

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Factores pronósticos y biomarcadores moleculares en gammopatías monoclonales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Cuenca Navarro

DIRECTORES

Joaquín Martínez López
Beatriz Sánchez-Vega Carrión

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

FACTORES PRONÓSTICOS Y BIOMARCADORES MOLECULARES EN
GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Isabel Cuenca Navarro

DIRECTOR

Joaquín Martínez López y Beatriz Sánchez-Vega Carrión

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

A mi familia,

A Pedro,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y como no podría ser de otra manera, agradezco al Dr. Joaquín Martínez por haber puesto su confianza en mí, por haberme dado esta gran oportunidad y por dejarme formar parte de este maravilloso grupo de investigación que ha formado y no para de crecer. Admiro su valentía y ambición por alcanzar grandes cosas, por su aporte y lucha en la investigación contra el cáncer. Gracias por estar siempre que se te necesita.

En segundo lugar, agradezco a también mi directora la Dra. Beatriz Sánchez-Vega, por enseñarme tantas cosas, tanto profesionales como de la vida misma. Gracias por confiar plenamente en mí, demostrármelo y ayudarme a coserme estas alas con las que se que puedo llegar hasta donde quiera.

Gracias también a la Dra. Rosa Ayala, jefa del laboratorio, por preocuparse por mi y estar siempre que la he necesitado.

A mi compañero David de la séptima, por su ayuda infinita con la bioinformática.

A todos mis compañeros del laboratorio, en especial a MariLuz y Alba, por vuestra comprensión y apoyo y escuchar todas mis batallitas y por todas las risas que nos recargan de energía. A Vanesa, porque la energía no miente, a Paloma, por todos los: ¡Isa, vamos a comer! y tus consejos de madre. A Antonio, por nuestras conversaciones infinitas. A Lucía, mi primera alumna de TFM. A Richard, Gonzalo, Iciar, Esther, Paqui, MariJose, Blanca, María, Alejandras, Lauras, Yanira, Alicia, Merche, Pedro, Santi, Miguel, Jaime... Todos me han aportado algo. A mis chicas Nuria y Sandri.

A mis padres y a mi hermanas, los pilares de mi vida. Gracias por estar siempre ahí, por escuchar todas mis "palabrejas" y hacer como que me entendéis. Papa, gracias por leerme mi trabajo de fin de carrera, ¡esto van a ser unas cuantas páginas más! Papa y mama, gracias por impulsarme siempre a lo más alto, por creer en mi y por los infinitos: "Isabel, lo que tu decidas, estará bien. Te apoyamos." A mi hermanas, saber que siempre estáis ahí, es un regalo de la vida. Os quiero tanto. También a todo el resto de la familia, a mi abuela Regina, por alegrarme los días con una sola llamada.

A Pedro, mi apoyo incansable e incondicional. Gracias por cuidarme como lo haces siempre pero mucho más durante este proceso. Este proceso en el que pasa por todas las emociones, alegría, ilusión, frustración, miedo, cansancio, valentía. Varias veces.

Te aseguro que vamos a recuperar todos esos: un minuto y acabo, dame 5 minutos y estoy, termino este apartado y voy. Gracias por esa paciencia. Por motivarme a ser mejor, a soñar a lo grande y a poner los pies en la tierra también. Por ser mi estrella polar cuando me he perdido. Gracias también a su familia, mi familia.

A mis amigas Ampa, Paloma, Viole, Laura, Sara, por mostrar siempre interés en lo que hago, y aunque a veces no me entiendan, nunca se cansan de preguntar y animarme. Viole cree que voy a ganar un Nobel. Por ser casa. Os quiero, y lo sabéis.

A mis amigas Ángela y Cristina, por todas la preguntas sobre mohos, plantas, setas y cualquier cosa relacionada con la biología. Por querer que siempre os cuente cosas nuevas.

Gracias.

INDICE

RESUMEN/ ABSTRACT

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DEFINICIÓN Y ESTADO ACTUAL DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	1
1.2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	2
1.3. FACTORES PREDICTIVOS DE MALIGNIDAD DE LA GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO.....	3
1.4. AMILOIDOSIS.....	6
1.4.1. <i>Amiloidosis de cadenas ligeras (AL)</i>	8
1.5. MIELOMA MÚLTIPLE.....	26
1.5.1. <i>Definición y aspectos generales del MM.</i>	26
1.5.2. <i>Epidemiología.</i>	26
1.5.3. <i>Etiología y mecanismos moleculares.</i>	27
1.5.4. <i>Estadios y evolución clínica del Mieloma Múltiple.</i>	29
1.5.5. <i>Factores pronósticos y estadificación de los pacientes.</i>	31
1.5.6. <i>Alteraciones citogenéticas, moleculares y perfil mutacional del mieloma múltiple.</i>	32
1.5.7. <i>Vías de señalización alteradas en el mieloma múltiple.</i>	34
1.5.8. <i>Tratamientos</i>	35
1.5.9. <i>Fármacos inmunomoduladores.</i>	37
1.5.10. <i>Anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento del mieloma múltiple.</i>	38
1.6. HETEROGENEIDAD CLONAL.....	39
1.7. GENÓMICA Y MEDICINA DE PRECISIÓN.....	41
1.7.1. <i>Secuenciación masiva en las neoplasias hematológicas.</i>	43
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	47
2.2. OBJETIVOS.....	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PACIENTES CON AMILOIDOSIS DE CADENAS LIGERAS (AL).....	51
3.1.1. <i>Pacientes y muestras.</i>	51
3.1.2. <i>Preparación de las muestras y extracción del ADN.</i>	52
3.1.3. <i>Generación de las librerías de los exomas.</i>	53
3.1.4. <i>Secuenciación masiva en Illumina.</i>	58
3.1.5. <i>Estudio del repertorio inmune de las inmunoglobulinas.</i>	60
3.1.6. <i>Secuenciación masiva en Ion Torrent.</i>	65
3.1.7. <i>Análisis bioinformático.</i>	66
3.1.8. <i>Rutas moleculares y de señalización asociadas a los genes mutados.</i>	73
3.1.9. <i>Comparativa del perfil genético entre la amiloidosis AL y el mieloma múltiple.</i>	73
3.2. ESTUDIO DEL PERFIL MUTACIONAL MEDIANTE UN PANEL DE NGS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.....	74
3.2.1. <i>Pacientes y muestras.</i>	74
3.2.2. <i>Purificación celular y extracción del ADN.</i>	75
3.2.3. <i>Diseño del panel.</i>	75
3.2.4. <i>Estudio de pacientes incluidos en el ensayo clínico GEM12<65.</i>	80
3.2.5. <i>Análisis bioinformático.</i>	80
3.2.6. <i>Validación por arrays de CGH de los CNV.</i>	80
3.3. ENSAYOS DE DINÁMICAS CLONALES.....	81
3.3.1. <i>Cultivos celulares</i>	81
3.3.2. <i>Ensayos de competición clonal</i>	81
3.4. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO.....	84
4. RESULTADOS.....	85
4.1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN INMUNOGENÉTICA DE PACIENTES CON AMILOIDOSIS DE CADENAS LIGERAS (AL). 87	
4.1.1. <i>Descripción del escenario mutacional en amiloidosis AL.</i>	87

4.1.2.	<i>Análisis del repertorio de los reordenamientos de las inmunoglobulinas en amiloidosis AL y MM.</i>	92
4.1.3.	<i>Rutas y vías de señalización alteradas.</i>	93
4.1.4.	<i>Identificación y estudio de las variaciones en el número de copias.</i>	95
4.1.5.	<i>Firmas mutacionales.</i>	97
4.1.6.	<i>Comparativa amiloidosis AL vs MM.</i>	99
4.1.7.	<i>Correlación con las variables clínicas</i>	101
4.1.8.	<i>Análisis de la supervivencia libre de progresión</i>	103
4.2.	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PANEL DE NGS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL MM.	104
4.2.1.	<i>Resultados de validación de la versión 1.</i>	104
4.2.2.	<i>Resultados de validación de la versión 2.</i>	106
4.2.3.	<i>Panorama mutacional, CNV y traslocaciones en muestras del ensayo clínico GEM12</i>	109
4.3.	ENSAYOS DE DINÁMICAS CLONALES.	118
4.3.1.	<i>Ensayos de competición clonal.</i>	118
5.	DISCUSIÓN	123
5.1.	CARACTERIZACIÓN INMUNOGENÉTICA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS CLONALES DE LA AMILOIDOSIS DE CADENAS LIGERAS.	125
5.2.	VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DEL PANEL DE GENES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL MIELOMA MÚLTIPLE.	133
5.3.	ESTUDIO DE MODELOS DE COMPETICIÓN CLONAL COMO BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO, PROGRESIÓN Y LA RESISTENCIA EN EL MIELOMA MÚLTIPLE	138
6.	CONCLUSIONES	141
7.	BIBLIOGRAFÍA	145
8.	ANEXOS	161

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de las proteínas del suero.

Figura 2. Espectro de la posible progresión de MGUS.

Figura 3. Esquema de los procesos involucrados en la formación de las fibras amiloides en amiloidosis AL.

Figura 4. Cinética de formación del amiloide.

Figura 5. Afectación de órganos en amiloidosis AL.

Figura 6. Evidencia histológica de fibrillas amiloides en el tejido.

Figura 7. Representación de los 3 sistemas de estadificación de riesgo en amiloidosis AL.

Figura 8. Patrones de hibridación normal y anormal mediante dos estrategias.

Figura 9. Diagrama de flujo que muestra el tratamiento adaptado al grupo de riesgo al que pertenecen los pacientes con amiloidosis AL.

Figura 10. Maduración de las células B.

Figura 11. Progresión del mieloma múltiple

Figura 12. Rutas de señalización alteradas en el mieloma múltiple.

Figura 13. Mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma.

Figura 14. Mecanismo de acción de los fármacos inmunomoduladores mediante la unión a CRBN.

Figura 15. Modelos de evolución tumoral.

Figura 16. Esquema del proceso de tagmentación.

Figura 17. Funcionamiento de las microbolas AMPure XP

Figura 18. Esquema de la reacción de hibridación y captura

Figura 19. Esquema de una librería completa.

Figura 20. Proceso de *clustering* (Illumina).

Figura 21. Proceso de dos ciclos de secuenciación mediante la tecnología Illumina.

Figura 22. A. Análisis por PCR de los reordenamientos *IGH (VH-JH)*. B. En *IGK*

Figura 23. Esquema del flujo de trabajo seguido para la realización de las librerías de los genes de las inmunoglobulinas *IGH* e *IGK*.

Figura 24. Química de secuenciación de Ion Torrent.

Figura 25. Proceso de amplificación median PCR en emulsión (Ion Torrent).

Figura 26. Esquema del flujo de trabajo del programa MiXCR para identificación y cuantificación de clonotipos del repertorio de IG.

Figura 27. Genes y regiones incluidas en el panel de MM para la detección de SNV, INDEL, CNV, Tx y reordenamientos.

Figura 28. Ficha técnica kit KarioNIM Leukemia.

Figura 29. Esquema de la generación de sublíneas WT y mutantes y su posterior marcaje con proteínas fluorescentes.

Figura 30. Número de variantes detectadas por Strelka y VarScan 2.0.

Figura 31. Resumen de la distribución genómica y consecuencia funcional de los SNV (A) e INDEL (B) alterados en la serie de amiloidosis AL.

Figura 32. *Lollipop*s que muestran el tipo de mutación y posición en los genes más recurrentemente mutados en amiloidosis AL.

Figura 33. Diagrama de sectores que muestra la distribución en porcentaje de la frecuencia alélica de las 2318 mutaciones detectadas.

Figura 34. Diagrama de barras que muestra los distintos genes IGHV utilizados para la formación de los reordenamientos tanto en amiloidosis AL (rojo) como en MM (azul).

Figura 35. Diagrama de secciones que muestra las vías metabólicas y rutas de señalización alteradas en amiloidosis AL.

Figura 36. Gráfico de frecuencias que muestra de forma global las distribuciones de ganancias (rojo) y pérdidas (azul) como porcentajes para los 21 pacientes con amiloidosis AL.

Figura 37. Extracto de un gráfico del programa CNVKit donde se muestra una pérdida de copia del gen IGLL5 de un paciente con amiloidosis AL.

Figura 38. Contribución relativa media de cada uno de los 6 tipos de sustitución de bases en todas las muestras.

Figura 39. *Heatmap* que muestra los valores de similitud de coseno entre cada muestra y las firmas COSMIC.

Figura 40. Genes recurrentemente mutados en la serie de amiloidosis AL.

Figura 41. Distribución del VAF de los 63 genes drivers de MM descritos por Walker et al. en la base de datos de CoMMpass IA13c vs la serie de AL.

Figura 42. Panorama mutacional en amiloidosis AL y MM.

Figura 43. Diagrama de cajas y bigotes que muestra que la delección del cromosoma 13q estaba asociado con mayores niveles de NT-proBNP.

Figura 44. Gráfico de dispersión que representa la correlación entre el nº de mutaciones y la edad de los pacientes con amiloidosis AL.

Figura 45. Supervivencia libre de progresión de los pacientes con amiloidosis AL.

Figura 46. Imagen representativa del genoma de la muestra.

Figura 47. Frecuencia de los genes con mayor recurrencia identificados en los pacientes de MM.

Figura 48. CNV y Tx con mayor recurrencia en MM.

Figura 49. Estudio de la SLP para la delección del 1p analizada en 88 muestras.

Figura 50. Estudio de la SLP para la amplificación del 1q analizada en 88 muestras mediante FISH (A) y mediante NGS (B).

Figura 51. Estudio de la SLP para la amplificación del 1q analizada en 88 muestras mediante FISH (A) y mediante NGS (B).

Figura 52. Estudio de la SLP para las alteraciones de alto riesgo analizada en 88 muestras.

Figura 53. Estudio de la SLP en muestras con la delección del 13q detectada mediante NGS (A) y la delección del 13q junto las alteraciones de mal pronóstico como la t(4,14), delección del 17p y la t(14,16)(B).

Figura 54. Caracterización de las alteraciones mono-alélicas (a) y bi-alélicas (b) de *TP53* frente a sus WT.

Figura 55. Ensayo de competición entre clones con pérdida mono- y bi-alélica de *TP53*.

Figura 56. Caracterización de las mutaciones de *KRAS* en G12A (a) y A146T (b) frente a sus WT.

Figura 57. Ensayos de viabilidad celular de las líneas L363 con *IKZF1*(a) y *PSMB5* (b) mutados.
Figura 58. Ensayo de competición clonal entre *IKZF1* mutado y WT en presencia y ausencia de lenalidomida 2 uM.
Figura 59. Ensayo de competición clonal entre líneas L363 *PSMB5* e *IKZF1* mutado en ausencia de fármaco.
Figura 60. Ensayo de competición clonal entre líneas L363 *PSMB5* e *IKZF1* mutado en presencia de LEN.
Figura 61. Ensayo de competición clonal entre líneas L363 *PSMB5* e *IKZF1* mutado en presencia de BOR.

LISTADO TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las gammapatías monoclonales.
Tabla 2. Amiloidosis sistémicas más comunes.
Tabla 3. Criterios de respuesta en la amiloidosis AL.
Tabla 4. Estadificación de riesgo en los pacientes con mieloma múltiple. LDH: Lactato deshidrogenasa
Tabla 5. Alteraciones genéticas, citogenéticas y moleculares en el desarrollo del MM. PCL: Leucemia de células plasmáticas.
Tabla 6. Demografía y características clínicas de pacientes con amiloidosis AL
Tabla 7. Proporción de reactivos para la PCR de amplificación de los genes IGH (a) e IGK (b).
Tabla 8. Algoritmos computacionales de predicción del impacto funcional debido a variantes genómicas. Cada herramienta contiene distintos algoritmos computacionales, utilizadas para el estudio de predicción funcional de variantes alélicas.
Tabla 9. Bases de datos para la interpretación de variantes somáticas.
Tabla 10. Características demográficas y clínicas de los pacientes del ensayo clínico GEM12<65.
Tabla 11. Características de las muestras seleccionadas para la versión 2 del panel.
Tabla 12. Características de las líneas celulares utilizadas. Se especifica si son *wild type* (WT) o mutantes (MUT) para los genes *KRAS*, *NRAS* y *TP53* o bien si son resistentes (R) o sensibles (S) a IMiDs y PIs.
Tabla 13. Resumen de las combinaciones realizadas en cada experimento.
Tabla 14. Variantes identificadas en los genes recurrentemente mutados en amiloidosis AL.
Tabla 15. Tabla con las asociaciones significativas entre las variables genómicas identificadas en amiloidosis AL y las variables clínicas.
Tabla 16. Tabla de contingencia que muestra los pacientes con el reordenamiento IGHV3-48 y daño renal.
Tabla 17. Tabla de contingencia que muestra el número de pacientes que presentaron ganancias de copia 1q y daño cardíaco.
Tabla 18. Parámetros técnicos de secuenciación de las 4 muestras secuenciadas.
Tabla 19. Comparativa de mutaciones y alteraciones citogenéticas entre el panel de diseño propio, el panel M3P y datos de citogenética obtenidos mediante FISH.

Tabla 20. Comparativa de los resultados de la comparativa entre las alteraciones citogenética (A) y cariotipo (B) detectadas mediante FISH frente a las detectadas mediante el panel de NGS

Tabla 21. Valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) de las alteraciones mas importantes identificadas mediante NGS.

Tabla 22. Resultados globales de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de las 88 muestras analizadas.

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Concentración de ADN y amplificación genómica (Repli-g) de las muestras de amiloidosis AL.

Anexo 2. resultados de secuenciación de la validación de la versión 2 del panel de MM

Anexo 3. Publicaciones

ABREVIATURAS

AC: alteraciones cromosómicas

AcMo: anticuerpos monoclonales

ADCC: citotoxicidad mediada por célula y dependiente de anticuerpos

ADCP: fagocitosis celular dependiente de anticuerpos

ADNg: ADN genómico

AL: amiloidosis de cadenas ligeras

ATTR: amiloidosis transtirretina

BDex: bortezomib y dexametasona

BOR: bortezomib

bp: pares de bases

BUMEL: busulfán/melfalán

CCP: célula plasmática patológica

CDC: citotoxicidad dependiente del complemento

CGH: Hibridación genómica comparada

clg-FISH: Cytoplasmic Immunoglobulin Fluorescence in situ Hybridization

CNV: variación en el número de copia (*copy number variation*, en inglés)

CP: célula plasmática

CRAB: hipercalcemia, fallo renal, anemia y lesiones óseas

CyBorD: ciclofosfamida, bortezomib y dexametasona

dFLC: diferencia entre la cadena ligera libre circulante involucrada y no involucrada

dNTPs: desoxiribonucleótidos trifosfato

dsADN: ADN de doble hebra

E: especificidad

FDA: US Food and Drug Administration

FLC: cadenas ligeras libres

GFP: proteína verde fluorescente

GM: gammapatía monoclonal

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS en inglés)

HDM-SCT: altas dosis de melfalán y trasplante autólogo de células madre

Igs: inmunoglobulinas

IGV: Integrative Genomics Viewer

IMiDs: inmunomoduladores

IMWG: grupo internacional de trabajo de mieloma

Indel: pequeñas inserciones y deleciones

IQR: rangos intercuartiles

ISS: sistema internacional de estadiaje

LC: cadena ligera

LDH: lactato deshidrogenasa

LEN: lenalidomida

M: proteína monoclonal

MDex: melfalán y dexametasona

MM: mieloma múltiple

MO: médula ósea

MW: macroglobulinemia de Waldenström

NT-proBNP: porción N-terminal del péptido natriurético tipo B

NYHA: New York Heart Association

PBMC: células mononucleadas de sangre periférica

PCL: leucemia de células plasmáticas

PIs: inhibidores del proteasoma

RFP: proteína roja fluorescente

ROS: especies reactivas de oxígeno

RRMM: mieloma múltiple recidivante / refractario

S: sensibilidad

SLP: supervivencia libre de progresión

SMM: mieloma asintomático (*smoldering myeloma*, en inglés)

SNP: polimorfismo de un único nucleótido

TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

TFG: Tasa de filtración glomerular

TFGe: tasa estimada de filtración glomerular

VAF: frecuencia alélica de la variante

VPN: valor predictivo

VPP: valor predictivo positivo

VRD:

bortezomib/lenalidomida/dexametasona

WES: secuenciación de exoma completo (*whole exome sequencing*, en inglés)

WGS: Secuenciación de genoma completo (*whole genome sequencing*, en inglés)

RESUMEN/ ABSTRACT

Introducción

Las gammopatías monoclonales (GM) son un grupo de enfermedades muy heterogéneas que se caracterizan por presentar un pico monoclonal en la región gamma y beta en una electroforesis de sangre u orina. En algunos casos el desarrollo de una GM puede ser asintomático, en la mayoría de las veces se detecta de forma accidental tras pruebas de rutina y en algunos casos no implica el desarrollo de otras patologías como el mieloma múltiple (MM) o la amiloidosis de cadenas ligeras (AL), entre otras, que puedan requerir de un tratamiento con quimioterapia. Actualmente, y a pesar de los progresos importantes que se han hecho gracias a los avances tecnológicos como la secuenciación masiva, todavía no existen marcadores biológicos fiables para predecir qué pacientes progresarán y cuáles no. En este trabajo se ha utilizado la secuenciación masiva para caracterizar genéticamente pacientes con amiloidosis AL y MM, junto con estudios de dinámicas clonales en líneas celulares modificadas genéticamente, con el fin de identificar marcadores biológicos relevantes, que podrían ser utilizados para predecir la evolución o sugerir estrategias terapéuticas que podrían prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar el perfil genético de muestras de pacientes con amiloidosis AL mediante secuenciación masiva del exoma completo (WES) y del repertorio inmune. Así como la caracterización del perfil molecular de pacientes con mieloma múltiple al diagnóstico y la validación de un panel de secuenciación masiva para su implantación en la práctica clínica. Finalmente, estudiar mediante líneas celular modificadas genéticamente la heterogeneidad clonal y mecanismos de resistencia al tratamiento en el mieloma múltiple.

Métodos

Para la caracterización de la amiloidosis AL, se realizó WES, incluyendo las regiones reguladoras (UTR, 3' y 5') en 56 muestras pareadas de células plasmáticas patológicas (CPP) aisladas mediante *sorting* como muestra tumoral y de células mononucleadas de sangre periférica como muestra control. Las librerías de las inmunoglobulinas (Igs) se realizaron según lo descrito en el protocolo de BIOMED-2. Para el análisis de los datos se utilizaron distintos programas como Strelka, Varscan, Annovar, CNVKit, MutationalPatterns

y MiXCR. Para comparar el perfil mutacional de AL con MM se utilizó la base de datos MMRF CoMMpass IA13c.

En cuanto al MM, el panel de captura de secuenciación masiva fue diseñado para identificar las alteraciones más frecuentes en el MM, cubriendo tanto mutaciones puntuales, variaciones en el número de copia (CNVs), traslocaciones de *MYC* e *IGH* y los reordenamientos específicos VDJ de las inmunoglobulinas. Se secuenció el ADN de células plasmáticas purificadas de 114 pacientes de MM al diagnóstico, 88 de ellas pertenecientes al ensayo clínico GEM2012MENOS65, junto con 34 controles. Los datos fueron analizados por DREAMgenics, con su propio método de análisis.

Para el estudio de las dinámicas clonales, se han desarrollado ensayos de competencia clonal mediante el co-cultivo de líneas celulares de MM isogénicas modificadas genéticamente y marcadas con fluorescencia. Se han estudiado genes involucrados en la progresión de la enfermedad (*TP53* y *KRAS*) y resistencia al tratamiento (*IKZF1* y *PSMB5*).

Resultados

Los resultados de WES confirmaron que no existe un gen común alterado entre los pacientes con amiloidosis AL. Sin embargo, se identificaron algunos moderadamente recurrentes como *FAT4*, *MUC16*, *SSH2*, *IGLL5* y *SEMA5A*. Además se identificaron nuevos CNVs, como deleciones en el cromosoma 18 y el cromosoma 19. Por otro lado, las ganancias en el cromosoma 9 y 19 se asociaron significativamente con una reducción de la supervivencia libre de progresión. Tras el análisis del repertorio de las Igs, se identificó que el gen *IGHV-38* fue el más frecuentemente involucrado en la formación de los reordenamientos y que el 100% de los pacientes que presentaban este gen tenían afectación renal.

La aplicación del panel de captura de secuenciación masiva permitió identificar las alteraciones más frecuentes que aparecen en el MM. Los genes más frecuentemente mutados fueron *KRAS* (15% de los pacientes), *NRAS* (9%), *BRAF* (6%) y *TP53* (10%). Otras mutaciones patogénicas identificadas en menor fueron en los genes *DIS3*, *HIST1H1E* y *FGFR3*, en el 1%, 2% y el 3% de los pacientes, respectivamente. En cuanto a los CNV, se detectaron ganancias en 1q en el 32% de los pacientes, y deleciones en 1p y 17p en el 17% y 13% de los pacientes. También se identificaron traslocaciones, tales como t(11;14) (7%), t(4,14) (14%), la t(14,16) (1%) y la t(6,14) en el 3% de los pacientes, siendo similar a lo descrito previamente a excepción de la t(11,14), que se identificó en

una frecuencia menor. Además, esta metodología mostró un 74% de sensibilidad, 93% de especificidad, 75% de valor predictivo positivo y 93% de valor predictivo negativo.

Con el estudio de las dinámicas clonales se han podido definir tres modelos de competición clonal: ventaja proliferativa, supervivencia neutral y desventaja proliferativa.

Conclusiones

La amiloidosis AL es una enfermedad muy heterogénea en la que no existe una mutación *driver* común entre los pacientes. Sin embargo, se han identificado algunos genes como posibles biomarcadores, tales como *FAT4*, *MUC16*, *SSH2*, *IGLL5* y *SEMA5A*. El resultado del estudio de las CNVs fue similar entre AL y MM, sin embargo, los genes promotores identificados en MM no se encontraron mutados de forma recurrente en AL. Por otro lado, en la serie de amiloidosis AL el gen *IGH* más frecuentemente involucrado en el reordenamiento de las Igs fue el gen *IGHV3-48*, a diferencia del MM que fue el gen *IGHV3-30*.

La aplicación del panel de captura de secuenciación masiva en MM nos permite tener un panorama genómico global de los pacientes con MM y detectar con alta sensibilidad las mutaciones y alteraciones citogenéticas más importantes y recurrentes con una única prueba. Además, con este enfoque se podría detectar, tanto nuevos reordenamientos como CNVs que el FISH no detecta, consiguiendo una mejor estadificación del riesgo y pronóstico de los pacientes.

Los estudios de las dinámicas clonales permitirían definir de forma individualizada el pronóstico y las mejores opciones terapéuticas de los pacientes con MM. Además, podrían utilizarse como biomarcadores para predecir posibles recaídas.

Introduction

Monoclonal gammopathies are a group of heterogeneous diseases characterized by presenting a monoclonal peak in the gamma and beta region in a blood or urine electrophoresis. In some cases, the development of a MG can be asymptomatic and, usually, this pathology is accidentally detected by routine medical tests, and often, it does not imply the development of other pathologies such as multiple myeloma (MM) or light chains (AL) amyloidosis, among others, which may require chemotherapy treatment. Currently, and despite the significant progress that has been made in this field, thanks to technological advances such as massive sequencing, there are still no reliable biological markers to predict which patients will and will not progress to a malignant stage. In this work, NGS has been used to genetically characterize patients with AL amyloidosis and patients with MM, in addition with studies of clonal dynamics in genetically modified cell lines, in order to identify relevant biological markers, which can be used to predict the evolution or suggest therapeutic strategies that could prevent or delay disease progression.

Aims

The main objective of this work is to characterize the genetic profile of samples from patients with AL amyloidosis by massive sequencing of the whole exome (WES) and the immune repertoire, as well as the characterization of the molecular profile of patients with multiple myeloma at diagnosis and the validation of a massive sequencing panel for its implementation in clinical practice. In addition, to study clonal heterogeneity and mechanisms of resistance for the treatment in multiple myeloma using genetically modified cell lines.

Methods

For the characterization of AL amyloidosis, WES was performed, including the regulatory regions (UTR, 3' and 5') in 56 paired samples of pathological plasma cells (CPP) isolated by sorting from both tumor sample and peripheral blood mononucleate cells used as control fraction. Immunoglobulin (Igs) libraries were performed as described in the BIOMED-2 protocol. Different programs such as Strelka, Varscan, Annovar, CNVKit, MutationalPatterns and MiXCR were used to analyze the data. The MMRF CoMMpass IA13c database was used to compare the mutational profile of AL with MM.

Regarding MM, the massive sequencing capture panel was designed to identify the most frequent alterations in MM, covering both point mutations, copy number variations (CNVs),

MYC and *IGH* translocations, and VDJ-specific rearrangements. DNA from 114 MM purified plasma cells was sequenced at diagnosis, 88 of which belonged to the GEM2012MENOS65 clinical trial, along with 24 controls. The data was analyzed by DREAMgenics, with its own analysis method.

For the study of clonal dynamics, clonal competence assays were developed by co-cultivation of genetically modified and fluorescently labeled isogenic MM cell lines. Genes involved in disease progression (*TP53* and *KRAS*) and resistance to treatment (*IKZF1* and *PSMB5*) were studied.

Results

The WES results confirmed that there is no altered common gene among patients with AL amyloidosis. However, some moderately recurrent genes were identified as *FAT4*, *MUC16*, *SSH2*, *IGLL5* and *SEMA5A*. In addition, new CNVs were identified such as deletions on chromosome 18 and chromosome 19. On the other hand, gains on chromosome 9 and 19 were significantly associated with a reduction in progression-free survival. After the analysis of the Igs repertoire, it was identified that the *IGHV-38* gene was the most frequently involved in the rearrangements formation and that 100% of the patients who presented this gene had renal involvement.

The application of the NGS capture panel allowed to identify the most frequent alterations that appear in the MM. The most frequently mutated genes were *KRAS* (15% of patients), *NRAS* (9%), *BRAF* (6%) and *TP53* (10%). Other pathogenic mutations identified in minor were in the *DIS3*, *HIST1H1E* and *FGFR3* genes, in 1%, 2% and 3% of patients, respectively. Regarding CNV, gains were detected in 1q in 32% of patients, and deletions in 1p and 17p in 17% and 13% of patients, respectively. Translocations were also identified, such as t (11; 14) (7%), t (4.14) (14%), t (14.16) (1%) and t (6.14) in the 3% of the patients, being similar to what was previously described except for the t (11;14), which was found in a lower frequency. Furthermore, this methodology showed 74% sensitivity, 93% specificity, 75% positive predictive value and 93% negative predictive value.

With the study of clonal dynamics, three models of clonal competition were defined: proliferative "fitness", neutral survival "fitness" and negative survival "fitness".

Conclusions

AL amyloidosis is a very heterogeneous disease in which there is no common driver mutation among patients. However, some genes have been identified as possible biomarkers, such as *FAT4*, *MUC16*, *SSH2*, *IGLL5* and *SEMA5A*. The result of the study of CNVs was similar between AL and MM, notwithstanding the drivers genes identified in MM were not recurrently mutated in AL. On the other hand, in AL amyloidosis series, the *IGH* gene most frequently involved in the rearrangement of the Igs was the *IGHV3-48* gene, unlike the MM, which was the *IGHV3-30* gene.

The application of the mass sequencing capture panel in MM allowed us to have a global genomic overview of patients with MM and to detect with high sensitivity the most important and recurring mutations and cytogenetic alterations with a single test. Furthermore, this approach could detect both new rearrangements and CNVs that FISH does not detect, achieving a better staging of the risk and prognosis of patients.

The studies of clonal dynamics would permit defining individually the prognosis and the best therapeutic options for patients with MM. Furthermore, they could be used as biomarkers to predict possible relapses.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y estado actual de las gammopatías monoclonales.

Las gammopatías monoclonales son un grupo de enfermedades que se caracterizan por la proliferación descontrolada de células plasmáticas clonales que producen una proteína homogénea monoclonal (M),¹ dando lugar a una gammopatía monoclonal (GM). Una inmunoglobulina monoclonal consiste en dos cadenas polipeptídicas pesadas de una única clase y subclase y dos cadenas ligeras polipeptídicas de un solo tipo. Los diferentes tipos de inmunoglobulinas monoclonales se designan con letras mayúsculas que corresponden con la clase de su cadena pesada, las cuales se nombran con las letras griegas: γ (gamma) en IgG, α (alfa) en IgA, μ (mu) en IgM, δ (delta) en IgD y ϵ (epsilon) en IgE. Los tipos de cadenas pesadas son: κ (kappa) y λ (lambda).

La gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI, MGUS en inglés), es una entidad muy heterogénea clínicamente, su espectro va desde un estado premaligno, (todo mieloma está precedido de una MGUS), a procesos benignos, y en algunas ocasiones puede ser secundaria a múltiples enfermedades. Estos procesos benignos se caracterizan por presentar proteína monoclonal pero ninguno de los síntomas de una GM maligna como sería el mieloma múltiple (MM), la macroglobulinemia de Waldenström (MW) o la amiloidosis de cadenas ligeras (AL), entre otras.^{1,2} En la tabla 1, se indica la clasificación de las gammopatías y de los distintos procesos asociados a las mismas.³

La GMSI, término acuñado por Robert Kyle en 1978,¹ es uno de los desórdenes premalignos más comunes en la población en general, apareciendo en más del 3% de la población mayor de 50 años⁴ y en la mayoría de los casos se diagnostica de manera accidental. El riesgo anual de progresión a MM o a otros desórdenes relacionados con las células plasmáticas (CP) es del 1% aproximadamente.⁵ Aunque potencialmente a todos los pacientes con MM se les diagnostica primero una GMSI, la mayoría de las GMSI no evolucionan hacia la malignidad. Actualmente, es muy difícil diferenciar a los pacientes de bajo riesgo, que tal vez no necesiten un seguimiento adicional, de los pacientes de alto riesgo, que requieren un seguimiento exhaustivo y continuado.

Por lo tanto, la búsqueda e identificación de biomarcadores y factores pronósticos nos permitiría diferenciar y estratificar los distintos grupos de pacientes.

Tabla 1. Clasificación de las gammopatías monoclonales.

Tipo de gammopatía	Procesos malignos asociados	Procesos benignos asociados	Idiopáticas
Gammopatía monoclonal	<ul style="list-style-type: none"> -MM (IgG, IgA, IgD, IgE y cadenas ligeras kappa o lambda) -Plasmocitoma -MW -SLP (linfoma, LLC) -Enfermedad de cadenas pesadas (gamma, alfa,) -AL -Enfermedad por depósito de inmunoglobulinas -Carcinoma (mama, colon, próstata) 	<ul style="list-style-type: none"> -Enfermedades autoinmunes (crioglobulinemia, aglutinadas frías...). -Enfermedades endocrinológicas y similares (HPT, timoma). -Enfermedades infecciosas (sarcoidosis, parasitosis). -Enfermedades hepáticas (cirrosis biliar primaria, hepatitis C). -Angioedema y déficit adquirido del inhibidor de C1. -Enfermedades hematológicas (púrpura fulminante, esferocitosis hereditaria). -Implantes de silicona en mujeres. -Enfermedades pulmonares (FPI, PA, HPI). 	<ul style="list-style-type: none"> -GMSI (IgG, IgA, IgM, IgD, cadenas ligeras libres). -Biclonales. -Proteinuria de Bence-Jones idiopática.
Gammopatía policlonal	<ul style="list-style-type: none"> -Enfermedades hematológicas (5%) 	<ul style="list-style-type: none"> Hepatopatías (≈60%) Conectivopatías (≈20%) Infecciones crónicas (≈5%) Enfermedades hematológicas (3%) 	

MM: mieloma múltiple; MW: macroglobulinemia de Waldeström, AL: amiloidosis primaria de cadenas ligeras; SLP: síndrome proliferativos; HPT: hiperparatiroidismo; HLP: hiperlipoproteinemia; FPI: fibrosis pulmonar idiopática; PA: proteinosis alveolar; HPI: hemosiderosis pulmonar idiopática; GMSI: gammopatía monoclonal de significado incierto.³

A lo largo de este trabajo nos centraremos en los procesos malignos, y en concreto en el mieloma múltiple (MM) y la amiloidosis de cadenas ligeras (AL).

1.2. Pruebas diagnósticas en las gammopatías monoclonales.

El concepto de monoclonalidad implica que un grupo de células plasmáticas producen un único tipo de cadena pesada y/o ligera (p.ej. IgA-kappa, IgG-lambda; cadenas ligeras kappa, etc.), dejando de producirse las inmunoglobulinas normales. Esto hace que se vean alteradas diferentes propiedades de la sangre, y de algunos órganos como el riñón, favoreciendo también el desarrollo de enfermedades debido al déficit del resto de poblaciones celulares e inmunoglobulinas. Estas variables son las que nos permiten hacer un diagnóstico.

Cuando se habla de componente o pico monoclonal se hace referencia a la aparición de un pico en la región gamma (γ) o beta (β) de una electroforesis de proteínas en suero u orina. Esta es una técnica que permite la separación de moléculas proteicas en un soporte sometido a un campo eléctrico (Fig. 1.C).³

Esta región gamma es donde se detectan las inmunoglobulinas como podemos observar en la Fig 1. Primero, se encuentra la albúmina, seguida de: la región α -1 en la que se encuentran la α 1-antitripsina, la α 1-glicoproteína, la transcortina, la α 1-lipoproteína y la α -fetoproteína. Las 3 proteínas principales que integran la región α -2, son la α 2-macroglobulina, la haptoglobina y la ceruloplasmina. La región β incluye la transferrina, hemopexina, el componente C3 del complemento y la β lipoproteína. Por último, en la región γ migran las inmunoglobulinas.

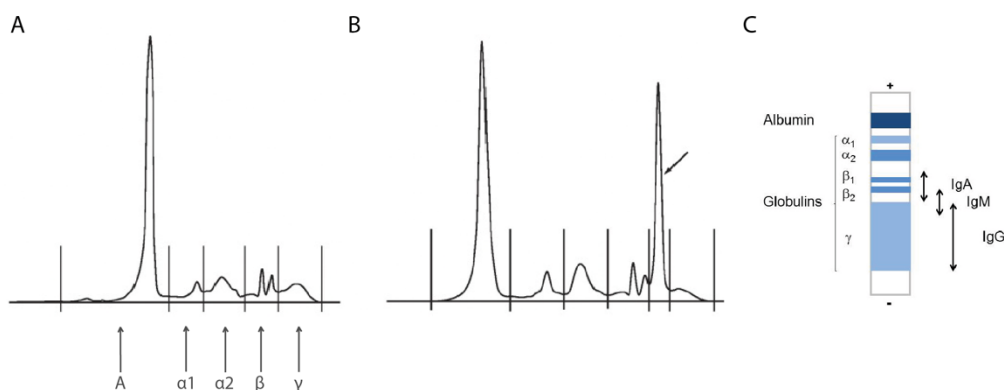


Figura 1. Electroforesis de las proteínas del suero. A) Suero normal. B) Pico de proteína monoclonal en la región γ , indicado con una flecha. C) Esquema del patrón electroforético donde se muestra donde migran las γ -globulinas hacia el cátodo.⁶

1.3. Factores predictivos de malignidad de la gammapatía monoclonal de significado incierto.

Son múltiples los cambios genéticos y del microambiente que llevan a la transformación de una GMSI en un mieloma asintomático (SMM), en un MM sintomático, y finalmente, en un mieloma extramedular.

Actualmente, hay una investigación muy activa con el fin de identificar marcadores biológicos relevantes que se expresen diferencialmente durante la progresión, lo cual, podría ser utilizado para predecir la evolución o sugerir estrategias terapéuticas que podrían prevenir o retrasar la progresión. Pero, a pesar de los progresos importantes que se han hecho, todavía no existen marcadores biológicos fiables para predecir qué

pacientes progresarán y cuales no; por ello las GMSI continúan siendo estratificadas por riesgo basándose en variables clínicas identificadas mediante estudios epidemiológicos.⁴

Investigadores españoles y de la Clínica Mayo han desarrollado modelos de predicción de riesgos de progresión de las GMSI. El estudio de los investigadores de la Clínica Mayo está centrado en biomarcadores del suero, e identifican 3 factores de riesgo: isotipo no IgG, concentración de proteína M en suero $\geq 15\text{g/L}$, y un ratio de cadenas ligeras (FLC) anormal.^{7,8} El estudio español se basa principalmente en la identificación de las poblaciones de CP mediante citometría de flujo multiparamétrica.^{9,10}

Hasta ahora, el modelo de la Clínica Mayo es el que está incluido en las guías del Grupo Internacional de Trabajo de Mieloma⁸ (IMWG) y es el más usado dada su fácil aplicabilidad. Sin embargo, ninguno de los dos modelos de riesgo se ha validado de forma independiente en grandes poblaciones de pacientes con seguimiento a largo plazo.

Recientemente se ha publicado un nuevo modelo de estratificación de riesgos que incorpora los límites revisados de los parámetros utilizados anteriormente y que puede aplicarse universalmente.¹¹

En un estudio retrospectivo sueco se analizó una cohorte amplia con 728 pacientes y un seguimiento de 30 años en el que se encontraron algunos hallazgos interesantes. Una observación importante fue que el riesgo anual de progresión a otros trastornos linfoides fue del 0,5% en la cohorte sueca, a diferencia del $\sim 1\%$ identificado en la población del estudio de la Clínica Mayo.⁵ Esto podría ser debido a los diferentes diseños del estudio y las poblaciones. En este estudio, también se confirmó el impacto negativo que tiene una concentración del componente M en suero $\geq 15\text{g/L}$ y ratio FLC anormal. Este último marcador también juega un papel importante para la identificación de pacientes con SMM de alto riesgo. También se observó que la supresión de las inmunoglobulinas no involucradas (inmunoparesis) incrementaba el poder discriminatorio del modelo de la Clínica Mayo en identificar pacientes con GMSI de alto riesgo. Además, la inmunoparesis específica de isotipo (supresión de $\text{IgG}\kappa$ en $\text{IgG}\lambda$ GMSI) resultó ser un posible predictor temprano de progresión.¹²

Todos estos últimos estudios tratan de redefinir las categorías de riesgo de las gammapatías monoclonales mediante un espectro completo, desde el estado precursor, hasta el MM quiescente y el MM activo (Fig. 2). El objetivo es detectar la enfermedad en

los estadios más tempranos de las alteraciones genéticas e inmunológicas, cuando la heterogeneidad intraclonal es menor y el clon sería más susceptible a los tratamientos, y así, anticiparnos al daño orgánico y prolongar la supervivencia.

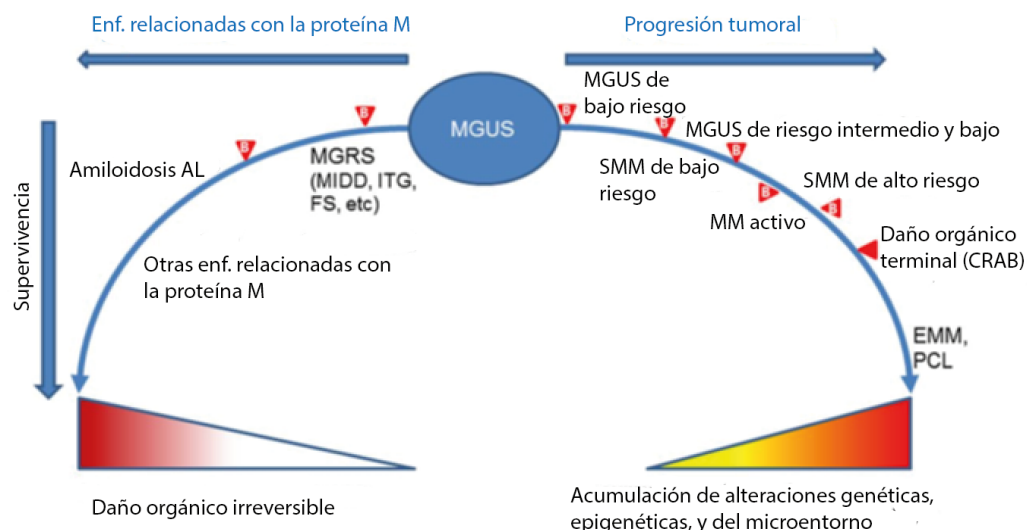


Figura 2. Espectro de la posible progresión de MGUS. La letra B (biomarcadores) indica las etapas de progresión, EMM: mieloma extramedular, SMM: mieloma asintomático, PCL: leucemia de células plasmáticas, MW: macroglobulinemia de Waldenstrom, MGRS: gammapatía monoclonal de importancia renal, MIDD: enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, ITG: glomerulopatía inmunotactoide y FS: síndrome de Fanconi. Imagen adaptada⁴

También es importante identificar a aquellos pacientes con GMSI de bajo riesgo ya que podrían no requerir un seguimiento anual exhaustivo. El modelo de la Clínica Mayo es eficaz para esto.⁵ Además, este grupo de pacientes representan aproximadamente el 40% de los casos de GMSI.⁸

Sin embargo, los pacientes con GMSI de riesgo medio y alto si precisan de un seguimiento, incluyendo tanto biomarcadores de progresión clonal como marcadores de daño orgánico, causado por la proteína M. Los dos órganos más afectados y clínicamente relevantes son el riñón, en la GM de significancia renal,¹³ y el corazón en la amiloidosis AL.¹⁴ La excreción urinaria de albúmina y la creatinina en suero son marcadores de daño renal, mientras que la porción N-terminal del pro-péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es un marcador muy sensible para detectar daño cardíaco en la amiloidosis AL.¹⁴

También, en las etapas tempranas de la progresión existen clones de CP subyacentes que suelen ser pequeños e indolentes. El tratamiento de estos clones tempranos es crucial en

la amiloidosis AL ya que determina una respuesta completa duradera y con ello una supervivencia mayor comparada con la de los pacientes con MM.¹⁵

Aunque solamente una pequeña fracción de pacientes con GMSI son identificados en la práctica clínica (21% de los mayores de 70 años)¹⁶. Actualmente, las guías prácticas indican que las GMSI de bajo riesgo (40%) no necesitan de un seguimiento. En cambio, los de riesgo intermedio y alto requieren de un seguimiento anual con el fin de detectar lo antes posible la progresión y anticiparse al daño orgánico.⁸

La utilización de biomarcadores permite estratificar clínicamente a los pacientes en distintos grupos de riesgo mejorando su manejo. Por lo tanto, el desarrollo de marcadores nuevos y relevantes junto con las técnicas de imagen (como la radiología ósea convencional, la tomografía computarizada, la resonancia magnética), van a ser unas herramientas potenciales para cambiar la práctica clínica del espectro de las gammapatías monoclonales.⁴

1.4. Amiloidosis

El término amiloidosis hace referencia a un conjunto de enfermedades complejas que se caracterizan por el mal plegamiento de proteínas que se agregan formando fibras amiloides, que se depositan en los tejidos y los dañan. Estas fibras amiloides se conforman en una estructura cuaternaria de hoja β -plegada muy estable.¹⁷

Hasta la fecha, se han identificado 36 proteínas que puedan formar estas fibras amiloides extracelulares,¹⁸ algunas forman depósitos localizados, como en el caso de la β -amiloides en Alzheimer y otras se depositan por los tejidos del cuerpo (conocido como amiloidosis sistémica)¹⁹, sería el caso de amiloidosis de cadena ligeras (AL).

Las amiloidosis sistémicas pueden ser hereditarias o adquiridas. Los dos tipos más comunes de amiloidosis adquiridas son la amiloidosis AL y la amiloidosis transtirretina (*ATTR*) de tipo natural (*wild-type*).

La amiloidosis sistémica también puede ser causada por mutaciones genéticas heredadas de manera autosómica dominante. Más de 120 mutaciones puntuales en el gen de la transtirretina (*TTR*) pueden causar amiloidosis sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso periférico y al corazón. Las variantes genéticas de *APOA1*, *APOA2*, *APOC2* y *APOC3* (que codifican las proteínas, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, apolipoproteína AIII y apolipoproteína AIV) también pueden causar amiloidosis sistémica.

apolipoproteína CII y apolipoproteína CIII, respectivamente), así como en los genes *FGA* (que codifica la cadena α del fibrinógeno), *GSN* (gelsolina), *CST3* (que codifica la cistatina C) y *LYZ* (que codifica la lisozima), también pueden causar amiloidosis sistémica hereditaria (Tabla 2).¹⁹

Tabla 2. Amiloidosis sistémicas mas comunes.

Tipo de amiloidosis	Proteína	Sistémica y/o localizada	Adquirida o hereditaria	Órganos involucrados
AL	Cadena ligera de las IG	Sistémica o localizada	Adquirida	Corazón, riñón, hígado, tejidos blandos, SN periférico, tracto gastrointestinal
ATTR	Transtirretina	Sistémica	Hereditaria	SN periférico, corazón, ojos, riñón, leptomeninges
		Sistémica	Adquirida	Corazón y ligamentos
AA	Proteína amiloide A sérica	Sistémica	Adquirida	Mayoritariamente riñón, pero también hígado, trato gastrointestinal y corazón, tiroides y SN autónomo
ALECT2	Factor quimiotáctico de leucocitos 2	Sistémica	Adquirida	Riñón, hígado, bazo, glándulas suprarrenales y pulmones
AApoAI	Apolipoproteína	Sistémica	Hereditaria	Corazón, hígado, riñón, SN periférico, testículos, laringe y piel
AFib	Cadena α del fibrinógeno	Sistémica	Hereditaria	Riñón
Aβ2m	β_2 -microglobulina, tipo salvaje	Sistémica	Adquirida (relacionada con hemodiálisis)	Sistema musculoesquelético
	β_2 -microglobulina	Sistémica	Hereditaria	SN autónomo

A pesar de la heterogeneidad etiológica y bioquímica de las amiloidosis, gran parte de las manifestaciones clínicas son compartidas, dependiendo principalmente de los órganos afectados, que suelen ser: el riñón y el corazón, seguido del sistema nervioso, el hígado, el tracto intestinal y los tejidos blandos.

1.4.1. Amiloidosis de cadenas ligeras (AL)

1.4.1.1. Definición

La amiloidosis primaria de cadenas ligeras (AL) es una gammapatía monoclonal que se caracteriza por el depósito extracelular de cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (IGs), siendo en este tipo de enfermedad las de tipo lambda (λ) más frecuentes que las de tipo kappa (κ), en un ratio (3:1).²⁰

Este depósito es debido a que un clon de células plasmáticas, sintetiza cadenas ligeras (LC) con una estructura terciaria inestable y con un mal plegamiento que tienden a agregarse y formar fibrillas amiloides.²¹

Estas fibrillas se depositan en cualquier órgano o tejido, principalmente en el corazón y el riñón. Las consecuencias de estos depósitos van a depender de la abundancia y la propagación de estos a los diferentes órganos y tejidos. Las formas sistémicas graves, sobre todo cuando se encuentra afectado el corazón, pueden llevar en último término a la muerte del paciente.

1.4.1.2. Epidemiología

Actualmente no existe una base de datos con un gran número de pacientes con amiloidosis AL, de tal modo que los datos epidemiológicos son limitados. La prevalencia aumenta con la edad y se duplica a partir de los 65 años comparado con el grupo de edad entre los 35-54 años. La media de edad al diagnóstico es de 63 años, afectando más a hombres (55%) que a mujeres.²²

Uno de los factores de riesgo de la amiloidosis AL, como se ha comentado anteriormente, es haber desarrollado previamente una GMSI, siendo el riesgo de 8,8²³ comparado con pacientes sin GMSI. En una serie de 1348 pacientes con GMSI con un seguimiento de 14 años, 14 desarrollaron amiloidosis AL (1%). Entre el 10 y el 15% de los pacientes tenían un mieloma coexistente con la amiloidosis AL, y en otra serie, se encontró que hasta el 38% de los pacientes con mieloma tenían amiloidosis AL encubierta²⁴. Aproximadamente el 1% de los pacientes con mieloma preexistente, que no reciben un diagnóstico simultáneo de amiloidosis AL, podrían desarrollar amiloidosis AL.²⁵ De tal modo que un diagnóstico diferencial entre estas dos GM sería muy interesante. La infección viral antecedente no parece ser un factor predisponente.

Otro de los factores de riesgo descritos de la amiloidosis AL es la existencia de algunos polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). En un estudio de asociación de todo el genoma en una cohorte de 1229 pacientes se encontró una asociación entre la amiloidosis AL y SNPs en diez *loci* con una alta significancia ($p < 10^{-5}$).²⁶ El SNP rs9344 fue el que tuvo mayor significancia ($p = 7,80 \times 10^{-11}$) y se encontró en una región de *splicing* del gen *CCND1*, que codifica la ciclina 1, la cual está implicada en la traslocación entre el cromosoma 11 y el 14. Otra variante significativa ($p = 5,2 \times 10^{-8}$) fue la rs79419269, cerca del gen *SMARCD3*, que codifica una proteína involucrada en el remodelamiento de la cromatina. Estos resultados apoyan la evidencia de la susceptibilidad genética que existe en amiloidosis AL.

- **Incidencia de la amiloidosis AL.**

Hasta la fecha, la incidencia se ha evaluado en seis estudios realizados en América y Europa.^{27, 28, 29, 30, 31, 32} El primer estudio fue llevado a cabo en Minnesota, USA en el que se reportan 8,9 casos por millón de personas por año entre 1950 y 1989 y 10,5 casos/millón de persona/año entre 1970 y 1989.²⁷ La incidencia calculada en Limousin (Francia), desde el 2012 hasta el 2016 fue de 12,5 individuos afectados por millón de habitantes durante el periodo de 5 años del estudio.³¹

En otro estudio, en Reino Unido, se reportó una incidencia de al menos 3 afectados por millón de personas y por año, en 2008. En un estudio sueco, indicaban una incidencia de 3 casos/millón de personas/año.²⁹ En el estudio de Argentina, informaron de una incidencia de 6,1 millón de habitantes/año entre 2001 y 2018.³² Y en Estados Unidos, entre 2007 y 2015, estimaron una incidencia de entre 10,8 y 15,2 por millón de habitantes/año.³⁰ Estos últimos 4 estudios no eran estudios basados en la población si no que determinaron la incidencia sobre la base de informes de certificados de defunción y egresos hospitalarios, entre otros métodos.

- **Prevalencia**

Con la mejora de las terapias y con ello la supervivencia global de los pacientes, la prevalencia de la amiloidosis AL ha aumentado en los últimos años. De hecho, se estimaba una prevalencia de entre 8,8 y 15,5 casos por millón de personas/año antes del 2010^{28, 30} y actualmente ha incrementado a 40-58 casos por millón de personas/año.^{28, 30, 32}

1.4.1.3. Biología de la enfermedad. Mecanismos y fisiopatología.

Tal y como se menciona anteriormente, el proceso subyacente a la amiloidosis es la conversión de proteínas globulares y solubles en fibras amiloides insolubles que se depositan en tejidos y órganos, dañando sus funciones.¹⁷

Los factores que pueden causar el desequilibrio en la proteostasis celular son diversos, la cual se encarga de mantener el proteoma en una localización y concentración correcta.³³ Por ejemplo, algunos de estos factores pueden ser: mutaciones que desestabilicen la estructura nativa de la proteína, incremento de la concentración de proteínas, exposición de regiones sensibles a proteasas o regiones hidrofóbicas y también la disminución de la eficiencia con la edad de las proteínas (≈ 1600) encargadas de mantener este equilibrio,³⁴ como las chaperonas extracelulares que se encargan de mantener un plegamiento correcto de las cadenas ligera (LC) e inhiben la agregación de proteínas.³⁵

En el caso de la amiloidosis AL, este desequilibrio es causado por la expansión de un pequeño clon indolente de células B que produce una cadena ligera de inmunoglobulina λ , en el 75-80% de los casos, y cadenas ligeras κ en los casos restantes (Fig.3).

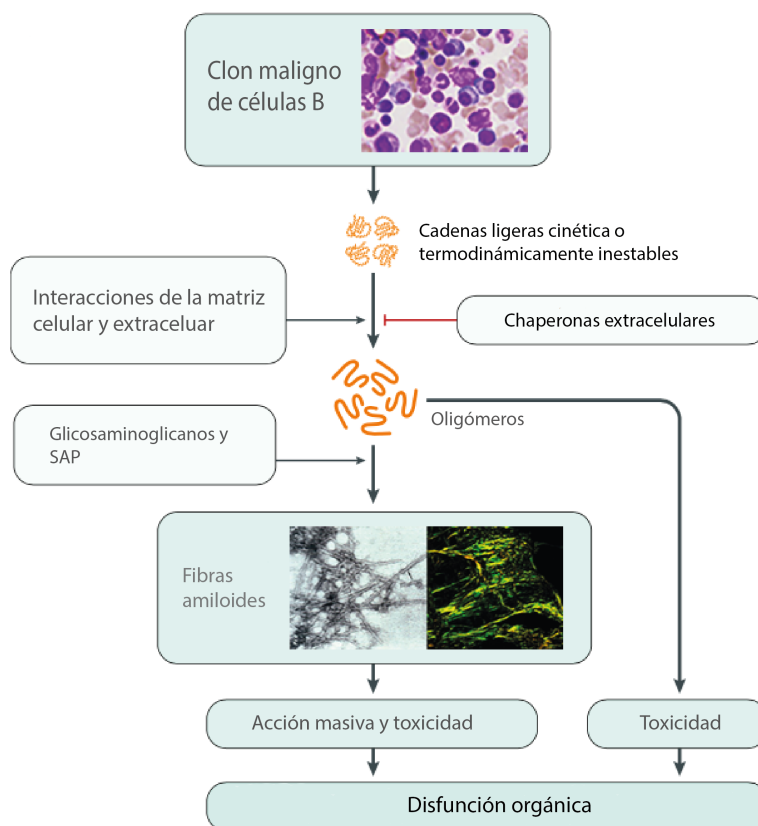


Figura 3. Esquema de los procesos involucrados en la formación de las fibras amiloides en amiloidosis AL. Imagen adaptada¹⁸

La t(11;14) ocurre aproximadamente en el 40-60% de los casos. Esta traslocación yuxtapone el *locus* del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) con el *locus* del oncogén *CCND1*.³⁶

Otro de los posibles factores causantes de la enfermedad son las mutaciones somáticas en el gen que codifica la región variable de las cadenas ligeras (*IGLV*) que reduce la estabilidad de la proteína nativa y aumentan la dinámica de la proteína, lo que favorece la endoproteólisis y la producción de dominios de cadena ligera variables que pueden causar amiloidosis.³⁷ De hecho, las cadenas ligeras amiloidogénicas tienen una baja estabilidad de plegado y una alta dinámica de proteínas en comparación con las cadenas ligeras producidas en el MM.^{38,39}

Otros factores que pueden facilitar el mal plegamiento y agregación de proteínas son: las interacciones con componentes de la matriz extracelular (tales como, glicosaminoglicanos, colágeno, lípidos)⁴⁰, con fuerzas mecánicas, con proteasas y con metales como el cobre.⁴¹

En los depósitos amiloides se ha identificado el componente sérico amiloide P (SAP), una proteína que se encuentra circulando en el plasma, unido mediante una unión dependiente de calcio a las fibras amiloides. Además, SAP ha mostrado ser un agente protector de la degradación de estas fibras⁴² y por lo tanto, un posible candidato para diana terapéutica.

Las fibras amiloides a su vez también causan citotoxicidad y promueven la formación de más oligómeros.⁴³

La cinética de la formación de fibrillas permite conocer aspectos importantes para el manejo clínico (Fig. 4). La formación de las fibras amiloides comienza con una solución de monómeros de proteína nativa, la cual podría plegarse mal y volverse amiloidogénica. Cuando la cantidad de proteínas mal plegadas alcanza una concentración específica empieza a producirse el desarrollo de las fibras. Este desarrollo consta de dos fases: (1) una fase de nucleación, en la cual los monómeros experimentan cambios conformacionales o plegamiento erróneo y se asocian para formar núcleos oligoméricos, y (2) una fase de alargamiento/crecimiento, en la que los núcleos crecen rápidamente mediante la adición de monómeros que forman polímeros más grandes hasta la saturación. La fase de nucleación es termodinámicamente desfavorable y ocurre gradualmente, mientras que la fase de alargamiento es un proceso mucho más favorable y avanza rápidamente. Por lo tanto, la cinética de la formación de amiloide está bien representada por una curva sigmoidea con una fase de retraso seguida de una fase de crecimiento

rápido. El paso limitante de la velocidad en el proceso es la formación de núcleos, es decir, que la formación de amiloide puede acelerarse sustancialmente mediante la adición de núcleos preformados.⁴⁴

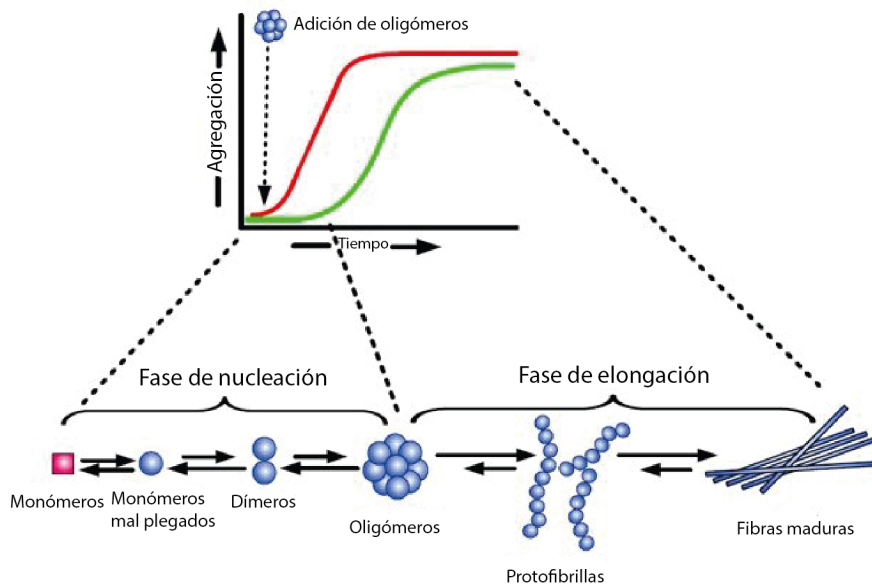


Figura 4. Cinética de formación del amiloide. La cinética de la formación de amiloide se representa por una curva sigmoidea con una fase de retraso seguida de una fase de crecimiento rápido (curva verde). La adición de monómeros mal plegados reduce el tiempo de nucleación e induce una formación de agregados más rápida (curva roja).⁴⁴

En definitiva, un diagnóstico temprano de la amiloidosis AL y la administración de la terapia adecuadas es crucial para frenar esa curva y progresión de la enfermedad.

- **Afectación orgánica**

Aunque todos los órganos pueden ser afectados, los órganos más frecuentemente dañados son el corazón y el riñón, seguido de los tejidos blandos, el hígado, y el sistema nervioso periférico y autónomo (Fig. 5).¹⁸

Actualmente, solamente existen algunas evidencias para explicar el tropismo de las cadenas ligeras sobre los órganos. Varios investigadores han descrito que ciertas características del gen *IGLV* podrían conferir un mayor riesgo de afectación de unos órganos en concreto. Por ejemplo, el gen germinal *IGLV6-57* es más común en pacientes con amiloidosis sistémica AL que en un repertorio de células B normales y se ha asociado con afectación renal.⁴⁵ Además, en este estudio se observó que las células mesangiales de riñón eran más propensas a formar fibras amiloides cuando se incubaban con cadenas ligeras derivadas de *IGLV6-57*.⁴⁵ A pesar de que la cadena ligera alterada sea la de tipo λ en la mayoría de los casos, se ha relacionado el gen germinal *IGKV1-33* con afectación

hepática.⁴⁶ El tropismo cardíaco se ha relacionado con el gen de la línea germinal *IGLV1-44*, incrementando en cinco veces la posibilidad de tener afectación cardíaca.^{46,47}

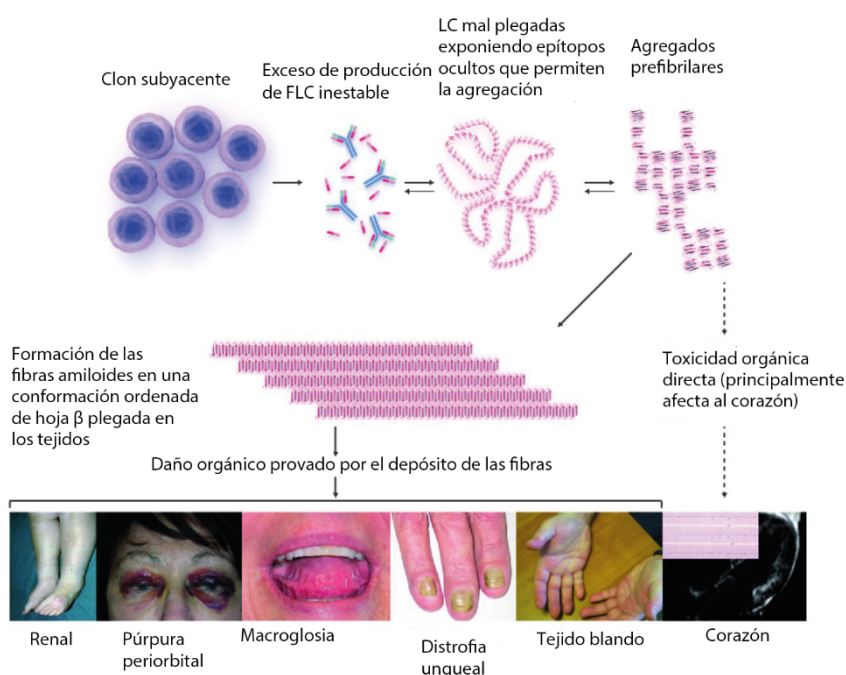


Figura 5. Afectación de órganos en amiloidosis AL. El depósito directo de fibrillas amiloides conduce a las características clínicas típicas representadas: hematomas periorbitales, macroglosia, edema de miembros inferiores con síndrome nefrótico, infiltración en los tejidos blandos de las manos, ECG anormal. FLC: cadenas ligeras libres, LC: cadenas ligeras. Imagen adaptada Mahmood *et al.*⁴⁸

El daño cardíaco es clave en la supervivencia de los pacientes con amiloidosis AL. Esta disfunción cardíaca es causada por los depósitos amiloides que alteran la arquitectura del tejido y por la proteotoxicidad de las cadenas ligeras.⁴⁹ También la alteración de las membranas celulares y la toxicidad celular. Para estudiar estos mecanismos, en un estudio se expusieron células cardíacas a cadenas ligeras purificadas de pacientes con amiloidosis AL cardíaca. Esto provocó un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) comparado con los niveles producidos por el control (cadenas ligeras aisladas de pacientes sin daño cardíaco).^{41,50} Además, se ha demostrado que estas cadenas amiloidogénicas pueden inducir la activación de p38 a través de la vía de las MAPK, lo que lleva a un aumento de la producción de ROS, desajustes en la homeostasis del calcio, disfunción celular y muerte celular de cardiomiocitos adultos.⁵¹ La vía p38 también media la transcripción del péptido natriurético B, un biomarcador serológico de daño cardíaco.⁵² Esta es la base de que el biomarcador NT-proBNP esté tan elevado en algunos pacientes con amiloidosis AL.

1.4.1.4. Diagnóstico, reconocimiento médico y prevención

Algunos de los síntomas comunes de la amiloidosis AL son: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada, proteinuria de rango nefrótico, hepatomegalia sin anomalías de imagen, o en cualquier paciente con una gammapatía monoclonal o mieloma múltiple.⁴⁹

Tras la detección de estos síntomas, se debe realizar una electroforesis de inmunofijación del suero y orina, y un ensayo de cadenas ligeras libres de las inmunoglobulinas (que evalúa la concentración de cadenas ligeras libres κ y λ y su proporción en el suero) para evaluar la proteína de cadena ligera precursora.

También es preciso una biopsia de tejido y el análisis histopatológico para confirmar el diagnóstico. La ultraestructura ordenada de las fibras amiloides permite la intercalación regular del colorante rojo Congo, que muestra una birrefringencia verde bajo microscopía de luz polarizada (Fig. 6).

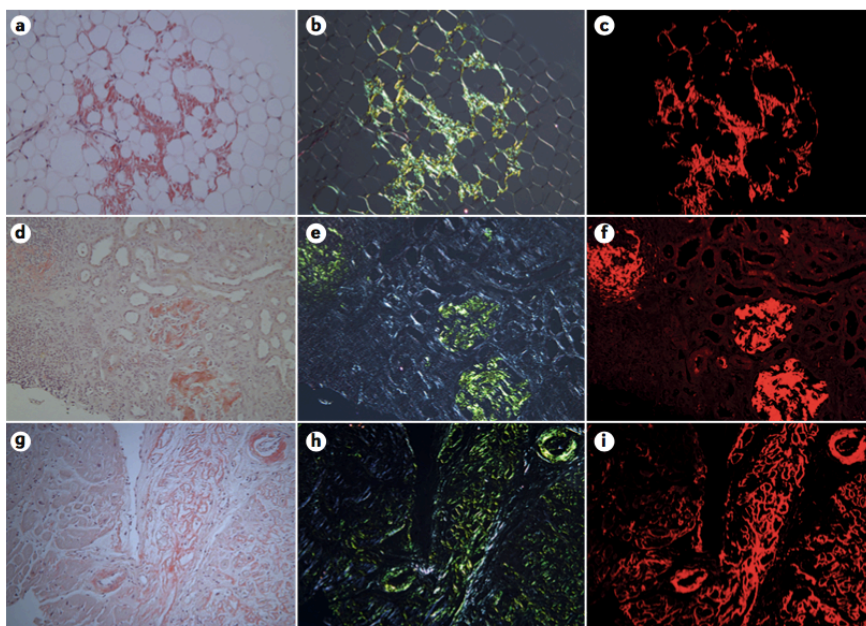


Figura 6. Evidencia histológica de fibrillas amiloides en el tejido. Los depósitos de amiloide se identifican en muestras de tejido utilizando tinción rojo Congo y la detección de birrefringencia mediante microscopía de luz polarizada. Un aspirado de grasa abdominal de un paciente con amiloide de transtiretina cardíaca (ATTR), que tenía la variante TTR V122I y una GMSI de IgG κ , muestra absorción de rojo Congo (a) y birrefringencia bajo luz polarizada (b) y aparece de color rojo brillante en luz fluorescente (excitación 497 nm y emisión 614 nm) (c). El tejido renal de un paciente con amiloidosis AL, muestra depósitos de amiloide en los glomérulos en luz brillante (d), luz polarizada (e) y luz fluorescente (f). Tejido cardíaco de un paciente con AL, la amiloidosis muestra una extensa deposición de amiloide con afectación de los vasos en luz brillante (g), luz polarizada (h) y luz fluorescente (i).¹⁸

Esta observación histológica es necesaria para el diagnóstico de la amiloidosis AL, aunque no siempre es necesario realizarla en el órgano afectado, sino que, en la mayoría de los casos, se realiza un aspirado de la grasa abdominal subcutánea, una biopsia de médula ósea o del labio. Con estas muestras se puede diagnosticar entre el 50-85% de los casos.^{53,54} La realización de una inmunohistoquímica permite identificar la proteína precursora.

Sin embargo, el análisis de los depósitos con espectrometría de masas, actualmente se consideran el mejor abordaje, ya que tiene una sensibilidad del 88% y una especificidad del 96%, mayor que las técnicas inmunológicas.⁵⁵

En cuanto a la prevención y monitorización de los pacientes, como se ha comentado anteriormente, una detección temprana es crucial para evitar lo máximo posible el daño orgánico ya que normalmente esto resulta en altas tasas de mortalidad tras pocos meses después del diagnóstico.⁵⁶

Las manifestaciones clínicas de la amiloidosis sistémica AL se asemejan a los síntomas de afecciones más comunes que se encuentran en individuos de edad avanzada, por lo tanto, las pruebas de diagnóstico apropiadas generalmente se inician varios meses después del comienzo de los síntomas.⁵⁷ De hecho, en un estudio, la amiloidosis AL se diagnosticó más de 1 año después del inicio de los síntomas en el 40% de los pacientes.⁵⁷ Los retrasos en el diagnóstico de amiloidosis AL también son comunes en pacientes con GMSI diagnosticada, a pesar de la aparición de síntomas relacionados con amiloide.⁵⁸ En más del 95% de los pacientes existe daño cardíaco o renal y actualmente existen marcadores para detectarlo. Por ejemplo, un incremento en los niveles de NT-proBNP en el suero indica que hay daño cardíaco antes de que se manifiesten los síntomas.⁵⁹ También la tasa de filtración glomerular y la albuminuria pueden servir para detectar daño renal en etapas tempranas.⁶⁰ De tal forma que, evaluar estos parámetros pueden servir para detectar amiloidosis AL presintomática en más del 95% de los pacientes, lo cuales pueden ser tratados y tener mejor pronóstico.

1.4.1.5. Grupos de riesgo de los pacientes con amiloidosis AL.

La supervivencia de los pacientes con amiloidosis AL es muy heterogénea y depende en gran medida de la afectación cardíaca al diagnóstico, ya que los pacientes con daño cardíaco tienen una mediana de supervivencia de 3-6 meses, a diferencia de los que no, que pueden llegar a vivir muchos años.⁶¹

Actualmente, existen 3 modelos de estadificación del riesgo de los pacientes con amiloidosis AL, como se puede observar en la figura 7.

El primero de ellos (fig. 7a), es el sistema de estadificación cardíaca y es el más utilizado para el diseño de ensayos clínicos y para determinar el manejo de los pacientes. Ha sido desarrollado por la Clínica Mayo y modificado por investigadores europeos.^{61,62,63,64} Este sistema se basa en los niveles de NT-proBNP (con un nivel de corte de 332 ng/L) y de troponina I (nivel de corte de 0.1 ng/ml). Los pacientes se clasifican como estadio I, estadio II o estadio III en función de la presencia de cero, uno o dos marcadores por encima de los valores de corte, respectivamente. Para pruebas estándar, la troponina T se podría usar en lugar de la troponina I, con un nivel de corte de 0.06 ng/ml y de 54 ng/L para ensayos de alta sensibilidad. La presencia de niveles muy altos de NT-proBNP (> 8,500 ng/L) identifican pacientes con disfunción cardíaca avanzada (estadio IIIb), mientras que los pacientes en estadio III cuyos niveles de NT-proBNP son <8,500 ng por litro tienen un mejor pronóstico (estadio IIIa).

El segundo sistema de estadificación (fig. 7b) es el revisado del grupo de la Clínica Mayo, en el que se incorporan los niveles de diferencia entre la cadena ligera libre circulante involucrada y no involucrada (dFLC) para el estadiaje.^{65,66} Este sistema se basa en los niveles de NT-proBNP (nivel de corte de 1.800 ng/L), los niveles de troponina I (nivel de corte de 0.07 ng/ml) y la dFLC (nivel de corte de 180 mg/L). Aquí, los pacientes se clasifican en estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV, en función de la presencia de cero, uno, dos o tres marcadores por encima de los límites, respectivamente. La troponina T estándar se puede usar en este sistema, en lugar de la troponina I, con un límite de 0,035 ng/ml.

El último de los modelos (fig. 7c), es el modelo de estadificación renal, que se basa en la proteinuria y la tasa estimada de filtración glomerular (TFGe).^{60,67} En este modelo se distinguen tres estadios distintos. La enfermedad en estadio I se basa en la presencia de proteinuria <5 g en 24 horas y TFGe >50 ml/min/1.73m²; el estadio II se basa en proteinuria > 5 g en 24 horas o TFGe <50 ml/min/1.73m²; y la enfermedad en estadio III se basa tanto en proteinuria >5 g en 24 horas como en TFGe <50 ml/min /1.73m². El porcentaje y los números de riesgo de diálisis para la enfermedad renal en estadio I, estadio II y estadio III pueden ser diferentes según la modalidad de tratamiento utilizada.

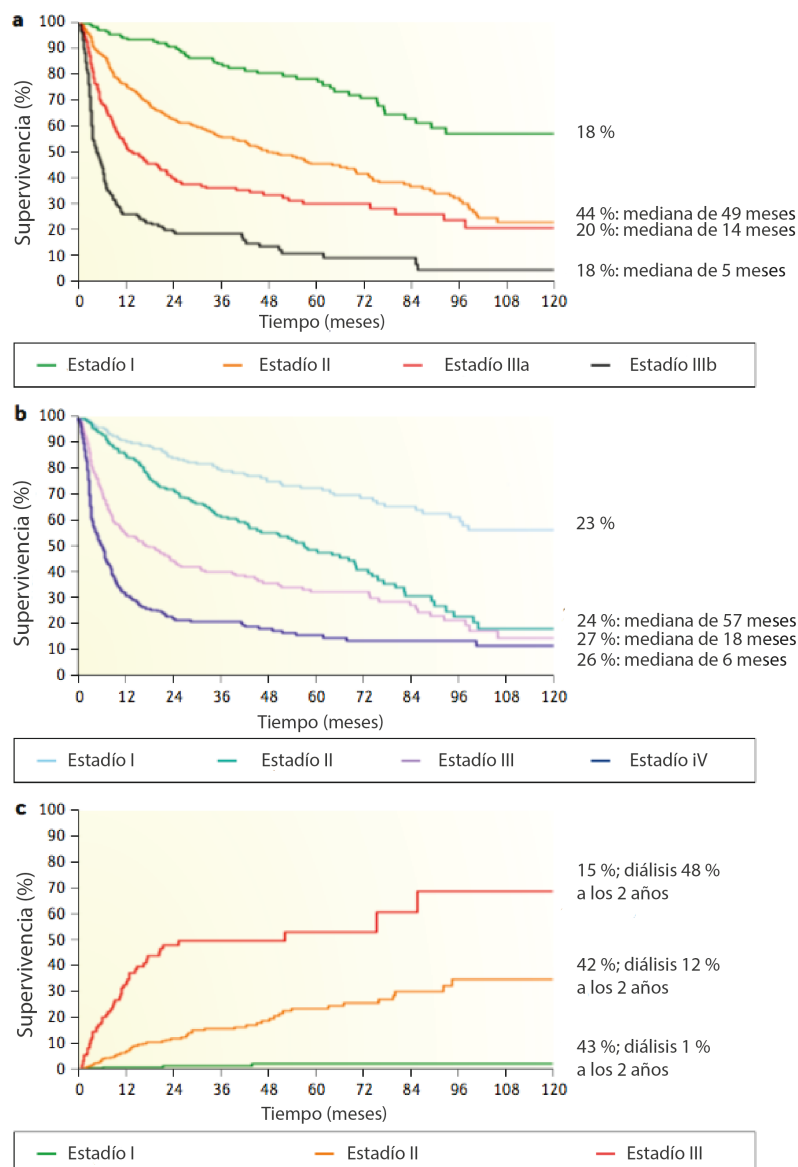


Figura 7. Representación de los 3 sistemas de estadificación de riesgo en amiloidosis AL. a. Sistema de estadificación cardíaco de la Clínica Mayor. b. Sistema de estadificación revisado de la Clínica Mayo. c. Sistema de estadificación renal. Imagen adaptada de Merlini *et al*¹⁸

1.4.1.6. Alteraciones genéticas y citogenéticas en la amiloidosis AL.

Actualmente, en la declaración de consenso sobre la estratificación de la Clínica Mayo de mieloma y la terapia adaptada al riesgo (mSMART) sobre el tratamiento en la amiloidosis AL,⁶⁸ la citogenética no se utiliza para agrupar a los pacientes en los distintos grupos de riesgo. Al contrario de lo que ocurre en el MM, donde numerosas alteraciones cromosómicas (AC) se han identificado como factores patogénicos y las pruebas moleculares se han convertido en un estándar en la evaluación diagnóstica.

Aun así, cada vez, están apareciendo más estudios donde la citogenética cobra importancia para evaluar el pronóstico de los pacientes y para adaptar los tratamientos de los pacientes. Por este motivo, en la guía actualizada se indica que se debe realizar un aspirado MO para determinar mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) un panel de mieloma estándar con trisomías, translocaciones de IgH y, duplicaciones y deleciones del cromosoma 1.

- Alteraciones citogenéticas en la amiloidosis AL.

En distintos estudios realizados con hibridación *in situ* fluorescente FISH, y FISH con tinción de las Ig del citoplasma (clg-FISH) se ha descrito que las alteraciones más frecuentes en amiloidosis AL son las traslocaciones del gen IgH,⁶⁹ localizado en el cromosoma 14. Estos eventos se asocian con las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, como ocurre en las GMSI y el MM.⁷⁰

La t(11;14)(q13;q32) es la que aparece con más frecuencia, en un 55% de los pacientes con amiloidosis AL.⁶⁹ Esta alteración en los pacientes con amiloidosis AL se relaciona con una sobrerregulación del oncogén *ciclina D1*,⁷¹ que podría manifestarse en una mayor expresión de factores de transcripción o promoción del ciclo celular. Aunque no se ha asociado con una mayor tasa de proliferación.⁷² Por otro lado, y aunque esta traslocación esté asociada con una naturaleza indolente y no sea un factor de riesgo en sí mismo, confiere una baja susceptibilidad al tratamiento con bortezomib (un inhibidor del proteasoma).⁷³ Un ejemplo de la detección de este tipo de traslocación se puede observar en la figura 8.

