



**Universidad de Sevilla**  
**Departamento de Fisiología Médica y Biofísica**

**TESIS DOCTORAL**

**Cambios en los perfiles de expresión génica en  
condiciones fisiológicas *versus* patológicas en el  
sistema hematopoyético**

**Alicia Báez Palomo**

**2014**



La presente tesis doctoral corresponde a un compendio de 3 trabajos previamente publicados y 1 sometido a proceso de publicación que se especifican a continuación:

**1. The Granulocyte colony-stimulating factor produces long-term changes in gene and microRNA expression profiles in CD34+ cells from healthy donors.**

Alicia Báez<sup>1</sup>, Beatriz Martín-Antonio<sup>2</sup>, José I. Piruat<sup>1</sup>, Concepción Prats<sup>1</sup>, Isabel Álvarez-Laderas<sup>1</sup>, Maria Victoria Barbado<sup>1</sup>, Magdalena Carmona<sup>1</sup>, Álvaro Urbano-Ispizua<sup>2,3</sup> y Jose Antonio Pérez-Simón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), CSIC, Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup>Departamento of Hematología, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Josep Carreras, Universidad de Barcelona.

Haematologica. 2014 Feb;99(2):243-51. doi: 10.3324/haematol.2013.086959

**2. Gene and miRNA expression profiles of hematopoietic progenitor cells vary depending on their origin.**

Alicia Báez<sup>1</sup>, Beatriz Martín-Antonio<sup>2</sup>, José I. Piruat<sup>1</sup>, Maria Victoria Barbado<sup>1</sup>, Concepción Prats<sup>1</sup>, Isabel Álvarez-Laderas<sup>1</sup>, Magdalena Carmona<sup>1</sup>, Jose Antonio Pérez-Simón<sup>1</sup> y Álvaro Urbano-Ispizua<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), CSIC, Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup>Departamento of Hematología, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Josep Carreras, Universidad de Barcelona.

Biol Blood Marrow Transplant. 2014 May;20(5):630-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.022.

**3. The CD27<sup>+</sup> memory B cells display changes in the gene expression pattern in elderly individuals.**

Alicia Báez, Isabel Álvarez-Laderas, José I. Piruat, Teresa Caballero-Velázquez, M.Victoria Barbado, África Millán-Uclés, Mayte Medrano, Estefanía García-Guerrero, LI Sánchez-Abarca and José Antonio Pérez-Simón.

Hematology Department; Institute of Biomedicine of Seville (IBIS); University Hospital Virgendel Rocío/CSIC/University of Seville; Seville; Spain.

Immunology. 2014 Sep 6. doi: 10.1111/imm.12381. [Epub ahead of print]

**4. Myelomatous plasma cells display an aberrant gene expression pattern similar to that observed in normal memory B cells**

Alicia Báez, José I Piruat, Teresa Caballero-Velázquez, LI Sánchez-Abarca, Isabel Álvarez-Laderas, M Victoria Barbado, África Millán-Uclés, Jesús Martín-Sánchez, Estefanía García-Guerrero, Mayte Medrano and José Antonio Pérez-Simón.

Hematology Department, University Hospital Virgen del Rocío / Institute of Biomedicine of Seville (IBIS) / CSIC / Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

*A Javi.*

*A mi familia.*

*A los grandes amigos.*



Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar  
en el bello y maravilloso mundo del saber.  
(Albert Einstein)

Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco  
de esa curiosidad que es la madre de la ciencia.  
(Juan Aguilar M)

Los genes, al igual que los diamantes, son para siempre.  
(Richard Dawkins)





## **Agradecimientos**

---



Tengo que agradecer a mucha gente la elaboración de esta tesis, y no me gustaría olvidarme de ninguna de ellas; espero que así sea.

En primer lugar a Álvaro Urbano y a Beatriz Martín por elegirme para ayudarles en su proyecto y por “adentrarme” en el mundo de la investigación clínica, que yo prácticamente desconocía. Descubrí entonces una nueva vocación, un trabajo con el que me sentía muy a gusto, y por ello os estaré siempre agradecida. Esto me recuerda a una frase que mi suegra siempre le decía a mi marido: “niño búscate un trabajo que te guste y no trabajarás ni un solo día de tu vida”, una frase genial, pero que más tarde descubrimos que no era suya. Quisiera dar especialmente las gracias a Bea porque con ella di los primeros pasos hasta que puede valerme por mí misma. Fue una buena maestra y después una amiga.

En segundo lugar a José Antonio Pérez Simón por confiar en mí involucrándome en nuevos proyectos y por dirigirme en la elaboración de este trabajo del que finalmente, creo modestamente, nos podemos sentir muy satisfechos.

A Piru, por ayudarme, aconsejarme y apoyarme en tantas ocasiones. Gracias a ti pude verle el sentido a tantos datos con tantos genes ¡qué locura! Y en lo personal has sido muchas veces como un hermano mayor, muchas gracias, todo se hace más fácil cuando alguien te guía y te indica el camino a seguir.

Cuca, la experta en proteómica, también has sido una buena maestra. Gracias por enseñarme la técnica que más odio en este mundo, los western blot, pero que cuando salen bien...la vida puede ser maravillosa. Eres tan divertida, la persona con la que más me he reído en un laboratorio, así que por favor no cambies nunca.

Mayte, la más peque y dulce del laboratorio, siempre dispuesta a echar una mano. Muchas gracias amiga, dentro de poco estarás en mi lugar, delante del ordenador rematando tu tesis.

No me olvido de mi otra familia, mis Antonias del semáforo jajaja, digo del laboratorio: Afri, Isa y Marina. Marina, mi hematóloga favorita, prácticamente entramos a la misma vez en el Servicio, tú como residente y yo como becaria. Te has convertido en una gran profesional de la que me siento muy orgullosa, y por supuesto en una inseparable, tanto que ¡ya somos vecinas! Afri, que buen fichaje hicimos contigo. Eres de esas personas con la que te encanta estar, porque siempre estas de buen humor, y siempre dispuesta a ayudar. Que buenas terapias hacemos de vuelta a casa en nuestras bicis a lo verano azul, ahí solucionamos todo lo que pasa en el mundo. Isa, todo lo que te puedo decir son cosas buenas. Tras cinco años juntas hemos compartido mil cosas, buenas y no tan buenas, y siempre hemos estado la una para la otra, el punto y la i. Esta tesis me ha costado literalmente sangre, sudor y lágrimas,

y tú lo sabes mejor que nadie; pero también hemos tenido numerosos momentos muy buenos, y esos no los olvidaré nunca.

También quiero dar las gracias a los demás compañeros del laboratorio que han participado en este trabajo, especialmente a Teresa, Nacho e Iván, por enseñarme el maravilloso mundo de la citometría de flujo y los cultivos celulares.

Y por supuesto al Servicio de Hematología al completo del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por acogerme como una más. Especialmente a mi amiga y Data Manager preferida, Rocío.

Hay mucha gente que piensa que las tesis no se deben agradecer a los familiares y amigos, pero a mí personalmente a veces me han ayudado más con su presencia y cariño que cualquiera con una pipeta en la mano. Tengo mucha suerte con la familia que me ha tocado, con los que estuvieron y con los que siguen a mí lado o en la distancia. De todos he aprendido algo, en especial de mis padres, Gabriel y Concha, gracias a ellos he llegado a ser la persona que ha escrito esta tesis; para ellos la mejor tesis del mundo por supuesto.

Javi, tú eres la persona que más ha “sufrido” este periodo de mi vida, pero después de 16 años juntos en los que hemos librado tantas batallas, esto ha sido pan comido. Eres la persona más buena y con más paciencia que conozco, que afortunada soy de que te cruzaras en mi camino. Nunca dejaré de agradecerte lo mucho que me apoyas, me cuidas y me quieres.

Finalmente, quiero dar las gracias a todos mis amigos. A los de toda la vida, a mis hermanos del barrio: Laliloli, David, Vicen, Pedro, Belén, Pepe, Lidia, Rocío, Peri, Lara y Álvaro, porque siempre están y estarán ahí. A mis biólogos: Mani, Teresa, Cheli y Nach; nuestra gran amistad empezó en la carrera, y ha continuado muchos años después y además sé que durará para siempre. A Almudena, una de mis grandes amigas en el IBIS y fuera de él; te echo mucho de menos, ¡vuelve ya! A los matalascañeros: Tote, Belén y Paco, por tantos buenos veranos juntos, y espero que puedan ser muchos más. Y a todos los que formáis parte de mí día a día, que sois muchos, gracias, muchas gracias por acompañarme de una forma u otra en esta aventura.

## **Abreviaturas**

---



**Ag:** antígeno

**Ang-1:** angiopoyetina-1

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BCR:** receptor de células B

**CAR:** células reticulares CXCL12 positivas

**CCDN1:** ciclina D1

**CCDN2:** ciclina D2

**CCDN3:** ciclina D3

**CG:** centro germinal

**CP:** célula plasmática

**CPH:** célula progenitora hematopoyética

**CPm:** célula plasmática mielomatosa

**CU:** cordón umbilical

**D:** segmento génico de diversidad

**EICH:** enfermedad de injerto contra huésped

**EICL:** efecto de injerto contra leucemia o contra tumor

**EIF4EBP1:** proteína de unión 1 del factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E

**FGFR3:** receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico

**G-CSF:** factor estimulador de colonias granulocíticas

**GMSI:** gammapatía monoclonal de significado incierto

**Ig:** inmunoglobulina

**IgH:** cadena pesada de la inmunoglobulina

**IgL:** cadena ligera de la inmunoglobulina

**IL-7:** interleuquina 7

**IMiDs:** sustancias inmunomoduladoras

**J:** segmento génico de unión

**LB:** linfocito B

**LBN:** linfocito B *naive*

**LBM:** linfocito B de memoria

**LCP:** leucemia de células plasmáticas

**LT:** linfocito T

**miRNA (o miARN):** microRNA; micro ácido ribonucleico

**MM:** mieloma múltiple

**MMQ:** mieloma múltiple quiescente

**MMSET:** *myeloma set domain*

**MO:** médula ósea

**OPN:** osteopontina glicoproteína ácida

**PB:** plasmablasto

**qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

**Pro-B:** progenitor del linaje B

**RAG 1:** gen activador de la recombinasa 1

**RAG 2:** gen activador de la recombinasa 2

**SCF:** factor de células madre

**SDF-1 (o CXCL12):** factor-1 derivado del estroma

**Shh:** *sonic hedgehog*

**SP:** sangre periférica

**Tdt:** deoxinucleotidil transferasa terminal

**THPO:** citoquina trombopoyetina

**TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos

**UPR:** respuesta a proteínas mal plegadas

**V:** segmento génico de la región variable

**VCAM-1:** molécula-1 de adhesión de células vasculares

**Wnt:** *wingless*





# Índice

---



<b>PREÁMBULO.....</b>	<b>1</b>
-----------------------	----------

## **INTRODUCCIÓN**

1. Células progenitoras hematopoyéticas.....	5
1.1. Trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	6
1.2. Fuentes de progenitores hematopoyéticos.....	7
1.3. El nicho hematopoyético.....	9
1.4. Movilización de progenitores hematopoyéticos.....	11
1.4.1. Agentes movilizadores.....	12
1.4.2. Mecanismo y efectos del G-CSF.....	13
2. Linfocitos B.....	15
2.1. Desarrollo del linfocito B.....	15
2.1.1. Etapa antígeno-independiente.....	15
2.1.2. Etapa antígeno-dependiente.....	18
3. Mieloma Múltiple.....	22
3.1. De la gammapatía monoclonal al mieloma múltiple.....	22
3.2. Alteraciones moleculares, genéticas y epigenéticas en el mieloma múltiple.....	23
3.2.1. Traslocaciones primarias (IgH).....	24
3.2.2. Traslocaciones secundarias (Ig).....	25
3.2.3. Variaciones en el número de copias.....	25
3.2.4. Desregulación de rutas y procesos de señalización.....	27
3.2.5. Cambios epigenéticos.....	30
3.3. Origen de la célula <i>stem</i> mielomatosa.....	32

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Hipótesis.....	37
Objetivos.....	38

## **RESULTADOS**

<u>Artículo 1.</u> Los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las células progenitoras hematopoyéticas varían dependiendo de su origen.....	41
<u>Artículo 2.</u> El factor estimulador de colonias granulocíticas produce cambios a largo plazo en los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las células CD34+ de donantes sanos.....	53
<u>Artículo 3.</u> Las células B de memoria muestran cambios en los patrones de expresión génica de individuos de edad avanzada.....	64
<u>Artículo 4.</u> Las células plasmáticas mielomatosas muestran un patrón de expresión génica similar al observado en las células B de memoria normales.....	76

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>

## PREÁMBULO

El trabajo realizado en esta tesis doctoral consiste en el estudio de los cambios en la expresión génica que sufren las células hematopoyéticas ante la modificación de las condiciones “fisiológicas” en las que se hallen, por ejemplo en función de su localización o de la edad, y de perturbaciones no fisiológicas, como puede ocurrir tras exposición a fármacos. Así mismo, los estudios realizados persiguen comprobar si estas modificaciones pueden tener alguna similitud con los cambios de expresión génica que ocurren en situaciones patológicas, por ejemplo, en el contexto de la transformación neoplásica.

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) empleadas actualmente en el trasplante presentan diferentes propiedades biológicas en función de su origen: médula ósea (MO), cordón umbilical (CU), o sangre periférica (SP), lo que se traduce en una evolución diferente de los pacientes tras el trasplante según sea la fuente de progenitores utilizada. Esto puede deberse, al menos en parte, a diferencias en los perfiles de expresión génica entre las CPH obtenidas a partir de las distintas fuentes, hecho que pudimos confirmar en el primero de los artículos publicados e incluidos en el presente proyecto de tesis. Tras comprobar que las CPH de SP movilizadas con el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) presentan un patrón de expresión génica distinto respecto a las CPH obtenidas de MO o CU, nos planteamos estudiar los efectos a corto, medio y largo plazo del G-CSF. De este modo pudimos observar cómo su patrón de expresión génica puede modificarse a largo plazo tras exposición a dicho factor.

Por otra parte, quisimos comprobar si los linfocitos B de memoria (LBM), uno de los subtipos celulares más “longevos” dentro del sistema hematopoyético junto con las CPH, podrían sufrir modificaciones en su expresión génica a lo largo del tiempo, con el envejecimiento del individuo. En primer lugar confirmamos que los LBM presentan un perfil de expresión génica muy diferente en sujetos añosos frente a sujetos jóvenes, cosa que no ocurre en otras subpoblaciones de linfocitos B de vida más corta, como los linfocitos B *naive* (LBN). Teniendo en cuenta que el mieloma múltiple es una enfermedad asociada al envejecimiento caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CP) que presentan anomalías en los mecanismos celulares de apoptosis y/o supervivencia celular, nos planteamos que las CP mielomatosas (CPm) podrían tener un patrón de expresión génica similar al de un LBM, y que las modificaciones observadas en la expresión génica en los LBM del anciano podrían subyacer a los procesos de mielomagénesis. En este sentido,

confirmamos que el perfil de expresión génica de las CPm es más parecido al de los LBM que al de las CP normales de individuos sanos. Precisamente, algunos de los genes que se expresan de manera “asincrónica” en las CPm (esto es, que normalmente se expresan en LBM pero que en condiciones normales dejan de hacerlo cuando éste madura a CP) son genes relacionados con longevidad celular que, en cierto modo, confieren a los LBM (y por ende a las CPm) características propias de una célula *stem*.

En resumen, en este trabajo de tesis hemos comprobado que diferentes condiciones fisiológicas (como el envejecimiento), el tratamiento con factores de crecimiento, o bien condiciones patológicas, se asocian a modificaciones en el perfil de expresión génica que subyacen a las propiedades biológicas de los diferentes compartimentos celulares analizados. Nuestras observaciones indican que es necesario un estricto control de estos procesos, especialmente en puntos concretos de la diferenciación hematopoyética (a nivel de CPH o de LBM) en los que tienen lugar procesos que regulan la diferenciación versus el mantenimiento de las propiedades biológicas que confieren a una célula longevidad, quiescencia o división asimétrica (esto es “stemness”).

# **Introducción**

---





## 1. CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

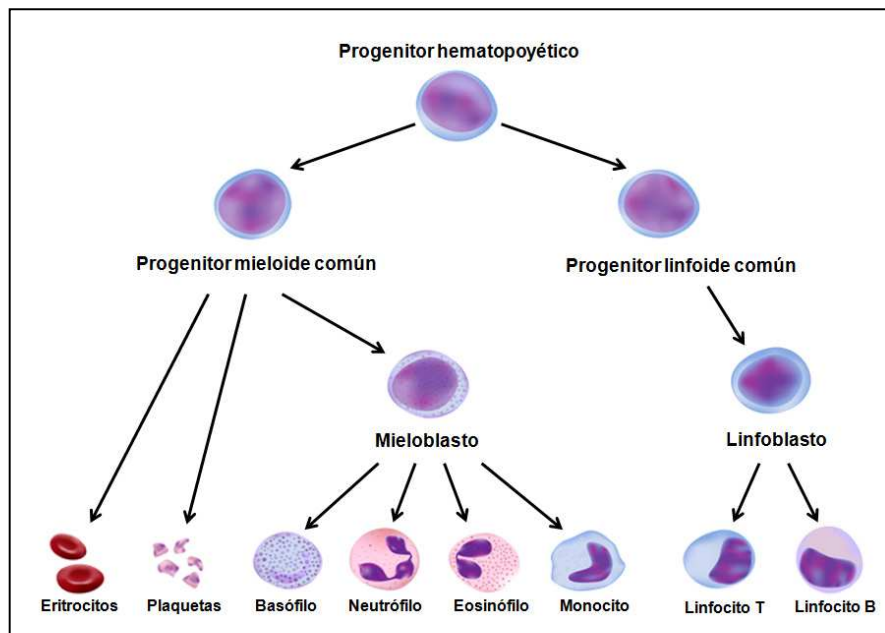
En términos generales se define a una célula madre como una célula progenitora con capacidad de auto-renovación y de diferenciación<sup>1</sup>. La auto-renovación es la capacidad de una célula para dividirse y dar lugar a dos células hijas con un patrón de expresión génica idéntico a ella; mientras que la diferenciación es la secuencia genéticamente programada de fenómenos mediante los cuales una célula origina células hijas que experimentan ganancia selectiva de funciones específicas a expensas de perder su capacidad de auto-renovación.

En los animales superiores, las células madre se han clasificado en dos grandes grupos, según su tejido de origen:

-Células madre embrionarias: derivan de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), y son capaces de generar todos los diferentes tipos celulares del cuerpo. Por ello también se denominan células pluripotenciales<sup>2</sup>.

-Células madre específicas de tejido o células madre adultas: se encuentran en la mayoría de los tejidos de un individuo, y son capaces de originar las células de un órgano o tejido concreto tanto en el embrión, como en el adulto<sup>3</sup>, incluso de distintas capas embrionarias (endodermo, ectodermo o mesodermo). También se denominan células multipotenciales.

En la actualidad, se han conseguido aislar células madre adultas a partir de la sangre, piel, grasa subcutánea, músculo cardíaco y esquelético, cerebro, retina, páncreas, etc<sup>4,5</sup>; y se han podido cultivar tanto *in vitro* (en el laboratorio), como *in vivo* (en modelo animal)<sup>6</sup>. El ejemplo más paradigmático de células madre, es el de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), capaces de generar las distintas estirpes celulares del sistema sanguíneo y sistema inmune mediante un proceso llamado hematopoyesis, que tiene lugar fundamentalmente en la médula ósea (MO). Durante la hematopoyesis, las CPH se diferencian hacia un progenitor mieloide común o un progenitor linfoide común, los cuales, mediante los procesos de mielopoyesis y linfopoyesis van a diferenciarse hacia los diferentes subtipos celulares presentes en la sangre periférica (SP) (Figura 1).



**Figura 1.** Diferenciación de la célula progenitora en los distintos tipos celulares hematopoyéticos (modificada de Guo G, *Cell Stem Cell* 2013).

### 1.1. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

En la actualidad las CPH se emplean en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), que representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas, o con trastornos no malignos congénitos o adquiridos del sistema hematopoyético. Esto justifica que en los últimos años se haya producido un aumento del número de TPHs realizados a nivel mundial<sup>7</sup>. Actualmente se estima que el número de TPH realizados en todo el mundo ronda los 50.000/año, con una tasa de crecimiento de un 10-15% por año.

En función del donante de las células progenitoras se distinguen tres tipos de TPH:

- Autólogo: cuando las CPH se obtienen a partir del propio paciente.
- Alogénico: cuando el donante es una persona distinta del receptor, un sujeto HLA compatible emparentado o un voluntario identificado a través del registro nacional o internacional (no emparentado).
- Singénico: cuando el donante es un hermano gemelo idéntico al receptor.

El TPH alogénico o singénico se basa en la sustitución de un sistema hematopoyético neoplásico, defectuoso o insuficiente, por otro normal obtenido de un donante sano histocompatible. Para ello, los pacientes reciben un régimen de acondicionamiento basado en

la administración de quimioterapia, a menudo combinada con radioterapia o depleción de linfocitos T (LT) tras el que se administran las CPH del donante, que serán capaces de reconstituir el sistema hematopoyético. Además de las CPH, se infunden otras células, como los LT, que juegan un papel fundamental en la evolución postrasplante, facilitando el implante de las CPH y contribuyendo al efecto antitumoral eliminando las células neoplásicas residuales, lo que se conoce como “efecto de injerto contra leucemia o contra tumor” (EICL). Sin embargo, estos LT también son capaces de provocar una respuesta aloimmune, que se basa en su capacidad para reconocer antígenos (Ag) de histocompatibilidad del paciente ausentes en el donante, activándose y generando un efecto citotóxico en órganos y tejidos sanos del receptor, lo que da lugar a la principal complicación del trasplante alogénico, denominada “enfermedad de injerto contra huésped” (EICH)<sup>8</sup>.

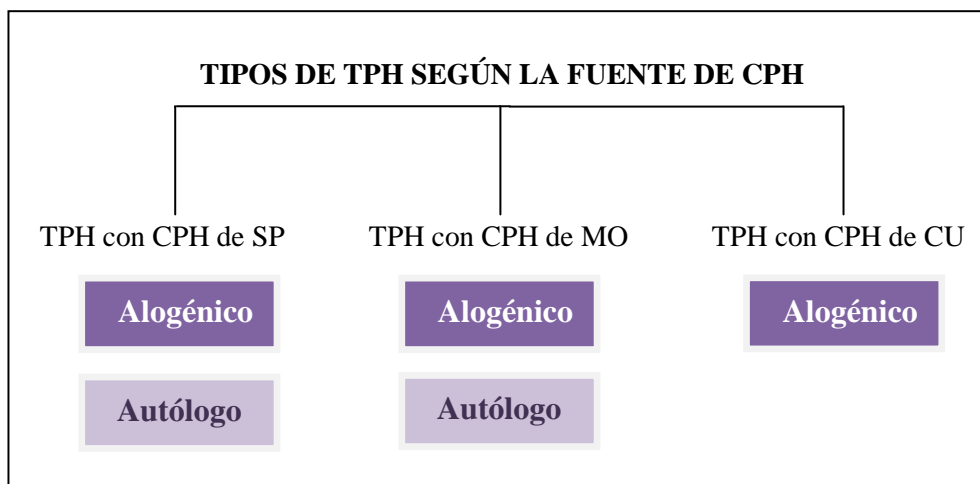
## 1.2. Fuentes de progenitores hematopoyéticos

Las CPH pueden obtenerse a partir de tres fuentes: sangre de cordón umbilical (CU), MO y SP, en la mayoría de los casos movilizada tras la administración al donante o al paciente de factores estimuladores de colonias.

