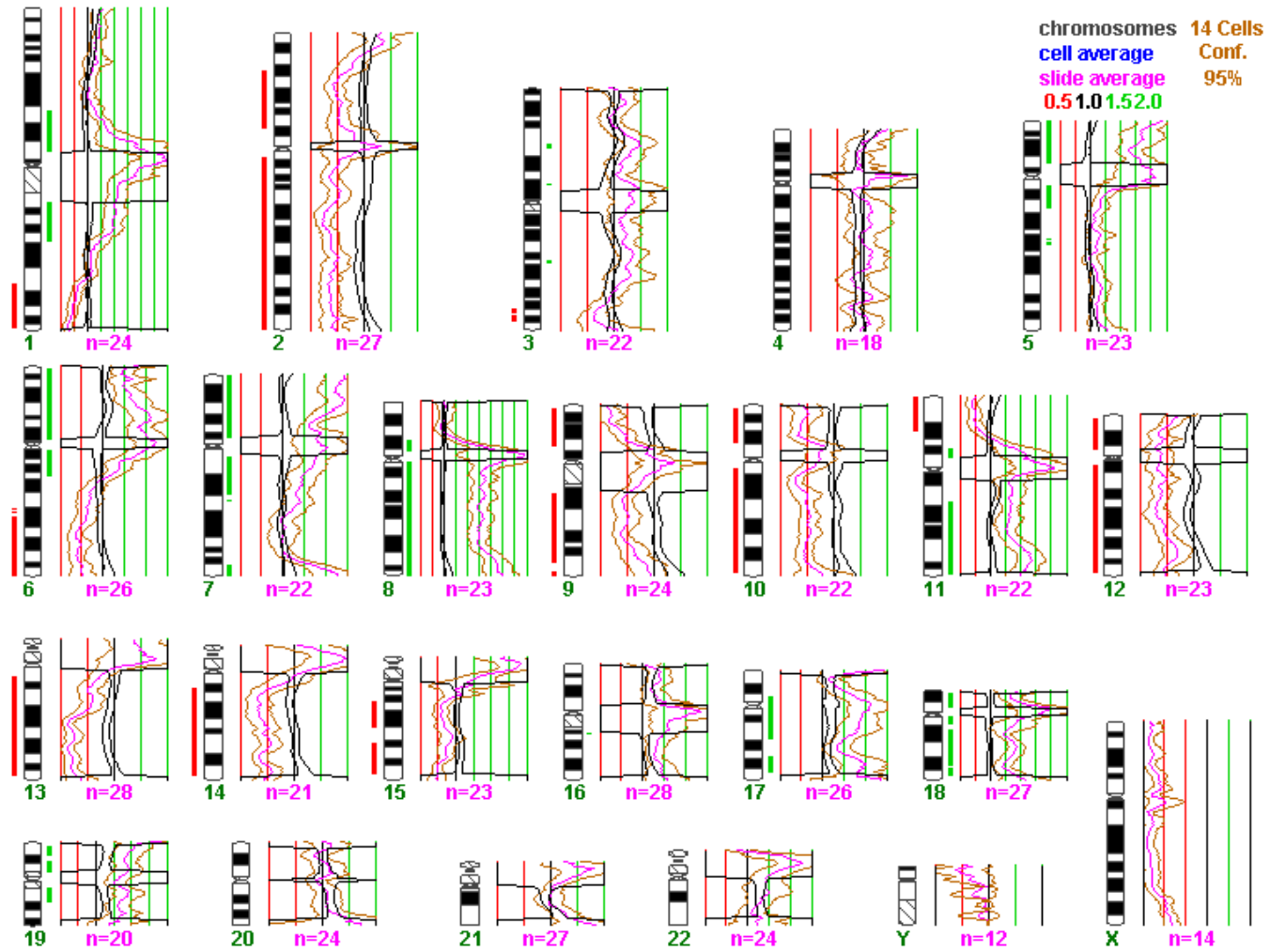
OPM-2



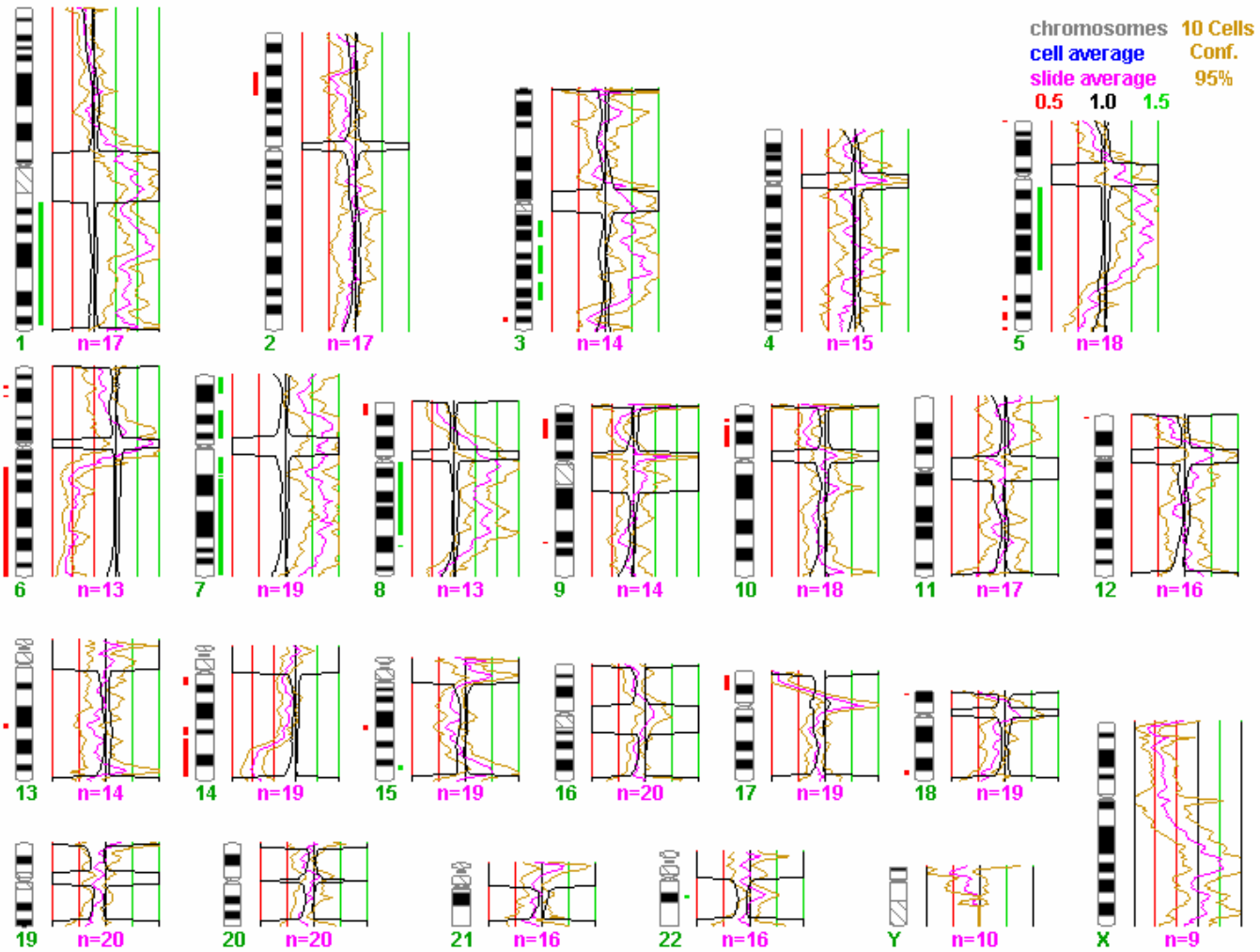
RPMI-8226



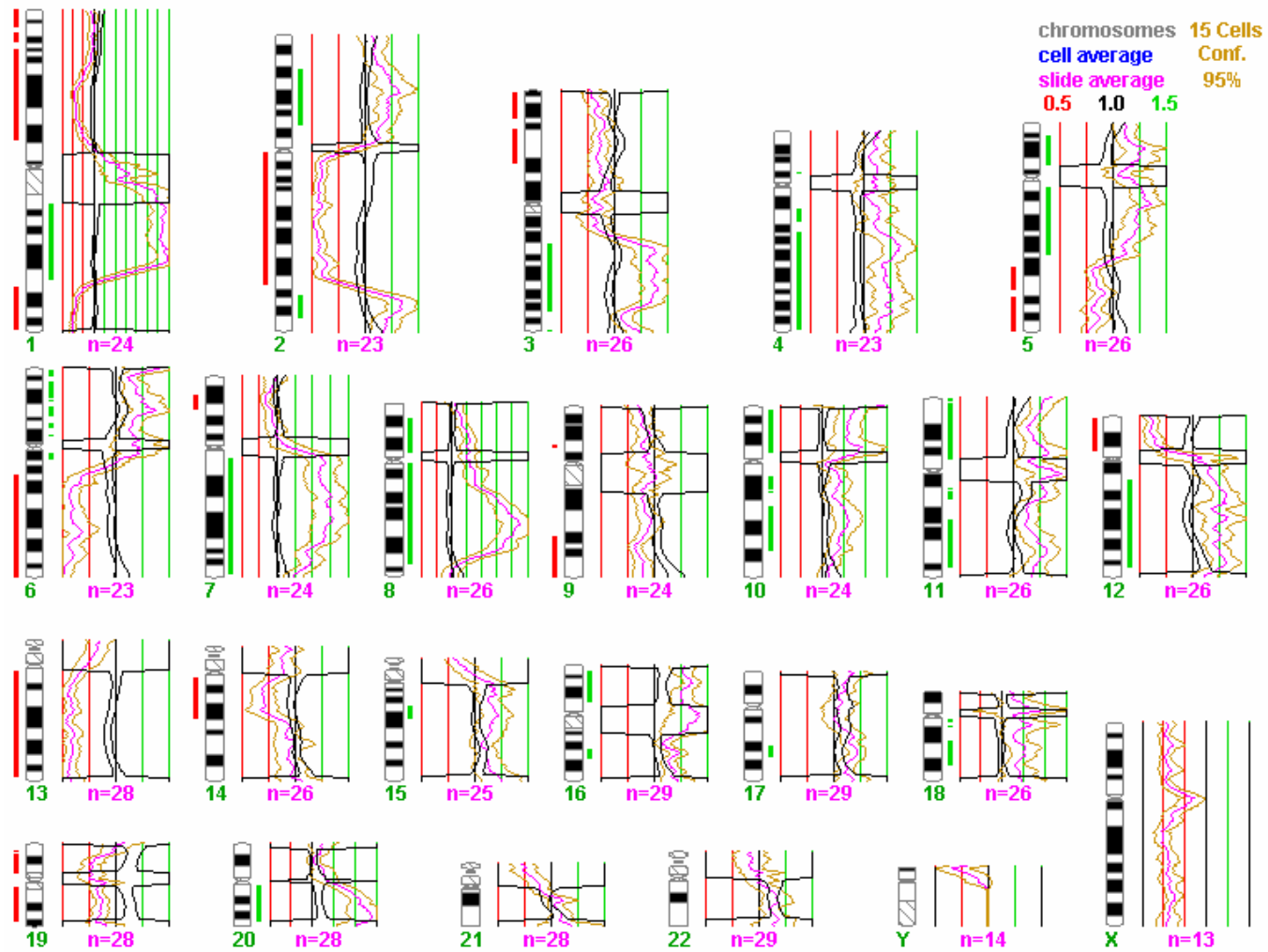
JJN-3



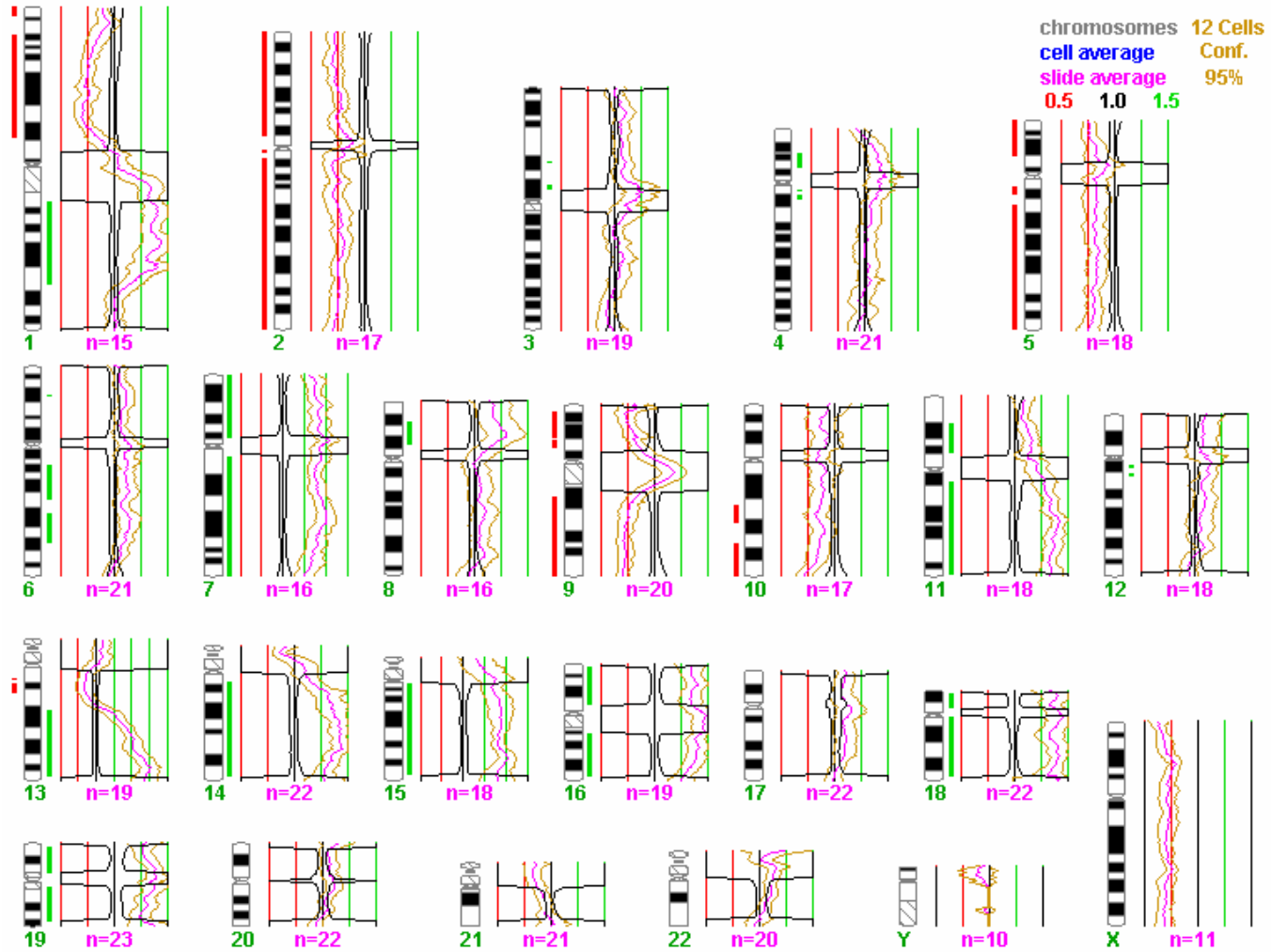
L363



LP-1



KARPAS-620



NCI-H929

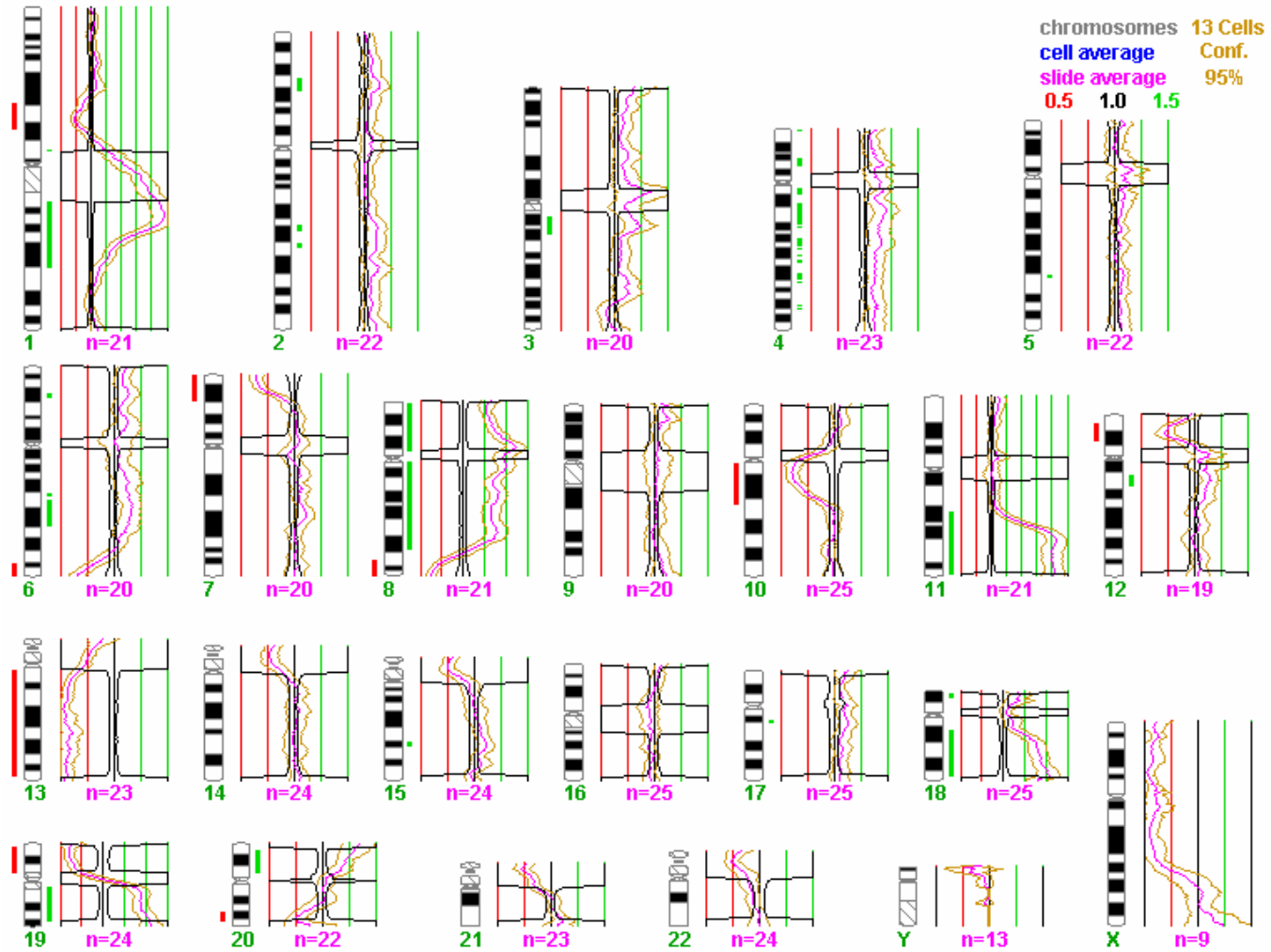


Tabla A2: Genes perdidos (aCGH ratio <0.82) y reprimidos (ratio <0.5) en al menos dos líneas celulares

Gen	Descripción	Citobanda	Inicio (bp)	% cls con represión	
				del ¹	no del ²
<i>LAMA4</i>	Laminin, alpha 4	6q21	112452940	3/3(100%)	5/6(83%)
<i>EST</i>	IMAGE:787893	6q11.1-q22.33	126154742	3/3(100%)	2/6(33%)
<i>PTPRK</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	6q22.2-23.1	128137049	2/2(100%)	5/7(71%)
<i>EST</i>	IMAGE:83363	6q24-q25	149966229	2/4(50%)	1/5(20%)
<i>TFB1M</i>	Transcription factor B1, mitochondrial	6q25	155364602	2/2(100%)	0/7(0%)
<i>SNX9</i>	Sorting nexin 9	6q25.1-q26	158117853	2/2(100%)	2/7(29%)
<i>QKI</i>	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	6q26-27	163709237	2/2(100%)	1/7(14%)
<i>EPB41LAB</i>	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	9q22.1-q22.3	103666429	2/2(100%)	1/7(14%)
<i>PTPN3</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	9q31	103870153	4/4(100%)	2/5(40%)
<i>EST</i>	IMAGE:214990	9q33	115708680	2/2(100%)	3/7(43%)
<i>STOM</i>	Stomatin	9q34.1	115747912	2/2(100%)	2/7(29%)
<i>ENG</i>	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	9q33-q34.1	122223825	4/5(80%)	2/4(50%)
<i>GLE1L</i>	GLE1 RNA export mediator-like (yeast)	9q34.13	122913538	2/4(50%)	3/5(60%)