Otras alteraciones que se han identificado en los últimos años han sido: la t(4;14) (3%), la t(14;16) (4%),⁷⁴ t(6;14) (2%), t(14,20) (1%)⁷⁵ y otras traslocaciones del gen *IGH* pero en las que se desconoce el otro gen implicado en la fusión.⁷⁴

También se han detectado ganancias en 1q21 (19% de los casos), 5p15/5q35 (8%), 9q34 (22%)⁷⁶, 11q23 (33%), 15q22 (15%), 19q13 (15%), 5p15/5q35 (8%) y deleciones en 8q21 (7%) y 13q14 (31%), Las ganancias en 1q han sido identificadas como un factor pronóstico adverso en pacientes tratados con quimioterapia estándar (melfalán/dexametasona) y en MM es considerada por la guía MM mSMART un factor de riesgo intermedio. Por otro lado, las deleciones en 13q14 se asociaron frecuentemente con la t(4;14) y que incluye a los oncogenes *MMSET* y *FGFR3*.^{74, 77, 78, 76} La monosomía/delección del cromosoma 13 también se ha asociado con altos niveles de dFLC, NT-proBNP y plasmocitosis en MO.⁷⁵

Sin embargo, deleciones en el 17p no se han identificado con mucha frecuencia (2%), a diferencia de lo que ocurre en el MM.⁷⁵

Las trisomías más frecuentes que se han identificado en amiloidosis AL han sido: trisomía en el cromosoma 9 (20% de los casos), en el cromosoma 15 (14%), 7 (10%), 3 (10%) y 11(9%), donde también se han observado tetrasomías.

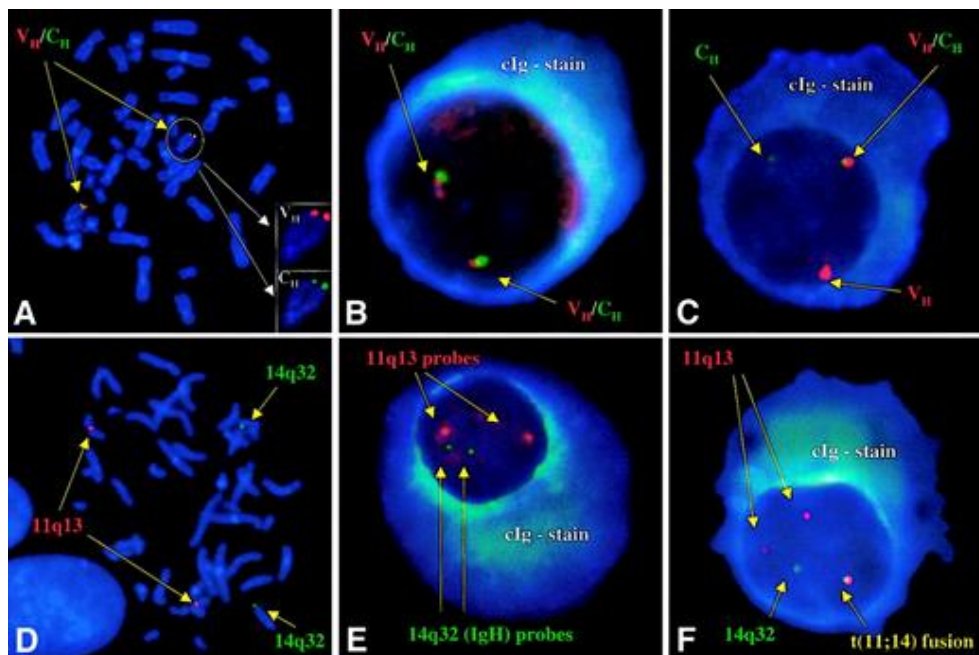


Figura 8. Patrones de hibridación normal y anormal mediante dos estrategias. A. Hibridación con las sondas VH y CH a la citobanda 14q32 en un control sano en metafase. B. Patrón normal de las sondas VHCH, con dos señales apareadas juntas. C. Patrón de señales celular que indica traslocación en 14q32. D. Hibridación de las sondas 14q32 y 11q13 en su localización correcta en control sano. E. Patrón normal de 14q32(verde)/11q13(rojo) de la estrategia de fusión. No se observan señales fusionadas. La luz azul intensa del citoplasma son las cadenas ligeras. Fuente: Hayman *et al*⁶⁹

Finalmente, en un estudio de *Granzow et al*,⁷⁹ con la serie de pacientes más grande hasta la fecha, donde estudian 118 pacientes con amiloidosis AL mediante SNPs-arrays y iFISH, identifican nuevas alteraciones cromosómicas como, trisomías en el cromosoma 4, 5, 17, 18 y 19, ganancias en 3p, 4q, 6p y 14q y deleciones en 4q, 6q, 14q, 16q y 20p. Algunas de estas alteraciones tienen potencial papel pronóstico como las deleciones 1p, las ganancias en 1q junto con deleciones en 14q, que se asocian con una peor supervivencia libre de progresión (SLP) y deleciones en 16q que se asocia con una mejor SLP.

En todos los estudios, se encontró al menos una alteración cromosómica en más del 72% de los casos.^{69,75,79}

En resumen, se demuestra que la citogenética es muy importante para el manejo y el estadiaje de los pacientes con amiloidosis AL ya que en estos estudios también se ha demostrado que la presencia de alteraciones citogenéticas está relacionada con una menor supervivencia global.⁷⁵

- Panorama mutacional en la amiloidosis AL.

A diferencia de lo que ocurre con otras gammapatías monoclonales como la macroglobulinemia de Waldenström (MW) y el MM, en las que gracias a las nuevas tecnologías como la secuenciación masiva, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la biología de la enfermedad, en la amiloidosis AL no se ha progresado mucho. Bien debido a la baja incidencia de la enfermedad o a la baja carga tumoral, todavía se desconoce si existe algún gen afectado en común entre todos los pacientes afectados de amiloidosis AL o si existe alguna recurrencia de los genes mutados.

Hasta la fecha, solamente se han realizado dos estudios en series pequeñas de amiloidosis, una de 24 y la otra de 48 pacientes ^{80,81}. En ambos estudios se utiliza la secuenciación masiva para el estudio del perfil mutacional.

En el primer estudio, identifican una media de 39 mutaciones somáticas por paciente. Los genes más frecuentemente mutados que identificaron fueron: *MUC16*, *LTBP4*, *RP1L1*, *SYNM*, *ALMS1*, *CASC5*, *CHGB*, *IGFN1*, *IL7R*, *OR11G2*, *PKHD1L1*, *SIGLEC12*, *SUSD5* y *ZBTB21*. Entre los genes mutados recurrentemente, se identificaron mutaciones en *IL7R*, un gen que codifica un receptor de la superficie celular que regula la recombinación V(D)J al alterar la accesibilidad de los sustratos de ADN a la recombinasa en las células pro-B.⁸²

Otras mutaciones se encontraron en genes *drivers* como *EGR1* (Q95R), *DIS3* (D479E, M667L), *IRF4* (S332G), y *TRAF3* (K99 *splicing*). También, algunos casos con mutaciones *hotspots* en MM en *NRAS* (Q61R and Q61H), pero no en *KRAS* ni en otros genes que hayan sido descritos como genes de factor pronóstico adverso en MM como *ATM*, *ATR*, *ZFHX*, y *TP53*.

En el segundo estudio, donde se realizó secuenciación masiva de exoma (WES) en 10 pacientes y un panel de 52 genes en otros 38 pacientes, identificaron una media de 33 mutaciones somáticas en regiones codificantes. De entre los 10 genes significativamente mutados (*XBP1*, *DUSP2*, *SMPDL3A*, *CD27*, *IGLL5*, *KFKBIA*, *KRAS*, *BIRC3*, *MAGEC3* y *FTSJ3*), 4 de ellos pertenecen a la vía de señalización NF-κB: *DUSP2*, *NFKBIA*, *KRAS* y *BIRC3*, sugiriendo una potencial importancia de esta vía en la patogénesis de la amiloidosis

AL.⁸¹ En el análisis de los 38 casos analizados con el panel encontraron que el gen más frecuentemente mutado fue el gen *IGLL5* (17% de los pacientes) seguido de *ASCC3*, *DNAH5*, *HIST1H1E*, *BRIP1*, *MEGF6*, *KRAS*, *ATR*, *ASB15*, *SPTAN1*, *PRDM16*, *FBN2* y *FN1*. Además, encontraron que las mutaciones en *HIST1H1E*, *ASB15*, *ASCC3* y *MEGF6*, se relacionaban con una disminución de la supervivencia global.⁸¹

1.4.1.7. Tratamientos.

El objetivo principal en la terapia para la amiloidosis AL es la eliminación del precursor amiloide y la reabsorción de los depósitos amiloides. La quimioterapia (convencional y de alta dosis) es efectiva para supresión de la síntesis de las cadenas ligeras, seguido de un trasplante autólogo de células madre (HDM-SCT).

Para comprobar la eficacia del tratamiento se miden cambios en los niveles de dFLC, NT-proBNP, proteinuria o TFG y se han establecido una serie de criterios para determinar el tipo de respuesta que alcanzan los pacientes, hematológica⁸³, cardíaca⁸³ y/o renal⁶⁰ (Tabla. 3).

Tabla 3. Criterios de respuesta en la amiloidosis AL

Respuesta	Valores medibles	Criterios
Hematológica	dFLC >50 mg/L	-Respuesta completa: inmunofijación negativa de suero y orina y ratio normal de cadenas ligeras libres . -Muy buena respuesta parcial: dFLC <40 mg/L -Respuesta parcial: disminución de mas del 50% de dFLC comparado con la línea basal
	dFLC 20–50 mg/L	Respuesta de baja dFLC: dFLC< 10mg/L
Cardíaca	NT-proBNP >650 ng/L	Disminución de NT-proBNP de >30% y >300 ng/L comparado con la línea basal
Renal	Proteinuria >0.5 g/24h (mayoritariamente albumina)	Disminución de la proteinuria >30% comparado con la línea basal (o es <0.5 g/24 h) en ausencia de reducción de TFGe de >25%

AL, immunoglobulin light chain; dFLC, difference between disease-associated and uninvolved circulating free light chain; TFGe, estimated glomerular filtration rate; NT-proBNP, amino-terminal fragment of type B natriuretic peptide. Adaptada de: Merlini *et al*¹⁸

Los tratamientos que se utilizan en amiloidosis AL derivan de los que se utilizan en el MM aunque con algunas modificaciones, debido a la disfunción orgánica ocasionada por el depósito amiloide.

El tipo de terapia que recibe cada paciente depende del grupo de riesgo al que pertenezca, también teniendo en cuenta la edad y la afectación cardíaca. Los pacientes de bajo riesgo (que representan el 20-25% de los pacientes con amiloidosis AL) reciben altas dosis de melfalán seguido de un HDM-SCT.⁸⁴ La terapia de inducción con ciclofosfamida, bortezomib y dexametasona (CyBorD) podría usarse en pacientes con más de un 10% de infiltración de células plasmáticas en la médula ósea y en pacientes que rechazan el HDM-SCT por adelantado,⁸⁵ como podrían ser los enfermos muy mayores y los enfermos con afectación cardíaca. Para estos pacientes, por lo general se usa melfalán y dexametasona (MDex) y CyBorD. En los pacientes que no se consigue una respuesta completa a los tres meses del HDM-SCT, se puede considerar la terapia de consolidación con bortezomib y dexametasona (BDex).⁸⁶

Los pacientes con riesgo intermedio (que representan aproximadamente el 60% de los pacientes con amiloidosis AL) son aquellos que no son elegibles para el HDM-SCT y sin afectación cardíaca grave. Por lo general, se usa la combinación de bortezomib, melfalán y dexametasona (BMDex). Sin embargo, el melfalán puede afectar a la recolección de células madre en pacientes que son candidatos potenciales para el HDM-SCT. La combinación CyBorD es preferible en estos casos. Para los pacientes que presentan neuropatía periférica o enfermedad pulmonar fibrótica se debe evitar el bortezomib debido a su potencial toxicidad neurológica y pulmonar.⁷⁶

Los pacientes con afectación cardíaca grave (entre el 20-25% de los pacientes con amiloidosis AL), con concentraciones séricas del biomarcador NT-proBNP muy altas (> 8,500 ng/L) y en una clase III o superior en la escala de la *New York Heart Association* (NYHA) se consideran de alto riesgo. Los regímenes basados en bortezomib, ya sea a bajas dosis o con dosis completa bajo observación estrecha en una unidad de cuidados críticos, pueden beneficiar al 30-40% de estos pacientes, aunque la supervivencia general es pobre (4 a 7 meses).⁸⁷ En estos pacientes, se debe considerar el trasplante cardíaco, seguido de HDM-SCT.⁸⁸

El tratamiento de pacientes recidivantes y/o refractarios se basa principalmente en medicamentos inmunomoduladores (IMiDs), y pomalidomida que parece ser bien tolerada y de acción rápida.⁸⁹ También se está comprobando que el daratumumab es muy efectivo

y podría pasar a una terapia inicial en combinación con regímenes que contengan bortezomib. También, en monoterapia ha demostrado ser bien tolerado y altamente efectivo en pacientes con amiloidosis AL pretratados superando la eficacia en el MM recidivante / refractario (RRMM).⁹⁰

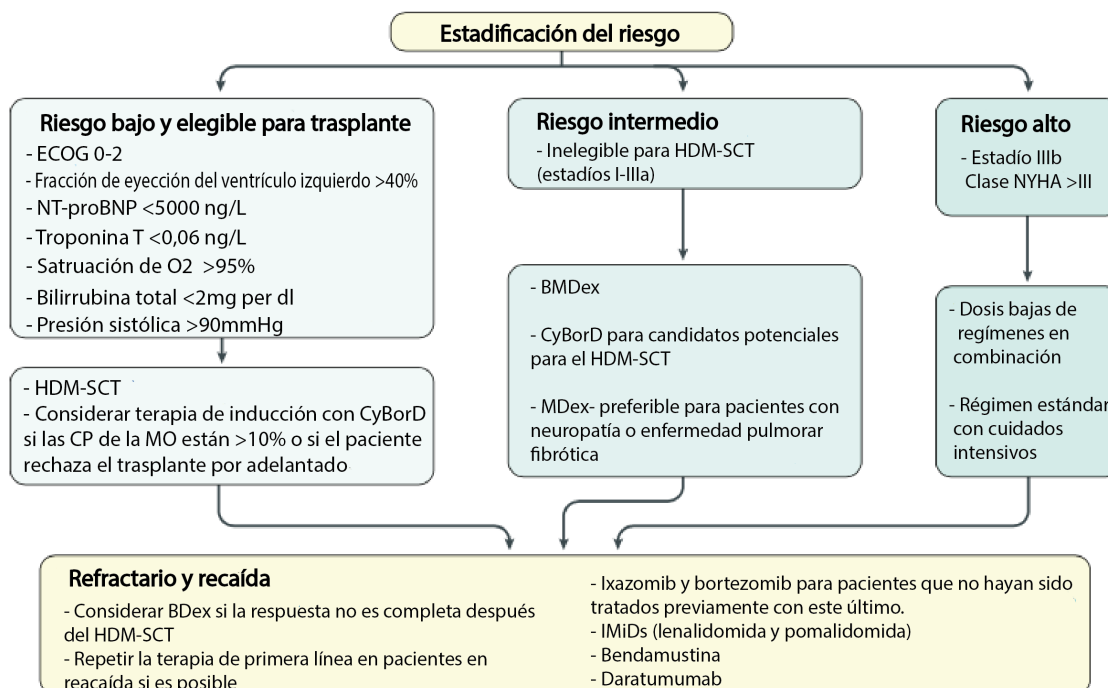


Figura 9. Diagrama de flujo que muestra el tratamiento adaptado al grupo de riesgo al que pertenecen los pacientes con amiloidosis AL. HDM-SCT, trasplante autólogo de células madre; ECOG, Grupo de Oncología Cooperativa del Este; MDex, melfalán y dexametasona; NYHA, New York Heart Association; CyBorD: ciclofosfamida, bortezomib y dexametasona; BMDex, bortezomib, melfalán y dexametasona. Fuente: Merlini *et al*¹⁸

Por último, en el tratamiento de la amiloidosis AL también es una parte muy importante la terapia de apoyo, incluyendo las medidas dietéticas, la terapia antiedematosa, la profilaxis de la trombosis venosa e incluso el trasplante de órganos (trasplante cardíaco o renal).⁹¹

1.4.1.8. Inmunoterapia en amiloidosis AL

Actualmente, existen varios anticuerpos monoclonales (AcMo) para el tratamiento en monoterapia o en combinación en el tratamiento de la amiloidosis AL. Algunos de ellos persiguen la erradicación del clon de CP que produce la proteína aberrante, mientras que otros están enfocados a la eliminación de las fibras amiloides.⁹²

- **Anticuerpos dirigidos contra el clon de células plasmáticas.**

Daratumumab

Daratumumab es un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 IgG1 κ . CD38 es un marcador de superficie que es altamente expresado por las células plasmáticas patológicas, al contrario que en el resto de poblaciones celulares.⁹²

Los mecanismos de acción del daratumumab son: inducción de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por célula y dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), apoptosis de las células tumorales y la modulación enzimática del receptor.⁹³

Tras varios ensayos clínicos, daratumumab se ha aprobado en monoterapia mostrando una buena tolerancia y alta eficacia en pacientes con amiloidosis AL tratados previamente, mostrando más efectividad incluso que en pacientes RRMM. Aunque su efecto es rápido y con una seguridad aceptable hay que prestar especial atención a la alta incidencia de infecciones relacionadas con el tratamiento.⁹⁰

Isatuximab

Isatuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1 κ que se une a un epítipo específico de CD38, pero una forma distinta a como lo hace daratumumab. De tal forma que los mecanismos que desencadena son: ADCC, ADPCP, CDC, agotamiento de células inmunes, inducción de apoptosis directa e inhibición de la actividad enzimática CD38.^{94,95}

Este AcMo está siendo revisado por la *US Food and Drug Administration* (FDA) para el RRMM. En amiloidosis AL, está siendo evaluado en un ensayo clínico en fase II en pacientes con enfermedad refractaria recidivante (NCT03499808) y del que todavía no se disponen los datos (activo pero sin reclutamiento a 1 mayo de 2020).

Elotuzumab

Elotuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 κ . Su diana terapéutica es la molécula de señalización de activación linfocítica de la familia F7 (SLAMF7), también llamada CS1. Esta glicoproteína está localizada en la citobanda 1q23, y se expresa de forma normal en las CP, linfocitos, células NK, etc. A diferencia de lo que ocurre en las CP clonales que suelen tener amplificaciones en esta región.⁹⁶ Los mecanismos de acción de este anticuerpo son principalmente vía ADCC mediada por células NK.

Elotuzumab ha sido aprobado en RRMM y actualmente hay un ensayo clínico en reclutamiento (NCT03252600) utilizando lenalidomida, dexametasona y elotuzumab con o sin ciclofosfamida en el tratamiento de pacientes con amiloidosis primaria recurrente.

- **Anticuerpos dirigidos contra las fibras amiloides.**

NEOD001

El anticuerpo monoclonal IgG1 NEOD001 (birtamimab) es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal murino 2A4. La diana de este anticuerpo son las fibras amiloides.⁹⁷

A pesar de tener un comienzo prometedor, y haber empezado un estudio en fase III, el desarrollo del medicamento se suspendió en abril de 2018 en función de los resultados del estudio de fase IIb, que no llegó a terminarse. En este ensayo, la mejor respuesta cardíaca y renal después de 12 meses fue baja y similar entre la cohorte tratada con NEOD001, *versus* la cohorte tratada con placebo. De tal modo que Prothena discontinuó el desarrollo de NEOD001 para amiloidosis AL.⁹⁸

CAEL-101 (11-1F4)

CAEL-101 o 11-1F4, es un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1 κ murino que reconoce un epítipo conformacional asociado a las fibras amiloides relacionadas con las cadenas ligeras humanas.⁹⁹ En un estudio en fase I, 11-1F4 ha sido bien tolerado por todos los pacientes tratados y mostró respuestas orgánicas prometedoras.¹⁰⁰ Actualmente se están planteando nuevos ensayos clínicos con este fármaco.

Anti-SAP

Como su nombre indica, este anticuerpo está dirigido contra el componente SAP, del que ya hemos hablado previamente. Es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 y también se denomina, dezamizumab. La estrategia de este fármaco era disminuir los niveles de SAP en suero, ya que protege los depósitos amiloides, y disminuir residuos de SAP en los tejidos, pero tras los resultados en un estudio en fase II se identificó que el perfil de beneficio/riesgo no era el esperado, de modo que el desarrollo de esta terapia fue finalizado. Actualmente, nuevas estrategias usando SAP están siendo desarrolladas.⁹²

En resumen, estrategias basadas en la eliminación de los depósitos amiloides junto con las terapias dirigidas a la eliminación del clon tumoral podrían mejorar el manejo y pronóstico de los pacientes con amiloidosis AL. Desafortunadamente, dos de los

anticuerpos anti-amiloide han sido abandonados tras su falta de eficacia en ensayos clínicos.

1.5. Mieloma Múltiple.

1.5.1. Definición y aspectos generales del MM.

El mieloma múltiple es una enfermedad incurable, en la cual, la recaída se caracteriza por un nuevo crecimiento del tumor residual y la supresión inmunológica. El MM tiene una biología muy compleja que afecta a muchos aspectos de la enfermedad y a la respuesta al tratamiento.¹⁰¹

Esta neoplasia de células plasmáticas se caracteriza por la proliferación y acumulación incontrolable de CP clonales en la MO, la presencia de Ig monoclonal en el suero u orina, lesiones osteolíticas, daño renal e inmunodeficiencia. Estas CPs producen y secretan una Ig anormal de tipo monoclonal, principalmente IgG o IgA, dando lugar al pico M. Este pico puede estar formado por la inmunoglobulina completa o por las cadenas ligeras. El exceso de cadena ligeras se denomina Bence-Jones, que debido a su bajo peso molecular pueden pasar a la orina. Las manifestaciones clínicas más comunes son fatiga, dolor óseo e infecciones recurrentes.¹⁰²

1.5.2. Epidemiología.

El MM representa el 1% de todas las neoplasias malignas y aproximadamente el 10% de todos los cánceres hematológicos, siendo el más común después del linfoma.¹⁰³ La incidencia anual, en los Estados Unidos es de 4,3 casos por 100 000 habitantes, resultando en más de 15 000 nuevos pacientes cada año.¹⁰⁴ Además, esta enfermedad es dos veces más común en población negra americana que en población blanca y más común en hombres que en mujeres.¹⁰⁵ En Europa, en población caucásica, la incidencia es intermedia con 4,5-6 casos/100 000 habitantes/año y una mortalidad de 4,1/100 000 habitantes/año.¹⁰⁶

La media de edad al diagnóstico es de 66 años, siendo extremadamente raro que se desarrolle en personas menores de 30, apareciendo con una frecuencia de entre el 0,02 y el 0,3%¹⁰⁷ y del 2% en pacientes menores de 40 años.¹⁰⁸

En general, no se considera una enfermedad con una base genética hereditaria, sin embargo, aunque raro, se han encontrado casos familiares.¹⁰⁹

En cuanto a la prevalencia mundial estimada a 5 años es de aproximadamente 230 000 casos.¹¹⁰

Es importante destacar que en la última década, en la población general, la tasa de supervivencia ha mejorado significativamente gracias a la disponibilidad de terapias efectivas comenzando por el trasplante autólogo de células madre (TAPH) y más recientemente por el uso de los PIs, IMiDs y anticuerpos monoclonales.^{111,112}

En los últimos estudios, se ha informado de que la supervivencia en pacientes con MM recidivantes antes del año 2000 fue de 12 meses, en comparación con 24 meses después del año 2000.¹¹³ Las nuevas terapias, y en concreto, los fármacos inmunomoduladores y los inhibidores del proteasoma, han llevado a los pacientes a sobrevivir más tiempo, mejorando la tasa de supervivencia a 5 y 10 años.¹¹⁴ Aunque esta respuesta sigue siendo muy variable debido a la heterogeneidad de la respuesta al tratamiento.

1.5.3. Etiología y mecanismos moleculares.

A día de hoy, la causa del mieloma múltiple sigue siendo desconocida, aunque algunos estudios han identificado potenciales factores de riesgo, tanto ambientales como genéticos.

En uno de estos estudios, la incidencia del MM se vio incrementada tres veces en individuos que se habían expuesto a una radiación de ≥ 0.5 Gy comparada con individuos control, después de 20 años o más tras la exposición a la bomba atómica de Hiroshima y Nagasaki.¹¹⁵ Por otro lado, un estudio más reciente donde analizan datos desde 1950 hasta 1987 con el seguimiento anual de 2 778 000, sugieren que los individuos con exposición a menos de 4 Gy no había incrementado significativamente el riesgo de MM.¹¹⁶

También se han estudiado las exposiciones ocupacionales en varias poblaciones. Por ejemplo, en un gran metaanálisis de datos de granjeros de Estados Unidos se informó de un riesgo relativo de 1,38, pero que el aumento de este riesgo sea debido a la exposición a pesticidas, disolventes, agentes infecciosos y otros factores no ha sido determinada.¹¹⁷ Aunque la evidencia que existe es baja, también se ha asociado la exposición a tintes del pelo y a productos con benceno y petróleo a un aumento del riesgo de desarrollar MM.^{118,119}

Por otro lado, parece ser que también existen factores genéticos asociados al MM, ya que se ha informado de 8 familias con MM.¹²⁰ Además, el riesgo de GMSI en familiares de primer grado de pacientes con MM aumenta dos veces.¹²¹

Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han identificado múltiples *loci* genéticos asociados con una mayor mortalidad.¹²² También se han identificado SNPs que podrían llevar a la activación de *MYC* (gen asociado con la progresión del MM), *loci* asociados con una supervivencia inferior en pacientes (como 6p25 y 16p13),¹²³ así como SNPs asociados con el desarrollo de la toxicidad relacionada con los fármacos, como la neuropatía inducida por bortezomib.¹²⁴

En lo referente a la biología y los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad son complejos y muchos de los aspectos todavía son desconocidos.

Para comprender el MM, es necesario entender el desarrollo de las células B y la biología de las células plasmáticas. Las células plasmáticas se desarrollan a partir de células madres hematopoyéticas. Estas células madres van sufriendo diferentes pasos de diferenciación en la médula ósea y en los órganos linfoides secundarios, desde células B hasta células plasmáticas. En la médula ósea, las células B inmaduras experimentan un reordenamiento V(D)J, proceso por el cual se genera un repertorio de inmunoglobulinas primarias.¹²⁵ Estas células B que expresan en la superficie celular un complejo IgH-IgL (receptor de las células B) migran a los órganos linfoides secundarios. Aquí, sufren distintos procesos como maduración por afinidad, hipermutación somática y recombinación de cambio de clase (es decir, de IgM a IgG, IgA, IgD, o IgE). El resultado es la producción de anticuerpos que tienen una alta afinidad por antígenos específicos y con diferentes propiedades funcionales (es decir, Igs diferentes).

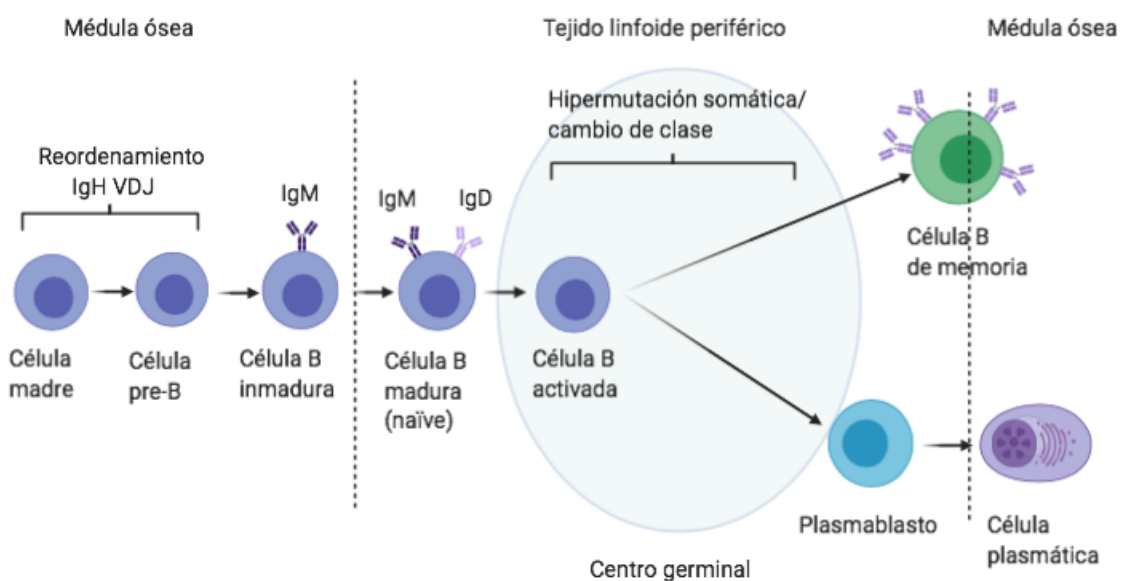


Figura 10. Maduración de las células B. *IgG u otro isotipo de Ig. Ig: inmunoglobulina, VDJ, diversidad variable y unión.¹⁰¹

Para la recombinación de cambio de clase y para la hipermutación somática es necesaria la rotura de la doble cadena de ADN en los *loci* de las inmunoglobulinas. El problema está en que estas rupturas de ADN pueden fusionarse con otras rupturas que ocurren en otras partes del genoma, lo que lleva a fusiones aberrantes del ADN y traslocaciones cromosómicas. La mayoría de estas traslocaciones son intrascendentes, ya que estas células no producen progenie. Sin embargo, las traslocaciones que involucran oncogenes pueden dotar a las células de una ventaja proliferativa y es lo que podría conducir al desarrollo de estados patológicos como las GMSI, SMM y el MM.

Por lo tanto, las traslocaciones cromosómicas y las aneuploidías, de las que se hablará más adelante, son un posible evento iniciador del MM. Otros procesos que forman parte de la patogénesis del MM, además de las alteraciones genéticas y los defectos cromosómicos son las alteraciones epigenéticas y el microambiente tumoral.¹²⁶

1.5.4. Estadios y evolución clínica del Mieloma Múltiple.

Como ya se ha comentado y como se esquematiza en la figura 11, la presencia de una GMSI podría marcar el inicio del desarrollo del MM. A esta etapa le sigue una etapa intermedia de la enfermedad que desarrollan algunos pacientes denominada, MM asintomático. Estos pacientes tienen unos niveles de proteína M mayores de 30g/L y aproximadamente un 10% de CP en la MO, pero son asintomáticos con respecto al daño orgánico terminal relacionado con el MM.

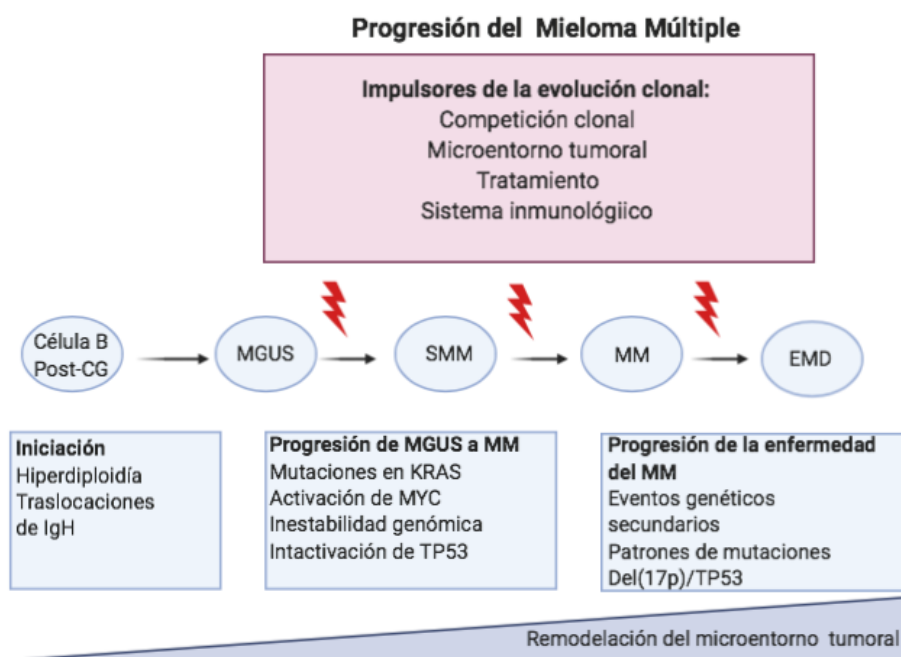


Figura 11. Progresión del mieloma múltiple¹²⁷.

Los pacientes SMM progresan a MM durante los 5 primeros años tras el diagnóstico, después la tasa de progresión disminuye.¹²⁸

En las etapas finales de la enfermedad, las células de MM pueden adquirir la capacidad de crecer fuera de la MO, y es lo que se conoce como mieloma extramedular o leucemia de células plasmáticas (PCL). Toda esta transformación maligna de células B o CP en GMSI y MM, requiere tanto eventos iniciales, como traslocaciones del gen IgH o hiperdiploidía, como múltiples eventos genéticos secundarios tales como variaciones en el número de copia (CNV), mutaciones que se acumulan en el clon tumoral y cambios epigenéticos. Todo ello también promovido por el remodelamiento del nicho de la MO, la evolución y competición clonal (de la cual se hablará más adelante), el resto de células del sistema inmunitario y el tipo de terapias recibidas.

El diagnóstico del MM se caracteriza por la presentación y desarrollo de las características denominadas CRAB (hipercalcemia, fallo renal, anemia y lesiones óseas). Según la última revisión del IMWG,¹²⁹ la definición de MM implica infiltración de $\geq 10\%$ de células plasmáticas en la MO o un plasmocitoma óseo probado mediante biopsia y uno o más de los siguientes eventos:

- Evidencia de daño orgánico como consecuencia de la proliferación de las CPs, como:
 - Hipercalcemia: calcio sérico $> 0,25\text{mmol/L}$ ($> 1\text{ mg / dL}$) más alto que el límite superior de lo normal, o $> 2,75\text{ mmol/L}$ ($> 11\text{ mg / dL}$).
 - Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina $< 40\text{ml por minuto}$ o creatinina sérica $> 177\text{ }\mu\text{mol/L}$ ($> 2\text{ mg/dL}$).
 - Anemia: valor de hemoglobina $> 20\text{ g/L}$ por debajo del límite inferior de lo normal, o un valor de hemoglobina $< 100\text{ g/L}$.
 - Lesiones óseas: una o más lesiones osteolíticas en radiografía esquelética, tomografía computarizada o PET-CT.
- Cualquiera de los siguientes biomarcadores de malignidad:
 - Infiltración en la MO de CP $\geq 60\%$
 - Ratio de dFLC ≥ 100

- Más de una lesión focal en estudios de resonancia magnética

Tras el diagnóstico, los pacientes reciben una línea de tratamiento y si éste es efectivo, los valores bioquímicos comienzan a estabilizarse y la sintomatología empieza a desaparecer. Sin embargo, el MM se caracteriza por el desarrollo de sucesivas recaídas requiriendo nuevas líneas de tratamiento para frenar los síntomas y la progresión de la enfermedad.¹⁰¹ En otros casos, los pacientes se muestran refractarios y nunca llegan a alcanzar una respuesta suficiente para controlar la enfermedad.

1.5.5. Factores pronósticos y estadificación de los pacientes.

En el mieloma múltiple, varios factores, como las alteraciones y citogenéticas y biomarcadores, pueden actuar como factores pronósticos.

En cuanto a los marcadores citogenéticos, se evalúan en la MO en todos los pacientes,¹³⁰ ya que, por ejemplo, la del(17p) y la t(4;14) son marcadores de mal pronóstico. Sin embargo, la coexistencia de distintas aberraciones cromosómicas puede variar el perfil de riesgo, como la trisomía del cromosoma 3 o 5 que se asocian con una mejora del mal pronóstico asociado con la del(17p) y la t(4;14).^{131.132} Por el contrario, otros factores pueden empeorar el riesgo, por ejemplo, la presencia de la del(1p32) en pacientes con la t(4;14) y la del(6q) en pacientes con la del(17p).¹³³ También la presencia de la del(1p) empeora el buen pronóstico que confiere la t(11;14).¹³⁴

Las traslocaciones t(4;14), t(14;16), t(14;20) y la del(17/17p) junto con un cariotipo no hiperdiploide se consideran factores de alto riesgo, independientemente del tratamiento, según el sistema de estadificación de riesgo del IMWG.¹³⁵ La combinación de tres o más alteraciones citogenéticas se considera un factor de riesgo alto y se asocia con una supervivencia menor de dos años.¹³⁶ De tal modo que se ha establecido por el IMGW como prueba de rutina en el diagnóstico el estudio mediante FISH el estudio de la t(4;14) y la del(17p). Aunque también se debería tener en cuenta el perfil de expresión genético, la detección de mutaciones y las CNVs.

Hasta la fecha, se han propuesto varios sistemas de estadificación de riesgo como el sistema internacional de estadiaje (ISS)¹³⁷. La base de este sistema fueron los niveles de albúmina y de β_2 -microglobulina. Más tarde, en un ISS posterior revisado, se incluyeron los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y las alteraciones cromosómicas. Además, se han descrito otros factores pronósticos que podrían repercutir en la supervivencia de los pacientes (Tabla 4).¹³⁵ Actualmente, con el desarrollo de las nuevas tecnologías se ha

descrito un nuevo subgrupo de pacientes de muy alto riesgo, denominado “double hit”. Estos pacientes se caracterizan por tener o bien una inactivación bialélica de *TP53* o una amplificación (4 copias o más) de 1q21.¹³⁸

Tabla 4. Estadificación de riesgo en los pacientes con mieloma múltiple.

Sistema de estadiaje internacional
Etapa I: niveles de B ₂ -microglobulina <3,5mg/L y albúmina sérica ≥ 3,5g/dl
Etapa II: No etapa I o III
Etapa III: niveles de B ₂ -microglobulina ≥5,5mg/L o mayor
Sistema de estadiaje internacional revisado
Etapa I: Sistema internacional de estadificación estadio I, niveles normales de lactato deshidrogenasa (LDH) y marcadores citogenéticos de riesgo estándar, detectados mediante hibridación fluorescente in situ (FISH)
Etapa II: No etapa I o III
Etapa III: Sistema de estadificación internacional en etapa III y niveles de LDH más altos de lo normal o marcadores citogenéticos de alto riesgo, detectados mediante FISH (como la presencia de del (17p), t (4;14) y t(14;16))
Otros factores
Número de CPs circulantes, enfermedad extramedular, alta tasa de proliferación de las CPs, presencia de mutaciones en TP53, fallo renal, inmunoparesia...

LDH: Lactato deshidrogenasa. Adaptada de *Kumar et al*¹²⁶

1.5.6. Alteraciones citogenéticas, moleculares y perfil mutacional del mieloma múltiple.

El MM, como ya se ha comentado, es una enfermedad que se caracteriza por presentar una gran inestabilidad y heterogeneidad cromosómica. Se han identificado numerosas alteraciones citogenéticas, que han sido muy bien estudiadas y que van apareciendo a largo del proceso hacia el desarrollo de MM. De manera que se pueden agrupar en eventos primarios, que aparecen en los primeros pasos de la transformación, y eventos secundarios, en etapas más avanzadas. Sin embargo, estas numerosas alteraciones citogenéticas no son suficientes para explicar la transformación maligna de la CP de MM. Si no que también se han descubierto numerosos genes y alteraciones moleculares que forman parte de este proceso de malignidad. Un resumen de todas ellas se encuentra en la siguiente tabla :

Tabla 5. Alteraciones genéticas, citogenéticas y moleculares en el desarrollo del mieloma múltiple.

Eventos genéticos subyacentes a la iniciación y la progresión del MM hasta PCL	
<ul style="list-style-type: none"> • Variantes hereditarias (SNPs) <p>2p: <i>DTNB</i> y <i>DNMT3A</i></p> <p>3p: <i>ULK4</i> y <i>TRAK1</i></p> <p>7p: <i>DNAH11</i> y <i>CDCA7L</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Eventos genéticos primarios (% de tumores) • Traslocaciones de <i>iGH@</i> y genes afectados <p>t(4;14): <i>FGFR3</i> y <i>MMSET</i> (11%)</p> <p>t(6;14): <i>CCND3</i> (<1%)</p> <p>t(11;14): <i>CCND1</i> (14%)</p> <p>t(14;16): <i>MAF</i> (3%)</p> <p>t(14;20): <i>MAFB</i> (1.5%)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hiperdiploidía (57%) <p>Trisomía de los cromosomas: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eventos genéticos secundarios (% de tumores) • Ganancias <p>1q: <i>CKS1B</i> y <i>ANP32E</i> (40%)</p> <p>12p: <i>LTBR</i></p> <p>17q: <i>NIK</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Traslocaciones secundarias <p>t(8;14): <i>MYC</i></p> <p>Otras traslocaciones que no implican <i>IGH@</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Eventos epigenéticos <p>Hipometilación general</p> <p>Hipermetilación en genes específicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eventos genéticos secundarios (% de tumores)(continuación) • Eventos moleculares característicos de MM <p>Inmortalización</p> <p>Alteración ciclo G1/S (<i>CDKN2C</i>, <i>RB1</i> (3%), <i>CCND1</i> (3%) y <i>CDKN2A</i>)</p> <p>Proliferación (<i>NRAS</i> (21%), <i>KRAS</i> (28%), <i>BRAF</i> (5%) y <i>MYC</i> (1%))</p> <p>Resistencia a la apoptosis (<i>PI3K</i> y <i>AKT</i>)</p> <p>Vía NF-κB (<i>TRAF3</i> (3%), <i>CYLD</i> (3%) y <i>I-κB</i>)</p> <p>Localización anormal y enfermedad ósea (<i>DKK1</i>, <i>FRZB</i> y <i>DNAH5</i> (8%))</p> <p>Diferenciación anormal de las CPs (<i>XBP1</i> (3%), <i>PRDM1</i> (6%) y <i>IRF4</i> (5%))</p> <p>Alteración en la reparación del DNA (<i>TP53</i> (6%), <i>MRE11A</i> (1%) y <i>PARP1</i>)</p> <p>Edición del RNA (<i>DIS3</i> (13%), <i>FAM46C</i> (10%) y <i>LRRK2</i> (5%))</p> <p>Alteraciones epigenéticas (<i>UTX</i> (10%), <i>MLL</i> (1%), <i>MMSET</i> (8%), <i>HOXA9</i> y <i>KDM6B</i>)</p> <p>Vigilancia inmune anormal</p> <p>Alteraciones en el metabolismo energético</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deleciones <p>1p: <i>CDKN2C</i>, <i>FAF1</i> y <i>FAM46C</i> (30%)</p> <p>6q (33%)</p> <p>8p (25%)</p> <p>11q: <i>BIRC2</i> y <i>BIRC3</i> (7%)</p> <p>13: <i>RB1</i> y <i>DIS3</i> (45%)</p> <p>14q: <i>TRAF3</i> (38%)</p> <p>16q: <i>CYLD</i> y <i>WWOX</i> (35%)</p> <p>17p: <i>TP53</i> (8%)</p>

PCL: Leucemia de células plasmáticas. Adaptada de Morgan *et al* ¹³⁹

Los estudios de secuenciación masiva han demostrado que no existe una mutación *driver* universal en el MM, si no la presencia de mutaciones únicas y compartidas en subclones coexistente de CP malignas.^{139,140,141,142}

1.5.7. Vías de señalización alteradas en el mieloma múltiple.

Como se ha descrito en el apartado anterior, el MM se caracteriza por muchas mutaciones que ocurren en pequeños subconjuntos de pacientes. A pesar de ello, muchas de estas mutaciones se pueden agrupar en varias rutas de señalización, por ejemplo, la ruta pro-supervivencia del factor nuclear κB (NF-κB), que es la vía de señalización central en las células B.^{143,144} De hecho, en el 20% de los pacientes, la alteraciones genéticas dan como resultado la activación de la vía no canónica de NF-κB, la cual puede aumentar la expresión de varias proteínas antiapoptóticas (Fig. 12).¹⁴⁵

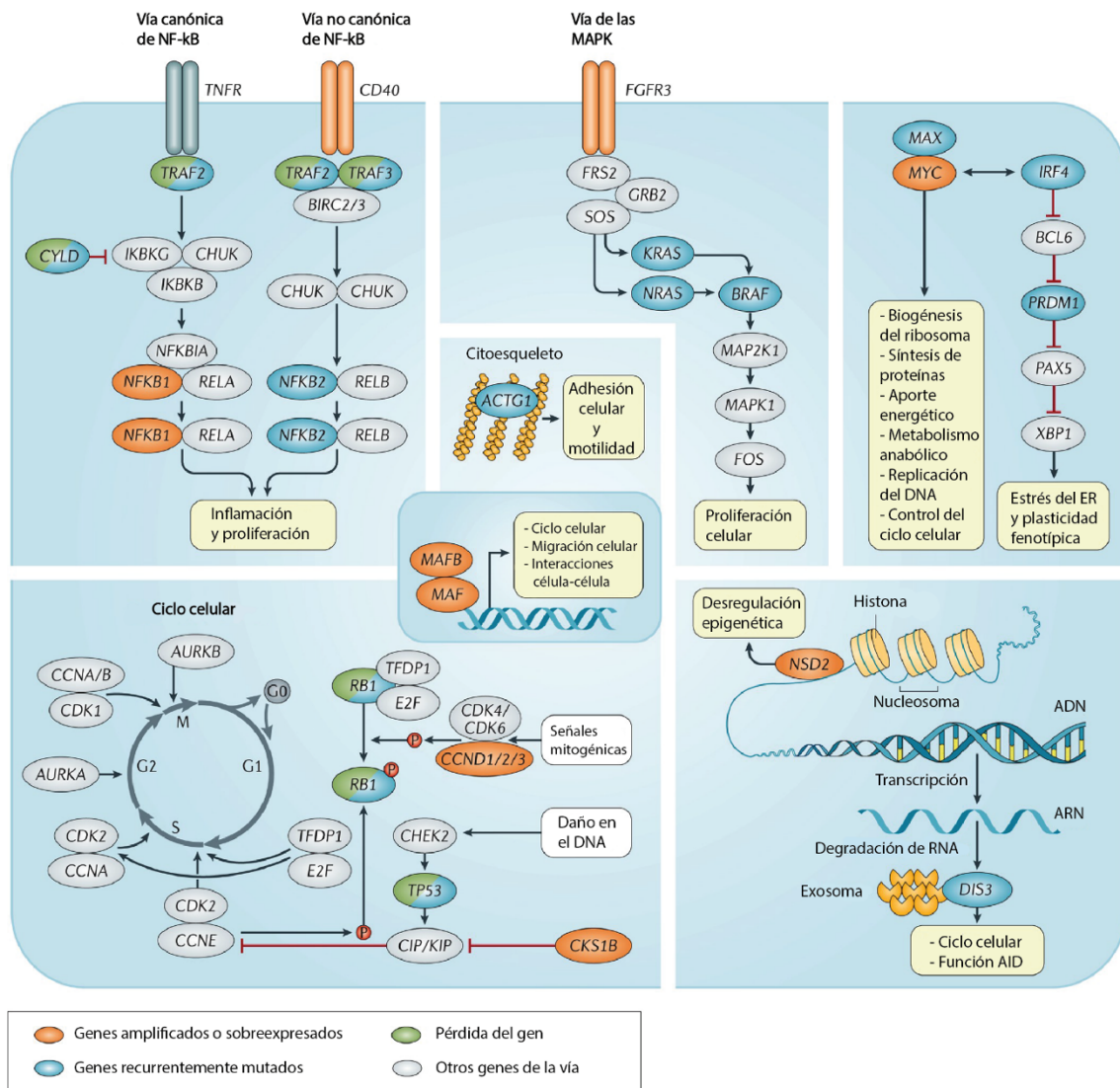


Figura 12. Rutas de señalización alteradas en el mieloma múltiple. AID, deaminasa de citosina inducida por activación; ER, retículo endoplasmático; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno. Imagen adaptada ¹²⁶

Otras vías que se ven alteradas son: la regulación del ciclo celular, las interacciones con el microambiente (sobreexpresión de MAF en t(14;16), y t(14;20)), cambios en el citoesqueleto y alteraciones epigenéticas.¹⁴⁶

1.5.8. Tratamientos

Debido al hecho de que el MM es una enfermedad muy heterogénea, los pacientes presentan diferentes niveles de sensibilidad a los fármacos, por lo que el tratamiento con un único fármaco no sería efectivo.

Durante estos últimos años se ha avanzado en el tratamiento de esta enfermedad con la incorporación de fármacos de distinta naturaleza, que se administran de manera conjunta o en diferentes combinaciones, lo que ha ayudado a alargar la esperanza de vida de estos pacientes.¹⁴⁷ Al igual que en el caso de la amiloidosis AL, si los pacientes cumplen los requisitos el TAPH está indicado.

Agentes alquilantes

La ciclofosfamida, el melfalán y la bendamustina fueron los primeros fármacos que se utilizaron en el tratamiento del MM y actualmente se siguen usando.¹⁴⁸ Su mecanismo de acción se basa en la alteración del ADN mediante la formación de puentes cruzados, introducción de mutaciones y fragmentación de éste.¹⁴⁹ Aunque son muy eficaces, se han identificado pacientes refractarios o recidivantes mediante un mecanismo que no está del todo claro. Algunos autores sugieren que podría deberse a la capacidad de reparación del ADN.¹⁵⁰

Glucocorticoides

El mecanismo de acción de estos fármacos no es del todo conocido. Aunque se ha demostrado que tienen la capacidad de inducir la apoptosis en las células de MM *in vitro*, lo que sugiere que la eficacia de este fármaco *in vivo* en pacientes. También se ha observado un efecto positivo para paliar los síntomas de la quimioterapia generalmente utilizada en el tratamiento del MM. ¹⁵¹

Los glucocorticoides ampliamente utilizados en el MM son: la prednisona y la dexametasona, que han mostrado en ser muy eficaces aumentando la supervivencia de los pacientes.^{152,153}

Inhibidores del proteasoma

En las últimas dos décadas los inhibidores del proteasoma (PIs) han aparecido para cambiar el tratamiento en las enfermedades hematológicas y en concreto en el MM, de modo que ahora forman uno de los pilares del tratamiento.

Hasta la fecha, se han aprobado por la FDA tres tipos de PIs. El primero de todos fue el bortezomib, después el agente de segunda generación, carfilzomib y por último, el primer PI que se administra de forma oral, ixazomib.¹⁵⁴

Los mecanismos por los cuales los PIs conducen a la muerte celular son diversos y afectan a varias vías utilizadas en las células cancerosas (Fig.13)

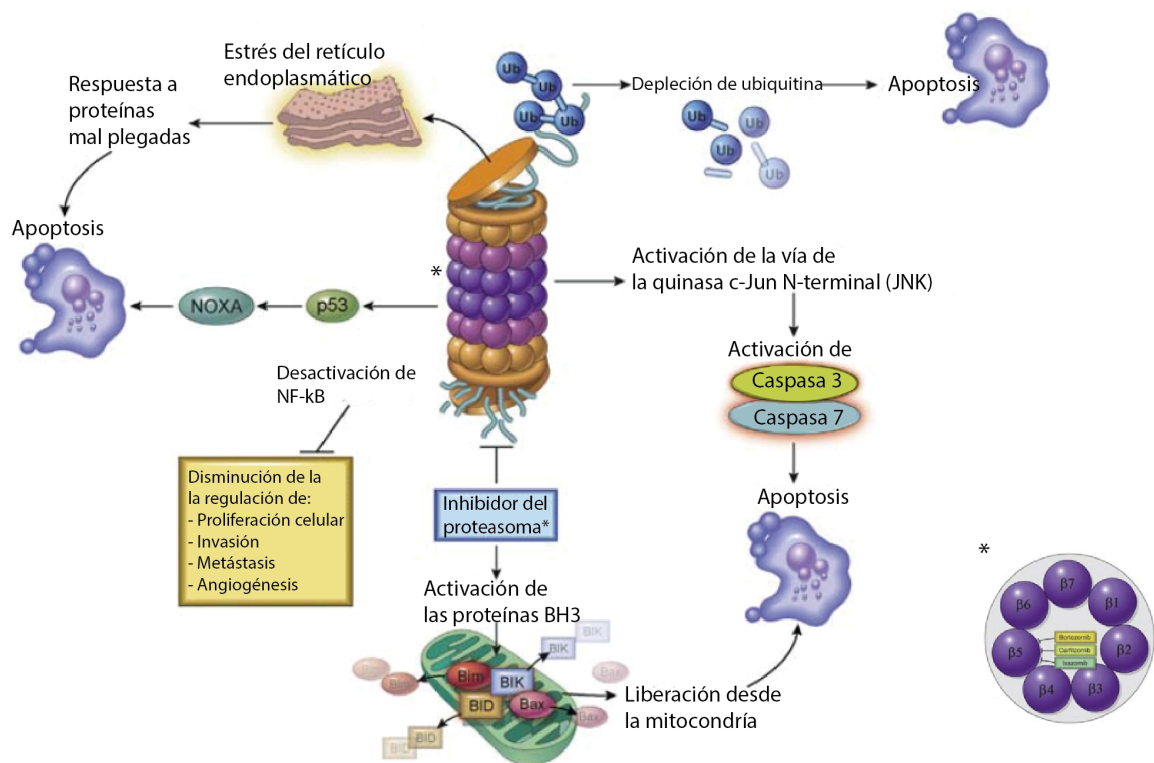


Figura 13. Mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma.*Bortezomib, carfilzomib, e ixazomib inhiben la subunidad $\beta 5$, inhibiendo así la actividad catalítica del proteasoma. Imagen adaptada de Nunea A y Annunziata CM.¹⁵⁵

El primer mecanismo de citotoxicidad, es la inhibición de la ruta NF- κ B y por tanto la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis.¹⁵⁶ Por otro lado, la inhibición del proteasoma provoca la activación de la ruta c-Jun quinasa NH₂-terminal (JNK) y de p53, activando proteínas pro-apoptóticas como Bim, BIK, BID, Bax y NOXA.¹⁵⁷ Por último, como las células de mieloma producen una gran cantidad de Igs, hay una alta carga proteica

para el retículo endoplasmático (RE) que cuando se estresa puede activar rutas de apoptosis. Los PIs evitan la degradación de las proteínas ubiquitinadas, bloqueando la translocación de proteínas mal plegadas del RE al proteasoma. La acumulación de proteínas mal plegadas provoca un estrés del RE, conduciendo a la apoptosis celular.¹⁵⁸

A pesar de su alta efectividad, mejorando significativamente los síntomas, disminuyendo la masa tumoral y provocando altas tasas de remisión, parece ser que las recaídas de los pacientes son inevitables debido a los mecanismos de resistencia.¹⁵⁹

Recientemente, algunos de estos mecanismos de resistencia han sido descritos, como por ejemplo, la disminución de la regulación de la subunidad 19S del proteasoma, de transportadores de fármacos ABC1 y mutaciones somáticas en el gen *PSMB* que forma parte de la subunidad catalítica del proteasoma.¹⁶⁰

1.5.9. Fármacos inmunomoduladores.

Al igual que con la aparición de los PIs, los fármacos inmunomoduladores (IMiDs) han mejorado significativamente la supervivencia de los pacientes con MM.¹⁶¹

El primer fármaco en utilizarse fue la talidomida, un IMiD de primera generación, asociado con una alta toxicidad en pacientes mayores. Después, apareció el IMiD de segunda generación, lenalidomida, con menores efectos tóxicos que la talidomida, utilizado tanto en nuevos diagnósticos, como en RRMM y como terapia de mantenimiento tras el TAPH.

La pomalidomida, de tercera generación, es 10 veces más potente que la lenalidomida y ha mostrado resultados muy buenos en pacientes de MM en recaída y para los refractarios a lenalidomida y bortezomib.¹⁶¹ A pesar de esto, también provocan efectos secundarios graves y hay pacientes que desarrollan resistencia, de modo que se siguen estudiando cuales son los mecanismos de resistencia a IMiDs en pacientes con MM.¹⁶²

Estos fármacos tienen múltiples efectos biológicos como la teratogenicidad, la estimulación de la producción de IL-2 por las células T y la inhibición de la producción de TNF por los monocitos, pero se desconoce la base molecular de estas actividades pleiotrópicas.¹⁶³ Recientemente, se ha demostrado que estos fármacos se unen a la proteína cereblon, codificada por el gen *CRBN*, que forma parte de un complejo formado por Roc1, CUL4 y DDB1. Este complejo ubiquitina sustratos e induce su proteólisis.

Cuando estos fármacos se unen a la proteína CRBN, se potencia la ubiquitinación y proteólisis de IKZF1/IKZF3, que son factores de transcripción muy importantes en la

diferenciación de las células B. La eliminación de estas proteínas provoca la citotoxicidad celular en mieloma y la disminución de la regulación de *IRF4* y *MYC*¹⁶⁴ (Fig.14). También se ha demostrado que mutaciones en los genes *IKZF1/3*, provocan resistencia al tratamiento.^{163,165}

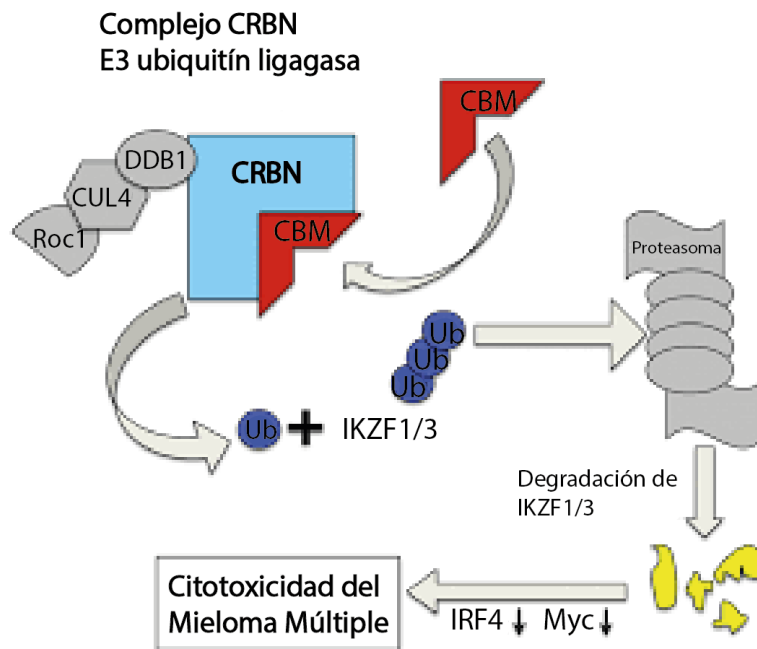


Figura 14. Mecanismo de acción de los fármacos inmunomoduladores mediante la unión a CRBN. CBM; moléculas de unión a cereblon (CRBN).¹⁶⁶

A día de hoy, estos fármacos, junto con los PIs forman el componente principal en los tratamientos anti-MM.

1.5.10. Anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento del mieloma múltiple.

Como ya se ha comentado en los tratamientos de la amiloidosis AL, los AcMo daratumumab, elotuzumab e isatuximab también son utilizados en el tratamiento del MM.

Daratumumab se ha mostrado su eficacia tanto en monoterapia como en combinación para los RRMM y en tratamientos de primera línea. Actualmente hay cinco ensayos clínicos en fase 2/3 con daratumumab.¹⁶⁷

Elotuzumab en monoterapia no ha demostrado tener respuestas objetivas, sin embargo, en combinación con los fármacos anti-MM estándar, tanto IMiDs como PIs, ha mostrado una mejora significativa de la supervivencia con un incremento mínimo de la toxicidad.¹⁶⁸

En cuanto a isatuximab, varios estudios han demostrado un beneficio significativo y sostenido de la SLP en combinación con el tratamiento estándar en pacientes RRMM.

Actualmente, está pendiente la aprobación de isatuximab en combinación con pomalidomida/dexametasona por parte de la FDA.¹⁶⁷

1.6. Heterogeneidad clonal.

Hasta hace muy poco tiempo, se pensaba que la evolución tumoral seguía un modelo lineal.

Con la llegada de los estudios citogenéticos y la secuenciación masiva existen cada vez más evidencias de que la progresión tumoral puede seguir distintos modelos de competición y evolución tumoral, dando lugar al concepto de heterogeneidad clonal. Probablemente, esta heterogeneidad clonal, desde una perspectiva de selección darwiniana, sea la característica esencial de la evolución clonal, donde distintos linajes clonales, divergen y forman distintas subpoblaciones, responsable de recaídas y mecanismos de resistencia frente a fármacos.^{169,170}

En el campo de la evolución tumoral se aplica el conocimiento de la evolución de las especies, la ecología y la genética de poblaciones para comprender cómo las poblaciones de células tumorales responden a presiones selectivas, como el sistema inmune, cambios de pH, quimioterapia, radiación, falta de nutrientes, etc.¹⁷¹

Para comprender cómo ocurre esta heterogeneidad intratumoral, se han propuesto varios modelos de competición clonal: evolución lineal, evolución ramificada, evolución neutral y evolución puntuada (Fig. 15).

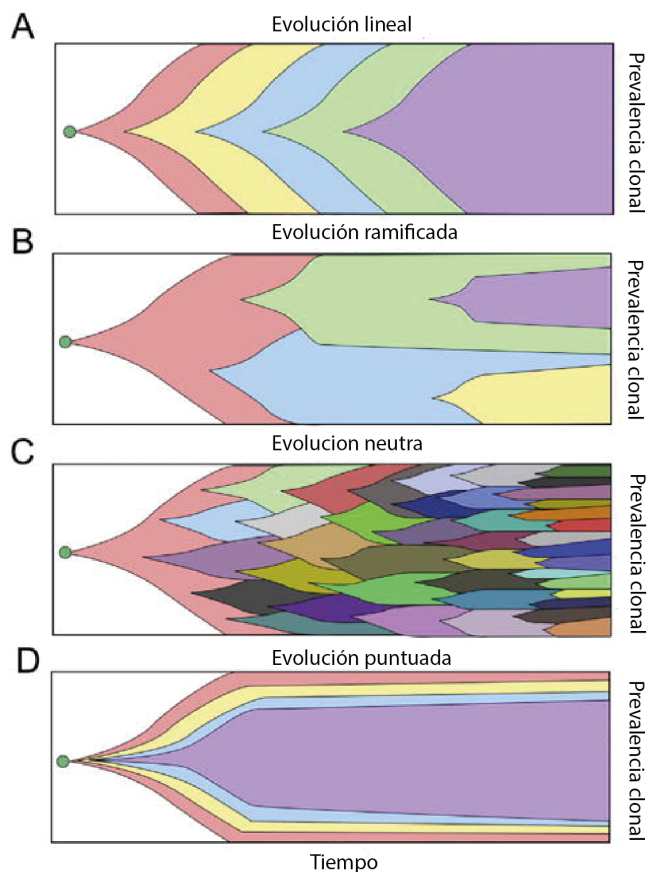


Figura 15. Modelos de evolución tumoral. Se muestran los cambios dinámicos en las frecuencias clonales a lo largo del tiempo. (A) Evolución lineal (B) Evolución ramificada (C) Evolución neutra (D) Evolución puntuada. Los colores indican clones con diferentes genotipos. 172

En el modelo de evolución lineal se postula que las mutaciones se adquieren linealmente en un proceso gradual que conduce a etapas más malignas. En este modelo las nuevas mutaciones impulsoras proporcionan una ventaja selectiva o *fitness* tan fuerte que supera a todos los clones anteriores mediante barridos selectivos.

En el modelo de evolución ramificada los clones divergen de un ancestro común y evolucionan en paralelo, lo que resulta en múltiples linajes clonales. A diferencia con el modelo anterior, los barridos selectivos son poco comunes, y múltiples clones se expanden ya que todos tienen una buena ventaja proliferativa.

La evolución neutra es un caso de evolución ramificada extremo, donde no hay cambios de selección y las mutaciones aleatorias se acumulan a lo largo del tiempo. Esto da lugar a una heterogeneidad interclonal muy amplia.

En cuanto al modelo de evolución puntual, no se basa en la adquisición gradual de mutaciones a lo largo del tiempo como en los otros tres modelos si no en que pueden

ocurrir una gran cantidad de aberraciones genómicas en breves periodos de tiempo en las primeras etapas de la progresión del tumor.

Con este nuevo concepto se introduce una mayor complejidad a la biología tumoral ya que se considera que los clones no existen de forma aislada si no que forman parte de un equilibrio dinámico que compite por los recursos limitados.¹⁷³

Datos de estudios recientes, tanto clínicos como biológicos, muestran que esta heterogeneidad clonal es común entre el MM, la amiloidosis AL y el cáncer en general.^{173;174}

Comprender estas relaciones complejas entre clones en humanos supone todo un desafío, pero con los avances tecnológicos como la secuenciación masiva, técnicas de imagen, las aplicaciones de la técnica CRISPR/Cas, secuenciación masiva de una célula (*single-cell*), etc., estamos comenzando a comprender el número, la naturaleza y la interacción entre los eventos genéticos que se requieren para desarrollar el MM y la amiloidosis AL. Esto permitirá acercarnos cada vez más a una medicina de precisión en la que las terapias no solamente se centren en la población clonal predominante si no que se tenga en cuenta la presencia de la heterogeneidad subclonal, previendo resistencias, recaídas y mejorando el pronóstico de los pacientes.¹²⁶

1.7. Genómica y medicina de precisión.

Tras la publicación de los resultados del Proyecto Genoma Humano¹⁷⁵ en 2001 y el descubrimiento del potencial que podía tener conocer nuestro genoma en el campo de la medicina, la genómica se ha convertido en una herramienta indispensable en el campo de la medicina.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva o de última generación (NGS, *Next Generation Sequencing*, en inglés) han impulsado este avance de la genómica a pasos agigantados, así como el campo de la bioinformática acercándonos cada día más a una medicina de precisión, donde se tiene en cuenta las características y necesidades de cada paciente.

Por otro lado, la identificación de alteraciones genómicas que sirvan como biomarcadores y dianas terapéuticas contra las que dirigir fármacos, como los inhibidores de tirosina quinasas ha promovido el desarrollo de la medicina de precisión en la oncología.¹⁷⁶ El primer fármaco desarrollado contra una diana terapéutica, fue el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor ERBB2. Este receptor se encuentra

amplificado en el 20% de los pacientes con adenocarcinoma de mama. El tratamiento con este anticuerpo durante un año supuso una disminución del 50% del riesgo de recurrencia.¹⁷⁷

Actualmente, las aplicaciones de la NGS y la bioinformática son innumerables, por ejemplo:

- Secuenciación del exoma completo (WES, *Whole exome sequencing*, en inglés): Secuenciación del exoma, es decir, la parte correspondiente a las regiones codificantes (exones).
- Secuenciación del genoma completo (WGS, *Whole genome sequencing*, en inglés): Secuenciación del genoma completo de un individuo
- Secuenciación del transcriptoma (RNASeq): Secuenciación del transcriptoma de un individuo.
- Desarrollo de paneles de genes: Secuenciación de un determinado grupo de genes de interés.

La bioinformática es el pilar fundamental y la base de todas estas aproximaciones ya que nos permite dar sentido a la inmensa cantidad de información que se obtiene con esta tecnología. Con el uso de la bioinformática se pueden contrastar los resultados con miles de bases de datos, tanto para conocer el tipo de mutación que se ha obtenido, como por ejemplo, si es una mutación conservada, su patogenicidad, en qué enfermedades ya se ha detectado, discernir entre mutaciones *passenger* (que proporcionan una ventaja adaptativa fundamental) y *drivers* (no tienen ningún valor adaptativo), estudio de las firmas mutacionales, que son características de cada tipo de tumor, y un largo sinfín de aplicaciones que siguen creciendo de manera exponencial.

Este tipo de aproximaciones, permite el análisis simultáneo de un gran número de alteraciones, como SNPs, CNVs y traslocaciones en una única prueba, permitiendo así identificar las características genéticas del tumor y con ello hacer posible la aplicación de un tratamiento personalizado para cada paciente. Además, en una investigación más básica permite caracterizar enfermedades, para entender mejor su biología y buscar biomarcadores moleculares que sirvan para el pronóstico o mejora del tratamiento de la enfermedad.

1.7.1. Secuenciación masiva en las neoplasias hematológicas.

La NGS ha permitido conocer qué genes y rutas metabólicas están alteradas en cada paciente, esto podría permitir el diseño de fármacos que actúen directamente sobre estas dianas, siendo así los tratamientos más eficaces y ajustados al perfil genético de cada paciente. Por ejemplo, como ha ocurrido en la leucemia mieloide crónica, que el desarrollo del imatinib, que va dirigido contra el gen de fusión BCR/ABL1 (cromosoma filadelfia), ha mejorado drásticamente el pronóstico de los pacientes.¹⁷⁸

En el caso del MM, la medicina de precisión afronta varios retos, ya que es una enfermedad genéticamente muy heterogénea como ya se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, aunque se han identificado varios genes recurrentemente mutados como *KRAS*, *NRAS*, *FAM46C*, *DISC3* y *TP53*, casi la mitad de los pacientes presenta mutaciones en otros genes no recurrentes, por lo que el diseño contra una única diana terapéutica parece ser inviable.^{141,142,179} Además, debido a esta heterogeneidad que presenta el MM también se debe tener en cuenta que la administración continuada de una terapia dirigida ejerce una presión selectiva generando resistencias. De modo que el uso de estas terapias deberá ir acompañado de una monitorización exhaustiva de los distintos subclones.

A pesar de todo esto, se están probando distintas terapias dirigidas contra diana moleculares en estudio en el MM, como inhibidores de BRAF, en mielomas con mutaciones en la vía RAS/MAPK e inhibidores de BET en mielomas con sobreexpresión de *MYC*, entre otros. Siento esta última una de las más prometedoras.¹⁸⁰

Otro tipo de ventajas que ofrece la NGS es que, debido a la gran cantidad de lecturas de una sola secuencia permite examinar el repertorio y reordenamientos de las inmunoglobulinas¹⁸¹ o de las células T¹⁸², detectando así poblaciones clonales de una forma muy exhaustiva, e incluso hacer un seguimiento de los clones tumorales. Esto permite detectar y medir la enfermedad mínima residual, por ejemplo, en el MM¹⁸³, la leucemia mieloide aguda¹⁸⁴ o la leucemia linfocítica crónica¹⁸².

En resumen, el uso de la secuenciación masiva y la bioinformática, junto con el desarrollo de fármacos dirigidos contra dianas moleculares, suponen un futuro prometedor como herramientas para implementar una medicina de precisión en la práctica clínica, así como para la caracterización y búsqueda de nuevos biomarcadores en enfermedades menos conocidas como la amiloidosis AL.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo

El desarrollo y el constante crecimiento de las nuevas tecnologías como la secuenciación masiva y la edición genética, así como el avance y crecimiento exponencial de la bioinformática, ha permitido profundizar en el conocimiento de numerosas enfermedades, incluidas las hematológicas. Este desarrollo ha llevado a la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas lo que ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos y más efectivos.

A pesar de ello, en el caso de la amiloidosis AL, dada su alta complejidad, la baja incidencia y la baja carga tumoral, la información sobre la biología de la enfermedad y su implicación con la clínica todavía siguen siendo desconocidas. Tampoco se conoce si existe un gen *driver* común, como en el caso de la macroglobulinemia de Waldenström y cuáles son las diferencias o semejanzas que pudiesen existir con el MM, ya que las dos gammapatías comparten la misma identidad celular, la célula plasmática.

Afortunadamente, en el caso del mieloma múltiple se ha avanzado más en el conocimiento de esta enfermedad gracias al desarrollo de estas tecnologías. Por ejemplo, en el MM se han descrito algunos genes *drivers* como *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *DIS3*, etc., y alteraciones citogenéticas que ha permitido la identificación de un grupo de pacientes de muy alto riesgo que con las técnicas actuales no hubiese sido posible.

Por otro lado, dada la gran heterogeneidad clonal que caracteriza tanto al MM como a la amiloidosis AL, la cual es responsable de las numerosas recaídas que se observan en el MM. El estudio en poblaciones celulares modificadas genéticamente con el objetivo de poder hacer un seguimiento de ellas mediante citometría de flujo, del comportamiento y las dinámicas clonales nos puede permitir definir de forma individualizada el pronóstico y las mejores opciones terapéuticas de los pacientes con MM. Además, podrían utilizarse como biomarcadores para predecir posibles recaídas.

Por lo tanto, el uso de las nuevas tecnologías como la secuenciación masiva y la edición genética nos permitirá caracterizar la amiloidosis AL en busca de biomarcadores y factores pronósticos, y la implementación de esta metodología en la práctica clínica en el caso del MM. Todo ello, nos permitirá un mayor conocimiento de la enfermedad, mejor pronóstico y mejor elección de los tratamientos en este tipo de enfermedades, fomentando cada vez más una medicina de precisión.

2.2. Objetivos

El objetivo global de este trabajo es caracterizar el perfil genético mediante secuenciación de exoma completo y la secuenciación del repertorio inmune de la amiloidosis AL. Así como la caracterización del perfil molecular de pacientes con mieloma múltiple al diagnóstico mediante la validación de un panel de secuenciación masiva, y estudiar la heterogeneidad clonal y mecanismos de resistencia al tratamiento en el mieloma múltiple.

Para conseguir este objetivo se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar a nivel genético 27 pacientes con amiloidosis AL mediante secuenciación del exoma completo y regiones reguladoras.
2. Analizar el repertorio inmune tanto de amiloidosis AL como del MM, y compararlos entre sí.
3. Estudiar el perfil mutacional de pacientes con MM al diagnóstico mediante un panel de NGS.
4. Correlacionar clínicamente estos resultados y determinar posibles marcadores pronósticos.
5. Estudiar las dinámicas clonales de los principales genes implicados en la progresión del MM y resistencia al tratamiento mediante modelos de competición clonal y definir mecanismos de selección clonal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Caracterización genética de pacientes con amiloidosis de cadenas ligeras (AL)

3.1.1. Pacientes y muestras

Para la realización de este proyecto se han recopilado 54 muestras de 27 pacientes, procedentes de 14 hospitales de toda España, diagnosticados con amiloidosis primaria de cadenas ligeras. El diagnóstico se basó en la demostración del depósito de sustancia amiloide en los tejidos con tinción de rojo Congo positiva, depósitos amiloide confirmados mediante inmunohistoquímica o espectrometría de masas y evidencia de células plasmáticas clonales.

Las muestras fueron recogidas tras el consentimiento de los pacientes, de acuerdo con las directrices del comité de ética local y la Declaración de Helsinki.

De las 54 muestras, 27 correspondían a células plasmáticas patológicas (CPP) de la médula ósea (MO) y 27 a muestras de sangre periférica (PBMCs) del mismo paciente que se utilizaron como control para descartar variantes o mutaciones de origen germinal. La demografía y características clínicas de los pacientes se encuentran recogidas en la tabla 6, que se muestra a continuación:

Tabla 6. Demografía y características clínicas de pacientes con amiloidosis AL (n=27).

Demografía y características clínicas de los pacientes	Mediana (rango) o % de casos
Hombre/ Mujer*	19 (70%) / 8 (30%)
Edad (años)¥	67 (45-78)
Clonalidad, λ	19 (70%)
Afectación renal*	13 (48%)
Afectación cardíaca*	14 (52%)
Afectación hepática*	1 (4%)
Afectación de los nervios periféricos*	2 (7%)
Afectación del tracto digestivo*	6 (22%)
Afectación tejidos blandos*	4 (15%)
Afectación pulmonar*	3 (11%)
Afectación epitelial*	3 (11%)
Afectación poliarticular*	1 (4%)
Albúmina sérica (g/dL)¥	3.6 (1.6-5)
Creatinina sérica (mg/dL)¥	1 (0.7-7)

Demografía y características clínicas de los pacientes	Mediana (rango) o % de casos
B2-microglobulina (mg/L)¥	2.8 (0.2-18)
Componente M sérico (g/dL)¥	0.62 (0-7.4)
Componente M en orina (g/24h)¥	(0-3.7)
dFLC (mg/L)¥	227 (2.5-18899)
Troponina T (ng/mL)¥	0.08 (0.005-51)
NT-ProBNP (pg/mL)¥	765 (12-26680)
% de CP por morfología¥	10 (2-23)
% de CP por citometría¥	0.1 (0.02-3.6)
Terapia*	
Trasplante autólogo	2
Mel/CP-Dex (Quimioterapia)	6
Bortezomib + quimioterapia (CP/Mel) (IP)	14
Otros	5
Clasificación Mayo Clinic revisada*	
I	5
II	50
III	30
IV	10
Isotipo*	
Kappa libre	19
Lambda libre	26
IgG-Kappa	11
IgG-Lambda	37
IgA-Lambda	7

Los resultados se expresan como mediana (rango) ¥ o como porcentaje de casos*. PC: células plasmáticas; dFLC: diferencia entre la cadena ligera en Suero involucrada y las no involucradas; NT-ProBNP: prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral; Mel: melfalán; Dex: dexametasona; CP: ciclofosfamida; PI: inhibidores del proteasoma.

3.1.2. Preparación de las muestras y extracción del ADN.

Para la obtención de las CP patológicas, los aspirados de médula ósea (BM) fueron caracterizados en base a su perfil inmunofenotípico usando combinaciones de anticuerpos de 8 colores y técnicas de citometría de nueva generación empleando el siguiente panel anticuerpos monoclonales (BV421HV450/ BV510/ FITC/ PE/ PerCP-Cy5.5/ PE-Cy7/ APC/ APC-H7): CD138/CD27/ CD38/ CD56/ CD45/ CD19/ CD117/ CD81. La adquisición de los

datos se realizó con el citómetro FACSCantoll (Becton Dickinson Biosciences – B.D, San Jose, CA) usando el software FACSDiva 6.1 (BD) y siguiendo las guías de EuroFlow.¹⁸⁵ Las células plasmáticas fueron sorteadas con un FACSaria II (Becton Dickinson Biosciences –BD, San Jose, CA) con una pureza $\geq 97\%$, según los fenotipos aberrantes específicos del paciente.

El ADN genómico (ADNg) fue extraído con el kit QIAamp ADN Mini y Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) para la sangre periférica y las CPP sorteadas, respectivamente, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. La cuantificación se realizó mediante medición fluorimétrica empleando el kit comercial *Qubit*® dsADN HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA).

Además, se usó *RNA carrier* para mejorar el rendimiento de la extracción del ADN en las muestras de células patológicas aisladas (al ser dónde se aislaron cantidades más pequeñas de células).

En 11 de las muestras fue necesario una amplificación del genoma completo ya que para la secuenciación de exomas es necesario al menos 50 ng de ADNg de partida. Esta amplificación se realizó con el kit REPLI-g® Mini de QIAGEN. Este kit utiliza una tecnología denominada amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), que permite amplificar cantidades de ADN muy pequeñas, incluso de una única célula, con una alta cobertura y fidelidad.¹⁸⁶ En el anexo 1 se muestran las concentraciones iniciales de las muestras y si fueron amplificadas mediante REPLI-g® o no.

La muestra tumoral se dividió en 3 alícuotas para realizar y secuenciar 3 librerías distintas a partir de la muestra original con el objetivo de tener una validación técnica.

3.1.3. Generación de las librerías de los exomas

Una vez que se obtuvo el ADNg de ambas poblaciones (PBMCs y CPP purificadas), se comenzó con la realización de las 108 librerías (controles + triplicados). Para ello, se siguió el protocolo SureSelectQXT Target Enrichment Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies) para Illumina basado en la tecnología de la transposasa para la fragmentación del ADN y la captura para la selección de las regiones a secuenciar. Las regiones capturadas son las especificadas en el kit SureSelect Human All Exon V6+UTR, el cual contiene sondas específicas para capturar exones y regiones reguladoras UTR. El desarrollo paso a paso del protocolo para la realización de exomas por captura, es el siguiente:

- Cuantificación del ADN y preparación de alícuotas

Partiendo de una concentración de 100ng/ μ l, se hicieron diluciones seriadas hasta llevar la muestra a una concentración de 25ng/ μ l, cuantificándose con el *Qubit*[®] dsADN HS Assay Kit. Este paso es muy importante para que la reacción enzimática funcione correctamente y obtengamos el tamaño deseado de los fragmentos (entre 245-350 pares de bases (bp)).