El primer TPH alogénico culminado con éxito se realizó a finales de la década de 1950 empleando CPH procedentes de MO<sup>9</sup>. En las siguientes dos décadas se utilizó solamente la MO como fuente de CPH. Sin embargo, en la década de 1960, varios experimentos demostraron que la SP contenía un pequeño número de CPH<sup>10</sup>, y que además podía ser enriquecida mediante el uso de ciertos fármacos quimioterapéuticos y/o factores de crecimiento hematopoyéticos<sup>11</sup>. A partir de entonces, la SP movilizada se convirtió en otra fuente de CPH y, de hecho, se ha utilizado cada vez con mayor frecuencia debido a que tiene ciertas ventajas en comparación con las CPH procedentes de MO. Finalmente, en 1978, se comprobó que la sangre de CU podría ser una fuente válida de CPH<sup>12</sup> y fue utilizada con éxito poco después en un TPH alogénico<sup>13</sup>.

Actualmente, la elección de una u otra fuente de CPH va a depender de la enfermedad de base, y de la disponibilidad de donante. En el caso de los trasplantes autólogos se usa casi exclusivamente CPH de SP movilizada. Para los trasplantes alogénicos se han empleado clásicamente CPH procedentes de MO, pero en los últimos años se ha incrementado considerablemente la donación a partir de SP movilizada. Así se evita una intervención quirúrgica para la extracción, y la recuperación hematológica es más rápida, si bien esto es a expensas de un mayor riesgo de EICH crónica y con la ventaja de disminuir el riesgo de

recaída y por tanto mejorar la supervivencia libre de enfermedad en pacientes de alto riesgo<sup>14,15</sup>. En cuanto al empleo de CU, debido a que la cantidad limitada de CPH que contienen puede ser insuficiente para reconstituir la hematopoyesis de un adulto, es la fuente de CPH más frecuentemente empleada en la población infantil. Sin embargo, también se emplea en adultos en caso de no disponer de un donante adecuado (Figura 2).



**Figura 2.** Fuentes de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y cordón umbilical (CU), empleadas en los distintos tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Aunque las CPH procedentes de las tres fuentes son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético del paciente tras el trasplante, presentan notables diferencias inherentes no solo debido a la diferente composición celular cuantitativa de CPH y células accesorias como LT, sino también a las propiedades biológicas e inmunológicas diferentes de estas subpoblaciones, lo que puede influir en el potencial de auto-renovación, proliferación y velocidad de recuperación hematopoyética tras trasplante. La SP movilizada contiene más cantidad de LT maduros, en comparación con la MO y el CU. Esto explica en parte las diferencias en el riesgo de rechazo del injerto y de EICH. Finalmente, los LT de CU son menos inmunorreactivos que los linfocitos del adulto<sup>16</sup>.

Más allá de estas diferencias cuantitativas, nos planteamos analizar las diferencias biológicas entre las CPH obtenidas de cada una de estas tres fuentes. En este sentido, la información existente en la literatura es muy escasa. Hasta la fecha varios estudios describen que existen diferencias en los perfiles de expresión entre los distintos linajes hematopoyéticos<sup>17,18</sup>, y otros estudios muestran las propiedades biológicas de cada fuente<sup>19,20</sup> de CPH pero enfocados en la eficiencia, proliferación y recuperación tras trasplante. Sin

embargo, no existían estudios genéticos y/o epigenéticos que explicasen las diferencias entre las CPH de las distintas fuentes empleadas en trasplante.

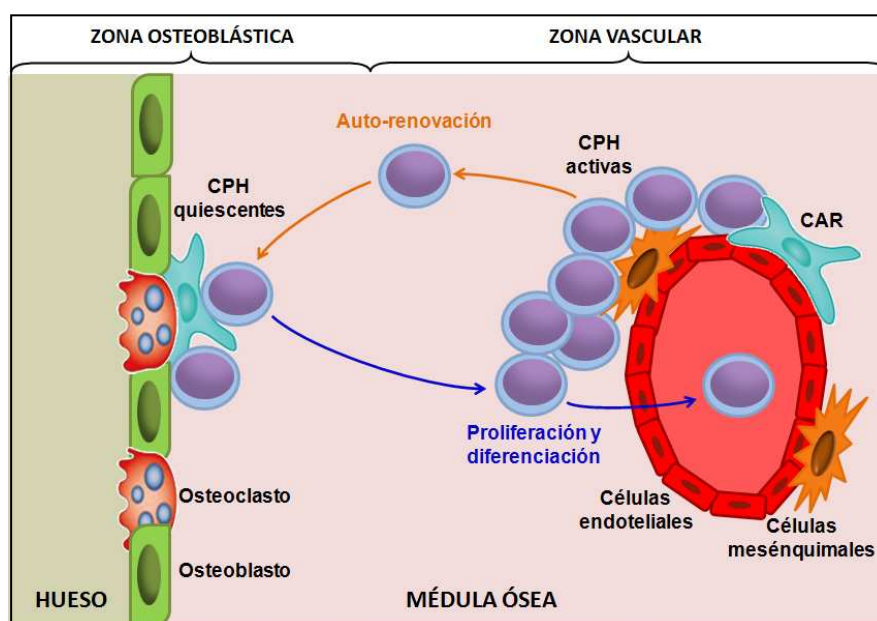
### 1.3. El nicho hematopoyético

Las CPH producen todas las células sanguíneas maduras a lo largo de la vida del organismo, y al mismo tiempo se mantienen indiferenciadas a modo de reservorio en un microambiente específico llamado “nicho” localizado en el interior de la MO<sup>21</sup>.

El microambiente o nicho hematopoyético está dividido en dos zonas:

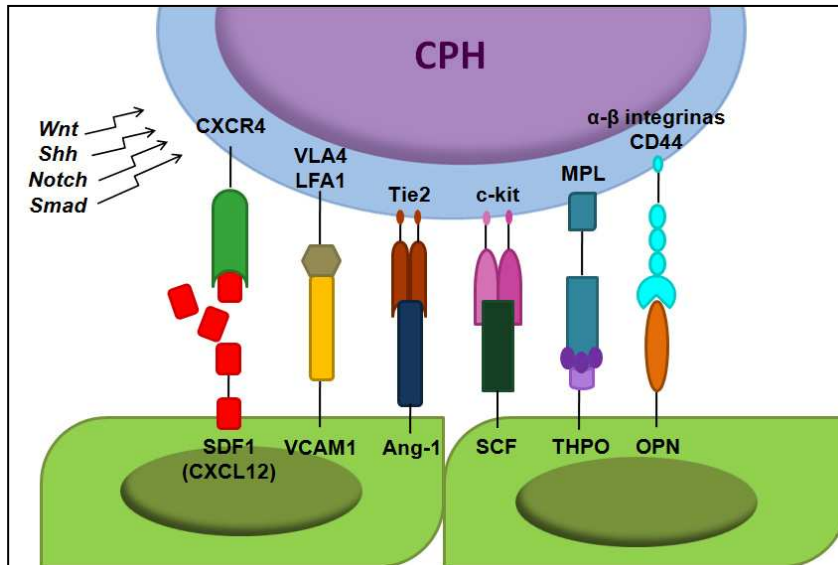
- Zona osteoblástica: localizada cerca del hueso, contiene CPH quiescentes. En esta zona se produce la auto-renovación de las CPH.
- Zona vascular: localizada en la región central de la MO, contiene CPH activas. En esta zona se produce la proliferación de las CPH, reparación de lesiones, diferenciación a células maduras y movilización a la circulación sanguínea<sup>22</sup>.

La función del nicho hematopoyético es regular la auto-renovación, proliferación y movilización de las CPH en la MO, produciéndose así un equilibrio dinámico entre estos procesos (Figura 3)<sup>23</sup>. Con el fin de alcanzar ese equilibrio y mantener la homeostasis fisiológica, el nicho hematopoyético requiere una combinación de citoquinas, factores de crecimiento, ligandos, moléculas de adhesión y rutas de señalización.



**Figura 3.** Estado de la célula progenitora hematopoyética (CPH) en los distintas zonas del nicho hematopoyético. Las CPH quiescentes pueden sustituir a CPH activas dañadas (flecha azul), mientras que las CPH activas pueden reemplazar a CPH quiescentes perdidas (flecha naranja).

Las CPH quiescentes se encuentran firmemente ancladas al nicho osteoblástico a través de diversas moléculas de adhesión (Figura 4).



**Figura 4.** Señalización celular entre la célula progenitora hematopoyética (CPH) y el nicho osteoblástico. SDF1: factor-1 derivado del estroma, CXCR-4: receptor de quimiocina CXCR-4, VCAM1: molécula 1 de adhesión de células vasculares, Ang-1: angiopoyetina-1, SCF: factor de células madre, THPO: trombopoyetina, OPN: osteopontina, Shh: *Sonic hedgehog*, Wnt: *Wingless*.

Una de las primeras moléculas de adhesión identificadas fue el factor de células madre (SCF), así como su receptor c-kit. SCF es expresado por osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, células mesenquimales y por células reticulares CXCL12 positivas (CAR). Varios estudios donde se analizaron distintos mutantes de los genes *SCF* y *c-Kit* revelaron que aunque no es una molécula esencial para la generación y expansión inicial de las CPH en el embrión y en el hígado fetal, son cruciales para el mantenimiento a largo plazo, auto-renovación y movilización de las CPH en la MO<sup>24</sup>. La Angiopoyetina-1 (Ang-1) es expresada y secretada por los osteoblastos, e interactúa con el receptor de tirosina-quinasa Tie2 expresado en las CPH, mejorando la capacidad de quiescencia de las CPH e induciendo su adhesión al hueso<sup>25</sup>. Las CPH expresan CXCR4, el receptor del factor-1 derivado del estroma (SDF-1, también conocido como CXCL12) expresado por las células CAR, células mesenquimales, osteoblastos y células vasculares endoteliales<sup>26</sup>. La interacción CXCR4-CXCL12 es un eje esencial en el mantenimiento, retención y movilización de las CPH durante la homeostasis y después de una lesión; así se ha observado que embriones deficientes en el gen *CXCL12* poseen un número y función reducida de CPH<sup>27</sup>. Su expresión y secreción es inducida en respuesta a la pérdida de CPH, debido a la irradiación, quimioterapia o la hipoxia. Interacciones a través de CXCL12 llevan a la sobreexpresión de la molécula-1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1)<sup>27</sup>, la cuál también se ha visto involucrada en la localización y retención de las CPH en el nicho hematopoyético. La activación de otras moléculas de adhesión como las integrinas VLA-4 y LFA-1 es también

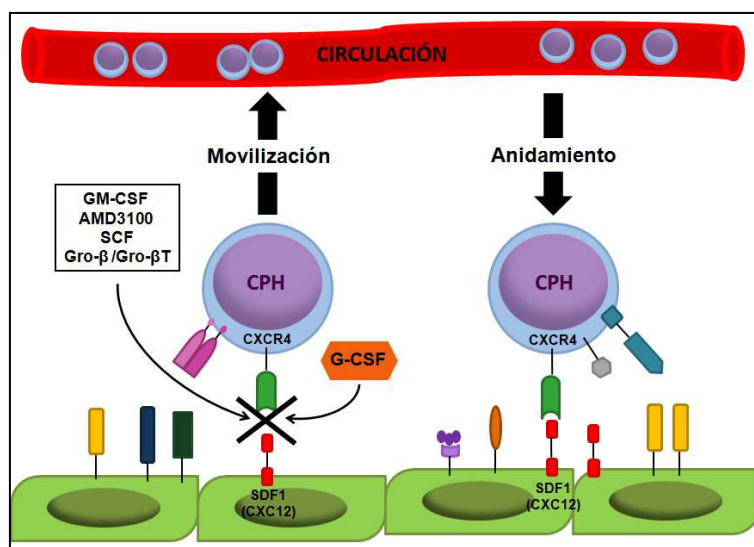
necesaria para la movilización y migración de las CPH. Por otro lado, la citoquina trombopoyetina (THPO) tiene una doble función, regular la producción y diferenciación de megacariocitos y plaquetas, y regular la quiescencia de las CPH. Varios estudios sugieren que CPH carentes del receptor de la trombopoyetina  $MPL^{28}$  acaban agotándose, debido a una proliferación excesiva y a una pérdida de la quiescencia. Similar a los mutantes  $MPL$ , la inhibición del gen *THPO* en los osteoblastos reduce el número de CPH quiescentes, mientras que la THPO exógena inhibe la proliferación celular. Finalmente, la osteopontina glicoproteína ácida (OPN) es secretada por los osteoblastos y puede funcionar como un regulador negativo del tamaño de las CPH. Se ha postulado que un incremento de CPH en ratones *OPN* deficientes se debe a una disminución del proceso de apoptosis<sup>29</sup>.

Recientemente, se han identificado varias vías de señalización como *Notch*, *Wingless* (*Wnt*), *Sonic hedgehog* (*Shh*) y rutas *Smad*. Algunos estudios sugieren que la activación de la vía *Wnt/Notch* aumenta la proliferación y la auto-renovación de las CPH<sup>30-32</sup>, y de una manera similar, se ha descrito que las CPH cultivadas *in vitro* con *Shh* aumentan su proliferación.

Todos estos datos demuestran la complejidad del nicho hematopoyético y la diversidad de señales que en condiciones fisiológicas orquestan el delicado equilibrio entre los procesos de auto-renovación y diferenciación de las CPH.

#### 1.4. Movilización de progenitores hematopoyéticos

La migración de las CPH se produce gracias a mecanismos que permiten a estas células salir de la MO y entrar en la circulación hacia la SP (movilización), pudiendo migrar a otros tejidos y volver a la MO (anidamiento).



**Figura 5.** Movilización y anidamiento de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

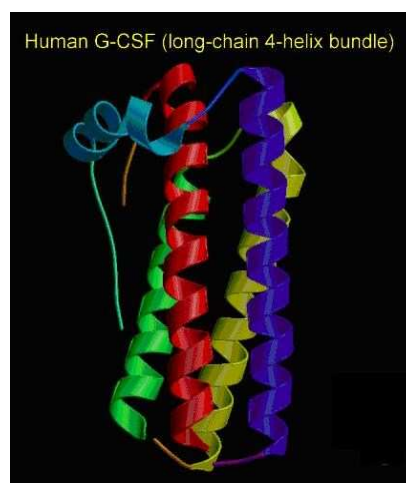
Ambos son procesos opuestos regulados por la interacción de citocinas, quimiocinas y proteasas (Figura 5). La movilización de las CPH se caracteriza por la disminución de moléculas de adhesión celular, principalmente del eje CXCR4/CXCL12. Por el contrario, el proceso de retorno a la MO requiere la regulación positiva de moléculas de adhesión celular y la activación de la vía de señalización CXCR4/CXCL12. Este proceso de retorno es un requisito indispensable para la proliferación de las CPH y de una importancia fundamental durante el desarrollo fetal y la homeostasis de las CPH en la edad adulta.

#### 1.4.1. Agentes movilizadores de progenitores hematopoyéticos

Sabemos que la mayoría de las CPH adultas se dividen infrecuentemente y, en su mayoría, se mantienen en el nicho hematopoyético en un estado de quiescencia; sin embargo, en respuesta a estrés o tras la administración de factores estimuladores de colonias son capaces de proliferar, y retornar a su estado latente tras la desaparición del estímulo.

La movilización de CPH mediante factores estimuladores de colonias se lleva a cabo desde los años 80<sup>33-36</sup>, y en la actualidad se emplea en el TPH para tratar diversas enfermedades hematológicas. Las CPH circulan en la SP en números muy bajos (0,01-0,05%), por lo que la movilización es necesaria para aumentar el número de CPH en la circulación periférica, hasta 100 veces.

Aunque existen diversos factores movilizadores como el GM-CSF, AMD3100, SCF, Gro- $\beta$  o Gro- $\beta$ T, la citoquina más comúnmente usada en la clínica para la movilización de CPH es el factor estimulador de colonias granulocíticas o G-CSF.



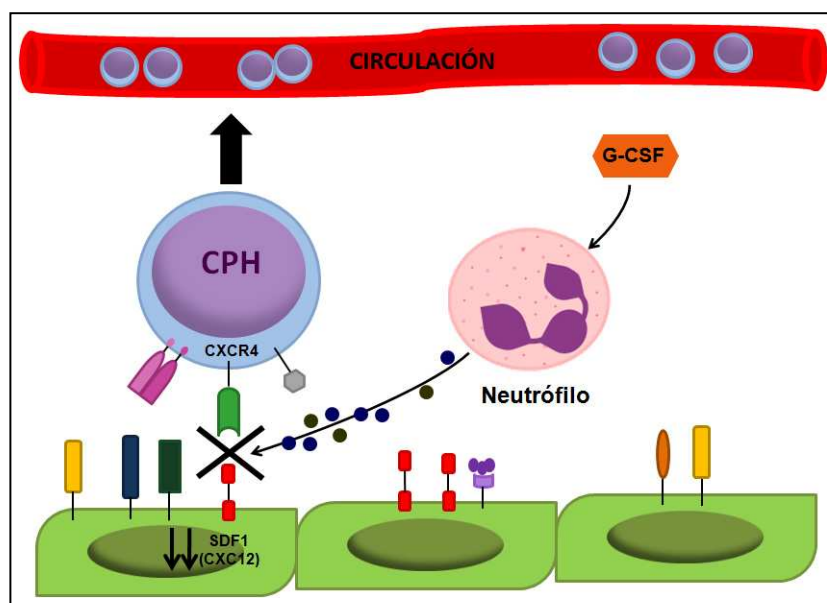
**Figura 6.** Estructura molecular del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) humano.



El G-CSF es una glicoproteína de 174 aminoácidos, con un peso molecular de 18-22 kD (Figura 6) que es sintetizado de manera endógena principalmente en la MO, aunque también en pequeñas cantidades, por células formadoras de hueso u osteoblastos, monocitos, macrófagos, células vasculares endoteliales, fibroblastos, células mesoteliales y células del estroma de la MO, y circula en SP aunque en muy pequeñas cantidades; en suero puede ser detectado en un rango de <30-163 pg/mL.

#### 1.4.2. Mecanismos de acción del G-CSF

En la actualidad aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares a través de los cuales el G-CSF ejerce su efecto movilizador sobre las CPH. Entre ellos la modificación en la expresión de moléculas de adhesión y sus ligandos, que es clave en el proceso de movilización<sup>37-39</sup>. Durante este proceso, el G-CSF provoca un aumento de la expresión del gen *CXCR4* por las CPH y una disminución de la expresión del gen *SDF-1* en el estroma medular<sup>37</sup>. Esto induce la liberación de enzimas proteolíticas (elastasas, catepsinas y metaloproteinasas) por los neutrófilos al compartimento extravascular de la MO, que degradan e inactivan las adhesiones quimio-tácticas e interacciones responsables de anclar las CPH en el estroma medular (Figura 7). De este modo, las CPH se liberan a la SP.



**Figura 7.** Mecanismo de movilización de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) inducido por el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF).

El G-CSF se emplea en todo el mundo en miles de pacientes y donantes todos los años y se considera un proceso seguro, como demuestran numerosos estudios donde los donantes tuvieron un seguimiento de hasta 10 años<sup>40</sup>. Aunque la inmensa mayoría de los donantes consideran que su estado general es bueno durante el período de seguimiento, se pueden

producir efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo tras la administración del G-CSF. Una proporción de donantes suele sufrir dolores óseos (>60%), dolores de cabeza (>20%), fiebre (3-4%), náuseas (2-10%) y sudores nocturnos, que suelen desaparecer en poco tiempo<sup>40</sup>. A largo plazo algunos estudios han descrito un incremento en la incidencia de algunas hemopatías<sup>41,42</sup>. Sin embargo, estos datos no han sido corroborados por otros grupos<sup>43,44</sup>.

Actualmente, la pregunta más importante, esto es, si la administración del G-CSF podría favorecer a largo plazo el desarrollo de hemopatías a través de alteraciones genéticas o epigenéticas, no puede ser contestada con certeza, si bien algunos estudios con un seguimiento >10 años ofrecen tranquilidad en este sentido. A pesar de ello, se ha demostrado que el G-CSF se comporta como una proteína anti-apoptótica<sup>45</sup>, porque las células tratadas con este factor de crecimiento poseen una vida media más prolongada. Se han identificado además mutaciones en el receptor del G-CSF en pacientes con neutropenia congénita severa<sup>46</sup> que provocan una excesiva proliferación celular tras estimulación con G-CSF, lo que puede contribuir al desarrollo de leucemia. Por otro lado, Nagler et al.<sup>47</sup> han descrito alteraciones epigenéticas y genéticas en linfocitos, y cambios en los patrones de expresión génica y de microRNAs (miRNAs) en las células mononucleadas y desestabilización del ADN tras la movilización con G-CSF. Estos hallazgos han generado cierta preocupación por la seguridad de los donantes. Sin embargo, como se ha mencionado, varios estudios publicados por distintos grupos<sup>48-50</sup> no describen una mayor incidencia de hemopatías.

A pesar de todos los estudios publicados, hasta la fecha no se conocen los efectos que puede producir el G-CSF en los patrones de expresión génica de las CPH de donantes sanos y sus potenciales consecuencias a largo plazo.

## 2. LINFOCITOS B

Los linfocitos B (LB) son las células responsables de la secreción de anticuerpos proporcionando inmunidad humoral frente a infecciones. También desempeñan otras funciones como la presentación de Ag a los LT, regulación negativa de las respuestas inflamatorias y regulación de las respuestas frente a auto-antígenos. Los linfocitos maduros producen anticuerpos de distintos isotipos que se distribuyen y localizan en distintos compartimentos de nuestro organismo y desencadenan distintas funciones efectoras como la activación del complemento, y diversas respuestas celulares, como la fagocitosis de microorganismos e inmunocomplejos y la exocitosis de mediadores y citotoxinas.