<i>FREQ</i>	Frequenin homolog (Drosophila)	9q34	124581385	2/4(50%)	2/5(40%)
<i>ASS</i>	Argininosuccinate synthetase	9q34.1	124866844	2/4(50%)	3/5(60%)
<i>FLJ25952</i>	Zinc finger, DHHC-type containing 20	13q12.11	15926716	2/3(67%)	3/6(50%)
<i>USP12</i>	Ubiquitin specific protease 12	13q12.13	21620292	5/5(100%)	3/4(75%)
<i>UBL3</i>	Ubiquitin-like 3	13q12-q13	24318544	2/2(100%)	3/7(43%)
<i>HSPH1</i>	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	13q12.3	25697386	3/3(100%)	2/6(33%)
<i>TSC22D1</i>	TSC22 domain family, member 1	13q14	38994144	6/6(100%)	2/3(66%)
<i>P2RY5</i>	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	13q14	42972925	3/4(75%)	4/5(80%)
<i>PCDH8</i>	Protocadherin 8	13q14.3-q21.1	47413024	2/3(67%)	0/6(0%)
<i>C13orf7</i>	Chromosome 13 open reading frame 7	13q22.2	73183344	3/3(100%)	1/6(17%)
<i>RANBP5</i>	RAN binding protein 5	13q32.3	92993545	2/2(100%)	2/7(29%)
<i>EST</i>	IMAGE:415698	14q31	82216394	2/3(67%)	0/6(0%)
<i>SERPINA6</i>	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6	14q32.1	88587290	2/2(100%)	4/7(57%)
<i>EST</i>	IMAGE:294578	14q32.1	88661424	3/3(100%)	5/6(83%)
<i>SERPINA4</i>	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4	14q31-q32.1	88844496	4/4(100%)	2/6(33%)
<i>EIF5</i>	Eukaryotic translation initiation factor 5	14q32.33	97615925	2/3(67%)	1/6(17%)

Figura A2: Representación gráfica de los resultados de la herramienta FatiGO.

Introducimos el listado de genes perdidos y reprimidos para buscar los términos GO más frecuentes

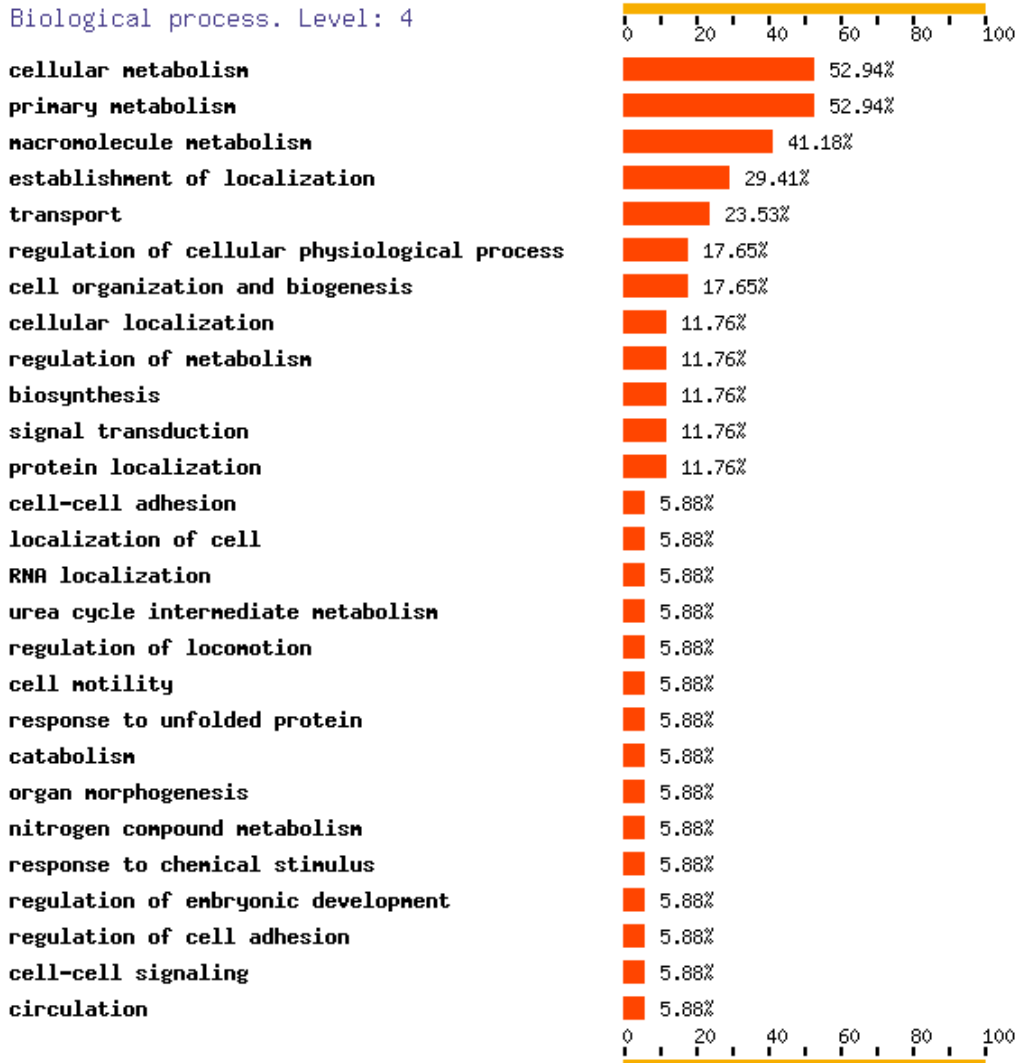


Tabla A3: CNV de cada uno de los casos.