- Reacción de “tagmentación”

En este punto se produce la fragmentación del ADNg mediante tagmentación, un método enzimático basado en el uso de transposasas, unas enzimas que cortan el ADN aleatoriamente y añaden adaptadores al final de los fragmentos en una única reacción. Estos adaptadores de oligonucleótidos llevan una secuencia común que hibrida con los oligonucleótidos que se encuentran en la superficie de vidrio (*flow cell*) que se encuentra en el secuenciador (Fig. 16). Esta reacción es llevada a cabo en un termociclador durante 10 minutos a 45°C.

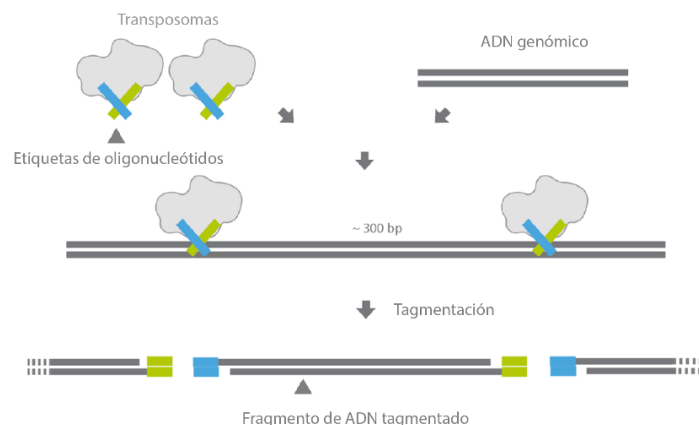


Figura 16. Esquema del proceso de “tagmentación”. Imagen adaptada de la guía de *Nextera XT DNA Library Prep Kit 2017* Illumina, Inc.

- Purificación de la librería “tagmentada”

A continuación, se purificó el producto de PCR con microbolitas magnéticas (AMPure XP, Beckman Coulter, Life Science) que se unen a determinados tamaños de fragmentos de ADN dependiendo de la concentración a la que se utilicen. En este punto se usan a una concentración 1X para quedarnos solamente con el tamaño de los fragmentos que nos interesan (por debajo de 400bp). El funcionamiento de estas bolitas magnéticas se describe en la figura 17.

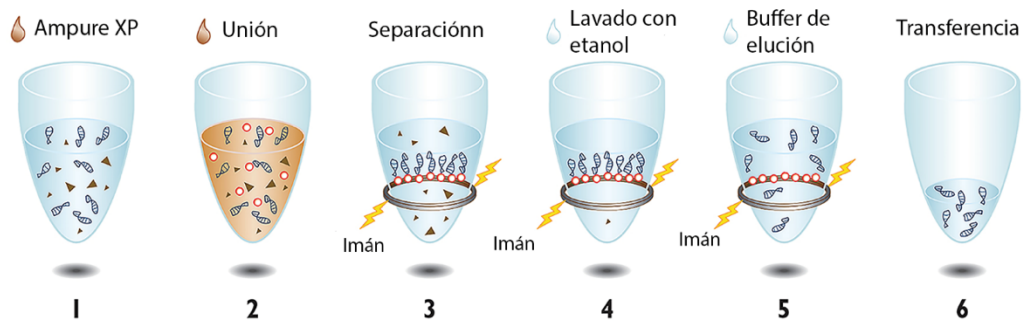


Figura 17. Funcionamiento de las microbolas AMPure XP. 1. ADN en solución 2. Unión del ADN a las bolitas magnéticas 3. Separación del ADN unido a las bolitas magnéticas del resto de contaminantes (ARN y sales) 4. Lavado del ARN y sales con etanol 5. Separación del ADN de las bolitas 6. Transferencia del eluido a un nuevo pocillo (Beckman.com, 2016).

- Amplificación de la librería “tagmentada” pre-captura

En este paso, los fragmentos con los adaptadores son reparados y amplificados mediante PCR empleando *primers* específicos que se unen a los adaptadores previamente incorporados en el proceso de *tagmentación*.

- Control de calidad

En este punto, las muestras se analizaron en un bioanalizador (Agilent 2100 Bioanalyzer) utilizando un chip ADN 1000 para ver el perfil de las librerías, comprobar que los fragmentos tenían el tamaño esperado (entre 245 y 350 bp) y que no había restos de adaptadores, dímeros de *primers* u otros fragmentos de mayor tamaño al de la librería que contaminen la muestra.

- Reacción de hibridación y captura.

En este paso, se hibrida el ADN con sondas de ARN con secuencias complementarias a las regiones que queremos capturar, en este caso, todos los exones del genoma y las regiones reguladoras (UTR 3' y UTR 5'). Además, estas sondas están unidas a biotina. El proceso de hibridación dura aproximadamente 2 horas. Después de la hibridación, las moléculas marcadas con biotina son capturadas con microbolas magnéticas de estreptavidina de manera que se obtienen todos los fragmentos capturados durante la hibridación, descartando las regiones intergénicas e intrones (Fig. 18).

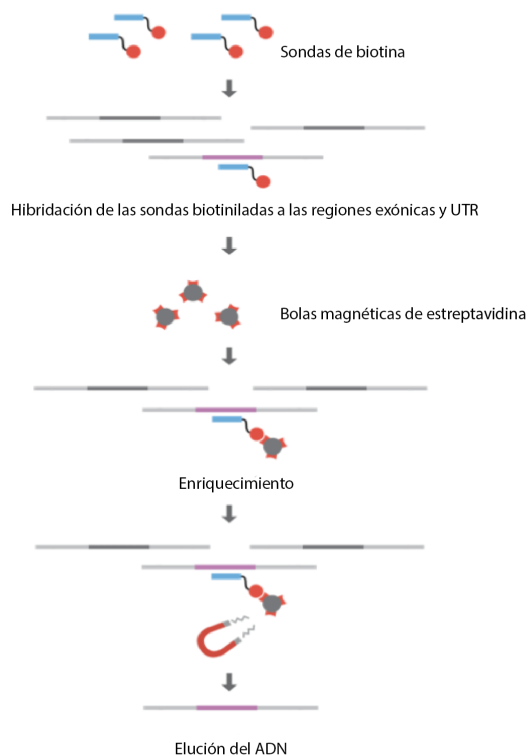


Figura 18. Esquema de la reacción de hibridación y captura.

- Amplificación de librería post-captura

El siguiente punto es la realización de otra PCR para añadir los índices específicos de cada muestra a ambos extremos de los adaptadores de los fragmentos. Estos índices consisten en una secuencia de 8 nucleótidos. Hay 8 índices denominados P7i (1-8), que pueden combinarse con 12 índices P15i (1-12), ofreciendo 96 posibles combinaciones. Estos oligonucleótidos sirven para poder identificar las secuencias correspondientes a cada muestra de forma inequívoca una vez hecho el *pool* o mezcla de las diferentes librerías correspondientes a cada muestra. Proceso denominado “*multiplexing* o multiplexado”.

- Purificación de la librería amplificada post-captura

Tras la PCR, se vuelven a purificar las muestras con las AMPure XP a una concentración 1X para eliminar posibles *primers* o índices no unidos. El resultado final es una librería compuesta por unos adaptadores, el fragmento de ADN y un par de índices en los extremos, como podemos observar en la siguiente figura 19.

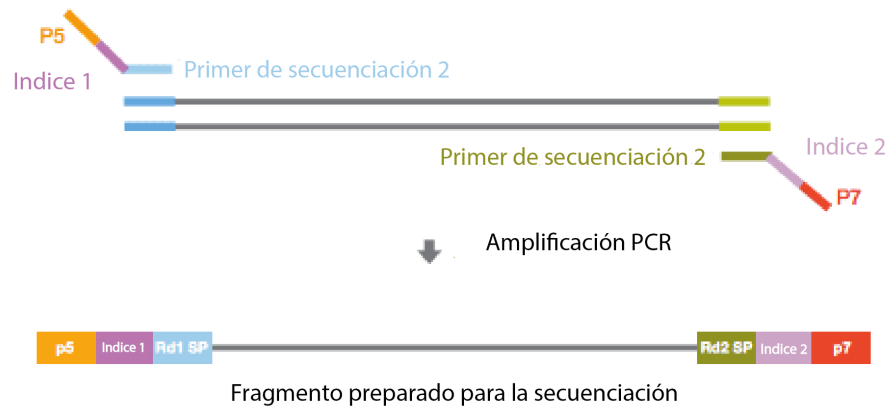


Figura 19. Esquema de una librería completa compuesta por unos adaptadores (azul y verde), el fragmento de ADNg (gris) y un par de índices en los extremos (morado y naranja/rojo).

- Control de calidad y cuantificación final

Tras la purificación, para ver el perfil, tamaño y concentración de la librería final, las librerías se vuelven a analizar en el bioanalizador, esta vez con el kit High Sensitivity ADN Analysis, ya que la concentración de las librerías es mucho más baja que en el primer punto de control. En este punto, las librerías tienen un tamaño entre 325 y 450 bp.

Una vez que tenemos todas las librerías cuantificadas, también por Qubit®, se mezclan en “*pools*” de 9 muestras de manera equimolar, para secuenciarlas en la misma carrera ya que la plataforma NextSeq 500 tiene una capacidad para 8 y 9 exomas.

Al estar todas en la misma concentración, todas debern tienen aproximadamente el mismo número de lecturas.

La fórmula utilizada para hacer el *pool* es la siguiente:

$$\text{Volumen de cada muestra} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

Donde, V(f) es el volumen final, C(f) es la concentración final, en nuestro caso 4nM, ya que es la concentración necesaria para secuenciar en el NextSeq500 siguiendo el protocolo de Illumina, C(i) es la concentración inicial de cada librería y # es el número de muestras que se ponen en el *pool*.

Una vez preparado el *pool* se cuantifica por 2100 Bioanalyzer para comprobar que está aproximadamente a la concentración teórica de 4nM.

3.1.4. Secuenciación masiva en Illumina.

Antes de comenzar la carrera, se prepara una hoja de muestras o *sample sheet*, un documento que incluye la información sobre el tipo de librería, protocolo, identificación de cada muestra y la secuencia del par de índices usados por muestra para que el equipo pueda discriminar unas muestras de otras (*demultiplexing*). Este documento se crea con la aplicación Illumina Experiment Manager o en BaseSpace *on site* de Illumina, una herramienta que nos permite ver a tiempo real el transcurso de nuestra carrera de secuenciación y almacenar resultados, entre otras aplicaciones.

Para cargar el *pool* de muestras en el equipo se siguió el protocolo de Illumina para NextSeq500 System. en este punto las librerías se desnaturalizan con NaOH a 1N y se llevan a una concentración de 1,8nM. A la dilución final se añade un ADN control al 1% respecto al total del *pool* que sirve para tener un control de la calidad de la carrera de secuenciación. Se suele utilizar el denominado PhiX Control v3 que son librerías realizadas con el genoma pequeño de un fago muy bien caracterizado.

Las librerías se secuenciaron en la plataforma NextSeq 500 de Illumina con el kit NextSeq 500/550 High Output v2 con una secuenciación *paired-end* y 2x150 ciclos.

La química de secuenciación de Illumina es muy similar a la secuenciación mediante electroforesis capilar (secuenciación Sanger), en la que una ADN polimerasa cataliza la incorporación de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) marcados con un fluoróforo sobre una hebra de ADN molde durante varios ciclos consecutivos de síntesis de ADN. En cada ciclo, el nucleótido incorporado es identificado mediante la excitación del fluoróforo. La diferencia fundamental es que en lugar de secuenciar un único fragmento de ADN, mediante la NGS se pueden secuenciar millones de fragmentos en paralelo.

El primer paso tras la generación de las librerías es un proceso de amplificación. Que en Illumina comienza con la inmovilización y separación espacial de los fragmentos en una superficie sólida de vidrio, denominada *flow cell*. Se inicia tras la carga en el secuenciador de las librerías y la unión de estas en el soporte de vidrio mediante los adaptadores complementarios. En este proceso, cada molécula es amplificada de manera clonal, formando *clusters* o grupos que tienen la misma secuencia, con el fin de aumentar la señal de fluorescencia. Un esquema de este proceso lo podemos observar en la figura 20.¹⁸⁷

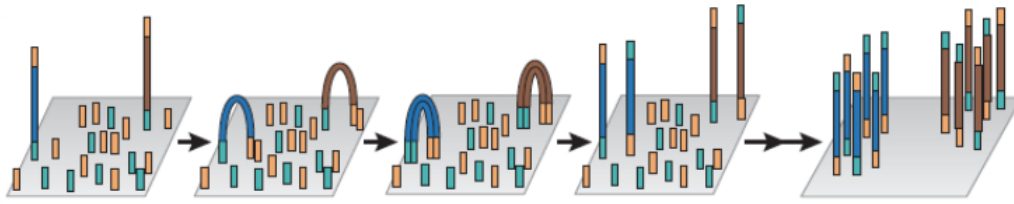


Figura 20. Proceso de *clustering* (Illumina). Durante este proceso las librerías desnaturalizadas se fijan a la superficie sólida gracias a los adaptadores complementarios. Después, se añaden nucleótidos y se da una reacción de PCR que genera ADN de doble cadena en puente, a continuación se da un proceso de desnaturalización, y finalmente obtenemos millones de *clusters* con nuestra secuencia de ADN. Todo este proceso se lleva a cabo dentro del secuenciador.

Una vez que se han generado los *clusters* comienza la secuenciación. Illumina usa un tipo de tecnología denominada SBS (secuenciación mediante síntesis, *sequencing by synthesis*, en inglés). Utiliza cuatro terminadores reversibles, cada uno marcado con un fluoróforo diferente, de forma que se detecta cada base cuando son incorporadas a las cadenas moldes de ADN. Los cuatro terminadores reversibles se encuentran ligados a los nucleótidos y bloquean la polimerización, por lo que la enzima polimerasa solo puede añadir una base a cada cadena de ADN que se está sintetizando. Al añadirse los nucleótidos simultáneamente y no secuencialmente, se produce una competencia natural por lo que se minimizan los errores de incorporación. Como las bases individuales se añaden a todos los moldes de una manera uniforme, el proceso de secuenciación produce unas secuencias de ADN de longitud uniforme. El resultado es una secuenciación base a base muy precisa que elimina virtualmente los errores específicos de la secuencia, permitiendo asignaciones de bases fuertes entre el genoma, incluyendo regiones de secuencias repetidas y homopolímeros. De esta forma, se consiguen secuenciar los millones de *clusters* de la superficie de la célula al mismo tiempo.

Después de cada ciclo de incorporación, se eliminan los terminadores y se determina la identidad de la base insertada por la excitación de los fluoróforos inducida por un láser y la consiguiente formación de imágenes que se registran. De esta manera, se va obteniendo el orden de la secuencia de ADN, traducida a partir de señales de fluorescencia (Fig. 21).

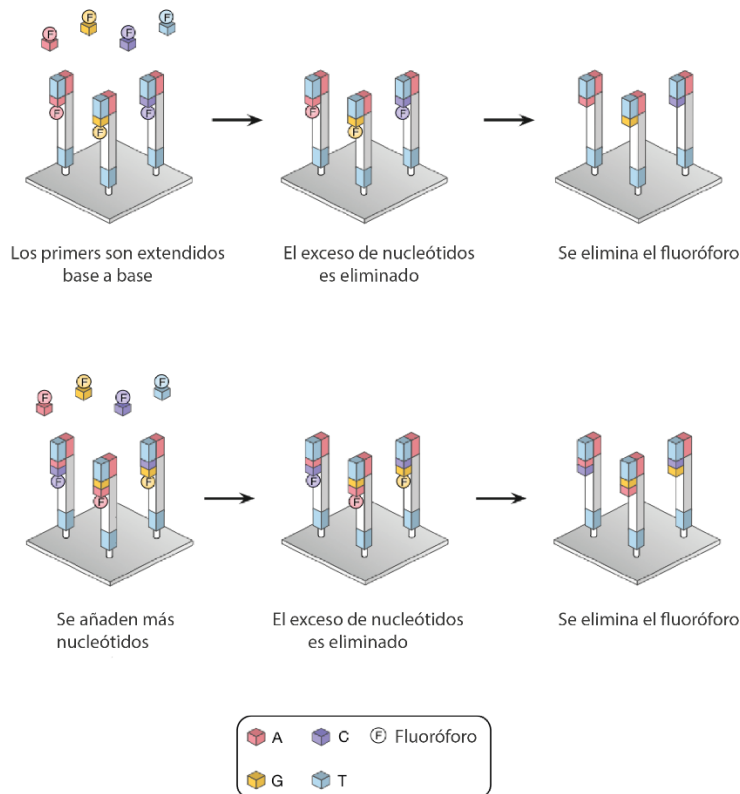


Figura 21. Proceso de dos ciclos de secuenciación mediante la tecnología Illumina.

Paso 1. Adición de nt y extensión de los *primers*.

Paso 2. Lavado del exceso de nucleótidos, excitación del fluoróforo y detección de la fluorescencia.

Paso 3. Eliminación del fluoróforo, lo que permite la unión del siguiente nucleótido. Estos ciclos se van repitiendo hasta sintetizar toda la librería. El número de ciclos va a depender del tamaño de las librerías.

El último paso es el análisis de los datos. En este último punto se trata de dar un sentido biológico a todas estas secuencias e información. Una vez obtenidas e identificadas todas las secuencias, estas se alinean con un genoma de referencia, y finalmente se pueden realizar diferentes tipos de análisis, para detectar polimorfismos de un único nucleótido (SNP), inserciones y deleciones (indels), análisis filogenéticos, metagenómicos, entre otros.

3.1.5. Estudio del repertorio inmune de las inmunoglobulinas.

El análisis de los genes IGHV-D-J y IGK-J se hizo sobre las mismas muestras usadas para la secuenciación de exoma completo.

En cuanto a la amplificación de los reordenamientos IGH/IGK se realizó de acuerdo a los datos ya publicados por Martínez-Lopez *et al*¹⁸³ y se explican a continuación:

1. PCR para la amplificación de los reordenamientos:

Para la amplificación de las regiones VDJ (IGH) y VJ (IGK) se hizo una PCR múltiple utilizando los *primers* de BIOMED2.¹⁸⁸ Debido a la alta diversidad de segmentos génicos V, D y J que forman el gen de las inmunoglobulinas (Figura 22a), para una detección precisa de todos los segmentos del reordenamiento, estos *primers* están agrupados por familias que cubren las distintas regiones diana.

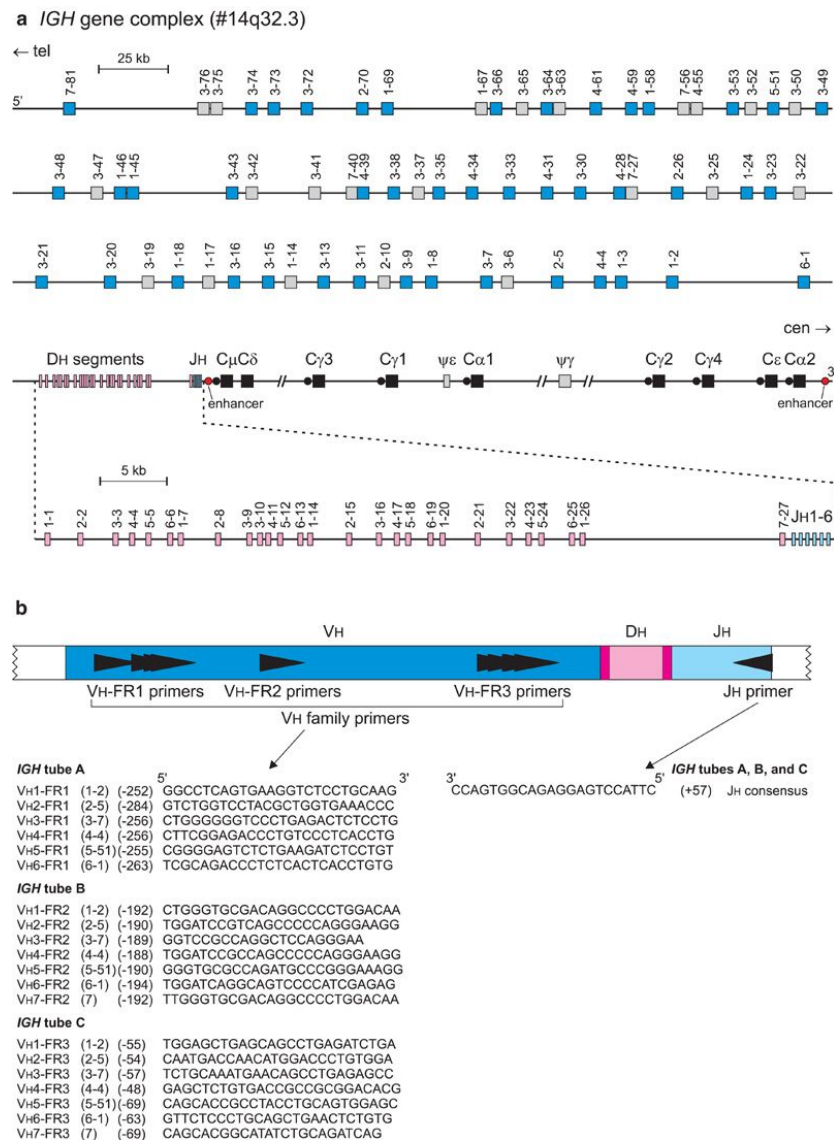


Figura 22. A. Análisis por PCR de los reordenamientos IGH (VH-JH). a) Esquema de los diferentes segmentos V, D y J en la banda cromosómica 14q32.3. Solo los segmentos del gen VH no polimórficos que se reordenan se incluyen en azul (VH funcional) o en gris (pseudogenes que se reordenan). b) Diagrama esquemático del reordenamiento IGH VH – JH con tres conjuntos de *primers* VH y un *primer* de consenso JH, combinados en tres tubos multiplex. La posición relativa de los primers VH y JH se da de acuerdo con su nucleótido más 5' *upstream* (-) o *downstream* (+) de la secuencia señal de recombinación (RSS) involucrada. Adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics.¹⁸⁹

En la figura 22.B, a continuación, se muestra un esquema similar pero con el gen kappa de la cadena ligera de las inmunoglobulinas.

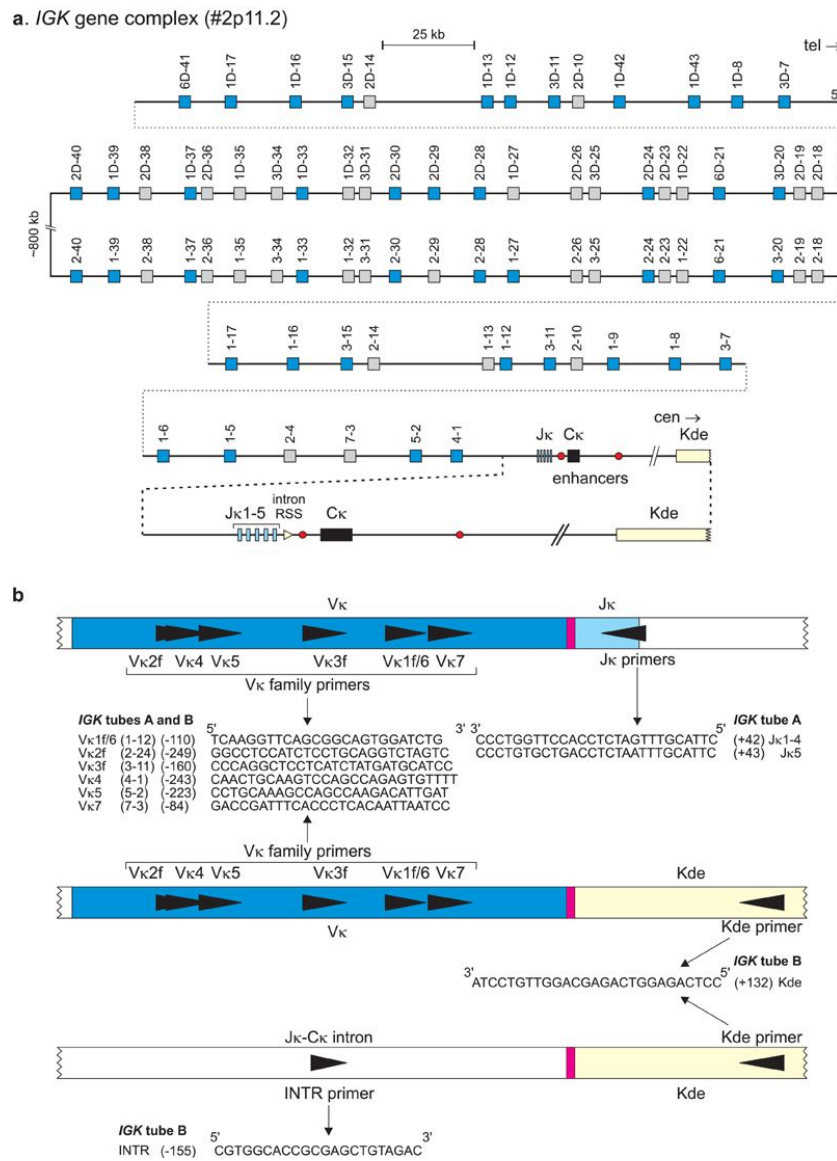


Figura 22. B. Análisis por PCR de los reordenamientos genéticos del gen *IGK*. (a) Esquema de los diferentes segmentos del gen *IGK* en la banda cromosómica 2p11.2. Solo los segmentos del gen *Vκ* no polimórficos que se reordenan se incluyen en azul (*Vκ* funcional) o en gris (*Vκ* no funcional). (b) Diagrama esquemático de los reordenamientos *Vκ*-*Jκ* y los dos tipos de reordenamiento de *Kde* (*Vκ*-*Kde* e intron *RSS*-*Kde*). La posición relativa de los *primers* *Vκ*, *Jκ*, *Kde* e intron *RSS* (*INTR*) se da de acuerdo con su nucleótido más 5' *upstream* (-) o *downstream* (+) del *RSS* involucrado. El segmento del gen *Vκ* utilizado como miembro representativo de las familias *Vκ*1, *Vκ*2 y *Vκ*3 se indica entre paréntesis. *Vκ*4, *Vκ*5 y *Vκ*7 son familias *Vκ* de un solo miembro. Los *primers* se dividen en dos tubos: tubo A con cebadores *Vκ* y *Jκ* y tubo B con cebadores *Vκ*, intron *RSS* y *Kde*. Adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics.¹⁸⁹

Para la PCR se utilizó 649 ng de ADN de las CPP, lo que sería equivalente a 100 000 células utilizando la proporción de los reactivos detallada en la tabla 7.

a)

PCR	CONC.	FR2
	final	$\mu\text{l}/\text{rxn}$
Buffer II 10X	1x	5,0
MgCL ₂ 25mM	1,5 mM	3,0
dNTP 10mM	0,2 mM	1,0
Mezcla FR1 10 μM	400 nM	
Mezcla FR2 10 μM	400 nM	2,0
Mezcla FR3 10 μM	400 nM	
H ₂ O		18,6
Taq Gold 5 U/ μL	2 U	0,4
ADN 100 ng/ μl		20,0
	TOTAL	50,0

b)

PCR	CONC.	KVJ
	final	$\mu\text{l}/\text{rxn}$
Buffer II 10X	1x	5,0
MgCL ₂ 25mM	1,5 mM	3,0
dNTP 10mM	0,2 mM	1,0
Mezcla KVJ	200 nM	1,0
Mezcla Kdel	200 nM	
H ₂ O		19,6
Taq Gold 5 U/ μL	1 U	0,4
ADN 100 ng/ μl		20,0
	TOTAL	50,0

Tabla 7. Proporción de reactivos para la PCR de amplificación de los genes IGH (a) e IGK (b).

2. Generación de las librerías con las secuencias de las Ig para Ion Torrent:

Para la generación de las librerías se utilizó el kit *NEBNext® Fast DNA Library Prep Set* para Ion Torrent™ y se siguieron las guías recomendadas por el fabricante. En la figura 23, se encuentran detallados los pasos para la realización de las librerías. Brevemente.

2.1. Fragmentación del ADN. Como partimos de un producto de PCR (amplicones de los reordenamientos IGH/IGK) no hay que realizar este paso. En este producto hay una mezcla de amplicones que tienen extremos 3' y 5' libres fosforilados o no.

2.2. Reparación de los extremos y fosforilación 5'. En este punto se crean extremos romos mediante la adición o deleción de bases y se fosforila el extremo 5' para preparar los fragmentos.

2.3. Ligación de los adaptadores e índices. Como se describe en el apartado anterior (3.1.3. Generación de las librerías de los exomas), en este punto unas secuencias de nucleótidos complementarias a los *primers* de secuenciación (en este caso para la plataforma Ion Torrent) se incorporan a los extremos de las librerías junto con unas secuencias específicas de cada muestra, denominadas índices o códigos de barras.

2.4. PCR de enriquecimiento. En este punto final se realiza una PCR de 8 ciclos con los *primers* que se unen a los adaptadores y la NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix para enriquecer nuestras librerías de interés.

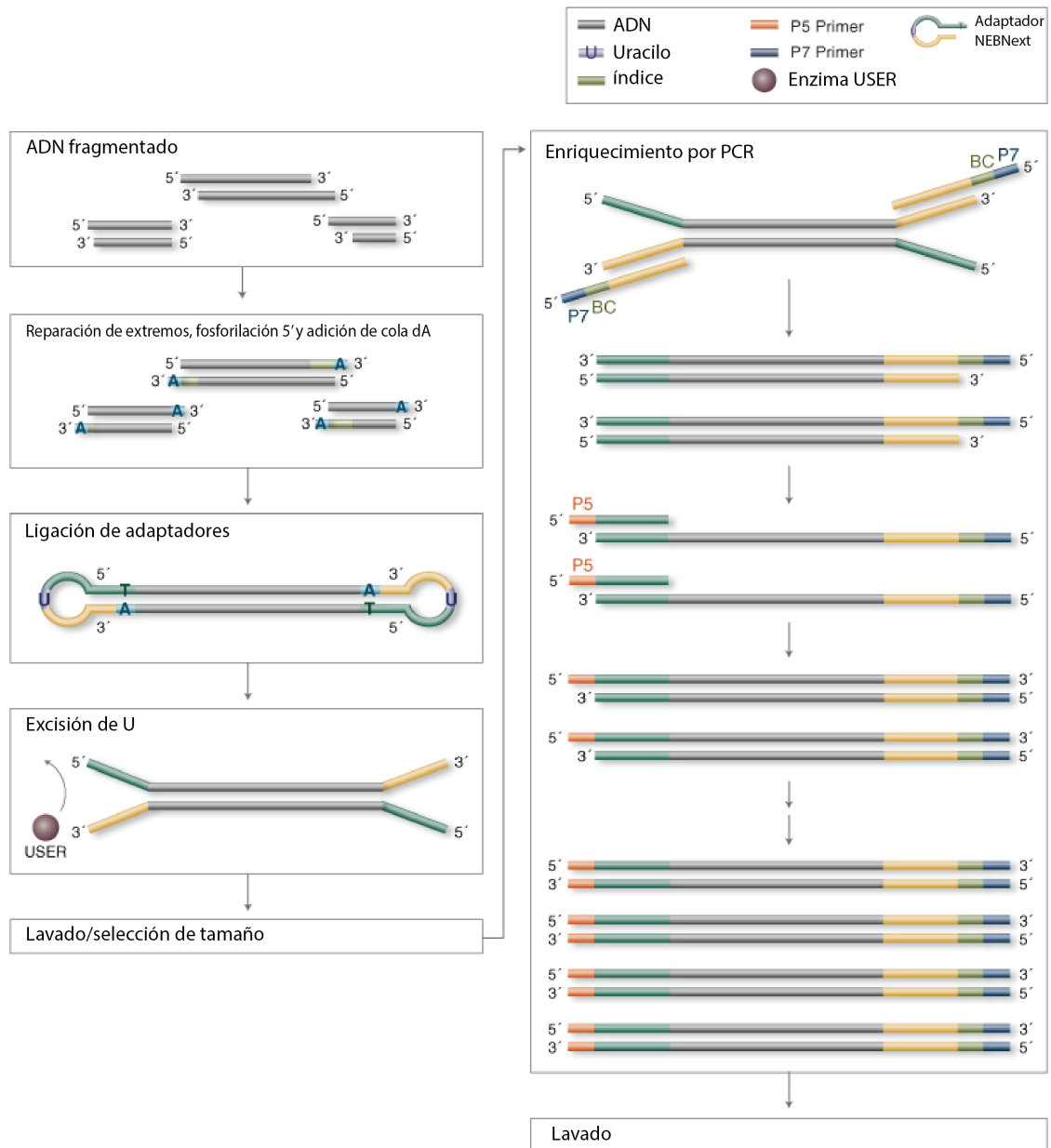


Figura 23. Esquema del flujo de trabajo seguido para la realización de las librerías de los genes de las inmunoglobulinas IGH e IGK. Fuente: protocolo *NEBNext® Fast ADN Library Prep Set* para Ion Torrent™.

A continuación, se cuantifican las librerías mediante qPCR con el kit *QIAseq™ Library Quant Assay Kit* usando el equipo *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche Applied Science) ya que la concentración a la que hay que llevar el *pool* final es de 80 pM

y esta concentración no se puede medir con Qubit® debido a la sensibilidad. También debido a que con las Igs se generan librerías con muy baja diversidad que no generan híbridos perfectamente complementarios cuando baja la temperatura, de forma que el agente intercalante del Qubit® no se une de forma uniforme, infraestimando la concentración. Por último, se prepararon dos *pools* de forma equimolar con 20 muestras cada uno para secuenciar en la plataforma Ion S5 System (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA).

3.1.6. Secuenciación masiva en Ion Torrent.

La tecnología de Ion Torrent se basa en otro tipo de química en la que la adición de un nuevo nucleótido complementario de la hebra molde produce la liberación de un H^+ , lo que se traduce en cambios de pH. Esto es detectado por un sensor de iones y son estas señales las que se traducen en la secuencia ordenada de nucleótidos (Fig.24).

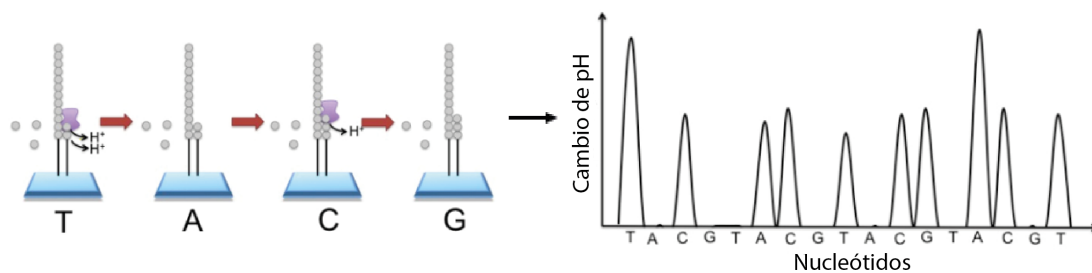


Figura 24. Química de secuenciación de Ion Torrent. En cada ciclo se va liberando cada un dNTP distinto. El pH se detecta tras la unión (o no) de la base complementaria y liberación de un ion de H^+ . Los dNTP se lavan y comienza un nuevo ciclo. Los cambios de pH, si los hay, se miden para determinar cuantas bases (si la hay) fueron añadidas con cada ciclo.

Mediante esta tecnología, la amplificación de la señal, a diferencia de Illumina (proceso de *clustering*), se realiza mediante una PCR en emulsión.

En este proceso, los fragmentos de ADN se amplifican dentro de una gota de agua en emulsión (microrreactores), a esta reacción se añaden unas bolitas que tienen en su superficie secuencias complementarias a los adaptadores de los fragmentos de ADN. De tal forma que, a cada bolita se une una molécula de ADN desnaturalizada. Los amplicones generados tras varios ciclos consecutivos de PCR, a partir de esa única molécula, se capturan por toda la superficie de la bolita, resultando en bolitas rodeadas de moléculas que corresponden a la amplificación de un único fragmento (Fig. 25).

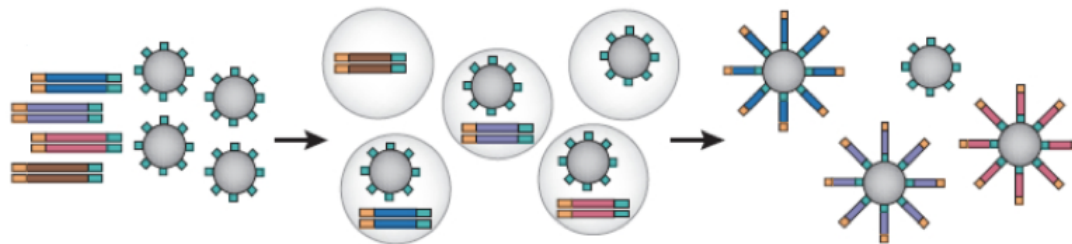


Figura 25. Proceso de amplificación median PCR en emulsión (Ion Torrent).

Después del enriquecimiento de estas bolitas, millones de ellas se depositan en pocillos individuales de una pequeña placa denominada, *chip*. La amplificación clonal (PCR en emulsión) y la carga en un chip Ion 530 se realizó en el equipo Ion Chef™ Instrument (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA).

Por último, las muestras fueron secuenciadas en un Ion S5 (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, US) con una secuenciación *single end* y una química de 400, es decir, 400 ciclos de secuenciación ya que los tamaños de las librerías oscilan entre 250-295pb las de *IGH* y entre 120-160pb, 190-210pb y 260-300pb las de *IGK*.

3.1.7. Análisis bioinformático

3.1.7.1. Flujo de trabajo para el análisis de las variantes

En primer lugar, los archivos .fastq, un fichero de texto plano que contiene la secuencia biológica y las calidades asociadas a cada uno de los nucleótidos de la misma, pasan un control de control de calidad mediante el programa FastQC. Las secuencias que superan el cribado de calidad, siguen la rama de análisis SNV, en un proceso que se agrupa en distintos módulos de trabajo:

- alineación de las secuencias con el genoma de referencia (hg19) mediante el programa de alineamiento, BWA-MEM.¹⁹⁰ Se genera un fichero tipo .bam
- identificación y eliminación de las secuencias duplicadas obtenidas durante el enriquecimiento por PCR contenidas en el fichero .bam mediante el programa Picardtools.
- Identificación de las bases o *variant calling*, para ello utilizamos dos herramientas bioinformáticas distintas específicas para la detección de variantes somáticas y de muy baja frecuencia alélica, Strelka¹⁹¹ y VarScan 2.0¹⁹², con el fin de aumentar la especificidad ya que solo nos quedamos con aquellas variantes que fueron detectadas por ambos programas.

- La anotación de las variantes se realizó utilizando la herramienta ANNOVAR.¹⁹³ Tras este paso, se genera un archivo tipo .vcf. Y finalmente, las variantes se filtraron de forma general siguiendo los siguientes criterios:
 - Ser detectadas por ambos algoritmos de identificación de bases.
 - No aparecer en la lista de variantes de cada uno de sus controles.
 - Las variantes detectadas debían tener ≥ 10 lecturas.
 - Un MAF $< 1\%$ en cualquier población.
 - Estar presente en al menos dos de los tres replicados.
 - Pasar el filtro manual tras la visualización en el programa Integrative Genomics Viewer (IGV), para eliminar posibles artefactos.

3.1.7.2. Algoritmos de predicción de impacto funcional

Los algoritmos computacionales son capaces de predecir *in silico* si un cambio de un nucleótido afecta a la estructura o a la función de una proteína y a día de hoy, se incluyen en todos los estudios genómicos. Estos algoritmos usan aproximaciones estadísticas, tales como modelos de Markov, *machine learning (neural networks)*, y el principio de máxima entropía, para predecir si una variante tiene impacto o no en la secuencia, estructura o función de la proteína. Los algoritmos más comunes solo se aplican a variantes SNVs del tipo de mutación con cambio de sentido o *missense*,¹⁹⁴ y son los especificados en la tabla 8.

Tabla 8. Algoritmos computacionales de predicción del impacto funcional debido a variantes genómicas.

Función/utilidad	Herramienta	Enlace web
Missense SNV	PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT	http://sift.jcvi.org
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	Condel	http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-for-prioritization-of-variants-involved-in-hereditary-diseases-and-transfic-for-cancer
	CoVEC	https://sourceforge.net/projects/covec/files
	CADD	http://cadd.gs.washington.edu
	GERP++	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
	PhyloP&PhastCons	http://compgen.bscb.cornell.edu/phast

Cada herramienta contiene distintos algoritmos computacionales, utilizadas para el estudio de predicción funcional de variantes alélicas.

3.1.7.3. Interpretación de variantes somáticas

Existe un amplio número de bases de datos relacionadas con información originada de las nuevas tecnologías de secuenciación, ya sea a nivel de ADN, ARN o proteína.

En la tabla 9 se muestran las bases de datos más relevantes a nivel internacional para la interpretación de variantes somáticas en cáncer, que incluyen bases de datos poblacionales útiles para la exclusión de polimorfismos, bases de datos específicas de cáncer, repositorios de datos de secuenciación y otras bases útiles relativas a mutaciones.

Tabla 9. Bases de datos para la interpretación de variantes somáticas.

Función/utilidad	Base de datos	Enlace web
Bases de datos de población para excluir polimorfismos	1000 Genomes Project	http://browser.1000genomes.org
	Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
	dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org
Bases de datos específicas de cáncer	Catalog of Somatic Mutations in Cancer	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	My Cancer Genome	http://www.mycancergenome.org
	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	https://pct.mdanderson.org
	cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center	http://www.cbioportal.org
	ClinicalTrial	https://clinicaltrials.gov
	Intogen	https://www.intogen.org/search
	IARC (WHO) TP53 mutation database	http://p53.iarc.fr
	Pediatric Cancer Genome Project	http://explorepkgp.org
	International Cancer Genome Consortium	https://dcc.icgc.org
Repositorios de secuencias y servidores de datos	NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
	RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
	Locus Reference Genomic	http://www.lrg-sequence.org
	UCSC table browser	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables
	Ensemble BioMart	http://useast.ensembl.org/biomart/martview
Otras bases de datos de mutaciones/enfermedades útiles para la interpretación de variantes	ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org
	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl

Función/utilidad	Base de datos	Enlace web
	dbNSFP	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
	Ensemble Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html

BD, base de datos; dbSNP, The Database of Short Variation; ExAC, Exome Aggregation Consortium; IARC, International Agency for Research on Cancer; NCBI, National Center for Biotechnology Information; UCSC, University of California, Santa Cruz; WHO, World Health Organization.

3.1.7.4. Análisis de las inmunoglobulinas.

Para analizar las secuencias de las inmunoglobulinas se utilizó el programa MiXCR (disponible en: <http://mixcr.milaboratory.com/> y <https://github.com/milaboratory/mixcr/>),¹⁹⁵ esta herramienta es un marco universal que procesa grandes datos de inmunomas de secuencias en bruto (.fastq) para identificar y contar clonotipos. MiXCR utiliza tanto lecturas *paired-end* como *single-end*, tiene en cuenta la calidad de la secuencia, corrige los errores de PCR e identifica las posibles hipermutaciones de la línea germinal.

El flujo de trabajo de MiXCR se divide en 3 pasos principales (figura 26) y solamente está disponible para sistemas operativos linux:

- Paso 1: Alineamiento de las lecturas a las referencias de la base de datos IMGT. Esta base de datos es un repositorio público en el que se encuentran todas las referencias de las inmunoglobulinas, receptores de células T, y del complejo mayor de histocompatibilidad tanto de humanos como de otros vertebrados. Los ficheros de entrada son de tipo .fastq y el de salida es un informe de alineamiento .djca (similar al .bam).
- Paso 2: Agrupación de clonotipos. A partir del fichero .vdjca, las secuencias que son idénticas se agrupan formando clonotipos. El programa nos devuelve un archivo .clns, en formato texto, con los clones que se han identificado.
- Paso 3: En este último paso, se corrigen posibles errores de secuenciación y PCR y se exportan los clones en un fichero .vcf con el que ya se puede trabajar.

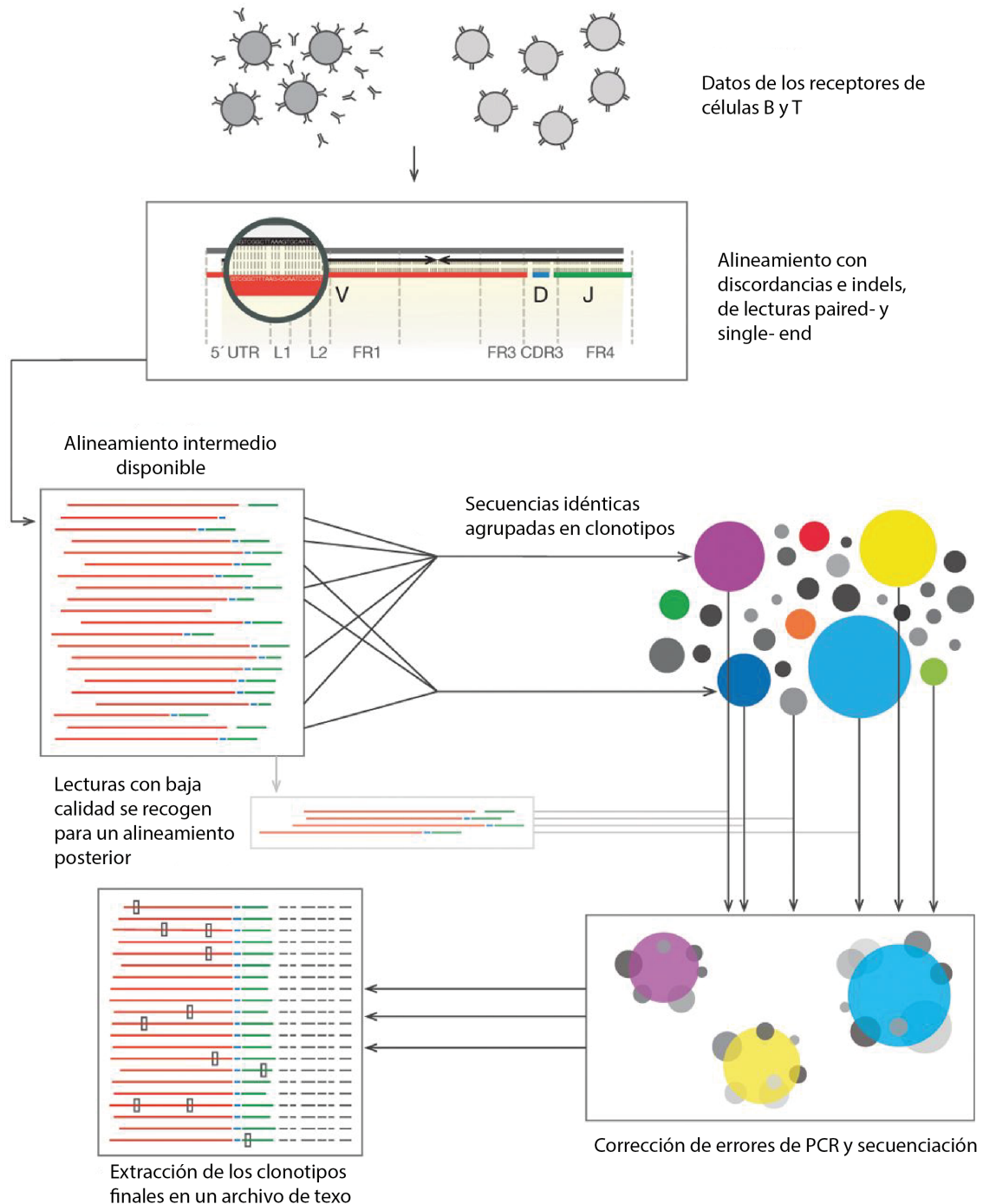


Figura 26. Esquema del flujo de trabajo del programa MiXCR para identificación y cuantificación de clonotipos del repertorio de IG.

Después, se analizaron las secuencias clonales con la base de datos IMGT (<http://www.imgt.org>), que nos da un informe muy detallado sobre mutaciones, aminoácidos, si la secuencia da lugar a una IG productiva o no, el punto isoeléctrico, tamaño de la región CDR3, etc. Se consideró que una secuencia era clonal o clonotipo cuando al menos estaba presente en una frecuencia superior al 10% respecto al total de secuencias identificadas. Las secuencias con una homología con la línea germinal del 98%

o más se consideraron no mutadas, y aquellas con una homología inferior al 98% se consideraron como mutadas. Las muestras controles (sangre periférica) se utilizaron para definir el punto de corte entre clonal y policlonal.

Todos estos datos se compararon con una serie de 63 muestras de médula ósea de pacientes con MM al diagnóstico que habían sido secuenciados y analizados de la misma manera.

3.1.7.5. Detección y análisis de las variaciones en el número de copia

El estudio de los CNV se realizó con el software bioinformático CNVKit.¹⁹⁶ Todo el desarrollo de este apartado se realizó con el sistema operativo linux Mint.

- Pipeline del software:

Los archivos de entrada del programa son las secuencias de ADN de todas las muestras en formato .bam, los ficheros .bed con la información de las regiones de interés para la captura (exomas +UTR), archivos con el contenido GC y las secuencias repetitivas en formato FASTA.

Este programa usa tanto las lecturas *on-target* (secuencias diana de la captura) como las lecturas no específicas capturadas (*off-target*) para calcular el ratio de copia \log_2 . Este ratio es la medida más comúnmente usada para la medición de los CNVs. La fórmula estándar para calcular el *log2 ratio* es: intensidad observada/intensidad de la referencia. El cálculo requiere el uso de una referencia para determinar qué es lo “normal” o cual es la línea base de intensidad. Para ello, se generó una línea base con los datos de los 27 controles realizados a partir de sangre periférica.

Se utilizaron todos los parámetros por defecto del programa y a través de un comando *batch* (un sistema para procesar por lotes) se creó la referencia y se analizaron las muestras de forma automática. Finalmente, los gráficos también fueron generados con este programa.

3.1.7.6. Análisis de las firmas mutacionales (Mutational Pattern).

Para realizar el análisis de los patrones o firmas mutacionales se utilizó el programa RStudio (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) con el paquete MutationalPatterns disponible gratuitamente en: <http://bioconductor.org/packages/MutationalPatterns>.

Este análisis nos permite caracterizar patrones mutacionales y posibles relaciones con características genómicas y epigenómicas.¹⁹⁷ Además, ofrece un método eficiente para cuantificar la contribución de las firmas mutacionales conocidas. Dichos análisis se usaron para determinar si ciertos mecanismos de reparación del ADN están perturbados y para caracterizar aún más los procesos subyacentes a las firmas mutacionales conocidas. La similitud entre cada perfil mutacional y cada firma COSMIC se midió utilizando la similitud de coseno, un método que indica la similitud entre dos vectores.

Para realizar los análisis de patrones mutacionales, se cargaron los 27 .vcf con los SNV y el genoma de referencia correspondiente (hg19).

En primer lugar, se crea un espectro mutacional que muestra la contribución relativa media de cada uno de los 6 tipos de sustitución de bases en todas las muestras, mediante la función *plot_spectrum* en el que se muestra el número total de mutaciones y la desviación estándar en todas las muestras. A continuación se creó una matriz de recuento de mutaciones de las 96 posibles combinaciones de trinucleótidos.

Finalmente, se analiza la similitud entre el perfil mutacional obtenido de las muestras con las firmas previamente descritas de COSMIC. Para ello se utiliza el método de similitud de coseno, que refleja lo bien que cada perfil mutacional puede ser explicado por cada firma individual. Se calculan con la función *cos_sim_matrix* y visualizadas con *plot_cosine_heatmap*. El *heatmap* representa la similitud en los perfiles mutacionales con las firmas previamente descritas por COSMIC y qué firmas destacan más.

3.1.8. Rutas moleculares y de señalización asociadas a los genes mutados

El análisis ontológico de los genes que fueron identificados como mutados en amiloidosis AL se realizó con el software de libre acceso PANTHER.¹⁹⁸ Esta herramienta permite, a partir de un listado de genes, estudiar las relaciones entre familias y subfamilias de proteínas. Estas relaciones están definidas filogenéticamente y generadas por algoritmos computacionales y estudiadas y curadas por biólogos expertos que utilizan un sistema de software para asociar términos de ontología.

3.1.9. Comparativa del perfil genético entre la amiloidosis AL y el mieloma múltiple.

Para comparar nuestros datos genómicos con los de MM, descargamos la base de datos CoMMpass IA13c del proyecto MMRF (<http://www.themmr.org>) con resultados de 930

pacientes de MM al diagnóstico y en seguimiento en muestras de MO y sangre periférica. La base de datos fue reanalizada con ANNOVAR.9 para poder comparar estos datos con los obtenidos experimentalmente en este proyecto. Del número total de pacientes seleccionamos las muestras al diagnóstico y de MO.

En esta base de datos solamente se reportan las variantes con un VAF por encima del 5% y no se tiene información sobre las regiones reguladoras. De modo que se filtraron ambas bases de datos siguiendo los mismos criterios, manteniendo solo aquellas mutaciones detectadas por Strelka y descartando aquellas variantes con un VAF < 5%, MAF < 1%, variantes sinónimas y variantes localizadas en las regiones UTR, genes de las Ig, variantes intrónicas y variantes no codificantes.

3.2. Estudio del perfil mutacional mediante un panel de NGS en pacientes con mieloma múltiple.

3.2.1. Pacientes y muestras.

Para el estudio de este panel se utilizaron 88 muestras de CP de médula ósea de pacientes con MM de nuevo diagnóstico incluidos en el ensayo clínico GEM12<65, registrado en www.clinicaltrials.gov como #NCT01916252. Este es un ensayo clínico de fase III multicéntrico para valorar el tratamiento de inducción con bortezomib/lenalidomida/dexametasona (VRD-GEM) seguido de altas dosis de quimioterapia con melfalan-200 (MEL-200) frente busulfán/melfalán (BUMEL). A continuación, se muestran las características demográficas y clínicas de los pacientes.

Tabla 10. Características demográficas y clínicas de los pacientes del ensayo clínico GEM12<65.

Demografía y características clínicas de los pacientes	Mediana (rango) o % de casos
Hombre/ Mujer	56 / 44
Edad (años)	60 (42-65)
CM suero	2,65 (0-9,5)
CM orina	0,22 (0-49,7)
Ratio sFLC	20,99 (0-9780)
sFLC_K	123 (0,42-77267)
sFLC_L	6,3 (0-4680)
Hemoglobina	10,4 (8-15,5)
Creatinina	0,92 (0,45-1,79)
Tratamiento	Mediana (rango) o % de casos
Bortezomib/Lenalidomida/Dexametasona + MEL-200	55 %

Demografía y características clínicas de los pacientes	Mediana (rango) o % de casos
Busulfán + MEL	45 %
Sistema internacional de estadiaje (ISS)	Mediana (rango) o % de casos
I	36 %
II	38 %
III	26 %
Tipo de mieloma	
IgG-Kappa	39 %
IgG-Lambda	22 %
IgA-Kappa	12 %
IgA-Lambda	8 %
Bences Jones K	16 %
Bences Jones L	1 %
No secretor	1 %

MEL: Melfalán; sFLC: cadenas ligeras libre en suero.

Para las validaciones se han utilizado muestras del grupo español de mieloma (GEM) cuyas características se describen en los siguientes apartados.

3.2.2. Purificación celular y extracción del ADN.

Para la obtención del ADN de las CP purificadas, en primer lugar, se hizo un lisado de los aspirados de MO. A continuación, mediante la técnica de Ficoll separamos las distintas fracciones celulares para después purificar las CPs mediante el empleo de microbolas inmunomagnéticas marcadas con anticuerpos CD138, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania).

El ADN fue extraído con el kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit de QIAGEN (Qiagen, Hilden, Alemania) y su cuantificación se realizó por medición fluorimétrica empleando el kit comercial *Qubit*® dsADN HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA)).

3.2.3. Diseño del panel.

Para el diseño del panel de MM para su diagnóstico molecular se llevaron a cabo 2 versiones, que se describen a continuación.

3.2.3.1. Diseño y validación de la versión 1.

Tras revisar la bibliografía y en colaboración con el Centro de Investigación Médica Aplicada de Pamplona, el Hospital Universitario de Salamanca y la empresa de análisis

bioinformático Dreamgenics, en primer lugar, se diseñó una primera versión para detectar las mutaciones, CNsV y traslocaciones más relevantes conocidas en mieloma múltiple.¹⁴⁰

Este panel de captura comprende un tamaño de 332.18 Kb que incluye las siguientes regiones (Fig. 27):

- Regiones codificantes de 24 genes relevantes en el mieloma múltiple como: *ATM*, *ATR*, *ATRIP*, *BCL7A*, *BRAF*, *CCND1*, *CYLD*, *DIS3*, *EGR1*, *FAM46C*, *FGFR3*, *HIST1H1E*, *IRF4*, *KRAS*, *LTB*, *MAX*, *NRAS*, *NRM*, *PRDM1*, *PRKD2*, *RB1*, *TP53*, *TRAF3*, *ZFH4*.

- Gran parte del gen *IGH* para la detección de traslocaciones y el reordenamiento clonal VDJH. Para poder detectar traslocaciones se diseñaron sondas en las regiones implicadas (Fig.27, en verde).

Una de las ventajas que presenta este panel (enriquecimiento por hibridación con sondas complementarias en lugar de por amplificación) es que no es necesario conocer el punto de corte exacto sino delimitar la región implicada en cualquiera de las dos parejas.

- Regiones para la detección de CNVs en los cromosomas: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, X e Y). También se Incluyeron regiones de otros genes relevantes como: *MPL*, *EPHB2*, *DDR2*, *DNMT3A*, *ERBB4*, *PIK3CA*, *KIT*, *PDGFRA*, *FGFR4*, *ROS1*, *EGFR*, *MET*, *ABL1*, *FGFR2*, *RET*, *KIF5B*, *MLL*, *BRCA3*, *FLT3*, *HIF1A*, *IDH2*, *MAP2K1*, *ERBB2*, *RARA*, *ACTG1*, *BRCA1*, *FAF1*, *CDKN2C* y *CKS1B*.

- Regiones para la detección de otros reordenamientos: *MYC* y parejas de *IGH*, así como reordenamientos secundarios.

- Gen TP53 completo.

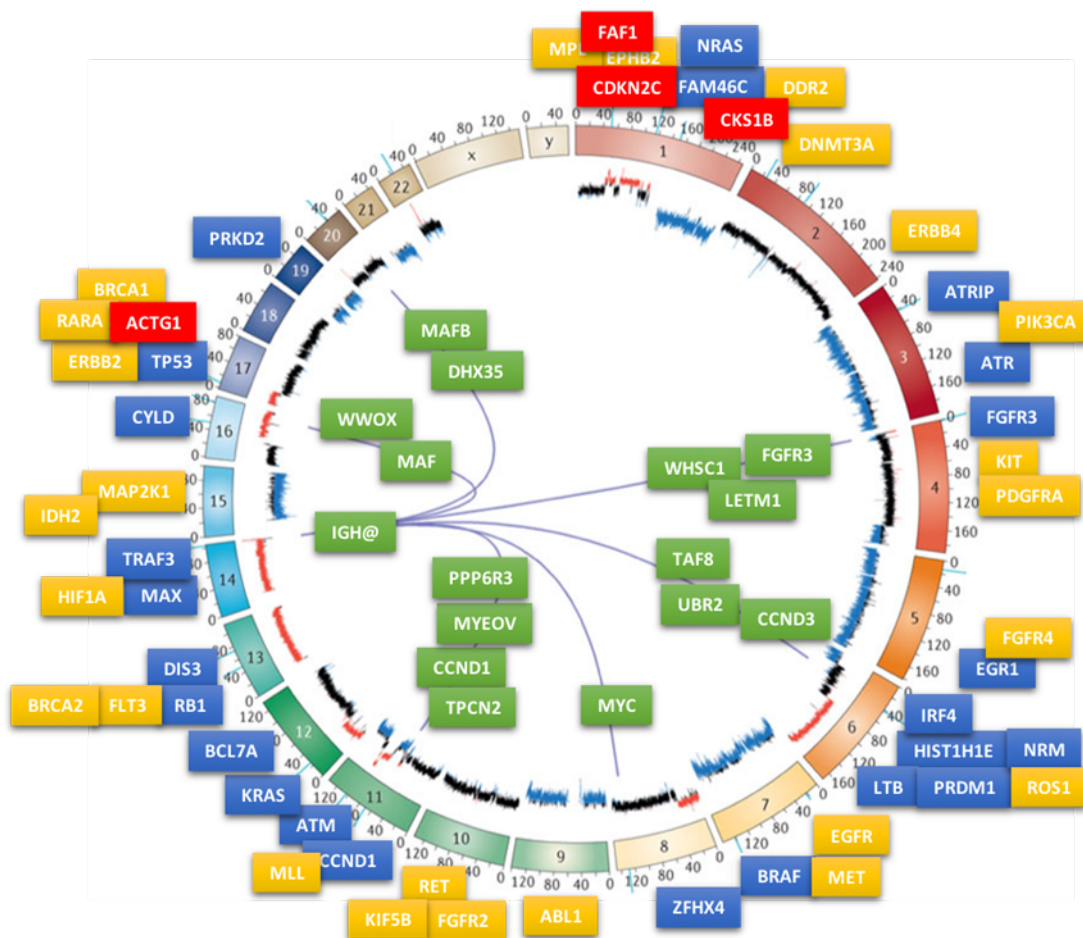


Figura 27. Genes y regiones incluidas en el panel de MM para la detección de SNV, INDEL, CNV, traslocaciones y reordenamientos.

En resumen, el 61.9% de las sondas correspondían a las regiones codificantes, el 26.9% a reordenamientos *IGH*, el 6.4% a CNVs y el 5.1% corresponde a otros reordenamientos y de los intrones de *TP53*.

Para esta primera versión, se realizaron 4 librerías con muestras de células CD138⁺ de pacientes con MM procedentes del grupo GEM/PETHEMA que ya se habían secuenciado previamente con otro panel (M3P), proporcionado por la Clínica Mayo de Arizona con el fin de poder comparar resultados con esta primera aproximación.

Este panel contiene los 77 genes más frecuentemente alterados en el mieloma múltiple. Para la realización de las 4 librerías se utilizó el kit SureSelectQXT para Illumina de Agilent Technologies, es decir, el mismo protocolo que en el caso de los exomas de amiloidosis AL. La metodología detallada se encuentra en el apartado anterior (3.1.3. Generación de las librerías de los exomas). La única diferencia está en las sondas utilizadas para la captura, que en este caso comprenden las regiones diseñadas para capturar los genes de

nuestro diseño. Después, se realizó la secuenciación en la plataforma Illumina en el equipo MiSeq v2 con una secuenciación de tipo *paired-end* (2x120 ciclos).

Tras el análisis preliminar, se decidió tener en cuenta algunas consideraciones para mejorar el diseño y además, se secuenciaron muestras controles para poder crear una línea base y poder identificar los CNVs.

3.2.3.2. Diseño y validación de la versión 2.

Para esta segunda versión se realizaron los siguientes cambios:

- Se redujeron en un 30% las regiones de gen *IGH*, dejando las regiones mínimas para detectar traslocaciones.

- Se añadieron algunas sondas más a las 31 regiones peor cubiertas según los análisis de la versión 1 y a los genes más frecuentemente mutados para mejorar la cobertura: *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *DIS3*, *FAM46C*, *TP53* y *TRAF3*. También se incluyeron dos genes nuevos en el panel (*CRBN* y *NFKB2*) por su potencial relevancia en la predicción de respuesta a inmunomoduladores.

De este modo, el porcentaje final de sondas correspondiente a cada región quedó de la siguiente manera: 81% de sondas para secuenciar genes codificantes, 11% para detección de CNVs, 8% para región *IGH* y el 7% para detectar otros reordenamientos. De modo que el panel pasó de tener 332,2 Kb en la versión 1 a 258,0 Kb en la versión 2.

Para la validación de esta segunda versión se eligieron 22 muestras con cariotipos y citogenética complejos (Tabla 11), y que estuviesen bien caracterizadas en cuanto a la cantidad, pureza e integridad del ADN, con valores de DIN superiores a 8. También se eligieron 10 controles negativos. El objetivo en este punto era comprobar la capacidad de detección de las alteraciones citogenéticas del panel de NGS. Las mutaciones puntuales no pudieron validarse ya que no se tenían resultados previos de estas muestras.

Con estas 32 muestras seleccionadas se llevó a cabo la secuenciación, con el kit 2 x 150 High Output de Illumina para el equipo NextSeq500.

Tabla 11. Características de las muestras seleccionadas para la versión 2 del panel.

MUESTRA	DX	SEXO	CARIOTIPO	Mutaciones y citogenética	[ng/ μ l]	DIN
M1	MM	Mujer	54,XY,del(1p),t(3;4),+3,der(?)t(?;4),+5,+7,+9,+11,+15,+15,-17,+19,19	TP53	83.4	7.5
M2	MM	Hombre		t(11,14), TxIGH, del_RB,	106	7.6
M3	MM	Hombre		PERDIDA IGH, del_RB	87.8	7.1
M4	MM	Mujer		TP53, IGH/FGFR3 t(4;14), TxIGH	94.4	6.6
M5	MM	Hombre	57,XY,+5,+6,+9,-16,-18,+21,+22,+8mar[14]/46,XY[36]	1q	119	8.2
M6	MM	Hombre	46,XY[30]	IGH-CCND3 t(6;14)	204	9.6
M7	MM	Hombre	46,XY[30]	1q	78.8	7.6
M8	MM	Hombre	51,XY,del(2)(p13),+4,+5,-8,+9,+add(11)(p15),der(14)t(11;14)(q13;q32),+15,+19[4]/ 46,XY[26]	TxIGH	56.4	8.0
M9	MM	Hombre	46,XY[30]	1q, TxIGH	99.6	7.9
M10	MM	Mujer	46,XX[30]	TxIGH	84.6	8.4
M11	MM	Mujer	46,XX,del(2)(q24),der(11)(q?),der(14)t(11;14)(q13;q32)[19]/ 46,XX[31]	TxIGH	170	8.4
M12	MM	Mujer	74~78<3n>,XX,-X,del(1)(q31)x2,i(1)(q10),+i(1)(q10),add(2)(p25),der(4)(p?q?)x2,+5,+7,-8,add(8)(q24)x2,del(9)(p21),-10,+11,-12,-13,+14,add(14)(q32),+15,del(16)(q23),der(17)t(1:17)(q21;q13)x2,-18,add(19)(q13),+add(19)(q13),+20,+ 6~10 mar[50]	TP53, IGH/MAF t(14:16)	145	8.6
M13	MM	Mujer	46,XX[30]	1q, pérdida IGH	59.8	7.7
M14	MM	Mujer	46,XX[30]	TP53, 1q, IGH/FGFR3 t(4;14)	127	7.6
M15	MM	Hombre	44,X,-Y[24]/46,XY[6]	TxIGH	53.8	7.8
M16	MM	Mujer	45,XX,del(11)(p11),dic(1;12)(q32;p13),-13,add(14)(q32),-15,-16,-16,+4mar[13]/ 44,XX,del(4)(q31),dic(1;12)(q32;p13),del(11)(p11),-13,add(14)(q32),-16,-16,-18,+3mar[13]/ 88<4n>,XXXX,idemx2[5]/46,XX[19]	IGH/MAF t(14:16)	161	9.1
M17	MM	Mujer		TP53, 1q	144	8.3
M18	MM	Hombre	46,XY[50]	1q, pérdida IGH	94.8	8.4
M19	MM	Hombre	51,XY,+3,del(6)(q22),-13,del(22)(q11.2),+del(22)(q11.2),+3mar[8]/46,XY[42]		72.6	8.1
M20	MM	Hombre		1p	68.2	7
M21	MM	Hombre		TP53, 1p, 1q, IGH/FGFR3 t(4;14), IGH/MAF t(14:16)	54.2	6.9
M22	MM	Hombre		1q, IGH/FGFR3 t(4;14)	50.8	7.5

del_RB: delección del gen que codifica para la proteína del retinoblastoma.

3.2.4. Estudio de pacientes incluidos en el ensayo clínico GEM12<65.

Para la realización de este estudio se secuenciaron 96 muestras más, 88 muestras del ensayo clínico GEM12<65 y 8 controles negativos, en dos grupos de 48 muestras por carrera en un NextSeq500 (2 x 150 High Output).

3.2.5. Análisis bioinformático.

El análisis bioinformático de los datos se llevó a cabo en colaboración con la empresa Dreamgenics. Una vez que teníamos la llamada de variantes y habían sido anotadas, en el laboratorio se procedió al estudio y filtrado de las variantes. En cuanto al filtrado, se descartaron variantes que:

1. Estuvieran localizadas en zonas intrónicas.
2. Que no dieran lugar a cambio de aminoácido (sinónimas).
3. Que tuvieran una cobertura inferior a 20x.
4. Variantes que estuviesen presentes en la base de datos de mutaciones puntuales no patogénicas como dbSNP, ExAC, 1000 Genome, etc, con una frecuencia alélica minoritaria por encima del 1% de la población.

3.2.6. Validación por *arrays* de CGH de los CNV.

Las muestras discordantes entre los resultados de la técnica FISH (considerada el *gold standard*) y los resultados de NGS se analizaron en paralelo utilizando el kit KarioNIM Leukemia de 180k + SNPs (NIMGenetics). En cuanto a la metodología, se hibrida la muestra con ADN comercial de referencia de sexo masculino (Agilent Technologies) sobre una plataforma KaryoNIM® Leukemia, diseñada por NIMgenetics® para la detección de alteraciones relacionadas con la leucemia linfocítica crónica y otros trastornos hematológicos (fabricado por Agilent Tech). Para su análisis bioinformático, se utiliza el constructo genómico hg19 y el estadístico ADM-2 (ventana 0.5 Mb, A=6) aceptando alteraciones de ≥ 5 sondas consecutivas. Para el análisis de heterocigosidad se usa el parámetro LOH (pérdida de heterocigosidad, *loss of heterozygosity*, en inglés) score = 6 del software Agilent Cytogenomics. La resolución del análisis es de aproximadamente 17 Kb para los genes relacionados con leucemia linfocítica crónica y 130 Kb para el resto del genoma. El análisis de LOH identifica regiones de homocigosidad de al menos 10 megabases.

La información técnica de este kit se encuentra resumida en la siguiente figura 28.

Cobertura completa de las regiones clásicas para pronóstico en LLC	LOCUS	
	Capacidad de detección	Resolución
Trisomía del cromosoma 12	130 Kb	1 sonda/25,5Kb
Deleción 11q23 , incluyendo el gen ATM		
Deleción 13q14 , incluyendo la región DLEU		
Deleción 17p13 , incluyendo el gen TP53		
Otras regiones de interés	Capacidad de detección	
Genes de interés en LLC <i>ATM, BIRC2, BIRC3, IKZF1, KLHL6, MYB, MYD88, NOTCH1, POT1, SF3B1, TP53, XPO1</i>	<17Kb	
Regiones LOH	10 Mb	
Genes incluidos en <i>Cancer Consensus</i>	Cobertura completa	

Figura 28. Ficha técnica kit KarioNIM Leukemia. Se muestra el tamaño del *array*, resolución y las alteraciones cromosómicas y genes que incluye el estudio.

3.3. Ensayos de dinámicas clonales

3.3.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares humanas de MM utilizadas fueron L363, AMO1 y OPM2. Estas líneas se cultivaron en un medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibióticos (penicilina-estreptavidina) y fungicida, a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía CO₂ al 5%, realizando subcultivos periódicos cada 3-4 días y se mantuvieron a una concentración de 300.000 célula/ ml.

3.3.2. Ensayos de competición clonal

Para entender las mutaciones implicadas en la proliferación y progresión del MM, se utilizó la línea AMO1. Para estudiar el efecto de las alteraciones mono- y bi-alélicas en TP53, y la línea OPM2 para la caracterización de las alteraciones en *RAS* (*KRAS* WT, *G12A*, *A146T*). Por otro lado, para estudiar las mutaciones relacionadas con la resistencia a IMiDs y PIs, se utilizaron líneas de mieloma sensibles a estos fármacos (AMO1 y L363), a las que se les introdujo mutaciones en los genes *IKZF1* (WT y A152T) y *PSMB5* (WT y A20T). En la tabla 12 quedan resumidas las características de cada línea celular utilizada.

Tabla 12. Características de las líneas celulares utilizadas.

	KRAS	NRAS	TP53	IMiDs	PIs
AMO-1	MUT	WT	WT	R	S
L363	WT	MUT	MUT	S	S
OPM-2	WT	WT	MUT	-	-

WT: *wild type*; MUT: mutantes; R: resistentes; o S: sensibles.

Como se ha comentado, la línea celular AMO1 se utilizó para los estudios con *TP53*, ya que es WT para este gen, y para la resistencia a PIs. La línea L363 se utilizó para estudios de resistencia a ambos grupos de fármacos. Por último, OPM-2 se usó para la caracterización de las alteraciones en *RAS*, ya que es de las pocas líneas que presenta esta ruta intacta.

La generación de sublíneas WT y mutantes se realizó mediante CRISPR/CAS9 o mediante transfección a través del sistema *Sleeping Beauty*. A continuación, a esas sublíneas se les transfirió del mismo modo una proteína fluorescente, GFP (proteína verde fluorescente) o RFP (proteína roja fluorescente) para el análisis por citometría de flujo. El esquema del proceso se puede observar en la figura 29. Estas líneas celulares fueron cedidas por el grupo de Genética traslacional del Universitätsklinikum Wuerzburg, Alemania.

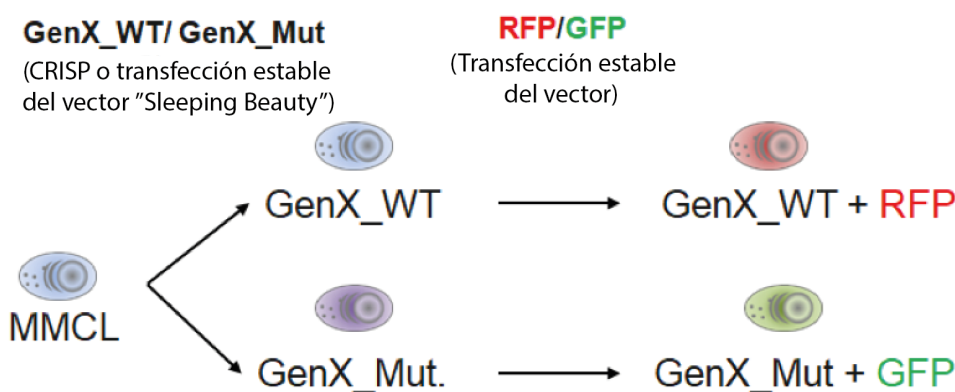


Figura 29. Esquema de la generación de sublíneas WT y mutantes y su posterior marcaje con proteínas fluorescentes. MMCL: línea celular de mieloma, RFP: proteína roja fluorescente, GFP: proteína verde fluorescente.

En primer lugar, se realizaron ensayos de viabilidad celular con las líneas L363 *IKZF1* y *PSMB5* mutado con el objetivo de comprobar la adquisición de resistencia en las líneas mutadas.

Para ello, se sometió a las líneas L363 *IKZF1* WT y L363 *IKZF1* A152T a una concentración de lenalidomida (LEN) de 2 μ M, y a las líneas L363 *PSMB5* WT y L363 *PSMB5* A20T a una concentración de bortezomib (BOR) de 6 nM. Después de 48-72h, se hizo un recuento para comprobar la viabilidad celular después de la exposición a los fármacos.

Tras la caracterización de los diferentes mutantes a nivel molecular y la comprobación de la adquisición de resistencia mediante los ensayos de viabilidad celular, se combinaron las diferentes células marcadas en presencia de diferentes fármacos y condiciones, tal y como queda resumido en la tabla 13.

Tabla 13. Resumen de las combinaciones realizadas en cada experimento.

Experimento 1. Estudio de la dinámica clonal de <i>TP53</i>
Experimento 1.1. AMO1 <i>TP53</i> WT/WT + AMO1 <i>TP53</i> mono-alélico
Experimento 1.2. AMO1 <i>TP53</i> WT/WT + AMO1 <i>TP53</i> bi-alélico
Experimento 1.3. AMO1 <i>TP53</i> mono-alélico + AMO1 <i>TP53</i> bi-alélico
Experimento 2. Estudio de la dinámica clonal de <i>KRAS</i>
Experimento 2.1. OPM2 <i>KRAS</i> WT + OPM2 <i>KRAS</i> G12A
Experimento 2.2. OPM2 <i>KRAS</i> WT + OPM2 <i>KRAS</i> A146T
Experimento 3. Estudio de la dinámica clonal de <i>IKZF1</i>
Experimento 3.1. L363 <i>IKZF1</i> WT + L363 <i>IKZF1</i> A152T
Experimento 3.2. L363 <i>IKZF1</i> WT + L363 <i>IKZF1</i> A152T + LEN (2 μ M)
Experimento 4. Estudio de la dinámica clonal de <i>PSMB5</i>
Experimento 4.1. L363 <i>IKZF1</i> A152T + L363 <i>PSMB5</i> A20T + LEN (2 μ M)
Experimento 4.2. L363 <i>IKZF1</i> A152T + L363 <i>PSMB5</i> A20T
Experimento 4.3. L363 <i>IKZF1</i> A152T + L363 <i>PSMB5</i> A20T + BOR (6 nM)

A continuación, se estudió el comportamiento de las mutaciones mono- y bi-alélicas de *TP53* en la línea AMO1. Para ello, se combinaron células *TP53* WT con *TP53* mono-alélico y *TP53* bi-alélico respectivamente en una proporción 80/20, con el objetivo de ver si los porcentajes revertían. Por otro lado, se combinaron células *TP53* con mutación mono-alélica y bi-alélica también en una proporción 80/20.

Para el estudio de las mutaciones en *KRAS*, se utilizó la línea OPM2 *KRAS* WT y se combinó con las células mutantes *KRAS* G12A y *KRAS* A146T respectivamente, a una proporción de 80/20.

Por último, en cuanto al estudio de los genes implicados en la resistencia a fármacos, se comenzó con el análisis de la mutación *IKZF1*. Para ello, se combinó la línea L363 *IKZF1* WT con *IKZF1* A152T en proporción 80/20, en ausencia de fármaco y con LEN a 2 uM.

El estudio de la mutación en *PSMB5* implicó la combinación de células L363 *IKZF1* A152T Y L363 *PSMB5* A20T en diferentes condiciones: por un lado se estudió esa combinación en presencia de LEN a 2 uM y por otro lado, se analizó el comportamiento de estas mutaciones en ausencia de fármaco, y adicionando BOR a 6 nM a partir del día 41.

Los cambios en las poblaciones celulares se fueron midiendo aproximadamente cada 3-4 días mediante citometría de flujo.

3.4. Análisis bioestadístico.

Las asociaciones se han estudiado entre los distintos parámetros mediante el test estadístico de Fisher para variables categóricas y el test estadístico de Wilcoxon para variables continuas. Para el estudio de la normalidad se emplearon las pruebas de Kolmorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. En el caso de variables continuas, se analizaron las diferencias entre grupos mediante la t de Student para variables con una distribución normal o la U de Mann-Whitney para las variables que no seguían dicha distribución. La homogeneidad de las varianzas para la t de Student se estudió mediante la prueba de Levene. Los análisis de correlación se analizaron mediante test de Spearman o el test de Pearson dependiendo de los casos.

La validez de la nueva metodología se evaluó comparando los resultados de la prueba (panel NGS) con los de un patrón de referencia o gold-standard (FISH), que identifica el diagnóstico verdadero. Para ello, utilizamos los marcadores de validez: sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Todos los valores p de dos colas con significación estadística fueron definidos con un valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de la caracterización inmunogenética de pacientes con amiloidosis de cadenas ligeras (AL).

4.1.1. Descripción del escenario mutacional en amiloidosis AL

4.1.1.1. Resultados técnicos de secuenciación

En cuanto a los datos de secuenciación se obtuvo una calidad de secuenciación por encima del Q30 en el 96,5% de las lecturas, este valor indica la probabilidad de que una base de cada mil sea identificada de forma incorrecta. La media de profundidad de cobertura fue de 63x, es decir, que de media todos los exones y las regiones UTR' del genoma fueron leídas 63 veces. El porcentaje medio de duplicados de PCR fue del 15% y la cobertura media *on-target*, es decir, el porcentaje de lecturas que caen en nuestra región de interés (exomas + UTR') fue del 84%.