### 2.1. Desarrollo del linfocito B

El desarrollo de los LB tiene lugar en dos etapas que se localizan en diferentes tejidos:

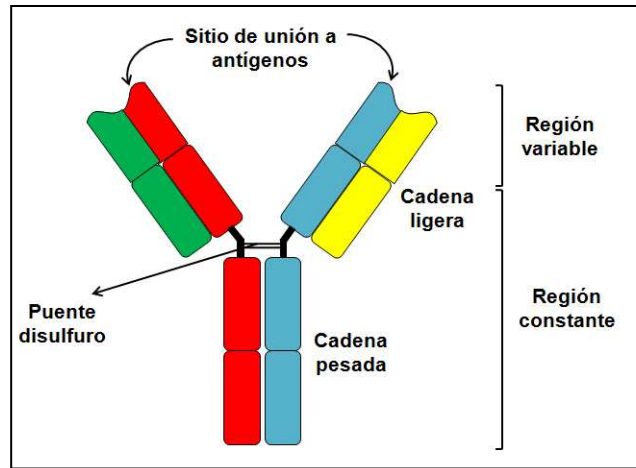
-Etapa antígeno-independiente: tiene lugar principalmente en el hígado fetal y en la MO fetal y adulta<sup>51</sup>. En ella se produce la diferenciación de los progenitores de las células B (pro-B) en linfocitos B maduros *naive* (LBN).

-Etapa antígeno-dependiente: tiene lugar en los órganos linfoides secundarios (gánглиos linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a las mucosas)<sup>52,53</sup>. En ella se produce la activación de los LBN mediada por Ag, y su diferenciación a LB de memoria (LBM) y/o a linfocitos efectores.

El tráfico de los distintos subtipos de células B entre los tejidos linfoides primarios y secundarios refleja el estado inmune de un individuo, así como los trastornos en el desarrollo de células B, auto-inmunidad, y enfermedades linfoproliferativas relacionadas con la biología y homeostasis de las células B.

#### 2.1.1. Etapa antígeno-independiente:

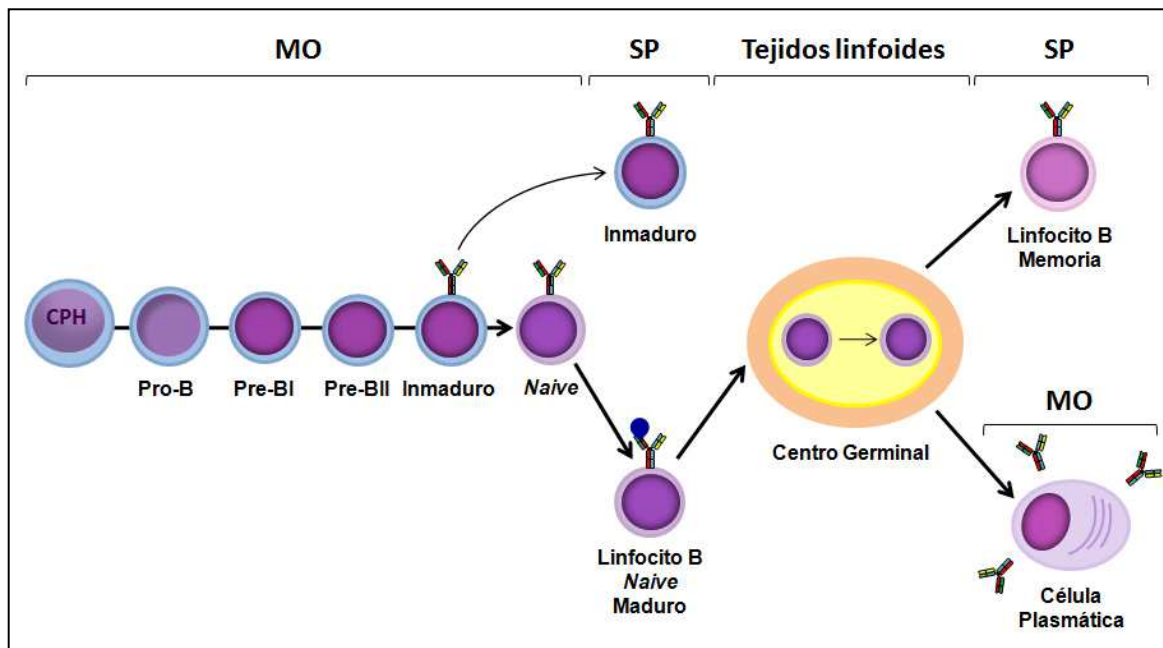
La marca característica del desarrollo de los LB medulares es el reordenamiento organizado de los segmentos génicos que codifican la porción variable de la molécula de inmunoglobulina (Ig). La Ig de superficie celular consiste en dos cadenas pesadas ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  o  $\epsilon$ ) y dos cadenas ligeras ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) unidas covalentemente mediante puentes disulfuro intracatenarios (Figura 8).



**Figura 8.** Estructura molecular de la inmunoglobulina de superficie celular

Las Ig de superficie funcionan como receptores para Ag de las células B (BCR). La unión del Ag a estos receptores desencadenan la respuesta inmune antígeno-específica al iniciar el proceso de activación celular que permitirá la diferenciación de los LB en células plasmáticas (CP) secretoras de anticuerpos.

Basándose en el estado génico de las cadenas del BCR y la expresión de una gran variedad de proteínas de superficie e intracelulares, se han identificado cinco fases principales en esta etapa: pro-B, pre-B-I, pre-B-II, LB inmaduro y *naive*<sup>54</sup> (Figura 6).

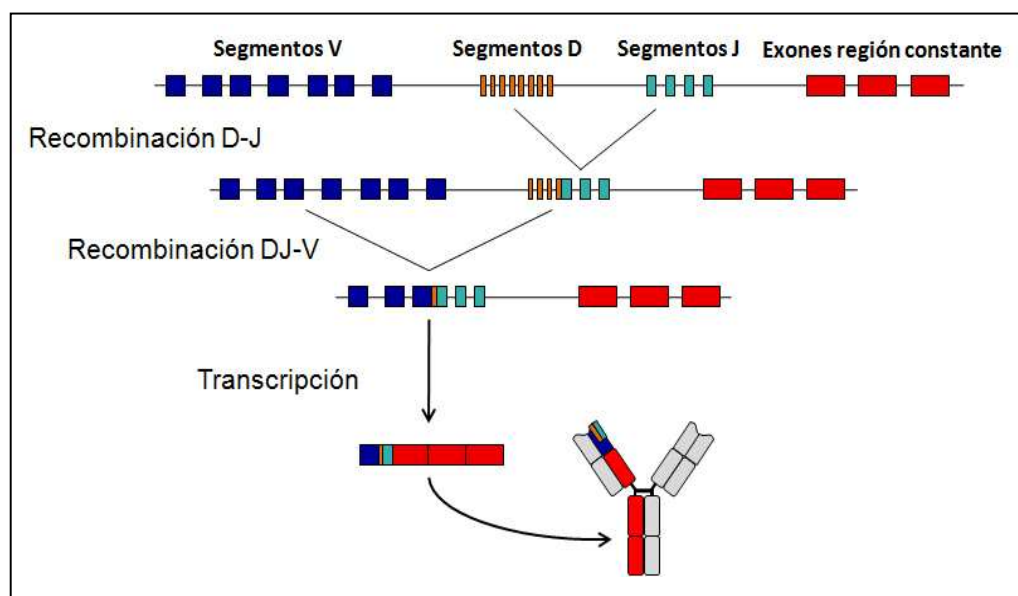


**Figura 6.** Fases del proceso de diferenciación de los linfocitos B humanos en los distintos tejidos, médula ósea (MO), sangre periférica (SP), y tejidos linfoides.

Durante las primeras fases en la diferenciación de las células B, las células pro-B comprometidas establecen interacciones VLA-4/VCAM-1 y c-kit/SCF con las células del estroma medular<sup>55</sup>. Las células pro-B no son totalmente precursoras del linaje B hasta que migran a un nicho diferente que contiene células que expresan interleuquina-7 (IL-7)<sup>56</sup>. La interacción de IL-7 con su receptor CD127, expresado por las células pro-B, promueve la síntesis de varios factores de transcripción (PAX-5, PU.1, EBF-1, E2A) que a su vez inducen la síntesis de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) y de las recombinasas Rag1 y Rag2, necesarias para iniciar la recombinación somática entre los segmentos génicos de diversidad (D) y de unión (J) de la cadena pesada de la Ig (IgH)<sup>57</sup>.

Una vez que el proceso de recombinación somática ha tenido lugar, las células pro-B pasan a ser células pre-BI. En estas células se completa el reordenamiento de la IgH con la unión a D-J de un segmento de la región variable (V)<sup>58</sup> (Figura 7). Este mecanismo de reordenamiento génico combinatorio permite la generación de un BCR específico y distinto en cada LB individual, generándose así una población de LB con receptores muy diversos, lo que permite reconocer a una amplia variedad de Ag.

Las células pre-BI que realizan un reordenamiento productivo de los genes de la IgH pasan a ser células pre-BII. Estas células consiguen generar un exón VDJ funcional que se transcribe y da lugar a la generación de una proteína que será la cadena pesada del BCR.



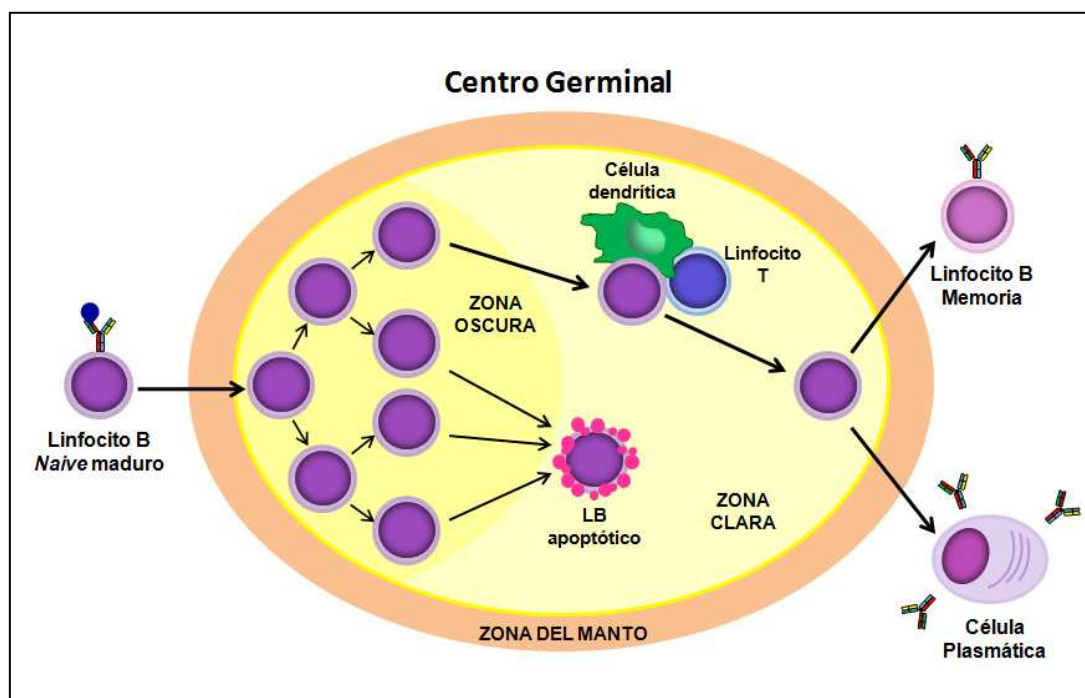
**Figura 7.** Esquema del proceso de reordenamiento y transcripción de los genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

En este momento, se intercala el primer punto de control. Se activan una serie de genes, ( $\lambda 5$  y  $Vpre\beta$ ) que codifican una “pseudocadena ligera”, cuyo cometido es comprobar si la IgH generada será capaz de acoplarse con una cadena ligera verdadera. Si no se supera este punto de control, la célula puede emprender varias vías: intentar un nuevo reordenamiento con el otro alelo, o bien la muerte celular programada por apoptosis<sup>59</sup>. Cuando se produce el acoplamiento de la IgH y la pseudocadena ligera, el complejo formado se expresa como un pre-receptor en la membrana celular.

A continuación, las células pre-BII proliferan e inician el proceso de recombinación somática entre los segmentos V y J de la cadena ligera de la Ig (IgL), del mismo modo que en la IgH (a excepción de la recombinación con el segmento D, puesto que las IgL no poseen). Aquí encontramos el segundo punto de control. Si la IgL generada es capaz de asociarse a la IgH, la célula detiene los reordenamientos; pero si no es capaz de asociarse, se producen sucesivos reordenamientos VJ con el mismo alelo. Si el fallo persiste, se producen reordenamientos en el otro alelo. En el momento que la célula expresa una molécula completa de IgM en su membrana, pasa a ser una célula B inmadura<sup>60</sup>. En este momento se establece el tercer punto de control del proceso de diferenciación. Las células que producen BCR funcionales y no auto-reactivos (no reaccionan con los Ag presentes en la MO) son seleccionadas y se convierten en LBN, mientras que las células que no los producen son eliminadas o reprogramadas<sup>58,61</sup>.

### 2.1.2. Etapa antígeno-dependiente:

Los LBN dejan la MO y circulan a través de los vasos sanguíneos hasta la zona de LT de los tejidos linfoides<sup>62</sup>. Si no encuentran un Ag, salen del tejido linfoide a través de los vasos linfáticos, y se quedan recirculando entre la SP y los tejidos linfoides hasta que mueren en pocos días. Sin embargo, si encuentran su Ag específico presentado por las células dendríticas, los LBN se activan y migran a un centro germinal (CG), formado por la zona oscura (donde residen los centroblastos) y la zona clara (ocupada mayoritariamente por centrocitos). En la zona oscura, los LBN activados experimentan una rápida proliferación, expansión clonal, hipermutación somática de las regiones V de la Ig y recombinación de cambio de clase de isotipo de la IgH. Aquellas células B que no completan bien este proceso entran en apoptosis, el resto van a la zona clara del CG donde aumentan la afinidad del BCR con su Ag (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema representativo del proceso de diferenciación de una célula B en el centro germinal.

Cuando el LBN maduro y activado abandona el CG, puede diferenciarse en dos direcciones, hacia LBM o bien hacia CP. La propiedad fundamental del LBM es reconocer y recordar un Ag si este reaparece, mientras que la CP tiene una alta capacidad de secreción, pudiendo producir mil millones de moléculas de BCR en una hora.

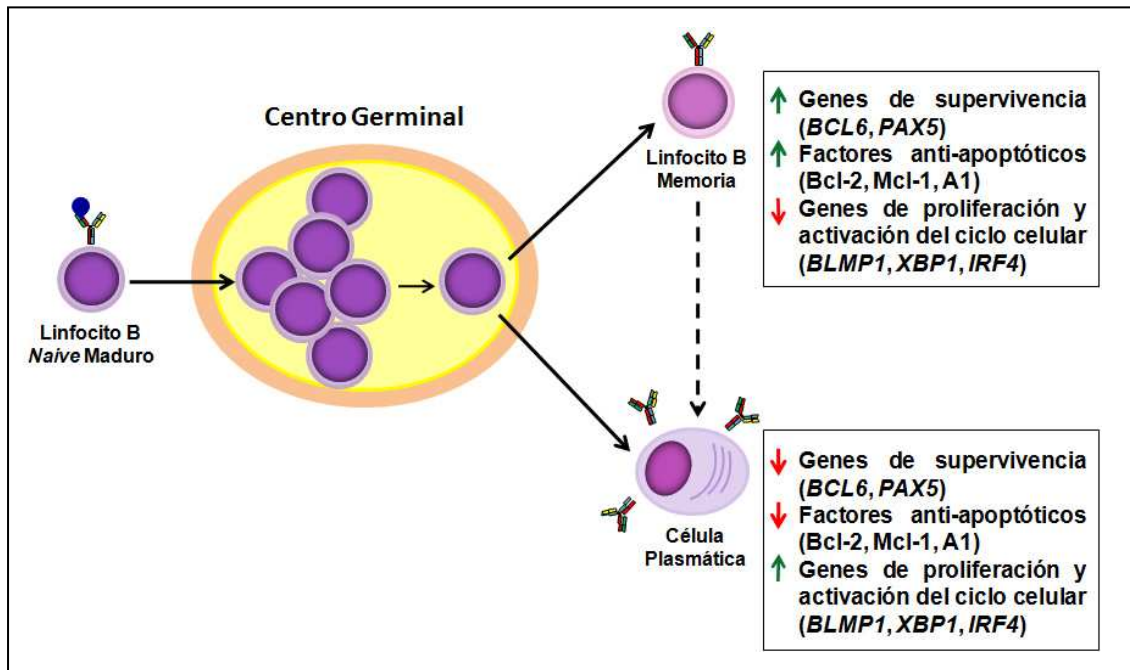
En la diferenciación a LBM, los LBN maduros adquieren una gran afinidad de unión al Ag<sup>53</sup>, a la vez que modifican el patrón de expresión de numerosos genes. Aunque los LBN y LBM circulan por la SP, muchos de los LBM residen también en lugares de drenaje de Ag, como la zona marginal del bazo y los folículos linfoides, el epitelio de las mucosas y las amígdalas, mientras que los LBN recirculan constantemente entre los diferentes tejidos linfoides<sup>63,64</sup>. En la SP, los LBN comprenden aproximadamente el 60-70% de las células B circulantes, carecen de mutaciones somáticas en la región IgV, y coexpresan simultáneamente IgM e IgD<sup>64,65</sup>. Por el contrario, los LBM constituyen del 20-30% de todas las células B de SP, han sufrido fenómenos de hipermutación somática y muestran una región IgV mutada; además, aproximadamente la mitad de ellos han sufrido el cambio de isotipo de IgH, reflejado por la expresión de IgA e IgG en el 23±10% y el 21±9% de los LBM circulantes del adulto, respectivamente<sup>66</sup>. La otra mitad de los LBM coexpresan IgM e IgD (52±15% de las células de memoria). A diferencia de los LBN, de vida más corta, los LBM tienen una larga vida media, y son capaces de permanecer viables en estado no proliferativo durante años, por ello

expresan genes implicados en supervivencia celular y factores anti-apoptóticos, mientras que reprimen la expresión de genes relacionados con proliferación y con activación del ciclo celular. Los LBN expresan niveles elevados de factores de transcripción importantes en el mantenimiento de la quiescencia, como PLKZ, KLF4, KLF9, p21 y FOXO1A<sup>67</sup>, mientras que los LBM expresan niveles elevados de factores anti-apoptóticos como Bcl-2, A1 y Mcl-1 implicados en la longevidad celular<sup>68</sup> (Figura 9).

Por otro lado, en la SP de adultos sanos se detecta la presencia de un pequeño número de células con características morfológicas, fenotípicas y funcionales similares a las de las CP<sup>69,70</sup> que representa aproximadamente el 1-3% de todas las células B de SP. Se cree que la mayoría de estas células son plasmablastos (PB) que han pasado a la SP desde los tejidos linfoides secundarios, dirigiéndose a un nicho de MO, tejido linfoide asociado a mucosas o a tejidos inflamados. Además de estos PB circulantes, en condiciones de activación inmune, también podrían detectarse en la sangre CP maduras que han abandonado la MO y las mucosas. Al contrario que las CP de MO que son Ig negativas, más del 75% de los PB/CP circulantes expresan Ig de forma débil<sup>71</sup>.

Las CP secretoras de Ig representan el estadio final de la transformación antigénica de las células B. Entre los factores que inducen el paso de LBN a CP se encuentran los ligandos de CD27 y la IL-10. Las CP pierden la expresión de Ig de superficie, siendo por tanto incapaces de reconocer Ag, limitándose sólo a producir más o menos cantidad de anticuerpos solubles. El factor inductor de una mayor o menor producción de Ig es el microambiente combinado con mediadores solubles presentes en la MO. Durante la diferenciación a CP, estas células modifican su patrón de expresión génica, incrementándose la expresión de genes relacionados con proliferación celular y activación del ciclo celular, y disminuyendo la de genes relacionados con supervivencia y factores anti-apoptóticos (justo lo contrario que el LBM). La diferenciación a CP es iniciada por la inducción del gen *BLIMP-1*, un represor transcripcional que promueve el desarrollo de estas células<sup>72</sup> reprimiendo la expresión de los genes responsables de la “identidad” de las células B, como *PAX-5*, *BCL6* y *Spi-B* (Figura 9). Por otro lado, el gen *XBP-1*, inducido en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático, se expresa a niveles elevados en las CP<sup>73</sup> y es esencial para la inducción del fenotipo secretor de estas células. Recientemente, *IRF-4* también ha sido identificado como uno de los genes esenciales para la diferenciación de CP<sup>74</sup>.

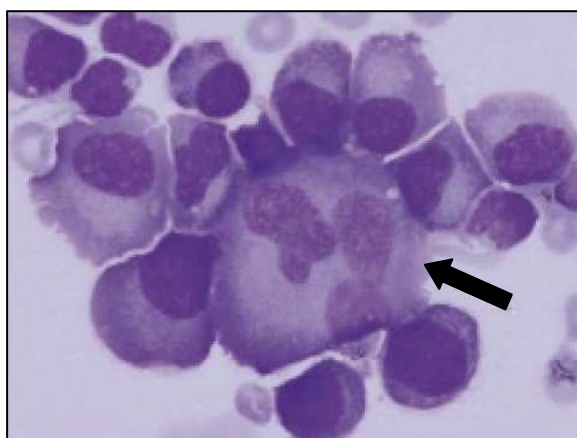




**Figura 9.** Regulación de la expresión génica durante el proceso de diferenciación de un linfocito B de memoria a una célula plasmática.

### 3. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por la proliferación y acumulación descontrolada de CP clonales en la MO (Figura 10), y por la producción excesiva y continuada de una misma Ig llamada paraproteína o componente monoclonal detectable en el suero y/u orina. El MM es una enfermedad poco frecuente, su incidencia es de 4-5 casos por cada 100.000 habitantes/año y está asociada a la edad, ya que afecta generalmente a individuos mayores de 60 años. No es una patología hereditaria ni se conoce su causa, representando el 15% de las hemopatías malignas<sup>75</sup>.



**Figura 10.** Mieloma Múltiple, infiltración por células plasmáticas atípicas, algunas de ellas binucleadas (tomada de M.Rozman, Hospital Clinic, Barcelona).