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (MB)	OBS
1	del	8p	8	181530	47062121	46.880591	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
2	del	11q21	11	88625768	93112179	4.486411	
	del	11q22.1	11	97267361	105235831	7.96847	del-hom
	del	11q23.1	11	107390044	108214469	0.824425	
	del	14q13.2-q21.3	14	30209271	47317645	17.108374	
	del	16p11	16	31601229	31835555	0.234326	
	del	16p13.2	16	3646249	5996067	2.349818	
	del	1p12-p21.1	1	103799708	118390307	14.590599	
	del	1p31.3	1	100052257	100633006	0.580749	
	del	1p36.12	1	23383461	23869316	0.485855	
	del	1q21	1	142416822	142683098	0.266276	
	del	3p14	3	32867760	36755630	3.88787	
	del	3p21	3	16111233	17956752	1.845519	
	del	3p22	3	13103728	14401912	1.298184	
	del	3p24	3	5670895	10507545	4.83665	
	del	6q24-q24.3	6	136214703	153111265	16.896562	
	gan	Xq21.31	X	90537322	154405100	63.867778	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	11p-q13.4	11	186966	76374332	76.187366	
gan	11q23.2-tel	11	114350685	133951311	19.600626		
gan	3p25	3	224727	3562164	3.337437		
gan	3q	3	108323474	199292074	90.9686		
gan	9	9	204367	138284700	138.080333		
3	del	12q13.2	12	52656064	52961800	0.305736	
	del	1q21.3-q41	1	193354776	218446914	25.092138	
4	del	14	14	18402516	106329810	87.927294	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OB
4	del	16q11-q22	16	34847326	69417987	34.570661	
	del	16q22.2-tel	16	69808750	88651733	18.842983	
	del	18q22.3-tel	18	70316046	76083058	5.767012	
	del	1p	1	604268	120796369	120.192101	
	del	4p	4	62447	46229035	46.166588	
	del	6q16.1-tel	6	93610555	170809875	77.19932	del -hom 6q26.2
	del	Xq21.31-q21.33	X	86728457	97661774	10.933317	del-hom
	del	Xq25	X	123753696	125843415	2.089719	del-hom
	gan	Xq21.33-q25	X	97937268	123356399	25.419131	
	gan	Xq25-tel	X	126179379	154405100	28.225721	
	gan	17	17	48539	78623171	78.574632	
	gan	19p-q12	19	232080	35852516	35.620436	
	gan	1q	1	142614442	245422360	102.807918	
	gan	7p21.1	7	11853187	12367807	0.51462	
	gan	8q24.12-tel	8	122398671	146250765	23.852094	
gan	9q	9	67943027	138284700	70.341673	amp 9q22.2	
gan/amp	16q22.2	16	69441287	69753919	0.312632		
5	del	3p24.2	3	24930353	25810811	0.880458	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
6	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	
	del	22	22	14433473	49468349	35.034876	
	del	8q21.3-tel	8	90844268	146250765	55.406497	
	gan	19p13.1-13.3	19	232080	17981227	17.749147	
	gan	1q	1	142902432	245422360	102.519928	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
7	del	16p13.12	16	13809293	13958463	0.14917	
	del	16p13.2	16	3195143	4247686	1.052543	
	del	1q21.2	1	142902432	143236258	0.333826	
	del	1q22	1	151865010	153827498	1.962488	
	del	22q12.1-q12.3	22	22657455	28035110	5.377655	
	del	3p12.1-p21.32	3	47591087	82751614	35.160527	
	del	8p12-o22	8	13991907	35817703	21.825796	
	del	9p21.3	9	21067574	22136626	1.069052	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OB
7	del	9q21.33	9	85528518	86306931	0.778413	
8	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	
	del	14q24.2-tel	14	68877801	106329810	37.452009	
	del	16p13.12	16	13018096	13949643	0.931547	
9	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	6	6	204528	170809875	170.605347	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	11	11	186966	133951311	133.764345	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	18	18	170229	76083058	75.912829	
	gan	20	20	18580	62363574	62.344994	
	gan	19p	19	232080	24132522	23.900442	
	gan	1q	1	142498565	245422360	102.923795	
	gan	8	8	181530	146250765	146.069235	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
10	del	13q12.12-q21.31	13	19104540	66093198	46.988658	
	del	16q	16	45172598	88651733	43.479135	
	del	17q21	17	29200209	29712020	0.511811	
	del	6q22.1-q26	6	111232868	166363651	55.130783	
	gan	11	11	186966	133951311	133.764345	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
11	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	
	del	16p13.12	16	13923497	13949643	0.026146	
	del	16q	16	45172598	88651733	43.479135	
	del	18q12.1	18	27929523	28261411	0.331888	
	del	18q12.3	18	43537771	43939851	0.40208	
	del	20p12.1-p12.3	20	18580	14892155	14.873575	
	del	22q11.22	22	21004565	21348204	0.343639	
	del	8p	8	181530	43175254	42.993724	
	del	9p21.3	9	20864659	21853204	0.988545	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
11	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	10p12.33-p15	10	173728	15768076	15.594348	
	gan	1q	1	142565191	245422360	102.857169	
	gan	3q24-tel	3	149908446	199292074	49.383628	
	gan	Xq21.31	X	91572633	154405100	62.832467	
	12	del	12q21.1-q24.12	12	72896329	109994429	37.0981
del		12q24.32	12	127803079	129998595	2.195516	
del		13q14.12-q31.1	13	45637710	80035987	34.398277	
del		17p11	17	20668869	22004936	1.336067	
del		17p12	17	7054388	16263648	9.20926	
del		17p13.2	17	1840756	1884968	0.044212	
del		1p33	1	50916605	53642491	2.725886	
del		21q21.1	21	22349931	22717037	0.367106	
del		22q11-q12.3	22	16429857	30435872	14.006015	del hom 22q11.22
del		4p-1	4	62447	7338418	7.275971	
del		4p-2	4	13019621	13304811	0.28519	
del		4p-4	4	16751089	30820718	14.069629	
del		4p-5	4	44947266	48496995	3.549729	
del		6q26	6	160608251	161129952	0.521701	
del		8p12-p23.2	8	6408158	27096480	20.688322	
del		8q12.1	8	59427415	59733212	0.305797	
del		8q23.1	8	107376988	107921744	0.544756	
gan		16q22.2	16	69322931	69875637	0.552706	
gan		13q31.3	13	89705305	91143561	1.438256	
gan		17q21.32	17	41458670	41700762	0.242092	
gan		1q	1	142416822	245422360	103.005538	
gan		21q21.1	21	15510301	19813228	4.302927	
gan		4p	4	14540459	16576866	2.036407	
gan		4p	4	40189556	42557229	2.367673	
gan		4p	4	9536171	9536230	9.818199	
gan		8q24.21	8	128548643	128955220	0.406577	
13		del	13	13	18601703	114077122	95.475419

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
13	gan	10p11.22	10	35692684	35967741	0.275057	
	gan	17q21.32	17	41458670	42166852	0.708182	
	gan	7p14.1	7	36074495	36407238	0.332743	
14	gan	16p12.1	16	21155570	21382561	0.226991	
	gan	17q21.32	17	41458670	41700762	0.242092	
	gan	14q21.1	14	44463153	44835550	0.372397	
15	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	del-hom 13q12
	del	14	14	18402516	106329810	87.927294	
	del	1q21	1	142416822	142614442	0.19762	
	del	3p24.2	3	24930353	25810811	0.880458	
	del	8q23.1	8	107376988	107921744	0.544756	
	gan	7p21.1	7	5799875	5829766	0.029891	
	gan	2q12.3	2	110199090	110337717	0.138627	
16	del	11q11.22	11	186966	6958317	6.771351	
	del	12p13.2-p12.1	12	11312714	27464842	16.152128	
	del	12q21.33	12	86882565	87788438	0.905873	
	del	14q213.2-q31.3	14	64782414	83161788	18.379374	
	del	22q11-q12.3	22	16531140	36097997	19.566857	
	del	2q12.3	2	110199090	110337717	0.138627	
	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
17	del	16p13.2	16	3346012	4226109	0.880097	
	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	17	17	48539	78623171	78.574632	
	gan	18	18	170229	76083058	75.912829	
	gan	19p	19	232080	24132522	23.900442	
	gan	1q	1	142902432	245422360	102.519928	
	gan	6p-q16.3	6	204528	115296805	115.092277	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
18	del	16q	16	45172598	88651733	43.479135	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
18	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	11	11	186966	133951311	133.764345	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	21	21	10013263	46892294	36.879031	
	gan	3q	3	108323474	199292074	90.9686	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
19	del	10q24.2-tel	10	99498368	135293352	35.794984	
	del	12p11.22-p13.32	12	3720836	27020436	23.2996	
	del	13q12.12-q32.2	13	18601703	96811180	78.209477	
	del	16q	16	45172598	88651733	43.479135	
	del	1p22.2	1	84171854	95498709	11.326855	
	del	1p36.32	1	1583815	6515571	4.931756	
	del	22q12.1	22	22063991	48576604	26.512613	
	del	3p24.2	3	25444062	25810811	0.366749	
	del	3q26	3	193344013	199292074	5.948061	
	del	4q13.1-q26	4	56726475	115009696	58.283221	
	del	7p22	7	1263119	1355742	0.092623	
	del	8p11.22-p23.2	8	181530	38369274	38.187744	
	gan	Xq21.33	X	95194126	154405100	59.210974	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	11q13.2-tel	11	68821295	133951311	65.130016	
	gan	19p-q13.2	19	232080	47443541	47.211461	
	gan	1q	1	142902432	245422360	102.519928	
	gan	6p25.2-p22.1	6	352463	29866766	29.514303	
gan	9	9	204367	138284700	138.080333		
gan	9	9	204367	138284700	138.080333	amp 9q33.1-ter	
20	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	del -hom 13q12
	del	1p12-p31.1	1	65884336	120241712	54.357376	
	del	7p22-p12.3	7	149268	47228984	47.079716	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
20	del	8p	8	181530	43167926	42.986396	
	gan	Xq21.33	X	93089393	154405100	61.315707	
	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	21	21	10013263	46892294	36.879031	
	gan	12p	12	49967	50026	34.278466	
	gan	19p-q12	19	232080	36336102	36.104022	
	gan	1q	1	142683098	245422360	102.739262	
	gan	7p12.3-qtel	7	47577297	158588053	111.010756	
	gan	9p	9	204367	40955632	40.751265	
	amp	9q34.2	9	132972692	133016025	0.043333	
	21	del	11p15.4	11	186966	6997120	6.810154
del		16p13.12	16	13018096	13949643	0.931547	
del		17p	17	48539	22427573	22.379034	
del		21q21.3	21	16508006	18211999	1.703993	
del		22q11.22	22	20828565	21220033	0.391468	
del		8p11.2	8	37847079	38373619	0.52654	
del		8p12-p23.2	8	181530	31008590	30.82706	
gan		3	3	224727	199292074	199.067347	
gan		5	5	148243	180617048	180.468805	
gan		7	7	149268	158588053	158.438785	
gan		15	15	19109124	100168659	81.059535	
gan		18	18	170229	76083058	75.912829	
gan		19	19	232080	63784327	63.552247	
gan		11q22.1-tel	11	93889813	133951311	40.061498	
gan		6p	6	204528	58506692	58.302164	
gan	9	9	204367	138284700	138.080333		
22	del	13	13	18601703	114077122	95.475419	
	del	14q13.2	14	101569155	102837054	1.267899	
	del	1q31.3	1	192833855	193614996	0.781141	
	del	22q12.1-q12.3	22	21870458	30670806	8.800348	
23	del	10p12.33	10	16674397	16905440	0.231043	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
23	del	12p12.1	12	20923732	21888938	0.965206	
	del	20q12-q13.2	20	35972013	48152303	12.18029	
	del	4q13.2-q22.3	4	66296550	90995359	24.698809	
	del	6q24.1-q26	6	140568208	170809875	30.241667	
	del	9q22.2-q22.32	9	90643816	96874627	6.230811	
	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	11	11	186966	133951311	133.764345	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
	gan	20q11.22	20	31714033	32101066	0.387033	
	gan	9	9	204367	138284700	138.080333	
	gan	5p-q13.2	5	148243	74103035	73.954792	
	gan	5q21.11-tel	5	95846933	180617048	84.770115	
	amp	17p11	17	15589242	17426376	1.837134	
24	del	16p13.12	16	12937632	13949643	1.012011	
	del	1q31.3	1	193442747	193892811	0.450064	
	del	4p16.2	4	1668972	1846231	0.177259	
	gan	3	3	224727	199292074	199.067347	
	gan	6	6	204528	170809875	170.605347	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	19	19	232080	63784327	63.552247	
25	del	12p12.1	12	21152676	21552696	0.40002	
	gan	11q13.2-tel	11	68821295	133951311	65.130016	
	gan	13q14.2	13	49400172	49756976	0.356804	
	gan	1q	1	142683098	245422360	102.739262	
	gan	8q23.3-q24.21	8	117725989	125822490	8.096501	
26	del	16p13.12	16	11048633	15062188	4.013555	
	gan	5	5	148243	180617048	180.468805	
	gan	7	7	149268	158588053	158.438785	
	gan	11	11	186966	133951311	133.764345	
	gan	15	15	19109124	100168659	81.059535	
	gan	18	18	170229	76083058	75.912829	

CASO	ALTERACIÓN	REGION	CHR	START	END	TAMAÑO (Mb)	OBS
26	gan	17p11-qtel	17	16057597	78513524	62.455927	(amp 17p11)
	gan	19p13.1-p13.3	19	232080	19514806	19.282726	
	gan	19q13.2-qtel	19	38013393	63784327	25.770934	
	gan	1q	1	142528814	245422360	102.893546	
	gan	6p25.2-p21.32	6	204528	37287940	37.083412	
	gan	8	8	181530	146250765	146.069235	
	gan	6q12	6	63993034	70557038	6.564004	(x2 amp)
	amp	17p13.2	17	3632698	4966472	1.333774	



Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma

Cristina Largo
Sara Alvarez
Borja Saez
David Blesa
Jose I. Martin-Subero
Ines González-García
Jose A. Brieva
Joaquin Dopazo
Reiner Siebert
María J. Calasanz
Juan C. Cigudosa

Background and Objectives. Multiple myeloma (MM) is a malignancy characterized by clonal expansion of plasma cells. In 50% of the cases, the neoplastic transformation begins with a chromosomal translocation that juxtaposes the *IGH* gene locus to an oncogene. Gene copy number changes are also frequent in MM but less characterized than in other neoplasias. We aimed to characterize genes that are amplified and overexpressed in human myeloma cell lines (HMCL) to provide putative molecular targets for MM therapy.

Design and Methods. Nine HMCL were characterized by fluorescent *in situ* hybridization, comparative genomic hybridization (CGH) and cDNA microarrays for gene expression profiling and copy number changes.

Results. After defining the *IGH*-translocations present in the cell lines, we conducted expression-profiling analysis. Supervised analysis identified 166 genes with significantly different expression among the cell lines harboring *MMSET/FGFR3* (4p16), *MAF* (16q) and *CCND1* (11q13) rearrangements. Array-CGH was then performed. Five chromosomes recurrently affected by gains/amplifications in primary samples and cell lines were analyzed in detail. Sixty amplified and overexpressed genes were found and 25 (42%) of them were only overexpressed when amplified; moreover, six showed a significant association between overexpression and gain/amplification. We also found co-amplification and overexpression for genes located within the same amplicons, such as *MALT1* and *BCL2*.

Interpretation and Conclusions. Parallel analysis of gene copy numbers and expression levels by cDNA microarray in MM allowed efficient identification of genes whose expression levels are elevated because of increased copy number. This is the first time that *MALT1* and *BCL2* have been shown to be overexpressed and amplified in MM.

Key words: multiple myeloma, oncogene, array LGH, expression array.

Haematologica 2006; 91:184-191

©2006 Ferrata Storti Foundation

From the Cytogenetics Unit, Spanish National Cancer Centre, (CNIO), 28029 Madrid, Spain (CL, SA, DB, JCC); Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, 31008 Spain (BS, MJC); Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein, 24105 Kiel, Germany (JIM-S, RS); Immunology Service, "Puerta del Mar" University Hospital, 11009 Cádiz, Spain (IG-G, JAB); Bioinformatics Unit, Spanish National Cancer Centre, (CNIO), 28029 Madrid, Spain (JD).

Correspondence:
Juan C. Cigudosa, Cytogenetics Unit, Spanish National Cancer Centre, (CNIO), C/ Melchor Fernandez Almagro 3, Madrid, 28029, Spain
E-mail: jccigudosa@cnio.es

Multiple myeloma (MM) is a malignancy characterized by a clonal expansion of plasma cells and a wide variability in clinical features, responses to treatment, and survival times among patients.^{1,2} Clues to understanding the pathogenesis of myeloma are coming from two directions.^{3,4} The first one is chromosomal aberrations, present in virtually all MM, which are either chromosome translocations involving the *IGH* locus and a cellular oncogene; gain and/or losses of chromosomes or specific genomic regions, or a combination of both types of aberrations.⁵ The second aspect is the close interaction of the MM cells with bone marrow stromal cells, which is necessary for survival, growth and differentiation of the plasma cells.⁴ Understanding of the significance of various translocations in MM has increased, but little is known about the role of gains and losses. Of particular interest is gene overexpression associated with genomic gains or amplifications. These events, frequently observed in other types of cancer, have been

used as therapeutic targets. For example, *ERBB2* is overexpressed because of gene amplification in 15 to 20% of breast cancers and represents the target protein for trastuzumab therapy.⁶ Therefore, the detection of genes that are gained and overexpressed in MM could eventually offer novel therapeutic approaches. In this work we characterized nine human myeloma cell lines (HMCL) using fluorescence *in situ* hybridization (FISH), conventional comparative genomic hybridization (c-CGH), and cDNA microarrays in order to analyze the gene expression profiles and to determine their relationship with gene copy number changes.