4.1.1.2. Descripción del escenario mutacional

Tras el filtrado de las variantes germinales, exclusión de polimorfismos y artefactos de secuenciación, se identificaron un total de 2318 SNV e indels somáticos. La media de mutaciones por paciente fue de 86 con un rango de entre 23 y 434 mutaciones para los SNVs y una media de 4 indels (0-18) por paciente. La mediana fue de 50 para los SNVs y 2 para los indels.

El 80% (1931/2318) de las variantes fueron detectadas por ambos *variant callers*. Aproximadamente, el 20% de las variantes fueron detectadas por uno de los dos programas. Varscan detectó 435 variantes que no habían sido detectadas por Strelka mientras que éste identificó 51 variantes somáticas no identificadas por Varscan 2.0 (Fig.30).

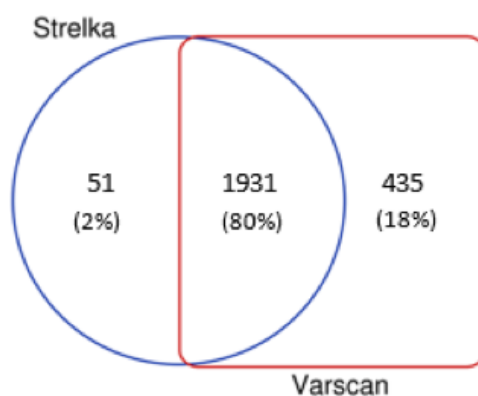


Figura 30. Número de variantes detectadas por Strelka y Varscan 2.0.

Del total de estas variantes, el 62% se encontraban en regiones exónicas, el 2% en regiones de *splicing* y el 37% en regiones reguladoras UTR. En la figura 31 se muestran los porcentajes de los diferentes tipos de mutaciones somáticas encontradas en pacientes con amiloidosis AL.

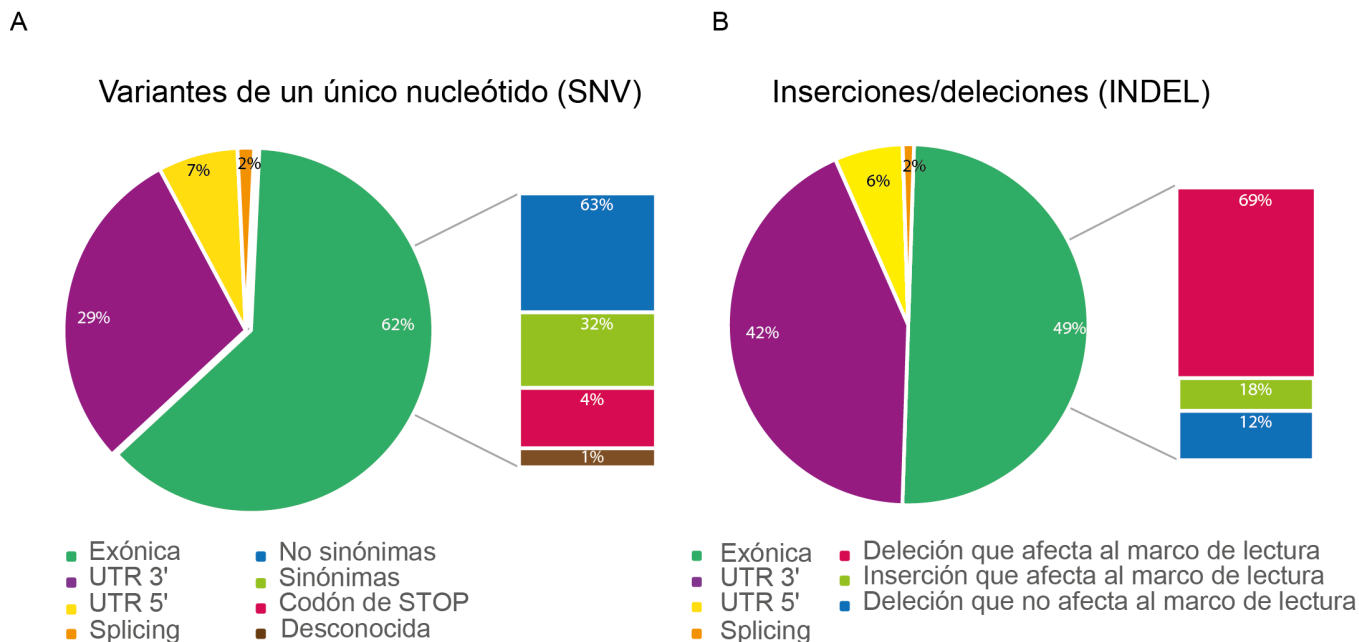


Figura 31. Resumen de la distribución genómica y consecuencia funcional de los SNV (A) e INDEL (B) alterados en la serie de amiloidosis AL.

En este punto, es importante destacar la gran representación de las mutaciones en regiones UTR 3' y 5', un 36% de mutaciones SNV y un 48% de los indels fueron identificados en estas regiones.

En cuanto a la prevalencia de mutaciones somáticas a lo largo del genoma fue de 1.7 (0.8-14.5) mutaciones por megabase. Dos muestras mostraron un número significativamente mayor de mutaciones respecto a las demás (S9: 340 mutaciones y S11: 452 mutaciones).

4.1.1.3. Recurrencia mutacional

Los 3 genes más frecuentemente mutados, con una recurrencia igual o mayor del 18%, en cinco o más pacientes, fueron: *MUC16* (26%), *SEMA5A* (19%) e *IGLL5* (19%). Los tipos de mutaciones encontrados en *MUC16* fueron seis mutaciones no sinónimas, es decir, que dan lugar a cambio de aminoácido, tres mutaciones sinónimas y una delección con cambio del marco de lectura. En *SEMA5A*, se detectaron cuatro mutaciones, tres de ellas localizadas en las regiones UTR 3' del gen, y una mutación no sinónima. Las mutaciones

identificadas en *IGLL5* fueron las siguientes: tres mutaciones no sinónimas y dos sinónimas. Es interesante destacar que todas las mutaciones en este gen se encontraron en el exón 1.

El resto de los genes estaban mutados en 4 pacientes o menos. El tipo de mutaciones identificadas y la posición en estos genes está representado en los gráficos *lollipop* que se muestran a continuación en la figura 32.

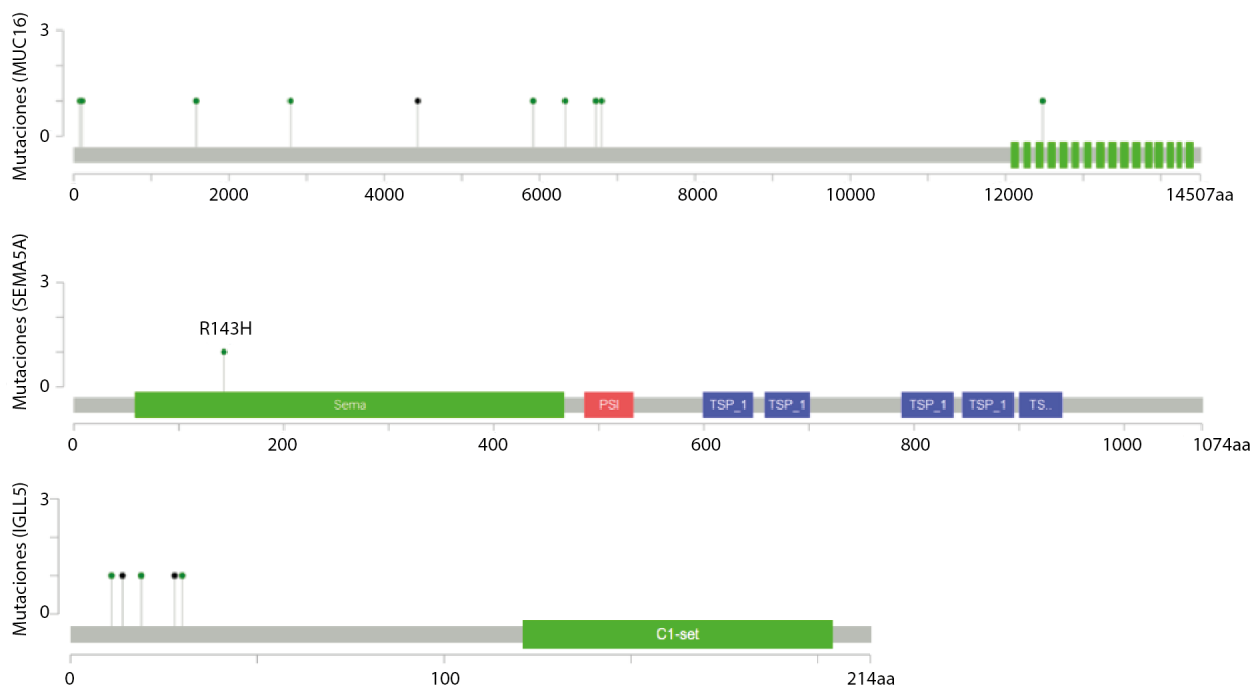


Figura 32. *Lollipop*s que muestran el tipo de mutación y posición en los genes más recurrentemente mutados en amiloidosis AL. Mutaciones con cambio de sentido (verde), mutación que da lugar a una proteína truncada (negro).

4.1.1.4. Estudio de la frecuencia alélica

El estudio de la frecuencia alélica de las mutaciones detectadas en nuestra serie de pacientes mostró que el 66% de ellas (1530/2318) fueron detectadas a una frecuencia alélica por debajo del 25% (Fig. 33).

Debido a la gran heterogeneidad mutacional característica de la amiloidosis AL, la mayoría de los genes no se encuentran recurrentemente mutados en nuestra serie de pacientes.

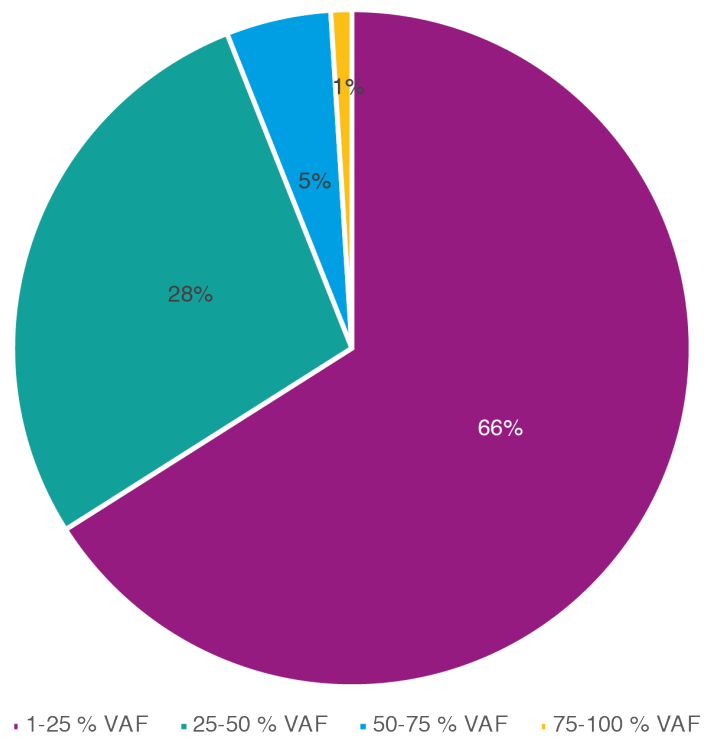


Figura 33. Diagrama de sectores que muestran la distribución en porcentaje de la frecuencia alélica de las 2318 mutaciones detectadas.

Por lo tanto, el estudio de la frecuencia alélica se realizó sobre los tres genes que presentaron una recurrencia mutacional más alta. Un resumen de las mutaciones encontradas en estos tres genes se encuentra en la tabla 14.

Tabla 14. Variantes identificadas en los genes recurrentemente mutados en amiloidosis AL.

Tipo	Software	ID	Posición	Ref	Alt	VAF(%)	Gene	Función	Función exónica	Cambio de amino-ácido
Snv	Ambos	5	chr22:23230370	A	C	97,8	IGLL5	Exónica	no sinónima	exon1:p.Q46P, exon1:p.K11Q
Snv	Ambos	8	chr22:23230317	G	A	48,5	IGLL5	Exónica	Sinónima	exon1:p.L28L
Snv	Ambos	18	chr22:23230275	G	A	44,8	IGLL5	Exónica	Sinónima	exon1:p.E14E
Snv	Ambos	23	chr22:23230321	G	A	64,0	IGLL5	Exónica	no sinónima	exon1:p.G30S
Snv	Ambos	27	chr22:23230394	C	T	46,5	IGLL5	Exónica	no sinónima	exon1:p.A54V, exon1:p.P19S
Snv	Ambos	2	chr19:9067272	A	G	4,5	MUC16	Exónica	no sinónima	exon3:p.L6725P
Snv	VarScan 2	2	chr19:9091490	C	A	3,9	MUC16	Exónica	no sinónima	exon1:p.V109F
Indel	Ambos	6	chr19:9074149	TTA	T	17,0	MUC16	Exónica	Delección con cambio del marco de lectura	exon3:p.L4432fs
Snv	Ambos	7	chr19:9091575	C	A	2,3	MUC16	Exónica	Sinónima	exon1:p.G80G
Snv	VarScan 2	9	chr19:9087079	G	A	8,0	MUC16	Exónica	no sinónima	exon1:p.A1579V
Snv	Ambos	11	chr19:9020059	T	C	5,3	MUC16	Exónica	no sinónima	exon21:p.E12479G
Snv	Ambos	11	chr19:9068458	A	T	4,0	MUC16	Exónica	no sinónima	exon3:p.S6330T
Snv	Ambos	11	chr19:9083433	A	G	5,8	MUC16	Exónica	Sinónima	exon1:p.G2794G
Snv	Ambos	13	chr19:9069692	A	G	13,9	MUC16	Exónica	Sinónima	exon3:p.P5918P
Snv	Ambos	15	chr19:9067047	C	T	12,4	MUC16	Exónica	no sinónima	exon3:p.S6800N
Snv	Ambos	7	chr5:9226985	C	T	36,7	SEMA5A	Exónica	no sinónima	exon7:p.R143H
Snv	VarScan 2	11	chr5:9036939	A	G	14,9	SEMA5A	UTR3	-	
Snv	Ambos	21	chr5:9042995	A	G	17,7	SEMA5A	UTR3	-	
Snv	Ambos	25	chr5:9039328	C	A	19,7	SEMA5A	UTR3	-	
Snv	Ambos	27	chr5:9036840	A	G	6,4	SEMA5A	UTR3	-	

El 100% de las mutaciones encontradas en el gen *I_GLL5* fueron clonales ya que se encontraron a una frecuencia alélica por encima del 47%, con una media del 60,3%. En cambio, las mutaciones encontradas en los genes *MUC16* y *SEMA5A*, estaban una frecuencia media de 7,7% y 19,1%, respectivamente.

4.1.2. Análisis del repertorio de los reordenamientos de las inmunoglobulinas en amiloidosis AL y MM.

Tras el alineamiento de las secuencias con las referencias de la base de datos de las inmunoglobulinas (IMGT), anotación y filtrado de aquellos reordenamientos que se encontraban por debajo del 10% respecto al total de lecturas, se identificaron un total de 39 clonotipos IGHV-D-J e IGK-VJ en las 27 muestras de los pacientes con amiloidosis AL. El 19% (5 de 27) de los pacientes presentaron más de dos clonotipos mayoritarios: en tres muestras se identificaron tres y en dos muestras cuatro. También se identificó una muestra dos clonotipos distintos, uno con frecuencias del 48% y el 21%. Estos datos sugieren que existe más de una célula clonal involucrada en la patogénesis de la amiloidosis AL.

En cambio, en MM se encontraron 77 reordenamientos clonales en las 63 muestras analizadas presentando una heterogeneidad clonal del 3,9%, es decir, solamente 5 de los 63 pacientes mostraron más de un reordenamiento clonal, siendo significativamente diferente ($p=0.024$) a lo encontrado en la serie de amiloidosis AL.

Usando como punto de corte el 98% de homología de secuencias para definir el estado de hipermutaciones somáticas en el gen de las inmunoglobulinas, el 23% (9 de 39) de las secuencias identificadas en amiloidosis AL fueron consideradas como mutadas, un porcentaje ligeramente menor al encontrado en MM (36%). La longitud de la región CDR3 del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, no presentó diferencias significativas ($p = 0,9$) entre amiloidosis AL y MM, con una mediana de 54 y 51 aminoácidos respectivamente.

El gen *I_GH* detectado con más frecuencia en los reordenamientos, fue el gen *I_GHV3-48* con una recurrencia del 10,3% en amiloidosis AL, y, el gen *I_GHV3-30* con un 12% en MM (Fig. 34).

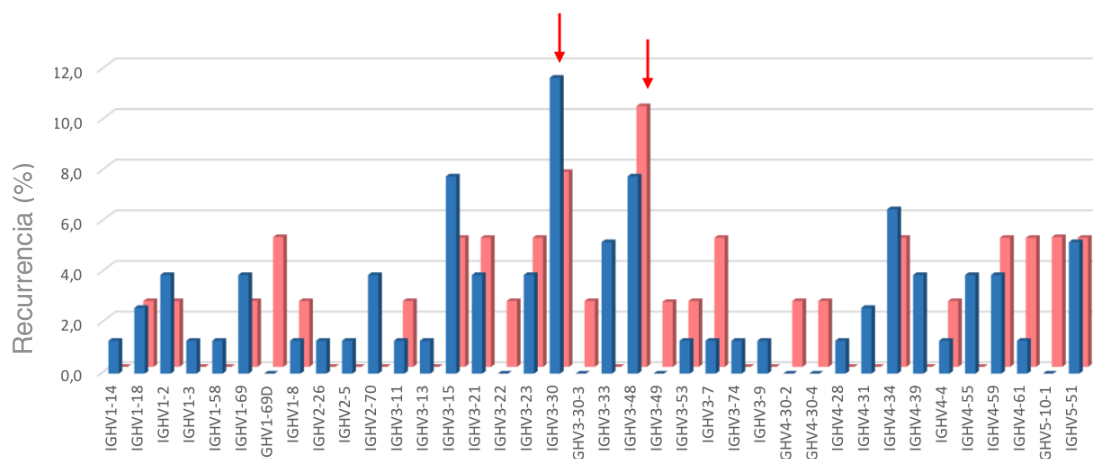


Figura 34. Diagrama de barras que muestra los distintos genes IGHV utilizados para la formación de los reordenamientos tanto en amiloidosis AL (rojo) como en MM (azul). Las flechas indican los genes mas recurrentes, IGHV3-48 en amiloidosis AL y IGHV3-30 en MM.

4.1.3. Rutas y vías de señalización alteradas.

Tras analizarlas con el software PANTHER, se observó que ninguna ruta estaba representada significativamente respecto a las demás. Por lo tanto, decidimos centrarnos en las rutas o grupos de genes y procesos mas interesantes alteradas en MM y amiloidosis AL, tales como proliferación, genes superiores de tumores, genes relacionados con MM, maquinaria de ubiquitinación, cambios epigenéticos (modificación de historia y epifactores), estrés oxidativos, estrés del ER, transportadores de drogas, genes asociados a fármacos (PIs e IMiDs), secreción celular, regulación de la producción de inmunoglobulinas y vía de unión de chaperonas. Para ello, seleccionamos los genes incluidos en los distintos grupos y calculamos cuántos de ellos también aparecían en la lista de nuestra serie. A continuación, se describen los procesos biológicos y las rutas seleccionadas asociados a la amiloidosis AL:

- Crecimiento:
 - Proliferación (GO:0008283)
 - Supresores de tumores (PDMI: 23066107)
 - Genes relacionados con el MM (Panel M3P de la Clínica Mayo).
- Modulación de la expresión
 - Maquinaria de ubiquitinación (PMID:27002219, PMID:16325574, PMID:27199454)
 - Epigenética. Modificación de histonas (PMID: 20930037). Epifactores (PMID: 26153137).

- Supervivencia
 - Respuesta al estrés. Estrés oxidativo (GO:0006979) y estrés del ER (GO:0034976).
 - Transportadores de fármacos (PMID: 25475361)
 - Genes relacionados con resistencia a fármacos (PIs e IMiDs) (método interno).
- Procesos biológicos
 - Secreción celular (GO:0032940)
 - Regulación de la producción de Igs (GO:0002637)
 - Chaperonas (GO:0051087).

Como podemos observar en la figura 35, las vías más representativas alteradas en AL fueron: proliferación (28%) incluyendo genes como *MUC16*, *SEMA5A*, *NOTCH2*, *NCOR1*, *FAT4*, *WNT7A*, *SMAD1*, *TFGA*, *TET*, y genes que se encuentran en la ruta NFκB (*ZAP70*, *PLCG2*, *IL1R1*, *TRADD*, *TRAF2*, *BIRC2*, *TRIM25*, *TRAF3*, *LTB*, *TAB1*, *TAB3*, *XIAP*, *NFKB2*, *PTGS2*, *PLAU*, y *GADD45B*). También las vías de secreción celular (18%), con genes como *TRAF2*, *TFGB3*, *XBP1*, *PCDH7* y *WNT7A* y genes supresores tumorales (17%) tales como *ZFH3*, *NOTCH2*, *PRDM5*, *PAX5* y *MAX*.

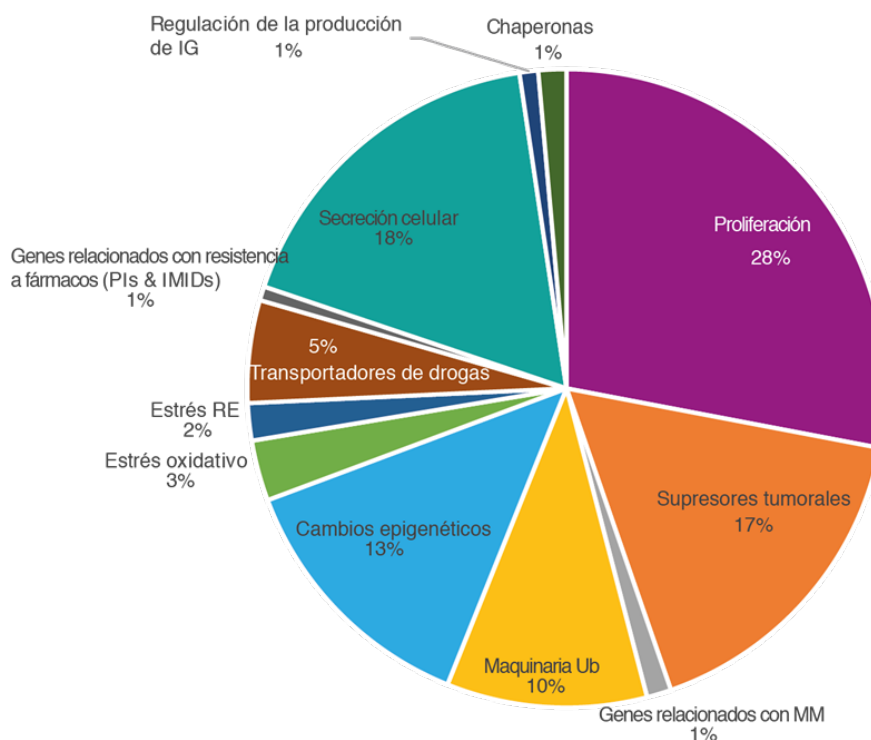


Figura 35.

Diagrama de secciones que muestra las vías metabólicas y rutas de señalización alteradas en amiloidosis AL.

4.1.4. Identificación y estudio de las variaciones en el número de copias.

La detección fiable de los CNV fue posible en 21 de los 27 casos. Seis muestras fueron descartadas por presentar mucho ruido en el análisis y por tanto en el resultado final. Todas ellas habían sido amplificadas con Repli-g, las 3 réplicas.

Tras el análisis de los CNV se pudo demostrar que el 90,5% (19/21) de los pacientes tenían al menos una alteración estructural, así, solamente el 9,5% (2/21) no presentaron ninguna aberración cromosómica. Un resumen de los CNV detectados en la serie de amiloidosis AL se puede observar en la figura 36.

De forma general, se observaron ganancias en los cromosomas impares y pérdidas de copia en los cromosomas 6q, 13 y 22. La ganancia más recurrente en este estudio fue en el cromosoma 11 o brazo 11q (52,4% de los casos), seguida de la trisomía de los cromosomas 7, 9 y 19 (42.9%, 47.5% y 42.9% de los casos, respectivamente). Además, en el cromosoma 7 también se identificó la duplicación mas larga del estudio, con 97Mb que abarca desde la citobanda 7q11.1 hasta la 7q36.3 o desde la posición chr7:61657308 a la posición chr7:159128163. La mayoría de los genes que se encuentran en esta región son genes que forman parte de la membrana celular, tales como, ATP sintetasas, transportadores de cationes, glucosidasas, receptores acoplados a proteína G, metaloproteasas, oxigenasas, proteínas de unión a ARN, y proteínas SNARE entre otras.

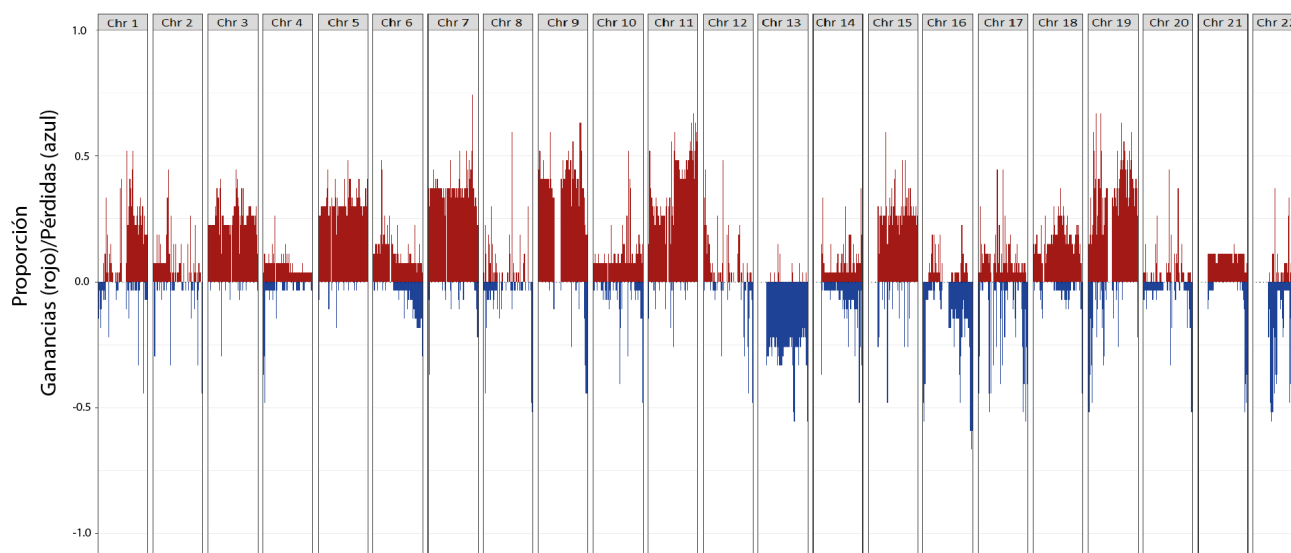


Figura 36. Gráfico de frecuencias que muestra de forma global las distribuciones de ganancias (rojo) y pérdidas (azul) como porcentajes para los 21 pacientes con amiloidosis AL

En el cromosoma 13q fue donde se detectaron mas deleciones, identificándose en el 39% de los pacientes, teniendo el 65% de ellos una pequeña región en común delecionada: 13q11-13q12.11 (chr13:19,020,500-21,728,039). Esta región incluye genes relacionados con el metabolismo celular, el transporte mediado por vesículas y la metilación.

En el cromosoma 22, solamente se encontraron grandes deleciones o monosomías en un paciente. Sin embargo, tras observar que el gen *IGLL5*, localizado en el cromosoma 22, fue uno de los genes mutados con más frecuencia y con una VAF elevada, se profundizó en el estudio de la variación en el número de copias de este gen y se identificó que estaba delecionado en el 29% (6/21) de los pacientes. Además, tres de ellos, tenían delecionadas las dos copias del gen. En la figura 37 se puede ver un ejemplo de la deleción de una copia ($\log_2 = -1$) del gen *IGLL5* en uno de los pacientes.

Teniendo en cuenta los CNVs y las mutaciones puntuales el 41% (11 de 27 pacientes) de los pacientes tenían alterado este gen.

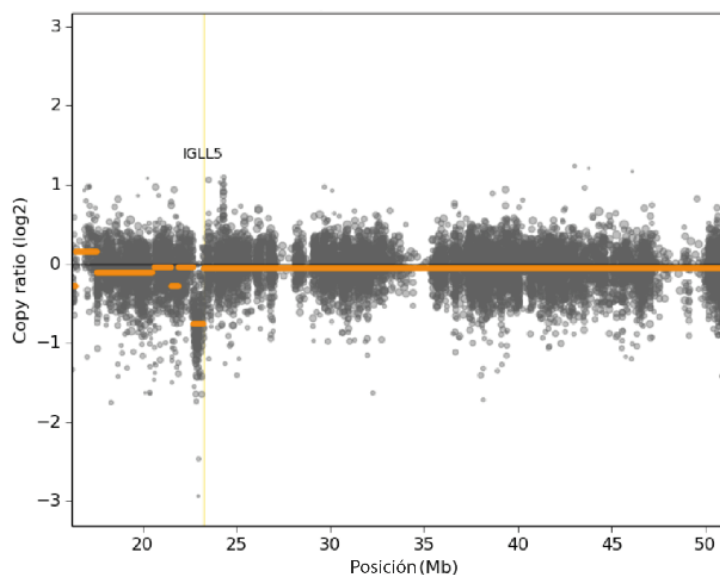


Figura 37. Extracto de un gráfico del programa CNVKit donde se muestra una pérdida de copia del gen *IGLL5* de un paciente con amiloidosis AL.

Los cromosomas o regiones cromosómicas alteradas con menos frecuencia fueron los cromosomas 2, 4, 8, 10, 12, 14 y 20.

4.1.5. Firmas mutacionales.

Una vez que se importaron los datos en formato .vcf, se creó el espectro mutacional con la contribución media de cada uno de los 6 tipos de sustitución de bases (C>A C>G C>T T>A T>C T>G) en todas las muestras respecto al genoma de referencia, para tener una visión general de las características de las mutaciones somáticas adquiridas en las 27 muestras de pacientes con amiloidosis AL. Para las sustituciones de bases C> T, se hizo una distinción de esta sustitución entre zonas CpG y otras zonas del genoma, ya que la desaminación de las citosinas metiladas en las regiones CpG es un proceso mutacional activo con frecuencia. De hecho, y como se puede observar en la figura 38 esta sustitución es la mas común a lo largo de todas las muestras.

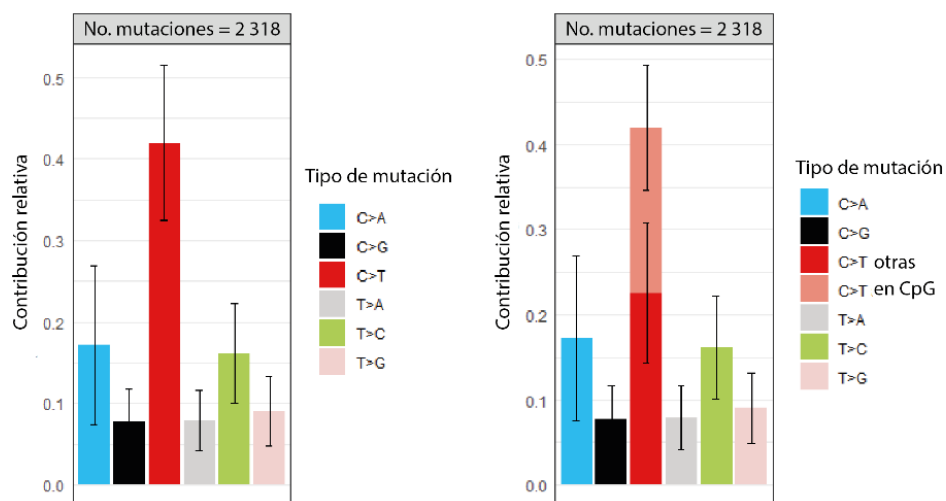


Figura 38. Contribución relativa media de cada uno de los 6 tipos de sustitución de bases en todas las muestras. Las barras de error indican la desviación estándar de todas las muestras. También se indica el número total de mutaciones.

Este tipo de sustituciones está probablemente relacionada con la tasa relativamente elevada de desaminación espontánea de 5-metil-citosina que produce transiciones C>T y que ocurre predominantemente en los trinucleótidos NpCpG.¹⁹⁹ Además, este tipo de sustituciones es característico de la firma mutacional de tipo 1.²⁰⁰

A continuación, a partir de la matriz de mutaciones con los recuentos para los 96 cambios de trinucleótidos, se compararon las diferencias y similitudes con las firmas mutacionales descritas en COSMIC. Los resultados se muestran en el *heatmap* que se presenta a continuación, en el que se indican los valores de similitud de coseno (Fig.39).

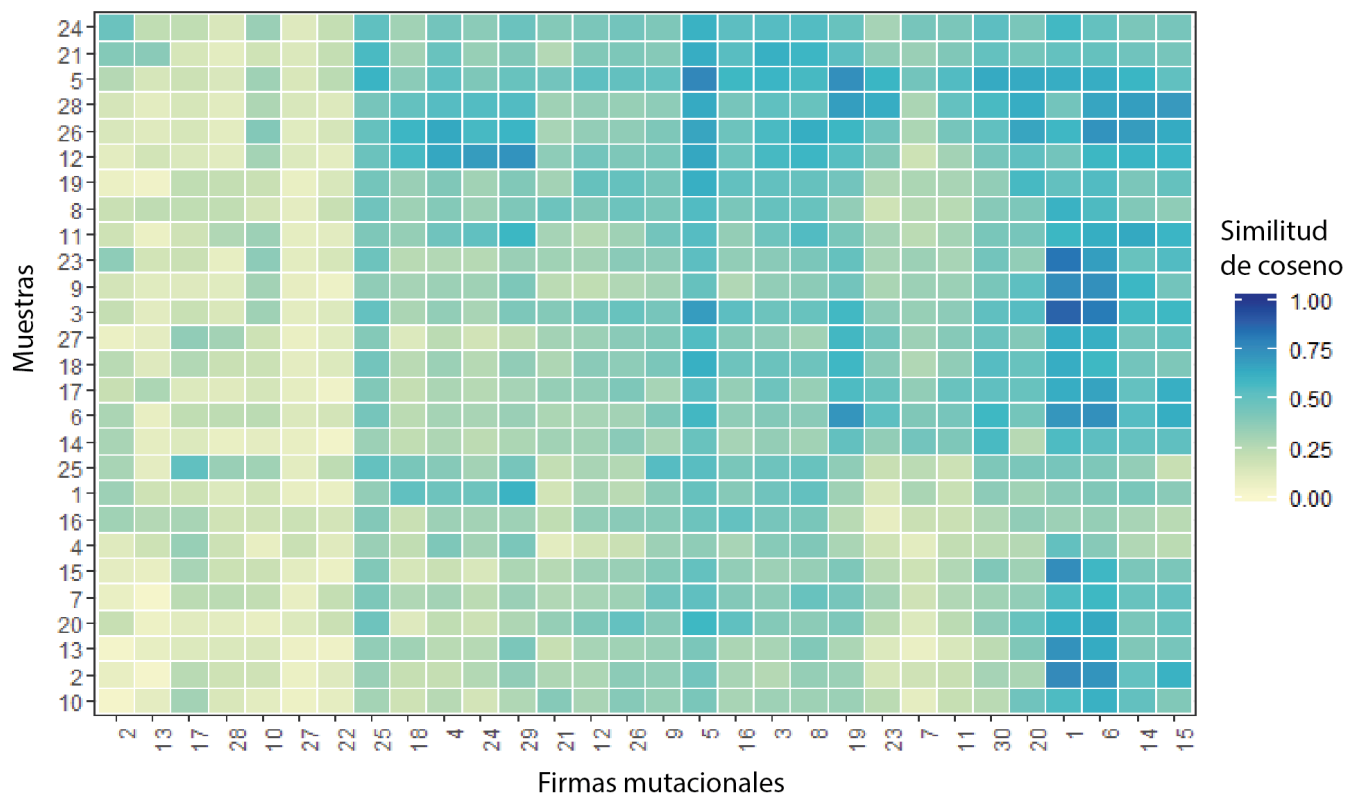


Figura 39. *Heatmap* que muestra los valores de similitud de coseno entre cada muestra y las firmas COSMIC. Las muestras se han agrupado de acuerdo con el valor de similitud con cada firma. Además, las firmas se han ordenado según su similitud, de modo que las firmas muy similares se agrupan.

En la mayoría de los pacientes se identificaron entre 1 y 8 firmas mutacionales, sugiriendo que para el desarrollo de la enfermedad están siendo operativos múltiples procesos mutacionales.

Las firmas compartidas entre todas las muestras con una mayor similitud de coseno con las ya descritas de COSMIC fueron las firmas 1, 5, 6 y 25.

Las firmas 1 y 5 son firmas relacionadas con la edad. La firma 1, como se ha comentado anteriormente está asociada con un proceso mutacional endógeno iniciado por la desaminación espontánea de la 5-metilcitosina. La firma 5 se caracteriza por presentar sesgo de cadena en la transcripción para sustituciones T>C en el contexto ApTpN. En cuanto a la firma mutacional 6, está asociada con deficiencia de la proteína de reparación de emparejamientos erróneos o *mismatch repair* (MMR) y se encuentra en tumores con inestabilidad genómica o inestabilidad de microsatélites (MSI-H). Finalmente, la firma mutacional 25 se caracteriza por mostrar sesgo de cadena transcripcional para mutaciones T>A y solo se ha identificado en las líneas celulares de linfoma de Hodgkin, por lo que la etiología de esta firma sigue siendo desconocida. ¹⁴

4.1.6. Comparativa amiloidosis AL vs MM.

Tras filtrar las variantes encontradas en la serie de amiloidosis AL de tal forma que fuesen comparables con los datos de la base de datos de MM, CoMMpass IA13c, se identificaron un total de 718 mutaciones exónicas, no sinónimas y no localizadas en los genes de las inmunoglobulinas con una VAF mayor del 5% (683 SNVs y 35 indels).

Se identificó que solamente 37 de los 662 (5,5%) de genes mutados estaban alterados en más de un pacientes (Fig. 40). El 85% de los casos (23/27), presentaron al menos una mutación en uno de estos 37 genes (rango, 1-11).

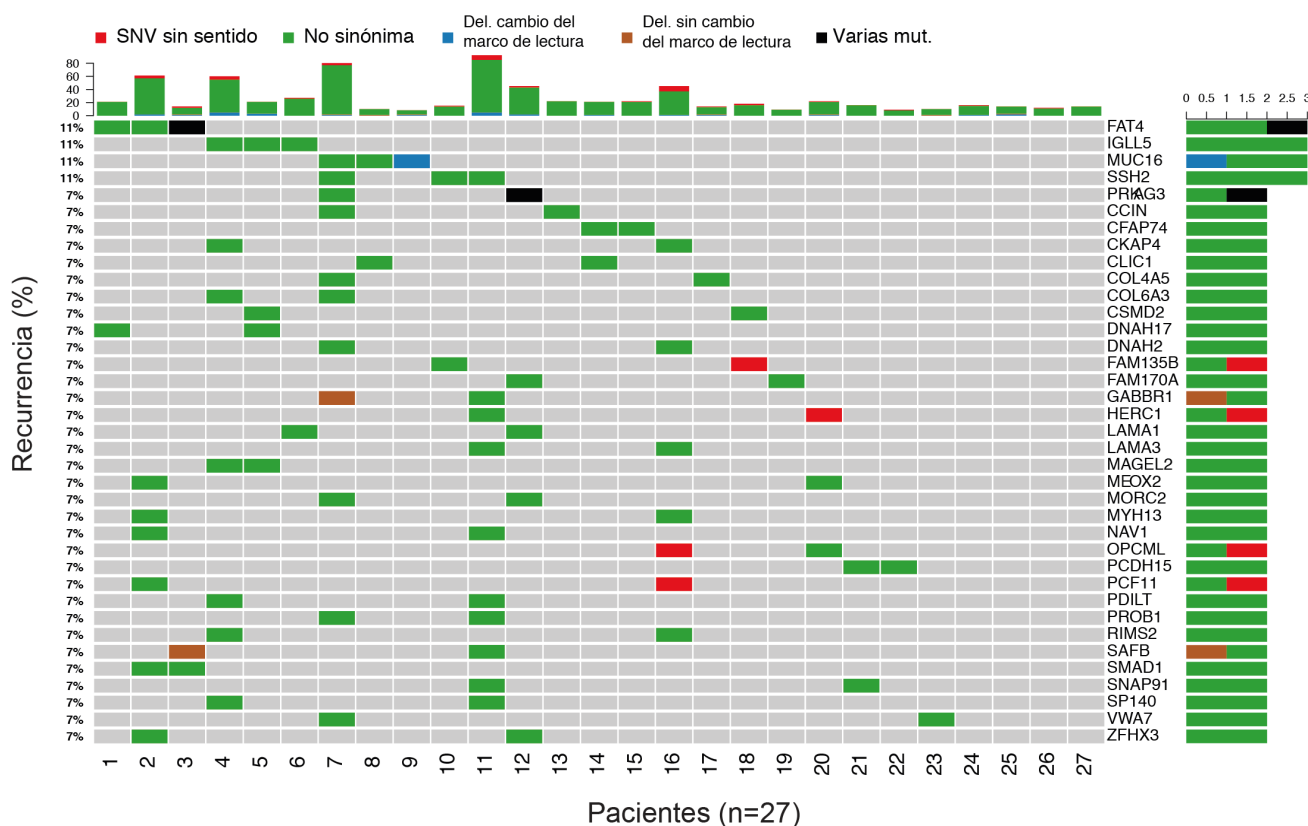


Figura 40. Genes mutados con recurrencia en la serie de amiloidosis AL. Distribución por pacientes de los genes (n=37) mutados con mayor frecuencia. Los cuadrados están coloreados de acuerdo al tipo de mutación. Los gráficos de barras en la parte de arriba de la figura muestran el número total de mutaciones por pacientes.

La mediana de mutaciones por muestra fue de 18 mutaciones (rango, 8-92) a diferencia de lo que se encontró en la serie de MM (mediana de 38, $p < 0,0001$, Fig. 42A). Por el contrario, la presencia de CNV en amiloidosis AL (19/21, 90.5%) fue similar a la serie de MM, donde se han identificado alteraciones en el 100% de los casos.

Además, al comparar los genes descritos como *drivers* en el MM,²⁰¹ se observó que *NRAS*, *BRAF*, *TRAF* no aparecían mutados en la serie de amiloidosis AL, y otros aparecían mutados solamente una vez (*DIS3* y *DUSP2*), siendo la mayoría de ellos subclonales, con una media de VAF del 23% (Fig. 41).

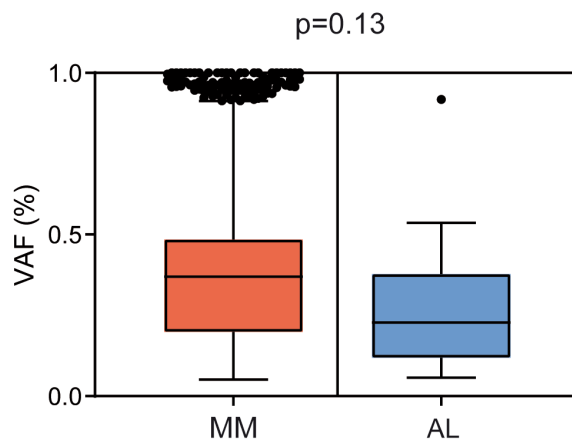


Figura 41. Distribución del VAF de los 63 genes drivers de MM descritos por Walker et al. en la base de datos de CoMMpass IA13c vs la serie de AL. Las cajas muestras los rangos intercuartiles (IQR) desde el primer cuartil hasta el tercero. Las líneas en el centro representan las medianas. Los bigotes se dibujan al valor más cercano que no excede 1.5 veces el IQR.

En otro análisis simultáneo, se compararon todos los genes mutados de nuestra serie con los mutados en la serie de MM y se obtuvo que, de los 14 135 genes mutados de MM, solamente el 4,4% (608) estaban compartidos por ambas series (Fig. 42B), mostrando además diferencias considerables en la recurrencia (Fig. 42C).

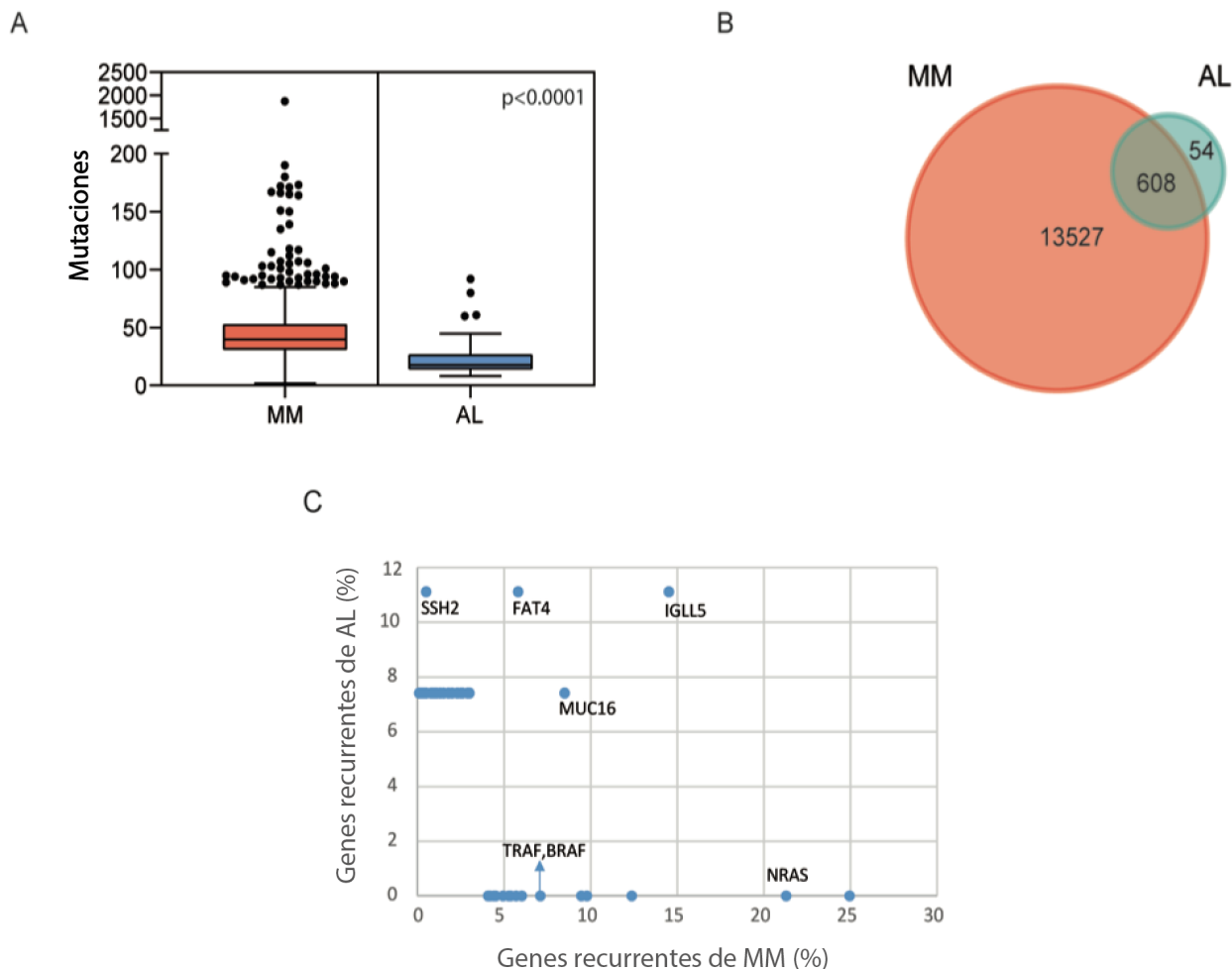


Figura 42. Panorama mutacional en amiloidosis AL y MM. A) Número de mutaciones en pacientes con amiloidosis AL y MM. B) Mutaciones compartidas y exclusivas entre MM y AL. C) Genes *drivers* basados en su recurrencia en amiloidosis AL y MM.

4.1.7. Correlación con las variables clínicas

Tras analizar mediante los estadísticos correspondientes en cada caso y correlacionar las características genómicas identificadas en amiloidosis AL y los principales hallazgos moleculares con las distintas variables clínicas, se encontraron las siguientes relaciones significativas, resumidas en las tablas 15, 16 y 17.

Tabla 15. Tabla con las asociaciones significativas entre las variables genómicas identificadas en amiloidosis AL y las variables clínicas. +: amplificación, Afect.: afectación, tto: tratamiento, chr: cromosoma, del: delación o pérdida de copia. NT-proBNP: fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B.

	Edad	Afectrenal	Afect. cardíaca	Afect. epitelial	NT-proBNP	Respuesta al tto	Progresión
IGHV3-48*	-	$p=0.025$	-	-	-	-	-
+1q vs. 1q*	-	$p=0.038$	-	-	-	-	-
Del13 vs. 13*	-	-	$p=0,049$	-	$p=0,022$	-	-
+7 vs. 7	-	-	-	$p=0,03$	-	$p=0,008$	-
+9 vs. 9	-	-	-	-	-	$p=0,02$	$p=0,03$
Nº mutaciones*	$R=0.4$ $p=0.03$	-	-	-	-	-	-

Tabla 16. Tabla de contingencia que muestra los pacientes con el reordenamiento IGHV3-48 y daño renal. χ^2 de Pearson= 5.057, $p= 0.025$. Test de Fisher= 0.041

		Presencia del reordenamiento o IGHV3-48		Total
		-	+	
Daño renal	-	14 (61%)	0 (0%)	14
	+	9 (39%)	4 (100%)	13
Total		23	4	27

Tabla 17. Tabla de contingencia que muestra el número de pacientes que presentaron ganancias de copia 1q y daño cardíaco. χ^2 de Pearson= 4.295, $p= 0.038$. Test de Fisher's=0.063.

		1q+		Total
		-	+	
Daño cardíaco	-	10 (67%)	1 (17%)	11
	+	5 (33%)	5 (83%)	10
Total		15	6	21

Por otro lado, también se encontró una asociación significativa entre la pérdida de copia en el 13q o monosomía del cromosoma 13 y altos niveles de NT-proBNP (Fig. 43). Además, curiosamente, la carga mutacional (número de mutaciones) se correlacionó significativamente con la edad de los pacientes ($R = 0,51$, $p < 0,001$) (Fig. 44).

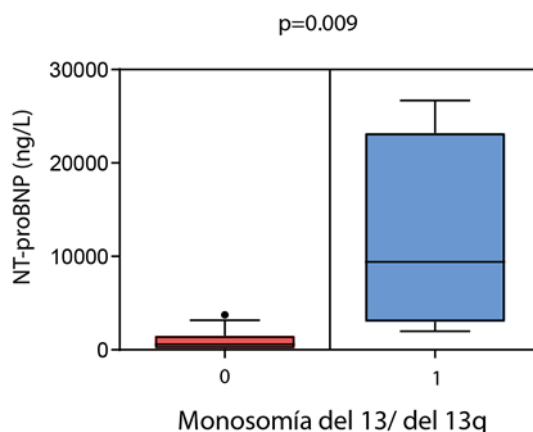


Figura 43. Diagrama de cajas y bigotes que muestra que la delección del cromosoma 13q estaba asociado con mayores niveles de NT-proBNP. Las cajas muestran el rango intercuartil (IQR) desde el primer cuartil hasta el tercero y la línea del medio representa las medianas. Los barras de error se dibujan respecto al valor más cercano sin exceder 1.5 veces el IQR. 0: Sin pérdida de copia o monosomía del cromosoma 13; 1: pérdida de copia o monosomía del cromosoma 13.

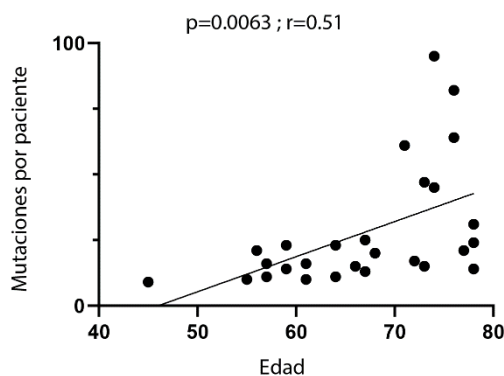


Figura 44. Gráfico de dispersión que representa la correlación entre el n° de mutaciones y la edad de los pacientes con amiloidosis AL.

El resto de características genómicas y variables clínicas no alcanzaron el grado de significancia al realizar los distintos test estadísticos.

4.1.8. Análisis de la supervivencia libre de progresión.

En este estudio se evaluó la supervivencia libre de progresión (SLP) con los hallazgos genéticos mas importantes como, los genes recurrentes y rutas metabólicas mas

representadas y no se detectó ningún impacto significativo en la SLP. Sin embargo, al estudiar el impacto de las variaciones en el número de copias, se identificó que, en los pacientes con amiloidosis AL, la presencia de ganancias en el número de copias en los cromosomas 9 y 19 estaban asociados con una menor SLP ($p=0,010$ y $0,046$, respectivamente) (Fig. 45).

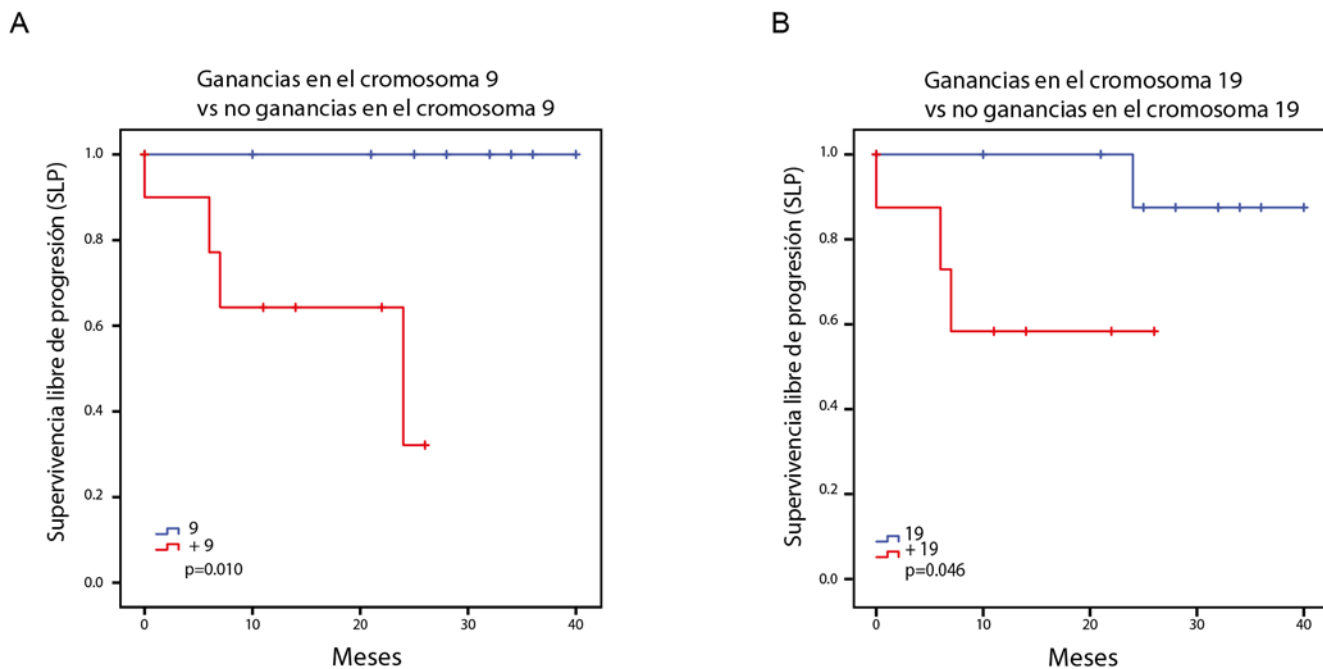


Figura 45. Supervivencia libre de progresión de los pacientes con amiloidosis AL. A) Ganancias en el cromosoma 9 vs pacientes sin ganancias en el cromosoma 9. B) Ganancias en el cromosoma 19 vs otros pacientes.

4.2. Resultados de la validación del panel de NGS para el diagnóstico molecular del MM.

4.2.1. Resultados de validación de la versión 1.

4.2.1.2. Datos de secuenciación.

La calidad del proceso de secuenciación se determinó teniendo en cuenta una serie de parámetros tales como la calidad de secuenciación, la cobertura *on target*, la profundidad, los duplicados PCR y la *callability*, que hace referencia al porcentaje de las regiones del panel que están cubiertas con una determinada profundidad de lectura. Estos parámetros se encuentran detallados en la tabla 18.

La calidad de secuenciación estuvo por encima del Q30 en el 89% de las muestras, la profundidad de cobertura media fue de 407x teniendo el 94,8% de las regiones que cubre el panel al menos 10 lecturas. El tamaño medio del inserto fue de 231,35 pares de bases.

Tabla 18. Parámetros técnicos de secuenciación de las 4 muestras secuenciadas.

	% lecturas duplicadas	% lecturas mapeadas	Media del tamaño del inserto	% on-target	Cobertura media	Callability DP100
M1	21,7	99,8	239,0	29,3	383,1	96,42 %
M2	22,8	99,8	222,0	32,1	419,0	96,16 %
M3	26,2	99,7	221,0	31,8	379,2	89,68 %
M4	26,6	99,7	241,0	34,3	424,0	95,98 %
Media	25,19	99,76	231,25	32,4	406,8	94,77 %
Mediana	26,2	99,8	234,0	32,1	419,0	95,98 %

Validación de las mutaciones y alteraciones citogenéticas

Una vez identificadas las variantes y las alteraciones citogenéticas mediante nuestro panel de MM, se compararon estos resultados con los resultados de las variantes obtenidos del panel M3P y los resultados de la citogenética obtenidos mediante FISH ya que el panel M3P solo está diseñado para la detección de SNVs e indels. Como se puede observar en la tabla 19, se detectaron todas las mutaciones y traslocaciones patológicas que se había encontrado anteriormente, excepto una t(4,14), que había sido detectada mediante FISH y no por NGS.

Tabla 19. Comparativa de mutaciones y alteraciones citogenéticas entre el panel de diseño propio, el panel M3P y datos de citogenética obtenidos mediante FISH.

	Incluido en panel propio	Panel M3P	Gen	Región	Panel propio	M3P
M1	SI	SI	NRAS	EXON	D	D
	SI	SI	TP53	EXON	D	ND
CITOGÉNÉTICA POR FISH: t(11;14), t(14;16) y del _{RB}					D	NA
M2	NO	SI	IDH2	UTR_3	ND	D
	SI	NO	ATR	EXON	D	ND
	SI	SI	NRAS	EXON	D	D
	SI	NO	HIST1H1E	EXON	D	ND
	SI	SI	FGFR3	EXON	D	D
	SI	NO	BCL7A	EXON	D	ND
CITOGÉNÉTICA POR FISH: del _{TP53}					D	NA
M3	NO	SI	NR3C1	EXON	ND	D
	NO	SI	MYC	UTR_5	ND	D
	SI	NO	ZFH4	EXON	D	ND
	SI	NO	BCL7A	EXON_DONOR	D	ND

	Incluido en panel propio	Panel M3P	Gen	Región	Panel propio	M3P
	SI	SI	RB1	EXON	D	D
	SI	SI	TP53	EXON_ACCEPTOR	D	D
	SI	SI	ATM	INTRON	D	D
	SI	SI	TRAF3	INTRON	D	ND
CITOGENÉTICA POR FISH: del_ <i>TP53</i> , del_ <i>RB</i> , t(4,14)					ND t(4;14)	NA
M4	SI	SI	ATM	EXON	D	D
	SI	SI	TP53	EXON	D	D
	SI	SI	FGR3	INTRON	D	ND
	SI	SI	RB1	INTRON	D	ND
	SI	NO	TRAF3	INTRON	D	ND
	NO	SI	TNFRSF 21	EXON	ND	D
	NO	SI	SP140	SPLICE_REGION	ND	D
CITOGENÉTICA POR FISH: del_ <i>RB</i> , t(11,14), 1q+					D	NA

Los CNVs y los reordenamientos VDJ no se pudieron identificar dada la falta de controles negativos para poder crear una línea base y poder normalizar los resultados.

4.2.2. Resultados de validación de la versión 2

4.2.2.1. Datos de secuenciación.

La secuenciación de estas 32 muestras, 22 muestras de CP de MM y 10 muestras de controles sanos, fue de alta calidad con una alta homogeneidad en el número de lecturas entre las muestras y la densidad de *clusters* fue la máxima alcanzable (220 K/mm²), el % de lecturas que superaron el Q30 fue del 88%.

Se obtuvo una media 30 millones de lecturas por muestra, la cobertura media de todas las muestras fue de 1269,5x, el porcentaje medio de lecturas *on-target* fue 41,8% y el porcentaje medio de los duplicados de PCR fue inusualmente alto, 74,4%.

En cuanto al tamaño medio del inserto, fue de 226,4 pares de bases, similar a los resultados de la versión anterior. Estos resultados se encuentran en el anexo 2.

4.2.2.2. Validación de las alteraciones citogenéticas y genes mutados.

Para la validación de las muestras se utilizaron los resultados obtenidos mediante FISH y el panel. En las tablas 20 A y B se muestran las alteraciones citogenéticas y el cariotipo de las muestras comparado con los resultados del panel de NGS.

A.

ID	FISH_Del_TP53	NGS_del_TP53	FISH_1p-	NGS_1p-	FISH_1q+	NGS_1q+	FISH_IGH/FGFR3 t(4;14)	NGS_IGH/FGFR3 t(4;14)	FISH_IGH/MAF t(14;16)	NGS_IGH/MAF t(14;16)	FISH_t(11;14)	NGS_t(11;14)	FISH_TxIGH	NGS_TxIGH	FISH_del_RB	NGS_del_RB	FISH_IGH-CCND3 t(6;14)	NGS_IGH-CCND3 t(6;14)	Clonoti-pos	Panel_Clonotipos	FISH_Pérdida_IGH	NGS_Pérdida_IGH
M1	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	IGHV3-15*01, IGHD2-15*01,IGHJ4*02	D	ND	ND
M2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D	D	D	ND	ND	NA	2	ND	ND
M3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	NA	5	D	D
M4	D	D	ND	ND	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	NA	3	ND	ND
M5	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND
M6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	NA	1	ND	ND
M7	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	NA	1	ND	ND
M9	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	NA	3	ND	ND
M10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	NA	3	ND	ND
M11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D t(2;4)	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	D
M12	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND
M13	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	D	D
M14	D	ND	ND	ND	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	1	D	D
M15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	D
M16	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND
M17	D	D	ND	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	1	ND	ND
M18	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	1	D	D
M19	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	1	ND	D
M20	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	1	ND	ND
M21	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND
M22	D	D	ND	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	2	ND	ND

B.

Muestra	CARIOTIPO	NGS_CNV
M1	54,XY,del(1p),t(3;4),+3,der(?)t(?)4),+5,+7,+9,+11,+15,+15,-17,+19,19	t(3;4): D +3: D,der(?)t(?)4): ?, +5: D, +7: D, +9: No D, +11: No D, +15: D,-17: D,+19 D
M2	NA	+9,+11,-11,-13
M3	ND	+1,-1,-13,-14,-16,-4,+5,-9,+9
M4	ND	+3,+4,+5,+6,+7,+10,+11,- 13,-14,+17,+19
M5	57,XY,+5,+6,+9,-16,-18,+21,+22,+8mar[14]/46,XY[36]	D todo menos la amplificación en el 22
M6	46,XY[30]	-1,-14,-20
M7	46,XY[30]	-4,-8,+9,+14,-17
M8	51,XY,del(2)(p13),+4,+5,- 8,+9,+add(11)(p15),der(14)t(11;14)(q13;q32),+15,+19[4]/ 46,XY[26]	-1,-2,+3,+5,+9,+11,+15,+19 (+4 y -8, no)
M9	46,XY[30]	-4,+11,-13,-16
M10	46,XX[30]	+3,-4,+5,+7,+9,+11,+15,-16
M11	46,XX,del(2)(q24),der(11)(q?),der(14)t(11;14)(q13;q32)[19]/ 46,XX[31]	-4,+9
M12	74~78<3n>,XX,- X,del(1)(q31)x2,i(1)(q10),+i(1)(q10),add(2)(p25),der(4)(p?q?)x2,+5,+7,- 8,add(8)(q24)x2,del(9)(p21),-10,+11,-12,- 13,+14,add(14)(q32),+15,del(16)(q23),der(17)t(1:17)(q21;q13)x2,- 18,add(19)(q13),+add(19)(q13),+20,+ 6~10 mar[50]	+1,-1,-2,-3,+4,+5,+6,+7,-8,- 10,+11,+12,-12,- 13,+15,+16,+17,-19,-21, -X
M13	46,XX[30]	+1, -13,-14,-16,+4,-X,+2,- 6,+9
M14		+1,-13,-14,+18,-7,+7,+8,- 22,-X
M15	44,X,-Y[24]/46,XY[6]	+11,-13,-14
M16	ND	-1,+4,-13,-14,-16,-18,+X
M17	45,XX,del(11)(p11),dic(1;12)(q32;p13),-13,add(14)(q32),-15,-16,- 16,+4mar[13]/ 44,XX,del(4)(q31),dic(1;12)(q32;p13),del(11)(p11),- 13,add(14)(q32),-16,-16,-18,+3mar[13]/ 88<4n>,XXXX,idemx2[5]/46,XX[19]	+1,-1,+3,-4,+6,-6,-9,-10,-12,- 13,-16,-17,-21,-22
M18	46,XY[50]	+1,+3,+6,+8,+9,+11,- 14,+15,-16,+17
M19	51,XY,+3,del(6)(q22),- 13,del(22)(q11.2),+del(22)(q11.2),+3mar[8]/46,XY[42]	-1,+3,+5,-8,+9,-11,-13,- 14,+15,+19,+21,-22
M20		-1,-4,+5,-6,-8,+9,+11,- 13,+15,+18,+X
M21		+1,-1,-4,-6,+9,-12,-13,-14 (MAX),-17,-19,+X
M22		-1,+1,-6,-12,-13,-14(MAX),- 17,-19,-20,+X

Tabla 20. Comparativa de los resultados de la comparativa entre las alteraciones citogenética (A) y cariotipo (B) detectadas mediante FISH frente a las detectadas mediante el panel de NGS. +/- → Amplificación/delección de alguna región del cromosoma. D, detectado, NO, no detectado, NA, no analizado

Se detectaron el 75,6% de las traslocaciones y alteraciones en el número de copias que habían sido detectadas previamente por FISH, excepto dos deleciones en el gen *TP53*, dos amplificaciones 1q+, dos t(4,14), una t(14,16) y una t(11,14). Es interesante destacar que además se detectaron otras alteraciones importantes que no habían sido detectadas por FISH como deleciones en *RB* en 6 muestras (27,3% de los pacientes) y amplificaciones del gen *CCND1* en el cromosoma 11 (3 muestras, 13,6%), una deleción en *TP53*, pérdida de copia en el cromosoma 1p en 4 muestras (18,2%) y 3 (13,6%) pérdidas de *IGH*. También se identificaron algunas alteraciones que no se pueden detectar mediante FISH pero que se consideran importantes como, amplificaciones en el gen *BRAF* (cromosoma 7), en el gen *ZFHX4* (cromosoma 8), pérdida de copias en el cromosoma 13, amplificación del cromosoma 3 (*CRBN/ATRIP/ATM*), y deleciones en el gen *KRAS* en el cromosoma 12, amplificación del gen *EGR1* en el cromosoma 5.

A nivel mutacional, se detectó un total de 86 variantes somáticas y el 100% de los pacientes presentaron al menos una mutación en alguno de los genes que estaban incluidos en el panel.

4.2.3. Panorama mutacional, CNV y traslocaciones en muestras del ensayo clínico GEM12

4.2.3.1. Datos de secuenciación.

Los resultados de secuenciación de estas 88 muestras secuenciadas con la versión 2 del panel estuvieron dentro de los valores esperados respecto a las secuenciaciones de muestras anteriores. También se incluyeron 8 muestras de pacientes sanos como control.

Se obtuvo una media de 3,4 millones de lecturas por muestra, un 45% de duplicados de PCR y la cobertura media *on-target* fue del 44%. La cobertura media que se obtuvo fue de 609x, teniendo el 93% de las regiones al menos cubiertas con 200 lecturas. El tamaño medio del inserto fue de 208 pares de bases.

4.2.3.2. Estudio de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo.

En la siguiente tabla 21 se representan los valores de sensibilidad y especificidad del panel a partir de estas últimas 88 muestras secuenciadas tras comparar los datos obtenidos mediante la técnica *gold standard* FISH con los datos obtenidos mediante NGS. Como se puede apreciar el panel discrimina muy bien ($E=0,91$), pero la sensibilidad es baja (0,55).

Tabla 21. Valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) de las alteraciones mas importantes identificadas mediante NGS.

	FISH+/NGS+ (VP)	FISH+/NGS- (FN)	FISH-/NGS+ (FP)	FISH-/NGS- (VN)	S	E
1p	5	10	10	51	0,33	0,84
1q	19	15	2	37	0,56	0,95
17p	5	5	9	61	0,50	0,87
t(11,14)	5	2	0	2	0,71	1,00
t(4,14)	11	3	1	42	0,79	0,98
t(14,16)	1	3	0	38	0,25	1,00
Total	46	38	22	231	0,55	0,91

4.2.3.3. Resultados reanalizados con 16 controles nuevos.

Tras secuenciar nuevas muestras como controles negativos y definir una nueva línea base para la llamada de los CNVs, algunas alteraciones que no se habían detectado por NGS pasaron a detectarse, como deleciones en 1p (3 muestras), 2 amplificaciones en 1q (2 muestras) y una trisomía en el gen TP53 también pasó a detectarse. Así como algunos falsos positivos pasaron a ser verdaderos negativos (5 muestras).

4.2.3.4. Validación de casos discordantes mediante *arrays*.

Los 5 casos cuyos resultados fueron discordantes entre lo detectado por FISH y NGS se analizaron mediante un *array* que combina la tecnología de *array* CGH por oligonucleótidos y de SNP *array*. En 3 de las 5 muestras se identificaron con el *array* los mismos CNVs detectados mediante NGS y en las mismas coordenadas. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en cada una de las muestras:

Muestra 1:

En esta muestra, se detectó una ganancia en el 1q mediante NGS, mientras que mediante FISH no se identificó esta alteración. Los resultados del *array* identificaron también esta alteración, entre otras:

Se detectó una deleción en las citobandas 1p31.1p21.2, en las coordenadas genómicas chr1:76172621_100904282. Una duplicación en las citobandas 1q21.1q44, (chr1:143730352_249224147). Una trisomía del cromosoma 3,7,9,15,18, 19 y del cromosoma X. Por otro lado, se detectó una región de pérdida de heterocigosidad en las

citobandas 1p32.1p21.2, en las coordenadas genómicas chr1:59538472_76154273. Con un tamaño de 16.62 megabases.

Muestra 2:

En este caso se detectó mediante NGS un falso positivo de una ganancia en el 1q ya que por *array* no se detectaron variaciones de cambio de número de copia de naturaleza no polimórfica.

Muestra 3:

Las discordancias que se encontraron en esta muestra fue una trisomía del cromosoma 17, que fue detectada por NGS y no por FISH. Mediante el *array* se detectaron trisomías en los cromosomas 5, 7, 9, 15, 17,18, y 19, y pérdida del material genómico del cromosoma Y en su totalidad, coordenadas genómicas chrY:140,328- 28,478,759. Todo ello también detectado por el panel de NGS.

Muestra 4:

En este caso mediante el panel no se pudo detectar una duplicación en el 1q ya que el número normalizado de lecturas no era consistente a lo largo de toda esta región. Por FISH si fue de detectada. Mediante el *array* Se detectó esta duplicación en las citobandas 1q21.1q43, coordenadas genómica chr1:142617943_242398623, esta CNV de 99.78 megabases, contiene 741 genes. Además, se detectaron trisomías en los cromosomas 3, 7, 9, 11 y 19. También se identificaron dos duplicaciones adicionales, una en las citobandas 15q11.1q13.1, con una señal de intensidad de la región que podría indicar que la alteración se encuentra en un estado de mosaico del 70%, aunque es importante señalar que el *array* CGH no es la técnica adecuada para valorar grados de mosaicismo, y otra en la citobanda 15q13.1q26.3 (chr15:29540262_101395091). Se detectó una delección en las regiones 16q11.2q24.3 (chr16:46500741_90148393), en la que la señal de intensidad de la región podría indicar que la alteración se encuentra en un estado de mosaico del 50%.

Por otro lado, se detectaron dos regiones de pérdida de heterocigosidad:

1. Citobandas 11q12.1q13.3, coordenadas genómicas chr11:57597065_70228123 (50.58megabases).
2. Citobandas 16q21q24.3, coordenadas genómicas chr16:60986009_89708096 (60.96 megabases). Un ejemplo representativo de las alteraciones de estas muestras se encuentra en la siguiente figura 46:

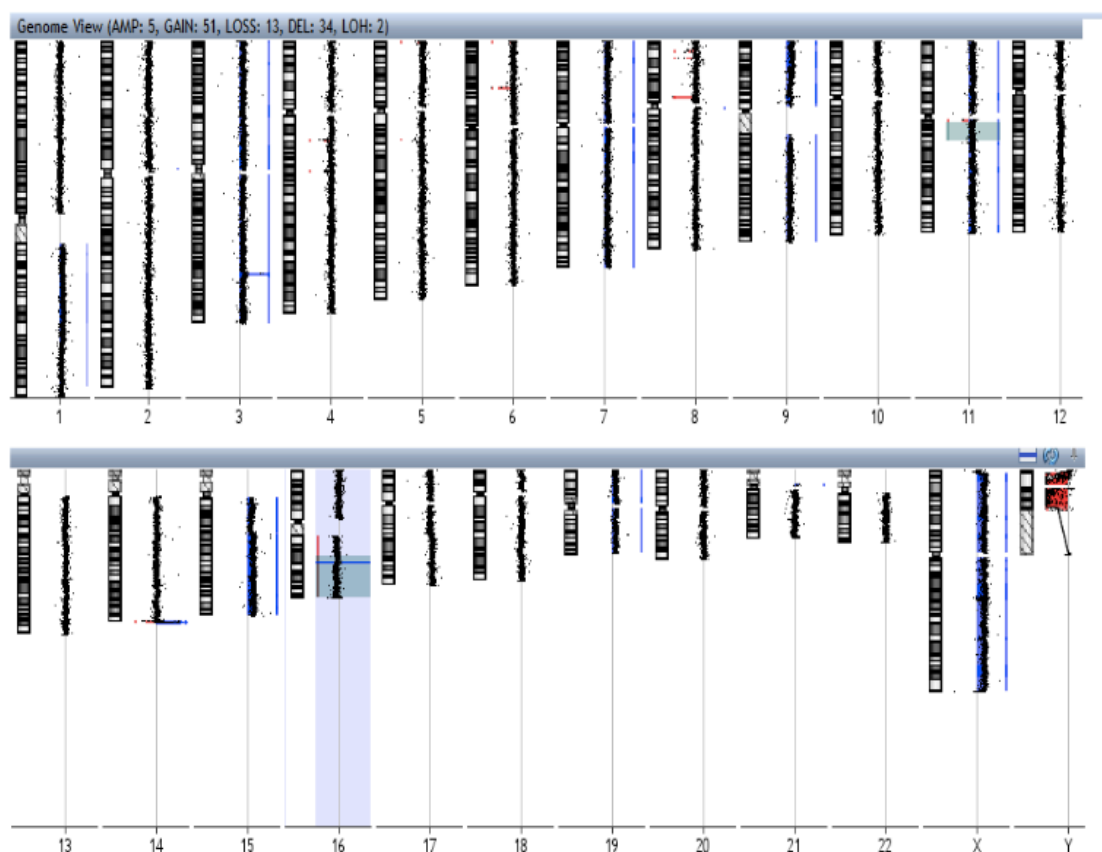


Figura 46. Imagen representativa del genoma de la muestra.

Muestra 5:

En esta muestra encontramos dos discordancias, mediante el panel de secuenciación masiva no se detectó ninguna alteración mientras que por FISH se detectó una deleción en el 1p y ganancias en el 1q. Como se observó mediante el panel de secuenciación masiva, por la técnica de *array* no se detectaron ninguna de estas alteraciones. Solamente se detectó una duplicación en la región 19q13.43, en las coordenadas genómicas chr19:58822611_58956397 donde se encuentran los genes ZSCAN22, A1BG, RPS5 y ZNF132, que no se detectó por secuenciación ya que en el cromosoma 19 no hay ninguna sonda en esta región, de modo que no es posible detectarlo.

Tras la mejora de la línea base con la secuenciación de los nuevos controles y la validación por *arrays* de estas muestras discordantes la sensibilidad y la especificidad mejoró, pasando de una sensibilidad global de 0,55 a 0,74 y una especificidad de 0,91 a 0,93.

La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del nuevo análisis se puede observar en la siguiente tabla 22:

Tabla 22. Resultados globales de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de las 88 muestras analizadas.

	GLOBAL (CNV +TX)			GLOBAL (CNV)			GLOBAL (TX)	
	(FISH) +	(FISH) -		(FISH) +	(FISH) -		(FISH) +	(FISH) -
(NGS) +	53	18	(NGS) +	36	17	(NGS) +	17	1
(NGS) -	19	245	(NGS) -	12	162	(NGS) -	7	83
	S	E		S	E		S	E
	0.74	0.93		0.75	0.91		0.71	0.99
	VVP	VPN		VVP	VPN		VVP	VPN
	0.75	0.93		0.68	0.93		0.94	0.92

4.2.3.5. Descripción de las mutaciones, CNVs y traslocaciones en MM.

Con este panel se detectaron 50 mutaciones no sinónimas en regiones exónicas en el 47% de los pacientes (41/88). La frecuencia de los genes mutados con más recurrencia en nuestra serie fueron *KRAS*, en un 15% de los pacientes, , *NRAS* (9%), *BRAF* (6%), *TP53* (10%), *FGFR3* (3%), *HIST1H1E* (2%) y *DIS3* (1%) como se puede observar en la siguiente figura 47:

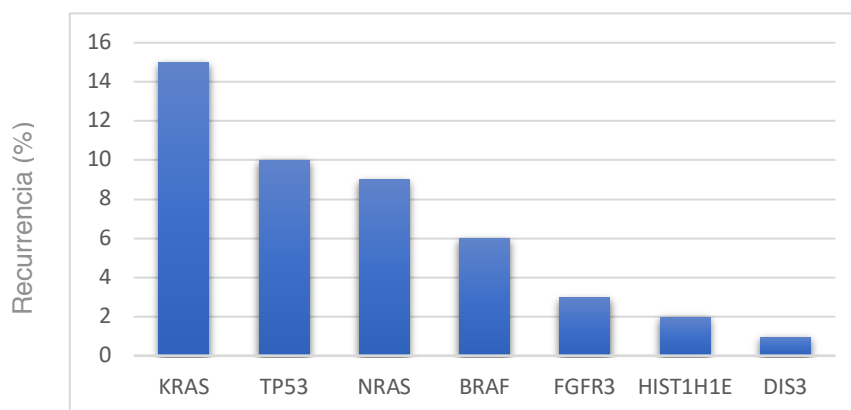


Figura 47. Frecuencia de los genes con mayor recurrencia identificados en los pacientes de MM.

En cuanto a los CNVs, se detectaron amplificaciones en 1q en el 32% de los pacientes y deleciones en 1p y 17p en el 17% y el 13% de los pacientes respectivamente (Fig. 48). También se identificaron amplificaciones de los genes *ATR* y *CRBN*, en un 22% y un 16% de los pacientes, respectivamente.

Se detectaron traslocaciones en un 28% de los pacientes, incluyendo la t(11;14) en el 7% de los pacientes, la t(4;14) en un 14% de los pacientes y un paciente con la t(14;16).

También se identificó la t(6;14)(p21;q32) o gen de fusión *IGH-CCND3* en 3 pacientes. Otra translocación adicional identificada y que no había sido detectada por FISH fue la t(10,14), en un paciente.