Hasta hace poco tiempo la mediana de supervivencia de los pacientes con MM no superaba los 3 años, pero la introducción de nuevos fármacos como los inhibidores de proteosomas o las sustancias inmunomoduladoras (IMiDs) ha permitido que cada vez un mayor número de pacientes supere los 5 años de supervivencia. Los avances en el tratamiento de soporte también han contribuido a mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

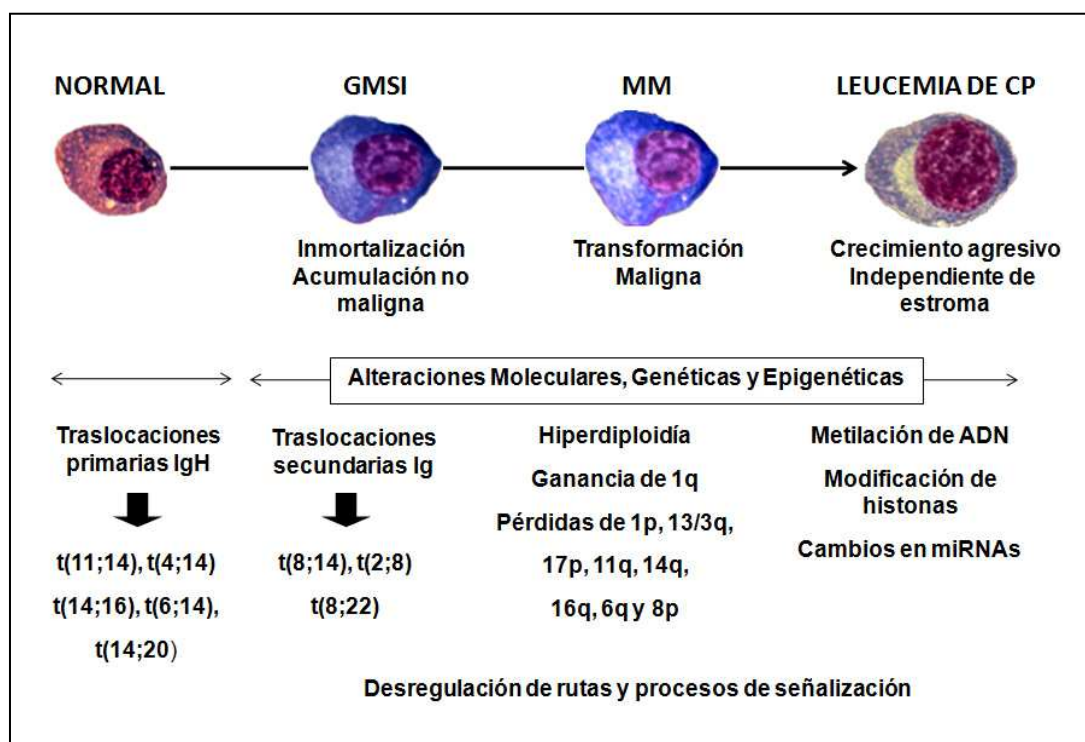
#### 3.1. De la gammopatía monoclonal al mieloma múltiple

El MM es una enfermedad genéticamente compleja que se desarrolla a través de un proceso en el que pueden identificarse diversas etapas (Figura 11) si bien muchos pacientes debutan con un MM sin haberse identificado una fase previa.

La primera de estas fases se denomina gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y es una fase asintomática que se caracteriza por la acumulación de una pequeña población clonal de CP en la MO de  $<10\%$ <sup>76</sup>. La GMSI tiene una prevalencia de  $>5\%$  en

adultos mayores de 70 años y un riesgo de progresión a MM del 1% por año<sup>77,78</sup>. A esta fase le sigue otra fase asintomática llamada MM quiescente (MMQ), que se distingue de la GMSI por un mayor contenido de CP células en MO (>10%) y un riesgo de progresión a MM del 10 % por año durante los primeros cinco años<sup>79</sup>. A continuación, en la fase de MM sintomático las CP mielomatosas (CPm) se acumulan en mayor porcentaje en la MO produciendo complicaciones clínicamente relevantes (síntomas CRAB: **C**alcio aumentado, **R**efracción **A**umentada, **B**anidad y **A**fectación ósea – *Bone*). La fase final es la llamada leucemia de células plasmáticas (LCP), una fase agresiva de la enfermedad que se caracteriza por presencia de CP en SP > 20% y por una rápida progresión a la muerte del individuo<sup>80</sup>. Sin embargo, un elevado porcentaje de pacientes no atraviesa por estas distintas etapas o bien es directamente diagnosticado en fase de MM.

Con los nuevos avances y progresos en la biología molecular, muchos de los genes y rutas alteradas en el MM han podido ser caracterizados, como se especifica a continuación.



**Figura 11.** Esquema de las fases del desarrollo y progresión del mieloma múltiple (MM).

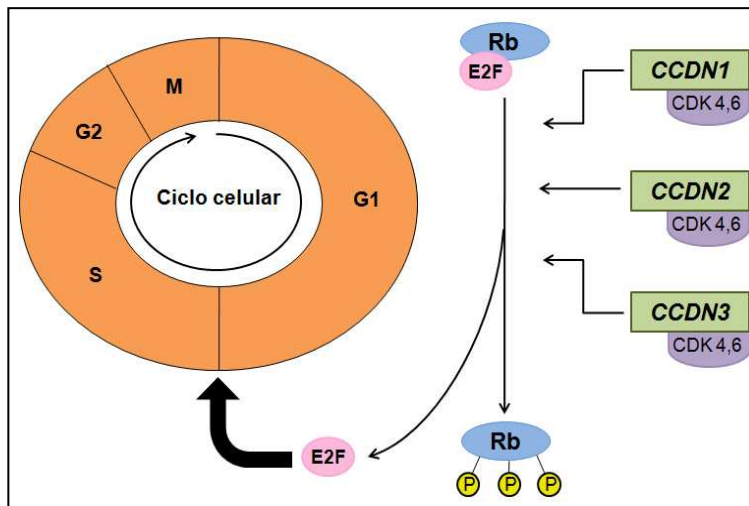
### 3.2. Alteraciones moleculares, genéticas y epigenéticas en el mieloma múltiple

En el MM se han descrito numerosas alteraciones cromosómicas, algunas de las cuales son alteraciones primarias que podrían contribuir a la etiopatogenia del tumor, mientras que

otras se han descrito como secundarias (Figura 11). Sin embargo, actualmente es un intenso tema de debate si estas alteraciones, incluso las primarias, contribuyen realmente o no al tránsito de una CP normal a una patológica, o bien si existen otras alteraciones o patrones de expresión génica sobre los cuales estas traslocaciones en realidad serían eventos secundarios.

### 3.2.1. Traslocaciones primarias (IgH):

Tienen lugar en el CG de los ganglios linfáticos y contribuyen a la inmortalización de la CP a través de la desregulación del punto de transición de las fases G1/S del ciclo celular, mediante la sobreexpresión de los genes de ciclina D, un evento que se ha demostrado clave en etapas tempranas del desarrollo del MM (Figura 12).



**Figura 12.** La sobreexpresión de los genes de ciclina D (*CCDN*) influye en la progresión del ciclo celular en el punto de transición de las fases G1/S en el mieloma múltiple. CDK: kinasa dependiente de ciclina, Rb: proteína del retinoblastoma, E2F: factor 2 de elongación, P: grupo fosfato (modificada de Steven M. Prideaux, *Adv Hematol* 2014).

Se producen como consecuencia de traslocaciones del gen de la IgH localizado en la región 14q32, a diferentes regiones cromosómicas. La t(11;14) es la traslocación más común, puesto que la poseen del 15-20% de los pacientes con MM y conlleva a una activación del gen *CCDN1* (ciclina D1)<sup>81</sup>. La t(4;14) se observa en el 15% de los MM y se asocia en la mayoría de los casos con un aumento en los niveles de expresión del gen *MMSET* (*myeloma SET domain*), que juega un papel en la regulación epigenética y en la reparación del ADN, y también en algunos casos del gen *FGFR3* (receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico)<sup>82</sup>. Estos datos parecen indicar que *MMSET* puede ser crítico en la transformación tumoral de las CP que tienen la t(4;14). De hecho, se ha demostrado en modelos de ratón que la supresión de la expresión del gen *MMSET* en CPm con t(4;14) reduce la progresión tumoral<sup>83</sup>. La t(14;16) presente en el 5-10% de los casos de MM, provoca un aumento en la expresión del oncogén *c-MAF*<sup>84</sup>, un factor de transcripción que induce la

expresión de un número de genes, incluyendo *CCDN2* (ciclina D2). La t(6;14), presente en el 3% de los pacientes con MM conlleva a un aumento de la expresión de *CCDN3* (ciclinaD3) involucrada en el ciclo celular<sup>85</sup>. Y finalmente, la t(14;20) es la más rara y menos frecuente de todas e implica al gen *MAFB*, que es un factor de transcripción similar a c-MAF<sup>86</sup>.

### 3.2.2. *Traslocaciones secundarias (Ig):*

A diferencia de las traslocaciones primarias, las secundarias contribuyen a la progresión de la enfermedad. La traslocación secundaria más frecuente es la t(8;14), que conlleva a la sobreexpresión del gen *c-MYC*, localizado en 8q24 y que desempeña un papel central en el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>87</sup>. Varios estudios han sugerido que este gen está vinculado directamente a etapas tardías de la enfermedad, e indirectamente a un mal pronóstico, ya que suele detectarse en el 15% de MM y en el 50% de los pacientes con enfermedad avanzada<sup>88</sup>.

### 3.2.3. *Variaciones en el número de copias*

Son eventos muy comunes en el MM y consisten en pérdidas o ganancias de ADN, de una zona o del cromosoma completo. En general, las pérdidas de ADN contribuyen a la malignidad de la enfermedad por la pérdida de genes supresores de tumores, mientras que las ganancias son patógenicas a través de la activación de oncogenes.

Hiperdiploidías: normalmente son trisomías, y aparecen aproximadamente en el 50% de los casos de MM<sup>89</sup>. Aunque actualmente se desconoce el mecanismo que generan las hiperdiploidías, parece ser que una sola mitosis fallida puede dar lugar a la ganancia de cromosomas enteros<sup>90</sup>. Este aumento en el número de copias produce la sobreexpresión de genes asociados con el crecimiento celular<sup>91</sup>, tales como *c-MYC*, *NF-kB* y *MAPK*, que promueven la producción de proteína ribosomales y factores de iniciación de la traducción desencadenantes del proceso de mielomagénesis.

Ganancia de 1q: ganancia del brazo del cromosoma 1q. Se observa en el 35-40% de los casos de MM y frecuentemente va asociada a la pérdida de 1p. Este evento implica la ganancia de varios oncogenes como *CKS1B*<sup>92</sup>, *ANP32E*, *BCL-9*, y *PDZK1*. *ANP32E*, es un inhibidor de la proteína fosfatasa 2A que participa en la remodelación de la cromatina

y en la regulación transcripcional, y es de particular interés ya que se ha demostrado que se asocia con una disminución de la supervivencia de los pacientes<sup>93</sup>.

Pérdida de 1p: deleción del brazo entero o deleciones intersticiales del cromosoma 1p. Se observa en el 30% de los pacientes con MM. Esta deleción produce la pérdida de genes supresor de tumores, como *FAM46C*, *FAFI* y *CDKN2C*<sup>94</sup>. *FAM46C* codifica proteínas ribosomales y factores de iniciación y elongación de la síntesis de proteínas. *CDKN2C* es un inhibidor de la quinasa 4 dependiente de ciclina involucrado en la regulación del ciclo celular. Y *FAFI* codifica una proteína implicada en la iniciación y la mejora del proceso de apoptosis a través de la vía de Fas.

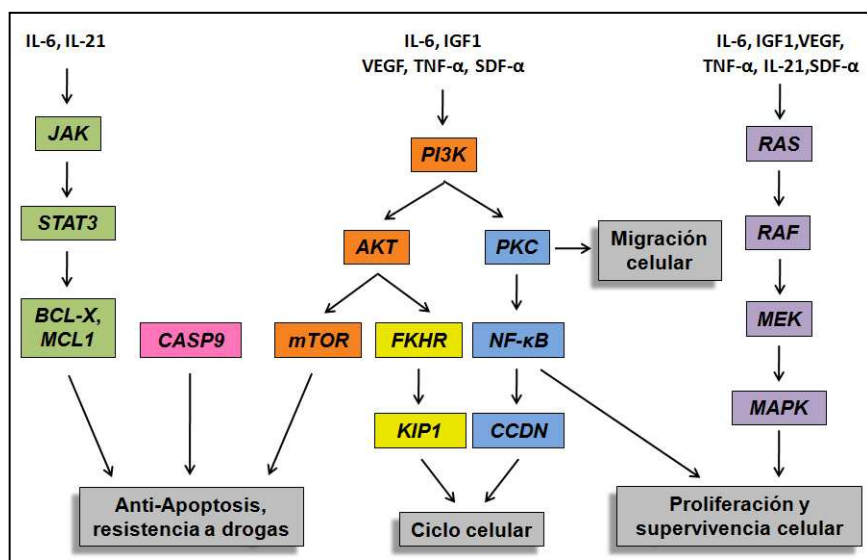
Pérdida del cromosoma 13/13q: se observa en aproximadamente el 50% de los casos de MM. En aproximadamente el 85% de los casos, la deleción del cromosoma 13 constituye la pérdida del brazo q, mientras que en el 15% restante se producen diversas deleciones intersticiales<sup>95</sup>. En cualquier caso conlleva a la pérdida del gen supresor de tumores *RBI*, produciendo una regulación inferior del ciclo celular<sup>96</sup>.

Pérdida de 17p: deleción del brazo corto del cromosoma 17. Se observa en aproximadamente el 10% de casos de MM de nuevo diagnóstico, pero este porcentaje es cada vez mayor en etapas avanzadas de la enfermedad<sup>97</sup>. Se piensa que esta deleción lleva a la pérdida del gen supresor de tumores *TP53*<sup>98</sup>, que interviene en la regulación de la detención del ciclo celular, reparación del ADN, y en la apoptosis en respuesta al daño de ADN.

Otras pérdidas cromosómicas: la deleción 11q se encuentra en el 7% de los casos de MM y conduce a la pérdida de los genes supresores de tumores *BIRC2* y *BIRC3*. La deleción 14q es un evento común que se encuentra en el 38% de los casos e incluye la pérdida de *TRAF3*. La deleción 16q se observa en el 35% de los MM, y conlleva la pérdida de los genes *CYLD* y *WWOX*. Todos estos genes, excepto *WWOX* que está implicado en la apoptosis<sup>99</sup>, están involucrados en la ruta de señalización de NF-kB, una ruta muy importante y estudiada en la patogénesis de la enfermedad<sup>100</sup>. Las deleciones 6q y del 8p, son dos lesiones con una frecuencia observada en el MM del 33% y 19-24%, respectivamente; la lesión en 8p produce una represión del gen *TRALI*<sup>101</sup>, asociado con la apoptosis inducida por la familia TNF.

### 3.2.4. Desregulación de rutas y procesos de señalización

En el MM se encuentran afectadas numerosas vías de señalización que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad y que están asociadas con procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, migración, resistencia a drogas y reparación del ADN (Figura 13).



**Figura 13.** Vías desreguladas implicadas en la patogénesis del mieloma múltiple.

**NF-κB:** comprende una familia de factores de transcripción que se inducen en respuesta al estrés celular, promoviendo supervivencia y proliferación celular. En el MM, la ruta de NF-κB se encuentra afectada en al menos el 50% de los casos; en las CPM, la activación de NF-κB conduce a la liberación de citoquinas claves como IL-6 y BAFF promoviendo la supervivencia celular<sup>102</sup>. La activación del gen *NF-κB* en las CPM se produce a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la inactivación de vías supresoras a través de deleciones y/o mutaciones de genes, y la inducción de vías tumorales mediante translocaciones y ganancias de genes<sup>103</sup>.

**MAPK:** la vía de señalización de las MAPK es una ruta altamente conservada, implicada en diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Esta vía puede ser estimulada a través de citoquinas inflamatorias, como TNF-α, IL-6, e IGF-1, que a su vez también activan las cascadas de señalización de las quinasas RAS, RAF y MEK. En la vía MAPK, existen dos oncogenes, *ANR* y *KRAS*, que se encuentran desregulados en muchos tipos de cáncer, y en el MM están mutados con una prevalencia del 20-35%<sup>104</sup>. Por otro lado, en un estudio reciente realizado por Chapman et al., los autores identificaron que un 4% de

los pacientes diagnosticados de MM albergan una mutación en el gen *BRAF*. Este gen codifica una serina/treonina proteína quinasa mutada en muchos tipos de cáncer<sup>105</sup>. Este hallazgo tiene una especial relevancia clínica, ya que los pacientes de MM con mutaciones en el gen *BRAF* podrían beneficiarse del desarrollo de nuevas drogas basadas en inhibidores de *BRAF*, que en algunos casos han demostrado tener una buena eficiencia clínica<sup>106</sup>.

JAK-STAT: la vía de señalización JAK-STAT se encuentra activada en el 50% de los casos de MM, así como en una proporción de células estromales de la MO circundantes<sup>107</sup>. La principal inductora de esta vía es IL-6, una citoquina clave en el proceso de mielomagénesis<sup>108</sup>. Una de las principales consecuencias de la activación de esta vía es la hiperactividad de STAT3, un factor de transcripción de la familia STAT que resulta de la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL<sup>109</sup>, correlacionada con la quimiorresistencia en pacientes con MM. La inhibición del gen *STAT3* con diversos compuestos y el inhibidor de la quinasa JAK2, están asociados con la inhibición in vitro de la supervivencia de las CPM inducida por IL-6<sup>110,111</sup>.

PI3K: la IL-6 e IGF-1 actúan sobre receptores de tirosina quinasa que activan la vía de señalización de PI3K, que conduce a la fosforilación de la quinasa AKT, la cual activa posteriormente varias vías como mTOR, GSK-3B y FKHR, que participan en muchos procesos celulares, incluyendo proliferación celular y resistencia a la apoptosis. La desregulación de la vía PI3K a través de la fosforilación de AKT fosforilada<sup>112</sup>, se observa en aproximadamente el 50% de los casos de MM. Sin embargo, a diferencia de la vía MAPK, la vía PI3K se encuentra rara vez mutada en el MM. Sin embargo, es la vía más conocida y de más interés dentro de la investigación de la patogénesis de la enfermedad.

Desregulación del ciclo celular: junto a la sobreexpresión de los genes de ciclina D en el MM, la pérdida de la función de genes reguladores del ciclo celular también resulta ser un evento clave que desestabiliza la regulación del ciclo celular. La represión del gen *CDKN2C* o la inactivación de *CDKN2A* a través de cambios en la metilación del ADN pueden desregular la transición de las fases G1/S, ya que estos genes codifican inhibidores de quinasa dependientes de ciclina<sup>113</sup>.



Reparación del ADN defectuoso: la inestabilidad cromosómica es un evento muy característico del MM y contribuye a la acumulación de aberraciones genéticas durante la progresión de la enfermedad. A pesar de ello, no se han demostrado mutaciones en genes de reparación del ADN, como *PARP1*. Sin embargo se están evaluando inhibidores de *PARP* en algunos ensayos clínicos<sup>114</sup>. Esta actividad es especialmente prominente en los cánceres con recombinación homóloga defectuosa mediada por mecanismos de reparación del ADN.

Edición defectuosa del ARN: un estudio reciente reveló que cerca de la mitad de 38 casos de MM estudiados contenían mutaciones en genes implicados en el procesamiento del ARN, la traducción de proteínas y la respuesta de las proteínas mal plegadas. Cuatro mutaciones diferentes de *DIS3*, un gen que codifica una exonucleasa que actúa como el componente catalítico del complejo exosoma involucrado en la regulación de la abundancia de especies de ARN<sup>115</sup>, fueron observadas en 11% de las muestras de pacientes. Varios estudios han demostrado que el exosoma juega un papel vital en la regulación del pool de ARN mensajero (ARNm) disponible para la traducción<sup>116</sup>, e indican que la pérdida de la actividad del gen *DIS3* podría contribuir al proceso de mielomagénesis a través de la desregulación de la traducción de proteínas.

Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR): es un evento esencial para la homeostasis celular de las CP, dada la ingente producción de Igs que llevan a cabo. Un 8% de las mutaciones de UPR corresponden al gen *LRRK2*, una serina/treonina quinasa responsable de la fosforilación de la proteína de unión 1 del factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E (EIF4EBP1). También se han visto mutaciones, aunque a una frecuencia más baja (3%), en el gen *XBPI*. Varios estudios sugieren que cuando *XBPI* se encuentra sobreexpresado induce un síndrome parecido al MM<sup>117</sup>, mientras que cuando está reprimido las células B son capaces de proliferar y construir centros germinales, sin embargo son incapaces de diferenciarse en CP secretoras de Ig<sup>118</sup>.

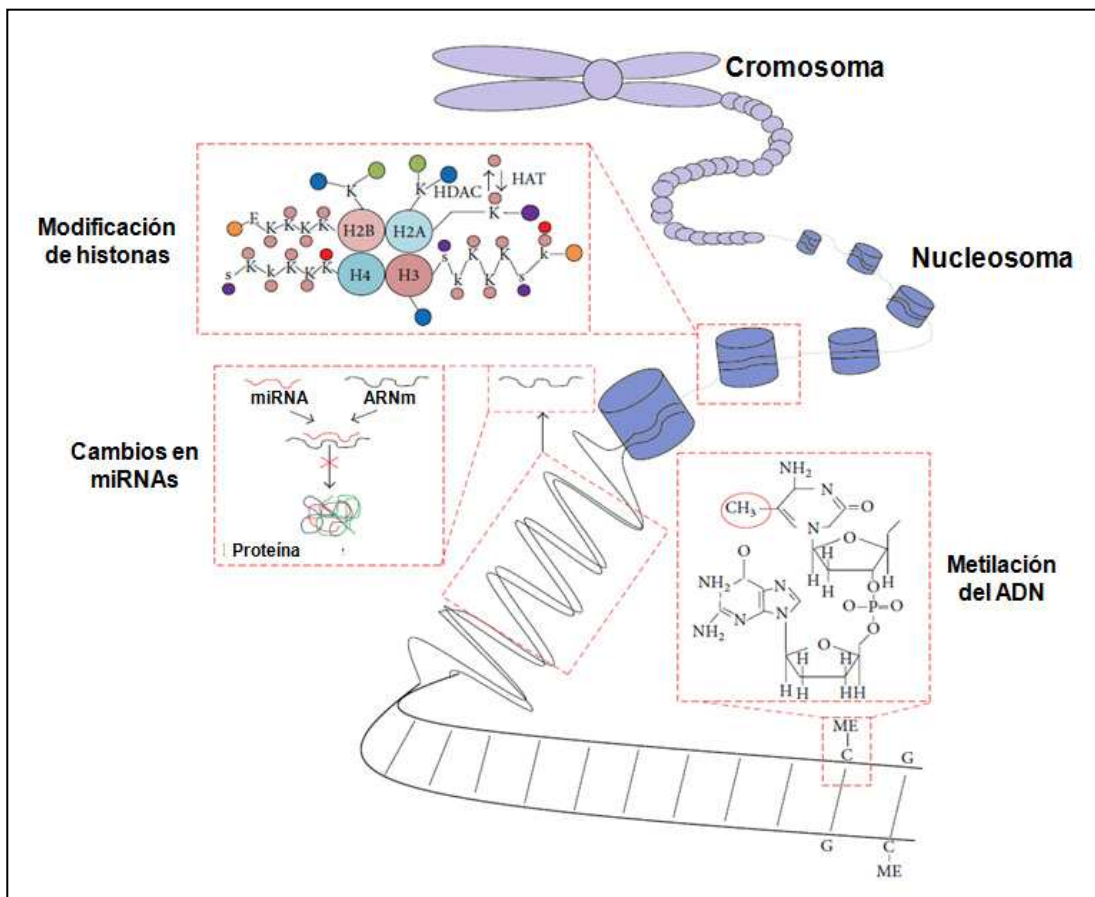
Diferenciación anómala de las CP: el gen *IRF4* está implicado en la regulación de la transcripción del interferón, mientras que también desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células B. Curiosamente, un estudio reciente reveló que *IRF4* es necesario para la supervivencia de las líneas celulares de MM<sup>119</sup>. *IRF4*

también actúa como factor de transcripción de *BLIMP1*, un gen que desempeña un papel clave en la diferenciación de las CP. Algunos estudios sugieren que la pérdida de función de alguno de estos dos genes podría tener una gran relevancia en la patogénesis del MM, ya que se conoce en otras enfermedades hematológicas como el linfoma difuso de células B<sup>120</sup>.