Design and Methods

Human multiple myeloma cell lines

Nine HMCL (RPMI-8226, U-266, OPM-2, SK-MM-2, LP-1, JIN-3, L-636, KARPAS-620, and NCI-H929) were obtained from the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-

organismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and cultured under recommended conditions. DNA and RNA were extracted using DNAzol[®] Genomic Isolation Reagent and Tri Reagent[®] (Molecular Research Cancer Center Inc., Cincinnati, OH, USA), respectively, following the suppliers' protocols. Metaphase cells were prepared by standard cytogenetics methods: mitotic arrest with colcemid (0.1 µg/mL for 1.5 hours at 37°C; GIBCO, Strachclyde, UK) was followed by hypotonic treatment (75 mM KCl for 15 minutes at 37°C) and fixation with methanol/acetic acid (3:1) before spreading onto slides.

Conventional comparative genomic hybridization

CGH analysis was carried out as previously described with minor modifications.⁷ The HMCL genomic test DNA was labeled by CGH-nick translation (Vysis, Chicago, IL, USA) with SpectrumGreen dUTP. Commercially available normal DNA, labeled with Texas Red dUTP, was used as the control reference (Vysis). Images of the hybridized normal male metaphases were analyzed with CytoVision Image Analysis System software (Applied Imaging, Newcastle, UK). Like other researchers,⁸ we defined high-level amplification as small regions with a ratio >1.4.

Microarray assays

Microarray assays were performed using the CNIO OncoChip, which contains 7657 different cDNA clones of cancer-related genes (<http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip>). For gene expression profiling, 30 µg of the test or reference total mRNA were labeled with fluorescent Cy5-dUTP and Cy3-dUTP (Amersham Biosciences, Cambridge, UK), respectively. Hybridizations were performed at 42°C for 15h as described elsewhere.⁹ In all microarray experiments, the reference RNA used was Universal Human RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Genes were deemed to be upregulated or downregulated if the ratio was at least two fold. The Gene Expression Profile Analysis Suite (GEPAS) software¹⁰ was used to analyze microarray data. CGH experiments onto cDNA arrays (array-CGH) were performed as described elsewhere previously with minor modifications.¹¹ Hybridizations and post-hybridization washes were performed at 50°C; slides were scanned in an Agilent Array Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and quantified using the GenePix Pro 5.0 software (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). Cy3/Cy5 ratio values were normalized to the median ratio value of all spots in the array. In addition, low quality measurements were excluded from the analysis. Copy gain and loss thresholds were established in control experiments by hybridizing control female DNA against DNA from cell lines containing one to five copies of the X chromosome (*data not shown*). The cut-off values obtained were 0.85 and 1.22 Cy5/Cy3 ratios for loss and gain, respectively. Amplification was considered to be present when ratios exceeded 1.61, meaning gains over five copies. Map positions for arrayed human cDNA clones were assigned according to the July 2003 version of University of California-Santa Cruz Biotechnology Human Genome Working Draft (<http://genome.ucsc.edu/>). In order to identify

the gained regions in the array CGH, we used the CGH-Plotter, developed by Autio *et al.*,¹² with our thresholds for gains and losses.

Fluorescence in situ hybridization

FISH assays were carried out as described elsewhere.¹³ A multi-FISH assay¹⁴ was used in order to identify the most common reciprocal translocations involving the immunoglobulin heavy and light chain loci. FISH assays were also carried out for three candidate genes: *c-MYC*, *BCL2* and *MALT1*. Probes used for FISH screening were: LSI MYC Dual Colour Break Apart probe (Vysis, Downers Grove, IL, USA), BCL2/IGH probe (Cancer Genetics Inc., Milford MA, USA) and MALT1 Break Apart probe (Master Diagnostic, Granada, Spain). The FISH assays enabled us to determine the presence/absence of translocations involving these genes.

Quantitative real-time polymerase chain reaction assays (qRT-PCR)

First, 1 µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with SuperScript[™] II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then qRT-PCR assays (TaqMan[®]) were performed using primers and probes provided by Assay-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for *CCND1* (hs00277039_m1), *CCND2* (hs00153380_m1), *MALT1* (hs01120046_m1), *C-MYC* (hs00153408_m1), and *BCL2* (hs00153350_m1) using the ABI prism 7900 system (Applied Biosystems). For all genes, the β -actin gene (hs99999903_m1) was used as a housekeeping gene to normalize the data, as described elsewhere.¹⁵ Total RNA from a pool of tonsil plasma cells, obtained after positive CD138 immunoselection, was used as a control. Tonsil plasma cells were separated according to our previously published protocol.¹⁶

Results

FISH characterization and global expression profiling

First, the set of HMCL was screened by a customized multi-FISH assay.¹⁴ The assay contained a combination of FISH probes designed to detect the most common reciprocal translocations involving the immunoglobulin heavy and light chain loci. We identified the presence of specific immunoglobulin translocations in all cell lines (Table 1): three showed *CCND1* rearrangements and four showed *FGFR3/MMSET* rearrangements, with SK-MM-2 showing co-existence of *CCND1* and *FGFR3/MMSET* rearrangements. The remaining three lines showed rearrangements of either *MAF* or *MAFB*. These and *FGFR3/MMSET* rearrangements result in *CCND2* upregulation so we performed a qRT-PCR study to evaluate the expression level of *CCND1* and *CCND2*, confirming the expected results (Table 1).

Next, we carried out global expression profiling (GEP) of all cell lines with the CNIO OncoChip, a microarray that contains 7657 cDNA clones representing more than 6000 cancer-related genes. Unsupervised hierarchical clustering to detect possible subgroups within the cell lines failed to segregate subgroups according to immunoglobu-

C. Largo et al.

Table 1. Classification of MM cell lines according to their immunoglobulin (Ig) chromosomal translocation status and their related expression data.

Cell line	Ig locus translocation	FISH confirmed Ig rearranged genes	CCND1 qRT-PCR (a)	CCND2 qRT-PCR (a)	CCND group by expression profiling (b)	TC classification (c)
U-266	ins(11;14)	CCND1	0.248	14.986	D1/D2	11q13
KARPAS-620	t(11;14) t(8;14)	CCND1	0.042	0.521	D1	11q13
SK-MM-2	t(4;14) t(11;14)	FGFR3 MMSET CCND1	0.095	0.004	D1	4p16 11q13
OPM-2	t(4;14)	FGFR3 MMSET	0.000	24.98	D2	4p16
LP-1	t(4;14)	FGFR3 MMSET	0.008	31.338	D2	4p16
NCI-H929	t(4;14)	FGFR3 MMSET	0.299	15.496	D2	4p16
RPMI-8226	t(16;22)	MAF	0.006	18.907	D2	MAF
JUN-3	t(14;16)	MAF	0.001	7.016	D2	MAF
L-363	t(20;22)	MAFB	0.000	16.966	D2	MAF

a: the expression levels of CCND1 and CCND2 were analyzed by qRT-PCR; b: see supplementary Figure 1 for clustering classification after expression profiling into the different CCND subgroups; c: classification of the cell lines in translocation/cyclin D (TC) groups according to the translocation group¹⁸ which includes chromosome rearrangements and CCND expression data.

lin translocation status or cyclin D1 or D2 expression. Expression data were further analyzed by supervised hierarchical clustering.¹⁷ For this purpose, we used a recently proposed MM classification system that integrates data from GEP, the deregulated expression of cyclin D1, D2, or D3, and cytogenetic results.^{3,18} Briefly, this system divides MM tumors into eight translocation/cyclin D (TC) groups – 11q13, 6p21, 4p16, maf, D1, D1+D2, D2, and NONE – which appear to be defined by early, and perhaps initiating, oncogenic events. The cell lines investigated in this study fall in three groups: 11q13, 4p16, and maf. SKMM-2 was assigned to the 11q13 group for three reasons: it harbored t(11;14), it overexpressed CCND1, and it did not overexpress either FGFR3 (not shown) or CCND2 (Table 1). We found that 166 genes were differentially expressed (unadjusted $p < 0.05$) between these groups (supplementary data, Figure 4). Among these genes, CCND1, FGFR3 and CCR1, a target of the maf pathway,¹⁹ were found to be differentially expressed in the corresponding subgroups (supplementary Figure 4).

Characterization of copy number changes and overexpressed genes

Our purpose was to identify candidate genes that were gained/amplified and overexpressed (A/O genes) as potential targets for therapy. For this purpose, we first

performed conventional CGH analysis in the HMCL set. We observed chromosomal imbalances in all of them. The most frequent aberrations were gains in 1q (9/9), 4q (8/9), 7q (8/9), 18q (7/9), 15q (7/9), 11q (7/9) and 8q (7/9) and losses in 13q (9/9), 6q (8/9), 14q(7/9) and 9p (6/9) (supplementary Figure 2). High-level amplifications were identified in most frequently gained regions such as 1q21-q32, 7q22-q35, 8q21-q23, 11q14-q25 and 18q11-q22. To obtain information at the gene level, cDNA based array CGH was then performed. This technique enables simultaneous analysis of expression and copy number changes of the genes included in the platform. Thresholds for gain and amplification were established as 1.22 and 1.61, respectively. We focused our analysis on chromosomes 1, 7, 8, 11 and 18, where high-level amplifications and recurrent gains were found by conventional CGH in our cell lines or primary samples from patients.^{2,20,21} Using the CGH-plotter software,¹² we identified 13 recurrent gained/amplified regions, some of which covered almost complete chromosome arms (Figure 1A). Within these large regions, we determined some small recurrent sub-regions with a distinctive level of amplification.

For further analysis, we selected the genes that, within these regions, were gained/amplified and overexpressed 2-fold in at least two of the HMCL (see Table 2 for a detailed description). Table 2 shows the 60 genes that fulfil these criteria. The most characteristic gene ontology (GO) term was assigned to each of these genes using the FatiGO web interface.²² The representative GO terms were related to cell growth and/or maintenance genes (GO:0008151), and genes involved in signal transduction (GO:0007165), cell death (GO:0008219) and regulation of programmed cell death (GO:0043067). Cell death-associated genes, such as BCL2, MALT1, DCC, ELMO1, GAS2 and BNIP3L, were significantly overrepresented ($p = 0.024$). Furthermore, 25 out the 60 genes (42%) were only overexpressed when gained/amplified (bolded in Table 2). Among the 60 recurrently A/O genes, six of them showed a significant association between overexpression and gain/amplification: CHI3L1, ELMO1, BNIP3L, PLAG1, LOC157567, and VPS28 (Fisher's test unadjusted- $p < 0.05$). Additionally, using these approaches we were able to produce a list of loci deleted and downregulated in at least two cell lines, in chromosomes 6, 9, 13 and 14 (Supplementary Table 4). This additional information provides a more complete picture of both oncogenes and potential tumor suppressor genes involved in the pathogenesis of MM.

Analysis of c-MYC, BCL2 and MALT1 expression and amplification status

Finally, we conducted more detailed FISH and qRT-PCR assays on c-MYC and BCL2, because of their relevance in lymphoid malignancies, and on MALT1 because of the novelty of its overexpression in MM. Expression levels of these genes in the HMCL were compared with those in total RNA from a pool of tonsil plasma cells obtained after positive CD138 immunoselection. The threshold for overexpression was established as 1.6 fold the value for each gene in the tonsil plasma cells (Table 3).

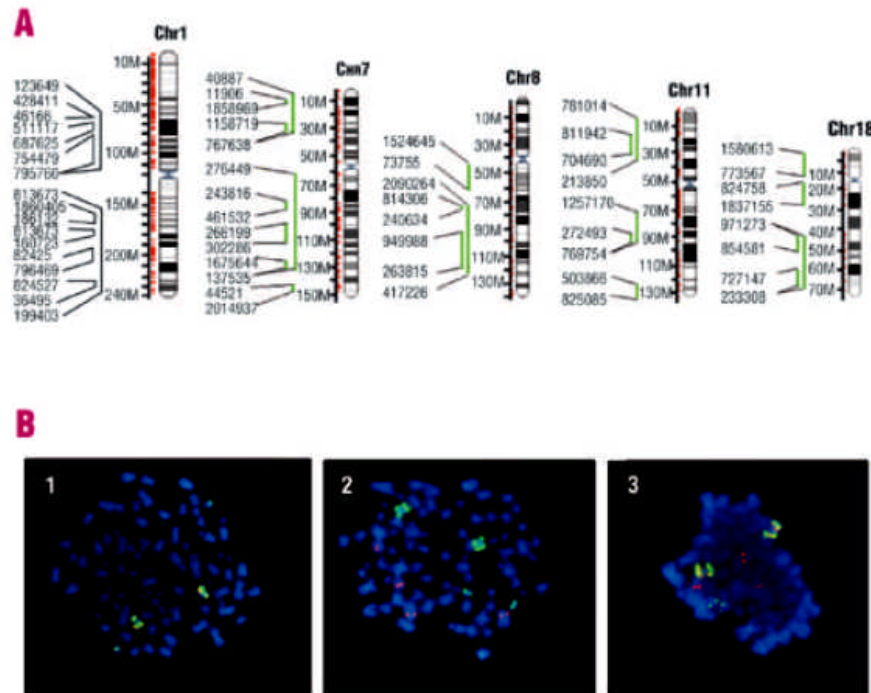


Figure 1. A. Ideograms of chromosomes 1, 7, 8, 11 and 18 representing recurrent gained/amplified regions in nine HMCL. Each chromosome is represented by its band ideogram. Red lines on the left of the ideograms depict the CNIO OncoChip clone coverage in each chromosome. Note that clone coverage is not homogeneous, and some gaps were found. The clone coverage was considered to delimit the gained/amplified regions. Green bars on the left delimit the gained/amplified regions. The limits of the regions indicated as the first and last clones that were included in the gained/amplified region (named by their IMAGE Clone_ID). We also show the minimum region of gain/amplification identified within the largest regions. The figure was created using the InSilico CGH tool, which allows the results of microarray hybridizations to be mapped onto the chromosome coordinates (<http://insilicocgh.bioinfo.cnio.es/>).¹⁷ Raw expression data and array CGH data are available upon request. **B.** FISH analyses of SK-MM-2 to identify *BCL2* and *MALT1* amplification. 1. Metaphase spread showing *MALT1* gene amplification in SK-MM-2. The *MALT1* breakpoint probe was designed to include centromeric and telomeric clones flanking the gene, which were differentially labeled with red and green fluorochromes. 2. *BCL2* amplification is shown using the *BCL2/IGH* probe (Cancer Genetics Inc., Milford MA, USA) with *BCL2* shown in green. The amplified signals are found in the same chromosomes as *MALT1*. 3. Co-hybridization of *MALT1* centromeric clones (labeled in red) with the *BCL2/IGH* probe. *MALT1* and *BCL2* are found in the same chromosomes, and also the *IGH* gene is shown in red. FISH assays were carried out as described elsewhere.¹³

c-MYC was overexpressed in four cell lines (as SK-MM-2, LP-1, Karpas-620, OPM-2) that harbored both translocations and gain/amplifications of *c-MYC*, while cell lines with simple translocations (L-363) or gains (JIN-3) failed to show upregulated values (Table 3). FISH analysis revealed that these four HMCL had concomitant amplification/gain and translocation. Regarding genomic changes involving *MALT1*, using a breakpoint FISH probe (Figure 1B), we found that seven cell lines showed extra copies of *MALT1* gene and that one of them, the SK-MM-2 line, also had a clear amplification (>10 copies). Expression analysis by qRT-PCR demonstrated *MALT1* overexpression in five HMCL (four with gain/amplification and one with no evidence of genomic copy number changes or translocations involving this locus). Finally, the *BCL2* study revealed, after FISH and qRT-PCR analysis (Table 3), that seven HMCL contained extra copies of the gene with overexpression also present in four of them. FISH data demonstrated that *MALT1* and *BCL2* are both gained in the same seven HMCL but were never found to be translocated in any of the cell lines.