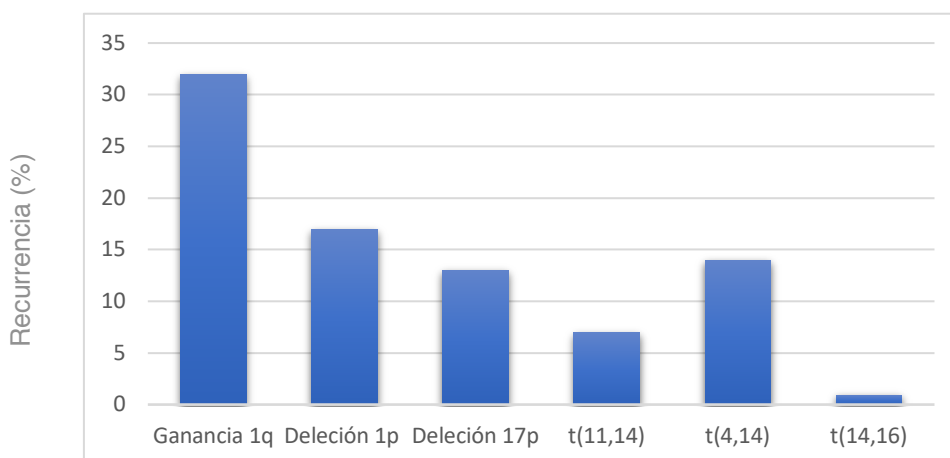


Figura 48. CNV y traslocaciones con mayor recurrencia en MM.

4.2.3.6. Análisis de la supervivencia e identificación de factores pronóstico.

En cuanto a la correlación con los datos clínicos, tras el análisis de la supervivencia libre de progresión (SLP) se observó que en la mayoría de los casos la NGS discrimina mejor o igual que el FISH a los grupos que tienen o no una alteración genómica o cromosómica.

En las siguientes gráficas (Fig. 49), se puede observar, respecto a la deleción en 1p, como la NGS discrimina mejor que la técnica de FISH, ya que en los grupos en los que no se detecta la deleción por NGS (gráfica A, en verde y azul) tienen mejor SLP. Además, utilizando los datos obtenidos por el panel de NGS, se separan significativamente en dos grupos de riesgo ($p=0,006$) (Fig.49c), mientras que por FISH no ($p=0,127$)(Fig.49b).

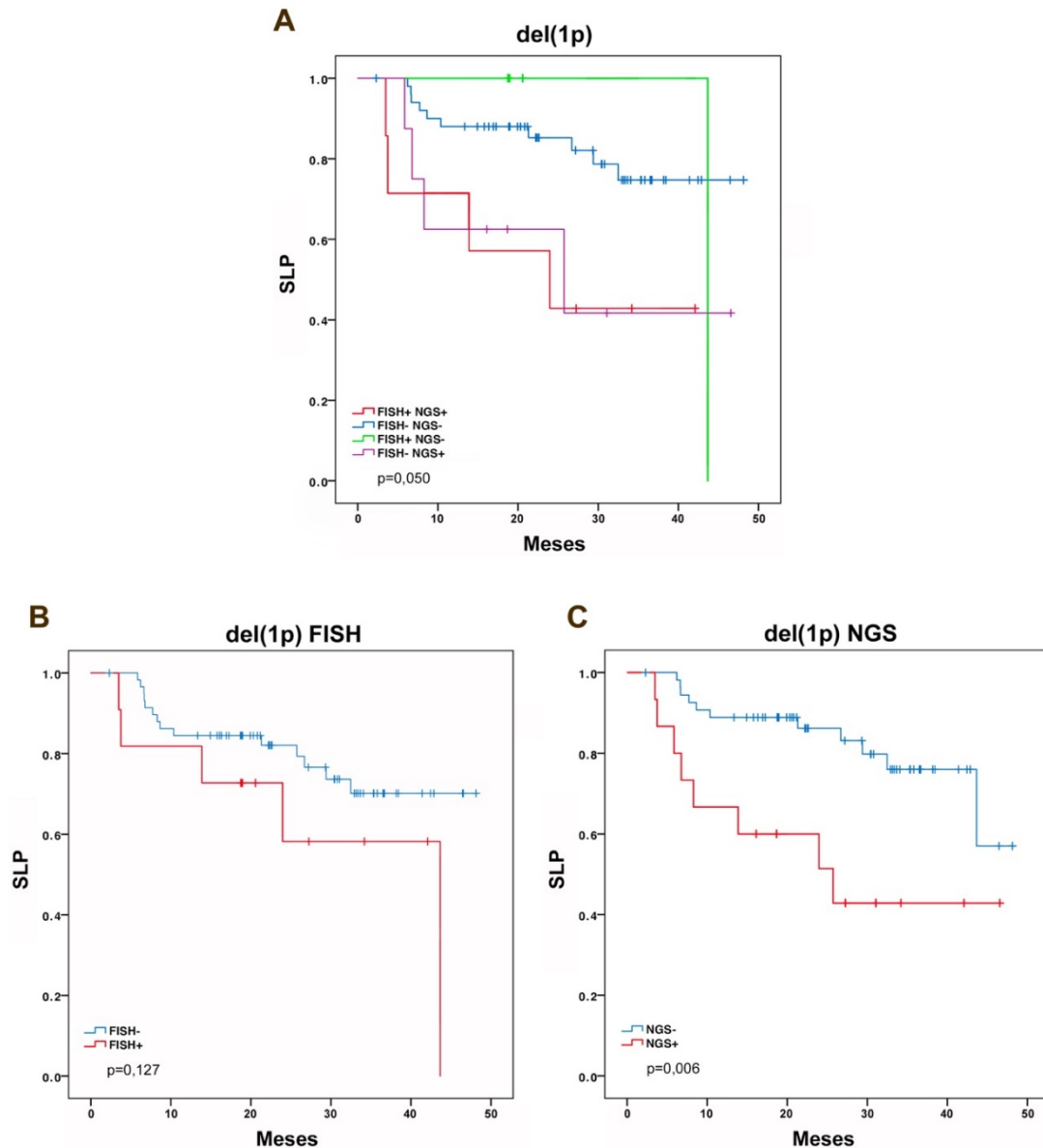


Figura 49. Estudio de la SLP para la deleción del 1p analizada en 88 muestras. A) Análisis de la SLP agrupando los pacientes en: falsos positivos (FISH- NGS+), falsos negativos (FISH+ NGS-), verdaderos negativos (FISH- NGS-) y verdaderos positivos (FISH+ NGS+). B) Estudio de la SLP con los resultados obtenidos mediante FISH. C) B) Estudio de la SLP con los resultados obtenidos mediante NGS.

En el caso de las amplificaciones en 1q, es llamativo que a pesar de ser una alteración con factor pronóstico ninguna de las dos técnicas discrimina significativamente a los pacientes en grupos pronóstico, como se puede observar en la figura 50.

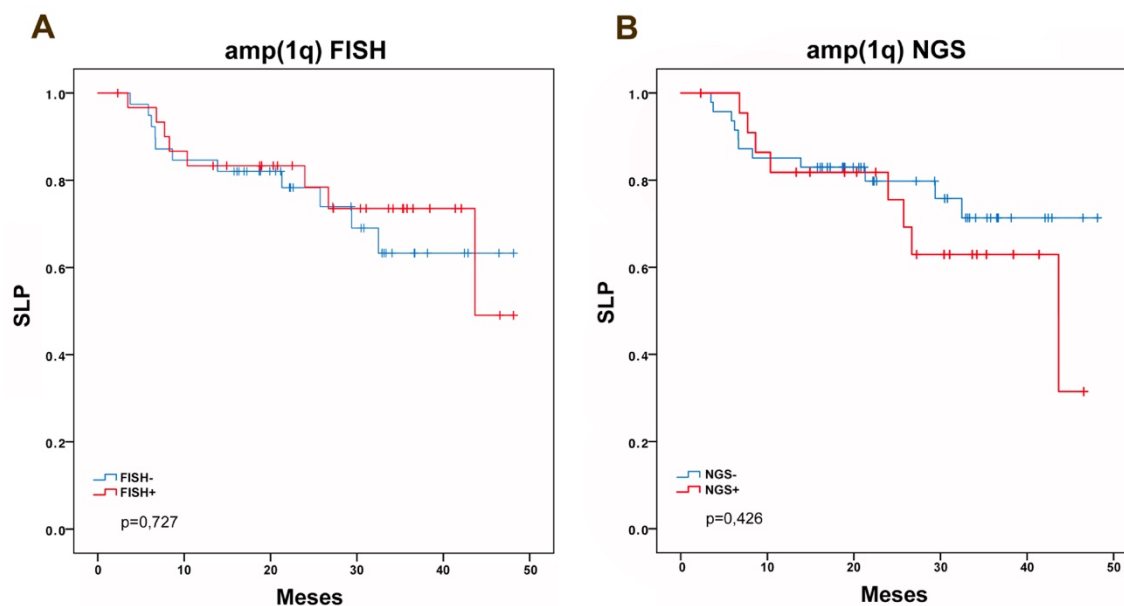


Figura 50. Estudio de la SLP para la amplificación del 1q analizada en 88 muestras mediante FISH (A) y mediante NGS (B).

Por otro lado, se observó que los pacientes con pérdida bialélica del gen *TP53*, tienen un gran descenso de la SLP ($P=0,028$) (Fig. 51).

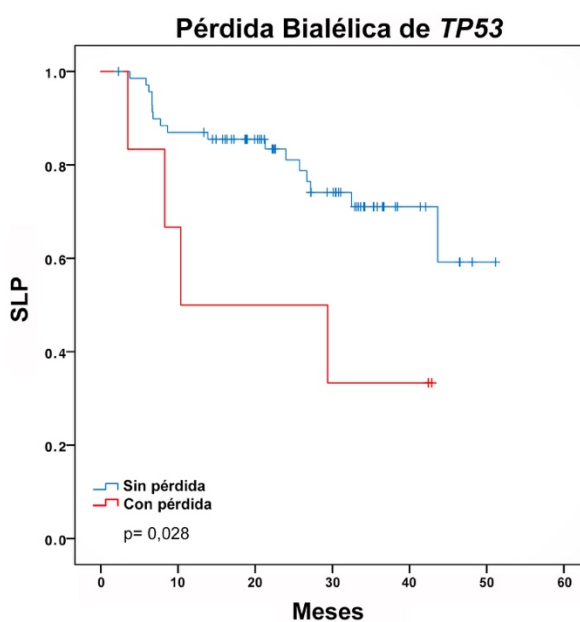


Figura 51. Estudio de la SLP para la pérdida bialélica de *TP53* analizada en 88 muestras mediante FISH (A) y mediante NGS (B).

Con las traslocaciones no se observó tanta diferencia entre ambas técnicas. En cuanto a la t(11;14) se obtuvo una significancia de $p=0,3$ tanto mediante FISH como por NGS. De forma similar ocurrió con la t(4;14), $p=0,03$ mediante FISH y $p=0,04$ por NGS. Respecto a la t(14;16) solamente hubo un caso, de manera que no se pudo realizar el test estadístico.

Además, al agrupar las alteraciones de mal pronóstico (17p, t(4;14) y t(14;16)) y analizar la SLP se observó que el panel de NGS también discrimina bien, aunque no de forma significativa ($p=0,064$), a los distintos grupos de riesgo (Fig.52).

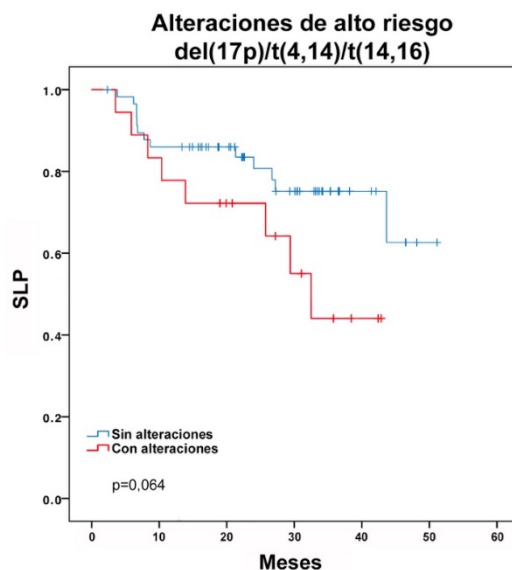


Figura 52. Estudio de la SLP para las alteraciones de alto riesgo analizada en 88 muestras de MM. Por otro lado, aunque por si sola la delección del(13q) no separaba significativamente los grupos (Fig. 53A), al estudiar la delección del 13q asociada a otros factores de mal pronóstico como la t(4;14), delección del 17p y la t(14;16), se observó una reducción significativa de la SLP ($p=0,002$)(Fig. 53B).

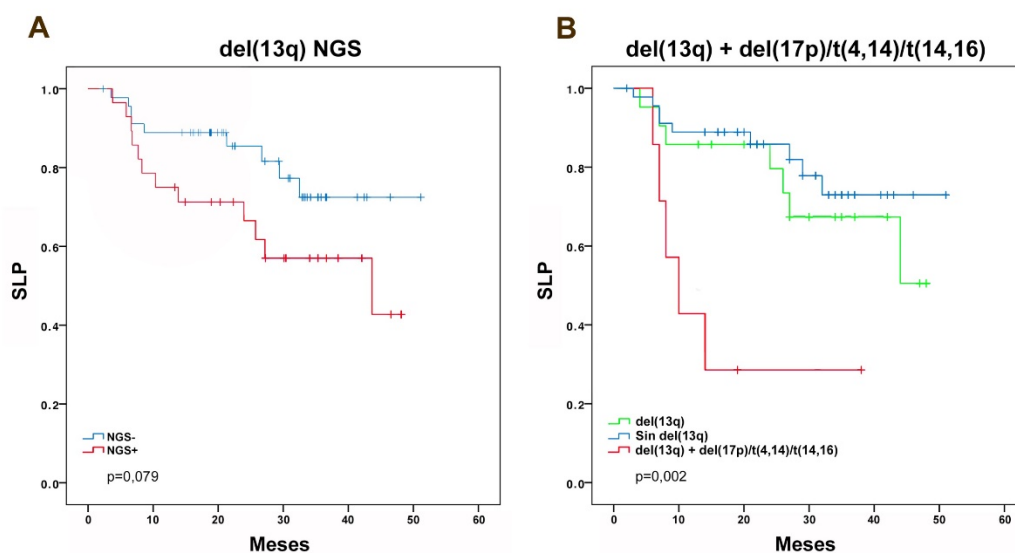


Figura 53. Estudio de la SLP en muestras con la delección del 13q detectada mediante NGS (A) y la delección del 13q junto las alteraciones de mal pronóstico como la t(4,14), delección del 17p y la t(14,16)(B).

4.3. Ensayos de dinámicas clonales.

4.3.1. Ensayos de competición clonal.

Para el estudio de las mutaciones implicadas en la proliferación y progresión del MM, en primer lugar se observó el efecto de las alteraciones mono- y bi-alélicas en el gen *TP53*. Cuando se enfrentaron las células con mutación mono-alélica y bi-alélica frente a sus respectivos WT, se obtuvieron los siguientes resultados (Fig.54).

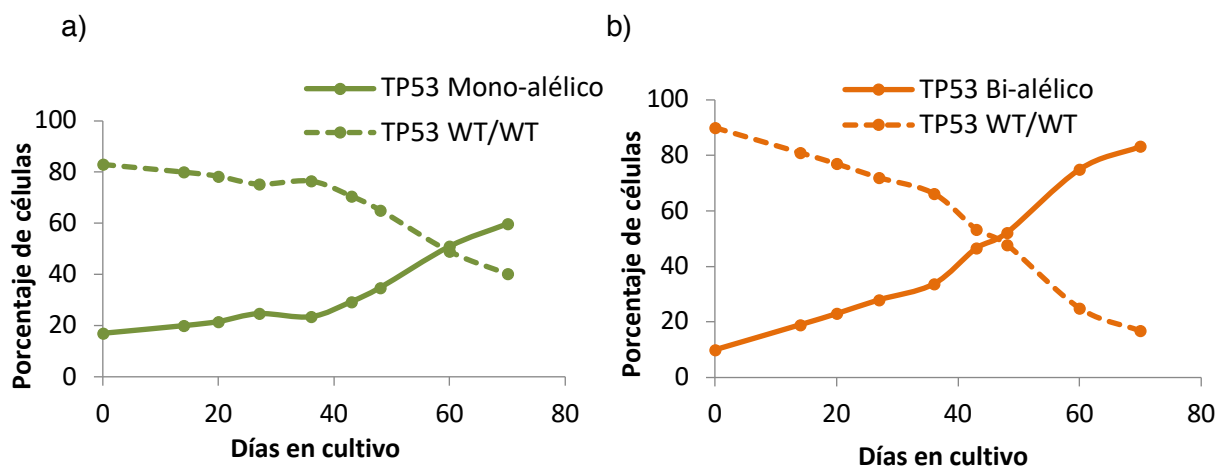


Figura 54. Caracterización de las alteraciones mono-alélicas (a) y bi-alélicas (b) de *TP53* frente a sus WT.

Se observa cómo aproximadamente en el día 60, las células con alteraciones mono-alélicas en el gen *TP53* superan en crecimiento a las células WT, mientras que las células con alteraciones bi-alélicas, sólo necesitan 48 días para conseguirlo. Esto indica que ambas alteraciones inducen una ventaja proliferativa en las células, pero una pérdida bi-alélica genera una mayor ventaja en las células mutadas.

Para comprobarlo, se combinaron células con alteración mono-alélica y bi-alélica en *TP53*, tal y como se muestra en la figura 55.

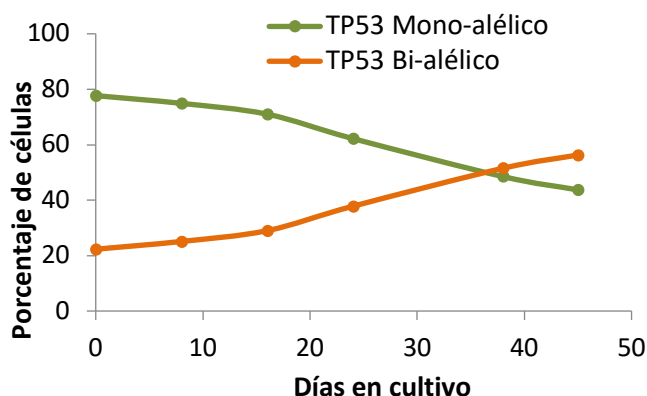


Figura 55. Ensayo de competición entre clones con pérdida mono- y bi-alélica de *TP53*.

Cuando ambos clones compiten, solamente transcurren 36 días hasta que el clon con pérdida bi-alélica supera al mono-alélico. Esto demuestra que una pérdida bi-alélica de *TP53* confiere una mayor ventaja de crecimiento a las células.

Del mismo modo, se comprobó la dinámica en células con *KRAS* mutado (G12A o A146T vs. WT), como se muestra en la figura 56.

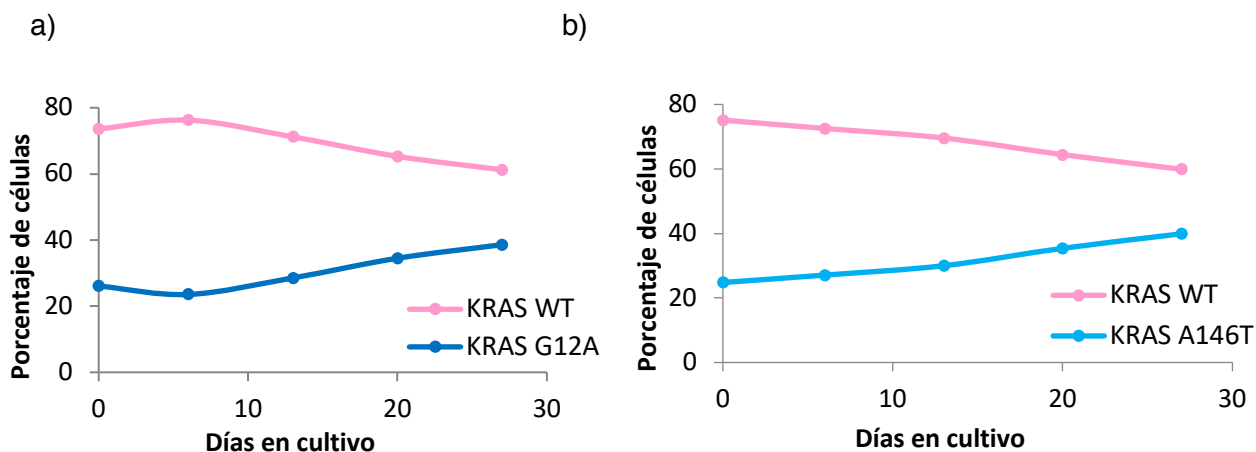


Figura 56. Competición clonal de las mutaciones de *KRAS* en G12A (a) y A146T (b) frente a sus WT.

Como se puede observar, tanto la mutación G12A en *KRAS* como la A146T proporcionaron una ventaja en el crecimiento de las células mutadas con respecto a las células no mutadas (WT), aunque su efecto no es tan importante o rápido como en el gen *TP53*.

Después, se caracterizaron los efectos de las mutaciones de resistencia y la exposición a los fármacos. Para ello, y en primer lugar, se realizaron ensayos de viabilidad celular con el fin de comprobar la resistencia de las células con las mutaciones A152T en el gen *IKZF1* (Fig. 57a). y A20T en el gen *PSMB5* (Fig. 57b) en presencia de lenalidomida (LEN) y bortezomib (BOR) respectivamente.

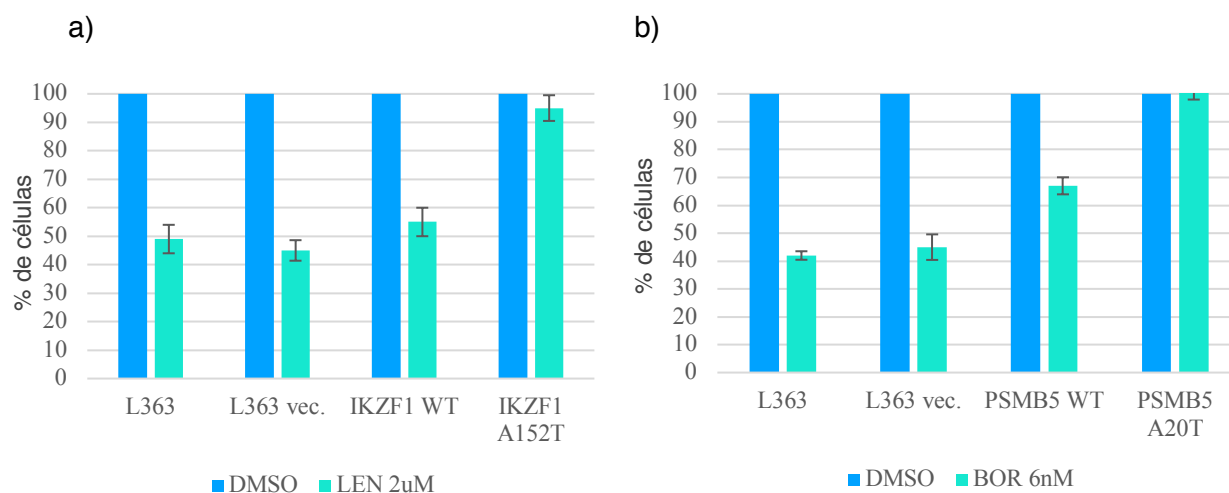


Figura 57. Ensayos de viabilidad celular de las líneas L363 con *IKZF1*(a) y *PSMB5* (b) mutados.

Se observó que las líneas celulares que tienen mutaciones en ambos genes presentan una viabilidad celular en presencia del fármaco prácticamente idéntica a la que presentan en medio DMSO. Por el contrario, las líneas celulares no mutadas, presentan una viabilidad menor en presencia del fármaco, lo que confirma que la adquisición de resistencia es mediada por estas mutaciones.

A continuación, se estudió el comportamiento de células con la mutación A152T en el gen *IKZF1* frente a células con *IKZF1* no mutado en presencia y ausencia del fármaco (Fig. 58).

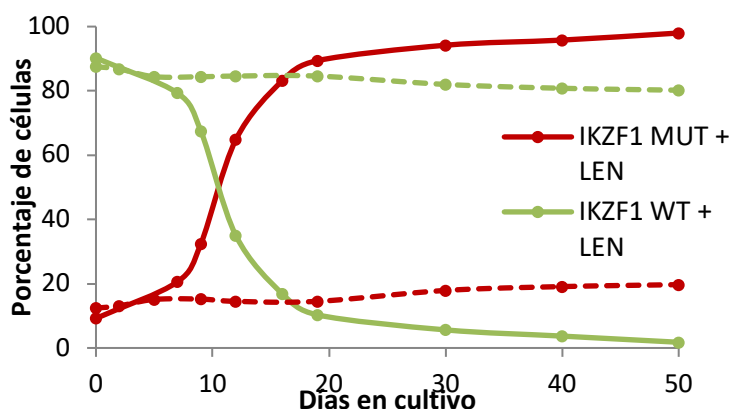


Figura 58. Ensayo de competición clonal entre *IKZF1* mutado y WT en presencia y ausencia de lenalidomida 2 uM.

En este ensayo se observó que las células con mutación en el gen *IKZF1* y células sin mutación respondieron de la misma manera en ausencia de fármaco, es decir, en estas condiciones, la mutación presenta un comportamiento neutral. Sin embargo, en presencia

de lenalidomida, la mutación en el gen *IKZF1* confirió una ventaja de supervivencia a las células, de modo que los porcentajes se revertieron en aproximadamente 10 días.

Por último, se estudió la combinación de las mutaciones *IKZF1*-A152T y *PSMB5*-A20T en diferentes condiciones:

- En ausencia de fármacos se observa una desventaja proliferativa en las células que tienen una mutación en *PSMB5*, haciendo que las células con mutaciones en *IKZF1*, que presenta un comportamiento neutral cuando se cultivan solas, adquirieran una ventaja de supervivencia en el cocultivo (Fig.59).

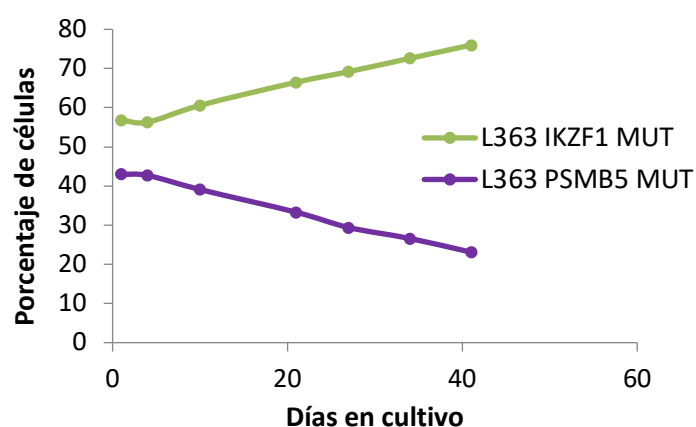


Figura 59. Ensayo de competición clonal entre líneas L363 *PSMB5* e *IKZF1* mutado en ausencia de fármaco.

- En presencia de lenalidomida se observa una ventaja de crecimiento en las células que tienen el gen *IKZF1* mutado, mientras que en las células con el gen *PSMB5* mutado, se observó una clara desventaja proliferativa (Fig.60).

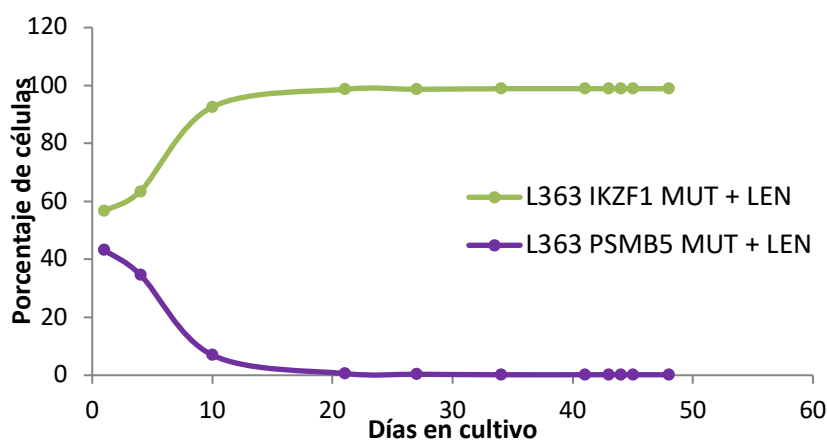


Figura 60. Ensayo de competición clonal entre líneas celulares L363 con mutaciones en los genes *PSMB5* e *IKZF1* en presencia de lenalidomida (LEN).

- Con el objetivo de ver la dinámica clonal que siguen las células con mutación en *PSMB5*, se adicionó a la combinación anterior bortezomib (BOR) 6 nM a partir del día 41, obteniendo los datos representados en la figura 61.

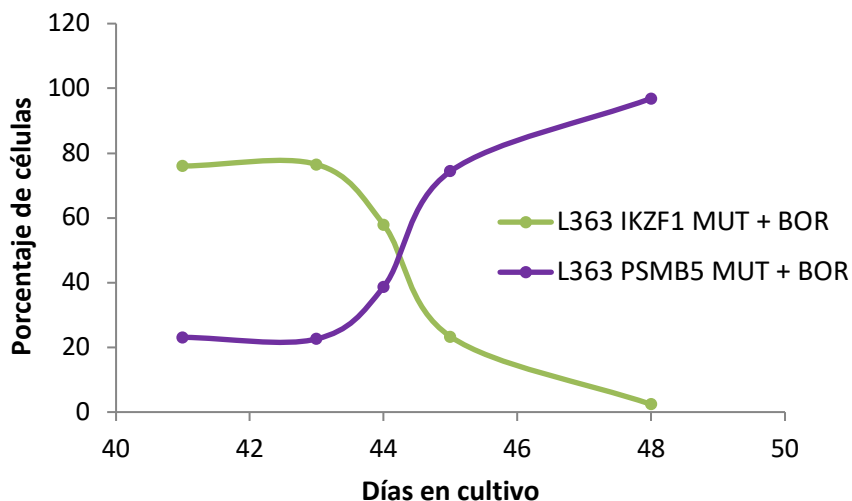


Figura 61. Ensayo de competición clonal entre líneas celulares L363 con mutaciones en *PSMB5* e *IKZF1* en presencia de bortezomib (BOR).

Cuando se añadió bortezomib al medio, se observó como la mutación en *PSMB5* indujo una ventaja proliferativa en las células afectadas, haciendo que sobrepasaran a las células *IKZF1* mutadas en apenas 3 días de tratamiento.

5. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización inmunogenética de las células plasmáticas clonales de la amiloidosis de cadenas ligeras.

La realización de este estudio proporciona uno de los primeros trabajos de secuenciación masiva de exomas en la mayor serie de pacientes con amiloidosis AL mejor caracterizada. Esto es debido a que todas las muestras fueron caracterizadas en base a su inmunofenotipo de CP patológicas mediante citometría de flujo de 8 colores.¹⁸⁵

En cuanto a la parte técnica, como se realizaron tres librerías distintas a partir de la muestras tumoral se pudieron descartar con una gran fiabilidad tanto los falsos positivos como los posibles artefactos de secuenciación. Así como validar las variantes candidatas. Además, el análisis de una muestra control (linfocitos T de sangre periférica) de cada uno de los pacientes permitió descartar mutaciones de la línea germinal. Las muestras para la realización de exomas se secuenciaron en la plataforma Illumina, en la que la asignación de bases está hecha directamente de las medidas de intensidad de señal durante cada ciclo, lo cual reduce las tasas de error comparado con otras tecnologías.²⁰²

Además, se utilizaron dos softwares distintos para hacer la llamada de las variantes con el objetivo de incrementar la sensibilidad y la confianza en la detección de variantes reales, ya que por lo general existen diferencias en el diseño y flujo de trabajo de los distintos programas. De acuerdo con los datos publicados, se observó que el programa VarScan detectó mas SNVs e indels que el programa Strelka, el cual parece ser mas estricto y a la vez mas fiable al hacer la llamada de variantes.²⁰³

La mediana de prevalencia de mutaciones somáticas en esta serie fue de 1,7 (0,8-14,5) mutaciones por megabase, esta es ligeramente mayor que la tasa de mutación estimada en neoplasias hematopoyéticas, como el MM (1,3 mutaciones por megabase) y la LLC y otras leucemias (<1 mutación por megabase).²⁰⁰ Son diversos los factores que están asociados a un aumento de la tasa de mutaciones, como exposición a mutágenos exógenos (tabaco, químicos, aflatoxinas), errores en la reparación del ADN, distintos tipos celulares. Esta tasa también puede verse aumentada en varias enfermedades hereditarias raras, por ejemplo, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, y xeroderma pigmentoso, cada una de las cuales también se asocia con un mayor riesgo de cáncer.²⁰⁴ En el caso de la amiloidosis AL y teniendo en cuenta los resultados de las firmas mutacionales, los factores principales que podrían aumentar esta tasa son, la acumulación de mutaciones relacionadas con el envejecimiento (firma mutacional 1) y fallos en la maquinaria de

reparación de emparejamiento erróneos (MMR) (firma mutacional 6). La firma mutacional asociada al tabaco no se identificó en las muestras de nuestra serie.

En cuanto al perfil mutacional, por primera vez, en este estudio se han identificado un gran número mutaciones en regiones reguladoras UTR 3' y UTR 5'. Esto es muy interesante ya que estas regiones juegan un papel muy importante en la expresión y regulación de genes a nivel de la traducción, pudiendo formar parte de la patogenia de la enfermedad. Además, las alteraciones en regiones UTR'3 pueden afectar a la estabilidad del ARNm y su localización en la célula.²⁰⁵

En nuestra serie hemos encontrado mutaciones en regiones UTR'3 de genes como *SEMA5A* (Semaforina 5A) que codifica una proteína de membrana relacionada con el metabolismo de proteínas y la vía de señalización de ERK, relacionada con múltiples tipos de cáncer. Por otro lado, mutaciones en la región UTR'5 se han relacionado con la alteración en la síntesis de proteínas.²⁰⁵ En nuestra serie, los genes *CXCL3* (Ligando 3 de quimiocinas CXC), que juega un papel en la inflamación y se ha asociado a melanoma²⁰⁶, y *CAV1* (Caveolina 1), un gen supresor de tumores y regulador negativo de la cascada Ras-p42/44 MAPK²⁰⁷, se encontraron mutados en esta región en 2 de los pacientes (7,4%). Por lo tanto, este trabajo demuestra que las mutaciones en regiones reguladoras pueden tener un papel importante en la patogenia de la amiloidosis AL, así como de otras patologías. El estudio de estas regiones no suele estar incluido en los estudios de NGS por lo que es crucial profundizar en el conocimiento de estas alteraciones en futuros estudios.

Por otro lado, teniendo en cuenta tanto las mutaciones en regiones exónicas como en la regiones reguladoras, nuestros datos confirman, junto con otros dos estudios recientemente publicados, la ausencia de una mutación *driver* común en esta enfermedad.^{80,81} A pesar de ello si que se han encontrado genes moderadamente recurrentes entre los pacientes con amiloidosis AL como *MUC16* con un 26% (7 pacientes) de recurrencia e *IGLL5* y *SEMA5A*, ambos con un 19% (5 pacientes) de recurrencia y en el caso de *IGLL5* la recurrencia aumentaría al 41% de los pacientes si tenemos en cuenta la alteración por pérdida de copia.

En cuanto a *MUC16*, este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de las mucinas. A pesar de que solamente una de las mutaciones fue considerada patogénica mediante el predictor SIFT, el resto fueron de significado incierto (6 variantes) o benignas (3 variantes), este gen también podría estar alterado por la ganancia de copia ya que se encuentra en el cromosoma 19. En nuestra serie se encontró una trisomía de este gen en

el 42,9% de los casos. Estas proteínas tienen un peso molecular alto, y se encuentran en las superficies apicales de los epitelios. Esta barrera mucosa, como ocurre en los tumores de ovario,²⁰⁸ donde también se usa como marcador, podría ser un mecanismo eficaz para evadir el reconocimiento inmune en la amiloidosis AL.

El gen *SEMA5A*, como ya se ha comentado, está relacionado con la vía ERK y Akt. En otros tipos de cáncer, como el de páncreas, se ha visto que su sobreexpresión puede ser una potencial diana terapéutica para frenar la metástasis.²⁰⁹ Sin embargo, en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, la regulación negativa de *SEMA5A* en el tejido tumoral se asoció con una menor supervivencia.²¹⁰ Esto es debido a que esta molécula puede interactuar con diferentes receptores que activan vías divergentes de forma tejido-específica.²¹¹ Por lo tanto, se debería investigar el papel de este gen en la amiloidosis AL, ya que en estos momentos su significado es desconocido y todas las mutaciones identificadas están catalogadas como significado incierto.

En gen *IGLL5* ha sido el tercer gen mutado con mas frecuencia en nuestra serie, y además se han encontrado tanto alteraciones por mutaciones puntuales como por deleciones en el número de copia. En cuanto a los SNVs en *IGLL5*, la mutación p.L28L detectada en nuestras serie también ha sido descrita en MM, donde relacionan alteraciones en este gen como un posible marcador de pacientes de MM de alto riesgo.²¹² El resto de mutaciones, otra mutación sinónima y 3 mutaciones no sinónimas son variantes de significado incierto, seguramente debido a la poca evidencia de la función de este gen. La carga alélica media de estas mutaciones encontradas en nuestra serie estaba por encima del 45%, sugiriendo que se encuentran en clones mayoritarios de la enfermedad. Este gen es muy interesante en amiloidosis AL ya que es un gen que codifica uno de los polipéptidos de inmunoglobulina tipo lambda de las Igs. Se extiende al locus de la inmunoglobulina λ , pero no requiere un reordenamiento somático para su expresión.

De los 3 exones que forman este gen, el primero de ellos no está relacionado con genes variables de la Ig, el segundo y el tercero forman parte de la región de unión y constante de la Ig λ . El *splicing* alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción. En cuanto su función molecular se relaciona con unión a antígenos, y con diversos procesos biológicos como: vía de señalización del receptor de células B, activación de la vía clásica del complemento, defensa frente a bacterias, fagocitosis y regulación positiva en la activación de las células B. Respecto a su expresión según la base de datos HPA ²¹³ corrobora que se encuentra sobreexpresado en células B, MO y nodos linfáticos.

Además, en nuestra serie también se han identificado genes con mutaciones relacionados con *IGLL5* en otros 4 pacientes distintos, como *C7*, *NTF4*, *NGF*, *TFGBR1* y *IGHV3-11*. De modo que el porcentaje de pacientes relacionados con alteraciones en *IGLL5* y su contexto aumentaría al 56% de los pacientes.

Curiosamente, en un estudio de WES en LLC también se ha encontrado *IGLL5* como el gen mutado con mas frecuencia de toda la serie incluyendo mutaciones en la región UTR5'. En este estudio demuestran que en los casos con mutaciones en *IGLL5*, la expresión de este gen, medida por RNA-Seq, es menor y sugieren que posiblemente *IGLL5* participe en la actividad de la deaminasa de citosina inducida por activación, proceso que da lugar a las mutaciones somáticas que conducen a la LLC.²¹⁴ También, se ha encontrado alterado en linfoma difuso de células B grandes ²¹⁵

De tal modo que, aunque la caracterización funcional de esta proteína no se ha llevado a cabo en este trabajo, el hecho de que aparezca mutado en varias patologías de célula B indica que las mutaciones en *IGLL5* pueden ser de importancia biológica.

Sin embargo, como la mayoría de estudios no tiene en cuenta las mutaciones en regiones reguladoras, mutaciones sinónimas o mutaciones con frecuencias alélicas menores del 5%, este tipo de variantes se eliminaron del estudio para poder comparar nuestros datos con una serie de MM. Con este estudio se obtuvo una mediana de 18 mutaciones por muestra (8-92), sugiriendo que en términos de carga mutacional, que la amiloidosis AL está mas cerca de una GMSI (mediana de 19 mutaciones por muestra)²¹⁶ que del MM (mediana de 38, $p < 0,0001$), Fig. 42A. La carga mutacional también se correlacionó con la edad de los pacientes ($R = 0.51$, $p < 0.001$) aunque no con el porcentaje de infiltración de CP en la MO. Esta correlación de número de mutaciones y edad ya se ha visto en varios estudios en los que el envejecimiento está asociado con la acumulación generalizada de mutaciones somáticas en diversos tejidos. En uno de los estudios hubo una correlación entre el número de divisiones celulares en un tejido y la acumulación estimada de mutaciones, ²¹⁷ por lo tanto, la división celular parece ser una fuente importante de mutación endógena. Esto junto con el nivel de inestabilidad genómica de las células normales, modificado por factores endógenos y ambientales, es el principal factor de riesgo de cáncer.²¹⁷ En cambio, también existen tipos de canceres que no se correlacionan con la edad de los pacientes como sarcoma, melanoma uveal, adenocarcinoma de pulmón. Probablemente, esto sea debido al rango de edad bajo debido a los efectos del tabaquismo o simplemente a que existen tipos de tumores que son mas propensos a los fenotipos mutantes, en los que los

tumores acumulan rápidamente mutaciones somáticas debido, por ejemplo, a mutaciones en los genes de reparación del ADN.²¹⁸

Además, en el caso de la amiloidosis AL, esta acumulación asociada con la edad se confirma con lo identificado en el estudio de las firmas mutacionales, donde la firma mutacional 1, relacionada con procesos mutacionales asociados a la edad, fue detectada en todos los pacientes de amiloidosis AL.

Por otro lado y al contrario de lo que ocurre en el caso de la carga mutacional, la presencia de CNVs fue más frecuente en la amiloidosis AL (90,5%) que en las GMSI (60,6%)²¹⁶ y similar a los pacientes de MM (100% de los casos)²¹⁹. También hay que destacar que las únicas alteraciones asociadas con la supervivencia libre de progresión inferior fueron las ganancias en los cromosomas 9 y 19. La del (13q) se asoció con niveles más altos de NT-proBNP apoyando lo descrito por otros autores⁷⁵. Además, los pacientes con 1q+ también mostraron un mayor riesgo de afectación cardíaca, lo que podría llevar a una menor SLP como se ha descrito en otros artículos, junto con deleciones en el 14q.⁷⁹ En general, estos resultados apoyan observaciones recientes basadas en la caracterización inmunofenotípica de la CP clonales, y posicionan a la amiloidosis AL entre GMSI y MM en términos genéticos.

Respecto a si los mismos genes podrían estar implicados en el desarrollo tanto del MM como de la amiloidosis AL, actualmente existen datos de los estudios de Boyle *et al* y Huang *et al.*, además de los del presente^{80,81,201}. Los resultados de Boyle y de este estudio sugieren que las mutaciones recurrentes de MM se detectan con poca frecuencia en pacientes con amiloidosis AL, siendo la mayoría de ellas subclonales. Por otro lado, en nuestro estudio solamente se encontraron cuatro genes de los descritos por Boyle *et al* como mutados con frecuencia en la amiloidosis AL. Sin embargo, el estudio de Huang *et al* basado en WES y secuenciación dirigida, sí identificó mutaciones recurrentes en *KRAS* al igual que en el MM. Además, tanto en este último estudio como en este trabajo, pero no en el de Boyle, se identificó al gen *IGLL5* como el gen más comúnmente mutado.

En nuestro trabajo no se ha encontrado asociación entre genes mutados y las características clínicas de los pacientes, mientras que Huang *et al* han identificado tres genes mutados con valor pronóstico, lo que podría ser debido al pequeño número de casos.

Todos estos datos señalan a la amiloidosis AL como una enfermedad muy heterogénea genéticamente, y que ésta podría desarrollarse por mecanismos genéticos distintos al MM. Sin embargo, el número de pacientes estudiados sigue siendo bajo, por tanto, son

necesarios estudios adicionales en series más grandes de pacientes que aporten más luz sobre el panorama mutacional y las posibles correlaciones clínicas en la amiloidosis AL.

Ya que el análisis de mutaciones en genes, no desveló ninguna recurrencia, se analizaron las vías de señalización por si alguna vía estuviera alterada de forma recurrente en los pacientes de amiloidosis AL. No se encontró ninguna vía de señalización significativamente enriquecida, siendo las más representativas la vía de proliferación al igual que en MM (incluyendo genes de la ruta NFκB),¹⁴³ y la vía de secreción celular. Aunque en menor proporción también es interesante destacar que se encontraron mutaciones en genes relacionados con el procesamiento y pliegue de proteínas (1,5% de todos los genes mutados). Estos resultados son acordes con la biología de esta enfermedad, ya que podría haber una desregulación en la eliminación, degradación y plegamiento anómalo intracelular de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, que conduciría a formar los depósitos. Estas vías también están alteradas en otros tipos de amiloidosis.²²⁰

En ausencia de un evento genético unificador que defina la amiloidosis AL, el estudio de los reordenamientos del gen de las inmunoglobulinas surge como una alternativa para comprender la propensión a que las cadenas ligeras se depositen en forma de fibrillas de lámina β, así como el tropismo de los órganos. Para proporcionar información complementaria a lo que ya se había descrito en los genes IGL^{221,45,222}, se realizó NGS del gen de la cadena pesada de las Ig (*IGH*) y del gen de la cadena ligera κ de las Igs. El grado de heterogeneidad clonal observado en la amiloidosis AL es significativamente mayor que el encontrado en el MM. En el MM y otras neoplasias hematológicas, la heterogeneidad citogenética intraclonal se ha demostrado como un factor pronóstico adverso en ensayos clínicos prospectivos. Sin embargo, creemos que un análisis sólido del papel pronóstico de los subclones en AL todavía no es factible, dado que el impacto pronóstico de las aberraciones citogenéticas en esta entidad depende en gran medida de la estadificación cardíaca y del tratamiento administrado.¹⁷⁴

En la serie de amiloidosis AL el gen *IGH* más frecuentemente involucrado en el reordenamiento de los genes fue el gen *IGHV3-48*, el cual ha sido identificado recientemente como un marcador predictivo de transformación histológica en linfoma agresivo en linfomas foliculares.²²³ Además, el 100% de los pacientes que presentaban este reordenamiento tenían afectación renal ($p=0,025$). Por el contrario, en la serie de MM el gen más frecuente fue el gen *IGHV3-30*. Por lo tanto, la expresión de *IGHV3-48* se suma a *IGLV6-57* como genes de la línea germinal de Ig asociados con el depósito renal dominante^{221,222}.

Por otro lado, los recientes avances en las tecnologías de secuenciación y el desarrollo de nuevos enfoques matemáticos han permitido descifrar los patrones de mutaciones somáticas causadas por diferentes procesos mutacionales. Hasta la fecha se han identificados 30 patrones distintos.²²⁴ En nuestra serie identificamos varios patrones compartidos entre todos los pacientes, como las firmas mutacionales relacionadas con la acumulación de mutaciones con la edad (firmas 1 y 5), esto se correlaciona con la media de edad de nuestra serie y la media de edad de la amiloidosis AL en general, y firmas relacionadas con mecanismos de reparación del ADN (firma 6), posiblemente debido al alto número de mutaciones y alteraciones cromosómicas encontradas. La etiología de la firma 25, también identificada en nuestra serie, sigue siendo desconocida. Sin embargo, la firma mutacional 5 también se encuentra comúnmente en otras neoplasias hematológicas, como en MM²²⁵. La firma mutacional 2, está relacionada con la progresión del mieloma múltiple latente a MM, pero no se ha identificado de forma recurrente en nuestra serie amiloidosis AL.²²⁶

Teniendo en cuenta todos los resultados del estudio: el perfil mutacional, el repertorio de genes de las Igs y las frecuencias alélicas de los SNVs y los CNVs, nuestros resultados confirman que amiloidosis AL es una enfermedad con una gran heterogeneidad clonal y subclonal. Estos clones minoritarios en el momento del diagnóstico podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad, ya que esta heterogeneidad clonal genética podría favorecer el desarrollo de clones resistentes al tratamiento. Además, como ya se ha mencionado, esta heterogeneidad intraclonal se ha identificado como un factor adverso en otras enfermedades hematológicas.¹⁷⁴

En resumen, este estudio confirma observaciones anteriores de que la amiloidosis AL no puede definirse por un único o un conjunto de eventos genéticos bien definidos. De hecho, según los resultados combinados de WES de 99 pacientes (27 en este estudio, 24 en Boyle *et al.*⁸⁰ y 48 en Huang *et al.*⁸¹), hasta 63 genes se encuentran mutados de forma recurrente. Por otro lado, nuestro estudio respalda aún más la noción de que el uso de determinados genes de la región variable de la línea germinal de las Igs es un determinante clave en la patogénesis de la amiloidosis AL,⁴⁷ y revela nuevas asociaciones de alteraciones citogenéticas con afectación orgánica y por lo tanto con el pronóstico de la enfermedad.

Todo ello, junto con el predominio diferencial de los reordenamientos de *IGH*, nuestros resultados sugieren que, entre otros factores, los genes de la línea germinal de las Igs, en lugar de anomalías citogenéticas específicas, predisponen a las cadenas ligeras de un

clon de PC a adoptar una conformación aberrante, posiblemente más cerca de la etapa GMSI de los pacientes, antes del desarrollo de mayor carga tumoral y acumulación de mutaciones *driver* de MM. Dada la alta frecuencia de depósitos de cadenas ligeras de tipo λ en amiloidosis AL, se justifican estudios adicionales para investigar si las mutaciones clonales en *IGLL5* (mediana de VAF, 64%) contribuyen a este proceso. En tal caso, su detección junto con otros genes candidatos (por ejemplo, *FAT4*, *MUC16* y *SSH2*) a través del diagnóstico mediante NGS podrían emerger como nuevos marcadores de riesgo para la amiloidosis AL en pacientes con gammapatías monoclonales.

5.2. Validación y puesta a punto del panel de genes mediante secuenciación masiva para el diagnóstico molecular del mieloma múltiple.

La incorporación de todo el espectro de las lesiones genómica en los modelos pronósticos y terapéuticos del MM requiere el desarrollo de nuevos métodos y tecnología para reunir toda la información requerida y tener una herramienta predictiva unificada. El panorama y opciones de tratamiento es cada vez mayor en el MM y esto sugiere que el análisis molecular será una parte de la práctica clínica de rutina en un futuro muy cercano para ayudar a la estadificación terapéutica y el pronóstico de los pacientes.

En este trabajo se presenta un nuevo enfoque de secuenciación y análisis que podría implementarse en laboratorios de diagnóstico. Esta metodología permite el multiplexado de muestras de distintos pacientes sin necesidad de muestras controles una vez que se ha creado una buena línea base para la detección fiable de los CNVs. Además, este enfoque permite el análisis de las mutaciones, cambios en el número de copia y traslocaciones de *IGH* mediante una única aproximación. Actualmente, estos estudios solo se realizan en centros de referencia a través de la integración de FISH, matrices de SNPs y datos de PCR a un coste por muestra que podría ser mayor que con nuestro método. También, dado que los diseños se pueden redefinir y refinar para incluir nuevos genes de interés o excluir regiones con escasa relevancia clínica, y que la NGS y la bioinformática continúan mejorando día a día, los tiempos de respuesta y el coste disminuirán todavía más en el futuro. Haciendo así de la NGS una opción viable para la práctica clínica de rutina.

En este proyecto se ha desarrollado un panel de captura de NGS con los genes más importantes relacionados con el MM hasta la fecha.²⁰¹ Se ha validado en un total de 127 muestras de MM al diagnóstico y se han comparado los resultados con FISH y *arrays* de CGH. Para ello, se generaron dos versiones del panel. Tras la prueba de la primera versión se obtuvo una cobertura media ligeramente menor de lo esperado y una cobertura *on-target* baja y mucho menor de lo esperado comparado con lo descrito en otros trabajos²²⁷ Esto último, probablemente debido a la complejidad de las regiones de los reordenamientos de las Igs incorporadas en el diseño.

A pesar de esto, se detectaron la gran mayoría de las mutaciones y traslocaciones patogénicas que habían sido identificadas anteriormente con técnicas alternativas.

De modo que en el segundo diseño se mejoraron estos factores, disminuyendo el número de muestras por carrera para obtener mayor cobertura media por muestra y se mejoró el diseño de las regiones más complejas y el análisis al secuenciar controles sanos. Además, se añadieron dos genes nuevos (*CRBN* y *NFKB2*).

Con esta nueva versión se mejoró tanto la cobertura media, como la cobertura la *on-target*. Por otro lado, y en concordancia con lo publicado recientemente,^{227,228} la sensibilidad y la especificidad, al comparar los resultados con el *gold standar* FISH y con *arrays* de CGH, fue del 74% y 93%, respectivamente. En este punto es interesante añadir que tras validar algunos casos discordantes entre FISH y NGS, que habían sido identificados como falsos positivos por NGS, también fueron positivos mediante *arrays*.

La frecuencia de los genes mutados en nuestra serie de MM fue similar a los datos publicados en los últimos años por otros autores^{140,229} (*KRAS* 21 vs 15%, *NRAS* 18 vs 9%, *BRAF* 7 vs 6% and *TP53* 8 vs 10%).

Sin embargo, la recurrencia de los genes *DIS3* y *NRAS* que se detectó en nuestra serie (1% y 9%) fue menor a lo que había descrito en la bibliografía (9% y 18%, respectivamente).²⁰¹ Esta diferencia posiblemente sea debida a la variabilidad que existe dentro de cada grupo de trabajo en los distintos pasos para filtrar las variantes una vez que obtenemos el archivo .vcf con todas las variantes, ya que se puede ser mas o menos estrictos. Este punto es muy importante, y consideramos que sería necesario una estandarización entre los distintos grupos. Para las variantes de la línea germinal, si se han descrito directrices para clasificar las variantes tanto para una interpretación biológica²³⁰ como clínica²³¹. Sin embargo para las variantes somáticas, solo se han descrito pautas para la interpretación clínica,¹⁹⁴ mientras que la clasificación biológica solo se menciona brevemente²³² o se describen en enfermedades específicas.²³³ No obstante, ambas clasificaciones son necesarias para poder estandarizar la llamada de las variantes en el diagnóstico clínico. Hasta ahora, se están utilizando sistemas de clasificación biológica específica de cada laboratorio, y por lo tanto, diferente, por lo que esto puede tener un impacto significativo en los informes clínicos.²³⁴

Mediante este panel, también se identificaron los reordenamientos VDJ de las inmunoglobulinas, aunque no fue posible en todas las muestras, dada la complejidad y variabilidad de la región, siendo esto una limitación de este estudio. La identificación de los

reordenamientos son interesantes porque son una herramienta que se puede utilizar para rastrear los clones malignos y el estudio de la enfermedad mínima residual y así hacer un mejor seguimiento de los pacientes y con ello una predicción de la supervivencia.¹⁸³

En cuanto a los CNVs, se identificaron las amplificaciones en 1q, deleciones en 1p y 17p entre otras tal y como ya se ha descrito previamente en el MM y una frecuencia similar.²²⁷

En este punto es interesante destacar el valor añadido que tiene la NGS en el diagnóstico molecular del MM, ya sea de forma individual o para complementar la técnica FISH. La NGS nos ha permitido detectar tanto amplificaciones (>4 copias) en el 1q21 como mutaciones puntuales en *TP53* y pérdida de copia del gen. Esto nos posibilita identificar a los pacientes que pertenecen a un nuevo grupo de muy alto riesgo, denominados “*Double-hit*”¹³⁸. Este subgrupo de pacientes se caracteriza por la pérdida bialélica de *TP53*, ya sea por la pérdida de las dos copias del gen o por mutaciones que alteran la función del gen y pérdida de una copia y amplificaciones del 1q21. Por lo tanto, es importante no solo determinar el estado del número de copias del 17p, si no que también es necesario determinar el estado mutacional de *TP53*. Además, hay que tener en cuenta que las sondas de FISH podrían no ser lo suficientemente sensibles para detectar pequeñas deleciones, en regiones exónicas o en el promotor, resultando en una mala clasificación de los pacientes.¹³⁸

De tal modo que, las mutaciones detectadas en *TP53*, por NGS, se han convertido en un marcador molecular muy importante en el diagnóstico de los pacientes con MM y así hemos podido comprobarlo en este trabajo. En nuestra serie, los pacientes “*Double hit*” tenían una SLP significativamente menor ($p=0,02$).

Por otro lado, fue llamativo detectar que las ganancias en 1q consideradas como factor de riesgo en las guías de MM,¹³⁵ no separaba significativamente a los pacientes ni mediante FISH ni por NGS. Esto posiblemente sea debido a la aparición de los nuevos tratamientos en el MM, como los inhibidores del proteasoma y los inmunomoduladores, que podrían estar modificando el impacto pronóstico descrito previamente para estas alteraciones. Además esto ya se observó en un estudio previo con pacientes de un ensayo clínico similar anterior.¹⁷⁹ También, los trasplantes autólogos de células madre parecen estar mejorando el pronóstico de estas alteraciones.²³⁵

Por otro lado, la amplificación del 1q fue la alteración citogenética que mas falsos negativos ha dado mediante el panel, y se tendrá en cuenta para futuras versiones del diseño del panel.

En cuanto a la comparación entre los datos obtenidos mediante FISH frente a los obtenidos por el panel de captura de NGS y su papel pronóstico, de forma general, para la mayoría de las alteraciones detectadas, se encontró que los resultados obtenidos por el panel de NGS discriminaban mejor a los pacientes que con los datos obtenidos por FISH, como en el caso de la del1p ($p=0,006$ vs $p=0,127$).

Respecto a las traslocaciones no se observó tanta diferencia entre ambas técnicas. Además, se demostró que las traslocaciones por sí solas no tenían un factor pronóstico significativo. En cambio, y como ya se ha demostrado en estudios previos que la coexistencia de unas alteraciones con otras puede cambiar el riesgo^{131, 133}, cuando se agruparon las alteraciones de mal pronósticos (17p, t(4;14) y t(14;16)) y se analizó la SLP se observó que el panel de NGS discrimina bien a los distintos grupos ($p=0,064$), aunque no significativamente, siendo consistente con lo establecido previamente en la estratificación de riesgo del IMWG.¹³⁵

De la misma manera, cuando la delección de 13q se asoció a otros eventos de mal pronóstico como la t(4,14), delección de 17p y la t(14,16), se observó una reducción significativa de la SLP ($p=0,002$). Sin embargo, con esta alteración hay que ser cautelosos ya que la monosomía del cromosoma 13 y las delecciones de su brazo largo parecen tener un efecto diferencial. A pesar de que han sido consideradas factores pronósticos adversos cuando se definieron por cariotipo, ^{236,237} en un estudio reciente han observado que la monosomía tiene una función adversa, pero que la eliminación parcial del 13q podría tener una función protectora en la supervivencia general. ²³⁸

También es interesante destacar que se identificó una traslocación t(10;14) que no había sido detectada previamente por FISH. Esta traslocación es rara pero se ha descrito en otras enfermedades hematológicas y en el MM.²³⁹ Esta traslocación yuxtapone el gen de la región constante de *IGH* con el gen *NFκB2* y provoca una activación constitucional de la vía no canónica de *NFκB2* promoviendo así los tumores malignos de células B.²⁴⁰

Realmente, en este tipo de patologías, como el MM y la AL, es complejo hacer un panel definitivo ya que no hay claramente un gen conductor, también debido al desarrollo constante de nuevos tratamientos y con ello la aparición de nuevos genes de resistencia como se ha podido observar en los estudios competencia clonal. De modo que estos paneles se deben estar revisando continuamente. Esto es aplicable a la clínica ya que siempre se podría incluir genes nuevos. Por eso, también es muy interesante fomentar que haya grupos de trabajo multidisciplinares.

En resumen, en este trabajo se describe una técnica de enriquecimiento por captura de un panel de NGS con las alteraciones mas frecuentemente alteradas en MM. Esta metodología podría implementarse en laboratorios de diagnóstico e investigación y también en el estudio de la patogénesis, diagnóstico y pronóstico del mieloma, fomentando así la medicina personalizada. Además, la aplicación de este panel a grandes cohortes de muestras de pacientes clínicamente bien caracterizados permitirá descubrir potencialmente nuevos biomarcadores con importancia clínica.

5.3. Estudio de modelos de competición clonal como biomarcadores de pronóstico, progresión y la resistencia en el mieloma múltiple

Los ensayos de dinámicas clonales de unos modelos celulares bien caracterizados molecularmente y la combinación en co-cultivo entre ellos nos ha permitido profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad y la dinámica clonal, y entender mejor la resistencia a los tratamientos que muy frecuentemente ocurre en los pacientes con MM.

Como ya se ha comentado, existen mutaciones y alteraciones bien caracterizadas en el MM que provocan un incremento de la progresión de la enfermedad como: mutaciones en *TP53*, tanto monoalélicas y bialélicas^{241,242}, y mutaciones en *KRAS*,^{243,140}. También mutaciones relacionadas con resistencia a los tratamientos como: mutaciones en el gen de la subunidad catalítica del proteasoma *PSMB5*,¹⁶⁰ asociado con resistencia a PIs como el bortezomib y mutaciones en los factores de transcripción *IKZF1/3*, relacionado con resistencia a tratamientos con IMiDs como la lenalidomida.¹⁶³

Mediante los estudios de las dinámicas clonales que se han realizado en este trabajo se han definido 3 mecanismos de selección clonal: ventaja proliferativa, supervivencia neutral y desventaja proliferativa.

El modelo de ventaja proliferativa consiste en que una determinada mutación o alteración citogenética le confiere a la célula una ventaja proliferativa independientemente del fármaco que haya en el medio. Esto se ha podido observar en las células que tenían alteraciones mono y bialélicas de *TP53*, que presentaron una ventaja proliferativa frente a células *wild-type*. Además, también se ha demostrado que la alteración bialélica de *TP53* presenta mayor ventaja proliferativa que la monoalélica. Otro ejemplo de este comportamiento serían las mutaciones en el gen *KRAS*, también estudiadas en este trabajo.

El modelo de supervivencia neutral se basa en que la presencia de una mutación ofrece una ventaja evolutiva cuando las células están expuestas a un tratamiento. Cuando el fármaco no está en el medio, las células presentan un efecto neutral. Es lo que ocurre en el caso de la mutación A152T en el gen *IKZF1*, donde en presencia de lenalidomida, las células que presentan la mutación se seleccionan frente a las *wild type*, pero en ausencia del fármaco no existe ninguna ventaja de una línea frente a la otra.

El tercer modelo que se describe es la desventaja proliferativa. Esto es lo que ocurre con el comportamiento de las células con el gen *PSMB5* mutado, donde en ausencia de bortezomib en el medio, la mutación induce una desventaja sobre éstas. En cambio, cuando se añade el fármaco, éstas se seleccionan frente a las células con *IKZF1* mutado. Es decir, en presencia del fármaco, la mutación confiere una ventaja proliferativa sobre las células mutadas, pero cuando se elimina del medio, se genera un impacto negativo. Esta desventaja proliferativa es debida a que a esta mutación que afecta a la subunidad catalítica del proteasoma provoca la acumulación de proteínas aberrantes en la células lo que conduce a la activación de vías apoptóticas.¹⁶⁰

Además, esto también podría explicar por qué estas alteraciones no se detectan con más frecuencia en el momento de la recaída.

En definitiva, estos resultados muestran que las dinámicas clonales pueden caracterizarse y cuantificarse, y que la detección temprana de las lesiones que rigen estas dinámicas pueden ser una gran ventaja a la hora de definir de forma individualizada el pronóstico y las mejores opciones terapéuticas de los pacientes con MM. Además, podrían utilizarse como biomarcadores para predecir posibles recaídas.

Estos estudios de heterogeneidad clonal y las dinámicas clonales, pueden tener grandes implicaciones en el tratamiento ya que la progresión del MM después del tratamiento estará determinada por qué clones de mieloma repueblan el nicho de CP en la MO. Este proceso da lugar al potencial para manipular terapéuticamente las presiones selectivas tras la inducción utilizando terapias de consolidación o mantenimiento. Estas estrategias terapéuticas permitirían la repoblación del nicho del mieloma por clones más indolentes que están asociados con mejores resultados a largo plazo para los pacientes. Sin embargo, en la enfermedad de alto riesgo, dicha estrategia podría facilitar la selección de clones más agresivos que perjudicasen la supervivencia posterior a la recaída. Y aunque existen múltiples mutaciones que pueden ser diana de fármacos, es difícil imaginar una estrategia mediante la cual múltiples terapias dirigidas puedan ser capaces de destruir todos los subclones malignos.

Por tanto, la implementación de estas estrategias se deberá acompañar de una monitorización de los distintos subclones, con el fin de administrar combinaciones de fármacos en el contexto clínico y biológico adecuado.²⁴⁴

6. CONCLUSIONES

1. La secuenciación masiva de los exones y las regiones reguladoras en muestras muy bien caracterizadas de pacientes con amiloidosis de cadenas ligeras ha permitido confirmar que la amiloidosis AL es una enfermedad muy heterogénea y que no existe una mutación *driver* común entre los pacientes.
2. A excepción del gen IGLL5, la amiloidosis AL y el MM no comparten genes promotores mutados de forma recurrente, y aunque la familia de genes V involucrada con más frecuencia en ambas patologías es la V3, en AL predomina el gen *IGHV3-48*, en MM es el gen *IGHV3-30*.
3. Las ganancias en los cromosomas 9 y 19 están asociados significativamente a una menor SLP, la delección del13q se asocia con niveles más altos de NT-proBNP y que el 100% de los pacientes con el gen *IGHV3-48* presentan afectación renal.
4. Se ha generado un panel de NGS que permite identificar las alteraciones más frecuentes en el MM, tanto mutaciones puntuales, traslocaciones, reordenamientos de las Ig como CNVs, con una sensibilidad y especificidad del 74% y 93%, respectivamente.
5. Los resultados obtenidos por el panel de NGS discriminan mejor a los pacientes de alto riesgo que los datos obtenidos por FISH o con las técnicas estándar. De tal forma que, este panel podría implementarse en la práctica clínica
6. Mediante los estudios de las dinámicas clonales se han definido tres mecanismos de selección clonal: ventaja proliferativa, supervivencia neutral y desventaja proliferativa, que permitirían predecir posibles recaídas y definir de forma individualizada el pronóstico y las mejores opciones terapéuticas de los pacientes con MM.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: Natural history in 241 cases. *The American Journal of Medicine* 1978; 64: 814–826.
- 2 Zawadzki ZA, Edwards GA. Nonmyelomatous monoclonal immunoglobulinemia. *Prog Clin Immunol* 1972; 1: 105–156.
- 3 Molina Garrido MJ, Guillén Ponce C, Guirado-Risueño M, Martínez y Sevilla C, Carrato Mena A. Diagnóstico diferencial de las gammopatías monoclonales. *Anales de Medicina Interna* 2006; 23: 546–551.
- 4 Merlini G. Determining the significance of MGUS. *Blood* 2014; 123: 305–307.
- 5 Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, Bradwell AR, Clark RJ *et al.* Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812–817.
- 6 Keren D. *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. CRC Press, 2003.
- 7 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF *et al.* A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564–569.
- 8 Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010; 24: 1121–1127.
- 9 Pérez-Persona E, Vidriales M-B, Mateo G, García-Sanz R, Mateos M-V, de Coca AG *et al.* New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; 110: 2586–2592.
- 10 Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S, Rozman M, Esteve J, Filella X *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 428–434.
- 11 San Miguel J, Mateos M-V, Gonzalez V, Dimopoulos MA, Kastritis E, Hajek R *et al.* Updated risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM) incorporating the revised IMWG diagnostic criteria. *JCO* 2019; 37: 8000–8000.
- 12 Katzmán JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ *et al.* Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013; 27: 208–212.
- 13 Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, Nasr SH, Cockwell P, Ferman J-P *et al.* Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 2012; 120: 4292–4295.
- 14 Merlini G, Wechalekar AD, Palladini G. Systemic light chain amyloidosis: an update for treating physicians. *Blood* 2013; 121: 5124–5130.
- 15 Dispenzieri A, Seenithamby K, Lacy MQ, Kumar SK, Buadi FK, Hayman SR *et al.* Patients with immunoglobulin light chain amyloidosis undergoing autologous stem cell transplantation have superior outcomes compared with patients with multiple myeloma: a retrospective review from a tertiary referral center. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 1302–1307.
- 16 Therneau TM, Kyle RA, Melton LJ, Larson DR, Benson JT, Colby CL *et al.* Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 1071–1079.
- 17 Merlini G, Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 583–596.
- 18 Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, Schönland SO, Palladini G, Hawkins PN *et al.* Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 1–19.
- 19 Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S-I, Merlini G, Saraiva MJM *et al.* Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* 2016; 23: 209–213.
- 20 Sarantseva S. *Amyloidosis: Mechanisms and Prospects for Therapy*. BoD – Books on Demand, 2011.
- 21 Bhat A, Selmi C, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Currents Concepts on the

Immunopathology of Amyloidosis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2010; 38: 97–106.

22 Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv* 2018; 2: 1046–1053.

23 Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR *et al.* Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine* 2018; 378: 241–249.

24 Desikan KR, Dhodapkar MV, Hough A, Waldron T, Jagannath S, Siegel D *et al.* Incidence and impact of light chain associated (AL) amyloidosis on the prognosis of patients with multiple myeloma treated with autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 315–319.

25 Madan S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Hayman SR, Zeldenrust SR *et al.* Clinical Features and Treatment Response of Light Chain (AL) Amyloidosis Diagnosed in Patients With Previous Diagnosis of Multiple Myeloma. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 232–238.

26 da Silva Filho MI, Försti A, Weinhold N, Meziane I, Campo C, Huhn S *et al.* Genome-wide association study of immunoglobulin light chain amyloidosis in three patient cohorts: comparison with myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 1735–1742.

27 Kyle RA, Linos A, Beard CM, Linke RP, Gertz MA, O’Fallon WM *et al.* Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood* 1992; 79: 1817–1822.

28 Pinney JH, Smith CJ, Taube JB, Lachmann HJ, Venner CP, Gibbs SDJ *et al.* Systemic amyloidosis in England: an epidemiological study. *Br J Haematol* 2013; 161: 525–532.

29 Hemminki K, Li X, Försti A, Sundquist J, Sundquist K. Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. *BMC Public Health* 2012; 12: 974.

30 Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Healthcare resource utilization and costs in amyloid light-chain amyloidosis: a real-world study using US claims data. *J Comp Eff Res* 2018; 7: 549–559.

31 Duhamel S, Mohty D, Magne J, Lavergne D, Bordessoule D, Aboyans V *et al.* Incidence and Prevalence of Light Chain Amyloidosis: A Population-Based Study. *Blood* 2017; 130: 5577–5577.

32 Aguirre MA, Boietti BR, Nucifora E, Sorroche PB, González Bernaldo de Quirós F, Giunta DH *et al.* Incidence rate of amyloidosis in patients from a medical care program in Buenos Aires, Argentina: a prospective cohort. *Amyloid* 2016; 23: 184–187.

33 Hipp MS, Park S-H, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 2014; 24: 506–514.

34 Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 2015; 84: 435–464.

35 Wyatt AR, Yerbury JJ, Dabbs RA, Wilson MR. Roles of extracellular chaperones in amyloidosis. *J Mol Biol* 2012; 421: 499–516.

36 Bochtler T, Hegenbart U, Heiss C, Benner A, Moos M, Seckinger A *et al.* Hyperdiploidy is less frequent in AL amyloidosis compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance and inversely associated with translocation t(11;14). *Blood* 2011; 117: 3809–3815.

37 Morgan GJ, Kelly JW. The Kinetic Stability of a Full-Length Antibody Light Chain Dimer Determines whether Endoproteolysis Can Release Amyloidogenic Variable Domains. *J Mol Biol* 2016; 428: 4280–4297.

38 Blancas-Mejía LM, Horn TJ, Marin-Argany M, Auton M, Tischer A, Ramirez-Alvarado M. Thermodynamic and fibril formation studies of full length immunoglobulin light chain AL-09 and its germline protein using scan rate dependent thermal unfolding. *Biophys Chem* 2015; 207: 13–20.

39 Oberti L, Rognoni P, Barbiroli A, Lavatelli F, Russo R, Maritan M *et al.* Concurrent structural and biophysical traits link with immunoglobulin light chains amyloid propensity. *Sci Rep* 2017; 7: 1–11.

40 Ami D, Lavatelli F, Rognoni P, Palladini G, Raimondi S, Giorgetti S *et al.* In situ characterization of protein aggregates in human tissues affected by light chain amyloidosis: a FTIR microspectroscopy study. *Sci Rep* 2016; 6: 1–12.

41 Diomede L, Romeo M, Rognoni P, Beeg M, Foray C, Ghibaudi E *et al.* Cardiac Light Chain Amyloidosis: The Role of Metal Ions in Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Antioxid Redox Signal* 2017; 27: 567–582.

42 Pepys MB, Dyck RF, de Beer FC, Skinner M, Cohen AS. Binding of serum amyloid P-

component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin Exp Immunol* 1979; 38: 284–293.

43 Marin-Argany M, Lin Y, Misra P, Williams A, Wall JS, Howell KG *et al*. Cell Damage in Light Chain Amyloidosis: FIBRIL INTERNALIZATION, TOXICITY AND CELL-MEDIATED SEEDING. *J Biol Chem* 2016; 291: 19813–19825.

44 Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer’s disease. *Aging (Albany NY)* 2011; 3: 803–812.

45 Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V L germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood* 2001; 98: 714–720.

46 Kourelis TV, Dasari S, Theis JD, Ramirez-Alvarado M, Kurtin PJ, Gertz MA *et al*. Clarifying immunoglobulin gene usage in systemic and localized immunoglobulin light-chain amyloidosis by mass spectrometry. *Blood* 2017; 129: 299–306.

47 Perfetti V, Palladini G, Casarini S, Navazza V, Rognoni P, Obici L *et al*. The repertoire of λ light chains causing predominant amyloid heart involvement and identification of a preferentially involved germline gene, IGLV1-44. *Blood* 2012; 119: 144–150.

48 Mahmood S, Palladini G, Sancharawala V, Wechalekar A. Update on treatment of light chain amyloidosis. *Haematologica* 2014; 99: 209–221.

49 Merlini G. AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 2017: 1–12.

50 Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M *et al*. Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res* 2004; 94: 1008–1010.

51 Shi J, Guan J, Jiang B, Brenner DA, Del Monte F, Ward JE *et al*. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 α MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 4188–4193.

52 Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 505–513.

53 Quarta CC, Gonzalez-Lopez E, Gilbertson JA, Botcher N, Rowczenio D, Petrie A *et al*. Diagnostic sensitivity of abdominal fat aspiration in cardiac amyloidosis. *Eur Heart J* 2017; 38: 1905–1908.

54 Muchtar E, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Kapoor P, Hayman SR *et al*. Overuse of organ biopsies in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): the consequence of failure of early recognition. *Ann Med* 2017; 49: 545–551.

55 Vrana JA, Theis JD, Dasari S, Mereuta OM, Dispenzieri A, Zeldenrust SR *et al*. Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica* 2014; 99: 1239–1247.

56 Muchtar E, Gertz MA, Kumar SK, Lacy MQ, Dingli D, Buadi FK *et al*. Improved outcomes for newly diagnosed AL amyloidosis between 2000 and 2014: cracking the glass ceiling of early death. *Blood* 2017; 129: 2111–2119.

57 Lousada I, Comenzo RL, Landau H, Guthrie S, Merlini G. Light Chain Amyloidosis: Patient Experience Survey from the Amyloidosis Research Consortium. *Adv Ther* 2015; 32: 920–928.

58 Kourelis TV, Kumar SK, Go RS, Kapoor P, Kyle RA, Buadi FK *et al*. Immunoglobulin light chain amyloidosis is diagnosed late in patients with preexisting plasma cell dyscrasias. *Am J Hematol* 2014; 89: 1051–1054.

59 Merlini G, Lousada I, Ando Y, Dispenzieri A, Gertz MA, Grogan M *et al*. Rationale, application and clinical qualification for NT-proBNP as a surrogate end point in pivotal clinical trials in patients with AL amyloidosis. *Leukemia* 2016; 30: 1979–1986.

60 Palladini G, Hegenbart U, Milani P, Kimmich C, Folli A, Ho AD *et al*. A staging system for renal outcome and early markers of renal response to chemotherapy in AL amyloidosis. *Blood* 2014; 124: 2325–2332.

61 Wechalekar AD, Schonland SO, Kastiris E, Gillmore JD, Dimopoulos MA, Lane T *et al*. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood* 2013; 121: 3420–3427.

- 62 Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, Lacy MQ, Burritt MF, Therneau TM *et al.* Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3751–3757.
- 63 Kristen AV, Giannitsis E, Lehrke S, Hegenbart U, Konstandin M, Lindenmaier D *et al.* Assessment of disease severity and outcome in patients with systemic light-chain amyloidosis by the high-sensitivity troponin T assay. *Blood* 2010; 116: 2455–2461.
- 64 Palladini G, Barassi A, Klersy C, Pacciolla R, Milani P, Sarais G *et al.* The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis. *Blood* 2010; 116: 3426–3430.
- 65 Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Colby C *et al.* Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 2012; 30: 989–995.
- 66 Palladini G, Milani P, Foli A, Obici L, Lavatelli F, Nuvolone M *et al.* Oral melphalan and dexamethasone grants extended survival with minimal toxicity in AL amyloidosis: long-term results of a risk-adapted approach. *Haematologica* 2014; 99: 743–750.
- 67 Kastritis E, Gavriatopoulou M, Roussou M, Migkou M, Fotiou D, Ziogas DC *et al.* Renal outcomes in patients with AL amyloidosis: Prognostic factors, renal response and the impact of therapy. *Am J Hematol* 2017; 92: 632–639.
- 68 Dispenzieri A, Buadi F, Kumar SK, Reeder CB, Sher T, Lacy MQ *et al.* Treatment of Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement. *Mayo Clinic Proceedings* 2015; 90: 1054–1081.
- 69 Hayman SR, Bailey RJ, Jalal SM, Ahmann GJ, Dispenzieri A, Gertz MA *et al.* Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2001; 98: 2266–2268.
- 70 Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13931–13936.
- 71 Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 296–303.
- 72 Bryce AH, Ketterling RP, Gertz MA, Lacy M, Knudson RA, Zeldenrust S *et al.* Translocation t(11;14) and survival of patients with light chain (AL) amyloidosis. *Haematologica* 2009; 94: 380–386.
- 73 Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, Granzow M, Benner A, Seckinger A *et al.* Translocation t(11;14) is associated with adverse outcome in patients with newly diagnosed AL amyloidosis when treated with bortezomib-based regimens. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1371–1378.
- 74 Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, Heiss C, Benner A, Hose D *et al.* Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 2008; 111: 4700–4705.
- 75 Warsame R, Kumar SK, Gertz MA, Lacy MQ, Buadi FK, Hayman SR *et al.* Abnormal FISH in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis is a risk factor for cardiac involvement and for death. *Blood Cancer Journal* 2015; 5: e310.
- 76 Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, Benner A, Kimmich C, Seckinger A *et al.* Prognostic impact of cytogenetic aberrations in AL amyloidosis patients after high-dose melphalan: a long-term follow-up study. *Blood* 2016; 128: 594–602.
- 77 Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, Benner A, Seckinger A, Dietrich S *et al.* Gain of chromosome 1q21 is an independent adverse prognostic factor in light chain amyloidosis patients treated with melphalan/dexamethasone. *Amyloid* 2014; 21: 9–17.
- 78 Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR *et al.* Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clinic Proceedings* 2013; 88: 360–376.
- 79 Granzow M, Hegenbart U, Hinderhofer K, Hose D, Seckinger A, Bochtler T *et al.* Novel

recurrent chromosomal aberrations detected in clonal plasma cells of light chain amyloidosis patients show potential adverse prognostic effect: first results from a genome-wide copy number array analysis. *Haematologica* 2017; 102: 1281–1290.

80 Boyle EM, Ashby C, Wardell CP, Rowczenio D, Sachchithanatham S, Wang Y *et al.* The genomic landscape of plasma cells in systemic light chain amyloidosis. *Blood* 2018; 132: 2775–2777.

81 Huang X-F, Jian S, Lu J-L, Shen K-N, Feng J, Zhang C-L *et al.* Genomic profiling in amyloid light-chain amyloidosis reveals mutation profiles associated with overall survival. *Amyloid* 2020; 27: 36–44.

82 Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D, Venkitaraman AR. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 1998; 391: 904–907.

83 Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN *et al.* New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012; 30: 4541–4549.

84 Comenzo RL, Vosburgh E, Simms RW, Bergethon P, Sarnacki D, Finn K *et al.* Dose-intensive melphalan with blood stem cell support for the treatment of AL amyloidosis: one-year follow-up in five patients. *Blood* 1996; 88: 2801–2806.

85 Kourelis TV, Kumar SK, Gertz MA, Lacy MQ, Buadi FK, Hayman SR *et al.* Coexistent multiple myeloma or increased bone marrow plasma cells define equally high-risk populations in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4319–4324.