### 3.2.5. Cambios epigenéticos

El estudio de la epigenética es un campo emergente en el MM y está demostrando una influencia cada vez mayor en la patogénesis de la enfermedad<sup>121</sup>.

Existen tres grandes áreas principales en la regulación epigenética (Figura 14):



**Figura 14.** Mecanismos principales de regulación epigenética: ARN de interferencia, modificación de las histonas y metilación del ADN. Círculo rosa=grupo acetilo, círculo morado=grupo fosfato, círculo rojo=grupo metilo, círculo azul=grupo carboxilo, círculo verde=ubiquitina, círculo naranja=extremo amino terminal, k=lisina, E=ácido glutámico, S=serina, H2A=histona 2A, H2B=histona 2B, H3=histona 3, H4=histona 4 (modificada de Steven M. Prideaux, *Adv Hematol* 2014).

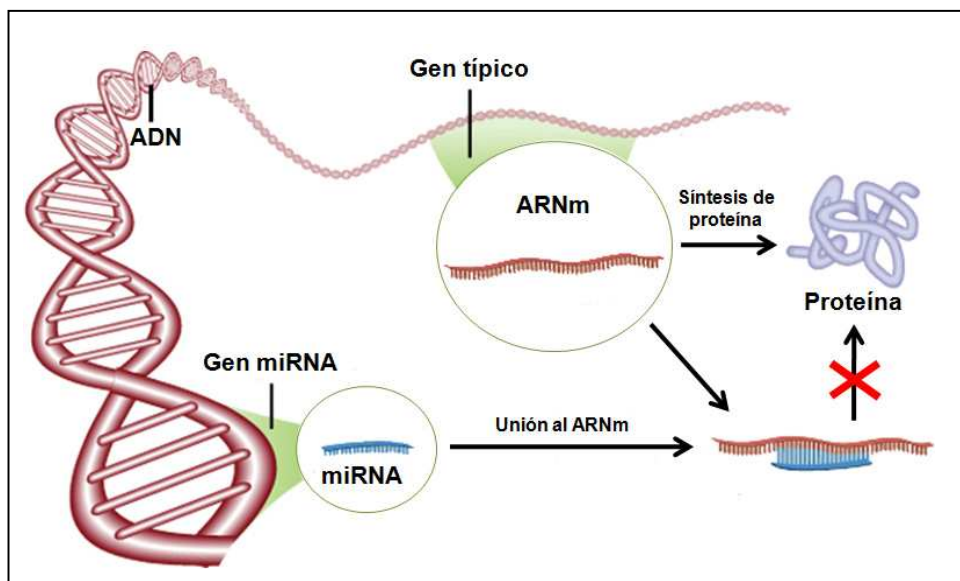
Metilación del ADN: los cambios de metilación del ADN se producen en las “islas” CpG que se encuentran generalmente con mayor frecuencia en las regiones promotoras,

secuencias repetidas y elementos trasponibles. Por tanto, estos cambios de metilación actúan regulando la expresión génica, contribuyendo al desarrollo y a la diferenciación celular, así como a la progresión de muchos tipos de cáncer. El genoma del MM, sigue con frecuencia un patrón conocido de metilación formado por ADN global hipometilado y genes específicos hipermetilados, el cuál va sufriendo cambios con la progresión de la enfermedad<sup>122</sup>. Los cambios más significativos en la metilación del ADN que influyen en la supervivencia celular, progresión del ciclo celular y reparación del ADN, se han observado en tumores con t(4;14)<sup>123</sup>, en relación con la sobreexpresión del gen *MMSET*.

Modificación de las histonas: Otros genes implicados en la metilación y modificación de la cromatina también se encuentran desregulados en el MM, incluyendo *HOXA9*, *KDM6A* y *MLL*. *HOXA9* está regulado principalmente por una histona metiltransferasa y codifica un factor de transcripción de unión al ADN que contribuye a la regulación de la expresión génica, la morfogénesis y la diferenciación celular. En este sentido, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de *HOXA9* produce mutaciones en varios genes: *MLL*, *MLL2*, *MLL3* y *MMSET*<sup>124</sup>. Estos hallazgos indican que la expresión de *HOXA9* tiene un papel en la patogénesis del MM y que los cambios epigenéticos en este gen pueden representar nuevas dianas terapéuticas en la enfermedad.

Cambios en miRNAs: Los miRNAs son un grupo de pequeñas moléculas de ARN no codificantes, de tamaño entre 19-22 nucleótidos, productos del procesamiento secuencial de transcritos de la ARN polimerasa II mediados por 2 enzimas endonucleasas ARNasaIII, llamadas *Drosha* y *Dicer*. Los miRNAs regulan la expresión génica a un nivel postranscripcional; a partir de su unión a la región 3' UTR del ARNm diana, pueden llevar a la inhibición de la traducción del gen o la degradación proteica en función de su complementariedad (Figura 15). De este modo los miRNAs están involucrados en muchos procesos biológicos incluyendo desarrollo, diferenciación, proliferación y muerte celular<sup>125</sup>. Varios estudios han demostrado que los miRNAs pueden actuar tanto como supresores de tumores como oncogenes en diversos tipos de cáncer, incluyendo el MM, donde se han podido identificar varios miRNAs expresados diferencialmente<sup>126,127</sup>, así como qué cambios en los miRNAs pueden desregular genes y vías relevantes en la patogénesis de la enfermedad, incluyendo genes implicados en la progresión del ciclo celular como *TP53* y *MYC*<sup>128,129</sup>. Todos estos datos apuntan a que la desregulación de los

miRNAs podría contribuir a la represión o inducción de genes implicados en la patogenicidad del MM.



**Figura 15.** Regulación del ARNm mediada por microRNAs (modificada de *Discover Magazine*, 2009)

### 3.3. Origen de la célula *stem* mielomatosa

Actualmente no se conoce la verdadera naturaleza y fenotipo de la célula *stem* mielomatosa y además existe mucha controversia al respecto. La identificación precisa de esta célula puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban el crecimiento tumoral, retrasar la recaída de los pacientes, y a largo plazo mejorar la supervivencia global.

A pesar de la utilización de nuevos fármacos altamente eficaces especialmente en cuanto a la tasa de respuestas alcanzada, la práctica totalidad de los pacientes termina por recaer, lo que se debería a la persistencia de una célula *stem* mielomatosa quiescente resistente al tratamiento convencional e incluso al trasplante. La secuenciación del gen V de IgH ha mostrado que las CPM son células post-germinales<sup>130</sup>, que han completado el proceso de hipermutación somática y han sufrido el cambio de isotipo, y que circulan por la SP migrando finalmente a la MO, donde bajo la influencia del micromedioambiente medular se produce su diferenciación a CP madura<sup>131</sup>. Lo que podría corresponderse con un LBM.

Del mismo modo, basado en la expresión de antígenos tales como CD19, CD27 o CD138, algunos autores han sugerido que el clon neoplásico se origina a partir de un LBM<sup>132</sup>. De hecho, estudios *in vivo* han demostrado que las células B clonotípicas CD138<sup>+</sup> aisladas de un

paciente con MM avanzado pueden generar enfermedad en ratones NOD/SCID<sup>133</sup>, mientras que las CP CD138<sup>+</sup> son incapaces de producir un crecimiento clonogénico significativo<sup>134,135</sup>.

Sin embargo, hasta la fecha estos datos no han sido verificados por otros grupos<sup>136</sup>, algunos de los cuales sugieren incluso un origen más inmaduro como la célula pro-B<sup>137</sup>, ni se han realizado estudios de expresión génica comparando los patrones de expresión de una CPm con un LBM, con el fin de determinar el posible origen de la célula *stem* mielomatosa.



## **Hipótesis y Objetivos**

---





## HIPÓTESIS

### **En relación a las CPH:**

1. Las CPH empleadas en el TPH tienen distintas características biológicas según su origen (CU, MO o SP movilizada) que pueden relacionarse con diferencias a nivel de expresión génica y de miRNAs. La identificación de diferentes patrones de expresión entre las distintas fuentes de CPH podría tener implicaciones clínicas y explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en la evolución de los pacientes tras trasplante.
2. El G-CSF puede modificar los perfiles de expresión génica y de los miRNAs de las CPH movilizadas a largo plazo, dando lugar a cambios que podrían afectar a sus características biológicas de forma persistente.

### **En relación a las células B:**

3. Dada la larga vida media de los LBM, éstos podrían ser más susceptibles al desarrollo de modificaciones en su perfil de expresión génica relacionadas con la edad en comparación con otras células de vida más corta como los LBN.
4. La CPM podrían mantener un perfil de expresión génica “asincrónica” similar, al menos en parte, a un LBM, lo que contribuiría a su supervivencia a largo plazo pero, al mismo tiempo, adquirirían características funcionales, fenotípicas y genéticas de una CP en términos de activación.

## OBJETIVOS

### En relación a las CPH:

1. Determinar las diferencias en el patrón de expresión génica y de miRNAs de las CPH obtenidas a través de las distintas fuentes disponibles en la actualidad (CU, MO y SP movilizada), con el fin de identificar genes o miRNAs que pudieran explicar las diferencias clínicas observadas tras el trasplante.
2. Analizar si el G-CSF induce cambios en los perfiles de expresión génica y de miRNAs en las CPH de donantes sanos y determinar si estos cambios persisten o no a largo plazo.

### En relación a las células B:

3. Analizar los patrones de expresión génica de LBM y LBN tanto en sujetos jóvenes como de edad avanzada, con el fin de identificar genes relacionados con la longevidad de los LBM que pudieran alterarse en la población añosa y relacionarse con un mayor riesgo de desarrollar determinadas neoplasias linfoides.
4. Comparar los perfiles de expresión génica de CP y LBM de individuos sanos *versus* CP de pacientes con MM, con el fin de determinar si las CPm mantienen características intermedias entre las CP y los LBM.

## **Resultados**

---



**Artículo 1. Los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las células progenitoras hematopoyéticas varían dependiendo de su origen.**

Las CPH procedentes de SP movilizada con G-CSF, de MO o de CU poseen distintas propiedades biológicas, que puede deberse a diferencias en los patrones de expresión génica y de miRNAs. Por este motivo en el presente estudio nos planteamos estudiar los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las distintas fuentes de CPH empleadas en trasplante.

Para ello se aislaron células progenitoras CD34+ de 18 muestras de donantes sanos: 6 de CU, 6 de MO y 6 de SP movilizada con G-CSF (recolectadas al 5º día de su administración coincidiendo con el proceso de aféresis). Se utilizaron como control 6 muestras de SP no movilizada. En primer lugar se obtuvieron las células mononucleadas mediante centrifugación por gradiente de densidad, y se aislaron las células CD34+ mediante separación inmunomagnética. Para obtener una mayor pureza las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales CD34-PE y CD45-FITC y se sortearon por citometría de flujo (las células muertas fueron descartadas antes de la separación). La pureza del aislamiento de las células CD34+ fue en todos los casos superior al 95%. A continuación se extrajo el ARN de todas las muestras y se analizó la expresión de 384 miRNAs usando las tarjetas microfluídicas *TaqMan Human MicroRNA Arrays v2.0*, y la expresión de todo el genoma usando los arrays *Whole Human Genome 4x44K oligo microarray kit*. Los valores de expresión génica y de los miRNAs se obtuvieron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Con los datos de expresión se realizaron análisis jerárquicos no supervisados empleando el método de la distancia Euclídea. Para identificar los genes y miRNAs expresados diferencialmente entre las distintas fuentes de CPH se aplicó el test estadístico no paramétrico *Kruskal Wallis*. Se consideraron significativos aquellos genes y miRNAs con un valor  $p < 0.01$ . Todos los análisis se realizaron con el programa *Multiexperiment Viewer 4.7.1* y la funcionalidad de los miRNAs y genes expresados diferencialmente se determinó a partir de distintas bases de datos disponibles en internet.

Al realizar el análisis jerárquico no supervisado comparando los niveles de expresión génica y de miRNAs de las células CD34+ de MO, CU y SP movilizada con G-CSF, respecto a las CD34+ de SP no movilizada, pudimos identificar en ambos casos dos grupos, uno formado por las CD34+ de MO y CU, y otro que incluía las CD34+ movilizadas. Al aplicar el análisis estadístico *Kruskal Wallis* se identificaron 36 miRNAs y 43 genes expresados diferencialmente entre las distintas fuentes. En las células CD34+ movilizadas la mayoría de los miRNAs se encontraban sobreexpresados con respecto a las otras dos fuentes, y vimos que

estaban implicados en el control del ciclo celular, apoptosis, proliferación y diferenciación celular y respuesta inmune. En cuanto a los genes expresados de forma diferencial en las CD34+ movilizadas, también vimos que se encontraban relacionados con el ciclo celular, promoviendo la proliferación celular, hematopoyesis y respuesta inmune. Todos estos datos podrían justificar, al menos en parte, el hecho de que las CPH movilizadas posean una mayor velocidad de injerto tras trasplante que las CPH de MO y CU, además de las diferencias cuantitativas del inóculo en cada caso

Por otro lado, de los 43 genes expresados diferencialmente entre las tres fuentes, curiosamente 20 de ellos eran además diana de los miRNAs también expresados diferencialmente en este estudio. Por este motivo validamos algunos de estos genes por qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real) y por *Western Blot*. En ambos casos pudimos confirmar que las CPH movilizadas con G-CSF poseen un perfil de expresión diferente al de las CPH de MO y CU, las cuales parecen tener un patrón de expresión muy similar.

# Gene and miRNA Expression Profiles of Hematopoietic Progenitor Cells Vary Depending on Their Origin



Alicia Báez<sup>1,\*</sup>, Beatriz Martín-Antonio<sup>2</sup>, José I. Piruat<sup>1</sup>,  
 Maria Victoria Barbado<sup>1</sup>, Concepción Prats<sup>1</sup>,  
 Isabel Álvarez-Laderas<sup>1</sup>, Magdalena Carmona<sup>1</sup>,  
 José Antonio Pérez-Simón<sup>1</sup>, Álvaro Urbano-Ispizua<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Hematology, University Hospital Virgen del Rocío/Institute of Biomedicine of Seville (IBIS)/CSIC/University of Seville

<sup>2</sup> Department of Hematology/Hospital Clinic/IDIBAPS and Institute of Research Josep Carreras/University of Barcelona

## Article history:

Received 26 June 2013

Accepted 21 January 2014

## Key Words:

Hematopoietic progenitor cell  
 miRNA  
 Gene expression

## ABSTRACT

Hematopoietic progenitor cells (HPCs) from granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)–mobilized peripheral blood (G-PB), bone marrow (BM), or umbilical cord blood (CB) have differing biological properties and differing kinetics of engraftment post-transplantation, which might be explained, at least in part, by differing gene and miRNA expression patterns. To assess the differences in gene and miRNA expression, we analyzed whole genome expression profiles as well as the expression of 384 miRNAs in CD34<sup>+</sup> cells isolated from 18 healthy individuals (6 individuals per subtype of HPC source). We identified 43 genes and 36 miRNAs differentially expressed in the various CD34<sup>+</sup> cell sources. We observed that CD34<sup>+</sup> cells from CB and BM showed similar gene and miRNA expression profiles, whereas CD34<sup>+</sup> cells from G-PB had a very different expression pattern. Remarkably, 20 of the differentially expressed genes are targets of the differentially expressed miRNAs. Of note, the majority of genes differentially expressed in CD34<sup>+</sup> cells from G-PB are involved in cell cycle regulation, promoting the process of proliferation, survival, hematopoiesis, and cell signaling, and are targets of overexpressed and underexpressed miRNAs in CD34<sup>+</sup> cells from the same source. These data suggest significant differences in gene and miRNA expression among the various HPC sources used in transplantation. We hypothesize that the differentially expressed genes and miRNAs involved in cell cycle and proliferation might explain the differing kinetics of engraftment observed after transplantation of hematopoietic stem cells obtained from these different sources.

© 2014 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

## INTRODUCTION

Various sources of hematopoietic progenitor cells (HPCs) are available for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), including bone marrow (BM), umbilical cord blood (CB), and peripheral blood (PB), in some cases mobilized with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (G-PB) [1–3]. The absolute number and intrinsic biological properties of HPCs differ among these 3 sources, affecting the speed of hematopoietic recovery after HSCT. It has been demonstrated in the clinical setting that HPCs from G-PB provide more rapid recovery of neutrophils and platelets after HSCT [4,5] compared with HPCs from BM or CB [6].

Although the majority of HPCs in BM are in a dormant state during homeostasis, these cells are rapidly and efficiently activated after exposure to G-CSF [7]. Thus, G-CSF administration could account for the distinct phenotypic and biological features of mobilized HPCs compared with HPCs residing in the BM. Thus, HPCs enter the cell cycle after G-CSF exposure [8]. In addition, G-CSF induces a down-regulation of cell adhesion molecules and desensitization

of chemokine signaling, mainly through the SDF-1/CXCR4 axis, favoring HPC mobilization to PB [9,10]. The impact of G-CSF on the biological properties of HPCs either by a direct effect or by causing their detachment from the hemopoietic niche is presently unknown.

MicroRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNA molecules, 19–22 nucleotides in size, that regulate gene expression at the posttranscriptional level. miRNAs are involved in numerous biological processes, including development, differentiation, proliferation, and cell death [11]. Several studies have reported that miRNAs and gene expression differ among the different hematopoietic cell lineages during development [12–14]; however, there is little information on the differences in miRNA and gene expression profiles among these lineages used in HSCT.

Given this background, we hypothesized that the biological differences described in HPCs obtained from BM, CB, and G-PB might be related to a unique gene and/or miRNA expression profile within each subset, and that these varying patterns in gene and miRNA expression might explain, at least in part, the clinical differences observed after HSCT with HPCs from these different sources.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

CD34<sup>+</sup> progenitor cells were collected from 6 healthy donors for each type of HPC source: CB, BM, and PB both before and on the fifth day after

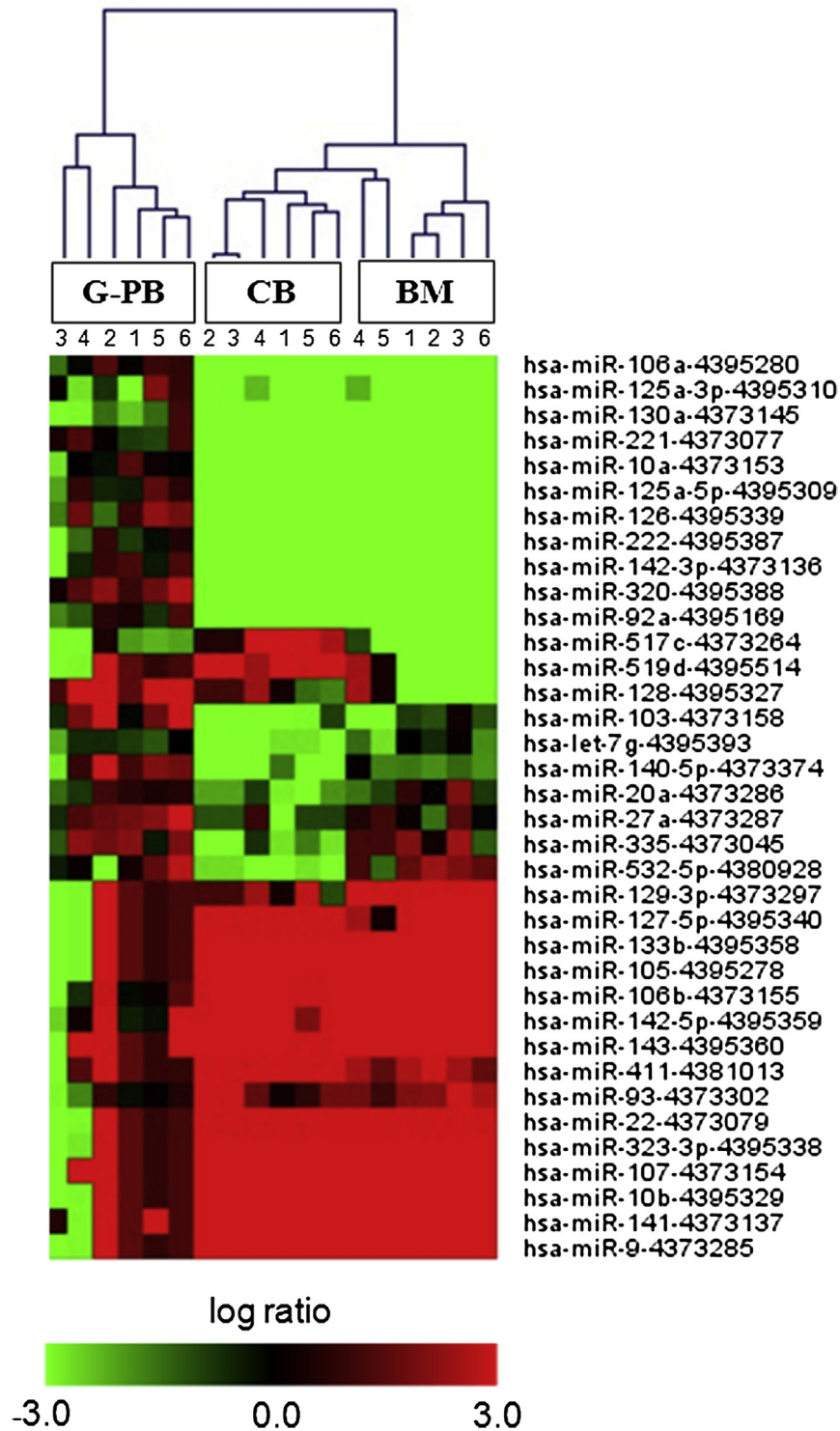
*Financial disclosure:* See Acknowledgments on page 638.

\* Correspondence and reprint requests: Alicia Báez Palomo, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla, Laboratorio de terapia celular y nuevas dianas terapéuticas en onco-hematología, 202 Ave Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.

E-mail address: abaez-ibis@us.es (A. Báez).

1083-8791/\$ – see front matter © 2014 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.01.022>



**Figure 1.** miRNA expression by HPC source. Unsupervised hierarchical cluster analysis performed with the miRNAs differentially expressed in HPCs from G-PB, BM, and CB. Each numbered column represents an individual sample, and each row represents a single miRNA. Red and green indicate miRNA expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

subcutaneous G-CSF administration (Filgrastim 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , once daily) (G-PB). CB samples were obtained from umbilical cord units not used for HSCT from the Gynecology and Obstetrics Department of the University Hospital Virgen del Rocío, Seville. Samples from BM, PB, and G-PB were collected from donors included in the allogeneic HSCT program at the hospital's Hematology Department.