Discussion

We genetically characterized a representative panel of HMCL. Multi-FISH assay identified the presence of at least one specific immunoglobulin translocation in all cell lines (Table 1). After GEP analysis of the HMCL, unsupervised hierarchical clustering failed to segregate subgroups according to either immunoglobulin translocation status or cyclin D1 or D2 expression. We speculated that this could be due to the nature of the cell lines, which mainly represent cases with advanced disease with a high number of chromosomal imbalances which modify the GEP. This pattern of non-clustering is in good concordance with previously observed GEP clusters in primary advanced MM samples which clustered together, but not regarding the translocation involved.²³ Data were further analyzed by supervised hierarchical clustering¹⁷ using translocation/cyclin D groups¹⁸ as the criteria for HMCL classification. Our series of cell lines belonged to three of the groups (11q13, 4p16, and *maf*) and the supervised

C. Largo et al.

Table 2. Genes gained/amplified (array CGH ratio >1.22) and overexpressed (expression array ratio >2) in at least two of the HMCL analyzed according to microarray assays.

Gene	Description	Cytoband	Start	% of cell lines with overexpression Gained ¹	Not gained ²
<i>NFIA</i> ³	NAAD485 protein	1p31.3-p31.2	60471035	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>LIM1</i> ³	LIM domain only 4	1p22.3	88933064	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>DISC1</i> ⁴	Disrupted in schizophrenia 1	1p22	92149953	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>EST</i> ⁵	MWSE: 633331	1p22.1	93013822	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>CD53</i> ⁴	CD53 antigen	1p31-p12	110282336	100% (2/2)	57% (4/7)
<i>EST1B</i> ⁴	Est1p-like protein B	1q22	151984237	100% (2/2)	29% (2/7)
<i>AIM2</i> ⁴	Absent in melanoma 2	1q22	154764543	67% (2/3)	50% (3/6)
<i>Uti1</i> ⁴	Uti1-carjugating enzyme 1	1q23.1	156855810	67% (2/3)	50% (3/6)
<i>CAPON</i>	C-terminal PDZ domain ligand of neuronal nitric oxide synthase	1q23.1-q23.2	157785645	40% (2/5)	25% (1/4)
<i>LOC54499</i> ³	Putative membrane protein	1q22-q25	161347624	40% (2/5)	50% (2/4)
<i>SELL</i> ³	Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1q23-q25	165310642	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>PTPNT</i> ³	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	1q32.1	137550093	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>CH3L1</i> ^{4*}	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1q32.1	139577702	67% (2/3)	17% (1/6)
<i>GW1</i>	Guanylate kinase 1	1q32-q41	224066618	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>ELMO1</i> ^{4*}	Engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, <i>C. elegans</i>)	7p14.1	36540538	100% (3/3)	0% (0/6)
<i>PUB1</i> ⁴	Putative ribc element binding protein B	7p13	44552097	100% (2/2)	14% (1/7)
<i>GN50</i>	Glucuronidase, β	7q21.11	64035490	66% (2/3)	17% (1/6)
<i>PFTK1</i>	PFTAIRE protein kinase 1	7q21.1	88873959	50% (2/4)	40% (2/5)
<i>CDK6</i> ⁴	Cyclin-dependent kinase 6	7q21.2	90888487	75% (3/4)	20% (1/5)
<i>TARAP</i> ⁴	Transformation/transcription domain-associated protein	7q22.1	97010689	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>SAPP2</i>	SFRS protein kinase 2	7q22.3	103240523	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>EST</i> ⁵	MWSE:624347	7q22.3	104785450	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>EST</i> ⁵	MWSE:462229	7q31	115393089	33% (2/6)	33% (1/3)
<i>MLL3</i>	B melanoma antigen family member 4	7q34-q36	150080292	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>BMP3L</i> ^{4*}	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	8p21	26544052	100% (2/2)	0% (0/7)
<i>CEBPD</i> ^{4*}	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), δ	8q11	48536540	50% (2/4)	0% (0/5)
<i>LYN</i>	<i>l</i> -yes-1 <i>Shimizu</i> sarcoma viral related oncogene homolog	8q12.1	56731374	57% (4/7)	50% (1/2)
<i>PLAG1</i> ^{4*}	Plasmodium aderonia gene 1	8q12.1	57236036	100% (5/5)	25% (1/4)
<i>GNH</i>	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.1	63887237	22% (2/9)	-
<i>EST</i> ⁵	MWSE:33274	8q13.1	67430390	50% (4/8)	0% (0/1)
<i>TFD52</i>	Tumor protein D52	8q21	80935889	100% (7/7)	50% (1/2)
<i>FUJ14007</i>	Hypothetical protein FUJ14007	8q21.13	82652132	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>EST</i> ⁵	MWSE: 809828	8q21.2	86036919	33% (2/6)	33% (1/3)
<i>TF53NPF1</i>	Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1	8q22	95910144	100% (4/4)	80% (4/5)
<i>LOC157567</i> ³	Hypothetical protein LOC157567	8q22.3	101603041	83% (5/6)	0% (0/3)
<i>CTHRC1</i>	Collagen triple helix repeat containing 1	8q22.3	104452013	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>LAP12</i>	Low density lipoprotein-related protein 12	8q22.2-q23.1	105569698	43% (3/7)	100% (2/2)
<i>EFS3</i>	Eukaryotic translation initiator factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	8q24.11	117718260	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>EST</i> ⁵	MWSE:128498	8q24.12	119375502	100% (8/8)	0% (0/1)
<i>MRPL13</i>	Mitochondrial ribosomal protein L13	8q24.12	121466001	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>FUJ14825</i>	Hypothetical protein FUJ14825	8q24.13	124290005	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>ZPX1</i>	Zinc finger and homeobox 1	8q24.13	124318757	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>FBOX32</i>	F-box protein 32	8q24.13	124507904	25% (2/8)	0% (0/1)
<i>MYC</i>	<i>c-myc</i> myeloblastonosis viral oncogene homolog (avian)	8q24.12-q24.13	128826577	71% (5/7)	0% (0/2)
<i>CY1C1</i> ⁴	Cytochrome c-1	8q24.3	145286499	100% (2/2)	29% (2/7)
<i>VPS28</i> ^{4*}	Vacuolar protein sorting 28 (yeast)	8q24.3	145686680	100% (2/2)	2% (0/7)
<i>GAS2</i>	Growth arrest-specific 2	11p14.3-15.2	23437753	75% (3/4)	40% (2/5)
<i>WNT1</i> ^{4*}	Wingless-type MMTV integrator site family, member 11	11q13.5	77486402	100% (3/3)	33% (2/6)
<i>RAB30</i> ^{4*}	RAB30, member RAB oncogene family	11q12-q14	84231288	50% (2/4)	100% (5/5)
<i>PCALM</i>	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	11c14	87234417	100% (3/3)	33% (2/6)
<i>PANX1</i>	Pannexin 1	11q1.4.3	95359855	40% (2/5)	0% (0/4)
<i>PON2AF1</i>	POU domain, class 2, associating factor 1	11q23.1	112735138	100% (3/3)	83% (5/6)
<i>FU1</i>	Friend leukemia virus integration 1	11q24.1-q24.3	130076675	57% (4/7)	0% (0/2)
<i>C18orf8</i> ³	Chromosome 18 open reading frame 8	18q11.2	20815018	86% (6/7)	0% (0/2)
<i>KCTD1</i> ^{4*}	Potassium channel tetramerization domain containing 1	18q1.2.1	23756411	50% (2/4)	20% (1/5)
<i>DOC</i>	Deleted in colorectal carcinoma	18q21.3	50213995	43% (3/7)	0% (0/2)
<i>TF4</i>	Transcription factor 4	18q21.1	52737605	67% (4/6)	67% (2/3)
<i>MLT1</i>	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	18c21	56312726	50% (2/4)	60% (3/5)
<i>EST</i> ⁵	MWSE: 845609	18q21.31	56751141	67% (2/3)	33% (2/6)
<i>RC1</i> ²	R-cell CLL/lymphoma 2	18q21.3	60753885	100% (6/6)	67% (2/3)

EST: expressed sequence tags; we provide the IMAGE Clone ID. ¹Percentage of cell lines that simultaneously present gene overexpression and gain/amplification of the genomic region where the gene is located. ²Percentage of cell lines that overexpress the gene, but that do not show genomic gain in the region where the gene is located. ³Genes appearing amplified (array CGH ratio > 1.61) in all cell lines harboring the genomic gain. ⁴Genes gained (array CGH ratio > 1.22, <1.61) in all cell lines harboring the genomic gain. ⁵These genes were found to be preferentially overexpressed when gain/amplified (Fisher's test unadjusted p<0.05). Bold lines indicate genes that are only overexpressed when gained/amplified.

Table 3. Results of microarrays, FISH and qRT-PCR analyses for *c-MYC*, *BCL2* and *MALT1* genes.

Cell line	Ploidy	<i>c-MYC</i> FISH	% of cells with gain	qRT-PCR
SK-MM-2	3	G+T	100	4.82*
U-266	2	N	0	0.06
DFM-2	3	G+T	100	2.26*
RPM-8226	3	N	0	1.75
JUN 3	2-3	G	87	1.31
L-363	2-3	N+T	0	1.51
LP-1	2-3	A+T	95	5.16*
KARPAS-620	3	A+T	100	2.15*
NCI H-929	2	N/D	100	1.31
Tonsil PC	-	-	-	1.09

Cell line	Ploidy	<i>MALT1</i> FISH	% of cells with gain	qRT-PCR
SK-MM-2	3	A	100	2.84*
U-266	2	N	8	6.71*
DFM-2	3	G	75	3.05*
RPM-8226	3	G	58	1.59
JUN 3	2-3	G	98	1.10
L-363	2-3	N	10	1.93
LP-1	2-3	G	89	6.41*
KARPAS-620	3	G	96	2.09*
NCI H-929	2	G	70	1.55
Tonsil PC	-	-	-	1.23

Cell line	Ploidy	<i>BCL2</i> FISH	% of cells with gain	qRT-PCR
SK-MM-2	3	A	100	62.13*
U-266	2	N	4	18.24*
DFM-2	3	G	88	7.69*
RPM-8226	3	G	77	4.89
JUN 3	2-3	G	69	2.57
L-363	2-3	N	7	9.40*
LP-1	2-3	G	75	26.46*
KARPAS-620	3	G	98	4.00
NCI H-929	2	G	70	5.34*
Tonsil PC	-	-	-	3.42

A: amplified, G: gained, N: without changes, D: deleted, T: translocated and NA: not available. PC: plasma cells. In FISH assays a locus was considered as gained when we found at least one copy more than the ploidy level of the cell line and amplified when more than six copies were found. * Overexpressed by qRT-PCR. The overexpression threshold was considered as 1.6-fold the expression level in plasma cells.

analysis found 166 genes (unadjusted $p < 0.05$) differentially expressed between the groups (supplementary Figure 1). Among these genes, *CCND1*, *PCFR3* and *CCM1* a target of the maf pathway,¹⁹ were differentially expressed in the corresponding subgroups, as was expected.

In order to identify candidate genes that were gained/amplified and overexpressed cDNA-based array CGH was performed. We have previously performed conventional CGH analysis in the HMCL set. Among all the aberrations identified, high-level amplifications were characterized in most frequently gained regions such as

1q21-q32, 7q22-q35, 3q21-q23, 11q14-q25 and 18q11-q22. These results are in concordance with those from previous studies on primary MM^{20,24} and cell lines.²⁵ Continuing research, we focused on five chromosomes (1, 7, 8, 11 and 18) in which high-level amplifications and recurrent gains were found by conventional CGH in our cell lines or primary patient samples.^{7,20,21} Thirteen recurrent gained/ amplified regions were identified; some of them spanned almost complete chromosome arms (Figure 1A). Within these regions, some small recurrent sub-regions of amplification were determined. This feature of large regions of gain/amplification including smaller sub-regions of different degrees of genomic imbalances has also been reported for amplicons in some solid tumors such as breast cancer and cell lines.^{26,27} We were able to identify 60 genes that were gained/amplified and overexpressed. The gene ontology approach showed that genes with cell death-associated functions, such as *BCL2*, *MALT1*, *DCC*, *ELMO1*, *GAS2* and *BNIP3L*, were significantly overrepresented. Twenty-five out the 60 genes (42%) were only overexpressed when gained/amplified. Although the gained/amplified regions contained a large number of overexpressed genes, especially in cells carrying the gain, other genes were also upregulated in the HMCL without the gain, pointing to alternative mechanisms of overexpression, such as translocations or hypomethylation described for different tumors. Furthermore, six of the amplified and overexpressed genes showed a significant association between overexpression and gain/amplification: *CH3L1*, *ELMO1*, *BNIP3L*, *PLAG1*, *LOC157567*, and *VPS28* (Fisher's test unadjusted $p < 0.05$). Among this group of genes, we mention in particular *ELMO1*, related with cell motility and cell death, and *PLAG1*, overexpressed in epithelial tumors.²⁸ We characterized 1q gain/amplification but were not able to identify *CKS1B*, a gene that has been shown to be gained in MM patients,²⁹ as an amplified and overexpressed gene because, unfortunately, this gene was not included in our array experiments. Further analysis of the gained/amplified and overexpressed genes showed that the genomic mechanism linked with overexpression was exclusively amplification in nine genes and gain in fifteen genes, whereas the remaining were affected by both mechanisms. Consequently, not only were amplifications associated with overexpression, but also low-copy gains had similar outcomes on gene expression, as has been described in other reports.^{26,27}

FISH and qRT-PCR assays were carried out on *c-MYC*, *BCL2*, and *MALT1* genes. These genes were selected from the 60 gained/amplified and overexpressed genes previously described because of their relevance in lymphoid malignancies for *c-MYC* and *BCL2*, and because of the novelty of its overexpression in MM for *MALT1*. The gene ontology approach also indicated that cell-death related genes, *BCL2* and *MALT1*, were overrepresented among the gained/amplified and overexpressed genes. The expression levels of these three genes was analyzed by comparison with total RNA from a pool of tonsil plasma cells. In general, data from array CGH and FISH were concordant for most cell lines with some discrepancies that were attributable to the levels of ploidy and oligoclonality. The comparison of expression data from gene

C. Largo et al.

expression profiling and qRT-PCR showed some concordance for most of the cell lines but also some controversial results, mostly for the RPMI-8266, JIN-3, and OPM-2 cell lines. These differences occurred because different reference RNA were used as controls: GEP was done using a commercial RNA pool (Table 1) whereas qRT-PCR was done with a pool of tonsil plasma cells. Because the commercial RNA pool may show a baseline level of expression for some specific genes that does not correspond with the levels of expression in plasma cells, we only discuss the results based on the qRT-PCR data.