86 Landau H, Hassoun H, Rosenzweig MA, Maurer M, Liu J, Flombaum C *et al.* Bortezomib and dexamethasone consolidation following risk-adapted melphalan and stem cell transplantation for patients with newly diagnosed light-chain amyloidosis. *Leukemia* 2013; 27: 823–828.

87 Palladini G, Milani P, Merlini G. Novel strategies for the diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015; 13: 1195–1211.

88 Palladini G, Merlini G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis? *Blood* 2016; 128: 159–168.

89 Palladini G, Milani P, Foli A, Basset M, Russo F, Perlini S *et al.* A phase 2 trial of pomalidomide and dexamethasone rescue treatment in patients with AL amyloidosis. *Blood* 2017; 129: 2120–2123.

90 Khouri J, Kin A, Thapa B, Reu FJ, Bumma N, Samaras CJ *et al.* Daratumumab proves safe and highly effective in AL amyloidosis. *British Journal of Haematology* 2019; 185: 342–344.

91 Milani P, Merlini G, Palladini G. Novel Therapies in Light Chain Amyloidosis. *Kidney Int Rep* 2018; 3: 530–541.

92 Popkova T, Hajek R, Jelinek T. Monoclonal antibodies in the treatment of AL amyloidosis: co-targeting the plasma cell clone and amyloid deposits. *British Journal of Haematology* 2020; 189: 228–238.

93 van de Donk NWCJ, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser AK *et al.* Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev* 2016; 270: 95–112.

94 Deckert J, Wetzel M-C, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallée F *et al.* SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 4574–4583.

95 Feng X, Zhang L, Acharya C, An G, Wen K, Qiu L *et al.* Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 4290–4300.

96 Cuesta-Mateos C, Alcaraz-Serna A, Somovilla-Crespo B, Muñoz-Calleja C. Monoclonal Antibody Therapies for Hematological Malignancies: Not Just Lineage-Specific Targets. *Front Immunol* 2018; 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01936.

97 Gertz MA, Landau H, Comenzo RL, Seldin D, Weiss B, Zonder J *et al.* First-in-Human Phase I/II Study of NEOD001 in Patients With Light Chain Amyloidosis and Persistent Organ Dysfunction. *J Clin Oncol* 2016; 34: 1097–1103.

98 Prothena Discontinues Development of NEOD001 for AL Amyloidosis. Prothena Corporation plc. [http://ir.prothena.com/news-releases/news-release-details/prothena-discontinues-](http://ir.prothena.com/news-releases/news-release-details/prothena-discontinues)

development-neod001-al-amyloidosis (accessed 1 May2020).

- 99 Edwards CV, Gould J, Langer AL, Mapara M, Radhakrishnan J, Maurer MS *et al.* Interim analysis of the phase 1a/b study of chimeric fibril-reactive monoclonal antibody 11-1F4 in patients with AL amyloidosis. *Amyloid* 2017; 24: 58–59.
- 100 Edwards CV, Gould J, Langer AL, Mapara MY, Radhakrishnan J, Maurer MS *et al.* Final Analysis of the Phase 1a/b Study of Chimeric Fibril-Reactive Monoclonal Antibody 11-1F4 in Patients with Relapsed or Refractory AL Amyloidosis. *Blood* 2017; 130: 509–509.
- 101 Borrello I. Can we change the disease biology of multiple myeloma? *Leukemia Research* 2012; 36: S3–S12.
- 102 Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 1371–1382.
- 103 Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1860–1873.
- 104 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* 2004; 101: 2667–2674.
- 105 Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2962–2972.
- 106 Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, Schouten H, Mohty M, Dimopoulos M *et al.* Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi133-137.
- 107 Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A *et al.* Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 21–33.
- 108 Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996; 93: 345–351.
- 109 Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1479–1483.
- 110 Cid Ruzafa J, Merinopoulou E, Baggaley RF, Leighton P, Werther W, Felici D *et al.* Patient population with multiple myeloma and transitions across different lines of therapy in the USA: an epidemiologic model. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2016; 25: 871–879.
- 111 Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, Derolf AR, Björkholm M. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1993–1999.
- 112 Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 830–834.
- 113 Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK *et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008; 111: 2516–2520.
- 114 Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival, a unique malignancy. *Semin Oncol* 2016; 43: 676–681.
- 115 Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 323–328.
- 116 Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 1994; 137: S68-97.
- 117 Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *American Journal of Industrial Medicine* 1997; 32: 510–516.
- 118 Altekruze SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). *Cancer Causes Control* 1999; 10: 617–625.
- 119 Bergsagel DE, Wong O, Bergsagel PL, Alexanian R, Anderson K, Kyle RA *et al.* Benzene and Multiple Myeloma: Appraisal of the Scientific Evidence. *Blood* 1999; 94: 1174–1182.
- 120 Familial myeloma. Report of eight families and a study of serum proteins in their relatives : Maldonado JE, Kyle RA: *Am J Med* 57: 875–884, 1974. *The American Journal of Medicine* 1974; 57: A67.
- 121 Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, Foreman BJ, Larson DR, Colby CL *et al.* Increased

- risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2009; 114: 785–790.
- 122 Mitchell JS, Li N, Weinhold N, Försti A, Ali M, van Duin M *et al.* Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nat Commun* 2016; 7: 12050.
- 123 Johnson DC, Weinhold N, Mitchell JS, Chen B, Kaiser M, Begum DB *et al.* Genome-wide association study identifies variation at 6q25.1 associated with survival in multiple myeloma. *Nat Commun* 2016; 7: 10290.
- 124 Magrangeas F, Kuiper R, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Guérin-Charbonnel C, Ferrer L *et al.* A Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Locus for Bortezomib-Induced Peripheral Neuropathy in European Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 4350–4355.
- 125 González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M *et al.* Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: 3112–3121.
- 126 Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Duin M van, Sonneveld P, Mateos M-V *et al.* Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 1–20.
- 127 Nieuwenhuijzen N van, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to Multiple Myeloma, a Paradigm for Clonal Evolution of Premalignant Cells. *Cancer Res* 2018; 78: 2449–2456.
- 128 Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM *et al.* Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2582–2590.
- 129 Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e538-548.
- 130 Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC *et al.* Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; 127: 2955–2962.
- 131 Avet-Loiseau H, Hulin C, Campion L, Rodon P, Marit G, Attal M *et al.* Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myélome experience. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2806–2809.
- 132 Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA *et al.* Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 2012; 119: 2100–2105.
- 133 Hebraud B, Magrangeas F, Cleynen A, Lauwers-Cances V, Chretien M-L, Hulin C *et al.* Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood* 2015; 125: 2095–2100.
- 134 Leiba M, Duek A, Amariglio N, Avigdor A, Benyamini N, Hardan I *et al.* Translocation t(11;14) in newly diagnosed patients with multiple myeloma: Is it always favorable? *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55: 710–718.
- 135 Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S *et al.* IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; 28: 269–277.
- 136 Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ *et al.* A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012; 26: 349–355.
- 137 Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J *et al.* International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3412–3420.
- 138 Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies F *et al.* A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2019; 33: 159.
- 139 Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 335–348.
- 140 Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM *et al.* Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3911–3920.
- 141 Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I *et al.* Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature*

Communications 2014; 5: 2997.

142 Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D *et al.* Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014; 25: 91–101.

143 Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F *et al.* Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12: 115–130.

144 Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng W-J *et al.* Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12: 131–144.

145 Cormier F, Monjanel H, Fabre C, Billot K, Sapharikas E, Chereau F *et al.* Frequent Engagement of RelB Activation Is Critical for Cell Survival in Multiple Myeloma. *PLOS ONE* 2013; 8: e59127.

146 Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 100–113.

147 Drawid A, Kaura S, Kiely D, Hussein MA, Kaman M, Gilra N *et al.* Impact of Novel Therapies on Multiple Myeloma Survival– Current and Future Outcomes. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 2015; 15: e63.

148 Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 1984; 310: 1353–1356.

149 Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2007; 17: 1061–1075.

150 Spanswick VJ, Lowe HL, Newton C, Bingham JP, Bagnobianchi A, Kiakos K *et al.* Evidence for different mechanisms of ‘unhooking’ for melphalan and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links in vitro and in clinical acquired resistant tumour samples. *BMC Cancer* 2012; 12: 436.

151 Sharma S, Lichtenstein A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood* 2008; 112: 1338–1345.

152 Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood* 1992; 80: 887–890.

153 Hernández JM, García-Sanz R, Golvano E, Bladé J, Fernandez-Calvo J, Trujillo J *et al.* Randomized comparison of dexamethasone combined with melphalan versus melphalan with prednisone in the treatment of elderly patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 127: 159–164.

154 Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36: 561–584.

155 Nunes AT, Annunziata CM. Proteasome inhibitors: structure and function. *Seminars in Oncology* 2017; 44: 377–380.

156 Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773–785.

157 Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P *et al.* Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003; 101: 1530–1534.

158 Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334: 1081–1086.

159 Murray MY, Auger MJ, Bowles KM. Overcoming bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 804–808.

160 Barrio S, Stühmer T, Da-Viá M, Barrio-García C, Lehnert N, Besse A *et al.* Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 2018; : 1.

161 Raza S, Safyan RA, Lentzsch S. Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* 2017; 17: 846–857.

162 Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 683–687.

- 163 Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M *et al.* Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science* 2014; 343: 301–305.
- 164 Huang S-Y, Lin C-W, Lin H-H, Yao M, Tang J-L, Wu S-J *et al.* Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells is associated with superior response of thalidomide- and lenalidomide-based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2014; 93: 1371–1380.
- 165 Barrio S, Munawar U, Zhu YX, Giesen N, Shi C-X, Viá MD *et al.* IKZF1/3 and CRL4CRBN E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Haematologica* 2020; 105: e237–e241.
- 166 Kortüm KM, Zhu YX, Shi CX, Jedlowski P, Stewart AK. Cereblon binding molecules in multiple myeloma. *Blood Reviews* 2015; 29: 329–334.
- 167 Wudhikarn K, Wills B, Lesokhin AM. Monoclonal antibodies in multiple myeloma: Current and emerging targets and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2020; 33: 101143.
- 168 Trudel S, Moreau P, Touzeau C. Update on elotuzumab for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma: patients' selection and perspective. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 5813–5822.
- 169 Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K *et al.* DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008; 456: 66–72.
- 170 Stewart AK, Chang H, Trudel S, Anderson KC, Richardson P, Alsina M *et al.* Diagnostic evaluation of t(4;14) in multiple myeloma and evidence for clonal evolution. *Leukemia* 2007; 21: 2358–2359.
- 171 Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306–313.
- 172 Davis A, Gao R, Navin N. Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2017; 1867: 151–161.
- 173 Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E *et al.* Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 1067–1076.
- 174 Bochtler T, Merz M, Hielscher T, Granzow M, Hoffmann K, Krämer A *et al.* Cytogenetic intraclonal heterogeneity of plasma cell dyscrasia in AL amyloidosis as compared with multiple myeloma. *Blood Adv* 2018; 2: 2607–2618.
- 175 Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
- 176 Servant N, Roméjon J, Gestraud P, La Rosa P, Lucotte G, Lair S *et al.* Bioinformatics for precision medicine in oncology: principles and application to the SHIVA clinical trial. *Front Genet* 2014; 5. doi:10.3389/fgene.2014.00152.
- 177 Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659–1672.
- 178 Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031–1037.
- 179 Ruiz-Heredia Y, Sánchez-Vega B, Onecha E, Barrio S, Alonso R, Martínez-Ávila JC *et al.* Mutational screening of newly diagnosed multiple myeloma patients by deep targeted sequencing. *Haematologica* 2018. doi:10.3324/haematol.2018.188839.
- 180 González-Calle V, Fonseca R. [Towards precision medicine in myeloma: new evidence and challenges]. *Medicina (B Aires)* 2017; 77: 222–226.
- 181 Medina A, Jiménez C, Sarasquete ME, González M, Chillón MC, Balanzategui A *et al.* Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients. *Blood Cancer J* 2020; 10: 14.
- 182 Boyd SD, Marshall EL, Merker JD, Maniar JM, Zhang LN, Sahaf B *et al.* Measurement and clinical monitoring of human lymphocyte clonality by massively parallel VDJ pyrosequencing. *Sci Transl Med* 2009; 1: 12ra23.
- 183 Martínez-Lopez J, Sánchez-Vega B, Barrio S, Cuenca I, Ruiz-Heredia Y, Alonso R *et al.* Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 1446–1449.

- 184 Onecha E, Linares M, Rapado I, Ruiz-Heredia Y, Martinez-Sanchez P, Cedena T *et al.* A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019; 104: 288–296.
- 185 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; 26: 1986–2010.
- 186 Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN *et al.* Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006; 7: 216.
- 187 Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135–1145.
- 188 van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257–2317.
- 189 Lefranc M-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database®. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 307–310.
- 190 Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv:13033997 [q-bio]* 2013. <http://arxiv.org/abs/1303.3997> (accessed 15 Apr2020).
- 191 Saunders CT, Wong WSW, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor–normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012; 28: 1811–1817.
- 192 Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 2009; 25: 2283–2285.
- 193 Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.
- 194 Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J Mol Diagn* 2017; 19: 4–23.
- 195 Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nature Methods* 2015; 12: 380–381.
- 196 Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Computational Biology* 2016; 12: e1004873.
- 197 Blokzijl F, Janssen R, van Boxtel R, Cuppen E. MutationalPatterns: comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Med* 2018; 10: 33.
- 198 H M, P T. PANTHER Pathway: An Ontology-Based Pathway Database Coupled With Data Analysis Tools. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2009; 563. doi:10.1007/978-1-60761-175-2_7.
- 199 Pfeifer GP. Mutagenesis at Methylated CpG Sequences. In: Doerfler W, Böhm P (eds). *DNA Methylation: Basic Mechanisms*. Springer: Berlin, Heidelberg, 2006, pp 259–281.
- 200 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500: 415–421.
- 201 Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE *et al.* Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 2018; 132: 587–597.
- 202 Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG *et al.* Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* 2008; 456: 53–59.
- 203 Krøigård AB, Thomassen M, Lænkholm A-V, Kruse TA, Larsen MJ. Evaluation of Nine Somatic Variant Callers for Detection of Somatic Mutations in Exome and Targeted Deep Sequencing Data. *PLOS ONE* 2016; 11: e0151664.
- 204 Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; 458: 719–724.
- 205 Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases.

Biology of the Cell 2009; 101: 251–262.

206 Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M *et al.* Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 588–597.

207 Fra AM, Mastroianni N, Mancini M, Pasqualetto E, Sitia R. Human caveolin-1 and caveolin-2 are closely linked genes colocalized with WI-5336 in a region of 7q31 frequently deleted in tumors. *Genomics* 1999; 56: 355–356.

208 Gubbels JA, Felder M, Horibata S, Belisle JA, Kapur A, Holden H *et al.* MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Molecular Cancer* 2010; 9: 11.

209 Saxena S, Hayashi Y, Wu L, Awaji M, Atri P, Varney ML *et al.* Pathological and functional significance of Semaphorin-5A in pancreatic cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 2017; 9: 5931–5943.

210 Lu T-P, Tsai M-H, Lee J-M, Hsu C-P, Chen P-C, Lin C-W *et al.* Identification of a Novel Biomarker, SEMA5A, for Non-Small Cell Lung Carcinoma in Nonsmoking Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2590–2597.

211 Purohit A, Sadanandam A, Myneni P, Singh RK. Semaphorin 5A mediated cellular navigation: connecting nervous system and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846: 485–493.

212 White BS, Lanc I, O’Neal J, Gupta H, Fulton RS, Schmidt H *et al.* A multiple myeloma-specific capture sequencing platform discovers novel translocations and frequent, risk-associated point mutations in IGLL5. *Blood Cancer Journal* 2018; 8. doi:10.1038/s41408-018-0062-y.

213 Dataset - HPA Tissue Gene Expression Profiles. <https://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/dataset/HPA+Tissue+Gene+Expression+Profiles> (accessed 5 Jul2020).

214 Kasar S, Kim J, Improgo R, Tiao G, Polak P, Haradhvala N *et al.* Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution. *Nat Commun* 2015; 6: 1–12.

215 de Miranda NFCC, Georgiou K, Chen L, Wu C, Gao Z, Zaravinos A *et al.* Exome sequencing reveals novel mutation targets in diffuse large B-cell lymphomas derived from Chinese patients. *Blood* 2014; 124: 2544–2553.

216 Mikulasova A, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Jackson GH, Smetana J *et al.* The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica* 2017; 102: 1617–1625.

217 Milholland B, Auton A, Suh Y, Vijg J. Age-related somatic mutations in the cancer genome. *Oncotarget* 2015; 6: 24627–24635.

218 Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18238–18242.

219 López-Corral L, Sarasquete ME, Beà S, García-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA *et al.* SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia* 2012; 26: 2521–2529.

220 Abraham RS, Ballman KV, Dispenzieri A, Grill DE, Manske MK, Price-Troska TL *et al.* Functional gene expression analysis of clonal plasma cells identifies a unique molecular profile for light chain amyloidosis. *Blood* 2005; 105: 794–803.

221 Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, Diegoli M *et al.* Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r(λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood* 2002; 100: 948–953.

222 Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kyle RA, Gertz MA *et al.* Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood* 2003; 101: 3801–3808.

223 García-Álvarez M, Alonso-Álvarez S, Prieto-Conde I, Jiménez C, Sarasquete ME, Chillón MC *et al.* Immunoglobulin gene rearrangement IGHV3-48 is a predictive marker of histological transformation into aggressive lymphoma in follicular lymphomas. *Blood Cancer J* 2019; 9: 1–10.

224 Alexandrov LB, Stratton MR. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 24: 52–60.

- 225 Hoang PH, Dobbins SE, Cornish AJ, Chubb D, Law PJ, Kaiser M *et al.* Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms. *Leukemia* 2018; : 1.
- 226 Bolli N, Maura F, Minvielle S, Gloznik D, Szalat R, Fullam A *et al.* Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nat Commun* 2018; 9: 3363.
- 227 Yellapantula V, Hulcrantz M, Rustad EH, Wasserman E, Londono D, Cimera R *et al.* Comprehensive detection of recurring genomic abnormalities: a targeted sequencing approach for multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2019; 9: 1–9.
- 228 Bolli N, Li Y, Sathiseelan V, Raine K, Jones D, Ganly P *et al.* A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2016; 6: e467.
- 229 Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, Barrio S, Shi CS, Zhu YX *et al.* Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J* 2016; 6: e397.
- 230 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–424.
- 231 Van Allen EM, Wagle N, Stojanov P, Perrin DL, Cibulskis K, Marlow S *et al.* Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine. *Nat Med* 2014; 20: 682–688.
- 232 Dienstmann R, Dong F, Borger D, Dias-Santagata D, Ellisen LW, Le LP *et al.* Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants. *Mol Oncol* 2014; 8: 859–873.
- 233 Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, Vázquez I, Álvarez S, Cabezón M *et al.* Spanish Guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2020; 188: 605–622.
- 234 Froyen G, Le Mercier M, Lierman E, Vandepoele K, Nollet F, Boone E *et al.* Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. *Cancers* 2019; 11: 2030.
- 235 Jian Y, Chen X, Zhou H, Zhu W, Liu N, Geng C *et al.* Prognostic Impact of Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma: A Retrospective Analysis of 229 Patients. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e3521.
- 236 Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH *et al.* 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* 1995; 86: 4250–4256.
- 237 Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E *et al.* Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000; 95: 1925–1930.
- 238 Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP, Greipp PT, Dispenzieri A, Lacy MQ *et al.* Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2017; 7: e600.
- 239 Migliazza A, Lombardi L, Rocchi M, Trecca D, Chang CC, Antonacci R *et al.* Heterogeneous chromosomal aberrations generate 3' truncations of the NFKB2/lyt-10 gene in lymphoid malignancies. *Blood* 1994; 84: 3850–3860.
- 240 Guo X, Koff JL, Moffitt AB, Cinar M, Ramachandiran S, Chen Z *et al.* Molecular impact of selective NFKB1 and NFKB2 signaling on DLBCL phenotype. *Oncogene* 2017; 36: 4224–4232.
- 241 Chin M, Sive JI, Allen C, Roddie C, Chavda SJ, Smith D *et al.* Prevalence and timing of TP53 mutations in del(17p) myeloma and effect on survival. *Blood Cancer J* 2017; 7: e610.
- 242 Kortüm KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C-X, Zhu Y-X, Bruins L *et al.* Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood* 2016; 128: 1226–1233.
- 243 Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E *et al.* High

incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 2001; 18: 212–224.

244 González-Calle V, Fonseca R. Retos y avances hacia la medicina de precisión en el mieloma múltiple. *Medicina (Argentina)* 2017; 77: 222–226.

8. ANEXOS

Anexo 1. Concentración de ADN y amplificación genómica (Repli-g) de las muestras de amiloidosis AL.

Pacientes	Muestras	Total (ng)	repli-G
Paciente 1	S_1_1	742	No
	S_1_2	593.6	
	S_1_3	445.2	
Paciente 2	S_2_1	1156	No
	S_2_2	1040.4	
	S_2_3	924.8	
Paciente 3	S_3_1	< 50 ng	Si
	S_3_2		
	S_3_3		
Paciente 4	S_4_1	1240	No
	S_4_2	1116	
	S_4_3	992	
Paciente 5	S_5_1	< 50 ng	Si
	S_5_2		
	S_5_3		
Paciente 6	S_6_1	1324	No
	S_6_2	1059.2	
	S_6_3	794.4	
Paciente 7	S_7_1	< 50 ng	Si
	S_7_2		
	S_7_3		
Paciente 8	S_8_1	428	No
	S_8_2	342	
	S_8_3	< 50 ng	Si
Paciente 9	S_9_1	< 50 ng	Si
	S_9_2		
	S_9_3		
Paciente 10	S_10_1	399.6	No
	S_10_2	239.8	
	S_10_3	< 50 ng	Si

Paciente 11	S_11_1	< 50 ng	Si
	S_11_2		
	S_11_3		
Paciente 12	S_12_1	432	No
	S_12_2	259.2	
	S_12_3	< 50 ng	Si
Paciente 13	S_13_1	369.2	No
	S_13_2	276.9	
	S_13_3	< 50 ng	
Paciente 14	S_14_1	668	No
	S_14_2	601.1	
	S_14_14	534.4	
Paciente 15	S_15_1	2900	No
	S_15_2	2320	
	S_15_3	1740	
Paciente 16	S_16_1	< 50 ng	Si
	S_16_2		
	S_16_3		
Paciente 17	S_20_1	< 50 ng	Si
	S_20_2		
	S_20_3		
Paciente 18	S_18_1	404	No
	S_18_2	303	
	S_18_3	< 50 ng	
Paciente 19	S_19_1	< 50 ng	Si
	S_19_2		
	S_19_3		
Paciente 20	S_20_1	1200	No
	S_20_2	1080	
	S_20_3	960	
Paciente 21	S_21_1	412	No
	S_21_2	247.2	
	S_21_3	< 50 ng	Si

Paciente 22	S_22_1	1412	No
	S_22_2	1129.6	
	S_22_3	847.2	
Paciente 23	S_23_1	428	No
	S_23_2	256.8	
	S_23_3	< 50 ng	Si
Paciente 24	S_24_1	424	No
	S_24_2	318	
	S_24_3	< 50 ng	
Paciente 25	S_25_1	660	No
	S_25_2	528	
	S_25_3	396	
Paciente 26	S_26_1	< 50 ng	Si
	S_26_2		
	S_26_3		
Paciente 27	S_27_1	564	No
	S_27_2	507.6	
	S_27_3	451.2	

Anexo 2. Resultados de secuenciación de la validación de la versión 2 del panel de mieloma múltiple.

Muestra	Nº Lecturas	Nº Lecturas mapeadas	% Trimming	% Duplicados	% en Sondas	Tamaño de inserto	Cobertura media
M1	25.075.958	7.221.857	2,73	70,24	39,77	244	1.158
M2	30.392.946	7.281.253	2,50	75,29	41,13	210	1.229
M3	23.767.034	6.338.376	2,71	72,45	48,12	237	1.240
M4	25.268.352	6.249.381	2,73	74,42	44,67	234	1.140
M5	28.785.296	7.335.947	2,74	73,62	45,50	249	1.358
M6	33.491.994	8.031.900	2,55	75,23	43,26	220	1.421
M7	25.754.678	6.710.246	2,87	72,99	47,79	253	1.305
M8	31.299.384	7.759.028	2,26	74,52	41,09	202	1.331
M9	30.860.960	7.477.790	2,67	74,94	45,43	237	1.381
M10	18.630.208	5.054.892	2,66	71,99	44,92	264	951
M11	20.040.896	5.754.092	2,72	70,32	56,03	270	1.296
M12	25.832.790	6.760.006	2,51	73,04	44,84	227	1.244
M13	28.877.776	6.986.014	2,58	75,01	42,87	237	1.230
M14	33.655.120	8.453.068	2,54	74,10	41,54	213	1.453
M15	31.446.542	7.490.712	2,50	75,42	36,85	225	1.150
M16	29.848.132	7.275.963	2,45	74,87	40,73	209	1.248
M17	27.085.496	6.752.623	2,30	74,35	41,40	221	1.156
M18	31.568.752	7.291.576	2,45	76,16	42,24	214	1.297
M19	33.197.414	7.987.475	2,52	75,14	40,33	220	1.321
M20	25.639.648	6.644.554	2,67	73,20	49,59	235	1.340
M21	26.323.882	7.018.756	2,55	72,52	40,89	231	1.168
M22	28.254.530	7.500.430	2,38	72,69	39,31	235	1.207
Control 1	34.952.710	8.255.283	2,78	75,52	37,58	227	1.407
Control 2	33.373.436	7.711.980	2,63	76,10	38,09	215	1.309
Control 3	32.939.636	7.933.527	2,75	75,06	37,89	230	1.351
Control 4	31.996.058	7.032.955	2,77	77,20	41,25	217	1.293
Control 5	31.279.420	7.028.187	2,85	76,69	42,04	231	1.326
Control 6	32.974.726	7.240.907	2,82	77,21	38,88	234	1.254

Control 7	35.776.660	8.118.971	2,48	76,58	34,76	202	1.252
Control 8	37.321.258	8.956.659	2,51	75,23	34,04	198	1.350
Control 9	31.337.278	7.608.844	2,67	74,89	36,95	199	1.260
Control 10	29.252.636	7.245.073	2,51	74,45	36,87	205	1.199
Media	30860960, 00	7265885,1 6	2,61	74,42	41,77	226,41	1269,53
Mediana	30626953, 00	7278608,0 0	2,61	74,88	41,19	227,00	1276,50

Anexo 3. Publicaciones.**1. Immunogenetic characterization of clonal plasma cells in systemic light-chain amyloidosis.**

Cuenca I *et al.* *Leukemia*. (2020). DOI:10.1038/s41375-020-0800-6. PMID: 32203144

2. Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients.

Medina A *et al.* *Blood Cancer Journal* (2020). DOI: 10.1038/s41408-020-0283-8. PMID: 32029700

3. IKZF1/3 and CRL4-CRBN E3 Ubiquitin Ligase Mutations and IMiD Resistance in Multiple Myeloma.

Barrio S *et al.* *Haematologica* (2019). DOI:10.3324/haematol.2019.217943. PMID: 31558666

4. Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma.

Barrio S *et al.* *Leukemia*. (2019) DOI: 10.1038/s41375-018-0216-8. PMID: 30026573

5. Mutational screening of newly diagnosed multiple myeloma patients by deep targeted sequencing.

Ruiz-Heredia Y *et al.* *Haematologica*. (2018). DOI:10.3324/haematol.2018.188839. PMID:29954938

6. Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma.

Martinez-Lopez J *et al.* *Leukemia*. (2017). DOI: 10.1038/leu.2017.58. PMID: 28210002



Multiple myeloma gammopathies

Immunogenetic characterization of clonal plasma cells in systemic light-chain amyloidosis

Isabel Cuenca¹ · Daniel Alameda² · Beatriz Sanchez-Vega¹ · David Gomez-Sanchez³ · Diego Alignani² · Marta Lasa² · Esther Onecha¹ · Ramon Lecumberri² · Felipe Prosper^{1b} · Enrique M. Ocio⁴ · Maria Esther González⁵ · Alfonso García de Coca⁶ · Javier De La Rubia⁷ · Mercedes Gironella^{1b} · Luis Palomera⁹ · Albert Oriol¹⁰ · Maria Casanova¹¹ · Valentin Cabañas¹² · Francisco Taboada¹³ · Albert Pérez-Montaña¹⁴ · Felipe De Arriba¹⁵ · Noemi Puig¹⁶ · Gonzalo Carreño-Tarragona¹ · Santiago Barrio¹ · Jose Enrique de la Puerta¹⁷ · Angel Ramirez-Payer¹³ · Isabel Krsnik¹⁸ · Juan Jose Bargay¹⁹ · Juan Jose Lahuerta¹ · Maria-Victoria Mateos^{1b} · Jesus F. San-Miguel² · Bruno Paiva² · Joaquin Martinez Lopez¹

Received: 19 November 2019 / Revised: 4 March 2020 / Accepted: 9 March 2020
© The Author(s) 2020. This article is published with open access

To the Editor:

Sequence-based analysis has come to play an integral role in many hematological malignancies [1], but disorders such as systemic light-chain (AL) amyloidosis remain poorly characterized due to its low incidence and small tumor size [2, 3]. Thus, greater knowledge about the immunogenetic

landscape of AL amyloidosis is required since, for example, potential differences between the genomic profiles of AL amyloidosis and multiple myeloma (MM) could help identifying patients with monoclonal gammopathies at greater risk of developing AL amyloidosis and monitor presymptomatic organ damage [4, 5].

To gain further insight into the immunogenetic landscape of AL amyloidosis, we performed whole-exome sequencing (WES) on highly purified bone marrow clonal plasma cells (PCs) isolated by fluorescence activation cell sorting (FACS) based on patient-specific aberrant phenotypes. A total of 27 patients with confirmed new diagnosis of AL amyloidosis based on the presence of amyloid-related systemic syndrome, positive amyloid tissue staining with Congo red, restricted light-chain deposition by

These authors contributed equally: Isabel Cuenca, Daniel Alameda

These authors jointly supervised this work: Bruno Paiva, Joaquin Martinez Lopez

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41375-020-0800-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Joaquin Martinez Lopez
jmarti01@med.ucm.es

¹ Hospital 12 de Octubre, Madrid, CNIO, Universidad Complutense, Madrid, Spain

² Clinica Universidad de Navarra, Centro de Investigacion Medica Aplicada (CIMA), IDISNA, CIBERONC Pamplona, Pamplona, Spain

³ Clinical and Traslational Lung Cancer Research Unit, i+12 Research Institute and Biomedical Research Networking Center in Oncology (CIBERONC), Madrid, Spain

⁴ Universidad de Cantabria, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

⁵ Hospital de Cabueñes, Gijon, Spain

⁶ Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain

⁷ Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain

⁸ Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁹ Hospital Clinico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain

¹⁰ Hospital German Trias i Pujol, Badalona, Spain

¹¹ Hospital Costa del Sol, Marbella, Spain

¹² Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

¹³ Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

¹⁴ Hospital Son Espases, Palma, Spain

¹⁵ Hospital Universitario Morales Meseguer. IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain

¹⁶ Hospital Universitario de Salamanca, Instituto de Investigacion Biomedica de Salamanca (IBSAL), Centro de Investigación del Cancer (IBMCC-USAL, CSIC), Salamanca, Spain

¹⁷ Hospital de Galdakao, Vizcaya, Spain

¹⁸ Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain

¹⁹ Hospital Universitario Son Llàtzer, Palma, Spain

immunohistochemistry or mass spectrometry, and evidence of PC clonality were investigated. Patients' demographics and clinical characteristics are described in Supplementary Table 1. PCs were collected and processed in triplicates followed by whole genome amplification of samples with genomic DNA amounts <50 ng (Supplementary Table 2). Afterwards, library construction, exome enrichment, and sequencing were performed individually. An overall average depth of 63× and mean on-target coverage of 84% were obtained. Data were deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under the PRJNA596656 access number. To increase specificity, only single-nucleotide variants (SNVs) and indels detected by both Strelka [6] and Varscan2 [7] variant callers were selected. Moreover, only somatic mutations present in two of three libraries per patient were considered positive. Germline variants were excluded through WES of matched peripheral blood cells. The mutational profile of patients with AL amyloidosis was compared with that of patients with MM enrolled in CoMMpass ($n = 930$; IA13c dataset). The CNVkit [8] was used to determine copy number abnormalities (CNA) from WES data (in 21 of the 27 AL patients). Deep sequencing of B-cell receptor immunoglobulin (BcR Ig) gene rearrangements was performed in all patients as previously described [9], and compared with that

of a series of 62 newly diagnosed MM patients. Detailed methodology is available in the Supplementary methods.

We identified a total of 718 exonic, non-immunoglobulin, nonsynonymous mutations with a variant allelic fraction (VAF) >5% (683 SNV and 35 indel). Total number and type of mutations are described in Supplementary Fig. 1. Interestingly, mutational burden was significantly correlated with patients' age ($R = 0.51$, $p < 0.001$) (Supplementary Fig. 2) though not tumor burden (data not shown). Only 37 out of 662 (5.5%) mutated genes were altered more than once (Fig. 1). That notwithstanding, 23 of the 27 cases (85%) presented with at least one mutation in one of the 37 genes (range, 1–11); being *FAT4*, *IGLL5*, *MUC16*, and *SSH2* the most frequently mutated genes (≥ 3 patients). With a median of 18 mutations per sample (range, 8–92), patients with AL amyloidosis are closer to monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) (median of 19) [10] rather than MM (median of 38 in the CoMMpass IA13c dataset, $p < 0.0001$; Fig. 2a) in terms of mutational load. By contrast, the presence of CNA was more frequent in AL amyloidosis (19/21, 90.5%; Supplementary Fig. 3) than MGUS (60.6% in Mikulasova et al.) [10] and similar to MM patients (virtually 100%) [11]. Overall, these results underpin recent observations based on the immunophenotypic characterization of clonal PCs [5], and locate AL

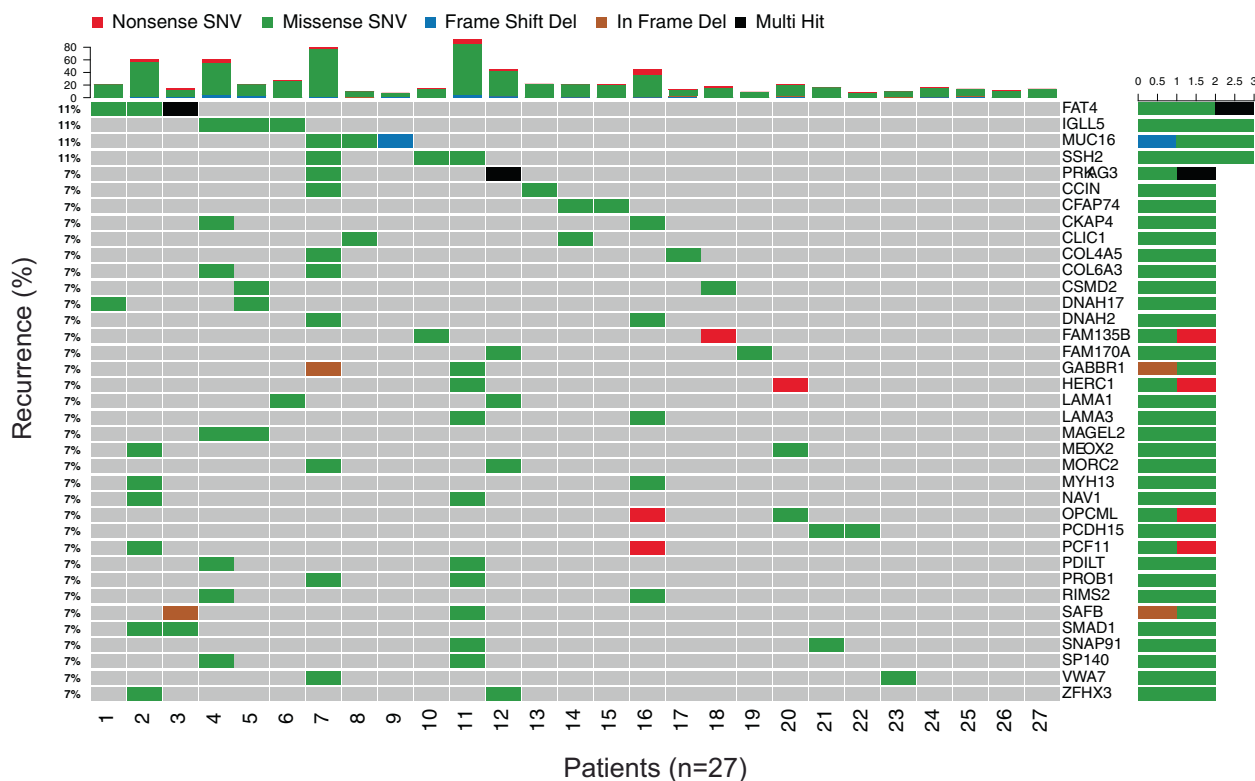


Fig. 1 Genes recurrently mutated in AL. Distribution per patient of the most frequently mutated genes ($n = 37$). Boxes were colored according to the type of mutation. Top barplots define the total number of mutations per patient.

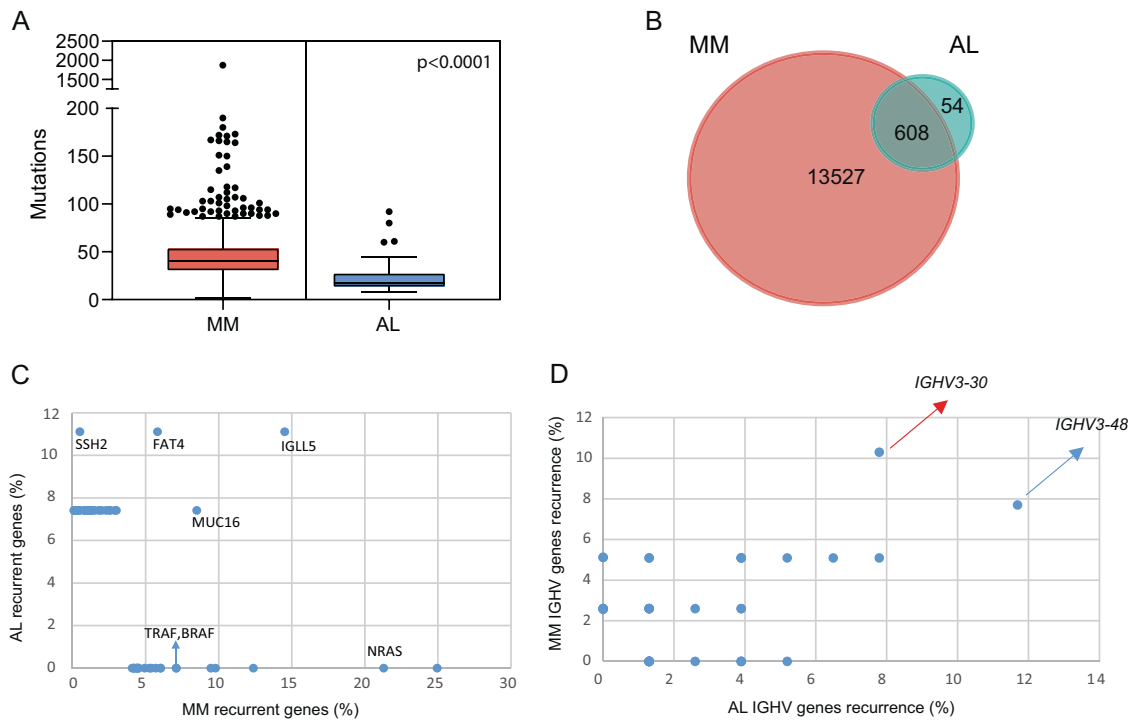


Fig. 2 The mutational landscape in AL and MM. **a** Number of mutations in patients with newly diagnosed AL and MM. **b** Shared and private mutations between AL and MM. **c** Driver genes based in its

recurrence in AL and MM. **d** Predominant Ig heavy chain gene rearrangements used in AL and MM.

amyloidosis in the crossroad between MGUS and MM also in genetic grounds. Of note, the only alterations associated with inferior progression-free survival were gains in chromosomes 9 and 19 (Supplementary Fig. 4a, b), whereas del (13q) was associated with higher NT-proBNP levels (Supplementary Fig. 5). Furthermore, patients with +1q also displayed greater risk of cardiac involvement (Supplementary Table 3).

Interestingly, various MM-defined driver mutations [12] were undetected in patients with AL amyloidosis (e.g., *NRAS*, *BRAF*, and *TRAF*) or observed only once (e.g., *DIS3* and *DUSP2*), most of them being subclonal with a median VAF of 23% (Supplementary Fig. 6) that was unrelated to the lower tumor burden in AL amyloidosis due to the FACS sorting strategy used to isolate clonal PCs, as described above. Simultaneous analysis of ours and the CoMM-pass datasets unveiled that out of 14,135 mutated genes, only 608 (4.4%) were shared between AL amyloidosis and MM (Fig. 2b), with considerable differences in their recurrence (Fig. 2c). Of note, none of the 65 genes exclusively mutated in AL amyloidosis were recurrent. Furthermore, only four genes (*XKR5*, *PRSS45*, *PKD1L2*, and *SRRM5*) overlapped with the 105 described by Boyle et al. [3] as AL restricted. While the results from these two studies suggest that MM recurrent mutations are unfrequently detected in patients with AL amyloidosis, recent data based on WES and targeted sequencing reported by Huang et al.

[13] identified recurrent mutations in *KRAS*. Furthermore, *IGLL5* emerged as one of the most commonly mutated genes in ours and the latter series, but not in that analyzed by Boyle et al. We have found no association between mutated genes and patients' outcome, whereas Huang et al. identified three mutated genes with prognostic value. Altogether, further studies in larger series of patients are warranted to shed more light into the mutational landscape and potential clinical correlations in AL amyloidosis.

In the absence of a unifying genetic event defining AL amyloidosis, BcR Ig gene rearrangements emerge as an alternative to understand the propensity for the deposition of monoclonal Ig light-chains in the form of β -sheet fibrils, as well as organ tropism. Previous studies based on PCR amplification of individual (typically Lambda) light-chain variable gene (VL) families have shown a potential bias in germline donor use in patients with AL amyloidosis [14] and that VL gene usage may influence clinical presentation, organ deposition, and outcome [15, 16]. Hence, we performed next-generation sequencing (NGS) of Ig heavy chain gene (IGH) and Kappa light-chain (IGK) rearrangements both in patients with AL amyloidosis ($n = 27$) and MM ($n = 63$) to provide complementary information on IGH and IGK repertoires, clonal variability, and extent of somatic hypermutations. A total of 39 IGHV-D-J and IGK-V-J clonotypes were identified and 5 of the 27 (19%) patients with AL amyloidosis displayed more than two

clonal rearrangements. This extent of clonal heterogeneity differs ($p = 0.024$) from that found in our MM series (3.9%). Using a cut-off of 98% to define homology, 9 of 39 sequences (23%) in AL amyloidosis were considered as mutated, which is slightly less when compared with that found in MM (36%). The CDR3 length was not significantly different between AL amyloidosis and MM (median of 54 versus 51 amino acids). The most frequent IGH gene involved in AL amyloidosis was *IGHV3-48* (recurrence of 10.3%) and 100% of patients who have this rearrangement had kidney involvement ($p = 0.025$) (Supplementary Table 4), whereas *IGHV3-30* was the most recurrent (12%) in MM (Fig. 2d). Thus, expression of *IGHV3-48* adds up to *IGLV6-57* as germline Ig genes associated with dominant kidney deposition [14, 15]. Of note, we found no significant differences regarding IGH and IGK repertoires, clonal variability, and extent of somatic hypermutations between patients with light-chain only versus heavy- and light-chain M-component (data not shown).

This study confirms previous observations that AL amyloidosis cannot be defined by a singular or a set of well-defined genetic events. In fact, based on combined results from WES of 99 patients (27 in this study, 24 in Boyle et al. [3], and 48 in Huang et al. [13]), 63 genes were found to be recurrently mutated. By contrast, our study further supports the notion that germline Ig gene use is a key determinant in the pathogenesis of AL amyloidosis [16], and unveils novel associations of cytogenetic abnormalities with organ involvement and outcome. The extent of CNA was similar between AL and MM, but MM-driver genes were not recurrently mutated in AL, which instead was marked by greater clonal heterogeneity (i.e., similarly to MGUS) [10]. Taken together with differential predominance of IGH rearrangements, our results suggest that amongst other factors, Ig germline genes rather than specific cytogenetic abnormalities predispose light-chains from a PC clone to adopt an aberrant conformation, typically closer to patients' MGUS stage before the development of higher tumor burden and accumulation of MM-driver mutations. Given the high frequency of Lambda light-chain deposition in AL, further studies are warranted to investigate if clonal mutations in *IGLL5* (median VAF, 64%) contribute to this process. In such cases, its detection together with other candidate genes (e.g., *FAT4*, *MUC16*, and *SSH2*) through NGS diagnostics could emerge as novel risk markers for AL amyloidosis in patients with monoclonal gammopathies.

Acknowledgements This study was supported by the Centro de Investigación Biomédica en Red—Área de Oncología—del Instituto de Salud Carlos III (CIBERONC; CB16/12/00369; and CB16/12/00489), Instituto de Salud Carlos III/Subdirección General de Investigación Sanitaria (FIS No. PI13/02196), Asociación Española Contra el Cáncer (GCB120981SAN and the Accelerator Award), CRIS against Cancer foundation grant 2014/0120, and the Black Swan Research Initiative of the International Myeloma Foundation.

Author contributions JFSM, BP, JML, and JLL conceived the idea and together with IC and BSV designed the study. IC, BSV, DGS, DA, BP, EO, and SB analyzed and interpreted data. IC and GCT performed statistical analysis. ML acquired the clinical data. DAlignani performed cell sorting. RL, FP, EMO, MEG, AGdC, JdIR, MG, LP, AO, MC, VC, FT, AP, FdA, NP, MVM, JLL, and JFSM provided study materials and patients. IC, BSV, DA, JML, and BP wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Merker JD, Valouev A, Gotlib J. Next-generation sequencing in hematologic malignancies: what will be the dividends? *Ther Adv Hematol*. 2012;3:333–9.
- Paiva B, Martinez-Lopez J, Corchete LA, Sanchez-Vega B, Rapado I, Puig N, et al. Phenotypic, transcriptomic, and genomic features of clonal plasma cells in light-chain amyloidosis. *Blood*. 2016;127:3035–9.
- Boyle EM, Ashby C, Wardell CP, Rowczenio D, Sachchithanatham S, Wang Y, et al. The genomic landscape of plasma cells in systemic light chain amyloidosis. *Blood*. 2018;132:2775–7.
- Merlini G, Comenzo RL, Seldin DC, Wechalekar A, Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis. *Expert Rev Hematol*. 2014;7:143–56.
- Puig N, Paiva B, Lasa M, Burgos L, Perez JJ, Merino J, et al. Flow cytometry for fast screening and automated risk assessment in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia*. 2019;33:1256–67.
- Saunders CT, Wong WSW, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor–normal sample pairs. *Bioinformatics*. 2012;28:1811–7.
- Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25:2283–5.
- Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: genome-wide copy number detection and visualization from targeted DNA sequencing. *PLOS Comput Biol*. 2016;12:e1004873.
- Martinez-Lopez J, Sanchez-Vega B, Barrio S, Cuenca I, Ruiz-Heredia Y, Alonso R, et al. Analytical and clinical validation of a

- novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31:1446–9.
10. Mikulasova A, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Jackson GH, Smetana J, et al. The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica*. 2017;102:1617–25.
 11. López-Corral L, Sarasquete ME, Beà S, García-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA, et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia*. 2012;26:2521–9.
 12. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018; 132:587–97.
 13. Huang X-F, Jian S, Lu J-L, Shen K-N, Feng J, Zhang C-L, et al. Genomic profiling in amyloid light-chain amyloidosis reveals mutation profiles associated with overall survival. *Amyloid Int J Exp Clin Investig J Int Soc Amyloidosis*. 2020;27:36–44.
 14. Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, Diegoli M, et al. Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r(λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood*. 2002;100:948–53.
 15. Abraham RS. Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood*. 2003;101:3801–7.
 16. Perfetti V, Palladini G, Casarini S, Navazza V, Rognoni P, Obici L, et al. The repertoire of λ light chains causing predominant amyloid heart involvement and identification of a preferentially involved germline gene, IGLV1-44. *Blood*. 2012;119:144–50.

Immunogenetic characterization of clonal plasma cells in systemic light-chain amyloidosis

Supplemental material

Supplemental Tables and Figures: 4+6

Supplemental index:

Supplemental Methods

Supplemental Table 1. Patient demographics and clinical characteristics of immunoglobulin light-chain amyloidosis (AL) patients (N=27).

Supplemental Table 2. Summary of total genomic DNA isolated per sample. repli-G amplified samples are also specified.

Supplemental Table 3. Contingency table regarding the presence of 1q+ and cardiac involvement.

Supplemental Table 4. Contingency table of patients with IGHV3-48 rearrangement and kidney involvement.

Supplemental Figure 1. Summary of genomic distribution and functional consequences of SNV (A) and INDEL (B) alterations in AL series.

Supplemental Figure 2. Correlation analysis between age and tumor burden.

Supplemental Figure 3. Frequency plot providing an overview of the distributions of gains (red) and losses (blue) as percentages for all 21 patients.

Supplemental Figure 4. Progression free survival (PFS) of AL patients. A) Gains in chromosomes 9 vs other patients, B) Gains in chr 19 vs other patients.

Chr: Chromosome

Supplemental Figure 5. Box plot showing the association of 1 del(13q) was associated with higher NT-proBNP levels. Box plot rectangles show the interquartile ranges (IQR) from the first quartile to the third quartile and the lines in the middle of the boxes represent the medians. The whiskers are drawn to the nearest value not exceeding 1.5 times the IQR.

Supplemental Figure 6. VAF distribution of the 63 MM-driver mutations described by Walker et al.¹ in the CoMMpass IA13c dataset vs our AL series. Box plot rectangles show the interquartile ranges (IQR) from the first quartile to the third quartile and the lines in the middle of the boxes represent the medians. The whiskers are drawn to the nearest value not exceeding 1.5 times the IQR.

Supplemental Methods

Patients

We analyzed 27 light-chain amyloidosis (AL) patients with confirmed diagnosis of AL based on the presence of amyloid-related systemic syndrome, positive amyloid tissue staining with Congo red, and evidence of PC clonality. Organ involvement was defined following the recommendations of Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement.²

Samples were collected through a multicenter study (Hospital Universitario de Salamanca, Clínica Universidad de Pamplona, and Hospital 12 de Octubre), and with the support of the Spanish myeloma group (GEM) after informed consent was given, in accordance with the local ethics committee guidelines and the Helsinki Declaration.

Samples and CD138 isolation

BM aspirates were immunophenotyped using 8-color combinations of monoclonal antibodies, and a direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique (BV421HV450/ BV510/ FITC/ PE/ PerCP-Cy5.5/ PE-Cy7/ APC/ APC-H7): CD138/ CD27/ CD38/ CD56/ CD45/ CD19/ CD117/ CD81. Data acquisition was performed with a FACSCantoll flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences – BD, San Jose, CA) using the FACSDiva 6.1 software (BD), and following the EuroFlow guidelines³. Expression profiles (iPEP) based on the 28 (8+20) different markers evaluated at the single cell level was performed with the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Clonal plasma cells were sorted (FACSAria II, Becton Dickinson Biosciences – BD, San Jose, CA; purity $\geq 97\%$) according to patient-specific aberrant phenotypes.

DNA isolation

We analyzed a total of 54 paired samples, 27 samples of sorted clonal plasma cells, and 27 samples of peripheral blood from the same patient as a control to discard germline variants. Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini and Micro Kits (QIAGEN) for peripheral blood and sorted plasma cells respectively.

Library preparation and sequencing

Whole-exome (WES) capture libraries were generated with the SureSelectQ^{XT} Human All Exon V6 + UTRs Reagent Kit (Agilent Technologies) for Illumina sequencing from 50ng of genomic DNA both tumor and control samples, following manufacturer instructions. Those samples with less than 50ng were amplified by repli-G, as previously described⁴.

For consistency purpose we generated three independent libraries from tumor samples in order discard sequencing artifacts in the bioinformatic analysis. Libraries were multiplexed and 2x150bp paired-end sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 platform (High Output Kit v2).

Bioinformatic analysis

Variant analysis workflow

Sequencing reads quality were evaluated using the FastQC tool⁵. Each replicate was analyzed independently. FASTQ files of all samples were aligned to hg19 human reference with the BWA mem (Burrows–Wheeler aligner-maximum exact matches) aligner, and SNV and small INDELS were analyzed with two different methods Strelka⁶ and VarScan2⁷ using default options.

MAFtools⁸ (<https://github.com/PoisonAlien/mafTools/>) was used for SNV analysis and visualization. Mean depth coverage of 63x was achieved, and the mean on-target coverage was of 84% with 87% (median) of target regions covered by at least 50x. For functional annotation we used the software ANNOVAR.⁹ Then, in-house script was used for variant filtering and somatic variant candidate selection. SNVs and small INDELS were considered if they were present in at least two replicates, their VAF was $\geq 5\%$ and they had a minor allele frequency (MAF) $< 1\%$ in any population from Exome Aggregation Consortium (ExAC) database. A total of 718 mutations were identified and manually reviewed with the Integrative Genomics Viewer (IGV) visualization tool¹⁰ to discard sequencing artifacts. CNVKit software was employed for CNV identification which achieved higher resolution in copy number changes from WES data¹¹ by using targeted reads and the off-target reads. Accurate identification of CNV was not possible in 6 samples with repli-G amplification performed in all 3 replicates.

Immunoglobulin repertoire analysis

The analysis of IGHV-D-J and IGKV-J genes was realized with the same samples used for WES analysis. The amplification of IGH/IGK rearrangements at DNA level was performed according to the previously published¹². The libraries were generated by ligation of specific adaptor oligos (NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™ kit) and sequenced on an Ion S5 sequencer (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA).

The sequencing data were analyzed with MiXCR, a universal framework that processes big immunome data from raw sequences to identify and count clonotypes. MiXCR efficiently handles paired- and single-end reads, considers sequence quality, corrects PCR errors and identifies germline hypermutations.¹³ We analyzed the sequences aligning to the IMGT database (<http://www.imgt.org>). A clonotype was identified when at least the unique rearrangements was present at a frequency above 10%. Sequences with a germline homology of 98% or higher in IGHV genes were considered as unmutated, and those with a homology less than 98% were considered as mutated.

Multiple myeloma dataset

Somatic SNV from CoMMpass IA13c dataset was downloaded from MMRF project (www.themmr.org) (930 patients). Dataset was fully re-annotated by ANNOVAR.⁹ To make our data as comparable as possible, we use the same filtering criteria for AL. Of the total number of patients, only the samples at diagnosis and from bone marrow were selected. Then, we kept only mutations obtained by Strelka and discard variants with VAF \leq 5%, MAF $>$ 1%, UTR and synonymous, IG genes, intronic and non-coding mutations.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS v22 and GraphPad Prism v8 softwares. We performed t-test on parametric variables, and Mann-Whitney on non-parametric variables. For progression-free survival analysis (PFS) we used Kaplan-Meier curves and two-sided long-rank test. Data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Supplemental references

- 1 Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE *et al.* Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 2018; **132**: 587–597.
- 2 Dispenzieri A, Buadi F, Kumar SK, Reeder CB, Sher T, Lacy MQ *et al.* Treatment of Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement. *Mayo Clin Proc* 2015; **90**: 1054–1081.

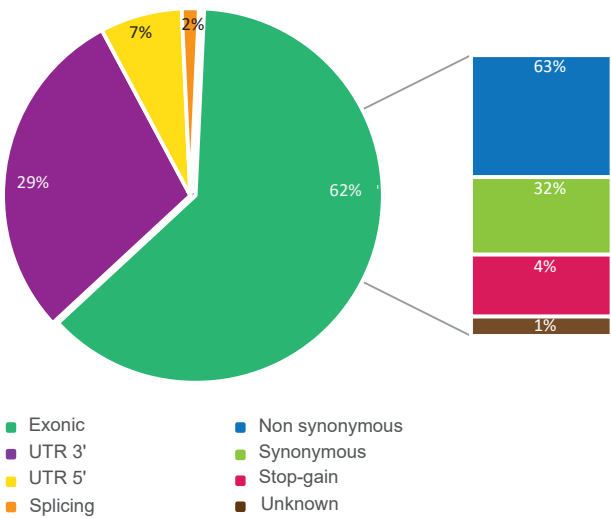
- 3 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; **26**: 1986–2010.
- 4 Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN *et al.* Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006; **7**: 216.
- 5 Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 24 Jan2019).
- 6 Saunders CT, Wong WSW, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor–normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012; **28**: 1811–1817.
- 7 Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinforma Oxf Engl* 2009; **25**: 2283–2285.
- 8 Mayakonda A, Lin D-C, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* 2018; **28**: 1747–1756.
- 9 Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: e164.
- 10 Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G *et al.* Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol* 2011; **29**: 24–26.
- 11 Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Comput Biol* 2016; **12**: e1004873.
- 12 Martinez-Lopez J, Sanchez-Vega B, Barrio S, Cuenca I, Ruiz-Heredia Y, Alonso R *et al.* Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 1446–1449.

- 13 Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* 2015; **12**: 380–381.

Supplemental Figure 1. Summary of genomic distribution and functional consequences of SNV (A) and INDEL (B) alterations in AL series.

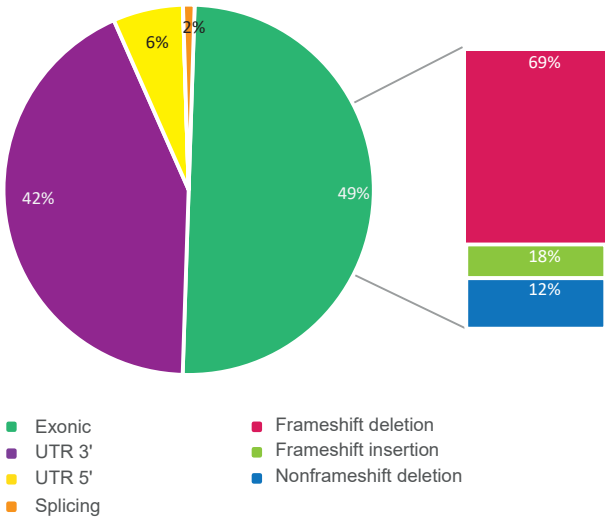
A

Single nucleotide variants (SNV)

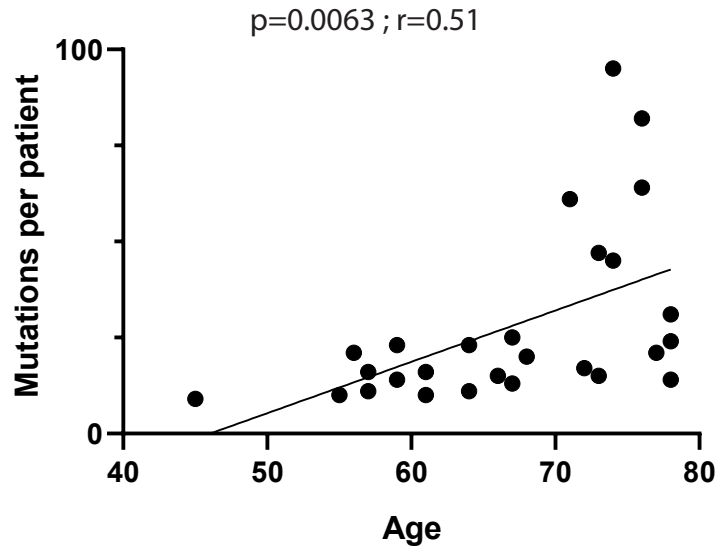


B

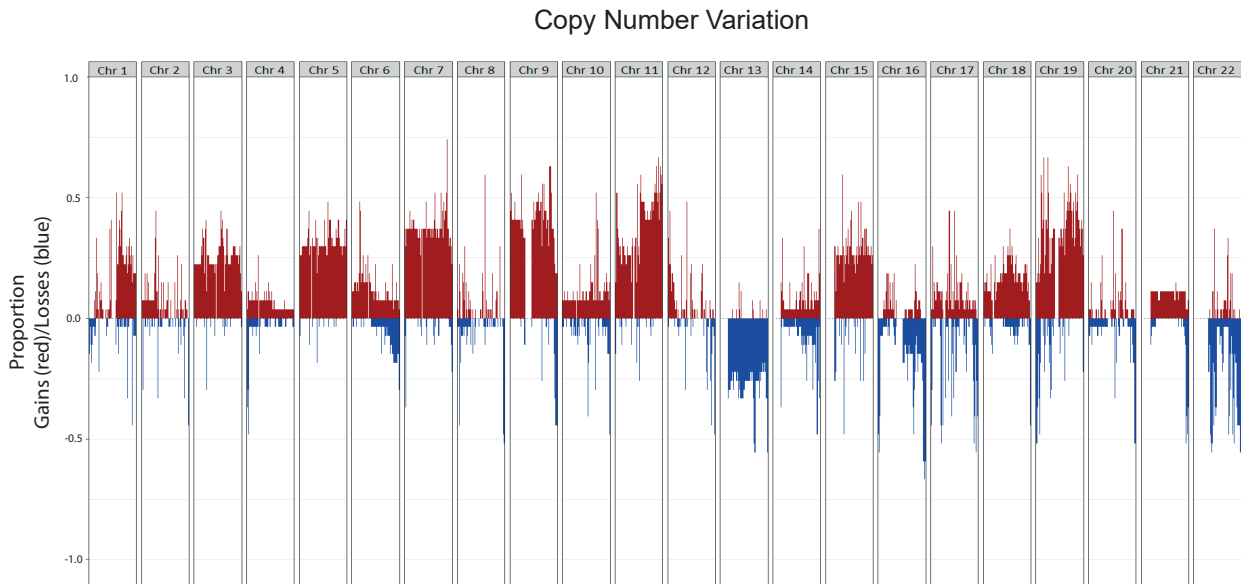
Insetions/deletions (INDEL)



Supplemental Figure 2. Correlation analysis between age and tumor burden.

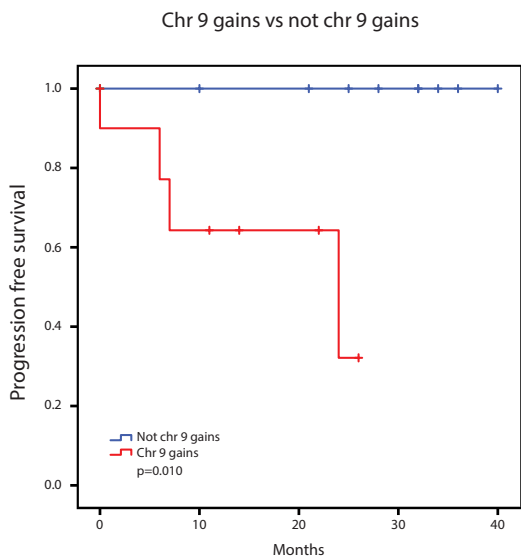


Supplemental Figure 3. Frequency plot providing an overview of the distributions of gains (red) and losses (blue) as percentages for all 21 patients.

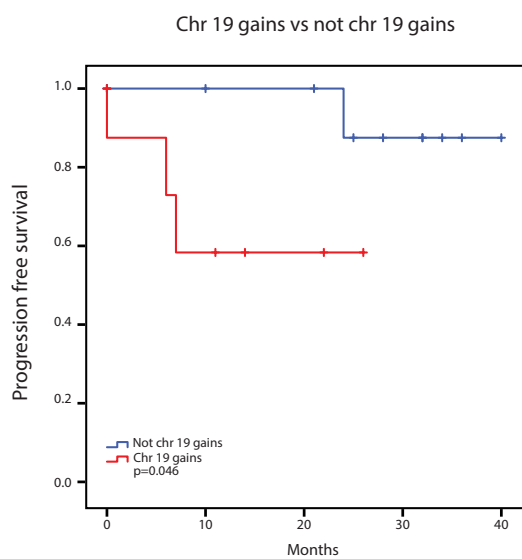


Supplemental Figure 4. Progression free survival (PFS) of AL patients. A) Gains in chromosomes 9 vs other patients, B) Gains in chr 19 vs other patients. Chr:Chromosome

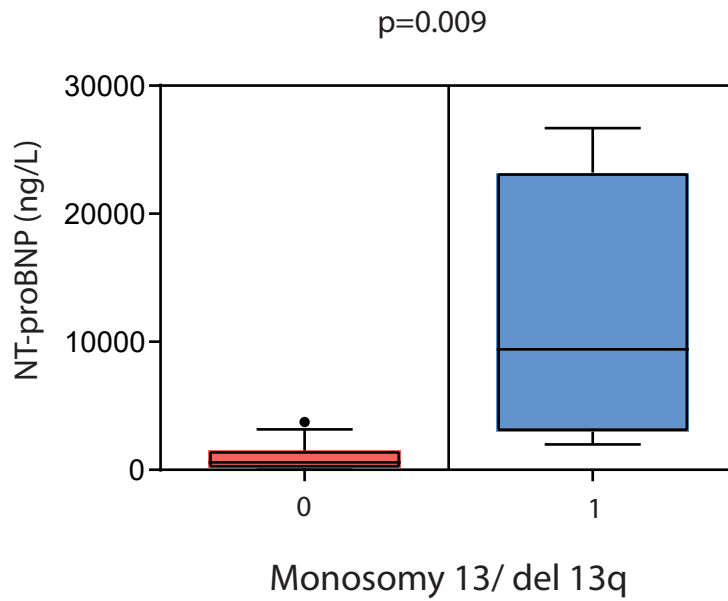
A



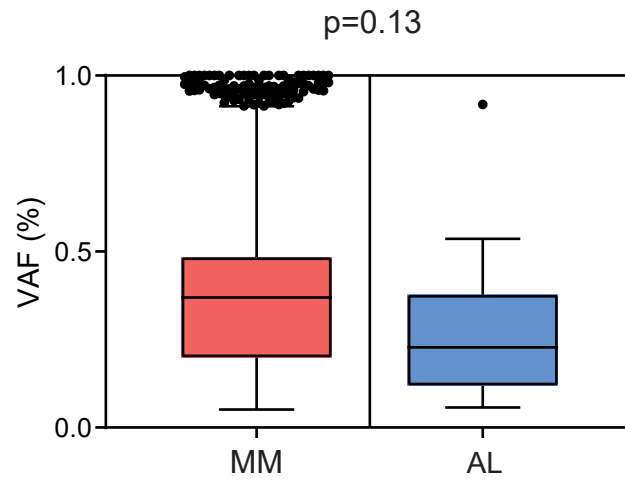
B



Supplemental Figure 5. Box plot showing the association of 1 del(13q) was associated with higher NT-proBNP levels. Box plot rectangles show the interquartile ranges (IQR) from the first quartile to the third quartile and the lines in the middle of the boxes represent the medians. The whiskers are drawn to the nearest value not exceeding 1.5 times the IQR.



Supplemental Figure 6. VAF distribution of the 63 MM-driver mutations described by Walker et al. in the CoMMpass IA13c dataset vs our AL series. Box plot rectangles show the interquartile ranges (IQR) from the first quartile to the third quartile and the lines in the middle of the boxes represent the medians. The whiskers are drawn to the nearest value not exceeding 1.5 times the IQR.



Supplemental Table 1. Patient demographics and clinical characteristics of immunoglobulin light-chain amyloidosis (AL) patients (N=27).

Patient demographics and clinical characteristics	Distribution
Male / Female*	70% / 30%
Age (years)‡	67 (45-78)
Isotype*	
Free Kappa	19%
Free Lambda	26%
IgG-Kappa	11%
IgG-Lambda	37%
IgA-Lambda	7%
No. of organs involved*	
Kidney involvement*	48%
Heart involvement*	52%
Liver involvement*	4%
Peripheral neuropathy*	7%
Gastrointestinal involvement*	22%
Revised Mayo Clinic stage*	
I	5%
II	50%
III	30%
IV	15%
Serum albumin (g/dL)‡	3.6 (1.6-5)
Serum creatinine (mg/dL)‡	1 (0.7-7)
β2-microglobulin (mg/L)‡	2.8 (0.2-18)
Serum M-component (g/dL)‡	0.62 (0-7.4)
Urine M-component (g/24h)‡	(0-3.7)
dFLC (mg/L)‡	227 (2.5-18899)
Serum cardiac troponin T (ng/mL)‡	0.08 (0.005-51)
NT-ProBNP (pg/mL)‡	765 (12-26680)
% plasma cells by morphology‡	10 (2-23)
% plasma cells by MFC‡	0.1 (0.02-3.6)
Therapy	
High-dose	7%
Mel/CP-Dex	22%
Bortezomib + CP/Mel	52%
Others	19%

Results expressed as median (range) ‡ or as percentage of cases*. PC: plasma cells; NT-ProBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; dFLC difference between the involved and uninvolved serum free-light chains; Mel: melphalan; Dex: dexamethasone; CP: cyclophosphamide.

Supplemental Table 2. DNA concentration and genomic amplification of samples. repli-G amplified samples are also specified.

Patients	Samples	Total ng	repli-G
Patient 1	S_1_1	742	No
	S_1_2	593.6	
	S_1_3	445.2	
Patient 2	S_2_1	1156	No
	S_2_2	1040.4	
	S_2_3	924.8	
Patient 3	S_3_1	< 50 ng	Yes
	S_3_2		
	S_3_3		
Patient 4	S_4_1	1240	No
	S_4_2	1116	
	S_4_3	992	
Patient 5	S_5_1	< 50 ng	Yes
	S_5_2		
	S_5_3		
Patient 6	S_6_1	1324	No
	S_6_2	1059.2	
	S_6_3	794.4	
Patient 7	S_7_1	< 50 ng	Yes
	S_7_2		
	S_7_3		
Patient 8	S_8_1	428	No
	S_8_2	342	Yes
	S_8_3	< 50 ng	
Patient 9	S_9_1	< 50 ng	Yes
	S_9_2		
	S_9_3		
Patient 10	S_10_1	399.6	No
	S_10_2	239.8	Yes
	S_10_3	< 50 ng	
Patient 11	S_11_1	< 50 ng	Yes
	S_11_2		
	S_11_3		
Patient 12	S_12_1	432	No
	S_12_2	259.2	Yes
	S_12_3	< 50 ng	
Patient 13	S_13_1	369.2	No
	S_13_2	276.9	
	S_13_3	< 50 ng	
Patient 14	S_14_1	668	No
	S_14_2	601.1	
	S_14_14	534.4	
Patient 15	S_15_1	2900	No
	S_15_2	2320	
	S_15_3	1740	
Patient 16	S_16_1	< 50 ng	Yes
	S_16_2		
	S_16_3		
Patient 17	S_20_1	< 50 ng	Yes
	S_20_2		
	S_20_3		

Patient 18	S_18_1	404	No
	S_18_2	303	
	S_18_3	< 50 ng	
Patient 19	S_19_1	< 50 ng	Yes
	S_19_2		
	S_19_3		
Patient 20	S_20_1	1200	No
	S_20_2	1080	
	S_20_3	960	
Patient 21	S_21_1	412	No
	S_21_2	247.2	Yes
	S_21_3	< 50 ng	
Patient 22	S_22_1	1412	No
	S_22_2	1129.6	
	S_22_3	847.2	
Patient 23	S_23_1	428	No
	S_23_2	256.8	Yes
	S_23_3	< 50 ng	
Patient 24	S_24_1	424	No
	S_24_2	318	
	S_24_3	< 50 ng	
Patient 25	S_25_1	660	No
	S_25_2	528	
	S_25_3	396	
Patient 26	S_26_1	< 50 ng	Yes
	S_26_2		
	S_26_3		
Patient 27	S_27_1	564	No
	S_27_2	507.6	
	S_27_3	451.2	

Supplemental Table 3. Contingency table regarding the presence of 1q+ and cardiac involvement.

		1q+		Total
		-	+	
Cardiac involvement	-	10 (67%)	1 (17%)	11
	+	5 (33%)	5 (83%)	10
Total		15	6	21

Pearson's $\chi^2= 4.295$. Significance= 0.038. Fisher's Exact test= 0.063

Supplemental Table 4. Contingency table of patients with IGHV3-48 rearrangement and kidney involvement.

		Presence of IGHV3-48 rearrangement		Total
		-	+	
Kidney involvement	-	14 (61%)	0 (0%)	14
	+	9 (39%)	4 (100%)	13
Total		23	4	27

Pearson's $\chi^2 = 5.057$. Significance = 0.025. Fisher's Exact Test = 0.041

ARTICLE

Open Access

Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients

Alejandro Medina¹, Cristina Jiménez¹, M. Eugenia Sarasquete¹, Marcos González¹, M. Carmen Chillón¹, Ana Balanzategui¹, Isabel Prieto-Conde¹, María García-Álvarez¹, Noemí Puig¹, Verónica González-Calle¹, Miguel Alcoceba¹, Isabel Cuenca², Santiago Barrio², Fernando Escalante³, Norma C. Gutiérrez¹, Mercedes Gironella⁴, Miguel T. Hernández⁵, Anna Sureda⁶, Albert Oriol⁷, Joan Bladé⁸, Juan-José Lahuerta², Jesús F. San Miguel⁹, María-Victoria Mateos¹, Joaquín Martínez-López², María-José Calasanz⁹ and Ramón García-Sanz¹

Abstract

Multiple myeloma is a heterogeneous disease whose pathogenesis has not been completely elucidated. Although B-cell receptors play a crucial role in myeloma pathogenesis, the impact of clonal immunoglobulin heavy-chain features in the outcome has not been extensively explored. Here we present the characterization of complete heavy-chain gene rearrangements in 413 myeloma patients treated in Spanish trials, including 113 patients characterized by next-generation sequencing. Compared to the normal B-cell repertoire, gene selection was biased in myeloma, with significant overrepresentation of *IGHV3*, *IGHD2* and *IGHD3*, as well as *IGHJ4* gene groups. Hypermutation was high in our patients (median: 8.8%). Interestingly, regarding patients who are not candidates for transplantation, a high hypermutation rate ($\geq 7\%$) and the use of *IGHD2* and *IGHD3* groups were associated with improved prognostic features and longer survival rates in the univariate analyses. Multivariate analysis revealed prolonged progression-free survival rates for patients using *IGHD2/IGHD3* groups (HR: 0.552, 95% CI: 0.361–0.845, $p = 0.006$), as well as prolonged overall survival rates for patients with hypermutation $\geq 7\%$ (HR: 0.291, 95% CI: 0.137–0.618, $p = 0.001$). Our results provide new insights into the molecular characterization of multiple myeloma, highlighting the need to evaluate some of these clonal rearrangement characteristics as new potential prognostic markers.

Introduction

B-cell lymphoproliferative disorders are caused by the expansion of a pathological clone at a specific stage of differentiation reflected in the B-cell receptor (BCR). Through multiple, hierarchically structured events, BCR genes from each B cell are assembled in a particular shape that confers an extremely high diversity to the B-cell repertoire to recognize different antigens¹. *IGHV*, *IGHD*

and *IGHJ* immunoglobulin genes go through recombination during early B-cell ontogeny that takes place in the bone marrow (BM), an entirely random, antigen-independent process driven by the Recombination-Activating Genes (*RAG1* and *RAG2*)² and Terminal deoxynucleotidyl Transferase (*TdT*)³. In humans, there are more than 50 *IGHV* genes, 27 *IGHD* genes and 6 *IGHJ* genes. *IGHV* and *IGHD* genes are clustered into seven different groups⁴. During B-cell differentiation, one allele is rearranged to produce a complete heavy-chain rearrangement (*IGH*) with or without the rearrangement of the second *IGH* allele⁵. This means that one or two *IGH* rearrangements can be found in each individual B cell,

Correspondence: M. Eugenia Sarasquete (mealonsos@saludcastillayleon.es)

¹Hospital Universitario de Salamanca (HUSAL), IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), CIBERONC, Salamanca, Spain

²Hospital 12 de Octubre, CIBERONC, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2020



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

although only one of them is expressed as a functional protein⁶. Immunoglobulin-expressing B cells then migrate to germinal centers to undergo two antigen-dependent processes: somatic hypermutation (SHM) and class-switch recombination (CSR)⁷.

As a clonal B-cell malignancy, multiple myeloma (MM) arises from a single cell, that has been recognized as a post-germinal center, IgA/IgG switched B cell in several studies⁸. *VDJH* usage, Complementarity-determining Region 3 (CDR3) composition and somatic hypermutation (SHM) levels have been studied for the vast majority of B-cell malignancies, as well as for normal, healthy B cells^{9–12}. The most interesting finding to date is the close association between SHM rate and the outcome in chronic lymphocytic leukemia (CLL), since a high SHM rate (>2%) is associated with good prognosis¹³. Another interesting observation is the presence of stereotyped immunoglobulin receptors, not only in CLL¹⁴ but also in mantle-cell lymphoma (MCL) or marginal zone lymphoma (MZL), which led researchers to infer that this was a common phenomenon for all mature B-cell tumors with potential prognostic and therapeutic implications¹⁵. Several studies performed with MM patients treated with conventional chemotherapy did not find any correlation between prognosis and *VDJH* gene usage, CDR3 amino acid composition or SHM rates^{16–18}. However, most series often included an insufficient number of heterogeneously treated patients, which makes any conclusion difficult to be inferred.

Here, we present the largest-to-date analysis of the *VDJH* repertoire in multiple myeloma, consisting in biological and clinical data from 413 patients diagnosed and treated according to the Spanish Myeloma Group (GEM-PETHEMA) protocols. Data were used for a comprehensive investigation of *VDJH* rearrangement characteristics, including *IGHV*, *IGHD* and *IGHJ* gene usage, SHM level and distribution, or complementarity-determining region (CDRs) and framework region (FWRs) length and composition. We also tried to identify the presence of potential clusters of stereotyped receptors, assessing potential relationships between molecular characteristics and clinical outcomes.

Methods

Patients

A total of 413 newly diagnosed MM patients, diagnosed from 1995 to 2016, were included in the present study. Most of them, 319 (77%), were enrolled in clinical trials from the GEM-PETHEMA Spanish MM group: GEM2000¹⁹ (NCT00560053, $n = 27$), GEM2005-más65²⁰ (NCT00443235, $n = 23$), GEM2005MENOS65²¹ (NCT00461747, $n = 20$), GEM2010MAS65²² (NCT01237249, $n = 83$), QUIREDEX²³ (NCT00480363, $n = 29$), GEM2012-MENOS65²⁴ (NCT01916252, $n = 130$) and GEM-CESAR²⁵

(NCT00480363, $n = 7$). The 94 remaining patients were treated following the same protocols (GEM2000, GEM2005), but they were not formally included in any clinical trial.

According to the International Myeloma Working Group (IMWG) criteria²⁶, patients with either t(4;14), t(14;16) or del17p were grouped together as a high-risk (HR) cytogenetics subset for subsequent analysis. Patients with symptomatic myeloma were also stratified based on the Revised International Staging System (R-ISS)²⁷.

This study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Salamanca in accordance with the Spanish law and the Declaration of Helsinki principles. Written informed consent was obtained from every patient prior to the inclusion in each trial.

Sample collection and IGH sequencing

Genomic DNA was isolated from bone marrow aspirates at the time of diagnosis using the automated DNA Purification kit Maxwell® (Promega, Madison, WI, USA). DNA quantification and quality assessment were done using the NanoDrop2000 Spectrophotometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). For the amplification of complete *VDJH* rearrangements, we used the BIOMED-2 (now Euroclonality©) FR1 primers²⁸ in multiplexed PCR reactions. All reactions were carried out in a 25 μ L mixture containing ~100 ng DNA and 10 μ mol of each primer. Monoclonal assessment of amplified products was carried out by GeneScanning using 1 μ L of PCR reaction. PCR products were sequenced in an automated ABI3500 XL DNA sequencer using Big-Dye terminators v3.1 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA).

One hundred and thirteen samples were also analyzed by next-generation sequencing (NGS) using the LymphoTrack® methodology (Invivoscribe Technologies, San Diego, CA, USA). We targeted the Framework Region 1 to amplify *VDJH* rearrangements from 113 patients. In one-step PCR, amplicons were generated and indexed. A purification step using Agentcourt AMPure XP microbeads (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) was performed; then, we assessed the quality of our amplicons using the TapeStation 4200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and Qubit 2.0 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Libraries were sequenced in an MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with 2 \times 251 of read length and aiming for 1 million reads per sample.

Immunophenotypic characterization

Patients were routinely characterized at diagnosis by multiparametric flow cytometry. Bone marrow samples were processed within 48 h after collection. Analysis was performed using different assays, following the EuroClonality/EuroFlow consortium guidelines: six-color panel for six markers (CD38/CD138/CD45/CD19/CD56/

CD117) in 78 patients, eight-color panel for eight markers (CD38/CD138/CD45/CD19/CD56/CD117/CD27/CD81) in the remaining 335 patients.