The hospital's Ethics Committee provided Institutional Review Board approval for this study, and informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

#### Isolation of HPCs

Mononuclear cells were collected from all samples by density-gradient centrifugation with Ficoll-Paque solution (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The  $\text{CD}34^+$  cells were isolated in an AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by positive immunomagnetic selection using the  $\text{CD}34$  MACS microbead Human Kit (Miltenyi Biotec). Further, for higher-purity isolation,  $\text{CD}34^+$  cells were sorted by flow cytometry (MoFlo, Beckman Coulter, Brea, CA). For this purpose, cells were incubated with the monoclonal antibodies  $\text{CD}34\text{-PE}$  and  $\text{CD}45\text{-FITC}$  (BD



Biosciences, San Jose, CA) for 20 minutes in darkness and at room temperature. Populations were selected based on the intensity of antibodies, as well as forward-scatter and side-scatter components. Dead cells were discarded before separation. The purity of the isolated CD34<sup>+</sup> cells exceeded 95% in all cases.

#### RNA Extraction

Total RNA was extracted by TRIzol (Bioline, Luckenwalde, Germany) in all samples. RNA quality and integrity were verified with the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A RNA integrity number >7.5 was required for further analyses of gene expression profiling.

#### miRNA Expression

The expression profiles of 384 miRNAs were analyzed in samples of CD34<sup>+</sup> cells from CB, BM, and PB/G-PB. Total RNA (150 ng) was reverse-transcribed using the miRNA TaqMan Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was loaded on to the TaqMan Human MicroRNA v2.0 Arrays (Applied Biosystems), which were subsequently analyzed on a 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). SDS 2.3 and RQ Manager 1.2 software (both from Applied Biosystems) were used for the array analyses. Undetectable miRNAs were excluded for further analyses. Data were normalized using the average of the endogenous small-nucleolar RNU48 and the noncoding small nuclear U6, both included in the array. The CD34<sup>+</sup> cell samples from PB served as the control group. miRNA expression levels were obtained by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

#### Gene Expression

We analyzed the whole genome expression profile in the same samples using the Whole Human Genome Oligo Microarray Kit 4 × 44K (Agilent Technologies). Total RNA (200 ng) was reverse-transcribed to cRNA and labeled with the two-color Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). cRNA quality and integrity were verified with the Bioanalyzer 2100 System (Agilent Technologies). Each analyzed sample was labeled with cyanine 5 and hybridized against a pool of cyanine 3–labeled RNA of CD34<sup>+</sup> cells from PB as the reference group. The microarrays were scanned in a GenePix Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### Validation of Significant Genes

The expression of significant genes was validated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using Quantitec Primer Assays and the Quantitec SYBR green Kit (both from Qiagen, Hilden, Germany) in a 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Data were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -ACTIN, and the same group of samples of CD34<sup>+</sup> cells from PB used for the hybridization experiments served as a control. The relative gene expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

#### Engraftment Data

Data on platelet and neutrophil recovery after HSCT with G-PB and BM were obtained from the recipients' clinical flow charts. Data on engraftment after HSCT with CB were obtained from a series of 6 patients undergoing CB transplantation at our institution in the same time period as those undergoing G-PB and BM transplantations. None of the CB samples analyzed for gene and miRNA expression in the present study was used for clinical purposes. Day of platelet engraftment was defined as the first day with a stable count >20 × 10e9/L without transfusion and neutrophil engraftment was defined as the first day with a stable count >0.5 × 10e9/L.

#### Statistical Analysis

Unsupervised hierarchical clustering of miRNA and gene expression data were performed using average linkage and Euclidean distance. miRNAs and genes differentially expressed among the different HPC sources were identified using the nonparametric Kruskal-Wallis test. To obtain positive and negative expression values, data were transformed to logarithmic scale. All analyses were performed using MultiExperimentViewer 4.7.1. Functions of the miRNAs and genes of interest were determined from various online databases (<http://www.targetscan.org>, <http://www.mirbase.org>, <http://www.geneontology.org>, and <http://www.ingenuity.com>).

Intragroup differences in gene expression determined by qRT-PCR and in kinetics of engraftment based on clinical parameters were assessed by ANOVA with Bonferroni post hoc adjustment.

#### Western Blot Analysis

For protein preparation, CD34<sup>+</sup> cells from G-PB, BM, and CB were homogenized in ice-cold 20 mM Tris buffer (pH 7.3), containing 2 mM Dithiothreitol, 1% Amidosulfobetaine, 1% nonyl phenoxypolyethoxyethanol, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and

10% protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Homogenized samples were incubated at 4°C for 30 minutes and then centrifuged at high speed in a microcentrifuge, after which protein-containing supernatant was collected. Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit—Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific, Rockford, IL). From each sample, 15 µg of protein was separated by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels and electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes. Blots were incubated in TTBS blocking solution (2% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween-20), followed by overnight cold incubation with the following antibodies: anti-HSPA1A (ab5439; Abcam, Cambridge, UK), anti-CRLF3 (ab103540; Abcam) and anti- $\beta$ -actin (ab6276; Abcam). The membranes were then washed with TTBS and incubated with either a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (711-035-152; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD) or HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (715-035-150; Jackson ImmunoResearch). Antibody detection was performed with an enhanced chemiluminescence reaction (Western Blot Luminol Reagent; sc-2048; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX).

## RESULTS

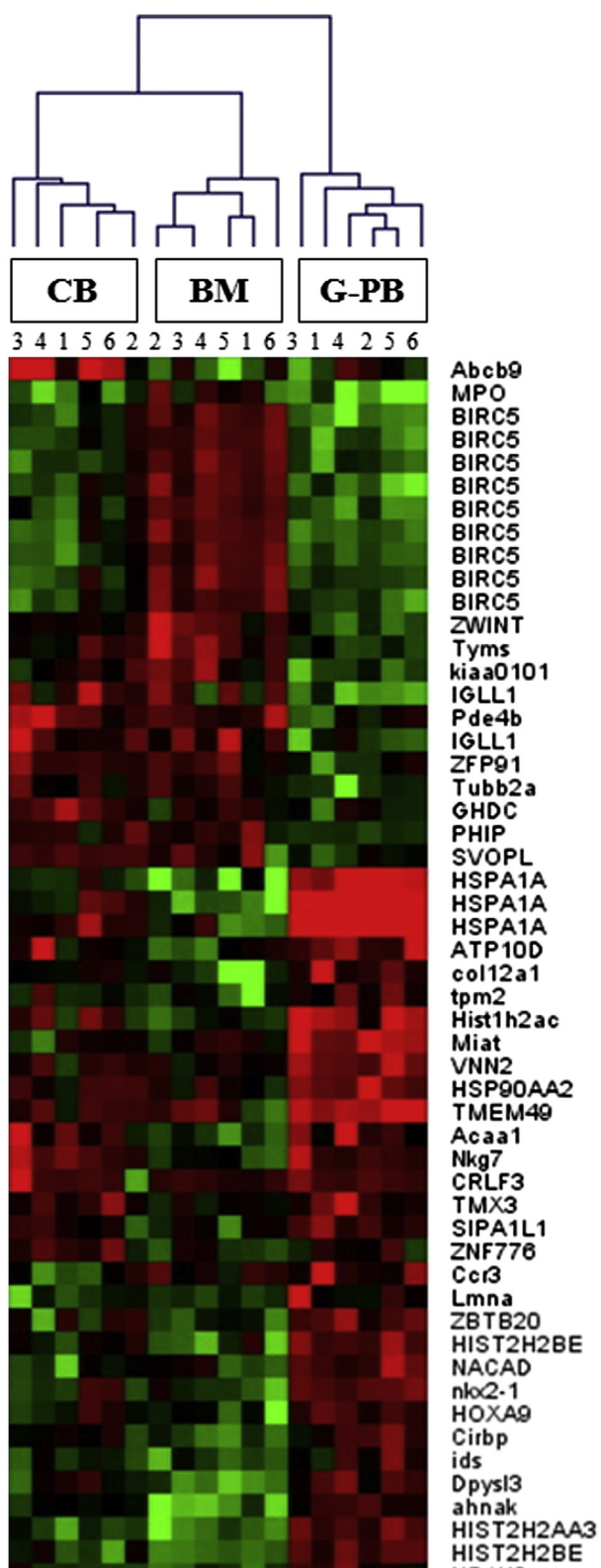
### miRNA Expression in HPCs from BM, CB, and G-PB

miRNA expression profiles were determined in CD34<sup>+</sup> cells from PB, G-PB, BM, and CB. Out of 384 miRNAs, 72 were undetectable across all samples and were excluded from further analysis. We performed unsupervised hierarchical clustering comparing the miRNA expression of HPCs from BM, CB, and G-PB with respect to the PB samples. The obtained cluster identified 2 groups, 1 group comprising the G-PB samples and the other group comprising the BM and CB samples, suggesting that HPCs from BM and CB have similar

**Table 1**  
miRNA Expression Levels

miRNA	Relative Expression (Log Ratio)			P Value
	G-PB	CB	BM	
hsa-miR-517c	-3.31	2.59	-6.00	.002
hsa-miR-130a	-2.28	-7.59	-10.92	.004
hsa-let-7g	-0.91	-4.13	-1.07	.004
hsa-miR-222	-0.75	-9.34	-7.79	.002
hsa-miR-142-3p	-0.64	-9.95	-11.09	.006
hsa-miR-125a-3p	-0.58	-4.38	-7.72	.007
hsa-miR-93	-0.54	1.85	2.14	.007
hsa-miR-10a	-0.22	-8.39	-7.70	.003
hsa-miR-92a	-0.18	-14.00	-13.45	.002
hsa-miR-125a-5p	0.04	-5.55	-6.16	.003
hsa-miR-129-3p	0.10	1.15	7.03	.003
hsa-miR-519d	0.10	5.87	-3.02	.003
hsa-miR-105	0.10	6.25	7.64	.002
hsa-miR-133b	0.10	6.43	6.11	.004
hsa-miR-127-5p	0.10	7.73	4.63	.002
hsa-miR-10b	0.10	8.12	9.01	.003
hsa-miR-9	0.10	9.65	11.07	.002
hsa-miR-22	0.10	16.75	17.46	.003
hsa-miR-106b	0.11	5.21	7.00	.001
hsa-miR-20a	0.13	-2.20	-0.05	.008
hsa-miR-532-5p	0.20	-3.67	1.25	.008
hsa-miR-221	0.21	-7.41	-10.75	.002
hsa-miR-106a	0.30	-15.68	-19.02	.002
hsa-miR-323	0.35	12.85	12.96	.003
hsa-miR-126	0.62	-7.52	-5.71	.001
hsa-miR-142-5p	0.69	4.43	5.90	.003
hsa-miR-411	0.77	5.11	2.43	.001
hsa-miR-335	1.10	-2.95	0.98	.006
hsa-miR-140-5p	1.23	-3.70	-1.39	.005
hsa-miR-141	1.35	9.18	10.28	.002
hsa-miR-107	1.38	9.08	10.72	.001
hsa-miR-27a	1.56	-1.14	0.29	.009
hsa-miR-320	1.56	-11.11	-9.50	.002
hsa-miR-103	1.73	-3.86	-2.00	.003
hsa-miR-143	2.23	5.83	7.28	.002
hsa-miR-128	3.95	0.32	-3.02	.007

Statistical significance:  $P < .01$ .



**Figure 2.** Gene expression by HPC source. Unsupervised hierarchical cluster analysis performed with the genes differentially expressed in HPCs from G-PB, BM, and CB. Each numbered column represents an individual sample, and each row represents a single gene. Red and green indicate gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

**Table 2**  
Gene Expression Levels

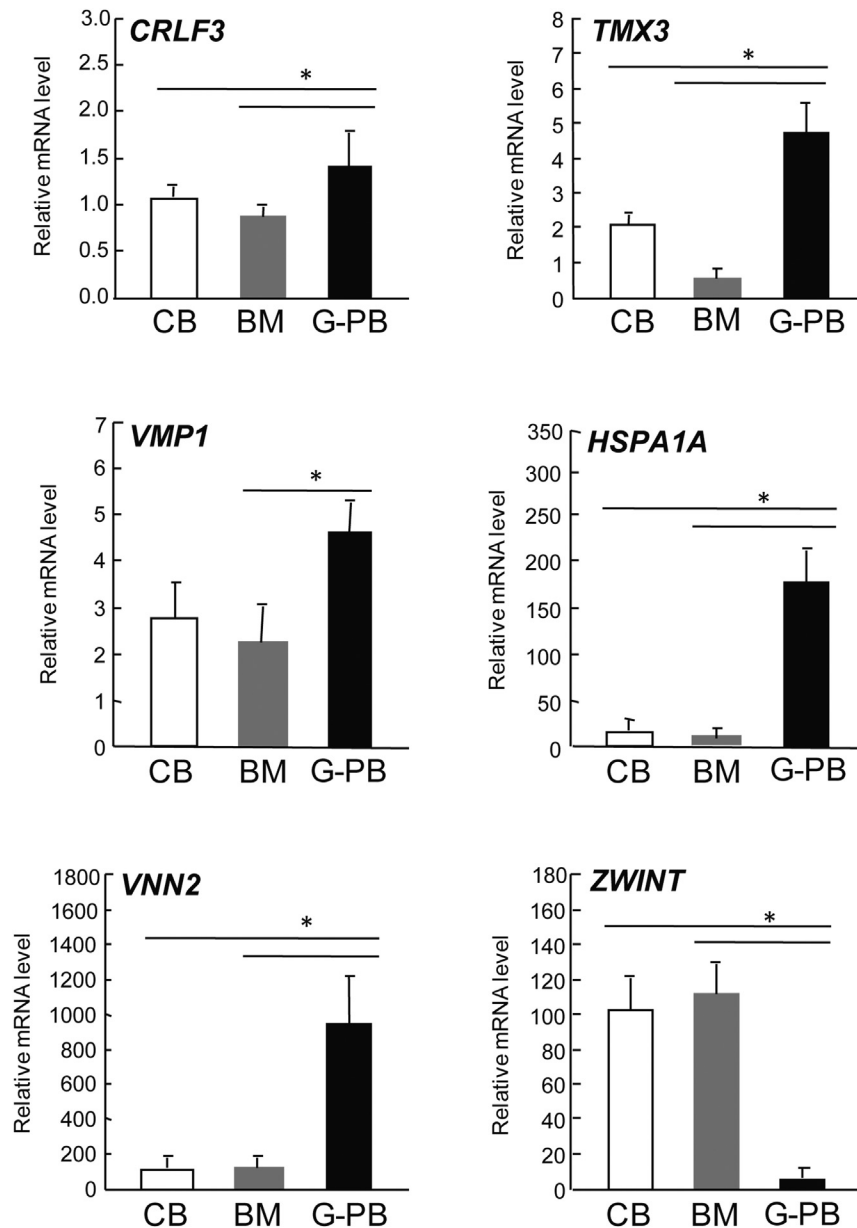
Gene	Relative Expression (Log Ratio)			P Value
	G-PB	CB	BM	
MPO	-2.44	-1.31	0.24	.009
BIRC5	-1.31	-0.52	1.29	.003
IGLL1	-1.31	1.21	0.80	.008
KIAA0101	-1.10	0.30	1.13	.006
ZWINT	-0.89	0.47	1.25	.005
PHIP	-0.66	0.44	0.90	.005
TYMS	-0.61	0.59	1.52	.004
TUBB2A	-0.53	0.09	0.42	.003
ZFP91	-0.48	1.05	0.87	.007
SVOPL	-0.39	1.16	0.43	.009
PDE4B	-0.36	1.64	1.09	.007
ABCB9	-0.32	2.63	-1.07	.007
GHDC	-0.06	0.66	0.27	.006
ZNF776	0.13	0.92	-0.63	.009
IDS	0.38	-0.63	-1.24	.004
DPYSL3	0.68	-0.25	-0.55	.007
NR1H3	0.69	-0.60	-0.96	.007
GABRA1	0.70	-0.69	-0.09	.008
HSP90AA2	0.77	0.41	0.17	.005
AHNAK	0.82	-0.25	-1.68	.001
CIRBP	0.82	0.02	-1.12	.003
TPM2	0.86	-0.13	-0.67	.006
HIST2H2BE	0.92	-0.52	-0.77	.003
LMNA	0.93	-0.92	-0.60	.003
HOXA9	0.94	-0.01	-0.87	.007
SIPA1L1	1.05	0.53	-0.51	.003
CCR3	1.11	-0.67	0.64	.008
NKG7	1.15	1.29	-0.45	.008
NEAT1	1.17	-0.71	-0.49	.006
TMX3	1.18	0.92	-0.10	.006
ACAA1	1.19	1.17	-0.97	.003
CRLF3	1.19	1.37	0.22	.004
ZBTB20	1.31	-0.44	-0.39	.008
NACAD	1.35	-0.66	-0.49	.003
COL12A1	1.38	0.06	-1.45	.002
NKX2-1	1.43	-0.13	-0.93	.003
VNN2	1.89	0.33	0.40	.004
HIST2H2AA3	1.97	0.74	-0.18	.003
ATP10D	2.13	0.46	-0.43	.009
HIST1H2AC	2.58	0.58	-0.63	.006
MIAT	2.65	-0.18	0.22	.003
VMP1	2.74	0.90	0.28	.003
HSPA1A	4.30	-0.12	-1.18	.002

Statistical significance:  $P < .01$ .

miRNA expression patterns that differ from the pattern seen in HPCs from G-PB.

miRNAs differentially expressed in the different HPC sources were identified using the nonparametric Kruskal-Wallis test. All miRNAs with a  $P$  value  $< .01$  were considered significant. Figure 1 shows unsupervised hierarchical clusters including only the differentially expressed miRNAs. We identified 36 miRNAs with expression levels varying among the different sources. Among these, 25 miRNAs were overexpressed and 9 were underexpressed in HPCs from G-PB, whereas 18 miRNAs were overexpressed and 18 were underexpressed in HPCs from BM and CB. Moreover, HPCs from BM and CB displayed no significant differences in the expression pattern for 30 miRNAs (Table 1).

Among the miRNAs differentially expressed in HPCs from G-PB, miR103, miR106a, miR125a-5p, miR126, miR140-5p, miR20a, miR221, and miR320 were overexpressed, whereas these miRNAs appeared underexpressed in both BM and CB. In contrast, miR93 was underexpressed in HPCs from G-PB and overexpressed in the other 2 HPC sources. All of these



**Figure 3.** Validation of significant genes. Expression levels of genes differentially expressed in HPCs from G-PB, BM, and CB relative to HPCs from PB as determined by qRT-PCR. Statistical analysis was performed with ANOVA. \* $P < .01$ .

miRNAs are involved in control of the cell cycle, apoptosis, cell proliferation, differentiation, and immune response.

#### Gene Expression in HPCs from BM, CB, and G-PB

We performed high-throughput gene expression analysis of the same samples by microarray technology. Unsupervised hierarchical clustering comparing samples from G-PB, BM, and CB with PB samples identified 2 clusters, 1 including G-PB samples and the other comprising BM and CB samples. This finding suggests that HPCs from BM and CB have similar gene expression profiles, whereas HPCs from G-PB have a different expression pattern.

Genes differentially expressed among the different HPC sources were identified using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences in expression with  $P < .01$  were considered significant. We identified 43 genes differentially expressed among the 3 sources (Figure 2). In HPCs obtained

from G-PB, 30 genes were up-regulated and 13 were down-regulated; in HPCs from CB, 25 genes were up-regulated and 18 were down-regulated; and in HPCs from BM, 18 genes were up-regulated and 25 were down-regulated (Table 2). Moreover, in HPCs from BM and CB, 28 genes exhibited the same expression pattern.

Among the genes differentially expressed in G-PB were down-regulated genes *GHDC*, *IGLL1*, *KIAA0101*, *PDE4B*, *PHIP*, *SVOPL*, *TUBB2A*, *TYMS*, *ZFP91*, and *ZWINT* and up-regulated genes *AHNAK*, *DPYSL3*, *GABRA1*, *HIST2H2BE*, *HOXA9*, *HSPA1A*, *IDS*, *LMNA*, *NACAD*, *NEAT1*, *NKX2-1*, *NR1H3*, *TPM2*, and *ZBTB20*. Most of these genes are involved in regulation of the cell cycle, cell growth and proliferation, cell death and survival, cell differentiation, and immune response.

Finally, to validate the high-throughput screening, we confirmed the expression of 6 genes (*CRLF3*, *ZWINT*, *HSPA1A*, *VMP1*, *VNN2*, and *TMX3*) out of the 43 differentially expressed

genes by qRT-PCR. A group of CD34<sup>+</sup> cell samples from PB served as a control. These genes were selected because each is representative of the different biological processes found in this study and because, according to online databases (<http://www.targetscan.org> and <http://www.mirbase.org>), all are targets of the differentially expressed miRNAs identified in this study. Our results verify that HPCs from G-PB had a different gene expression profile compared with HPCs from BM and CB. Expression of the genes up-regulated in HPCs from G-PB (*CRLF3*, *HSPA1A*, *VMP1*, *VNN2*, and *TMX3*) was higher compared with that of genes up-regulated in HPCs from BM and CB. In addition, a gene down-regulated in HPCs from G-PB (*ZWINT*) appeared to be up-regulated in HPCs from BM and CB (Figure 3).

#### miRNA and Gene Expression Pattern in HPCs from G-PB

We further analyzed the differences between HPCs from G-PB and HPCs from BM and CB through paired unsupervised analysis. We compared gene and miRNA expression profiles in CD34<sup>+</sup> cells from PB versus CB, BM, and G-PB using the nonparametric Mann-Whitney test. The differences in gene and miRNA expression with  $P < .01$  were considered significant. Regarding gene expression profiles, we found no significant differences between HPCs from PB and HSCs from G-PB, BM, or CB (Figure 4A-C); however, we found more similarities in miRNA expression pattern of HPCs between PB and G-PB than between PB and BM or between PB and CB (Figure 5A-C). These results suggest that

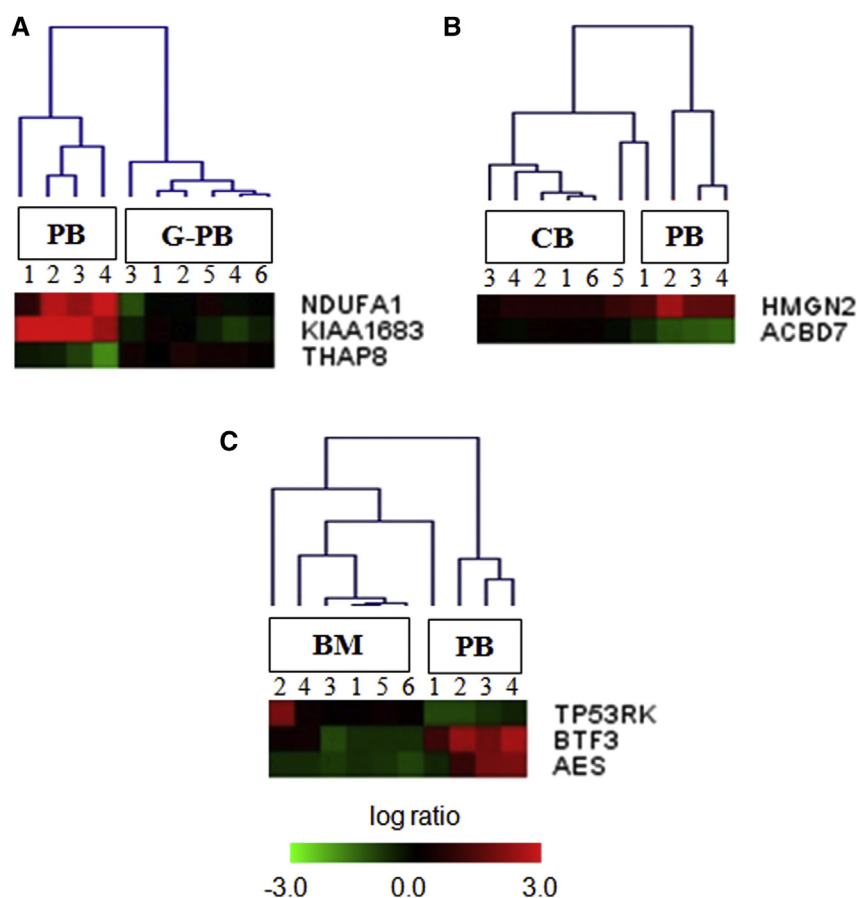
the differences in miRNA expression pattern of HPCs from G-PB compared with HPCs from BM and CB might not be attributable to a direct effect of G-CSF on HPCs, but rather could be related to G-CSF's effect on the detachment of HPCs from the hematopoietic niche.