Four cell lines showed *c-MYC* overexpression. These cell lines harbored both translocations and gain/amplifications of *c-MYC*. Nevertheless, we did not find *c-MYC* upregulation in cell lines harboring simple translocations or gains (Table 3). This suggests that either the overexpression of *c-MYC* requires a combination of both mechanisms or that this gene is not the target of the rearrangement. However, high levels of *c-MYC* expression have been associated with more aggressive cases of primary MM.²³ The *MALT1* gene has been found to be recurrently rearranged in chromosomal translocations with *API2* and the *JGH* locus in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas²⁴ and has also been described to be amplified in B-cell non-Hodgkin's lymphomas.²⁵ The functions of the MALT1 protein have not been fully characterized, but it has been demonstrated to have a synergic role with CARMA1 and BCL10 in *NF-κB* signaling.²⁶ We found seven cell lines with extra copies of *MALT1*. qRT-PCR demonstrated *MALT1* overexpression in four of the gained/amplified cases. *BCL2* is a survival factor for many cell types and its overexpression has been described in HMCL and in freshly isolated myeloma cells.^{24,27} We also identified seven HMCL with extra copies of *BCL2* and four cell lines showed upregulation. In summary, FISH data demonstrated that, whereas no translocations were identified, both *MALT1* and *BCL2* are gained in the same seven HMCL. For the first time in MM, we demonstrated simultaneous overexpression of *MALT1* and *BCL2* in three out of these seven cell lines. This phenomenon of simultaneous amplification and overexpression of co-localized genes has been reported in breast tumors for *ERBB2*, *GRB7* and *MEN64/CAB1* in the 17q12-q21 ampli-

con.^{28,29} Sanchez-Izquierdo *et al.*³² reported a patient with gastric MALT lymphoma with *MALT1* and *BCL2* amplification but the co-expression could not be further confirmed. In their study they also described 16 lymphoma cell lines with an 18q21 amplified region. They studied the co-existence of *BCL2* and *MALT1* amplification and overexpression and they described that the amplification peak predominantly involved *BCL2* in diffuse large B-cell and mantle cell lymphoma cell lines whereas SSK-41 and Karpas 1713 (marginal zone lymphoma cell lines) displayed the amplification maxima centred around the *MALT1* locus. They found no examples of simultaneous overexpression of both genes. Although no patients were analyzed in this study, the cell lines included represent the major translocation groups that do actually occur in primary MM samples from patients. Parallel analysis of gene copy numbers and expression levels by cDNA microarray in MM allowed efficient identification of genes whose expression levels are elevated because of increased copy number. The information provided here should foster protein expression studies of candidate genes in primary samples to identify putative therapeutic targets.

CL, SA and JCC contributed to the design, analysis, and interpretation of the data. CL and SA wrote the paper, with the final supervision of JCC. BS and JIMS designed the FISH probes, conducted the experiments and interpreted them. CL, SA, DB, and JD were involved in the microarray analyses and their interpretation (including software). IGG and JAB contributed to the extraction and analysis of expression of normal plasma cells. Finally, RS, MJC and JCC contributed to the final revision and critical reading of the manuscript. JCC takes primary responsibility for the paper. Responsibilities for Figure 1: CL, BS, JD; supplementary Figures 1 and 2: CL, DB and SA; Tables 1 and 2: BS and CL; Table 2: CL, DB, JD and SA; Table 3: CL, IGG, JAB and SA; supplementary Table 1: CL, DB, JCC and SA.

We thank M. Carmen Martín for providing technical support. This work was funded by Red Temática FIS G03/136 Mieloma Múltiple y otras gammopatías de la Célula a la Terapia and partially supported by a grant from the Fundació La Caixa and Deutsche Krebshilfe. CL is the recipient of a Fellowship from the Gobierno de Navarra. Authors declare that they have no potential conflict of interest.

Manuscript received August 25, 2005. Accepted December 1, 2005.

References

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351:1860-73.
2. Sirchi B, Fowler R. Multiple myeloma. *Lancet* 2004;363:875-87.
3. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-18.
4. Seidl S, Kaufmann H, Drack J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2005; 4:537-54.
5. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2:175-87.
6. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Guthrie JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:719-26.
7. Cigudosa JC, Rao FH, Calasanz MJ, Oderic MD, Michaeli J, Jhanwar SC, et al. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998; 91: 8997-10.
8. Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, et al. Comparative genomic hybridization analysis of 39 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000;60:4519-25.
9. Tracey L, Villuendas R, Dector AM, Spiteri I, Ortiz F, Garcia JF, et al. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood* 2005;102:1042-50.
10. Herrero J, Al-Shawour E, Diez-Utiarte R, Miteos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, et al. CEPAS: a web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33: 3461-7.
11. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CB, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23:41-6.
12. Autio R, Hautaniemi S, Kusanmiemi P, Yli-Harja C, Astola J, Wolf rd, et al. CCH-Fluor: MATLAB toolbox for CGH-data analysis. *Bioinformatics*

- 2008;19:1714-15.
13. Rodríguez-Perales S, Martínez-Ramírez A, de Andrés SA, Valle L, Urioste M, Benítez J, et al. Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:35-43.
 14. Karpas A, Harder L, Czepulkowski B, Elcosham D, Seward R, Drenasheva A, et al. Studies of four new human myeloma cell lines. *Leuk Lymphoma* 2005;46:101-12.
 15. Martínez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Álvarez J, Castrillo JM, Ruiz De La Parte A, et al. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4971-82.
 16. Medina F, Segundo C, Camps-Caro A, González-García L, Briteva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002; 99:2154-61.
 17. Herrero J, Vaquerizas JM, Al-Shahrour E, Cande L, Mateos A, Díaz-Uriarte JS, et al. New challenges in gene expression data analysis and the extended GEEAS. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: W485-91.
 18. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-308.
 19. Hui H, Wiestner A, Rosenwald A, Shafer AL, Campo E, Coogan T, 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;5:191-9.
 20. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, Binz RL, Tian E, Barlogie B, et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42:95-105.
 21. Gutiérrez NC, García JL, Hernández JM, Lumbresas E, Castellanos M, Basillo A, et al. Prognostic and biological significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 2004;104:2661-6.
 22. Al-Shahrour E, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of gene ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 2004;20:578-80.
 23. Mattioli M, Agnelli L, Fabis S, Baldini L, Murabito F, Biciardi S, et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2005;24:2461-73.
 24. Gutiérrez NC, Hernández JM, García JL, Canizo MC, González M, Hernández J, et al. Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 2001; 15:840-5.
 25. Inoue J, Otsuki T, Hirazawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, et al. Overexpression of EDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* 2004; 165:71-81.
 26. Ray ME, Yang ZQ, Albertson D, Kleer CG, Washburn JC, Macoska JA, et al. Genomic and expression analysis of the 8q11-12 amplicon in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2004; 64: 40-7.
 27. Finkbeiner D, Sogayves R, Sadar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207-11.
 28. Aetrom AK, Voz ML, Koz K, Reijer E, Wedell B, Mandahl N, et al. Conserved mechanism of FLAC1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res* 1999;59:918-23.
 29. Hyman E, Kauraniemi E, Hautaniemi S, Wolf M, Mousset S, Rozenblum E, et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:6240-5.
 30. Fabis S, Agnelli L, Mattioli M, Baldini L, Ronchetti D, Murabito F, et al. Characterization of oncogene dysregulation in multiple myelomas by combined FISH and DNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:117-27.
 31. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerron L, Stolte M, Ott G, et al. t(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2009;113:2885-9.
 32. Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Climent J, Karan L, et al. MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009;113: 4589-96.
 33. Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, et al. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in MALT lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 19012-9.
 34. Miguel-García A, Orsio T, Matutes E, Carbonell F, Miguel-Sosa A, Linares M, et al. bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study. *Haematologica* 1998;83:398-304.
 35. Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LC, Sundström C, Clvel I, Tajumoto Y, et al. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 1992;79:495-502.
 36. Kauraniemi E, Badlund M, Monni O, Kallioniemi A. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res* 2001;61:8285-90.

-Haematologica-

Multiple Myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations

Authors: Cristina Largo¹, Borja Saéz², Sara Alvarez¹, Javier Suela¹, Bibiana Ferreira¹, David Blesa¹, Felipe Prosper³, M Jose Calasanz² and Juan C Cigudosa¹.

¹Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain.

²Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Navarra, Spain.

³Area of Cancer, Area of Cell Therapy and Haematology Service, University Clinic, University of Navarra and Foundation for Applied Medical Research, Pamplona, Navarra, Spain.

Running title: ArrayCGH in primary MM samples

Key words: Multiple myeloma, arrayCGH, Hyperdiploid, amplification, homozygous deletion.

Corresponding author: Juan C Cigudosa, PhD.

Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)
Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain.

Phone: +34 91 22469200, Fax: +34 91 2246980

E-mail address: jccigudosa@cnio.es

Financial support: C.L. and B.S. has a PhD fellowship from Gobierno de Navarra. J.S. has a PhD fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. B.F. has a Marie Curie PhD Early Stage Research Training fellowship. Work funded by Red Temática FIS G03/136 Mieloma Múltiple y otras Ganmapatías: de la Génesis a la Terapéutica and by Grant PI040555 from Fondo Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo to JCC

ABSTRACT.

Background and objective: Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell neoplasia in which FISH and CGH studies have shown that genomic changes may affect almost all chromosomes. Our objective was the genomic characterization of CD 138 + multiple myeloma primary samples by means of high resolution array CGH platform. **Design and methods:** For the first time, a high resolution arrayCGH (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), with more than 40.000 probes, has been used to analyze 26 MM primary samples after the enrichment in CD138-positive plasma cells. **Results:** This approach identified copy number imbalances in all cases. Bioinformatics strategies have been optimized to perform data analysis allowing the segregation of hyperdiploid (H-MM) and non-hyperdiploid cases by arrayCGH and the identification of two H-MM subgroups based on the presence of gains in chromosome 7. Additional analysis showed that structural chromosome rearrangements were more frequently seen in H-MM. We also identified the same Xq21 duplication in nearly 20% of the cases that was originated through unbalanced chromosome translocations. High level amplifications and homozygous deletions have been recurrently observed in our series and they involved genes with meaningful function in cancer biology. **Interpretation and conclusions:** This approach has allowed us to identify copy number changes in 100% of the samples. We segregate different MM subgroups based on their genomic profiles and has made possible the identification of great genetic relevance homozygous deletions and amplifications in MM.

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell neoplasia characterized by a wide variability in clinical features, responses to treatment, and survival times among patients (1). Chromosome aberrations, present in virtually all MM (2) include chromosome translocations involving the *IG* loci and/or copy number changes of partial or whole chromosomes (3).

Two major genetic subtypes of MM have been defined: the hyperdiploid variant (H-MM), associated with multiple chromosome trisomies, and the non-hyperdiploid variant (NH-MM) with a high prevalence of *IGH* translocations (4). This classification seems to have relevance in prognosis since, recently, H-MM has been associated with a better survival and a similar response rate to treatment when compared with NH-MM (5).

Chromosome-based comparative genomic hybridization (CGH) has shown that DNA copy number variations (CNV) in MM may affect almost all chromosomes (6-8). We recently described, by array-based CGH (arrayCGH), CNV that resulted in the overexpression of genes included in amplified chromosomal regions (9). Here, we characterized CNV in a panel of CD138 enriched MM primary samples with a high density arrayCGH. Apart from confirming some of the genomic features of MM which have been recently described (10), we observed new recurrent amplifications and homozygous deletions and we characterized a novel duplication involving the Xq21-Xqter chromosome region.

MATERIAL AND METHODS.

Patients and molecular cytogenetics characterization

DNA from CD138+ cells, isolated from bone marrow by means of Magnetic Cell Sorting (Miltenyi Biotec, Auburn, CA/Cell), of 26 MM cases at diagnosis were included. DNA was extracted using DNeasy tissue kit (Qiagen, Germantown, MD). By this mean, all samples were enriched with more than 70% of plasma cells.

The median age was 67.5 years (range: 34-85). There were 16 men and 10 women in our series. Most patients (22/26) were homogenously treated with GEMM2000 protocol designed by the Spanish GEM-PETHEMA group (Table 1). All samples were collected after proper informed consent. All samples were cytogenetically characterized: 85% showed a normal karyotype. We screened our series by FISH with *IGH* (Vysis, Downers Grove, IL) and *IGL* (11) break-apart probes. Nine samples (34.6%) showed *IGH* rearrangements and two (7.7%) had *IGL* rearrangements. FISH assays and Spectral Karyotyping were carried out as described elsewhere (12).

Reference genomic DNA.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood of ten healthy female donors. DNA was extracted with a standard saline precipitation method and was purified by phenol-chloroform extraction using Light Phase-Lock Gel tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Same amounts of each donor DNA were mixed in a female DNA pool in order to use as reference DNA in all hybridizations.

ArrayCGH assays.

Human Genome CGH 44k microarrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) were used in this study. This platform consists of approximately 44000 60-mer oligonucleotide probes that span the human genome with an average resolution below 50 Kb. The platform has gene focused coverage in order to ensure adequate coverage in most commonly studied genomic regions. ArrayCGH assays were performed as previously described (13) with minor modifications. Ten healthy female donors DNA pool was used as reference DNA for all hybridizations. Slides were scanned using an Agilent 2565AA DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Raw data are of free access via our ftp server at www.cnio.es.