For data analysis, the values of all parameters measured per tube were mathematically calculated for the individual plasma-cell events using the merge and calculation functions of the INFINICYT™ v2.0 software (Cytognos S. L. Salamanca, Spain). Plasma cells were identified based on the characteristic pattern of expression of CD38, CD138, CD45 and light scatter features.

Sequence analysis

IGHV, *IGHD* and *IGHJ* genes from complete rearrangements detected using either Sanger or NGS were identified comparing them with the IMGT/V-Quest database²⁹, taking into account the option for insertions/deletions. Mutational status was assessed using the closest germline gene. Sequences containing more than 2% deviation from the germline were considered somatically mutated, following previously described criteria¹³. Point mutations were annotated, as well as the length and composition of N-, P- and CDR3 regions.

FastQ files generated by deep sequencing were processed using the LymphoTrackAnalysis® tool to retrieve sequences from virtually every clonal B cell in the samples, allowing the identification of tumor clones if the following criteria were met: (i) $\geq 20,000$ total reads; (ii) at least one but not more than 2 merged top reads $\geq 2.5\%$ of total reads and (iii) top first or second merged reads must be at least twice more abundant than the third most frequent read to be considered clonotypic.

Rearrangements were considered biallelic if the first two reads met the aforementioned criteria, had similar read count (less than 50% difference) and one was productive while the other one unproductive. Moreover, rearrangements were considered potentially biclonal if the first two reads met the aforementioned criteria, had similar read count (less than 50% difference) and both were productive.

CDR3 clustering analysis

ClustalX2.0 was used as previously described^{30,31}, comparing CDR3 amino acid sequences obtained from our cohort and 1117 additional sequences obtained from the IMGT/LIGM-DB database³² corresponding to unique rearrangements from both normal and human tumor B cells.

Primary and secondary standard criteria^{31,33} were used as described before to characterize immunoglobulin clusters.

Statistical analysis

Clinical and biological characteristics were analyzed discriminating between transplant-eligible and noneligible patients, as well as asymptomatic patients, with the SPSS

20.0 software (IBM, Armonk, NY, USA) using Fisher's exact test for discrete variables and the Mann–Whitney test for continuous variables. The Kaplan–Meier method and the log-rank test were used to plot and compare progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) curves. Cox regression was used to perform the multivariate analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate potential cutoff values for some variables. PFS was defined as the time from diagnosis to either disease progression, death or the last follow-up visit. OS was defined as the time from diagnosis to the last follow-up visit or decrease. All reported *p* values were obtained by a two-sided exact method, at the conventional 5% significance level ($p < 0.05$).

Results

Clinical characteristics

Baseline characteristics of the 413 patients included in the study are summarized in Table 1.

For transplant-eligible patients ($n = 228$), R-ISS stages I, II and III represented 24.1%, 62.8% and 13.1% of this subset, respectively. After induction, before the pre-transplant conditioning regimen started, the overall response ratio (ORR) was 92.4%: 15.3% were in stringent complete response (sCR); 24.1% of patients had achieved complete response (CR); and 26.5% of patients were in very good partial response (VGPR). The remaining patients were in partial response (PR, 26.5%). Median PFS was 49.5 months; median OS was 67.9 months.

For transplant-ineligible patients ($n = 149$), R-ISS stages I, II and III represented 13.1%, 77.9% and 9% of this subgroup, respectively. After induction, the ORR was 89.7%: 7.7% were in sCR, 34.2% achieved CR, 14.5% were in VGPR and 33.3% were in PR. Median PFS was 26.4 months; median OS was 57.7 months.

As expected, high-risk asymptomatic patients ($n = 36$) were younger (median age: 60 years). Serum albumin levels were higher (median: 3.76 g/dL) and $\beta 2$ microglobulin levels were lower (median: 2.25 mg/L). Consequently, 61.9% of smoldering patients were at ISS stage I, and 38.1% were at stage II.

Detection of clonal VDJH gene rearrangements

Sanger sequencing allowed the identification of full clonal *VDJH* gene rearrangements in 88% of patients (363/413). In 23 cases, the clonal *IGH* gene rearrangement was not detected, possibly due to a high polyclonal background or lack of PCR amplification due to an incorrect primer-annealing. In 12 cases, we could only identify the *IGHV* gene, while in the remaining cases we could identify two out of three genes (mostly *IGHV* and *IGHJ*, but not *IGHD*, $n = 13$).

Combining Sanger and NGS, the overall *VDJH* detection rate was 92.5% (382/413). In all, 388 complete

Table 1 Patient characteristics.

Variable	Global series (N = 413)	Transplant-eligible (N = 228)	Transplant-ineligible (N = 149)	Asymptomatic (N = 36)
Sex				
Men	54.5%	62.1%	45.8%	54.8%
Women	45.5%	37.9%	54.2%	45.2%
Age	64 years (37–91)	59 years (37–69)	72 years (48–91)	60 years (42–77)
IgH				
IgG	59.4%	55.8%	62.8%	42.3%
IgA	32.8%	35.5%	30.4%	50%
Bence–Jones	6.9%	7.0%	6.8%	7.7%
Nonsecretory	0.9%	1.7%	0%	0%
IgL				
Kappa chain	62.5%	63.5%	60.7%	50%
Lambda chain	37.5%	36.5%	39.3%	50%
Calcium	9.63 ± 1.72 mg/dL (0.45–17)	9.50 ± 1.99 mg/dL (0.45–17)	9.78 ± 1.37 mg/dL (2.28–14.4)	9.11 ± 0.49 mg/dL (8–10)
Creatinine	1.16 ± 0.84 mg/dL (0.20–6.50)	1.11 ± 0.76 mg/dL (0.20–6.50)	1.21 ± 0.93 mg/dL (0.36–5.90)	0.89 ± 0.28 mg/dL (0.50–1.61)
Albumin	3.52 ± 0.67 g/dL (1.43–5.50)	3.54 ± 0.73 g/dL (1.70–5.14)	3.51 ± 0.61 g/dL (1.43–5.50)	3.76 ± 0.46 g/dL (2.20–4.60)
β ₂ microglobulin	5.17 ± 5.22 mg/L (0–62)	5.11 ± 5.45 mg/L (0–62)	5.20 ± 4.98 mg/L (0.15–43.40)	2.25 ± 1.13 mg/L (0.30–4.41)
Hemoglobin	10.54 ± 1.98 g/dL (4.90–15.60)	10.55 ± 1.99 g/dL (5.50–15.50)	10.56 ± 1.97 g/dL (4.90–15.60)	12.38 ± 1.13 g/dL (10.10–14.70)
R-ISS ^a				
Stage I	19.1%	24.1%	13.1%	61.9%
Stage II	69.7%	62.8%	77.9%	38.1%
Stage III	11.2%	13.1%	9.0%	0%
ECOG				
0	23.8%	27.6%	20.3%	66.7%
1	49.7%	49.3%	50.7%	33.3%
2	20.2%	17.8%	21.6%	0%
3	4.0%	4.6%	3.4%	0%
4	2.3%	0.7%	4.1%	0%
Bone lesions				
None	19.2%	19.7%	18.9%	100%
Minor lesions	42.1%	45.4%	38.5%	0%
Major lesions	38.7%	34.9%	42.7%	0%
Plasmacytoma	11.2%	14.1%	8.3%	0%
High LDH	15%	16.6%	13.3%	5.4%
t(11;14)	13.2%	7.4%	18.1%	3.4%
t(4;14)	11.7%	12.2%	9.4%	19.4%
t(14;16)	3%	4.6%	1%	6.9%
17p abnormalities	7%	7.1%	7.2%	4.3%
HR cytogenetics	20.3%	21.6%	16.5%	29.6%
1q gain	47.7%	46.4%	50%	26.3%
del1p	5.7%	7.2%	3%	20%

Clinical features were compared distinguishing between symptomatic (transplant-candidates and noncandidates) and smoldering myeloma patients.

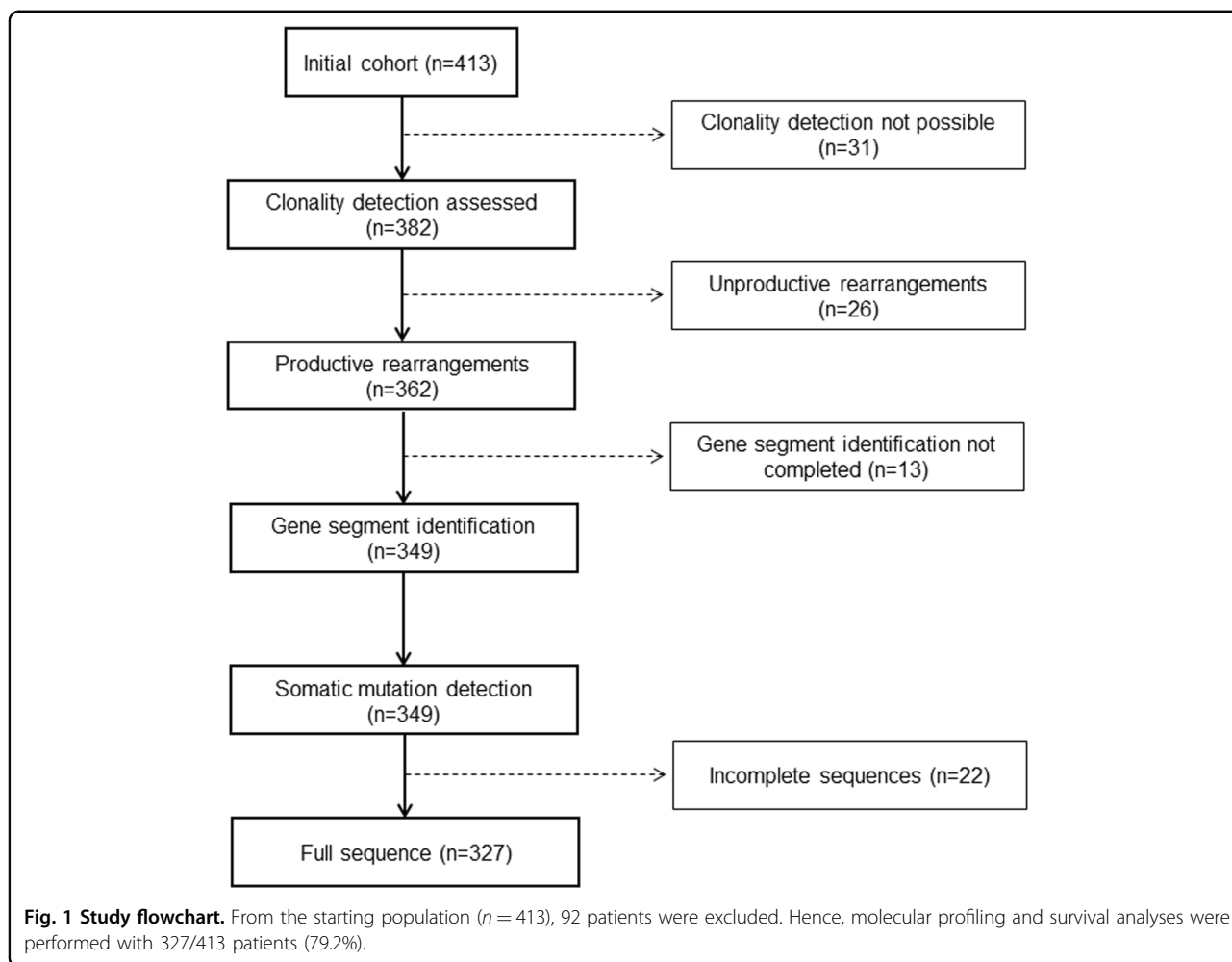
IgH immunoglobulin heavy chain, IgL immunoglobulin light chain, R-ISS Revised International Staging System, ECOG Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, LDH lactate dehydrogenase, HR cytogenetics high-risk cytogenetics.

^aProportions of each ISS group are shown instead of the R-ISS for asymptomatic myeloma patients.

rearrangements were detected, including the identification of five cases with a biallelic rearrangement, as well as one case with a potential biclonal myeloma that was later confirmed by flow cytometry (Fig. S1). Among them, 362 rearrangements (93.3%) were productive, while 26 rearrangements (6.7%) were unproductive (Fig. 1). Six of these unproductive sequences corresponded to light-chain myeloma patients.

Gene repertoire

IGHV, *IGHD* and *IGHJ* usage was identified in productive rearrangements. Table 2 shows the frequencies of *IGHV* gene group usage among the 362 productive rearrangements, with observed and expected frequencies (based on the number of genes per *IGHV* group), as well as SHM rates. No major differences were observed comparing transplant and nontransplant subgroups.



IGHV genes

According to the IMGT criteria^{29,32}, we detected 50 functional genes (Fig. S2 and Table S1) in our cohort. Five canonical *IGHV* genes were never seen: *IGHV1-45*, *IGHV3-20*, *IGHV4-28*, *IGHV6-1* and *IGHV7-04*. Overall, *IGHV3-30* was the most abundant *IGHV* gene, with 46/362 cases (12.7%), followed by *IGHV3-33* (5.2%), *IGHV3-23* (5%) and *IGHV1-69* (4.7%). On the other hand, some *IGHV* genes usually rearranged in the normal B-cell repertoire, such as *IGHV3-20* or *IGHV3-74*, were underrepresented or totally absent. Another interesting finding was the presence of four cases using the *IGHV4-34* gene: two of them had high SHM rates (10 and 18.9%), both were unproductive, and patients had light-chain myeloma; the other two cases also showed higher SHM rates than the mean (20.8 and 16.7%) and clonal rearrangements were productive. One of these patients had light-chain myeloma while the other one was IgG secretory MM.

Finally, we also found noncanonical, haplotype-dependent *IGHV* genes in ten patients: *IGHV4-30-2* ($n = 1$), *IGHV4-*

30-4 ($n = 5$), *IGHV4-38-2* ($n = 1$) and *IGHV5-10-1* ($n = 3$), and one pseudogene (*IGHV3-69-1*, $n = 1$).

Compared to previous myeloma series, *IGHV* gene frequencies in our cohort were similar with three exceptions (*IGHV3-20*, *IGHV4-30-2* and *IGHV6-1*) that were not found in our patients. We also observed that, while *IGHV3* gene group representation was similar between both series, *IGHV3-30* was overrepresented and *IGHV3-30-3* was underrepresented in our cohort.

IGHD and IGHJ genes

IGHD and *IGHJ* gene identification was assessed in 349/362 sequences (96%).

IGHD3 and *IGHD2* groups were the most abundant (30.4% and 25.4%, respectively), with *IGHD3-10* (10%) and *IGHD2-21* (8%) genes significantly overrepresented ($p < 0.05$) as compared to the expected value in healthy plasma cells. Conversely, *IGHD4-4* and *IGHD6-25* were not found in any sequence, and all members from the *IGHD1* gene group but *IGHD1-26* seemed to be underrepresented (less than 1.5% each one, Fig. S3 and Table S2). All these

Table 2 Group usage and SHM rates in IGHV genes.

IGHV group	Expected frequency	Observed frequency	Median SHM % (95% CI)
<i>IGHV1</i>	10 (18.2%)	55 (15.2%)	10.0 (8.6–10.5)
<i>IGHV2</i>	3 (5.4%)	31 (8.6%)	6.5 (6.0–8.0)
<i>IGHV3</i>	26 (47.3%)	191 (52.7%)	8.8 (8.7–9.7)
<i>IGHV4</i>	12 (21.8%)	67 (18.5%)	9.2 (9.2–11.4)
<i>IGHV5</i>	2 (3.6%)	18 (5.0%)	7.2 (6.1–9.0)
<i>IGHV6</i>	1 (1.8%)	0	–
<i>IGHV7</i>	1 (1.8%)	0	–
Total	55	362	8.8 (8.8–9.6)

Comparison of SHM %	Adjusted <i>p</i> value
<i>IGHV1</i> vs. <i>IGHV2</i>	0.006
<i>IGHV2</i> vs. <i>IGHV4</i>	0.001
<i>IGHV2</i> vs. <i>IGHV3</i>	0.012
<i>IGHV1</i> vs. <i>IGHV5</i>	0.301
<i>IGHV4</i> vs. <i>IGHV5</i>	0.118
<i>IGHV3</i> vs. <i>IGHV5</i>	0.790
<i>IGHV1</i> vs. <i>IGHV4</i>	1
<i>IGHV2</i> vs. <i>IGHV5</i>	1
<i>IGHV3</i> vs. <i>IGHV4</i>	1
<i>IGHV1</i> vs. <i>IGHV3</i>	1

The first two columns show the expected IGHV gene usage if all genes were randomly selected compared with the observed frequency within our cohort, respectively. Observed and expected IGHV distributions were not different when the χ^2 test was applied, demonstrating that there is no evidence of selection of specific gene groups in myeloma. Median somatic hypermutation rates per IGHV group are shown on the right side of the table. Below, Kruskal–Wallis-based paired comparisons are listed to determine potential differences in the hypermutation rate; a significantly lower mutation rate was found for patients using *IGHV2* compared to those using *IGHV1* ($p = 0.006$), *IGHV3* ($p = 0.012$) and *IGHV4* ($p = 0.001$). 95% CI 95% confidence intervals.

features were similar in previous myeloma series and were also seen in other hematologic B-cell malignancies and in normal plasma cells, although preference for *IGHD2-21* was specially marked only in myeloma.

For *IGHJ* gene usage, we found a deep bias in the use of certain genes matching previous observations concerning different hematologic malignancies such as CLL, MCL, and the normal bone marrow compartment: a significant overrepresentation of *IGHJ4* (46.4%) and *IGHJ6* (25%) was estimated (Fig. S4 and Table S3), while *IGHJ2* and *IGHJ1* were clearly underrepresented (2.9% and 1.1%, respectively). However, we noticed that, compared to previous series in myeloma, *IGHJ4* was underrepresented and *IGHJ6* overrepresented. In addition, *IGHJ1* and *IGHJ6* usage in healthy plasma cells looked completely different not only with respect to myeloma, but also with other mature B-cell disorders.

We explored associations between *VDJH* repertoire and risk factors. *IGHJ6* gene group was more frequent among patients with high-risk cytogenetics (37.9% vs. 17.8%, $p =$

0.025) considering only transplant-candidate patients. *IGHD1* gene group was also more frequently used by patients harboring high-risk cytogenetics, although this association was restricted to patients not candidates for transplantation (41.7% vs. 13.2%, $p = 0.026$). However, there were not relevant associations between the usage of these genes and the outcome in terms of PFS or OS.

Transplant-eligible and -ineligible patients showed similar proportions in *VDJH* gene usage (Table S4). In the same line, high-risk smoldering patients did not show significant differences in the use of *VDJH* genes compared to symptomatic patients.

Somatic hypermutation rates and IGH composition

Somatic mutations could be correctly identified in 349 sequences: mutational load was high (mean: $9.2\% \pm 3.8$; median: 8.8%; 95% CI: 8.8–9.6%; range: 0–22.7%), with five cases showing more than 98% of homology with germline genes. Comparing SHM rates between IGHV groups, we found a significantly lower rate for *IGHV2*

compared to *IGHV1*, *IGHV3* and *IGHV4* (Table 2). Median SHM ratios of transplant-eligible and -ineligible patients were similar (9.0% vs. 8.5% respectively, $p = 0.869$). Median SHM rate in symptomatic and asymptomatic patients was also similar (9.0% vs. 8.8%, $p = 0.845$). The complete sequence was available in 327/362 cases, so we continued the analysis with this set (Fig. 1).

As far as the junction region was concerned, nucleotide addition appeared in 92.5% of cases for the N1 region, and in 88.6% of cases for the N2 region. Only three cases did not show evidence of nucleotide addition, either in N1 or in N2. Mean Guanine/Cytosine content of the N-regions was 58.8%. Evidence of exonuclease activity in at least one of the two junction regions (*IGHV*-to-*IGHD* and/or *IGHD*-to-*IGHJ*) was observed in all rearrangements, although 32.2% of cases displayed a fully conserved *IGHV*-3' edge.

CDR3 amino acid composition

According to the IMGT numbering, we identified CDR3 positions (from amino acid 105 to amino acid 117). Median CDR3 length was 15 amino acids (range 6–29); this length was consistent across different myeloma subgroups (symptomatic, asymptomatic, transplant-eligible and transplant-ineligible patients). Amino acid proportions in myeloma were not significantly different from the normal B-cell population (Fig. S5), with predominance of Glycine, Alanine, Aspartic acid and Tyrosine.

Clustering analysis

CDR3 sequences from productive rearrangements ($n = 362$) were subjected to cluster analysis. We found one pair from our cohort that showed more than 60% of amino acid similarity. Consequently, and given they were clusters not previously described, we applied the secondary criteria. Although CDR3 lengths were similar (13 vs. 15 amino acids) and both rearrangements displayed the same *IGHJ4*02* germinal gene, *IGHV* and *IGHD* groups, as well as *IGHD* reading frames, were not concordant. Thus, we could not find any stereotyped immunoglobulin cluster among these myeloma patients.

Impact of molecular variables on clinical outcomes

Considering patients with symptomatic myeloma, after a median follow-up of 7.6 years (range 0.5–24.1), 120 patients had died; the majority of them ($n = 76$) were transplant-ineligible. ROC curves showed that 7 and 8% were the most optimal cutoffs for prognostic value of SHM; optimal cutoffs for serum albumin (3.2 g/dL), β_2 microglobulin (3.5 mg/dL), hemoglobin (9 g/dL) and creatinine (1 mg/dL) were also estimated. In addition, *IGHD2* and *IGHD3* users were grouped for subsequent analyses, because they were the most common *IGHD* groups and this bias has been observed in nearly every B-cell malignancy^{9–18}. Finally, all molecular data described

in previous paragraphs were combined with clinical data to perform statistical comparisons in transplant-eligible and -ineligible patients.

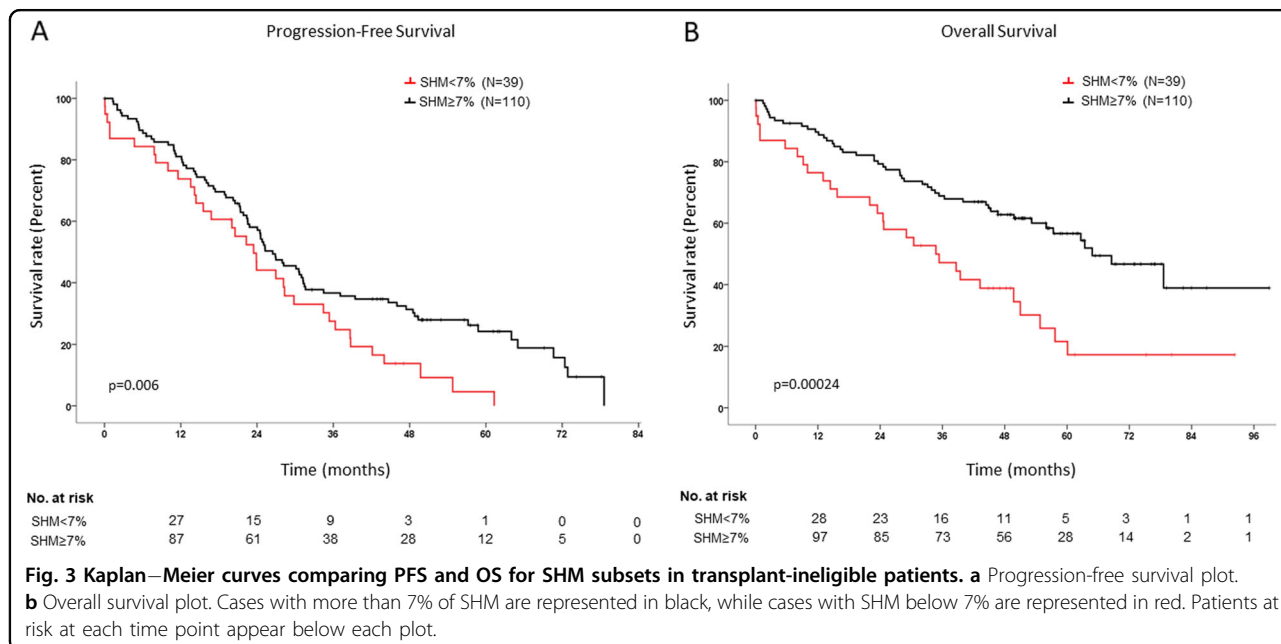
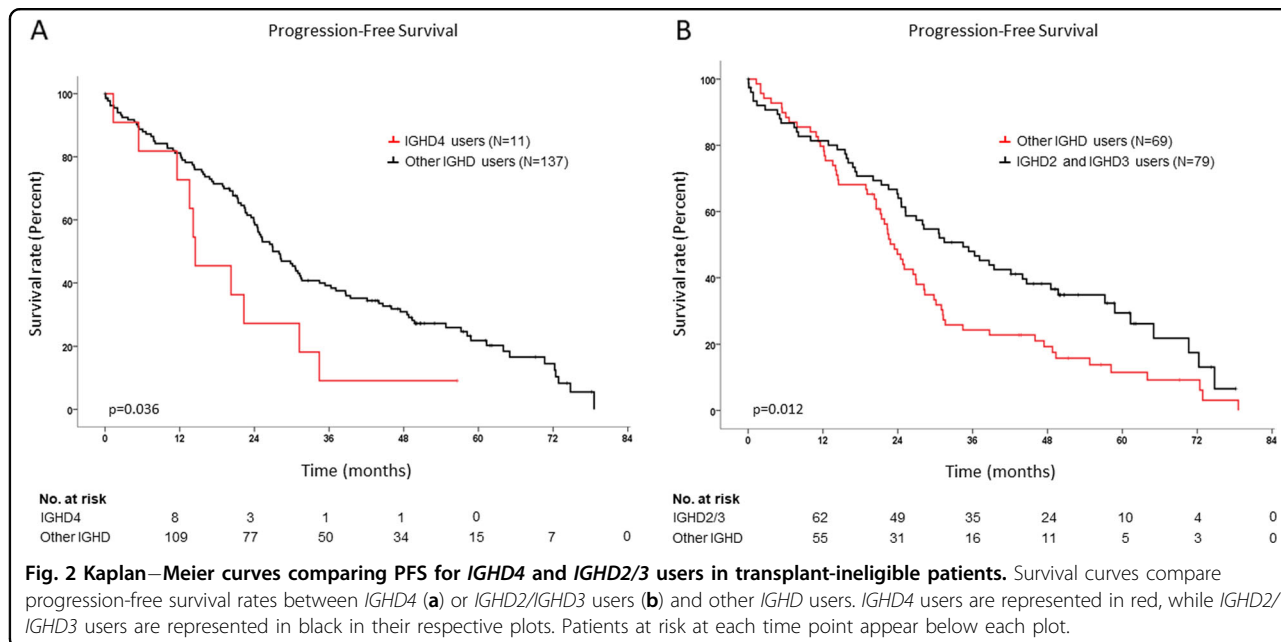
We first looked for relationships between treatment response and molecular variables. No major associations were seen, but two exceptions: (1) SHM $\geq 7\%$ associated with a higher rate of CR/sCR compared to patients with SHM $< 7\%$ in the nontransplant subset (45.8% vs. 27.3%, respectively; $p = 0.026$), and (2) *IGHD3-3* usage was associated with a better response in the transplant subgroup ($n = 10$), since 80% of MM patients with an *IGH* rearrangement choosing this particular gene achieved CR/sCR vs. 36.8% for other *IGHD* genes ($p = 0.019$).

In addition, we detected that SHM rates were progressively higher when symptomatic patients were analyzed based on the differentiation stage of their pathologic plasma cells: median SHM levels for CD19+/CD81+ (immature), CD19-/CD81+ (intermediate) and CD19-/CD81- (mature) plasma-cell subsets were 7.0% (95% CI: 5.2–11.4%), 8.50% (95% CI: 7.9–9.6%), and 9.3% (95% CI: 9.1–10.2%), respectively ($p = 0.029$). Moreover, median PFS increased from intermediate to mature subgroups (35.4 vs. 64.0 months respectively, $p = 0.024$) but not from immature to intermediate subsets, probably because we only found 11 CD19+/CD81+ cases in our series.

Transplant-ineligible patients

In the univariate analysis for PFS, improved survival of transplant-ineligible patients was associated with 0–1 ECOG stages ($p = 0.003$), CR/sCR after the end of induction ($p = 2 \times 10^{-6}$), baseline hemoglobin ≥ 9 g/dL ($p = 0.002$), no use of the *IGHD4* gene group ($p = 0.036$) (Fig. 2a) or specifically the *IGHD4-11* gene ($p = 0.0003$), use of the *IGHD2/IGHD3* gene groups ($p = 0.012$) (Fig. 2b), and SHM rate $\geq 7\%$ ($p = 0.006$) (Fig. 3a). Improved OS rates were observed in the univariate analysis for those patients with CR/sCR after induction ($p = 0.00026$), SHM rate $\geq 7\%$ ($p = 0.00024$) (Fig. 3b), standard-risk cytogenetics ($p = 0.031$) and serum hemoglobin ≥ 9 g/dL ($p = 0.002$).

One hundred and eleven transplant-ineligible patients were included in the multivariate analysis. For PFS (Table 3), CR/sCR achievement ($p = 10^{-6}$, HR: 0.311, 95% CI: 0.196–0.494) and the use of *IGHD2/IGHD3* gene groups ($p = 0.006$, HR: 0.552, 95% CI: 0.361–0.845) appeared as independent prognostic factors of prolonged survival rates. For OS, CR achievement after induction retained its independent prognostic value for improved survival probability ($p = 0.010$, HR: 0.347, 95% CI: 0.154–0.780) as well as SHM $\geq 7\%$ ($p = 0.001$, HR: 0.291, 95% CI: 0.137–0.618) and standard cytogenetic risk ($p = 0.016$, HR: 0.369, 95% CI: 0.164–0.832). Moreover, SHM rate was included in the multivariate regression model not only as a discrete variable but also as a continuous one to avoid potential bias induced with



the cutoff selection of 7%; in this case, the variable retained its prognostic value ($p = 0.017$, HR: 0.909, 95% CI: 0.840–0.983) along with achieving CR/sCR and the absence of cytogenetic risk, showing that an increment of 1% in SHM reduces death risk by 9%.

Transplant-eligible patients

Univariate analysis for PFS showed improved outcomes for patients in R-ISS stage I vs. II ($p = 0.002$) and III ($p = 0.004$), standard-risk cytogenetics ($p = 3 \times 10^{-6}$), 0–1 ECOG stages ($p = 0.015$), absence of 1q gains ($p = 0.019$)

and serum $\beta 2$ microglobulin < 3.5 mg/dL ($p = 0.023$). The R-ISS stage ($p = 6 \times 10^{-6}$), high-risk cytogenetics ($p = 4 \times 10^{-6}$), the ECOG score ($p = 0.004$), 1q gains ($p = 0.016$) and serum $\beta 2$ microglobulin ($p = 0.002$) also showed significant associations with the OS in the same direction as PFS. Interestingly, no molecular variable was significantly associated with survival in this subset of patients.

One hundred and thirty-seven transplant-eligible patients were included in the multivariate analysis. Presence of 1q gains ($p = 0.046$, HR: 2.187, 95% CI: 1.015–4.714) and high-risk cytogenetics ($p =$

Table 3 Univariate and multivariate analysis of clinical and biological factors influencing PFS and OS of transplant-ineligible patients in our cohort.

Variable	Univariate analysis for PFS		Multivariate analysis for PFS		Univariate analysis for OS		Multivariate analysis for OS	
	Median survival	<i>p</i>	HR [95% CI]	<i>p</i>	Median survival	<i>p</i>	HR [95% CI]	<i>p</i>
ECOG score								
0–1	26.94	0.003		NS		NS		
2–4	21.35							
Serum hemoglobin								
<9 g/dL	14.03	0.001		NS	24.54	0.002		NS
≥9 g/dL	28.32				64.85			
Post induction response								
sCR/CR	49.35	0.008	0.311 [0.196–0.494]	1E–05	Not reached	0.00026	0.347 [0.154–0.780]	0.010
VGPR/PR	23.88				53.19			
Cytogenetic risk								
High risk	36.30	0.196		NS	78.59	0.031	0.369 [0.164–0.832]	0.016
Standard risk	25.03				39.95			
IGHD4 usage								
Yes	14.49	0.036		NS		NS		
No	27.96							
IGHD4-11 usage								
Yes	14.16	0.0003		NS		NS		
No	26.94							
IGHD2 and IGH3 usage								
Yes	34.46	0.012	0.552 [0.361–0.845]	0.006		NS		
No	23.46							
SHM level								
<7%	23.46	0.006		NS	34.73	0.00024	0.291 [0.137–0.618]	0.001
≥7%	26.45				64.85			

Univariate analysis was first performed to evaluate the role of each clinical and biological variable described in this study. The table only shows statistically significant variables that were later included in the multivariate analysis. Median survival is shown in months. HR hazard ratio, CI confidence interval, NS nonsignificant.

0.000021, HR: 4.690, 95% CI: 2.267–9.700) were associated with lower PFS rates. High-risk cytogenetics retained its independent prognostic value for shorter OS ($p = 0.001$, HR: 8.030, 95% CI: 2.406–26.809), while serum $\beta 2$ microglobulin levels < 3.5 mg/dL associated with better outcomes ($p = 0.039$, HR: 0.116, 95% CI: 0.015–0.899).

Discussion

Here, we analyzed in depth the *IGH* locus, trying to correlate its characteristics with clinical data in a large cohort of 413 MM patients included in clinical trials. *VDJH* usage description provided new insights into the clonal differentiation and possible clinical implications for MM, that could potentially improve patient care.

IGHV gene repertoire reflected its normal counterpart, with *IGHV3* being the predominant gene group. As in other series, *IGHV3* was overrepresented and *IGHV1* underrepresented, although differences were not significant, with a much less pronounced bias than that observed in CLL^{12,13,31}. Similarly, *IGHV3-30*, *IGHV4-59* and *IGHV4-39* were overrepresented with respect to other *IGHV*

genes^{34–36}, and although these genes are also common in other lymphoproliferative disorders and normal plasma cells, we noted that *IGHV3-30* was specifically selected only in myeloma. In contrast, *IGHV3-23* and *IGHV1-69* appeared to be less frequently selected in MM (≥8% of representation in the normal B-cell population^{35,36} and B-cell pathologies vs. ≤5% in our series).

IGHV4-34 representation is high in hematologic malignancies such as B-ALL, CLL, MCL or diffuse large B-cell lymphoma as well as in normal B cells^{9,11,31}. Interestingly, this gene is usually absent in the normal plasma-cell population³⁷, although it shows a wide interindividual usage frequency³⁸, and it is rarely selected in MM¹⁷, but in this work it was not completely absent. *IGHV4-34* has been characterized as an inherently autoreactive antibody^{39,40} for it is widely represented in autoimmune diseases (i.e. systemic lupus erythematosus). Here, we found four clonal *IGHV4-34* rearrangements; they showed very high SHM rates and were usually nonproductive, leading to light-chain myelomas. This could be explained by the fact that during plasma-cell differentiation, those cells displaying autoreactive-prone

genes within their IGH rearrangements would be specially targeted by the somatic hypermutation machinery, trying to make them able to recognize only foreign antigens. Moreover, in our series, two out of the three unproductive rearrangements using *VH1-69*, another gene commonly associated with autoimmune events, such as Thrombotic Thrombocytopenic Purpura⁴¹, and highly represented in CLL, were light-chain myelomas with some of the highest SHM rates in our cohort (mean 12.23%). Interestingly, this gene is commonly unmutated in CLL patients^{42,43}.

SHM level was high and similar to what has been observed in other studies for healthy and pathological plasma and memory B cells. This would be in line with the post-germinal center origin of myeloma⁸. A striking finding was the presence of five MM cases with no apparent SHM; however, the *IGHV* region could not be completely sequenced (the entire FWR1 and part of the FWR2 was missing); from our experience, we think the mutational load was most likely underestimated, rather than being truly unmutated cases.

CDR3 composition resembled the normal immunoglobulin repertoire, with similar length, amino acid use, or evidence of TdT and exonuclease activity⁴⁴. This composition diverges from CLL, MCL or MZL patterns, where restricted antibody sets account for approximately 30% of cases^{45–47}. Accordingly, cluster analysis failed to demonstrate the presence of stereotyped receptors in our cohort, as it has been shown before in myeloma patients⁴⁸. Overall, the gene repertoire in our series was very close to previous reports^{17,18,48}, although functional *IGHV* and *IGHD* genes, whose use has not been reported in myeloma to date, have been found in this cohort probably due to its larger size. On the contrary, other genes such as *IGHV1-18*, *IGHV3-20*, *IGHV4-30-2* and *IGHV6-1*, found in Italian⁴⁸ or Greek¹⁸ patients, are absent in Spanish patients, maybe reflecting differences in the normal repertoire between different Mediterranean subpopulations. No differences were observed in the median length of the CDR3 region, and somatic hypermutation was slightly higher than in previous publications; however, this variation was not statistically significant.

The most remarkable finding was the association between a higher SHM level and an improved survival rate. The explanation for this situation seems to be connected with the maturation stage of tumor cells, represented by the expression of CD19 and CD81 biomarkers, which is consistent with previous findings regarding the immune profile of tumor plasma cells:⁴⁹ it suggests that early genetic alterations in the ontogeny of germinal-center B cells would provide a more aggressive profile in MM, which would be strong enough to overcome SHM and/or CSR earlier. Conversely, the acquisition of late, more harmless genetic events would allow tumor B cells to undergo SHM and CSR processes and this would lead to better outcomes. Another

possible explanation is related to the proliferation ratio of tumor cells: highly proliferative B cells (and therefore, more aggressive clones) activate DNA repair pathways that are able to reduce the SHM level, as it has been shown in CLL patients^{50,51}. However, the SHM cutoff is based on FRI primers; this threshold could differ when using leader primers.

Another striking feature was the correlation between the use of *IGHD2* and *IGHD3* gene groups and the outcome. An increased usage of these particular groups has also been observed in other series suggesting a positive selective pressure over them^{8,17,18}, since the bias was observed only for complete rearrangements. Nevertheless, whether or not the relationship between *IGHD* usage and survival is a myeloma characteristic remains uncertain.

SHM and *IGHD* usage were associated with the outcome only in the elderly, transplant-ineligible patients. Thereby, the effect of intensive regimens could be the main reason to explain why the negative prognostic impact of these molecular characteristics is diluted in younger, fit patients.

Regarding the value of clinical variables on the patient outcome, the prognostic role of cytogenetics, hemoglobin, albumin, β_2 microglobulin and ECOG in MM was confirmed⁵². Cytogenetic risk has to be mentioned as this variable showed significant associations with survival in all cases but when applied to PFS in transplant-ineligible patients. The absence of FISH studies for most patients diagnosed from 1995 to 2000 (most of them being older) made possible to find only 17 patients with high-risk cytogenetics in this subgroup, which could explain this result.

In conclusion, we have shown that multiple myeloma plasma cells resemble the normal mature B-cell repertoire but, in contrast to CLL, MCL or MZL, stereotyped receptors were absent^{14,15,53,54}. Light-chain and non-secretory myeloma cases could be explained by incorrect *IGH* rearrangements at the genomic DNA level, but not always, which means that other effects could hamper the immunoglobulin production, including transcriptional or translational defects. Finally, here, and for the first time, we have reported how some molecular characteristics of the *IGH* gene rearrangement, such as higher SHM rates or *IGHD2/IGHD3* gene usage, could positively impact on the outcome of patients. A validation series is currently planned to elucidate whether these findings could be applicable in real-life patients; if validated in independent studies, they could be considered as new molecular markers for PFS and OS in multiple myeloma.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness PI15/01956, CIBERONC-CB16/12/00233, and "Una manera de hacer Europa" (Innocampus; CEI-2010-1-0010)". M.G.-A., I.P.-C., and C.J. are supported by the Fundación Española

de Hematología y Hemoterapia (FEHH, co-funded by Fundación Cris in the latter case), A.M. by the European Social Fund and the Spanish Education Council through the University of Salamanca, and M.E.S. by the ISCIII (CPII18/00028). All Spanish funding is co-sponsored by the European Union FEDER program. The authors wish to thank José Pérez, Alicia Antón, Montserrat Hernández-Ruano, Estrella Arnés, Rebeca Maldonado, Mercedes Jiménez, Alejandra Martín, Isabel Sánchez, Rocío Corral and Francisco Boix (University Hospital of Salamanca, Spain) for their technical support, as well as the Spanish Multiple Myeloma "GEM-PETHEMA" group for providing clinical data. The authors are also very grateful to the patients who participated in this study.

Author details

¹Hospital Universitario de Salamanca (HUSAL), IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), CIBERONC, Salamanca, Spain. ²Hospital 12 de Octubre, CIBERONC, Madrid, Spain. ³Complejo Hospitalario, León, Spain. ⁴Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain. ⁵Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain. ⁶Hospital Duran i Reynals, Institut Català d'Oncologia (ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁷Hospital Germans Trias i Pujol, Institut Català d'Oncologia (ICO), Institut Josep Carreras, Badalona, Spain. ⁸Hospital Clínic i Provincial, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ⁹Clínica Universidad de Navarra (CUN), Centro de Investigación Médica Aplicada, IDISNA, CIBERONC, Pamplona, Spain

Author contributions

A.M., R.G.-S. and M. González conceived and designed the study. NP, FE, NCG, M. González, M.T.H., A.S., A.O., M.-J.C., J.M.-L., J.B., J.-J.L., M. Gironella, J.F. S.M., M.-V.M. and R.G.-S. recruited patients for the Spanish Multiple Myeloma Working Group (GEM-PETHEMA) clinical trials. A.M., C.J., M.E.S., I.P.-C., M.G.-A. and A.B. produced the molecular results. A.M., M.E.S., V.G.-C. and R.G.-S. analysed the data, performed the statistical analyses, and wrote the first draft of the manuscript. M.A., N.P., I.P.-C., M.G.-A., V.G.-C. and R.G.-S. provided support for statistical analyses and clinical data interpretation. M.E.S., N.P., M.A., V.G.-C., F.E., N.C.G., M. González, M.T.H., A.S., A.O., M.-J.C., J.M.-L., J.B., J.-J.L., M. Gironella, J.F.S.M., M.-V.M. and R.G.-S. reviewed the final manuscript. R.G.-S. and M. González obtained funding for the study. R.G.-S., the head of the group, produced the final revision of the manuscript and gave final approval for its publication.

Conflict of interest

Authors report grants P115/01956, CIBERONC-CB16/12/00233, and CEI-2010-1-0010 during the conduct of the study. A.M., M.G.-A., I.P.-C., C.J., V.G.-C. and M.E.S. are or were supported by the Spanish government. Authors have received honoraria from, consulted or served in an advisory role for, or are on the board of directors of Janssen (N.P., F.E., A.O., J.B., J.-J.L., J.F.S.M., M.-V.M., J.M.-L., R.G.-S.), Takeda (N.P., A.O., J.F.S.M., M.-V.M., R.G.-S.), Celgene (N.P., A.O., J.-J.L., J.F.S.M., M.-V.M.), Amgen (N.P., J.-J.L., J.F.S.M., M.-V.M.), Bristol-Myers Squibb (J.F.S.M., M.-V.M., J.M.-L., R.G.-S.), Novartis (J.F.S.M., J.M.-L.), MSD (J.F.S.M.), Sanofi (J.F.S.M.), Roche (J.F.S.M.), Hospira (R.G.-S.), Pharmacyclics (R.G.-S.), Gilead (R.G.-S.) and Incyte (R.G.-S.). The remaining authors have no relevant conflict of interest to disclose.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41408-020-0283-8>).

Received: 4 September 2019 Revised: 16 January 2020 Accepted: 21 January 2020

Published online: 06 February 2020

References

1. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. & Hood, L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* **19**, 981–992 (1980).

2. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517–1523 (1990).
3. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. & Alt, F. W. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171–1175 (1993).
4. Matsuda, F. et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J. Exp. Med.* **188**, 2151–2162 (1998).
5. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
6. Mostoslavsky, R., Alt, F. W. & Rajewsky, K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* **118**, 539–544 (2004).
7. Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 165–196 (2002).
8. González, D. et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* **110**, 3112–3121 (2007).
9. Hockley, S. L. et al. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br. J. Haematol.* **158**, 347–354 (2012).
10. Petrikos, L. et al. Clonotypic analysis of immunoglobulin heavy chain sequences in patients with Waldenström's macroglobulinemia: correlation with MYD88 L265P somatic mutation status, clinical features, and outcome. *BioMed. Res. Int.* **2014**, 809103 (2014).
11. Mroczek, E. S. et al. Differences in the composition of the human antibody repertoire by B cell subsets in the blood. *Front. Immunol.* **5**, 96 (2014).
12. Marinelli, M. et al. Immunoglobulin gene rearrangements in Chinese and Italian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **7**, 20520–20531 (2016).
13. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848–1854 (1999).
14. Agathangelidis, A. et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* **119**, 4467–4475 (2012).
15. Darzentas, N. & Stamatopoulos, K. Stereotyped B cell receptors in B cell leukemias and lymphomas. *Methods Mol. Biol.* **971**, 135–148 (2013).
16. Kiyoi, H., Naito, K., Ohno, R. & Naoe, T. Comparable gene structure of the immunoglobulin heavy chain variable region between multiple myeloma and normal bone marrow lymphocytes. *Leukemia* **10**, 1804–1812 (1996).
17. González, D. et al. Molecular characteristics and gene segment usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica* **90**, 906–913 (2005).
18. Hadzidimitriou, A. et al. Immunoglobulin genes in multiple myeloma: expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica* **91**, 781–787 (2006).
19. Lahuerta, J. J. et al. Busulfan 12 mg/kg plus melphalan 140 mg/m² versus melphalan 200 mg/m² as conditioning regimens for autologous transplantation in newly diagnosed multiple myeloma patients included in the PETHEMA/GEM2000 study. *Haematologica* **95**, 1913–1920 (2010).
20. Mateos, M. V. et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol.* **11**, 934–941 (2010).
21. Rosinol, L. et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood* **120**, 1589–1596 (2012).
22. Mateos, M. V. et al. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood* **127**, 420–425 (2016).
23. Mateos, M. V. et al. Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smouldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 1127–1136 (2016).
24. Rosinol, L. et al. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma. *Blood* **134**, 1337–1345 (2019).
25. Mateos, M. V. et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smouldering multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 438–447 (2013).

26. Chng, W. J. et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* **28**, 269–277 (2014).
27. Palumbo, A. et al. Revised International Staging System for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2863–2869 (2015).
28. van Dongen, J. J. M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4CT98-3936. *Leukemia* **17**, 2257–2317 (2003).
29. Brochet, X., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**, W503–W508 (2008).
30. Larkin, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**, 2947–2948 (2007).
31. Stamatopoulos, K. et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* **109**, 259–270 (2007).
32. Lefranc, M. P. et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* **37**, D1006–D1012 (2009).
33. Messmer, B. T. et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **200**, 519–525 (2004).
34. Kosmas, C. et al. Origin and diversification of the clonogenic cell in multiple myeloma: lessons from the immunoglobulin repertoire. *Leukemia* **14**, 1718–1726 (2000).
35. Brezinschek, H. P. et al. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 2488–2501 (1997).
36. Kraj, P. et al. The human heavy chain Ig V region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J. Immunol.* **158**, 5824–5832 (1997).
37. Pugh-Bernard, A. E. et al. Regulation of inherently autoreactive VH434 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J. Clin. Invest.* **108**, 1061–1070 (2001).
38. Turchaninova, M. A. et al. High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding. *Nat. Protoc.* **11**, 1599–1616 (2016).
39. Bhat, N. M., Lee, L. M., van Vollenhoven, R. F., Teng, N. N. H. & Bieber, M. M. VH4-34 encoded antibody in systemic lupus erythematosus: effect of isotype. *J. Rheumatol.* **29**, 2114–2121 (2002).
40. Mockridge, C. I. et al. Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection. *Autoimmunity* **37**, 9–15 (2004).
41. Pos, W. et al. VH1-69 germline encoded antibodies directed towards ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 421–428 (2009).
42. Duke, V. M. et al. V(H) gene usage differs in germline and mutated Bcell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* **88**, 1259–1271 (2003).
43. González-Gascón, Y. et al. Mutation status and immunoglobulin gene rearrangements in patients from northwest and central region of Spain with chronic lymphocytic leukemia. *BioMed. Res. Int.* **2014**, 257517 (2014).
44. Shi, B. et al. Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. *Theor. Biol. Med. Model.* **11**, 30 (2014).
45. Darzentas, N. et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia* **24**, 125–132 (2010).
46. Agathangelidis, A., Hadzidimitriou, A., Rosenquist, R. & Stamatopoulos, K. Unlocking the secrets of immunoglobulin receptors in mantle cell lymphoma: implications for the origin and selection of the malignant cells. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 299–307 (2011).
47. Hadzidimitriou, A. et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* **118**, 3088–3095 (2011).
48. Ferrero, S. et al. Multiple myeloma shows no intra-disease clustering of immunoglobulin heavy chain genes. *Haematologica* **97**, 849–853 (2012).
49. Paiva, B. et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia* **31**, 382–392 (2017).
50. van Gent, R. et al. In vivo dynamics of stable chronic lymphocytic leukemia inversely correlate with somatic hypermutation levels and suggest no major leukemic turnover in bone marrow. *Cancer Res.* **68**, 10137–10144 (2008).
51. Giné, E. et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* **95**, 1526–1533 (2010).
52. Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **91**, 719–734 (2016).
53. Varettoni, M. et al. Clues to pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia and immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance provided by analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement and clustering of B-cell receptors. *Leuk. Lymphoma* **54**, 2485–2489 (2013).
54. Zibellini, S. et al. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* **95**, 1792–1796 (2010).

IKZF1/3 and CRL4^{CRBN} E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma

Cereblon (CRBN), a target of immunomodulatory drugs (IMiD), forms the CRL4^{CRBN} E3 ubiquitin ligase (CRL4) complex with DDB1, CUL4B and ROC1.^{1,2} Under the influence of IMiD, CRL4 polyubiquitinates and thus depletes the transcription factors IKZF1 and IKZF3, resulting in cytotoxicity to multiple myeloma (MM) cells. *In vitro*, CRBN and IKZF1/3 mutations affecting the CRBN-lenalidomide binding site (degron) cause drug resistance to IMiD.³⁻⁵ We hypothesized that mutations in the other components of the CRL4 complex and its targets, Ikaros and Aiolos, likewise interfere with ubiquitin ligase activity, thus contributing to resistance to IMiD. In order to select the most promising patient-derived candidate mutations for functional validation, we first generated a comprehensive overview of point mutations

affecting *IKZF1*, *IKZF3* or *CRL4* genes in patients with advanced MM. Next, we contextualized all described mutations at the protein level, to investigate their structural impact on complex formation and stability. Based on these analyses, we then selected a subset for functional validation by expressing mutant IKZF1, CRBN or CUL4B in MM cell lines and analyzed their effects on resistance to IMiD, thus probing the relevance of such alterations for complex integrity and the transmission of IMiD activity.

To select relevant candidate mutations, we analyzed data from different Multiple Myeloma Mutation panel (M3P) cohorts^{3,6-8} and from other published and unpublished datasets^{9,10} for a total of 1,838 MM cases (*Online Supplementary Methods*). In this meta-analysis we observed that the mutation frequency increased significantly after treatment (Z-score: 4.5; $P < 0.00001$), from 2.0% (28/1373) in untreated cases to 6.2% (29/465) in pretreated cases. Notably, this increase occurred predominantly in three genes, *IKZF1* (0.15% to 1.3%, Z-

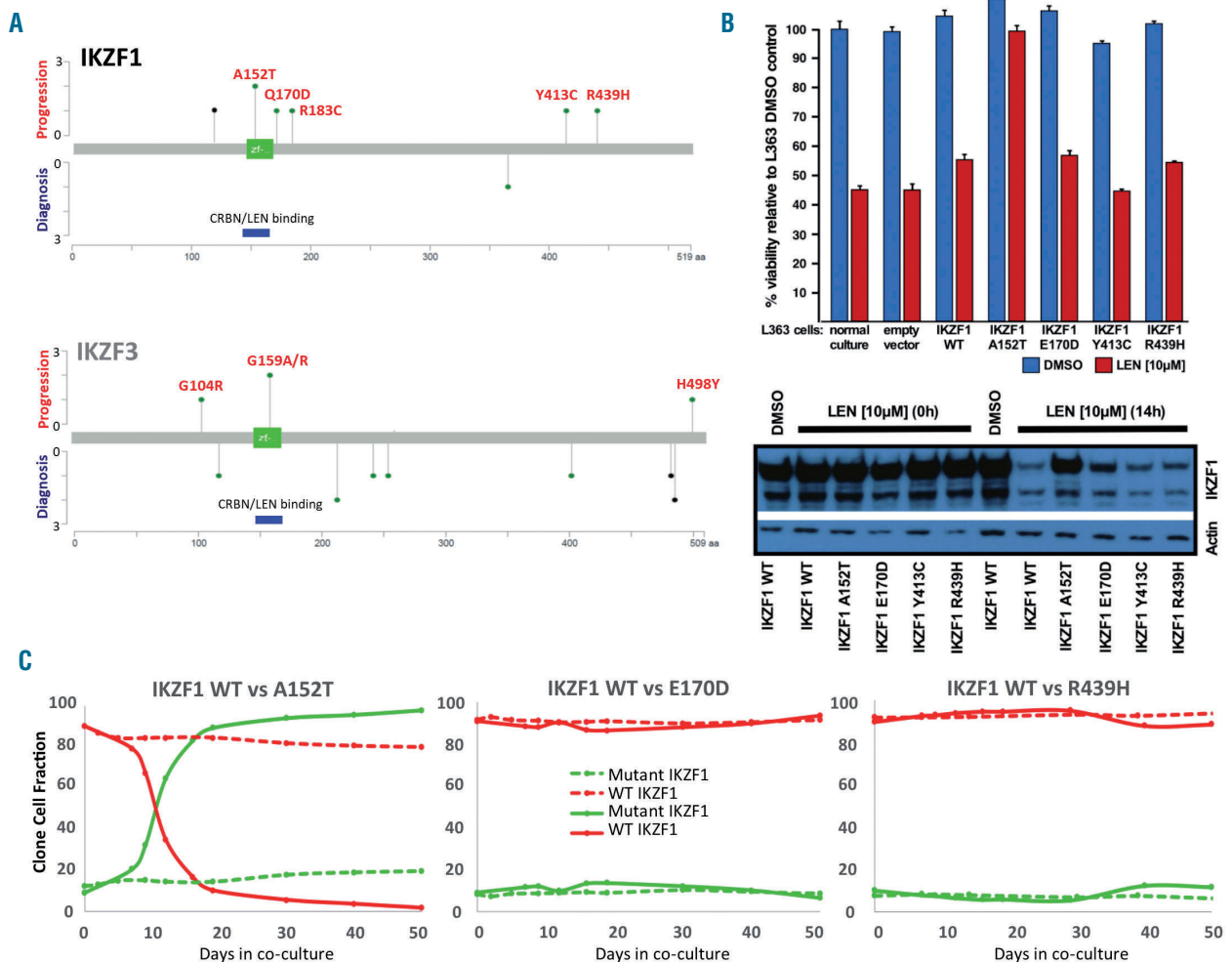


Figure 1. Only IKZF1/3 mutations affecting the lenalidomide/cereblon binding area induce resistance to lenalidomide. (A) Location of the mutations within the *IKZF3* and *IKZF1* genes. Lollipop plots of all mutations described in *IKZF1* and *IKZF3*. Blue bar; degron sequence of the lenalidomide binding site. Bottom of the lollipop plot: mutations detected at diagnosis. Top: alterations detected after exposure to therapy. Green dots indicate missense mutations and black dots nonsense mutations. (B) Viability and molecular effects of expression of mutated *IKZF1* in L363 cells. (C) Clonal competition assay (CCA) results for *IKZF1*-WT (red) vs. *IKZF1*-A152T, *IKZF1*-E170D or *IKZF1*-R439H (green). Dashed line: CCA without drug (10% mutant/90% WT). Solid line: CCA with 2.5 µM lenalidomide. DMSO: dimethylsulfoxide; LEN: lenalidomide; WT: wildtype.

score: 2.9; $P=0.001$), *CRBN* (0.44% to 2.15%, Z-score: 3.4; $P=0.006$) and *CUL4B* (0.44% to 1.93%, Z-score: 3.4; $P=0.004$) (Online Supplementary Figure S1). Of the *IKZF1/3*, *CRBN*, *DDB1*, *CUL4B* and *ROC1* mutations found in treated patients, 71% (24/34) were nonsense mutations or mutations located within previously described binding areas, whereas at diagnosis the distribution was spread out all along the gene loci^{2,4,11} suggesting passenger mutations. We identified three potential new hotspots (*IKZF3* G159R/A, *IKZF1* A152T and *CUL4B* R820T/S) each with mutations in two different patients. All the detected mutations and variant read frequencies are summarized in Online Supplementary Table S1. Of interest, in eight patients with samples available from diagnosis and relapse, *CRBN* and *CUL4B* mutations were acquired after IMiD treatment, whereas *IKZF3* mutations were also identified in *de novo* disease (Online Supplementary Figure S1). Together, these results suggest that CRL4 mutations play an important role in disease progression and clonal evolution.

Next, we assessed the functional effects of patient-derived mutations in Ikaros and Aiolos. We constructed

Sleeping Beauty vectors for expression of four *IKZF1* mutations (A152T, E170D, Y413C and R439H), and one mutation in *IKZF3* (G159R) (Figure 1A), and stably introduced these into MM cell lines (MM1.S and L363: IMiD sensitive, AMO1: less sensitive). Whereas transfection led to strong expression for all *IKZF1* constructs, the *IKZF3* expression vectors (wildtype and G159R), unfortunately, did not lead to noticeable expression even though two different versions using either cytomegalovirus- or CAAG-driven expression cassettes, were tested (Online Supplementary Figure S2). Viability assessments for all L363 *IKZF1* sub-lines after 6 days of treatment with 10 μ M lenalidomide showed that only the mutation at the lenalidomide binding site (A152T) conferred resistance to the drug (Figure 1B, top). This observation was supported by western blotting studies, which showed that only in the A152T subline did overnight treatment with lenalidomide have no effect on the level of Ikaros (Figure 1B, bottom). Furthermore, a minor inhibitory effect on *IKZF1* degradation was also observed for the mutation E170D, which is located in close proximity to the degron sequence. This result was

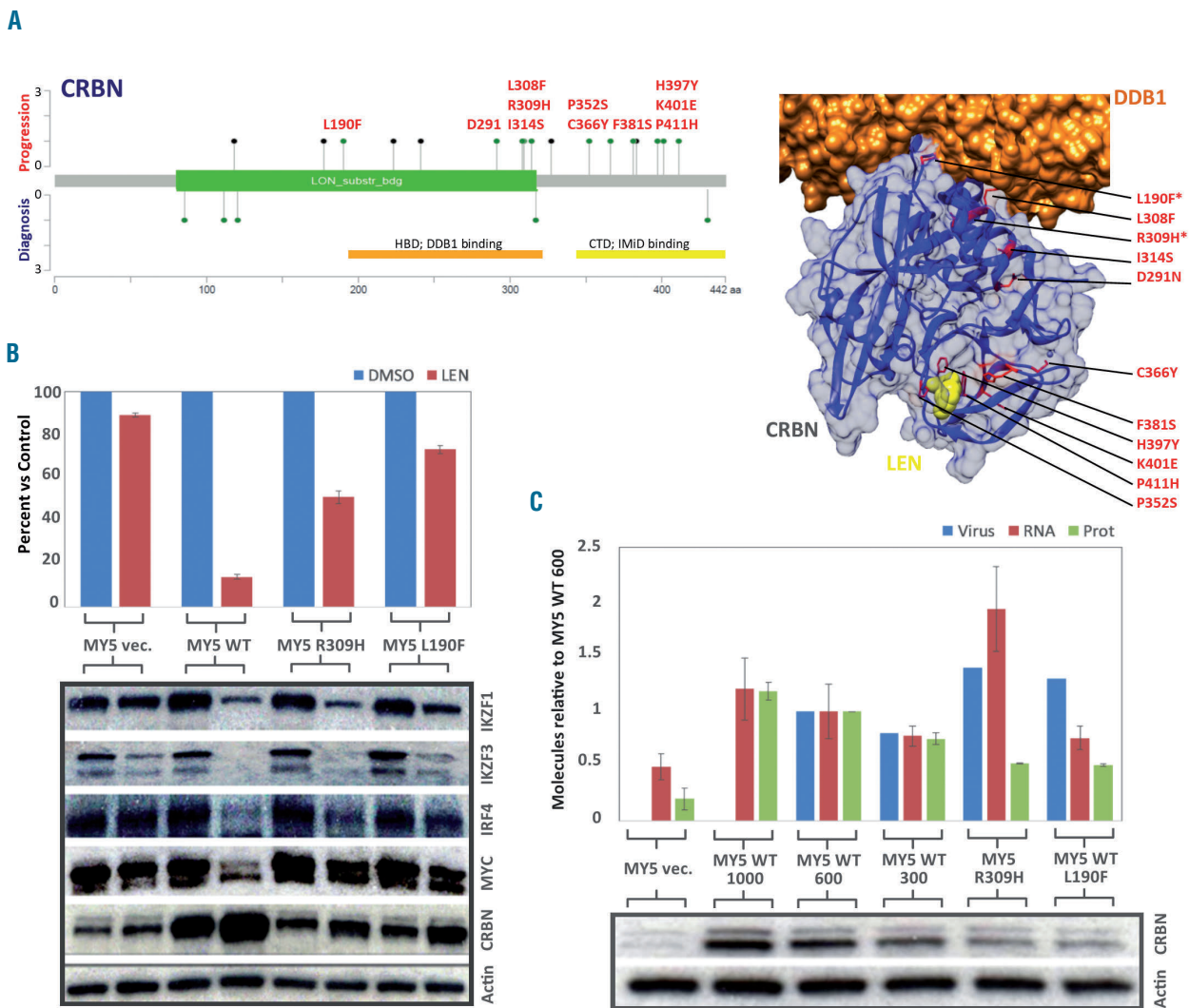


Figure 2. *CRBN* point mutations outside the lenalidomide binding pocket induce protein destabilization. (A) *CRBN* mutations at diagnosis and progression. (B) Viability test analyses (MTT) after 5 days of incubation with 5 μ M lenalidomide and western blotting for the different *CRBN* constructs. (C) Virus titration of the *CRBN* constructs, compared to RNA expression level (TaqMan assays) and protein quantity (Image).

occurrence of mutations at the IMiD binding site of CRBN induces resistance to IMiD.³ However, 56% of the missense *CRBN* mutations did not affect the IMiD binding pocket, but were present in the previously described CRBN Lon-like domain (LLD; residues 76-318), which contains a DDB1-binding motif (Figure 2A).¹¹ Furthermore, *in silico* analysis¹² suggests that seven of nine mutations affect this region (P85S, R111Q, F120V, D291N, L308F, R309H and I314S), which may thus lead to a reduction of CRBN stability (predicted stability change $\Delta\Delta G < 0$) (Online Supplementary Table S1). To understand whether these alterations also affect sensitivity to IMiD, we selected two CRBN mutations detected in IMiD-resistant patients (R309H and L190F) and lentivirally introduced them into OCIMY5 cells (cells that have very low levels of endogenous CRBN expression and are, therefore, resistant to IMiD). As shown in Figure 2B, both types of CRBN mutant-transduced cells showed a substantial reduction of sensitivity to lenalidomide compared with cells transduced with wildtype CRBN. However, further immunoblotting indicated that exogenous CRBN expression in the mutant-transfected cells was much lower than in cells transduced with wildtype CRBN. In order to analyze whether this effect was related to intrinsic features of the mutations, we performed a titration of wildtype CRBN virus (1000 virus equivalents to 75) and found that a decrease of virus equivalents correlated with decreases in RNA and protein levels of CRBN in the infected MM cells. Although both CRBN mutant virus preparations showed the highest virus equivalents, and although this corresponded to high levels of expressed CRBN RNA in OCIMY5 cells, these cells failed to express equivalent levels of CRBN protein (Figure 2C). These results suggest that in addition to CRBN mutations in the IMiD binding site, other point mutations may play a role in the development of resistance to IMiD either through impaired binding with other proteins of the complex or through destabilizing effects on the protein.

We also hypothesized that mutations in *DDB1*, *CUL4B* and *ROC1* may affect the formation of the CRL4 complex (Figure 3A). To confirm this, we prepared a *CUL4B* knockout model (in L363 cells) using the CRISPR/Cas9 system. Of ten viable clones, we selected one with clear knockout of *CUL4B* (Figure 3B, top). Compared to the naïve L363 cells, the knockout clone was more resistant to lenalidomide treatment. This effect was confirmed by a clonal competition assay, in which it was observed that under the selective pressure of lenalidomide treatment, the *CUL4B* knockout clone had an advantage, in terms of survival fitness, over the *CUL4B* wildtype cells (Figure 3B, bottom left). The clonal dynamics became even clearer when both *CUL4B* knockout and wildtype cells were initially present in equal amounts and cultured without lenalidomide. The wildtype cells easily outcompeted the *CUL4B* knockout clone under these conditions, but once the drug was added (2,5 μM , at day 21 in co-culture) the resistant clone took over (Figure 3B, bottom right). Of note, the re-introduction of wildtype *CUL4B* into the *CUL4B* knockout cells re-sensitized the cells to lenalidomide, confirming our hypothesis. Likewise, reintroduction of two other *CUL4B* mutants from IMiD pretreated patients (D311H, and R820S, a hotspot mutation detected in two MM patients) also reverted the resistance, suggesting that these two mutations do not alter the response to IMiD (Online Supplementary Figure S3).

We confirmed an increase of mutations in *CRBN*⁸ and detected similar results for *CUL4B* and *IKZF1* after ther-

apy. For eight cases of our cohort with acquired mutations in the CRL4 complex, a prior tumor sample was available (diagnosis-progression/relapse). In these sequential samples *CRBN* and *CUL4B* mutations were acquired after exposure to IMiD; in contrast, alterations in *IKZF3* were already detectable at diagnosis. This suggests that *IKZF3* mutations might play a role in the pathogenesis of MM rather than in the development of therapy-induced resistance. Recently, CRBN protein loss and point mutations in the CRBN-lenalidomide binding area were associated with IMiD resistance.³ Mutations in the CRBN-DDB1 binding motif¹¹ may also induce resistance to lenalidomide (Figure 2B). However, the underlying mechanisms of the mutations investigated were not related to binding, but may involve destabilization of the protein folding that induces CRBN degradation (Figure 2C). The knockout of *CUL4B* by CRISPR/Cas9 induced resistance to lenalidomide, highlighting the importance of this protein for the anti-tumor action of IMiD. The fact that this resistance was overcome by the reintroduction of *CUL4B* WT using Sleeping Beauty proved the specificity of our *in vitro* approach (Figure 3B).

This is the first comprehensive analysis of the impact of *CRL4* point mutations on responses to IMiD in MM. Mutations are predominantly selected for by therapy and affect the function of the ubiquitin ligase complex through loss of a subunit by a nonsense mutation, point mutations affecting protein stability, or by impairment of substrate binding. Some alterations, including *IKZF3* hotspot mutations, are detectable prior to treatment, at initial diagnosis. The possible implications of such alterations in the pathophysiology of MM deserve further investigation.

Santiago Barrio,¹ Umair Munawar,² Yuan Xiao Zhu,³ Nicola Giesen,⁴ Chang-Xin Shi,³ Matteo Da Viá,⁴ Ricardo Sanchez,⁵ Laura Bruins,³ Theresa Demler,² Nicole Müller,¹ Larissa Haertle,¹ Andoni Garitano,¹ Torsten Steinbrunn,¹ Sophia Danhof,¹ Isabel Cuenca,⁵ Clara Barrio-García,⁶ Esteban Braggio,³ Andreas Rosenwald,⁷ Joaquin Martinez-Lopez,⁵ Leo Rasche,¹ Marc S. Raab,⁴ A. Keith Stewart,^{3,8} Hermann Einsele,¹ Thorsten Stühmer² and K. Martin Kortüm¹

¹Department of Internal Medicine II, University Hospital of Würzburg, Würzburg, Germany; ²Comprehensive Cancer Center Mainfranken, University Hospital of Würzburg, Würzburg, Germany; ³Department of Hematology, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA; ⁴Department of Internal Medicine V, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany and CCU Molecular Hematology/Oncology, German Cancer Research Center (DKFZ), Germany; ⁵Hematology Department Hospital 12 de Octubre, Complutense University, H12O-CNIO Clinical Research Unit, CIBERONC Madrid, Spain; ⁶Gene Center, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany; ⁷Institute of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany and ⁸Center for Individualized Medicine of the Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

Correspondence: K. MARTIN KORTÜM
kortuem_m@ukw.de

doi:10.3324/haematol.2019.217943

Acknowledgments: this work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO216), the IZKF, the BTHA and the CDW Stiftung (KMK). UM was supported by a grant of the German Excellence Initiative to the Graduate School of Life Sciences, University of Würzburg.

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Kortum KM, Zhu YX, Shi CX, Jedlowski P, Stewart AK. Cereblon binding molecules in multiple myeloma. *Blood Rev.* 2015;29(5):329-334.
2. Fischer ES, Scrima A, Bohm K, et al. The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell.* 2011;147(5):1024-1039.
3. Kortum KM, Mai EK, Hanafiah NH, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood.* 2016;128(9):1226-1233.
4. Kronke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 2014;343(6168):301-305.
5. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood.* 2014;124(4):536-545.
6. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J.* 2016;6(2):e397.
7. Kortum KM, Langer C, Monge J, et al. Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P). *Ann Hematol.* 2015;94(7):1205-1211.
8. Kortum KM, Langer C, Monge J, et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M(3) P) in -17p high risk disease. *Br J Haematol.* 2015;168(4):507-510.
9. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014;5:2997.
10. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell.* 2014;25(1):91-101.
11. Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, et al. Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(9):803-809.
12. Pandurangan AP, Ochoa-Montañó B, Ascher DB, Blundell TL. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W229-W235.



Multiple myeloma gammopathies

Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma

Santiago Barrio¹ · Thorsten Stühmer¹ · Matteo Da-Viá¹ · Clara Barrio-Garcia² · Nicola Lehnert³ · Andrej Besse⁴ · Isabel Cuenca⁵ · Andoni Garitano-Trojaola¹ · Severin Fink¹ · Ellen Leich⁶ · Manik Chatterjee¹ · Christoph Driessen⁴ · Joaquin Martinez-Lopez⁵ · Andreas Rosenwald^{6,7} · Roland Beckmann² · Ralf C. Bargou¹ · Esteban Braggio⁸ · A. Keith Stewart^{8,9} · Marc S. Raab³ · Hermann Einsele¹ · K. Martin Kortüm¹

Received: 8 May 2018 / Revised: 22 May 2018 / Accepted: 30 May 2018 / Published online: 19 July 2018
© Springer Nature Limited 2018

Abstract

Despite an increasing number of approved therapies, multiple myeloma (MM) remains an incurable disease and only a small number of patients achieve prolonged disease control. Some genes have been linked with response to commonly used anti-MM compounds, including immunomodulators (IMiDs) and proteasome inhibitors (PIs). In this manuscript, we demonstrate an increased incidence of acquired proteasomal subunit mutations in relapsed MM compared to newly diagnosed disease, underpinning a potential role of point mutations in the clonal evolution of MM. Furthermore, we are first to present and functionally characterize four somatic *PSMB5* mutations from primary MM cells identified in a patient under prolonged proteasome inhibition, with three of them affecting the PI-binding pocket S1. We confirm resistance induction through missense mutations not only to Bortezomib, but also, in variable extent, to the next-generation PIs Carfilzomib and Ixazomib. In addition, a negative impact on the proteasome activity is assessed, providing a potential explanation for later therapy-induced eradication of the affected tumor subclones in this patient.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell disease that is characterized by profound genetic heterogeneity [1–4]. An increasing number of anti-MM compounds have substantially improved patient survival

over the past decade [5]. Nevertheless, even the most intense treatment strategies are unable to prevent disease relapse, acquisition of drug resistance is commonly observed, and long-term disease control is only achieved in a minority of patients. Underlying resistance mechanisms are poorly understood. We recently were first to report cereblon (*CRBN*) mutations in highly pretreated MM patients as a cause of resistance against immunomodulating drugs (IMiDs) [6]. According to the “Big Bang” model of cancer evolution, resistance-mediating alterations are already present in early disease, and it is the selective pressure of antitumor therapy that promotes

These authors contributed equally: Santiago Barrio, Thorsten Stühmer.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0216-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ K. Martin Kortüm
kortuem_m@ukw.de

¹ Department of Hematology-Oncology, Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany

² Gene Center, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

³ Department of Internal Medicine V, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

⁴ Departement of Hematology, Kantonsspital St Gallen, St Gallen, Switzerland

⁵ Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, CNIO, Complutense University, Madrid, Spain

⁶ Institute of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

⁷ Comprehensive Cancer Center Mainfranken, Würzburg, Germany

⁸ Division of Hematology-Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA

⁹ Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

their clonal expansion from baseline tumor heterogeneity [3, 4]. Proteasome inhibitors (PIs) are widely used as a backbone for numerous treatment regimens; however, virtually all patients develop resistance under prolonged treatment. Accordingly, in vitro, continuous exposure to PIs generates resistant cell lines, and single point mutations in *PSMB5* have been described as the underlying cause of Bortezomib (BOR) resistance. These mutations effect conformational or steric changes to the proteasome drug-binding site, not only impairing PI binding but also decreasing its chymotryptic catalytic function [7–13]. Other mechanisms for PI resistance have been discussed, including downregulation of 19S proteasome subunits [14–16], overexpression of *PSMB5* [12, 17, 18], of drug transporters such as *ABCB1* [10, 11], or of micro-environmental proteins (interleukin-6, insulin growth factor-1) and chaperones [19, 20]. However, somatic mutations that actually affect PI sensitivity were not yet described in primary myeloma samples [21]. In this manuscript, we are the first to present and functionally characterize four resistance-inducing *PSMB5* mutations from a MM patient under prolonged BOR treatment. Depending on the affected amino acid (aa), these four different single point mutations result in either pan- or drug-selective PI resistance. However, this selective advantage could still be overcome during the course of the disease by changes in treatment, since all mutations became undetectable in a later biopsy after Carfilzomib (CARF)-based combination therapy.

Methods

PSMB5 and other proteasome subunit mutations in myeloma cohorts

We combined data from our different Multiple Myeloma Mutation panel (M³P) cohorts [6, 22] and from other published and unpublished datasets [1, 2, 23] for a total of 1596 MM cases. We clustered these cases according to treatment status (Base line/Diagnosis: 758 whole-exome sequencing (WES) baseline cases from the CoMMpass dataset (IA10), 331 M³P newly diagnosed cases, 152 untreated cases from previously published datasets [1, 2]. First relapse: 194 WES pretreated cases from the CoMMpass dataset (Confirm Progression/Other); Refractory: 123 M³P multidrug refractory (rMM) cases, 38 WES rMM cases from a Heidelberg cohort (unpublished data)). In order to minimize the bias between M³P and WES approaches, we restricted the WES analysis to genes included in the M³P selection panel (*PSMA1*, *PSMB5*, *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMD1*, and *PSMG2*) and the M³P targeted analysis to alterations with a variant read (VR) > 5%.

Targeted deep sequencing

Targeted deep sequencing was performed on paired tumor-germline DNA samples using the Ion Torrent platform (PGM, Thermo Fisher) and Ion AmpliSeq Library Kit. The M³P panel includes in its last version 1327 amplicons covering the coding regions of 88 myeloma-relevant genes [6, 22]. An average of >800× depth sequencing coverage was generated per nucleotide. The findings were validated using custom primers targeted against the regions of interest and the Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher). Mutation analysis annotation and filtering was performed using the Ion Reporter Software v4.4 and screened with the Integrative Genomics Viewer (IGV) [16].

Whole-exome sequencing

Sample preparation of MM CD138+ cells and of corresponding peripheral blood mononuclear cells was performed using the Paired-End DNA Sample Prep Kit from Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the standard protocol. Exome enrichment was performed using the SureSelect Human All Exon V6 Kit from Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Clonal cluster generation and 100 bp paired-end sequencing were performed on the HiSeq System (Illumina). Base calling, alignment, variant calling, and annotation were performed using CASAVA (configureBclToFastq.pl script, Illumina), BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool), the HaplotypeCaller of the Genome Analysis Toolkit (Broad institute, Cambridge, MA, USA), and SeattleSeq Annotation, respectively [24].

Cell culture, antibodies, drugs, and reagents

Human MM cell lines AMO1 and L363 (DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI-1640 medium containing 2 mM glutamine (Gibco) and 100 µg/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen) and supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were seeded at a density of 300,000 cells/mL and kept at 5% CO₂ and 37 °C. Antibodies against *PSMB5* (cat. num: 12919) and β-actin (cat. num: 4967) were purchased from Cell Signaling Technologies. BOR, CARF, Ixazomib (IXA), and CB-5083 were obtained from Selleck Chemicals.

Functional analysis

For functional validation, cDNA cloning of wild-type *PSMB5* was performed and the specific mutations detected in the patient introduced by site-directed mutagenesis. The genes were subcloned into a derivative of the “Sleeping Beauty” vector, introduced, together with an expression

plasmid for transposase, via electroporation into AMO1 and L363 cells, and polyclonal cultures of stable transformants were established by puromycin selection for about 2 weeks.

Viability assays were conducted using the alamarBlue reagent (Bio-Rad), and apoptosis was determined by flow cytometry using annexin V-fluorescein isothiocyanate [25] and propidium iodide staining. Western analysis was performed as described before [26].

The activity of specific proteasome subunits $\beta 1$, $\beta 1i$, $\beta 2$, $\beta 2i$, and $\beta 5$ after PI treatment was assessed using a set of activity-based probes (ABP) to visualize human (immuno)proteasome activities, as recently described [11]. Briefly, transposed AMO1 cells were treated for 1 h with different concentrations of PI, washed with phosphate-buffered saline, then lysed and labeled with the ABPs. Subsequently, 30 μ g of protein was loaded and separated on Bis-Tris Gels.

The basal chymotrypsin-like ($\beta 5$) proteasome activity was measured using the Proteasome-Glo protease activity assay (Promega).

Structural analysis was performed with the Chimera 1.11 software [27] and data from public databases (PDB IDs 5LF3 and 4R67) [27–30].

Patient characteristics and follow-up

We functionally validated PSMB5 mutations obtained from a male Caucasian patient who was diagnosed in 2011 at the age of 64 years with lambda light chain myeloma (time point 1 (TP1); paraffin biopsy, 30% CD138+ cell infiltration). Cytogenetics revealed standard risk with del13q. He achieved serologic complete remission (CR) after total therapy “VTD-PACE” induction (BOR, Thalidomide, Dexamethasone (DEX), Cisplatin, Doxorubicin (A), Cyclophosphamide (CYCLO), and Etoposide) followed by high-dose Melphalan treatment. First relapse occurred after 2 years (TP2, paraffin biopsy, 30% infiltration), and the patient received BOR, CYCLO, and DEX (VCD) salvage therapy, which was followed by a second autologous transplant. This resulted in a very good partial remission and the patient remained treatment free for 15 months. Then second relapse occurred and four cycles of a BOR, A, and DEX (PAD)-Lenalidomide (LEN) combination was administered, inducing serologic CR. This remission was maintained without further treatment until third relapse 12 months later (TP3, CD138+ purified MM cells), which was then treated with PAD-Pomalidomide (POM). At this TP, *PSMB5* mutations were detected by M³P profiling. PAD-POM was applied for 3 cycles before serologic disease progression occurred (TP4, CD138+ purified MM cells) and further progression was noted under two additional cycles of a POM-Elotuzumab-DEX combination

(TP5, CD138+ purified MM cells). The regimen was then switched to CARF, LEN, and DEX (KRD) salvage therapy, with the patient being responsive and under treatment until September 2017 (TP6, CD138+ purified MM cells). Regrettably, the patient died shortly thereafter due to the consequences of a car accident.

These bone marrow aspirates were obtained at the Department of Internal Medicine II of the University Hospital Würzburg after informed consent and in accordance with the Declaration of Helsinki, within the frame of sample acquisition for the Clinical Research Unit 216 (KFO216) “Multiple Myeloma”. Permission was granted by the local ethics committee (Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg; reference number 76/13).