#### Protein Synthesis in HPCs from BM, CB, and G-PB

We analyzed the expression of some proteins to verify the results observed in gene expression data by microarray technology and qRT-PCR. We performed Western blot analyses comparing the expression of *CRLF3* and *HSPA1A* proteins in HPCs from G-PB, BM, and CB with respect to expression of  $\beta$ -actin. We chose these 2 proteins because their encoding genes were overexpressed in HPCs from G-PB compared with HPCs from the other 2 sources. Remarkably, both proteins had higher expression levels in HPCs from G-PB than in HPCs from BM or CB (Figure 6A). These protein analyses were performed in replicate; expression levels are shown in Figure 6B and C.

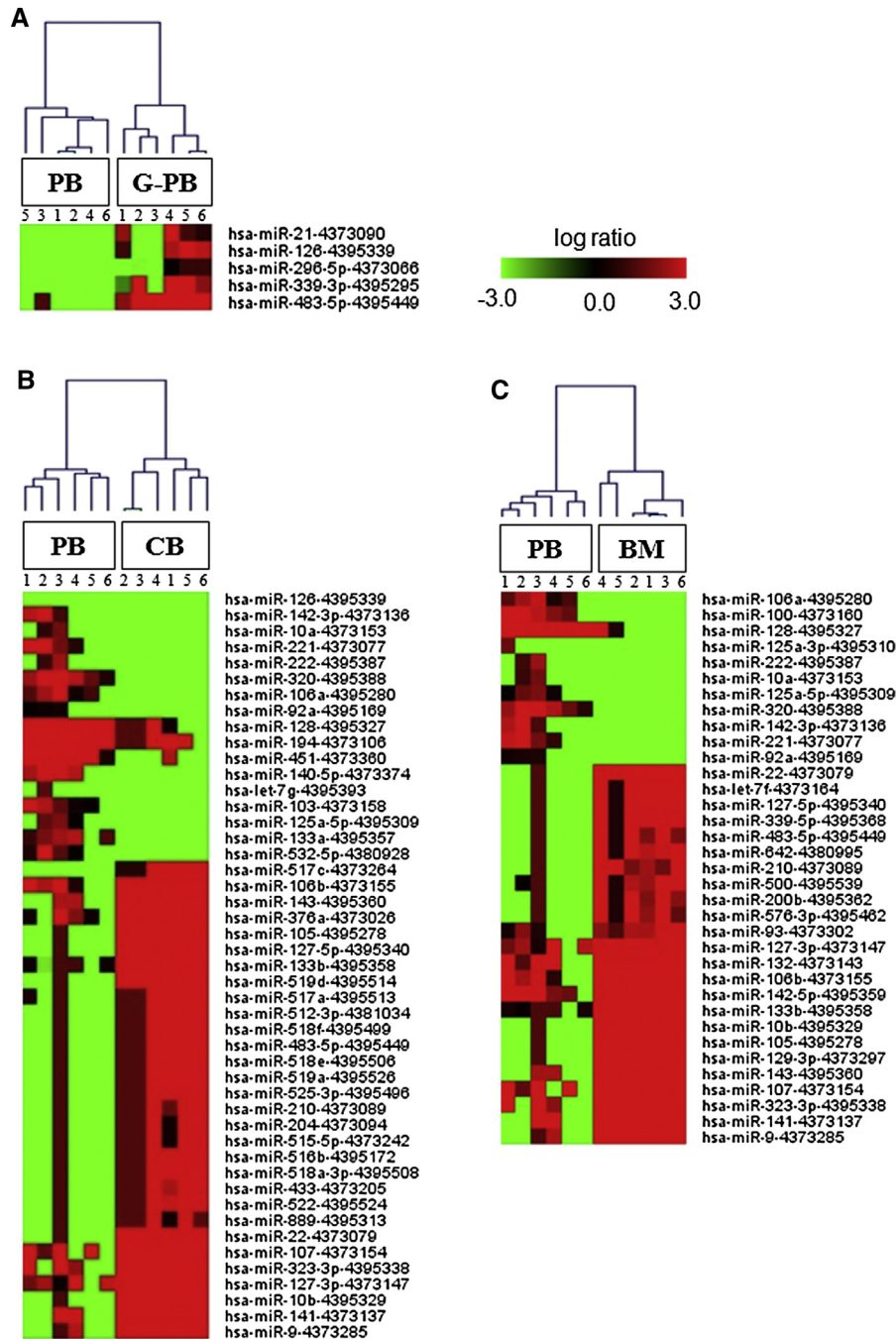
#### Engraftment

To correlate the data for gene, miRNA and protein expression with the kinetics of engraftment, we evaluated the recovery of neutrophils and platelets in patients who underwent HSCT using the HPCs from BM and G-PB used in the gene and miRNA expression molecular analyses, as well as HPCs from CB (Table 3). In the case of CB, the clinical parameters were obtained from patients who underwent HSCT



**Figure 4.** Gene expression pattern by HPC source versus PB. Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed with the genes differentially expressed in G-PB versus PB (A), CB versus PB (B), and BM versus PB (C). Each numbered column represents an individual sample, and each row represents a single gene. Red and green indicate gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test.





**Figure 5.** miRNA expression pattern in HPC sources versus PB. Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed with the miRNAs differentially expressed in G-PB versus PB (A), CB versus PB (B), and BM versus PB (C). Each numbered column represents an individual sample, and each row represents a single miRNA. Red and green indicate gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test.

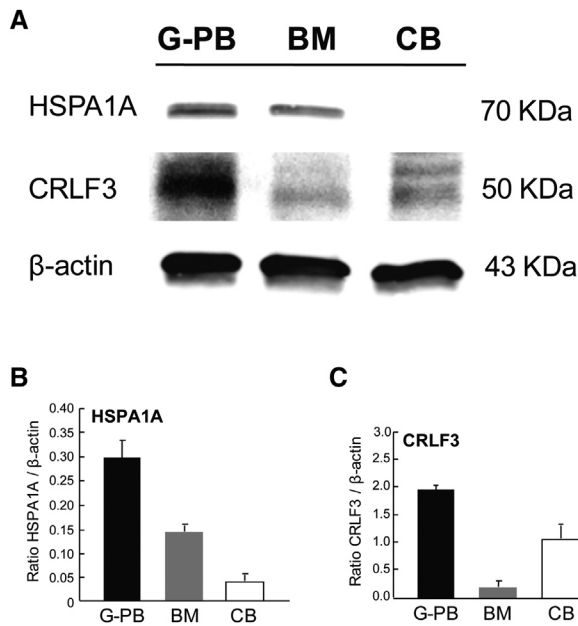
with samples other than those used in the molecular experiments, because in this group of samples, the entire umbilical cord was used for RNA and protein preparation. As expected, patients who received HPCs from G-PB had significantly shorter median times to neutrophil and platelet recovery significantly shorter compared with patients who received HPCs from BM and CB (Table 4).

## DISCUSSION

Previous studies have examined the biological properties of HPCs obtained from the 3 sources currently available for

transplantation: BM, CB and G-PB [15,16]. Those studies focused on cloning efficiency, proliferation and response to cytokine stimulation, progeny, and recovery after HSCT, and reported a faster rate of recovery with the use of HPCs from G-PB; however, their data do not fully explain the different engraftment outcomes in the recipients of transplants of HPCs from these different sources.

Although gene and miRNA expression profiles have been studied in hematologic cell lineages and in HPCs [17–21], the relationship between gene and miRNA expression and the properties of the HPCs obtained from the currently available



**Figure 6.** Protein expression by HPC source. (A) Western blot analysis of HSPA1A and CRLF3 proteins comparing HPCs from G-PB, BM, and CB. (B and C) Protein levels of HSPA1A (B) and CRLF3 (C) in HPCs from G-PB, BM, and CB normalized with respect to  $\beta$ -actin ( $n = 2$ ).

sources remains largely unknown. In this regard, we hypothesized that different patterns of gene and miRNA expression of HPCs in the G-PB, BM, and CB might have clinical implications and could explain, at least in part, the differing kinetics of engraftment observed after HSCT with these 3 types of HPCs.

We found that gene and miRNA expression profiles of HPCs differ depending on their source: G-PB, BM, or CB. We observed that the gene and miRNA expression patterns of HPCs are similar in BM and CB, whereas HPCs from G-PB have a unique expression profile. Of note, most of the differentially expressed genes and miRNAs are involved in the cell cycle and proliferation, which might explain the differing kinetics of engraftment observed after transplantation of HPCs from the 3 different sources.

We first identified 36 miRNAs differentially expressed in the 3 sources of HPCs, most of which appeared to be over-expressed in HPCs from G-PB. Among these, 8 miRNAs were overexpressed only in HPCs from G-PB (miR103, miR106a, miR125a-5p, miR126, miR140-5p, miR20a, miR221, and miR320). Of note, these 8 miRNAs are involved in control of the cell cycle, decreasing apoptosis and promoting cell proliferation and differentiation [22–25]. In contrast, in HPCs from BM and CB, the same number of miRNAs were over-expressed and underexpressed, with similar expression patterns in both.

**Table 3**  
Graft Characteristics

HPC Source	Graft Characteristics	
	CD3 <sup>+</sup> T cells ( $\times 10^6$ /kg)	CD34 <sup>+</sup> cells ( $\times 10^6$ /kg)
G-PB	245.3 $\pm$ 7.71	6.2 $\pm$ 0.57
BM	33.27 $\pm$ 3.37	3.48 $\pm$ 0.52
CB	13 $\pm$ 1.48	0.2 $\pm$ 0.06

Statistical analysis performed using ANOVA;  $P < .01$  in all comparisons between groups.

**Table 4**  
Engraftment Data

HPC Source	Time to Recovery after HSCT, d		
	Neutrophils >500	Platelets >20,000	Platelets >50,000
G-PB	16.0 $\pm$ 0.84	11.8 $\pm$ 0.37	14.8 $\pm$ 0.86
BM	18.67 $\pm$ 2.28	17.0 $\pm$ 1.70	31.75 $\pm$ 4.15
CB	21.3 $\pm$ 2.5	29.7 $\pm$ 2.67*	39.5 $\pm$ 2.5

Median time of neutrophil and platelet recovery in 6 patients after HSCT. Statistical analysis performed with ANOVA.

\*  $P < .01$ , CB versus G-PB or BM.

We then identified 43 genes differentially expressed among the 3 sources of HPCs and again we found more differences in HPCs from G-PB compared with HPS from BM and CB. We identified 10 down-regulated genes (*GHDC*, *IGLL1*, *KIAA0101*, *PDE4B*, *PHIP*, *SVOPL*, *TUBB2A*, *TYMS*, *ZFP91*, and *ZWINT*) and 14 up-regulated genes (*AHNAK*, *DPYSL3*, *GABRA1*, *HIST2H2BE*, *HOXA9*, *HSPA1A*, *IDS*, *LMNA*, *NACAD*, *NEAT1*, *NKX2-1*, *NR1H3*, *TPM2*, and *ZBTB20*) only in HPCs from G-PB. The majority of these genes are related to the cell cycle, promoting cell proliferation, hematopoiesis, and the immune response. Remarkably, 20 of these 43 differentially expressed genes are targets of the 36 miRNAs also differentially expressed in this study, based on information in the aforementioned databases (Table 5).

Interestingly, the direction of the change in the expression of these target genes was opposite of that in the expression of miRNAs. Five of these target genes were up-regulated only in HPCs from G-PB. *AHNAK* and *HIST2H2BE* are known to promote cell proliferation [26,27], whereas *IDS* participates in cellular secretion [28]. *HSPA1A* and *GABRA1* have important roles in inhibiting the apoptotic process when up-regulated [29,30]. In contrast, 8 target genes appeared to be down-regulated in HPCs from G-PB compared with HPCs from BM and CB. The down-regulation of *KIAA0101*, *ZWINT*, *PDE4B*, *ZFP91*, *TYMS*, and *IGLL1* could affect the cell cycle, cell proliferation, apoptosis, cell signaling and hematopoiesis [31–36], and the low expression of *PHIP* and *GHDC* could lead to defects in gene expression and the transcription process [37].

**Table 5**  
Target Genes

Target gene	Source	miRNAs
<i>CRLF3</i>	G-PB, BM, and CB	miR10a, miR92a
<i>HSP90AA2</i>	G-PB, BM, and CB	miR130a
<i>VMP1</i>	G-PB, BM, and CB	miR103a, miR92a
<i>VNN2</i>	G-PB, BM, and CB	miR10a, miR125a-3p
<i>KIAA0101</i>	BM and CB	miR103, miR106a, miR20a, miR320
<i>PHIP</i>	BM and CB	miR103, miR126, miR320
<i>ZWINT</i>	BM and CB	miR106a, miR320
<i>PDE4B</i>	BM and CB	miR103, miR106a, miR20a, miR320
<i>ZFP91</i>	BM and CB	miR103, miR106a, miR126, miR140-5p, miR20a, miR221, miR320
<i>GHDC</i>	BM and CB	miR103, miR221
<i>TYMS</i>	BM and CB	miR140-5p, miR20a
<i>IGLL1</i>	BM and CB	miR106a y miR221
<i>TMX3</i>	G-PB and CB	miR106a
<i>IDS</i>	G-PB	miR93
<i>AHNAK</i>	G-PB	miR93
<i>BIRC5</i>	BM	miR519d
<i>ABCB9</i>	CB	miR27a
<i>HSPA1A</i>	G-PB	miR93
<i>HIST2H2BE</i>	G-PB	miR93
<i>GABRA1</i>	G-PB	miR93

Listed are differentially expressed genes among the different HPC sources regulated by the differentially expressed miRNAs.

Overall, our data suggest that the genes expressed in HPCs from G-PB are involved in the cell cycle, promoting cell differentiation and proliferation. This may help explain the faster engraftment of G-PB HPCs after HSCT compared with HPCs from BM and CB.

Validation of some of these target genes (*CRLF3*, *ZWINT*, *HSPA1A*, *VMP1*, *VNN2*, *TMX3*) by qRT-PCR indicates that HPCs from BM and CB have a similar gene expression pattern with respect to HPCs from G-PB. Most of the genes up-regulated in HPCs from G-PB had lower expression levels in HPCs from BM and CB. In addition, 1 gene, *ZWINT*, that was down-regulated after mobilization appeared to be up-regulated in HPCs from BM and CB compared with HPCs from PB. Moreover, analysis of expression levels of the proteins encoded by 2 of these validated genes (*HSPA1A* and *CRLF3*) confirmed a different expression pattern in HPCs from G-PB compared with that in HPCs from BM and CB, as observed in gene and miRNA studies.

In addition, to examine the differences between HPCs from G-PB and HPCs from BM and CB, we compared gene and miRNA expression profiles of HPCs from PB and HPCs from all 3 sources. We found no statistically significant differences in gene expression profile between HPCs from PB and HPCs from the G-PB, BM, or CB; however, the miRNA expression profile of HPCs from PB was closer to that of HPCs from G-PB than to that of HPCs from BM or from CB. This finding may suggest that the detachment of HPCs from BM stroma induced by G-CSF can alter their miRNA expression profile, up-regulating or down-regulating miRNAs not expressed in this manner in BM and CB.

Finally, to correlate gene, miRNA, and protein expression data and clinical outcomes, we compared the kinetic of engraftment among patients undergoing HSCT with HPCs from G-PB, BM, or CB. As expected, neutrophil and platelet recovery was faster in the patients receiving G-PB HPCs. Although most of the difference in recovery has been attributed to the differing amounts of HPCs infused from each source, our data also suggest that these varying outcomes are a question not just of quantity but also of quality; that is, HPCs from different sources have differing biological properties, as demonstrated by the individual gene expression patterns.

In summary, we have demonstrated significant differences in gene and miRNA expression profiles in HSCs from the different sources currently used in HSCT. The expression profile of HPCs from G-PB differs from that of HPCs from BM and from CB, which seem to have similar expression patterns. Future studies of specific genes and miRNA from the data generated in this study may provide insight into the biological processes that contribute to posttransplantation outcomes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Gynecology and Obstetrics Department of the University Hospital Virgen del Rocío from Seville and Blanca Miranda from Biobank of Andalusian Public Health System for supply CB samples. Special thanks to Francisco Márquez, Ricardo Pardo and M. José Castro for the technical assistance provided.

**Financial disclosure:** This work was supported by a grant from the Consejería de Salud (PI0079) of Junta de Andalucía.

**Conflict of interest statement:** There are no conflicts of interest to report.

#### REFERENCES

- Brunstein CG. Umbilical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control*. 2011;18:222–236.
- Pelus LM, Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*. 2008;22:466–473.
- Basak GW, de Wreede LC, van Biezen A, et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of chronic myeloid leukemia relapse following peripheral blood or bone marrow stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:837–842.
- Van Besien K, Shore T, Cushing M. Peripheral-blood versus bone marrow stem cells. *N Engl J Med*. 2013;368:287–288.
- Brown RA, Adkins D, Khoury H, et al. Long-term follow-up of high-risk allogeneic peripheral-blood stem-cell transplant recipients: graft-versus-host disease and transplant-related mortality. *J Clin Oncol*. 1999;17:806–812.
- Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96:2703–2711.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135:1118–1129.
- Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, et al. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*. 2002;195:1145–1154.
- Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 2005;106:3020–3027.
- Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, et al. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol*. 2002;30:440–449.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:857–866.
- Smith EC, Thon JN, Devine MT, et al. MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood*. 2012;120:2317–2329.
- Liao R, Sun J, Zhang L, et al. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem*. 2008;104:805–817.
- Merkerova M, Vasikova A, Belickova M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev*. 2010;19:17–26.
- Arber C, Halter J, Stern M, et al. Graft source determines human hematopoietic progenitor distribution pattern within the CD34(+) compartment. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:650–658.
- Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, et al. Differences between peripheral blood and cord blood in the kinetics of lineage-restricted hematopoietic cells: implications for delayed platelet recovery following cord blood transplantation. *Stem Cell*. 2003;21:143–151.
- Zhang L, Sankaran VG, Lodish HF. MicroRNAs in erythroid and megakaryocytic differentiation and megakaryocyte-erythroid progenitor lineage commitment. *Leukemia*. 2012;26:2310–2316.
- Thiele W, Krishnan J, Rothley M, et al. VEGFR-3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis. *Blood*. 2012;120:1899–1907.
- Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM, et al. Gene-expression profiling of CD34<sup>+</sup> cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *Leukoc Biol*. 2004;75:314–323.
- Georgantas RW 3rd, Tanadve V, Malehorn M, et al. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Res*. 2004;64:4434–4441.
- Ren J, Jing P, Wang E, et al. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med*. 2009;7:20.
- Li H, Li T, Wang S, et al. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2013;10:313–324.
- Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, et al. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS ONE*. 2011;6:e16138.
- Huang X, Gschwend E, Van Handel B, et al. Regulated expression of microRNAs-126/126\* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117:2157–2165.
- Kim BM, Choi MY. Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426:183–189.
- Kouno M, Kondoh G, Horie K, Komazawa N, et al. Ahnak/Desmoyokin is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123:700–707.
- Freire J, Covelo G, Sarandeses C, et al. Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol*. 2001;79:123–131.

28. Piquer S, Casas S, Quesada I, et al. Role of iduronate-2-sulfatase in glucose-stimulated insulin secretion by activation of exocytosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297:E793-E801.
29. Selkirk GA, McLellan TM, Wright HE, Rhind SG. Expression of intracellular cytokines, HSP72, and apoptosis in monocyte subsets during exertional heat stress in trained and untrained individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R575-R586.
30. Vaknin UA, Hann SR. The alpha1 subunit of GABAA receptor is repressed by c-myc and is pro-apoptotic. *J Cell Biochem.* 2006;97:1094-1103.
31. Chang CN, Feng MJ, Chen YL, et al. p15(PAF) is an Rb/E2F-regulated S-phase protein essential for DNA synthesis and cell cycle progression. *PLoS ONE.* 2013;8:e61196.
32. Endo H, Ikeda K, Urano T, et al. Terf/TRIM17 stimulates degradation of kinetochore protein ZWINT and regulates cell proliferation. *J Biochem.* 2012;151:139-144.
33. Peter D, Jin SL, Conti M, et al. Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4<sup>+</sup> T cells: predominant role of PDE4D. *J Immunol.* 2007;178:4820-4831.
34. Jin X, Jin HR, Jung HS, et al. An atypical E3 ligase zinc finger protein 91 stabilizes and activates NF- $\kappa$ B-inducing kinase via Lys63-linked ubiquitination. *J Biol Chem.* 2010;285:30539-30547.
35. Ligabue A, Marverti G, Liebl U, Myllykallio H. Transcriptional activation and cell cycle block are the keys for 5-fluorouracil induced up-regulation of human thymidylate synthase expression. *PLoS ONE.* 2012;7:e47318.
36. Miyazaki T, Kato I, Takeshita S, et al. Lambda5 is required for rearrangement of the Ig kappa light chain gene in pro-B cell lines. *Int Immunol.* 1999;11:1195-1202.
37. Farhang-Fallah J, Yin X, Trentin G, et al. Cloning and characterization of PHIP, a novel insulin receptor substrate-1 pleckstrin homology domain-interacting protein. *J Biol Chem.* 2000;275:40492-40497.



**Artículo 2. El factor estimulador de colonias granulocíticas produce cambios a largo plazo en los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las células CD34<sup>+</sup> de donantes sanos.**

El G-CSF es actualmente la citoquina más utilizada en la movilización de las CPH y aunque su administración se considera un proceso seguro y se emplea en todo el mundo en miles de pacientes y donantes cada año, no se conocen sus efectos a largo plazo, especialmente sobre las CPH. En este sentido, nos planteamos analizar si el G-CSF podía producir cambios en los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las CPH de donantes sanos, y en ese caso si persistían a largo plazo.