Image and Data Analysis

Microarray images were transformed to fluorescence intensities by means of Feature Extraction Software, version 8.1 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Data were analyzed using Agilent CGH Analytics 3.2.25 software. In order to establish gained and lost regions a 500 Kb weighted moving-average window and a Z-score threshold of ± 2.5 were used. Z-score values were obtained for each probe and were categorized into gains and losses. For following analyses, regions of gains and losses were established. A region is defined as a group of consecutive probes that are simultaneously and similarly changed. High level amplifications were defined as consecutive clones, spanning a region, that showed a \log_{10} ratio higher than 0.3 (more than 5 copies) within a gained region and homozygous deletions as consecutive clones with a \log_{10} ratio lower than -1 (no copies) and detected as losses by z -score. Aberrations were categorized in numeric and structural changes. The latest type was segregated in changes larger than 3Mb (>3Mb) and those smaller than 3Mb (<3Mb) regarding high resolution conventional CGH resolution.

Identification of H and NH myelomas.

H or NH-MM was easily classified in our series by arrayCGH. . Based on the array CGH profile a copy number score (CNS) value was assigned to each chromosome. When there was not whole chromosome gain or loss a CNS value of 2 was assigned, when entire chromosome gain occurred a CNS of 3 was assigned and, finally, when loss occurred the CNS was equal to 1. The sum of CNS values of each case was calculated and if the value was from 48 to 74 it was classified as H-MM, when a different CNS was obtained, it was considered NH-MM. Ploidy status was further confirmed by a standard FISH assay based on centromeric probes (Vysis, Downers Grove, IL).

Definition of Smallest Overlapping Regions of Imbalance (SORI)

Genomic aberration region data were used to obtain the smallest overlapping regions of imbalance (SORI). Each SORI represented the most recurrent region of imbalance whose limits were defined by the minimum number of clones with the highest percentage of recurrence (10). SORI were defined independently for gain and losses. They were evaluated to define regions targeted by overlapping events in two or more samples. SORI limits were defined by the clones placed at the boundaries of the gained or lost region of the case showing the smallest unbalanced region. After SORI delimitation the presence or absence of belonging aberration was assigned to each sample (0=absence, 1=presence).

Bioinformatics and statistical analysis.

GEPAS Suite software (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) was used for unsupervised clustering, supervised analysis and gene annotation. A region was considered as statistically significant if adjusted p value was below 0.05. For statistical comparison of difference in the number of copy number changes in different groups U Mann-Whitney test was used with the SPSS v 13.0 package.

RESULTS.

A high number of genomic aberrations are found in MM.

The presence of DNA copy number changes in 26 primary MM samples was analyzed by high resolution arrayCGH. Most of the samples had a normal karyotype at diagnosis (Table 1), however, genomic copy number analysis, performed on CD138-positive cells, allowed the identification of copy number variations (CNV) in 100% of the cases. A total of 270 copy number changes (ranging from 2 to 26) were found, 145 were copy number gains and 125 were losses. The median size of aberration was 36 Mb ranging from 0.026 Mb to 199 Mb. The most frequent gains involved chromosomes 19 (65%), 9 (42%), 15 (42%), 5 (38%), 3 (38%), 7 (35%) and 1q (38%), and losses in 13q (38%), 8p (35%), 16p (31%), 22q (31%) and 1p (27%). Regarding the nature of the aberrations, two types of copy number changes were observed: entire chromosome gains and losses (**numeric changes**) and changes only affecting chromosomal regions (**structural changes**). The second group was disaggregated into two other subgroups regarding the size of the rearrangements: those that spanned more than 3Mb, and those that spanned less than 3Mb. The most frequent aberrations were structural >3Mb (41.5% of the changes), followed by numeric changes (31.1%).

Two major genetic categories of MM do exist: Hyperdiploid (H) MM with 48 to 74 chromosomes due to specific chromosome gains and nonhyperdiploid (NH) MM without this genotype. 50% of our cases were H-MM and the other half were NH-MM, initially assessed by arrayCGH and confirmed by conventional FISH (Table 1). Furthermore, unsupervised clustering, carried out with the most frequent aberrations found in our series, segregated two groups belonging to H-MM and NH-MM (Supplementary Figure 1). When H-MM and NH-MM were compared, we found that numeric changes were significantly more frequent in H-MM samples ($p < 0.001$) due to a higher frequency of whole chromosome gains ($p < 0.001$). However, monosomies seemed to be more frequent in NH-MM group ($p = 0.076$). In the case of structural aberrations, we found that gains >3Mb were significantly more frequent ($p = 0.037$) in H-MM cases (Supplementary Table 1). Other types of changes were equally distributed in both groups.

Clustering analysis allowed identification of two different H-MM subgroups.

In order to obtain a reliable picture of common aberrations present in this series, we defined the Smallest Overlapping Regions of Imbalance (SORI) for gains and losses.

Sixty-eight SORI were identified, 33 gains and 35 losses (Table 2). The most frequent gained SORI was 19p13.12-pter (65%) followed by 9q34, 19q13 and 19q13.2 (50%) and the most frequent losses were in 13q12-q21 (38%), 13q12.12 (35%), 8p12-p22 (27%) and 16p13.12 (23%). The median size was 1.5 Mb ranging from 0.026 Mb (a few genes) to 102 Mb (whole chromosomes). Deletion at 16p13.12, present in 23% of the cases, affected only *ERCC4*, a modifier gene reported to be involved in breast cancer (14).

Unsupervised and supervised clustering analyses were performed using SORI as variables. Unsupervised analysis was able to segregate H-MM from NH-MM, and after a supervised analysis, gained regions in chromosomes 15, 5, 19, 3, 9, 7 and 11q were significantly (adj p-value <0.05) more frequent in the H-MM group. In our series, the H-MM group could be further segregated into two subgroups according to the presence of gains in chromosome 7 (adj p-value= 0.03). In the case of NH-MM, the unsupervised clustering segregates two different subgroups. One of the clusters, with only two cases, was characterized by the presence of a high number of copy number variations, such as gains in 8q24.21 (*C-MYC*) and absence of *IGH* translocations (Figure 1).

New genomic aberrations in MM.

High Level Amplifications (HLA) and Homozygous Deletions (HD) represented 7% of the observed CNV. They appeared in H-MM and NH-MM, but, in general, clustered in cases that accumulate a high number of genomic aberrations. Nine HLA were found and most of these regions were also gained (Table 3) in other cases from our series. Among the genes contained in all the amplified regions, 31% are involved in signal transduction (*GO:0007165*), such as *DIRAS2*, *ADORA2B*, *TNFRSF13B*, *RALGDS*, *CCNE1* and *SYK*. Six HD were observed (Table 3). Reinforcing the putative pathogenic role of this finding, these regions also showed up as single copy losses in several additional samples of our series. Of interest, we observed a 376 Kb HD in chromosome 13, where four genes (*HSMPP8*, *PSPC1*, *ZNF237*, *ZNF198*) are located (Table 2). This deletion was observed in two cases (#15 and 20). Case #20 showed a single copy of chromosome 13 that involved in a translocation with chromosome 14 (Figure 1). Case #15 showed a HD that included two consecutive clones involving only *ZNF198*. In general, the genes are involved in cellular physiological processes (*GO:0050875*), although some of them are more specifically involved in cell death (*GO:0008219*) and signal transduction (*GO:0007165*), like *BIRC2*, *BIRC3* and *MAP3K5*; and others are metalloendopeptidases (*GO:0008237*) like *MMP8*, *MMP10*, *MMP1* and *MMP13*.

A novel duplication on Xq21.33 was identified in 5 out of 26 primary cases and in the MM cell line L363. FISH studies allowed the mapping of the duplication breakpoints that clustered around a 10 Mb in Xq21.33 (from nearly 86122579bp to 98277428 bp). SKY analysis (Figure 1) demonstrated that duplications were the unbalanced outcome of translocations with breakpoints at Xq21: in L363 involving chromosome 14q, t(X;14)(q21.33; q31.1); and in case #20 involving chromosome 21; t(X;21)(q21.33;q22.3). The breakpoint in chromosome 14 was found out by its arrayCGH profile and we confirmed that *IGH* was not involved by means of a combination of chromosome X painting probe (Qbiogene) and LSI *IGH* Dual Colour Break Apart probe (Vysis) in same hybridization.

We analyzed the possible association between response to treatment and genomic changes. No differences in the response to treatment were observed when we compared H-MM with NH-MM. However, differences in the response rate were found for specific SORI: cases with deletions in 16p13.2 showed a worse response to treatment ($p=0.025$); cases with deletions in 16q24.2 and chromosome 15 gains showed a tendency to have a better and worse response, respectively.

DISCUSSION

Multiple myeloma is an incurable malignant plasma cell (PC) neoplasia characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. Genetically, MM is defined by a large and variable number of genetic and chromosome rearrangements. In general, two major genetic subtypes of MM have been defined: the hyperdiploid variant associated with multiple chromosome trisomies and the non-hyperdiploid variant with high prevalence of *IGH* translocations (5). While the study of the biology of MM bearing *IGH* translocations has been extensively studied (15), little is known about the impact of genomic gains and losses in MM pathogenesis. In this regard, recently candidate genes overexpressed in amplified chromosomal regions have been proposed in MM cells lines (9). These events haven been described in other types of cancer and have been used as therapeutic targets.

In this study, an arrayCGH platform has been used for the analysis of copy number imbalances on CD138 positive PC. Although, as expected, most of the samples showed an unaltered karyotype at diagnosis, we achieved the identification of copy number variations in all of them. Observed frequencies of CNV, as losses of chromosome 13q and duplications of chromosome 1q, and Ig genes translocations, were concordant with previous studies (6, 7, 9, 10, 16). As a consequence of our analysis, arrayCGH efficiently allowed us to segregate the series in H-MM and NH-MM; half of the cases were H-MM and half NH-MM. The presence of *IGH* translocations was associated with NH-MM and in H-MM one case showed *IGH* translocations and two *IGL* translocations. It has been suggested that translocations present in H-MM are secondary events (5, 16).

ArrayCGH provides a level of resolution that overcome the limits of chromosome-based CGH that is, in the best conditions, near 3 Mb. Due to the high resolution of the platform (44K) we identified several aberrations smaller than 3 Mb, distributed in both H and NH cases that have not been previously described. We delimited several SORI that provide a reliable picture of the aberration described in MM (10). These SORI and unsupervised clustering identified two H-MM group regarding the presence of gains in chromosome 7 (adj p-value= 0.03). The group associated with chromosome 7 gains, also clustered those cases with duplications in 1q (5 cases) and deletions in 13q (3 cases). These data are in concordance with the genomic patterns described by Carrasco et al (10). Gains in 7q have been associated with a poor outcome in Burkitt's lymphoma (17).

The followed approach also allowed the identification of novel genomic markers and the definition of high level amplifications and homozygous deletions. Nine HLA were identified. Some of them, as 9q22.2, 19q13 and 16q22.2, have not been previously described in MM, but may harbour candidate oncogenes, as we have demonstrated in mantle cell lymphoma, where we observed primary samples showing amplification and overexpression of *SYK* (18). In case of HD, most of them have not been previously described in MM, Reinforcing the putative pathogenic role of this finding, these regions also showed up as single copy losses in several additional samples of our series. In HD in chromosome 13, *ZNF198* seems to be a good candidate for the target of the deletion because, besides HD described in case #20, in case #15, the HD covered only *ZNF198* gene. Furthermore, candidate genes as *PORIMIN*, *YAPI* and *MMP8*, which are located in our HD located at 11q22.2, have been confirmed as deleted and down regulated in a previous report (10).

Five cases showed duplication on Xq21.33. Although some CGH studies have reported data on Xq aberrations (19, 20), our work is the first description about the frequency and genetic origin of this marker in MM.

Statistically significant differences in the response to treatment were not observed when H-MM and NH-MM were compared, thus, confirming previous reports (10). However, differences in the response rate were found for specific SORI: such as 16p13.2, 16q24.2 and chromosome 15 gains.

In summary, our study represents the analysis of CNV in MM at the highest level of resolution ever reported. Our work includes some confirming data, obtained from other technological approaches, and it provides a complete genomic characterization of the two genetic categories of MM. Additionally, we have demonstrated for the first time that extreme genomic aberrations, as HLA and HD, are frequent events in MM. We think that these data warrant further investigation to get a deeper insight about the role of genomic instability in MM and its potential use for therapeutic purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Marta R. Salazar (University Clínic, Pamplona), Maite Ardanaz (Hospital Txagorritxu, Vitoria), Jose Ferreiro (Hospital Donostia, San Sebastian), Filomena Floristán (Hospital de Cruces, Bilbao), Jose A Marquez (Hospital de Basurto, Bilbao), Carmen Mateos (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), Ana Gorosquieta (Hospital de Navarra, Pamplona) and Gotzon Pereda (Hospital de Santiago, Vitoria) for kindly providing samples and clinical data. We are also grateful to M Carmen Martín Guijarro, Carmen Carralero and Gloria Soler for her excellent technical support.

REFERENCES

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004;351(18):1860-73.
2. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003;4(9):557-64.
3. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):175-87.
4. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004;64(4):1546-58.
5. Chng WJ, Santana-Davila R, Van Wier SA, Ahmann GJ, Jalal SM, Bergsagel PL, et al. Prognostic factors for hyperdiploid-multiple myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia* 2006;20(5):807-13.
6. Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Otero MD, Michaeli J, Jhanwar SC, et al. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998;91(8):3007-10.
7. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, Lumbreras E, Castellanos M, Rasillo A, et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 2004;104(9):2661-6.
8. Rao PH. Comparative genomic hybridization for analysis of changes in DNA copy number in multiple myeloma. *Methods Mol Med* 2005;113:71-83.
9. Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, et al. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica* 2006;91(2):184-91.
10. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 2006;9(4):313-25.
11. Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, Schlegelberger B, Grote W, Martinez-Climent JA, et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer* 2002;98(3):470-4.
12. Rodriguez-Perales S, Martinez-Ramirez A, de Andres SA, Valle L, Urioste M, Benitez J, et al. Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148(1):35-43.
13. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(51):17765-70.
14. Smith TR, Levine EA, Perrier ND, Miller MS, Freimanis RI, Lohman K, et al. DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(11 Pt 1):1200-4.
15. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106(1):296-303.
16. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998;12(6):960-9.
17. Garcia JL, Hernandez JM, Gutierrez NC, Flores T, Gonzalez D, Calasanz MJ, et al. Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* 2003;17(10):2016-24.

18. Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, et al. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2006;132(3):303-16.
19. Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, et al. Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* 2004;165(1):71-81.
20. Liebisch P, Wendl C, Wellmann A, Krober A, Schilling G, Goldschmidt H, et al. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia* 2003;17(12):2535-7.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES.**Figure 1. Unsupervised clustering results, ideograms showing arrayCGH profiles and SKY images.**

a) Unsupervised clustering revealing the molecular heterogeneity in MM primary samples. Unsupervised clustering was carried out with 68 SORI identified. The analysis allowed the segregation of the hyperdiploid cases from the nonhyperdiploid. The H-MM group could be divided in two subgroups. Statistically significant SORI that separated H-MM and NH-MM are highlighted with a blue key, and chromosome 13 deletion and 1q duplication are also marked with a grey arrow.

b) Red and blue lines depict the 500 Kb moving average CGH ratio. Bars on the left indicate losses and bars on the right gains (z-score threshold of 2). **Left ideogram)** Chromosomes X, 13 and 21 arrayCGH plots and SKY picture in case #20. Control DNA used was a female pool and sample was male. Xq duplication is depicted as a normal pattern after a loss (red arrow). Chr 21 trisomy and chromosome 13 homozygous deletion are also shown. SKY assays confirmed the arrayCGH results and uncovered that Xq21 duplicated fragment and remaining chromosome 13 were involved in different translocations. **Right ideogram)** ArrayCGH profiles of chromosome X and 14 showing Xq21 duplication (red arrow) and chromosome 14 breakpoint in L363. SKY analysis identifies that duplicated fragment was involved in a translocation with chromosome 14.

TABLES

Table 1. General features of multiple myeloma samples included in the study. Besides clinical features, Ig translocation status (Ig t) determined by FISH and known genetic features determined by array CGH are shown. M: Male, F: Female, NT: not treated.

Case	M/F (age)	Treatment	Response	Karyotype	FISH	Array CGH			
					Ig t	Ploidy	13q-	1q+	dup Xq
1	M (78)	GEMM2000	NO	46,XY / 45,X,-Y	-	H	-	-	-
2	M (66)	GEMM2000	NO	46,XY	-	H	-	-	+
3	M (39)	GEMM2000	YES	46,XY	IGH+	NH	-	-	-
4	M (61)	GEMM2000	YES	46,XY	-	NH	-	+	+
5	F (67)	NT	x	46,XX	-	NH	-	-	-
6	M (71)	GEMM2000	NO	46,XY	IGH+	NH	+	+	-
7	M (73)	GEMM2000	NO	46,XY	IGH+	NH	-	-	-
8	F (75)	NT	x	46,XX	-	NH	+	-	-
9	M (68)	GEMM2000	NO	57,XY<3n>,-1,der(6)t(1q;6q)x2,-8,-13,-14,-16,-17,-18,-20	IGL+	H	-	+	-
10	M (70)	GEMM2000	YES	46,XY	-	H	+	-	-
11	M (72)	GEMM2000	YES	46,XY	IGL+	H	+	+	+
12	M (58)	GEMM2000	YES	46,XY	-	NH	+	+	-
13	F (34)	GEMM2000	YES	NA	IGH+	NH	+	-	-
14	F (67)	GEMM2000	YES	46,XX	IGH+	NH	-	-	-
15	M (57)	GEMM2000	YES	46,XY	IGH+	NH	+	-	-
16	M (67)	Thalidomide vs placebo	YES	46,XY	-	NH	-	-	-
17	F (52)	GEMM2000	YES	46,XX,inv(9)(q11q13) [100%]	-	H	-	+	-
18	M (85)	NT	x	46,XY	-	H	-	-	-
19	F (62)	GEMM2000	YES	46,XX	-	H	+	+	+
20	M (59)	GEMM2000	NO	46,XY,der(1p),+3,+5,der(8p),der(9p),-13,add(13p),add(14)(q32),+15,er(16q),der(20q),+mar [100%]	-	H	+	+	+
21	F (66)	GEMM2000	YES	46,XX [67%]50,XX,add(1)(p36),der(3q),t(3;3)(q?;q?),+7,add(12)(p13),der(14q),+mar [33%]	-	H	-	-	-
22	F (71)	GEMM2000	YES	46,XX	IGH+	NH	+	-	-
23	M (73)	GEMM2000	YES	46,XY	-	H	-	-	-
24	M (81)	GEMM2000	YES	46,XY	IGH+	H	-	-	-
25	F (74)	GEMM2000	YES	NA	IGH+	NH	-	+	-
26	F (54)	GEMM2000	NO	45,X,-X[87%] 51,XX,der(1)(p?),+3,+5,+7,+8,-9,+11,der(14)(q?),add(16)(p?),+18 [13%]	-	H	-	+	-

Table 2: Description of 68 recurrent SORI identified in MM cases.¹ SORI significantly (adj p-value <0.05) more frequent in H group than in NH group. ² Statistically significant SORI identified in one of the H groups. ³ SORI present in one of the NH group, but they do not reach statistical significance.

SORI									
Gains					Losses				
Chr	Region	Start	Size (Mb)	%	Chr	Region	Start	Size (Mb)	%
1	1q	142902432	102.520	38%	1	1p36.32	1536308	5.000	8%
3	3pter ¹	224727	3.337	35%	1	1p36.12	23265113	0.604	8%
3	3q11-q22 ¹	108062308	32.496	38%	1	1p33 ³	50669458	3.014	8%
3	3q26-qter ¹	197698952	1.593	42%	1	1p31.1 ³	80821425	2.856	12%
5	5p-q13.2 ¹	148243	73.955	38%	1	1p21.3-p31.1	84171854	12.042	12%
5	5q21.11q-ter ¹	96057266	84.560	38%	1	1p12-p21.1	103799708	14.591	15%
6	6p22.1-25.2	352463	26.129	23%	3	3p24.3	24930353	0.880	12%
6	6q12	64228424	3.086	15%	4	4p16.2 ³	1661893	0.184	12%
6	6q12	69403244	1.154	15%	4	4p15.33 ³	13019621	0.285	12%
7	7p21.1 ^{1,2}	5637996	0.178	35%	4	4p15.31-p15.1 ³	16751089	14.070	8%
7	7p21.1 ^{1,2}	11853187	0.515	35%	4	4p13 ³	44691513	1.538	8%
7	7p21.1 ^{1,2}	16776548	0.337	31%	4	4q13.2-q22.1	66059589	26.058	8%
7	7p14.1 ^{1,2}	36074495	0.333	35%	6	6q23.2	136920041	0.341	12%
7	7q ^{1,2}	61960303	96.628	27%	6	6q26 ³	160608251	0.522	15%
8	8q23.3-q24.21	117725989	8.097	12%	7	7p22	1263119	0.093	8%
8	8q24.21 ³	128548643	0.407	15%	8	8p12-p22	13991907	13.105	27%
9	9q22.2	89830592	1.734	42%	8	8p11.22	37847079	0.527	19%
9	9q34.2 ¹	132972692	0.043	50%	8	8q23.1	107376988	0.545	8%
11	11q13.2-q13.4	68821295	7.553	31%	9	9p21.3	21067574	0.786	8%
11	11q23.2-qter ¹	114350685	19.601	35%	11	11q22.1	100828925	1.492	8%
15	15 ¹	19109124	81.060	42%	12	12p13.32	3509030	0.820	8%
16	16q22.2	69322931	0.553	8%	12	12p12.1	21152676	0.400	12%
17	17p13.2	3632698	1.334	12%	12	12q21.33	86882565	0.906	8%
17	17p11	16763408	0.663	15%	13	13q12.12	19140499	0.376	35%
17	17q21.32	41458670	0.242	23%	13	13q12-q21	45637710	20.455	38%
18	18	170229	75.913	15%	14	14q13.2-q21.3	30209271	16.915	12%
19	19p13.12-pter ¹	232080	17.754	65%	14	14q24.2	68763265	14.399	15%
19	19q13	34522544	1.330	50%	14	14q32.32	101569155	1.268	15%
19	19q13.2 ¹	42921103	0.673	50%	16	16p13.2	3646249	0.601	8%
20	20q11.22	31714033	0.387	8%	16	16p13.12	13923497	0.026	23%
21	21q21.1	15295891	4.694	12%	16	16q24.2 ³	83644296	1.600	23%
X	Xq21.333-q25	97661774	26.092	19%	17	17p13.2-p12	7054388	9.209	15%
X	Xq25-qter	126030916	28.374	19%	20	20q12	37664253	0.577	8%
					22	22q11.22	21004565	0.344	19%
					22	22q12.1	22555378	5.501	23%

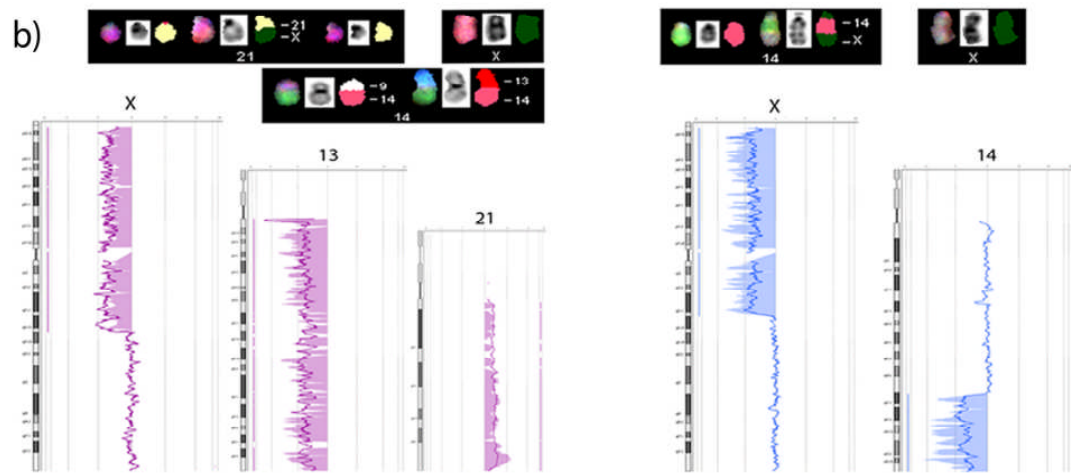
Table 3. Description of amplifications and homozygous deletions identified in MM.

¹When recurrent amplification was revealed the smallest overlapping region of amplification has been described. ² Case 23634 shows two consecutive clones homozygously deleted covering *ZNF198* gene locus. HLA: amplified, G: gained, HD: homozygous deletion, Hem. D: Hemizygous deletion.

AMPLIFICATIONS						
Chr	Region	Start	Size (Mb)	Cases HLA	% cases G	Genes in the region
6	6q12	64228424	3.086	26	11.5	<i>PTP4A1, PHF3, LOC389405, EGFL11</i>
6	6q12	69403244	1.154	26	11.5	<i>BAI3, C6orf209</i>
9	9q22.2	89830592	1.734	4	30.8	<i>LOC340515, DIRAS2, SYK, BF510209, AUH, NFIL3, ROR2</i>
9	9q34.2	132972692	0.043	20, 19 ¹	42.3	<i>CEL, RALGDS</i>
14	14q21.1	44463153	0.372	14	0	<i>BTBD5, KIAA0423, PRPF39, FKBP3, C14orf106</i>
16	16q22.2	69441287	0.312	4	3.8	<i>HYDIN</i>
17	17p13.2	3632698	1.334	26	7.7	<i>HSA277841, CAMKK1, P2RX1, ATP2A3, ZZEF1, ANKFY1, UBE2G1, MYBBP1A, FLJ90165, ALOX15, PELP1, ARRB2, CXCL16, ZMYND15, TM4SF5, LOC284013, PSMB6, PLD2, MINK1, CHRNE, GP1BA, SLC25A11, RNF167, PFN1, ENO3, SPAG7, CAMTA2, INCA1, KIF1C, GPR172B, FLJ30726, ZNF232</i>
17	17p11	15589242	1.837	23, 26 ¹	7.7	<i>FLJ40244, ADORA2B, TTC19, NCOR1, PIGL, PRR6, TRPV2, FLJ35696, ZNF287, ZNF624, FLJ36492, TNFRSF13B, M-RIP, LOC201164, FLCN, COPS3, NT5M, MED9, RASD1, PEXT</i>
19	19q13	34522544	1.299	4	46.2	<i>LOC284395, POP4, PLEKHF1, C19orf12, CCNE1, C19orf2, ZNF536</i>
HOMOZYGOUS DELETIONS						
Chr	Region	Start	Size (Mb)	Cases HD.	% Hem.D.	Genes in the region
6	6q26.2	137061308	0.199	4	7.7	<i>MAP3K5, PEX7</i>
11	11q22.1	100828925	1.491	2	3.8	<i>TRPC6, ANGPTL5, KIAA1377, YAP1, BIRC3, BIRC2, PORIMIN, MMP7, MMP20, MMP27, MMP8, MMP10, MMP1, MMP3, MMP12, MMP13</i>
13	13q12	19140499	0.376	20, 15 ²	26.9	<i>HSMPP8, PSPCI, ZNF237, ZNF198</i>
22	22q11.22	20994020	0.354	12	15.4	<i>IGLC2, SUHW2, SUHW1, PRAME</i>
X	Xq21.31-21.33	86728457	10.933	4	0	<i>PABPC5, NAP1L3, FLJ37659, DIAPH2, CPXCRI, KLHL4, PCDH11X</i>
X	Xq25	123753696	2.090	4	0	<i>WDR40B</i>

FIGURES

Figure 1.



SUPPLEMENTARY MATHIERIAL.**Supplementary Table 1. Distribution of number and type of aberrations along the different groups of MM cases. * Statistically significant differences (U Mann-Whitney).**

	<i>N° Numeric Changes</i>	<i>N° Structural >3Mb Changes</i>	<i>N° Structural <3Mb Changes</i>	<i>N° total changes</i>
Gain	74	50	21	145
Losses	10	62	53	125
Total	84	112	74	270
	<i>N° Numeric Changes</i>	<i>N° Structural >3Mb Changes</i>	<i>N° Structural <3Mb Changes</i>	<i>N° total changes</i>
IG+ (11 cases)				
Gain	18*	11	9	38
Losses	7	9*	21	37
Total	25*	20*	30	75
IG- (15 cases)				
Gain	56*	39	12	107
Losses	3	53*	32	88
Total	59*	92*	44	195
	<i>N° Numeric Changes</i>	<i>N° Structural >3Mb Changes</i>	<i>N° Structural <3Mb Changes</i>	<i>N° total changes</i>
IGH+ (9 cases)				
Gain	5*	5*	9	19
Losses	6	6*	16	28
Total	11*	11*	25	47
IGH- (16 cases)				
Gain	69*	45*	12	126
Losses	4	56*	37	97
Total	73*	101*	49	223
	<i>N° Numeric Changes</i>	<i>N° Structural >3Mb Changes</i>	<i>N° Structural <3Mb Changes</i>	<i>N° total changes</i>
H-MM (13 cases)				
Gain	69*	36*	4	109
Losses	2	36	26	64
Total	71*	72	30	173
NH-MM (13 cases)				
Gain	5*	14*	17	36
Losses	8	26	27	61
Total	13*	40	44	97

Supplementary Figure 1. Unsupervised clustering carried out with the most frequent aberrations found in our series. The unsupervised analysis was able to segregate H-MM and NH-MM in different branches. The H-MM was characterized by gains in chromosomes 19, 15, 11, 9, 7, 5 and 3 that were not in NH-MM. Chr 13 deletions and 1q duplications are distributed along both groups.