Results

The mutation frequency for PSMB5 and other proteasome genes in primary MM increases with drug treatment

Somatic mutations that affect the primary structure of PSMB5 have not previously been described from MM patients, even though >3000 primary samples have now been sequenced by targeted or high-throughput approaches [1, 2, 6, 22, 23, 31]. However, the large majority of these tumor samples were acquired at diagnosis. In an analysis of 1241 newly diagnosed MM patients, in fact, only one

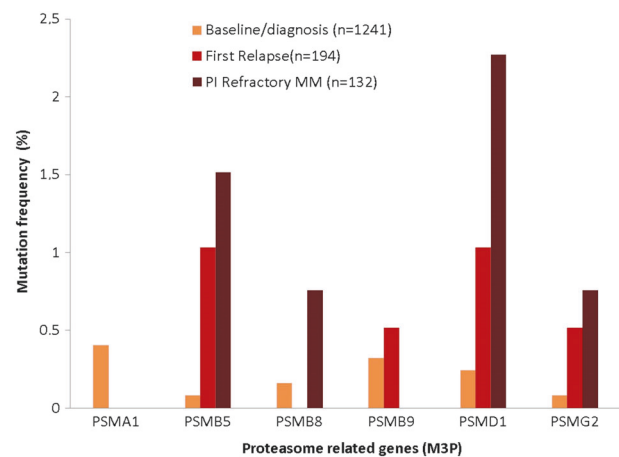


Fig. 1 Summary of proteasome subunit mutations in genes included in the M³P selection panel (*PSMA1*, *PSMB5*, *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMD1*, and *PSMG2*) from different myeloma cohorts. Base line/Diagnosis: 758 WES baseline cases from the CoMMpass dataset, 331 M³P newly diagnosed cases and 152 untreated cases from previously published datasets. First relapse: 194 WES pretreated cases from the CoMMpass dataset. Refractory: 123 M³P multidrug refractory (rMM) cases and 38 WES rMM cases from a Heidelberg cohort (unpublished data)

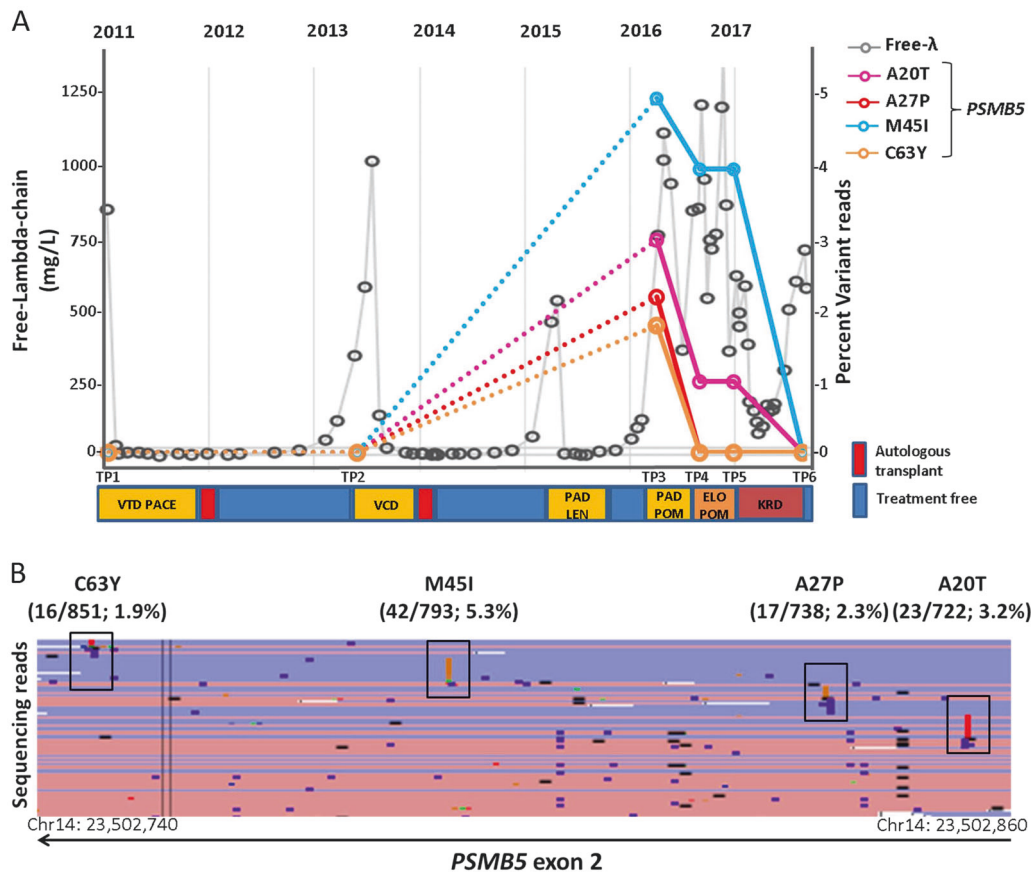


Fig. 2 **a** Clinical and molecular follow-up of the patient. The *PSMB5* mutations were found in third relapse (TP3), after treatment with various proteasome inhibitor-containing therapies (VTD-PACE, VCD, PAD-Len). Three months later, after subsequent treatment with PAD-Pom, two of the subclonal *PSMB5* mutations were undetectable (TP4). Gray line: Free-Lambda-chain quantification (mg/L). Dashed lines: percentage of variant reads for the four *PSMB5* mutations. Time points

sequenced: Paraffin biopsies for diagnosis (TP1) and first relapse (TP2) and three serial CD138⁺ purified aspirates following third relapse. **b** Four *PSMB5* mutations were detected in independent sequencing reads, covered by the same amplicon, suggesting that they most likely belong to different subclones (variant reads/total reads; variant read frequency). BAM file visualization in IGV sequencing reads aligned to hg19

PSMB5-mutated patient (0.08%, affecting aa position Y42C) was identified (Fig. 1). Analysis of the CoMMpass dataset provided 194 first relapse myeloma samples, and two of these harbored *PSMB5* mutations (1.0%). Their importance for PI resistance remains unclear, as they are located in the amino-terminal region (aa 1–59 of the precursor protein) that gets trimmed during assembly of the proteasome. From a multi-refractory cohort from our institution ($n = 161$ cases), two additional cases with selected *PSMB5* mutations were found (1.2%). One is described in this paper, while the other (R180Q) was detected in a patient resistant to BOR and CARF. Our sequencing panel also covers genes for other 20S proteasome subunits like PSMA1 and PSMB9, as well as the *PSMB5* immunoproteasome equivalent PSMB8. Relapsed/refractory primary myeloma samples showed increased mutational rates for all β subunits, as well as for the 19S proteasome subunit PSMD1 (0.24 vs. 2.4%, Fig. 1).

Multiple *PSMB5* mutations in a MM patient intensively treated with BOR

We performed targeted sequencing (average sequencing depth 870 \times) from a MM patient in third relapse (TP3) and detected missense mutations in *NRAS* (p.G61R, VR = 38%) and *MAX* (p.R35H, VR = 62.8%), both confirmed by WES (Supplemental 1). In addition, four subclonal mutations were found in the gene encoding proteasome subunit beta 5 (*PSMB5*): c.235G>A (p.A20T), c.256G>C (p.A27P), c.312G>C (p.M45I), and c.365G>A (p.C63Y) (protein positions refer to the cleaved mature protein) with VRs ranging from 1.9 to 5.3% (Fig. 2a and Supplemental 2). The four *PSMB5* mutations were validated by an independent sequencing reaction (Supplemental 3 and 4). After 4 months (TP4), the M45I and A20T mutations remained detectable, but the C63Y and A27P were absent in the targeted M³P sequencing. Three months later, sustained clearance of both

C63Y and A27P *PSMB5* mutations was confirmed (TP5) obtained under continuous Pomalidomide-Elotuzumab treatment. A last biopsy was received 9 months apart under KRD treatment (TP6), to which the patient was responsive. Importantly, in this biopsy none of the *PSMB5* mutations remained detectable, but the *NRAS* and *MAX* mutations were still confirmed as clonal hallmarks of the tumor cells. To complete the picture of clonal evolution in this patient, we performed a retrospective analysis of tumor DNA obtained from diagnosis (TP1) and first relapse (TP2). The paraffin-embedded bone marrow biopsies available from these TPs contained an estimated 30% MM cell infiltration as defined by immunohistochemistry. For increased sensitivity, we used a custom primer approach and applied a depth coverage of >100,000× and the presence of two of the variants, c.235G>A and c.365G>A, could be confirmed to be pre-existent at both of these early TPs (Supplemental 4).

***PSMB5* mutations are present in independent subclones and located within the BOR-binding site**

All four *PSMB5* mutations occurred in independent reads and within a highly conserved region of exon 2 (Fig. 2b). This implies that the mutations evolved in parallel within minimally two but most likely four competing subclones of

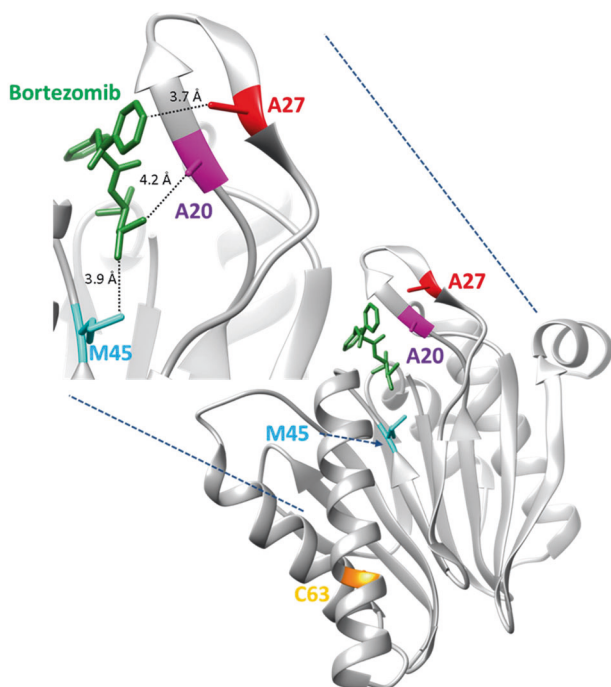


Fig. 3 Three of the four *PSMB5* mutations were found near/at the binding site for BOR. The crystal structure of human Proteasome subunit B type 5 (5LF3) is shown in gray in complex with BOR, here depicted in green. An enlarged view of the BOR-binding site (left) highlights its relation to the mutations found

the tumor. VR frequencies of the single mutations were rather low (A20T = 3.2%, A27P = 2.3%, M45I = 5.3%, and C63Y = 1.9%). However, summing up the VR of all mutated subclones, cells carrying a *PSMB5* mutation may have represented up to 25% of MM cells at this time of first sampling (TP3).

Structural analysis of the mutant PSMB5 proteins was performed. Three mutations (A20T, A27P, M45I) are located within the S1 pocket, essential for the proteasomal chymotrypsin-like activity [29] (Fig. 3), while C63Y is located in proximity to the substrate-binding channel [7]. All four mutations are as yet undescribed from human MM; however, the M45I variant has previously been investigated in cell culture models and was found to induce resistance to BOR, CARF, and ONX0914 (another PI in development) [14, 29]. Furthermore, a different mutation affecting aa position 63 (C63F) has previously been reported to induce PI resistance in vitro [7, 29].

Functional analysis of the *PSMB5* mutants

In order to functionally analyze the effects of these patient-derived *PSMB5* mutations, we introduced them into wild-type *PSMB5* by site-directed mutagenesis and subcloned the mutated genes into a cytomegalovirus promoter-driven derivative of the “Sleeping Beauty” transposon vector. After plasmid transfection into AMO-1 and L363 MM cells, the transposed population was selected through puromycin treatment for about 10 days. Western blotting showed rather moderate and largely identical levels of *PSMB5* overexpression for all *PSMB5* transposed sublines, resulting in visibly higher levels of the uncleaved *PSMB5* precursor protein (Fig. 4a). We next tested the effects of BOR treatment on these sublines via alamarBlue (metabolic activity/viability) and annexin V/propidium iodide (apoptosis) assays (Supplemental 5). As expected, overexpression of wild-type *PSMB5* led to a small (about 1.5-fold) rightward shift of the respective dose–effect curves [12] (Fig. 4b, green curves). In contrast, overexpression of mutant *PSMB5* led to pronounced resistance against BOR, as manifested by strong rightward shifts of the viability (Fig. 4b) with the mutations M45I and A20T providing the highest protection. We then tested whether the *PSMB5* mutants also provided resistance against other PIs. Treatment of the AMO-1 and L-363 sublines with IXA, an orally applicable structural analog of BOR, produced a similar resistance pattern to BOR, although at higher effective concentrations. Treatment with CARF, which represents a different molecular scaffold than BOR and, additionally, acts as an irreversible inhibitor of the 20S proteasome, also revealed increased resistance, especially for the A20T, and, to a lesser extent, the M45I mutations, but the effect was small or even absent in the C63Y and A27P mutants

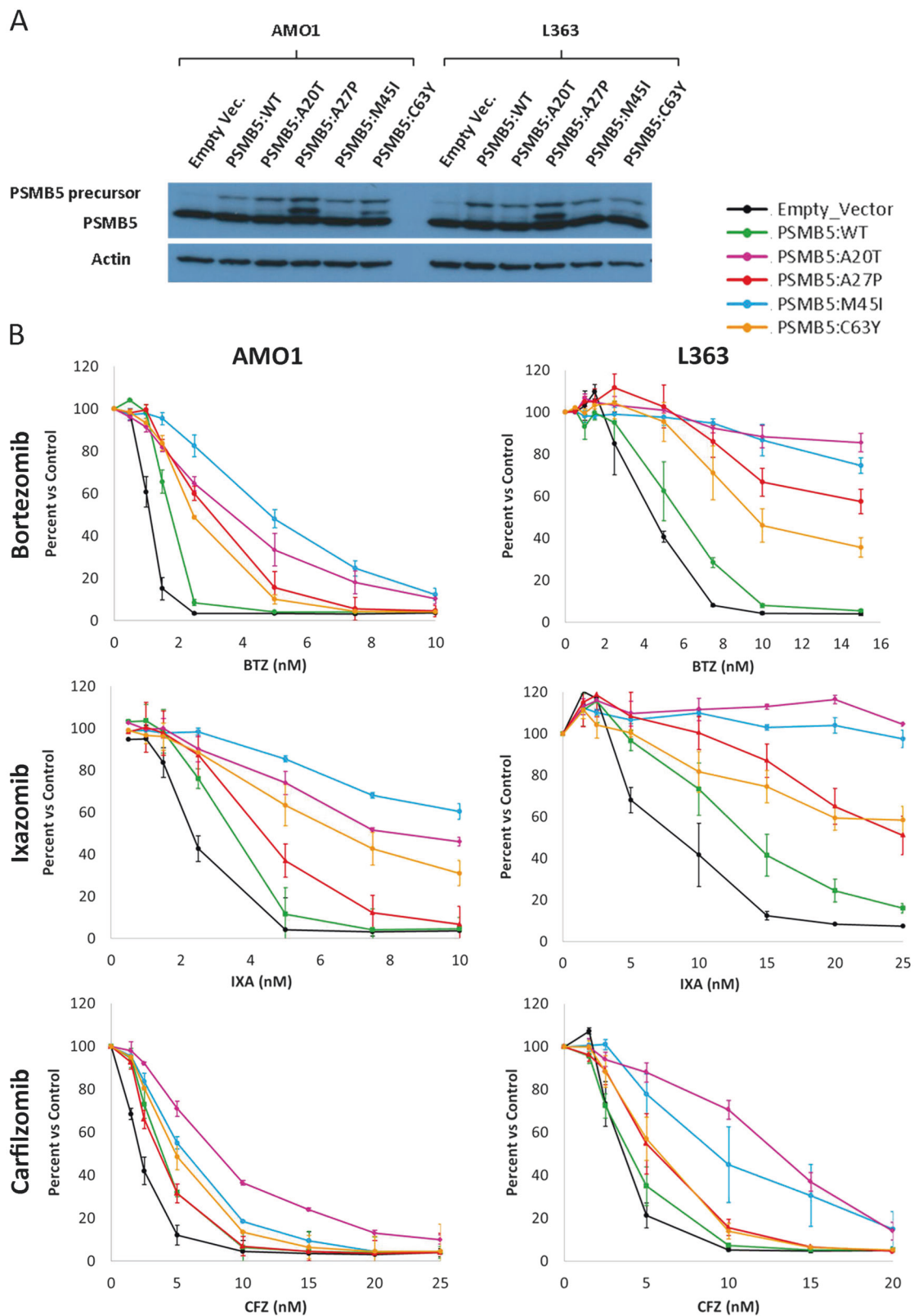
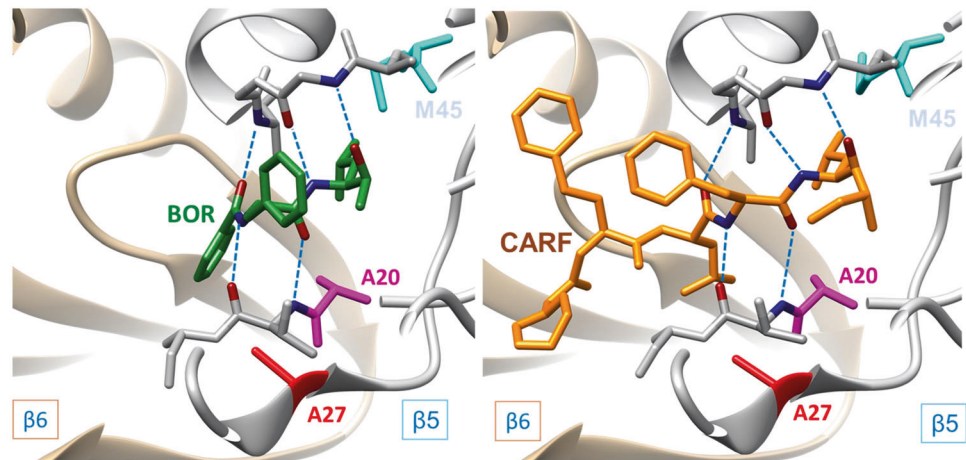


Fig. 4 The newly described *PSMB5* mutations induce resistance to BOR, IXA, and CARF. **a** *PSMB5* overexpression in *PSMB5*-transposed AMO1 sublines compared with empty vector transfected and parental cells. The weaker bands present in *PSMB5*-overexpressing cells represent uncleaved *PSMB5*, which has not yet been incorporated into proteasome complexes. **b** Viability assay (amarBlue) after 48 h of BOR treatment of the *PSMB5* mutant AMO1 (left) and L363 (right) sublines A20T, A27P, M45I, and C63Y compared to cells transfected with the empty vector or with *PSMB5* WT

Fig. 5 The main hydrogen bonds between the proteasome inhibitors BOR (left) and CARF (right) and the chymotrypsin-like active site of the proteasome are shown as blue dashed lines. Both drugs show similar interactions within the S1 pocket. However, the morpholine and phenyl groups in CARF further stabilize its binding to the proteasome, likely compensating for the destabilizing effects of mutation A27P



(Fig. 4b). CARF treatment tended to show better preservation of the steepness of the kill curves, so resistance was easily overcome with increasing concentrations. It is conceivable that the irreversible mechanism of action of CARF translates into a functionally more damaging effect against which *PSMB5* mutations offer less protection.

Inhibitory activity of CARF is less affected by the *PSMB5* mutations

It has been described that in addition to its irreversible mode of action CARF, the morpholine cap present on CARF but not in BOR significantly enhances anchoring to $\beta 5$ and $\beta 6$ subunits (Fig. 5) and improves CARF potency [29]. We therefore used ABPs to quantify the effects on the chymotrypsin-like (*PSMB5*, $\beta 5$), the caspase-like (*PSMB6*, $\beta 1$), and the trypsin-like (*PSMB7*, $\beta 2$) active regions of the proteasome and the immunoproteasome ($\beta 1i$, $\beta 2i$), which are targeted to variable extent by common PI compounds. The effects of BOR and IXA were comparable, both of which affected $\beta 5$ and $\beta 1/\beta 1i$ subunits in the empty vector- and *PSMB5* wt-transposed AMO-1 sublines but lost their capacity for inhibition of $\beta 5$ when *PSMB5* mutations were present. CARF was the most specific $\beta 5$ inhibitor in this assay, with virtually no activity against $\beta 1/\beta 1i$. In keeping with the viability assays, the A27P mutation in *PSMB5* offered very little protection against inhibition by CARF, and the protective effects of A20T could soon be overcome with higher concentrations of the drug (Fig. 6a).

PSMB5-mutated cells display reduced catalytic proteasome activity, but proteasome-independent proteolysis remains unaffected

We next tested whether *PSMB5* mutations have an effect on chymotrypsin-like proteasome activity. Equal amounts of cell lysate from *PSMB5* wild-type (i.e., empty vector- and *PSMB5*-wt-transposed AMO-1 cells) and from the A20T

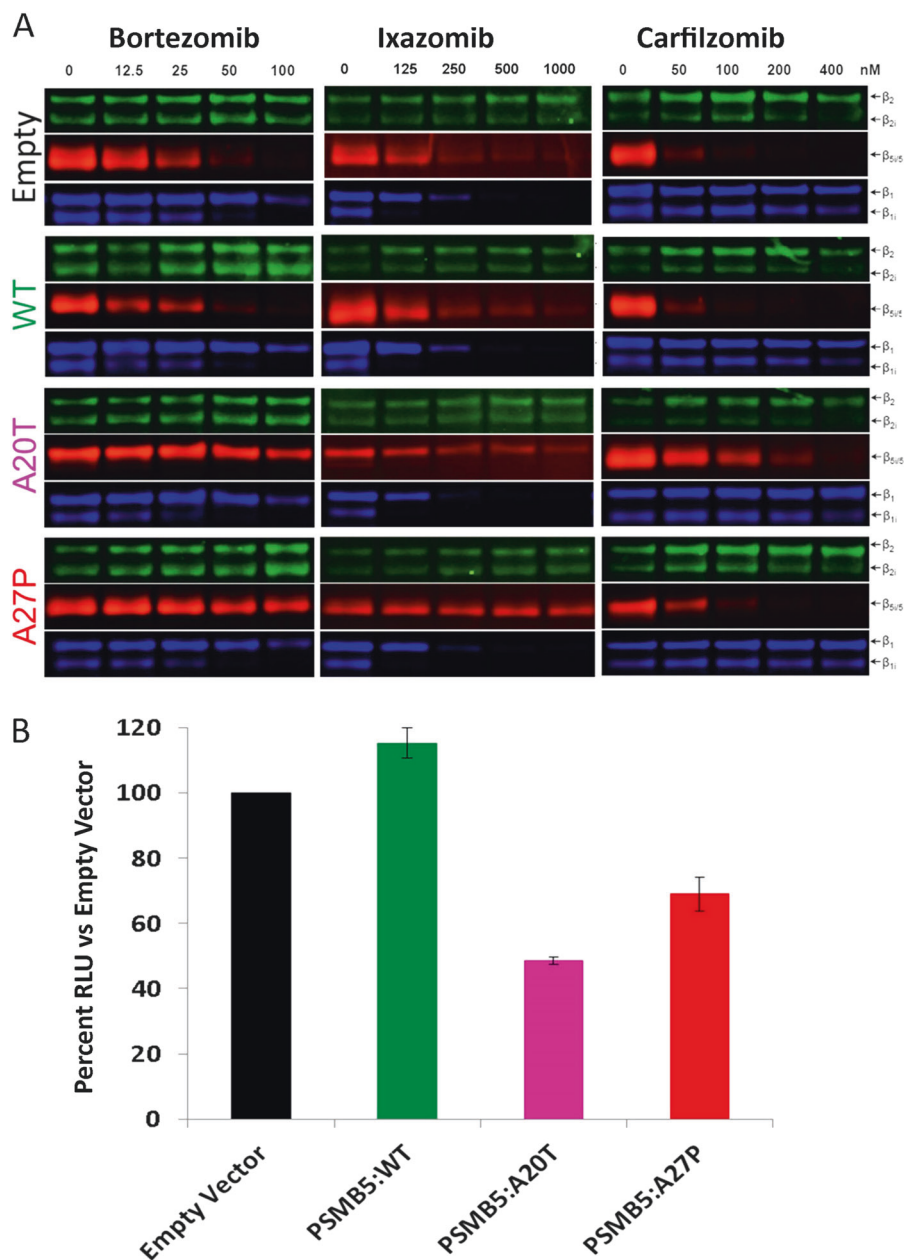
and A27P sublines were tested in the Proteasome-Glo chymotrypsin-like protease activity assay. Whereas the activity in the *PSMB5* wild-type-transposed subline slightly exceeded that of empty vector-transposed control cells, both the A20T and the A27P sublines showed marked reductions in activity levels to about 50 and 70% of the control, respectively (Fig. 6b).

Finally, we investigated whether 20S proteasome-independent blockade of the proteolysis machinery remains effective in the *PSMB5*-mutated AMO-1 sublines, using CB5083, an inhibitor of the p97 AAA ATPase, which is currently in Phase I clinical evaluation in MM. Cells were exposed to the drug for 48 h prior to viability analysis. No differences were observed between *PSMB5* wild-type and mutant cells, showing that the mutations had no effect on the p97 mode of action (Supplemental 6).

Discussion

PSMB5 mutations were first identified as the underlying cause for PI resistance in MM cell lines chronically exposed to BOR. In these models, single point mutations (A49T [11, 12], M45V, C52P [15], T21A, M45I [14], C63F, R24C [7]) were described that cause conformational changes or steric impediments to the drug-binding site. In addition to lowering the affinity for PIs, these mutations have also been found to impair 20S proteasome chymotryptic catalytic function [8–10]. BOR is one of the most commonly used compounds in MM therapy and resistance development is frequently observed. However, unexpectedly, even in large sequencing trials of MM tumor samples, PI-resistance-mediating *PSMB5* mutations were not discovered, and alternative, multi-factorial causes for clinical PI-resistance, such as upregulation of MDR1, changes in energy metabolism, or low activity status of the unfolded protein response, have instead been identified [12]. Here we provide the first direct evidence that *PSMB5* mutations may

Fig. 6 Characterization of proteasome activity. **a** The activity of specific proteasome subunits β_1 , β_{1i} , β_2 , β_{2i} , and β_5 after PI treatment was assessed using a set of activity-based probes (ABP). **b** The basal chymotrypsin-like (β_5) proteasome activity was measured using the Proteasome-Glo protease activity assay (Promega). The chymotrypsin-like activity of the proteasome in the mutated PSMB5 sublines was reduced by up to 50%, compared to empty vector-transposed control cells. Data are based on at least three independent experiments



also play a role in the development of clinical PI resistance in human (Fig. 1). The detection of four different subclonal *PSMB5* mutations at the same TP, found in a heavily BOR-treated MM patient in our institution, all of which functionally proven to provide protection against BOR, implies a role of *PSMB5* point mutations as a therapy-selected resistance mechanism to PI treatment in MM. Importantly, we observed that, at later TPs and under different (although still PI-containing) combination therapies, these *PSMB5* mutant subclones were partially and, eventually, completely (i.e., to below detection levels) eradicated. It is to note that the large majority of available MM genome data is derived from untreated, largely PI-sensitive disease. Thus one might speculate that currently available genomic data just do not

represent relevant TPs at which *PSMB5* and other proteasome subunit mutations could most likely be expected. In addition, higher sequencing resolution enabled us to detect the presence of *PSMB5* mutant subclones and most available genomic data in MM were generated with <100× sequencing coverage. When we tried to corroborate the mutations using a standard WES protocol, they remained undetectable with 100× coverage. (Supplemental 1). Finally, it is to further investigate in how far our and other's [32] observation that the PI-resistance-mediating mutations in *PSMB5* compromise the basal chymotryptic (i.e., *PSMB5*-dependent) proteasome activity is relevant on the persistence of PI-resistant subclones. One might conceive that the same *PSMB5* mutation that provides a selection

benefit under PI stress might confer to a growth disadvantage as soon as the PI-induced stress has been lifted. To what extent this might contribute to the absence of clonal *PSMB5* mutations in MM sequencing studies remains speculative and needs further investigation in samples collected at appropriate TPs.

According to current theories of clonal evolution [31–34] and the “Big Bang” model of cancer [4], the selection pressure applied through therapy led to the outgrowth of the different *PSMB5* mutant subclones. This mimics well the situation as described for in vitro selected BOR-resistant cells. One of the four *PSMB5* variants discovered in this patient (M45I) and one of the mutation loci (C63Y—but affecting a different aa change—C63F) were actually previously reported and related to PI resistance in such in vitro models [7, 29]. All four *PSMB5* mutations found in this patient are located in a highly conserved region in exon 2 and all of them cause significant resistance to BOR as shown by the pronounced rightward shifts of the viability/kill curves with respect to empty vector-transfected or wild-type *PSMB5*-transfected cells. We admit that there is an ongoing discussion on how to quantify best in vitro these effects, in particular since the exact levels of expression of the introduced genes with respect to the remaining endogenous wild-type copies remains unknown [29].

A major finding of this study is the selective resistance induction toward different PIs. The VR reduction for the M45I and A20T subclones and the clearance for the A27P and C63Y subclones by three cycles of POM-PAD therapy (TP4 and TP5) is remarkable, since it was achieved with a treatment that—from a clinician’s perspective—was considered to be unsuccessful: an increase in free light chain levels was observed after three cycles of POM-PAD therapy (Fig. 2). In vitro, the four mutations mediate different degrees of resistance against BOR, IXA, and CARF. The mutations A27P and C63Y had the lowest effect in both MM cell line models and against the three PIs. Indeed, A27P even provided no (AM01) or just weak (L363) protection against exposure to CARF (Fig. 4). In silico analysis of the main hydrogen bonds between the different PIs and the proteasome showed that, although the chemical structures of BOR and CARF are different, the hydrogen bond interactions within the S1 substrate pocket (formed by the $\beta 5$ and $\beta 6$ subunits) are largely similar, with PSMB5 residues A20 and M45 located in the immediate vicinity of some of these bonds (blue dashed lines, Fig. 5). However, Huber et al. [29] identified exclusive van der Waals interactions between the N-morpholine cap of CARF and the $\beta 5$ and $\beta 6$ subunits. This unique feature of CARF may permit stronger binding of the inhibitor and retain CARF sensitivity even in the presence of the A27P mutation.

ABP analysis for the different proteasome subunits independently confirmed our observation: whereas both mutants effectively block the anti- $\beta 5$ -activity of BOR and

IXA, the A27P mutation barely affects CARF inhibition, and the A20T protection can be overcome by increased CARF dosage.

PSMB5 impaired proteasome activity can be counterbalanced through the activation of alternative molecular pathways leading to increased gene expression of other proteasomal subunits or proteins involved in intracellular proteostasis control. One example is the ATPase valosin-containing protein (VCP/p97). p97 inhibition leads to intracellular proteotoxic stress and cell death and inhibitory compounds are being tested in Phase I clinical trials in MM [35–37]. Interestingly, the survival advantage caused by mutant *PSMB5*-mediated PI resistance could be overcome through inhibition of the p97 rescue pathway, thus highlighting a potential treatment approach for BOR-, CARF-, and IXA-resistant MM patients.

In summary, this work not only reports the description and functional validation of the first *PSMB5* mutants in human MM disease; we further demonstrate variable resistance induction through different mutations to common PIs used in the clinic and provide strategies to overcome drug resistance. Finally, we are first to describe an increased mutation incidence of *PSMB5* and other proteasome subunit encoding genes in relapsed disease, indicating a role for point mutations as a mechanism of PI resistance and tumor evolution in MM.

Acknowledgements This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO 216), the IZKF Würzburg to KMK and SB, and by the Progetto professionalità from the Banca del Monte di Lombardia Foundation to MDV.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
- Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:91–101.
- Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, et al. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet*. 2015;47:209–16.
- Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016;128:1735–44.
- Fonseca R, Abouzaid S, Bonafede M, Cai Q, Parikh K, Cosler L, et al. Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, 2000–2014. *Leukemia*. 2017;31:1915–21.

6. Kortum KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi CX, Zhu YX, Bruins L, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood*. 2016;128:1226–33.
7. Suzuki E, Demo S, Deu E, Keats J, Arastu-Kapur S, Bergsagel PL, et al. Molecular mechanisms of bortezomib resistant adenocarcinoma cells. *PLoS ONE*. 2011;6:e27996.
8. Verbrugge SE, Assaraf YG, Dijkmans BA, Scheffer GL, Al M, den Uyl D, et al. Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno)proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341:174–82.
9. Zhu YX, Tiedemann R, Shi CX, Yin H, Schmidt JE, Bruins LA, et al. RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood*. 2011;117:3847–57.
10. Soriano GP, Besse L, Li N, Kraus M, Besse A, Meeuwenoord N, et al. Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia*. 2016;30:2198–207.
11. Besse A, Stolze SC, Rasche L, Weinhold N, Morgan GJ, Kraus M, et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32:391–401.
12. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunitbeta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*. 2008;112:2489–99.
13. Wang L, Kumar S, Fridley BL, Kalari KR, Moon I, Pelleymounter LL, et al. Proteasome beta subunit pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res: an official journal of the American Association for Cancer Res*. 2008;14:3503–13.
14. Tsvetkov P, Mendillo ML, Zhao J, Carette JE, Merrill PH, Cikes D, et al. Compromising the 19S proteasome complex protects cells from reduced flux through the proteasome. *eLife*. 2015;4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08467>.
15. Tsvetkov P, Sokol E, Jin D, Brune Z, Thiru P, Ghandi M, et al. Suppression of 19S proteasome subunits marks emergence of an altered cell state in diverse cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:382–7.
16. Shi CX, Kortum KM, Zhu YX, Bruins LA, Jedlowski P, Votruba PG, et al. CRISPR genome-wide screening identifies dependence on the proteasome subunit PSMC6 for bortezomib sensitivity in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:2862–70.
17. Balsas P, Galan-Malo P, Marzo I, Naval J. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSMbeta5 overexpression and polyploidy. *Leuk Res*. 2012;36:212–8.
18. Shuqing L, Jianmin Y, Chongmei H, Hui C, Wang J. Upregulated expression of the PSMB5 gene may contribute to drug resistance in patient with multiple myeloma when treated with bortezomib-based regimen. *Exp Hematol*. 2011;39:1117–8.
19. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, et al. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*. 2003;63:6174–7.
20. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2012;120:3260–70.
21. Lichter DI, Danaee H, Pickard MD, Tayber O, Sintchak M, Shi H, et al. Sequence analysis of beta-subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. *Blood*. 2012;120:4513–6.
22. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, Barrio S, Shi CS, Zhu YX, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2016;6:e397.
23. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33:3911–20.
24. Leich E, Weissbach S, Klein HU, Grieb T, Pischmarov J, Stuhmer T, et al. Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules. *Blood Cancer J*. 2013;3:e102.
25. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc*. 2009;4:1383–95.
26. Hausmann S, Brandt E, Kochel C, Einsele H, Bargou RC, Seggewiss-Bernhardt R, et al. Loss of serum and glucocorticoid-regulated kinase 3 (SGK3) does not affect proliferation and survival of multiple myeloma cell lines. *PLoS ONE*. 2015;10:e0122689.
27. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25:1605–12.
28. Harshbarger W, Miller C, Diedrich C, Sacchetti J. Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib. *Structure*. 2015;23:418–24.
29. Huber EM, Heinemeyer W, Groll M. Bortezomib-resistant mutant proteasomes: structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914. *Structure*. 2015;23:407–17.
30. Schrader J, Henneberg F, Mata RA, Tittmann K, Schneider TR, Stark H, et al. The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science*. 2016;353:594–8.
31. Egan JB, Shi CX, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012;120:1060–6.
32. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014;28:1705–15.
33. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120:1067–76.
34. Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, Chaffee KG, Secreto C, Kortum KM, et al. Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia*. 2017;31:170–6.
35. Radhakrishnan SK, den Besten W, Deshaies RJ. p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition. *eLife*. 2014;3:e01856.
36. Parzych K, Chinn TM, Chen Z, Loaiza S, Porsch F, Valbuena GN, et al. Inadequate fine-tuning of protein synthesis and failure of amino acid homeostasis following inhibition of the ATPase VCP/p97. *Cell Death Dis*. 2015;6:e2031.
37. Radhakrishnan SK, Lee CS, Young P, Beskow A, Chan JY, Deshaies RJ. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol Cell*. 2010;38:17–28.

Mutational screening of newly diagnosed multiple myeloma patients by deep targeted sequencing

Multiple myeloma (MM) is a hematologic neoplasm that develops after transformation and excessive growth of plasma cells in the bone marrow. MM is characterized by heterogeneous genetic abnormalities and an extensive range of clinical outcomes.^{1,2} The marked variability of responses and the limited clinical prognostic value of the current genetic information justify the need to identify new biomarkers of response and develop personalized medicine strategies.³ The recent introduction of next-generation sequencing technologies has considerably advanced our understanding of the biological features of MM.^{4,6} Accordingly, we used a targeted deep sequencing panel, applying the highest read depth to date, to detect

minor subclones and evaluated their impact on response to treatment. We also integrated these data with the clinical features of a very homogeneous cohort of patients to unearth new patterns of genetic alterations and gain new insights into the complexity of the clonal and subclonal architecture of MM.

We analyzed 79 tumor samples from newly diagnosed MM patients enrolled in the GEM10MAS65 clinical trial (registered at www.clinicaltrials.gov as #NCT01237249).⁷ This phase II study enrolled patients older than 65 years, and randomly assigned them to one of two treatment arms: sequential melphalan/prednisone/bortezomib (MPV) followed by lenalidomide/low-dose dexamethasone (Rd), or alternating MPV with Rd. This clinical trial was carried out in compliance with the Helsinki Declaration: it was approved by the appropriate research

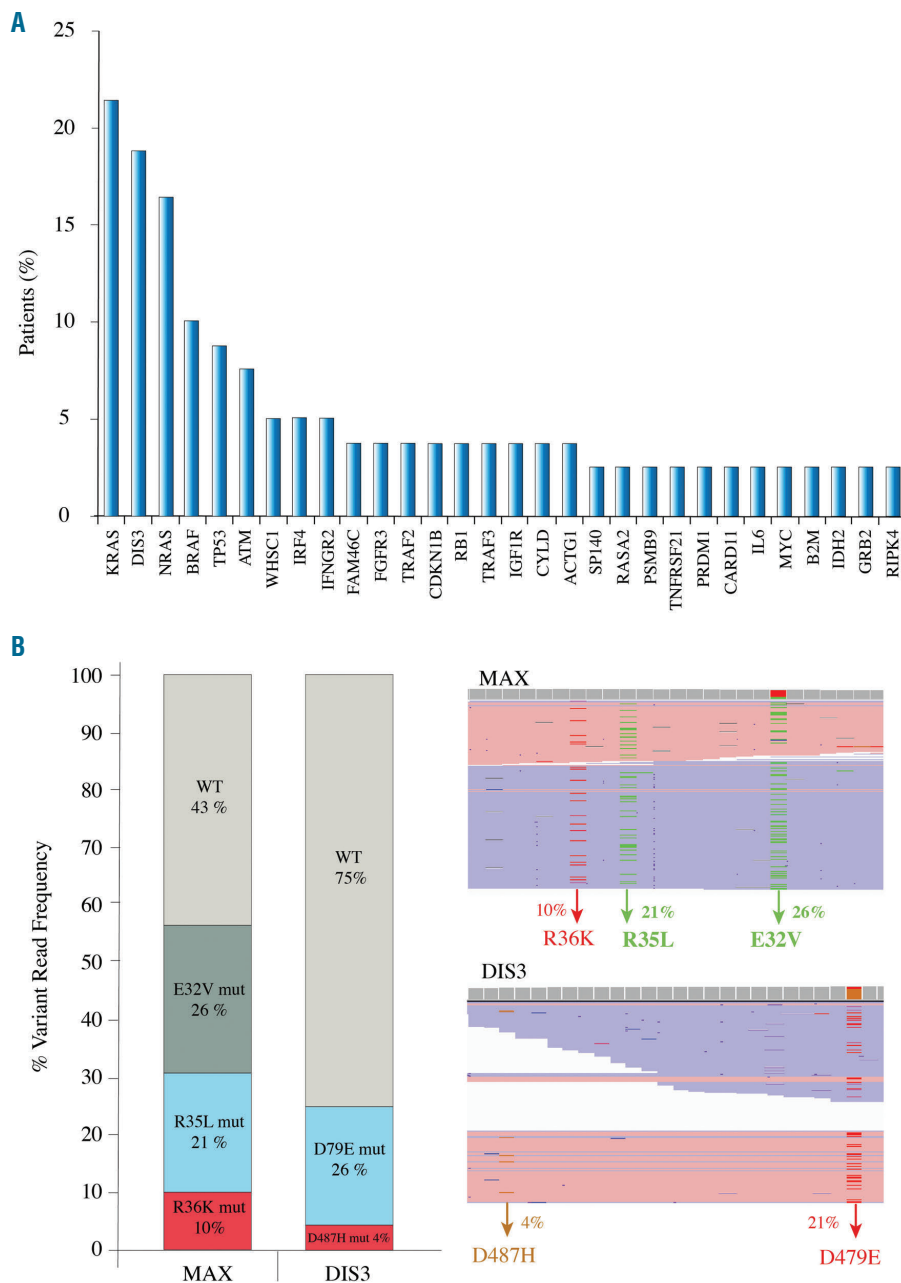


Figure 1. Mutated genes and parallel clonal evolution. (A) Fifty-four genes were mutated in 79 newly diagnosed MM patients. *KRAS*, *DIS3*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* mutations accounted for 42% of all the mutations. (B) *MAX* (right and up) and *DIS3* (left and down) showed concomitant mutations within the same patient. The proximity between subclonal mutations enabled us to detect that variants were in different sequencing reads, indicating a possible parallel subclonal evolution.

Ethics Committees and all participants provided written informed consent before inclusion. The median time to progression of this cohort of patients was 26.4 months and the median follow up was 31.5 months. Plasma cells were enriched from bone marrow aspirates using anti-CD138⁺ immunomagnetic beads obtaining a purity higher than 85% in all cases and only 20 ng of DNA were used for library construction. The panel screens 77 genes that are frequently mutated in MM, including those related to critical pathophysiological pathways, genes associated with drug resistance, or those targetable by molecular drugs (*Online Supplementary Table S1*).⁸⁻¹⁰ The average coverage depth for CD138⁺ and CD138⁻ samples was 1600 × and 900 ×, respectively. The minimum coverage of the detected variants was 20 ×, and the average cover-

age was 370 ×. We applied two different bioinformatics pipelines developed by ThermoFisher (Ion reporter 5.0) and by the Spanish National Cancer Research Center (*Rubioseq*, <http://rubioseq.bioinfo.cnio.es/>).¹¹ We also sequenced 11 germline fractions available to confirm that most of the germinal variants had been correctly excluded by our conservative filter criteria.

We identified 168 non-synonymous missense/nonsense/stop-loss single variants, of which 81 (48%) were predicted to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2, and 61 (36%) have been described in the COSMIC database. Eighty-five percent of patients harbored at least one mutation, with there being a median of 2.1 mutations per patient. Mutations were detected in 53 genes, although the following five genes accounted for 42% of the total

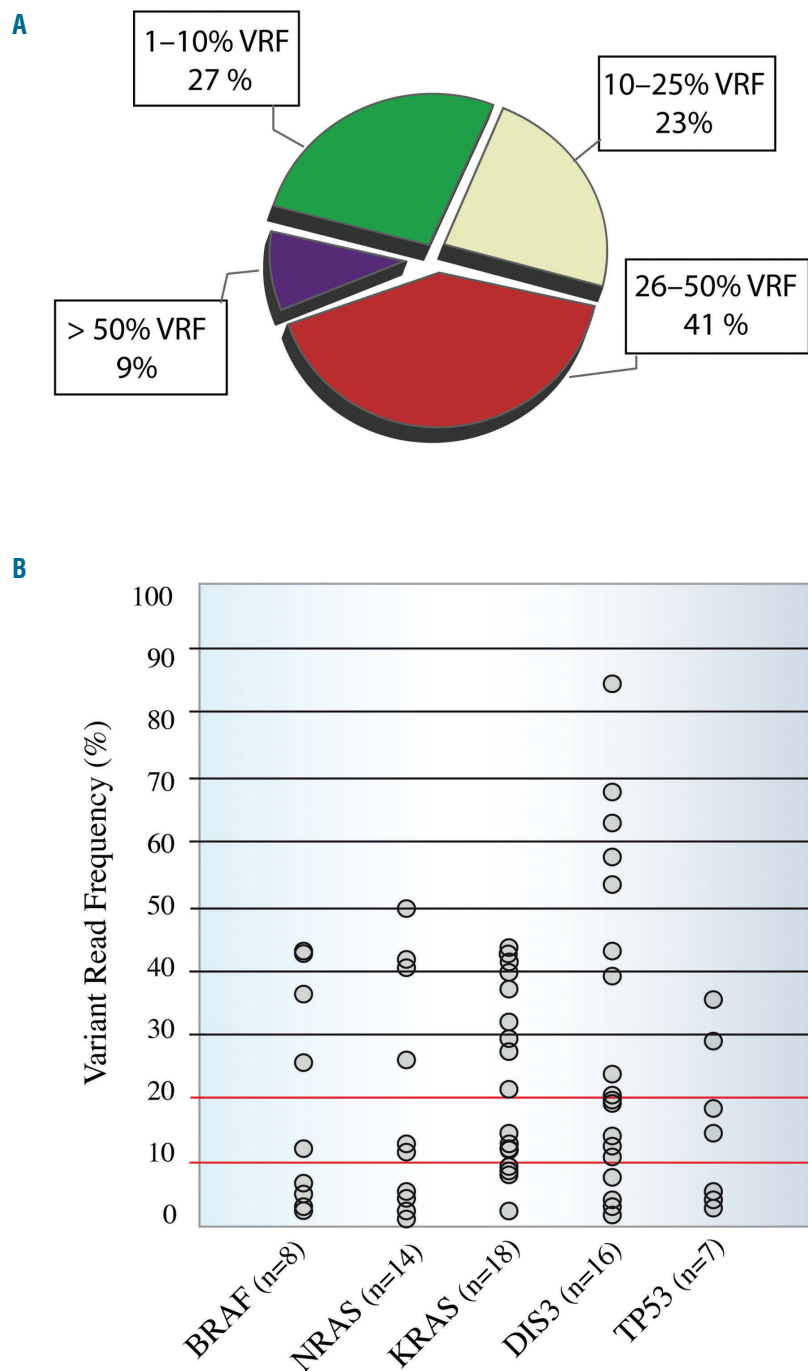


Figure 2. Clonal and subclonal heterogeneity and variant read frequency distributions. (A) Fifty percent of mutations (85/168) had a variable read frequency (VRF) <25%, and almost half of them (46/168) had a VRF <10%. These values highlight the importance of detecting variants at very low frequencies in newly diagnosed patients. (B) Distribution of the detected variants in the most frequently mutated genes. The number of patients harboring the mutations is indicated below the name of the gene. *DIS3* was the only gene in which a mutation VRF >50% was found.

number of mutations: *KRAS* (21.5% of patients), *DIS3* (19%), *NRAS* (16.5%), *BRAF* (10.1%) and *TP53* (8.8%) (Figure 1A). The *RAS* pathway was the most recurrently mutated, present in 48% (39/79) of patients. Seventy-two and 100% of *KRAS* and *NRAS* mutations, respectively, were detected at the hotspot codons 12, 13 and 61, and the targetable *BRAF* V600E activating mutation was detected in one patient. *KRAS* and *BRAF* mutations were co-existent in three patients, while *RAS* was always mutated exclusively. NF- κ B was the second most fre-

quently mutated pathway in our cohort, accounting for 15% of all mutations; mutations were found in the genes of 25% of the patients (19/79), including the adapter signaling genes *TRAF3* (1 nonsense and 4 missense) and *TRAF2* (3 missense). All were predicted to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2. Other pathways that were altered in our cohort were *MYC*, in 11% of patients (9/79), and *Cereblon* and *Cyclin*, each found in 9% of patients (7/79). Multiple mutations in the same gene were observed in 12 patients, affecting *DIS3* (n=4), *KRAS*

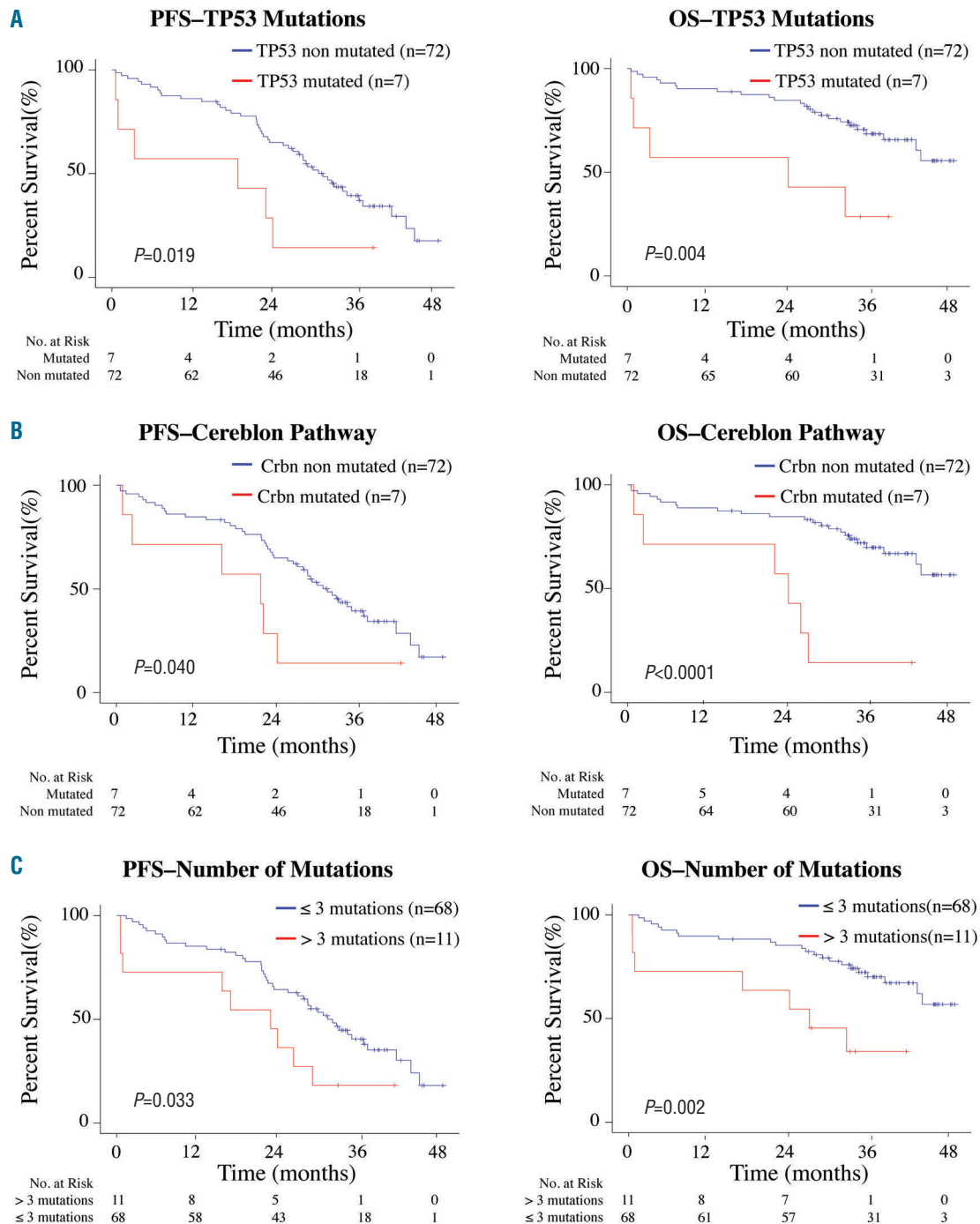


Figure 3. Negative impact of genetic alterations on progression-free survival (left) and overall survival (right). (A) Mutations in *TP53*. (B) Mutations in the Cereblon pathway. (C) More than three mutations (1 mutation/61 kb of DNA).

(n=3), *NRAS* (n=2), *MAX* (n=1), *TRAF3* (n=1) and *TP53* (n=1) genes. The *MAX* mutations were missense and were located at the known *MAX* hotspots E32V, R35L and R36K. All three *MAX* mutations were found to be subclonal, with variant read frequencies (VRF) of 26%, 21% and 10%, respectively. Interestingly, due to the proximity between mutations it was possible to confirm that each variant was located on a different sequencing read, with no read containing more than one mutation (Figure 1B). Since this patient had a diploid karyotype, the entire tumor was affected by the mutations in the *MAX* gene, but with a parallel evolution of the three different subclones. The same finding was made in one of the patients who harbored multiple mutations in *DIS3* (Figure 1B); in this case, the two D487H and D479E hotspot mutations were subclonal, with a VRF of 4% and 21%, respectively, and presented exclusively in different reads. Our cohort of patients revealed a broad VRF landscape, with 50% of variants (85/170) having a VRF below 25% and 27% (46/170) having a VRF below 10% (Figure 2A). The VRF of most of the mutations in *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* and *TP53* was lower than 40%, while that of *DIS3* mutations showed a broader range (2% to 85%) (Figure 2B). The *DIS3* gene had the largest number of low VRF mutations (5/20), all of which were considered to be pathogenic by SIFT and PolyPhen-2, and four of which were located in hotspots of the catalytic RNB domain (Online Supplementary Figure S1D).

We also evaluated the impact on survival of each individual mutated gene, and of genes grouped according to their pathways. No significant impact on survival was observed for *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* or *DIS3* genes or for the RAS and NF- κ B pathways. The existence of multiple mutations in the same gene or the number of subclonal mutations (<40% VRF) did not affect patients' survival. However, *TP53* mutations were associated with a negative impact on progression-free survival and overall survival ($P=0.019$ and $P=0.004$, respectively) (Figure 3A). Patients with mutations in the Cereblon pathway had significantly shorter progression-free survival and overall survival ($P=0.040$ and $P<0.0001$, respectively) (Figure 3B). We also noted a negative impact on progression-free survival and overall survival as a function of the number of mutations: patients with more than three mutations (>1 mutation per 61 kb of DNA analyzed) relapsed and died prematurely ($P=0.033$ and $P=0.002$, respectively) (Figure 3C). We performed multivariate survival analysis using a Cox regression model with the Akaike Information Criterion technique for the selection of demographic and cytogenetic variables. The variables selected to build the model were International Staging System score, Eastern Cooperative Oncology Group score and the patient's age. We found a significant negative impact on survival for *TP53* mutations (progression-free survival: hazard ratio, 3.68; 95% confidence interval: 1.45–9.29, $P=0.005$; overall survival: hazard ratio, 9.07; 95% confidence interval: 2.78–9.57, $P=0.0002$).

The genes and pathways found to be most frequently mutated in this study are consistent with those in previous reports (*KRAS* 21% versus 21%, *NRAS* 18% versus 16%, *BRAF* 7% versus 8% and *TP53* 8% versus 8%).^{6,9} The exception was *DIS3*, for which the mutational incidence increased from 9% to 19% due to the deep coverage which enabled the detection of a higher number of subclonal mutations (5/20). In addition, the VRF of mutated RAS genes (<50% in all cases) supports the hypothesis that newly diagnosed MM patients who are not exposed to selective pressure by a therapy are more likely to harbor subclonal than clonal RAS mutations.⁵ The detection

of minor subclones has allowed the identification of a subgroup of patients with poor outcome who would not have been identified by their cytogenetic profile or clinical manifestation, including those negative for del(17p) but positive for *TP53* mutations.¹² Considering the detection threshold in whole-genome and whole-exome sequencing studies, very useful genetic information might be being overlooked. Additionally, the recent discovery that Cereblon is essential for the anti-MM activity of immunomodulatory drugs^{13–15} is especially relevant here because patients enrolled in the GEM10MAS65 trial were all treated with lenalidomide, suggesting that downstream genes such as *IKZF1*, *IKZF2*, *IRF4* and *MYC* should be additionally studied when biomarkers of lenalidomide resistance need to be identified.

In conclusion, this is the first prospective study addressing the role of targeted sequencing in a highly homogeneous series of elderly, newly diagnosed MM patients treated within a clinical trial. Despite the limited number of samples included in the study, the next-generation sequencing strategy used here was capable of detecting mutations in purified plasma cells in most patients. The affordability of next-generation sequencing together with the small sample requirement offers an excellent opportunity to introduce personalized medicine protocols into clinical practice and also to intensify the search for new biomarkers and therapeutic targets to improve treatment selection and survival of MM patients.

Yanira Ruiz-Heredia,¹ Beatriz Sánchez-Vega,¹ Esther Onecha,¹ Santiago Barrio,² Rafael Alonso,³ Jose Carlos Martínez-Ávila,⁴ Isabel Cuenca,¹ Xabier Agirre,⁵ Esteban Braggio,⁶ Miguel-T. Hernández,⁷ Rafael Martínez,⁸ Laura Rosñol,⁹ Norma Gutiérrez,¹⁰ Marisa Martín-Ramos,⁹ Enrique M. Ocio,¹⁰ María-Asunción Echeveste,¹¹ Jaime Pérez de Oteyza,¹² Albert Oriol,¹⁰ Joan Bargay,¹³ Mercedes Gironella,¹⁴ Rosa Ayala,¹ Joan Bladé,¹⁵ María-Victoria Mateos,¹⁰ Klaus M. Kortum,² Keith Stewart,⁶ Ramón García-Sanz,¹⁰ Jesús San Miguel,⁵ Juan José Lahuerta³ and Joaquín Martínez-López¹

¹Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre - Hematological Malignancies Clinical Research Unit H120-CNIO, Madrid, Spain; ²Department of Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, Germany; ³Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁴Clinical Pharmacology Department, La Paz University Hospital, IDIPAZ, UAM, Madrid, Spain; ⁵Department of Hematology, Fundación de Investigación Médica Aplicada (FIAMA), Pamplona, Spain; ⁶Department of Hematology, Mayo Clinic, Phoenix/Scottsdale, AZ, USA; ⁷Department of Hematology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ⁸Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain; ⁹Department of Hematology, Hospital Clínic of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; ¹⁰Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca-Centro Investigación del Cáncer and Hospital Universitario-IBSAL, Salamanca, Spain; ¹¹Department of Hematology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain; ¹²Department of Hematology, Hospital Madrid Norte Sanchinarro, Madrid, Spain; ¹³Department of Hematology, Hospital Sont Llatzer, Palma de Mallorca, Spain; ¹⁴Department of Hematology, Hospital Universitario Vall de Hebrón de Barcelona, Spain and ¹⁵Department of Hematology, Hospital Clínic i Provincial, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Funding: this work was partially supported by a CRIS foundation grant, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) (RD12/0036/0064), Joan Rodés grant (JR 14/00016), Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en

Salud i-PFIS (IFI 14/00008) and Fondo de Investigación Sanitaria PI15/01484 awarded to Joaquín Martínez López

Correspondence: jmarti01@med.ucm.es
doi:10.3324/haematol.2018.188839

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Avet-Loiseau H, Durie BGM, Cavo M, et al. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*. 2013;27(3):711-717.
2. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012;26(2):349-355.
3. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5):2516-2520.
4. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
5. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
6. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3911-3920.
7. Mateos M-V, Martínez-López J, Hernández M-T, et al. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood*. 2016;127(4):420-425.
8. Kortüm KM, Langer C, Monge J, et al. Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P). *Ann Hematol*. 2015;94(7):1205-1211.
9. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2016;6(2):e397.
10. Bolli N, Li Y, Sathiseelan V, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016;6(9):e467.
11. Rubio-Camarillo M, Gómez-López G, Fernández JM, Valencia A, Pisano DG. RUBioSeq: a suite of parallelized pipelines to automate exome variation and bisulfite-seq analyses. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29(13):1687-1689.
12. Kortüm KM, Langer C, Monge J, et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M 3 P) in -17p high risk disease. *Br J Haematol*. 2015;168(4):507-510.sup
13. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(4):536-545.
14. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*. 2011;118(18):4771-4779.
15. Kortum KM, Mai EK, Hanafiah NH, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood*. 2016;128(9):1226-1233.

support for the investigation of the contribution of altered ribosomal biogenesis to an oncogenic differentiation block.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

JB was supported by a Kay Kendall Leukaemia Fund Intermediate Research Fellowship. The Necker laboratory is supported by the Association Laurette Fugain, La Ligue Contre le Cancer and the INCa CARAMELE Translational Research and PhD programs. The Fumagalli laboratory is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche and from the Fondation ARC Pour la Recherche sur le Cancer. The Martens laboratory was supported by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 282510-BLUEPRINT and the Dutch Cancer Foundation (KUN 2011-4937).

G Cordonnier^{1,2}, A Mandoli^{3,5}, A Radhouane^{1,5}, G Hypolite^{1,2},
L Lhermitte^{1,2}, M Belhocine⁴, V Asnafi^{1,2}, E Macintyre^{1,2},
JHA Martens³, S Fumagalli¹ and J Bond^{1,2}

¹Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1151, Paris, France;

²Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France;

³Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands and

⁴Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC), INSERM U1090, Aix-Marseille University UMR-S 1090, Marseille, France
E-mail: stefano.fumagalli@inserm.fr or jonathan.bond@inserm.fr

⁵These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

1 Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH *et al.* Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 2007; **445**: 442–446.

- 2 Ali SA, Zaidi SK, Dacwag CS, Salma N, Young DW, Shakoori AR *et al.* Phenotypic transcription factors epigenetically mediate cell growth control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 6632–6637.
- 3 Cai X, Gao L, Teng L, Ge J, Oo ZM, Kumar AR *et al.* Runx1 deficiency decreases ribosome biogenesis and confers stress resistance to hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2015; **17**: 165–177.
- 4 Bakshi R, Zaidi SK, Pande S, Hassan MQ, Young DW, Montecino M *et al.* The leukemogenic t(8;21) fusion protein AML1-ETO controls rRNA genes and associates with nucleolar-organizing regions at mitotic chromosomes. *J Cell Sci* 2008; **121** (Pt 23): 3981–3990.
- 5 Lopez-Camacho C, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Stein GS. CBFbeta and the leukemogenic fusion protein CBFbeta-SMMHC associate with mitotic chromosomes to epigenetically regulate ribosomal genes. *J Cell Biochem* 2014; **115**: 2155–2164.
- 6 Liu PP, Hajra A, Wijnga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; **85**: 2289–2302.
- 7 Lutterbach B, Hou Y, Durst KL, Hiebert SW. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12822–12827.
- 8 Mandoli A, Singh AA, Jansen PW, Wierenga AT, Riahi H, Franci G *et al.* CBFbeta-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014; **28**: 770–778.
- 9 Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 2012; **485**: 109–113.
- 10 Fumagalli S, Thomas G. The role of p53 in ribosomopathies. *Semin Hematol* 2011; **48**: 97–105.
- 11 Armistead J, Triggs-Raine B. Diverse diseases from a ubiquitous process: the ribosomopathy paradox. *FEBS Lett* 2014; **588**: 1491–1500.
- 12 Ramagopal S, Ennis HL. Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3083–3087.
- 13 Agrawal MG, Bowman LH. Transcriptional and translational regulation of ribosomal protein formation during mouse myoblast differentiation. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4868–4875.
- 14 Gao R, Chen S, Kobayashi M, Yu H, Zhang Y, Wan Y *et al.* Bmi1 promotes erythroid development through regulating ribosome biogenesis. *Stem Cells* 2015; **33**: 925–938.
- 15 Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR *et al.* A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2014; **24**: 165–169.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

OPEN

Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma

Leukemia (2017) **31**, 1446–1449; doi:10.1038/leu.2017.58

The first step for the cure of multiple myeloma (MM) is to achieve a complete response (CR)^{1,2} however, regardless of CR improvement, most patients experience disease progression or relapse in part due to the persistence of low levels of clonal plasma cells after treatment (minimal residual disease (MRD)).³ In addition, many patients who achieve MRD-negative status also relapse, indicating that the sensitivity and specificity of traditional techniques for MRD assessment can be improved.⁴ At

present, multiparameter flow cytometry (MFC), allele-specific oligonucleotide PCR and high-throughput sequencing (NGS) are the three high-sensitivity techniques available for MRD quantification in MM.^{3,5,6} A growing body of evidence strongly suggests that detection of subclinical levels of MRD with this high-sensitivity methods provides powerful independent prognostic information.^{7,8} MFC is the most widely available technique with excellent sensitivity and applicability; however, there is variability in sensitivity, panels and performance between laboratories, and requires high level of expertise.⁹ On the other hand, in previous work, we have shown that NGS of immunoglobulin (IG)

Accepted article preview online 17 February 2017; advance online publication, 10 March 2017

rearranged genes is an effective technology to identify and quantify pathological clonal cells in MM with a sensitivity of at least 0.001%.^{7,10} However, this NGS technology is a proprietary multiplex PCR that is performed at centralized laboratories increasing the turn-around time for the results. Furthermore, the NGS

method for MRD quantification in MM needs additional clinical validation to prove its utility for patient risk stratification, as well as to evaluate the efficacy of different treatment schemes.

In the present study, we describe and analytically validate a simplified in-house deep-sequencing method to identify and quantify MRD in MM patients from 1 µg of DNA. The method uses the standardized primers developed by the Biomed-2 concerted action to amplify all IGH or IGK sequences in a patient sample.¹¹ Libraries were prepared by ligation of specific adaptor oligos and sequenced either on an Ion S5 (ThermoFisher Scientific, Palo Alto, CA, USA) or on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequencing data were analyzed with a set of specific mathematical and bioinformatics tools to identify and quantitate the clone-specific sequence (clonotype) present on each sample (code patent pending). A clonotype was identified when at least 400 identical sequencing reads were obtained, or was present at a frequency of >1%.

We analyzed MRD by deep sequencing in bone marrow (BM) samples from 73 MM patients of which DNA was available for testing (Bioproject PRJNA360043). Patients were enrolled in the phase 2 trial for newly diagnosed elderly MM patients PETHEMA/GEM2010MAS65 study (www.clinicaltrials.gov as #NCT01237249); patients were randomized to receive 9 cycles of bortezomib/

melphalan/prednisone (VMP) followed by 9 cycles of lenalidomide/dexamethasone (Rd; sequential arm, $n=38$) vs 18 alternating cycles of VMP/Rd (alternating arm, $n=35$).¹² Ninety-five percent ($n=69$) of the patients experienced a CR according to the International Myeloma Working Group (IMWG).¹³ Median follow-up of the series was 3 years.

Statistical analyses were performed with the SPSS program version 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Linear regression was used to compare different dilutions of the DNA samples. The Spearman correlation coefficient was used to compare MFC data with NGS data. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were estimated by Kaplan–Meier survival analysis and statistical differences assessed via log-rank and Wilcoxon analyses.

With our approach of deep sequencing, a clonotype was detected in the 97% (71 out of 73) of MM patients, indicating a specificity similar to the clinical specificity reported in the original validation studies of the Biomed-2 method (98%),¹¹ slightly higher to the previously described NGS assay for IG quantification (91%),⁷ and comparable to 8c-MFC.⁸ Clonotypes were not detected in normal tonsil and BM samples, indicating the high specificity of the assay. This method also presents a very good analytical sensitivity of at least 10^{-5} , as determined from a 10-fold dilution curve of commercial control monoclonal and polyclonal DNAs (Figure 1a). With the same primer combinations, the analytical sensitivity of Biomed-2 amplification to detect a clonal population was 10^{-2} for IGH and IGK,¹¹ consequently, applying deep-sequencing technologies to the Biomed-2 design highly improves the sensitivity of clonal identification. In addition, the method also shows high reproducibility between runs and different NGS platforms

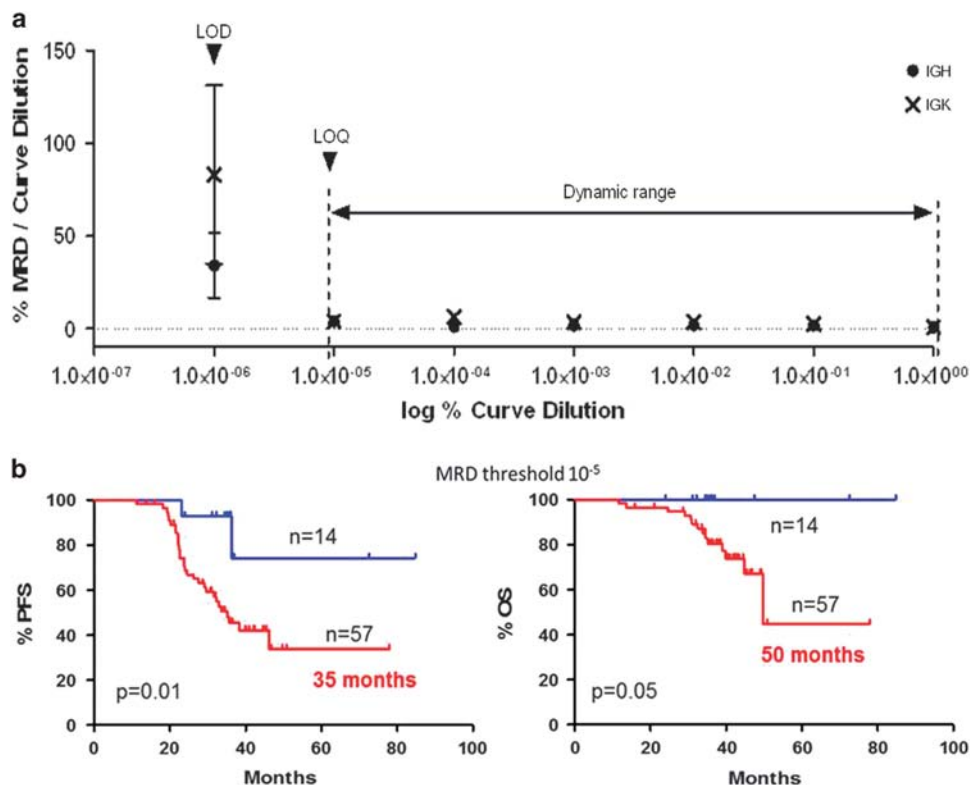


Figure 1. Performance characteristics of the NGS assay. **(a)** Plot of the dynamic range, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) of the method from a 10-fold dilution curve. The vertical axis represents the ratio of MRD values to curve dilution and the horizontal axis represents the logarithm value for curve dilution. $R^2 = 0.98$ and 0.96 for IGH and IGK genes, respectively, $P < 0.0001$. **(b)** Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) plots according to MRD levels. MRD-negative values (blue) and MRD-positive values (Red). The threshold for negative values was 10^{-5} .

(99.2%, 91 samples tested in duplicate in different sequencing runs), and is very precise for samples with MRD-negative values (median CV 8.1%, range 3.9–39).

As demonstrated in several trials, a prolonged therapy is an effective approach to improve survival in elderly patients. This was the basis for the 18 cycles explored in the GEM10mas65 clinical trial (VMP+Ld combination), which yielded excellent clinical results.^{12,14} When we analyzed the molecular response in these elderly MM patients, we found that the proportion of patients achieving an MRD-negative status is significantly higher after 18 cycles of treatment (27% ($n=19$) vs 11.5% ($n=8$) after 18 and 9 cycles, respectively, $P=0.04$), confirming that a prolonged treatment improves the rate of molecular responses. Similar to the data obtained with other MRD methods,^{7,8,15} the achievement of molecular responses measured by our NGS method is able to predict 3-year survival in patients enrolled in the GEM10 clinical trial. Median PFS was 35 months vs not reached for patients with MRD-positive and -negative values, respectively (hazard ratio (HR)=2.76, 95% confidence interval (CI) 1.21–6.25, $P=0.01$; Figure 1b). Median OS was also prolonged in MRD-negative patients compared with MRD-positive patients, with 3-year OS rates of 100% and 45%, respectively (median OS of 50 months vs not reached respectively, HR=3.66, 95% CI 0.98–13.67, $P=0.05$). Hence, achieving a molecular response as determined by this new deep-sequencing method results in improved PFS and OS.

The high efficacy of the treatment based on VMP and Rd in a sequential or alternating scheme (CR rates of 42% and 40%, and PFS of 74% and 80%, respectively) was demonstrated previously.^{8,12} In our present study, when we applied the NGS method to assess MRD negativity, more patients in the sequential treatment than in the alternating arm achieved a molecular

response (36% ($n=13$) vs 20% ($n=7$), respectively). Nonetheless, we observed no significant difference in OS between both treatment arms. Taken together, the data show that patients could not only benefit from a prolonged treatment of 18 cycles but also suggest that 18 cycles of treatment in a sequential scheme can be associated with higher number of molecular responses and prolonged PFS. However, these results should be interpreted carefully because the low number of patients analyzed in the study, and further testing is needed in order to draw stronger conclusions.

Sixty-six of these patients were also analyzed for MRD by MFC using an eight-color monoclonal antibody combination.⁸ The levels of MRD obtained with our method have a high degree of correlation with those assessed by 8c-MFC (total 66 patients, $n=175$ samples, Spearman coefficient $R=0.7917$, $P<0.0001$; $n=109$ post-treatment samples, $R=0.6388$, $P<0.0001$), with a global 89% concordance between MFC and NGS data (Figure 2a). Accordingly, there were no significant differences in terms of PFS and OS between the data obtained by our in-house method and MFC. Nevertheless, patients with discordant results between these two technologies, show an intermediate median PFS (46 months) as compared to double-positive (32 months) or double-negative (not reached) MRD values ($P=0.0063$; Figure 2b). At the time of the analysis, the OS for patients with discordant results was similar to that of NGS MRD-negative patients (not reached) versus a median of 50-month survival for MRD-positive patients ($P=0.0835$).

Due to the need of new response criteria that allows the identification of deeper responses than the now defined as clinical CR, the International Myeloma Working Group (IMWG) has defined new response categories of MRD negativity.¹³ One of them is

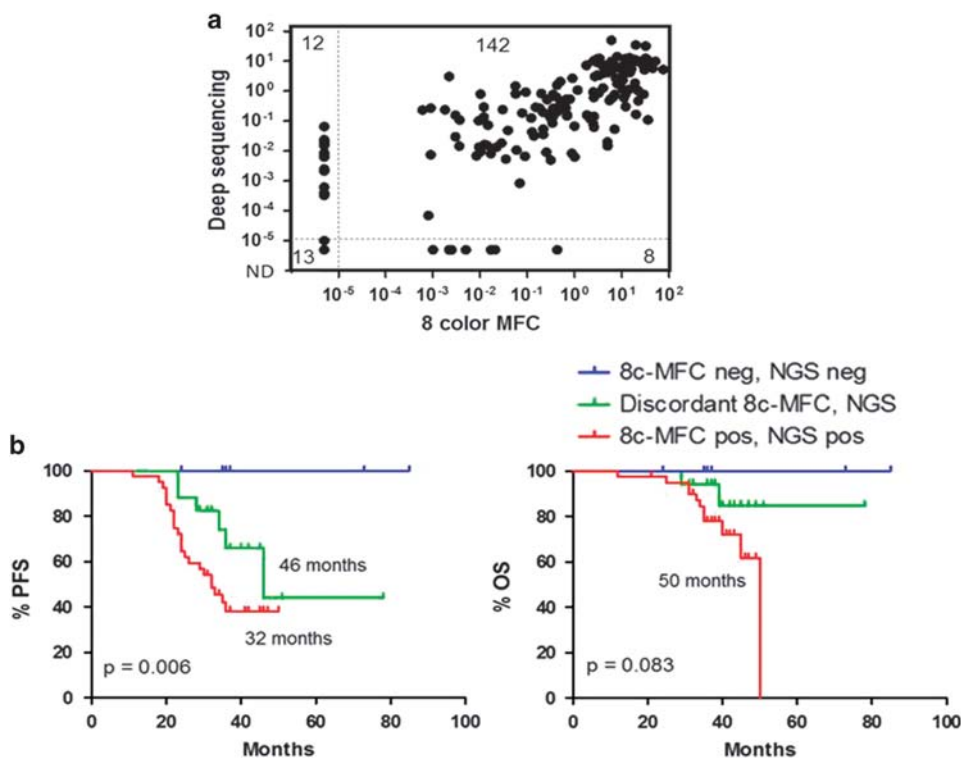


Figure 2. Comparison between deep-sequencing (NGS) and multiparameter flow cytometry (8c-MFC) data. (a) Scatter plot showing correlation of MRD values between deep sequencing and eight-color MFC. Numbers on upper left and lower right indicates samples with discordant results. Spearman correlation coefficient $R=0.7917$, $P<0.0001$. (b) Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) plots of patients grouped according to concordance of MRD levels between NGS and 8c-MFC. Data corresponds to patients with MRD-negative values ($\text{MRD} < 10^{-5}$) by both methods (blue); MRD-positive values ($\text{MRD} > 10^{-5}$) by both methods (red); and MRD with discrepant data between NGS and 8c-MFC (green).

sequencing MRD negative, reflecting the importance of the sensitivity of deep-sequencing methodology applied to the detection of very low numbers of tumor cells. In the new criteria, the IMGW recommends both deep-sequencing or next-generation flow to assess MRD in the BM, depending on the availability of the techniques at each center. As shown in the high degree of correlation of this study, this new method to measure MRD in MM by deep sequencing could be used to define MRD negativity by sequencing as defined in the new criteria of the IMGW.

In summary, our data confirm the clinical application of quantifying MRD levels by our in-house deep-sequencing method in MM patients. Our method shows a high analytical reproducibility and can be implemented in any laboratory with NGS capability, can be applied to the majority of MM patients with a short turn-round time, has a sensitivity of 10^{-5} and can be fully automated (from DNA extraction to data analysis), and thus easily standardized minimizing lab-to-lab variation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Cooperative Research Thematic Network grant RD12/0036/0061 of the Red de Cancer (Cancer Network of Excellence RTICC); the Subdirección General de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain) grants PI15/02062 and PI15/01484; the CRIS against Cancer foundation grant 2014/0120; Joan Rodés grant (JR 14/00016); and Undergraduate Fellowship IFI14/00008.

J Martínez-López^{1,11}, B Sánchez-Vega^{1,11}, S Barrio², I Cuenca¹, Y Ruiz-Heredia¹, R Alonso¹, I Rapado¹, C Marin¹, M-T Cedena¹, B Paiva³, N Puig⁴, M-V Mateos⁴, R Ayala¹, M-T Hernández⁵, C Jimenez⁴, L Rosiñol⁶, R Martínez⁷, A-I Teruel⁸, N Gutiérrez⁴, M-L Martín-Ramos¹, A Oriol⁹, J Bargay¹⁰, J Blade⁶, J San-Miguel³, R García-Sanz⁴ and J-J Lahuerta¹

¹Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain;

²Department of Hematology, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany;

³Department of Hematology, Clínica Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, Spain;

⁴Department of Hematology, Hospital Universitario, Salamanca, Spain;

⁵Department of Hematology, Hospital Universitario de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, Spain;

⁶Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain;

⁷Department of Hematology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain;

⁸Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain;

⁹Department of Hematology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain and

¹⁰Department of Hematology, Hospital Sont Llatzer, Palma de Mallorca, Spain

E-mail: jmarti01@umc.es

¹¹These authors contributed equally to this work.

This study has been presented in part at the Annual Meeting of the American Society of Hematology in 2015 (Orlando, FL, USA) and at the 20th Congress of European Hematology Association (EHA) in 2015 (Vienna, Austria).

REFERENCES

- Martínez-López J, Blade J, Mateos M-V, Grande C, Alegre A, García-Laraña J *et al.* Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 2011; **118**: 529–534.
- Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R *et al.* Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011; **117**: 3025–3031.
- Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L, Vidriales M-B, Montalbán M-Á, Martínez-López J *et al.* High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2012; **119**: 687–691.
- Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, Mateos M-V, Cedena T, Vidriales M-B *et al.* Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015; **126**: 858–862.
- Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M *et al.* Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; **12**: 286–295.
- Martínez-López J, Fernández-Redondo E, García-Sanz R, Montalbán MA, Martínez-Sánchez P, Pavia B *et al.* Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol* 2013; **163**: 581–589.
- Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R *et al.* Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014; **123**: 3073–3079.
- Paiva B, Cedena M-T, Puig N, Arana P, Vidriales M-B, Cordon L *et al.* Minimal residual disease monitoring and immune profiling using second generation flow cytometry in elderly multiple myeloma. *Blood* 2016; **127**: 3165–3174.
- Roschewski M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Mailankody S, Korde N, Landgren O. Minimal residual disease: what are the minimum requirements? *J Clin Oncol* 2014; **32**: 475–476.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E *et al.* Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; **120**: 5173–5180.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
- Mateos M-V, Martínez-López J, Hernández M-T, Ocio E-M, Rosiñol L, Martínez R *et al.* Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood* 2016; **127**: 420–425.
- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P *et al.* International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; **17**: e328–e346.
- Palumbo A, Mina R, Cerrato C, Cavallo F. Role of consolidation/maintenance therapy in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; **13**(Suppl 2): S349–S354.
- Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L *et al.* Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 2077–2084.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2017