Se aislaron células progenitoras CD34<sup>+</sup> de SP de 6 donantes sanos: antes de la movilización con G-CSF y a los 5, 30 y 365 días después de la movilización. Del mismo modo que en el artículo 1, se obtuvieron las células mononucleadas mediante centrifugación por gradiente de densidad, y se aislaron las células CD34<sup>+</sup> mediante separación inmunomagnética. Para obtener una mayor pureza las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales CD34-PE y CD45-FITC y se sortearon por citometría de flujo (las células muertas fueron descartadas antes de la separación). La pureza del aislamiento de las células CD34<sup>+</sup> fue en todos los casos superior al 95%. A continuación se extrajo el ARN de todas las muestras y se analizó la expresión de 384 miRNAs usando las tarjetas microfluídicas *TaqMan Human MicroRNA Arrays v2.0*, y la expresión de todo el genoma usando los arrays *Whole Human Genome 4x44K oligo microarray kit*. Los valores de expresión génica y de los miRNAs se obtuvieron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Con los datos de expresión se realizaron análisis jerárquicos no supervisados empleando el método de la distancia Euclídea. Para identificar los genes y miRNAs expresados diferencialmente antes y a los distintos tiempos tras la administración del G-CSF se aplicó el test estadístico no paramétrico U de *Mann Whitney*. Se consideraron significativos los genes y miRNAs con un valor  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa *Multiexperiment Viewer 4.7.1* y la funcionalidad de los miRNAs y genes expresados diferencialmente se determinó a partir de distintas bases de datos disponibles en internet.

Al realizar el análisis jerárquico no supervisado comparando los niveles de expresión génica y de miRNAs de las células CD34<sup>+</sup> antes y a los 5, 30 y 365 días de la movilización con G-CSF, se identificaron claramente dos grupos, uno formado por las CD34<sup>+</sup> no movilizadas y otro que incluía las muestras de CD34<sup>+</sup> obtenidas a los distintos tiempos tras la administración de la droga. En el caso de los miRNAs, al aplicar el análisis estadístico U de

*Mann Whitney* se identificaron 15, 179 y 155 miRNAs expresados diferencialmente entre las células CD34+ no movilizadas y tras la movilización a los 5, 30 y 365 días respectivamente. De todos ellos la mayoría de los miRNAs se entraban sobreexpresados tras la movilización, y seis de ellos además se mantenían sobreexpresados desde el día 5 hasta un año después del tratamiento. Del mismo modo se identificaron 4136, 4960 y 4805 genes expresados diferencialmente entre las células CD34+ no movilizadas y tras tratamiento con G-CSF a los 5, 30 y 365 días respectivamente. De todos ellos 2424 genes mantuvieron sus niveles de expresión desde el día 5 hasta un año después de la exposición con G-CSF y estaban implicados en varios procesos biológicos como cáncer, expresión génica, síntesis de proteínas, crecimiento y proliferación celular, muerte celular y supervivencia, ciclo celular y hematopoyesis. Curiosamente muchos de ellos son diana de los 6 miRNAs que se mantienen sobreexpresados a los distintos tiempos tras el G-CSF. Por este motivo se validaron algunos de estos genes por qRT-PCR, confirmándose que el G-CSF modifica los perfiles de expresión génica de las CPH hasta un año después de exposición al mismo.

# Granulocyte colony-stimulating factor produces long-term changes in gene and microRNA expression profiles in CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors

Alicia Báez,<sup>1</sup> Beatriz Martín-Antonio,<sup>2</sup> José I. Piruat,<sup>1</sup> Concepción Prats,<sup>1</sup> Isabel Álvarez-Laderas,<sup>1</sup> M. Victoria Barbado,<sup>1</sup> Magdalena Carmona,<sup>1</sup> Álvaro Urbano-Ispizua,<sup>2,3</sup> and Jose Antonio Pérez-Simón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, University Hospital Virgen del Rocio, Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), CSIC, University of Seville; <sup>2</sup>Department of Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS; and <sup>3</sup>Institute of Research Josep Carreras, University of Barcelona, Spain

## ABSTRACT

Granulocyte colony-stimulating factor is the most commonly used cytokine for the mobilization of hematopoietic progenitor cells from healthy donors for allogeneic stem cell transplantation. Although the administration of this cytokine is considered safe, knowledge about its long-term effects, especially in hematopoietic progenitor cells, is limited. On this background, the aim of our study was to analyze whether or not granulocyte colony-stimulating factor induces changes in gene and microRNA expression profiles in hematopoietic progenitor cells from healthy donors, and to determine whether or not these changes persist in the long-term. For this purpose, we analyzed the whole genome expression profile and the expression of 384 microRNA in CD34<sup>+</sup> cells isolated from peripheral blood of six healthy donors, before mobilization and at 5, 30 and 365 days after mobilization with granulocyte colony-stimulating factor. Six microRNA were differentially expressed at all time points analyzed after mobilization treatment as compared to the expression in samples obtained before exposure to the drug. In addition, 2424 genes were also differentially expressed for at least 1 year after mobilization. Of interest, 109 of these genes are targets of the differentially expressed microRNA also identified in this study. These data strongly suggest that granulocyte colony-stimulating factor modifies gene and microRNA expression profiles in hematopoietic progenitor cells from healthy donors. Remarkably, some changes are present from early time-points and persist for at least 1 year after exposure to the drug. This effect on hematopoietic progenitor cells has not been previously reported.

## Introduction

The mobilization of hematopoietic progenitor cells (HPC) for hematopoietic transplantation from bone marrow to blood stream by growth factors was introduced into clinical practice in the 1980s.<sup>1-4</sup> Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is the most commonly used cytokine and it is administered worldwide to thousands of patients and healthy donors every year. Several studies, in which different molecular and clinical parameters were analyzed for 10 years after G-CSF administration, have been reported describing its safety profile among healthy donors. In this regard, no increase in the incidence of hematologic malignancies was detected as compared to that in the normal population.<sup>5,6</sup> Furthermore, the donors' early post-donation quality of life following the collection of HPC from peripheral blood is better than that following bone marrow donation.<sup>7</sup> At the molecular level, G-CSF induces the release of proteolytic enzymes from neutrophils into the extravascular compartment of the bone marrow. These enzymes degrade and inactivate the linkage proteins between HPC and the bone marrow stroma releasing the HPC into the peripheral blood. The SDF-1/CXCR4 axis includes some of the most important receptors involved in

the interaction between HPC and stroma.<sup>8-13</sup> It is known that G-CSF causes a decrease in the expression of SDF-1 in the bone marrow stroma.<sup>14</sup> Nevertheless, there is not much information about the effects of G-CSF on the expression of other genes in HPC.

Several studies have shown that microRNA (miRNA) may also play an important role in the mobilization of HPC. Indeed, HPC have different miRNA expression profiles depending on whether they are mobilized with G-CSF or plerixafor.<sup>15,16</sup> miRNA are involved in different biological processes, including development, differentiation, proliferation and cell death.<sup>17</sup> Accordingly, changes in the expression of miRNA associated with the drug-induced mobilization of HPC might lead to changes in gene expression. In this regard, it has been described that G-CSF induces changes in both gene and miRNA expression profiles in leukocytes for up to 9 months after mobilization.<sup>18-20</sup> Its long-term effects on HPC do, however, still need to be analyzed.

On this background, we hypothesized that G-CSF could modify gene and miRNA expression profiles of HPC, resulting in changes that could affect these cells' biological features. The aim of this study was, therefore, to analyze, with high throughput techniques, whether G-CSF induces changes in

©2013 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2013.086959

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Manuscript received on March 1, 2013. Manuscript accepted on September 18, 2013.

Correspondence: abaez-ibis@us.es



gene and miRNA expression profiles in HPC from healthy donors, and to determine whether any changes in expression signatures persist in the long-term or return to the original status.

## Methods

### Samples

CD34<sup>+</sup> progenitor cells from peripheral blood of six healthy donors were collected before and at 5, 30 and 365 days after the mobilization with G-CSF (mobilization regimen: 10-15 µg/kg of G-CSF daily for 5 days). All donors were included in the transplant program of the Hematology Department of the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain). The local ethics committee of the same hospital provided institutional review board approval for this study, and informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Isolation of hematopoietic progenitor cells

Mononuclear cells were collected from all samples by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque solution (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The CD34<sup>+</sup> cells were isolated in an AutoMACS pro separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by positive immunomagnetic selection using the CD34 MACS microbead Human Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and, after magnetic enrichment, CD34<sup>+</sup> cells were sorted by flow cytometry. The purity of the isolated CD34<sup>+</sup> cells was greater than 95% in all cases.

### RNA extraction

Total RNA was extracted by TRIsure (Bioline, Luckenwalde, Germany) in all samples. The quality and integrity of the RNA were verified by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### MicroRNA and gene expression

The expression profiles of 384 miRNA were analyzed in all samples using TaqMan Human MicroRNA v2.0 Arrays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) which were analyzed on a 7900 HT Fast Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The SDS 2.3 and RQ Manager 1.2 software (both Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for the analysis. Data were normalized using the average of the endogenous small-nucleolar RNU48 and the non-coding small nuclear U6, both included in the array.

The expression profile of 45,000 genes was analyzed in the same samples using the Whole Human Genome Oligo microarray kit 4x44K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The microarrays were scanned in a GenePix reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Samples from non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells were used as the reference group in both types of expression analysis.

The expression of significant genes was validated by quantitative real-time PCR using Quantitec Primer Assays and the Quantitec SYBR Green Kit (both from Qiagen, Hilden, Germany) in a 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were normalized to the housekeeping gene *ACTB* and the group of samples from non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells was used as a control. The relative gene expression levels were calculated by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method.

### Statistical analysis

Unsupervised hierarchical clustering of gene and miRNA expression data was performed using the average linkage and the

Euclidean distance. To identify the genes and miRNA differentially expressed in CD34<sup>+</sup> cells before and at the different time-points after the G-CSF administration we applied the non-parametric Mann-Whitney test. To obtain positive and negative expression values, data were transformed to a logarithmic scale. All analyses were performed using Multi-experiment Viewer 4.7.1 software. The function of the genes and miRNA of interest was determined from different databases available online (miRbase, Gene Ontology, Ingenuity Pathways Analysis).

## Results

### Effect of granulocyte colony-stimulating factor on microRNA expression of hematopoietic progenitor cells

miRNA expression profiles were determined in CD34<sup>+</sup> cells from peripheral blood before and at different time-points after mobilization with G-CSF. Seventy-two out of 384 miRNA were undetectable across all samples and were excluded from further analyses. We performed unsupervised paired hierarchical clustering comparing the expression of the miRNA from non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells *versus* those obtained at 5, 30 or 365 days after exposure to the drug. In all paired comparisons two groups were clearly differentiated. One of them included the non-mobilized samples and the other one contained those samples obtained at the different time-points post-mobilization, thus indicating that G-CSF causes changes in miRNA expression patterns until at least 1 year after mobilization. To identify those miRNA differentially expressed between the different groups, a non-parametric Mann-Whitney test was applied. All miRNA with a *P* value <0.05 were considered statistically significant. Figure 1 shows paired hierarchical clusters including only differentially expressed miRNA.

At day 5 after treatment, we identified 15 differentially expressed miRNA, 12 of which were over-expressed and three under-expressed as compared to their expression in non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells (Figure 1A).

At day 30, we found 179 differentially expressed miRNA, 177 over-expressed and two under-expressed (Figure 1B). Out of these, nine miRNA were also over-expressed at day 5 after mobilization, whereas 168 miRNA appeared over-expressed for the first time at day 30 of the mobilization.

One year after G-CSF administration, we identified 155 differentially expressed miRNA, 130 of which were over-expressed and 25 under-expressed as compared to the expression level in the control (Figure 1C). Among all of these miRNA, 128 were also over-expressed at day 30 and maintained their expression levels 1 year after G-CSF administration, while six miRNA (miR182, miR21, miR339-3p, miR483-5p, miR500 and miR576-3p) showed over-expression since the start of the treatment and for up to 1 year later (Figure 2). These miRNA are mainly involved in processes such as cell cycle, proliferation, angiogenesis and immune response (Table 1). Overall, we found that G-CSF induced mostly over-expression of miRNA in mobilized HPC. The highest number of over-expressed miRNA was observed on day 30 after G-CSF administration and the same trend remained for at least 1 (Figure 1D).

In addition, in order to check that the miRNA expression pattern of CD34<sup>+</sup> cells from peripheral blood does not vary

over time in normal conditions, we performed the same unsupervised hierarchical clustering comparing the miRNA expression profiles of CD34<sup>+</sup> cells from peripheral blood of six control subjects, collected before and 30 days after administration of a vehicle (saline solution). As we expected there were no changes in a subject's expression pattern of miRNA over time (*Online Supplementary Figure S1*).

#### Effect of granulocyte colony-stimulating factor on protein-encoding gene expression of hematopoietic progenitor cells

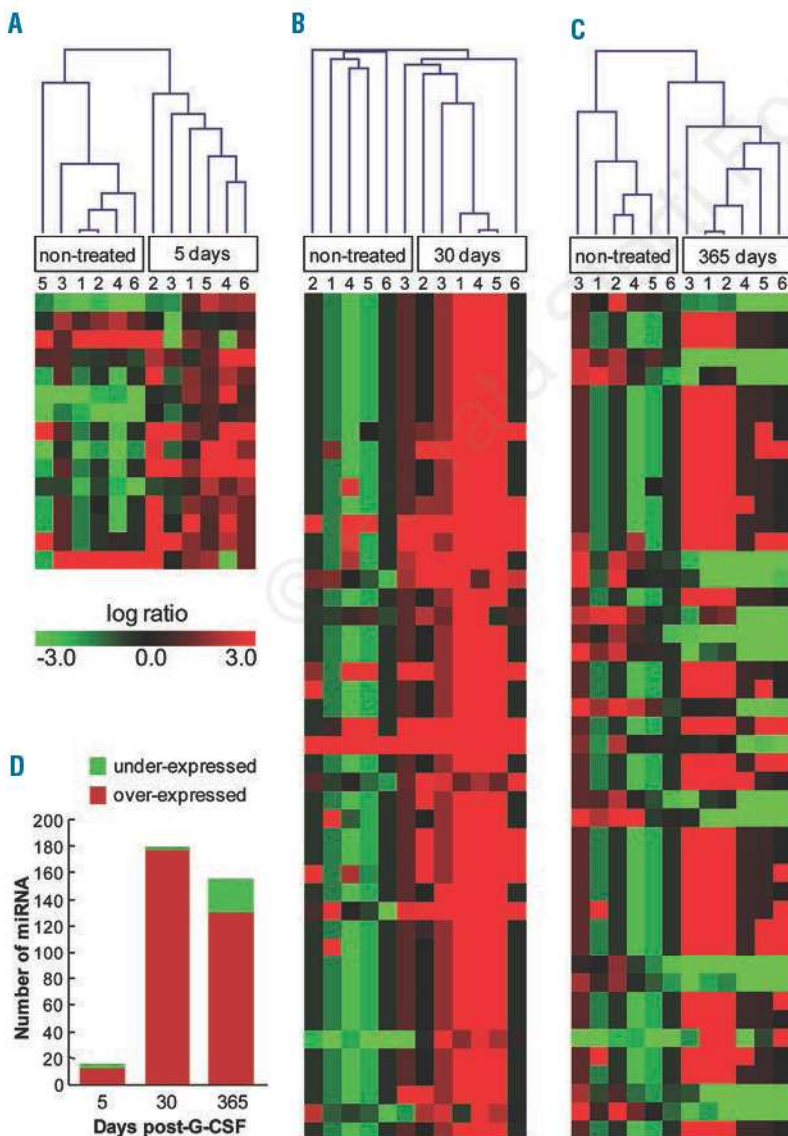
We performed high-throughput gene expression analysis of the same samples by microarray technology. Once again, unsupervised hierarchical clustering comparing non-mobilized samples with each of those collected at the different time-points after mobilization clearly identified two clusters which included the samples obtained before and after exposure to G-CSF. Interestingly, most of the differences in treated samples remained 1 year after mobilization. In order to identify those genes differentially expressed in CD34<sup>+</sup> cells before G-CSF and at the different

time-points after mobilization, we applied a non-parametric Mann-Whitney test in all paired unsupervised analyses. The differences in expression with a  $P$  value  $<0.05$  were considered statistically significant.

We identified 4136 genes differentially expressed in non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells versus CD34<sup>+</sup> cells obtained 5 days after exposure to G-CSF (Figure 3A). Out of these, 2113 genes were up-regulated and 2023 were down-regulated as compared to non-mobilized samples.

Thirty days after G-CSF administration we found 4960 differentially expressed genes: as compared to their expression in untreated samples, 1848 were up-regulated and 3112 were down-regulated 30 days after mobilization (Figure 3B). Of all these genes, 1899 appeared differentially expressed for the first time at day 30 of the mobilization, 635 being up-regulated and 1264 being down-regulated.

Finally, upon comparing CD34<sup>+</sup> cells before and 1 year after mobilization, we found 4805 differentially expressed genes: 1969 were up-regulated and 2836 down-regulated (Figure 3C). In this case 2381 genes appeared differentially expressed for the first time 1 year after G-CSF treatment:



**Figure 1.** Unsupervised hierarchical cluster analysis of miRNA. The analysis was performed with the miRNA differentially expressed between CD34<sup>+</sup> cells from non-treated samples and at 5 days (A), 30 days (B), and 1 year (C) after G-CSF administration. Each numbered column represents an individual sample and each row represents a single miRNA. Panel A contains all the miRNA included in the analysis. Panels (B) and (C) contain representative portions of the respective sets of miRNA. The red and green color code indicates miRNA expression levels in logarithmic scale. The statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney test. (D) Number of over- and under-expressed miRNA at the different time-points after G-CSF administration relative to expression in non-treated samples.



1075 were up-regulated and 1306 were down-regulated.

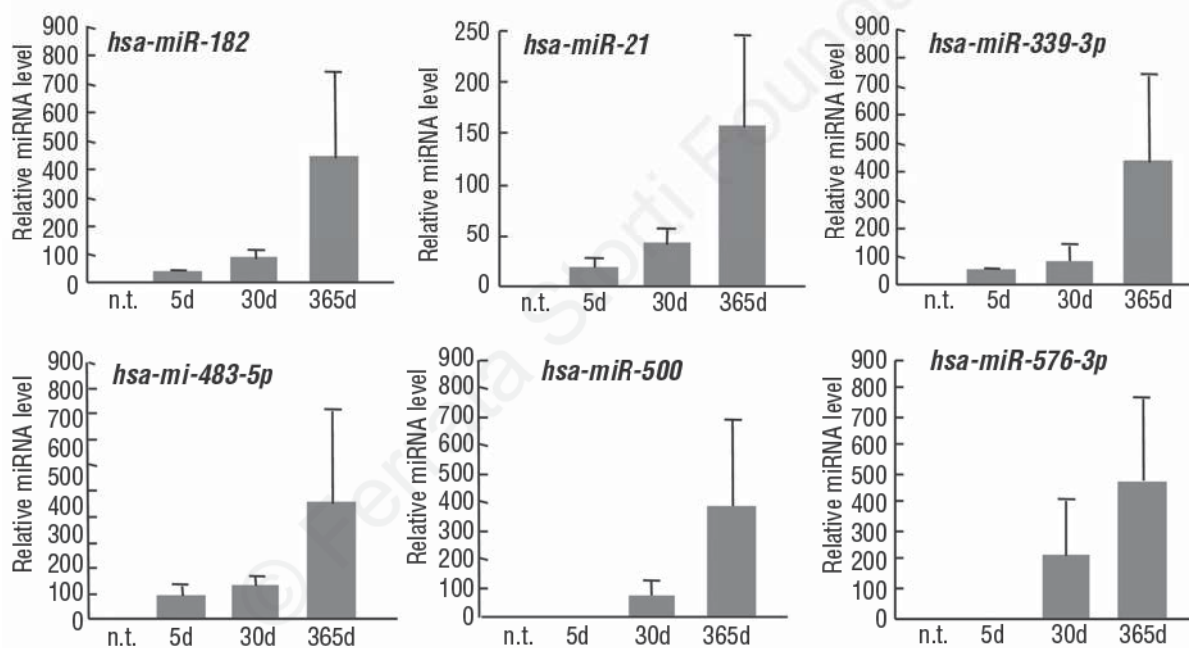
Among all of the differentially expressed genes, 2424 maintained their expression levels from day 5 to 1 year after the treatment with G-CSF; 894 of these genes were up-regulated and 1530 down-regulated as compared to levels in non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells. In order to analyze those genes whose expression levels remained altered at all time-points analyzed, we set a cut-off value of 1.5 above or below the expression of controls. Using this cut-off we identified 617 genes, of which 232 were up-regulated and 385 were down-regulated after mobilization, as compared to levels in the control. Functional analysis of these genes using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com>) showed that these genes were involved in several biological processes such as cancer, gene expression, protein synthesis, cellular growth and proliferation, cell death and survival, cell cycle and hematopoiesis (Table 2).

These results showed that G-CSF alters the expression profiles of genes in mobilized HPC. As for the miRNA, the highest number of up- or down-regulated genes was

observed after 30 days of treatment. Again, most of the changes persisted for at least 1 year after mobilization (Figure 3D).

Furthermore, we compared the gene expression patterns of CD34<sup>+</sup> cells from the peripheral blood of six control subjects, collected before and 30 days after the administration of a vehicle (saline solution). As observed for miRNA, gene expression levels did not vary over time in individual normal subjects (*Online Supplementary Figure S2*).

Finally, in order to validate the high-throughput screening, we confirmed the expression of eight out of these 617 genes (*CCL3L3*, *SCIMP*, *FGF3*, *MAP4K1*, *EEF1A2*, *IRF2BP2*, *BNIP3L* and *RPS27*) by quantitative real-time PCR (Figure 4). These genes were selected because, apart from showing a strong regulation, each of them participates in a different biological process. *CCL3L3* is related to cell proliferation and immune responses, *FGF3* participates in cell growth and proliferation, *SCIMP* is involved in the regulation of antigen presentation or cell activation, *MAP4K1* plays an important role in hematopoiesis and hematologic system



**Figure 2.** Expression levels of differentially expressed miRNA at all three time-points analyzed after G-CSF administration. Differences in miRNA expression at 5, 30, and 365 days (d) relative to the expression in non-treated (n.t.) samples. Statistical significance: \* $P < 0.05$ .

**Table 1.** Differentially expressed miRNA after G-CSF mobilization.

miRNA	Relative expression (log ratio)				Biological process
	Untreated	5 days	30 days	365 days	
hsa-miR-182	-0.92	1.44	3.62	4.07	Cell growth, proliferation and cell cycle
hsa-miR-21	-3.84	0.74	1.68	1.62	
hsa-miR-339-3p	-2.21	1.94	3.05	3.39	Angiogenesis, apoptosis, cell cycle, proliferation, stemness and immune response
hsa-miR-483-5p	-0.92	4.50	5.42	4.75	Angiogenesis, proliferation and cell cycle
hsa-miR-500	-0.87	1.50	3.78	4.07	Immune response and inflammation
hsa-miR-576-3p	-0.92	2.67	4.55	4.07	Translation process

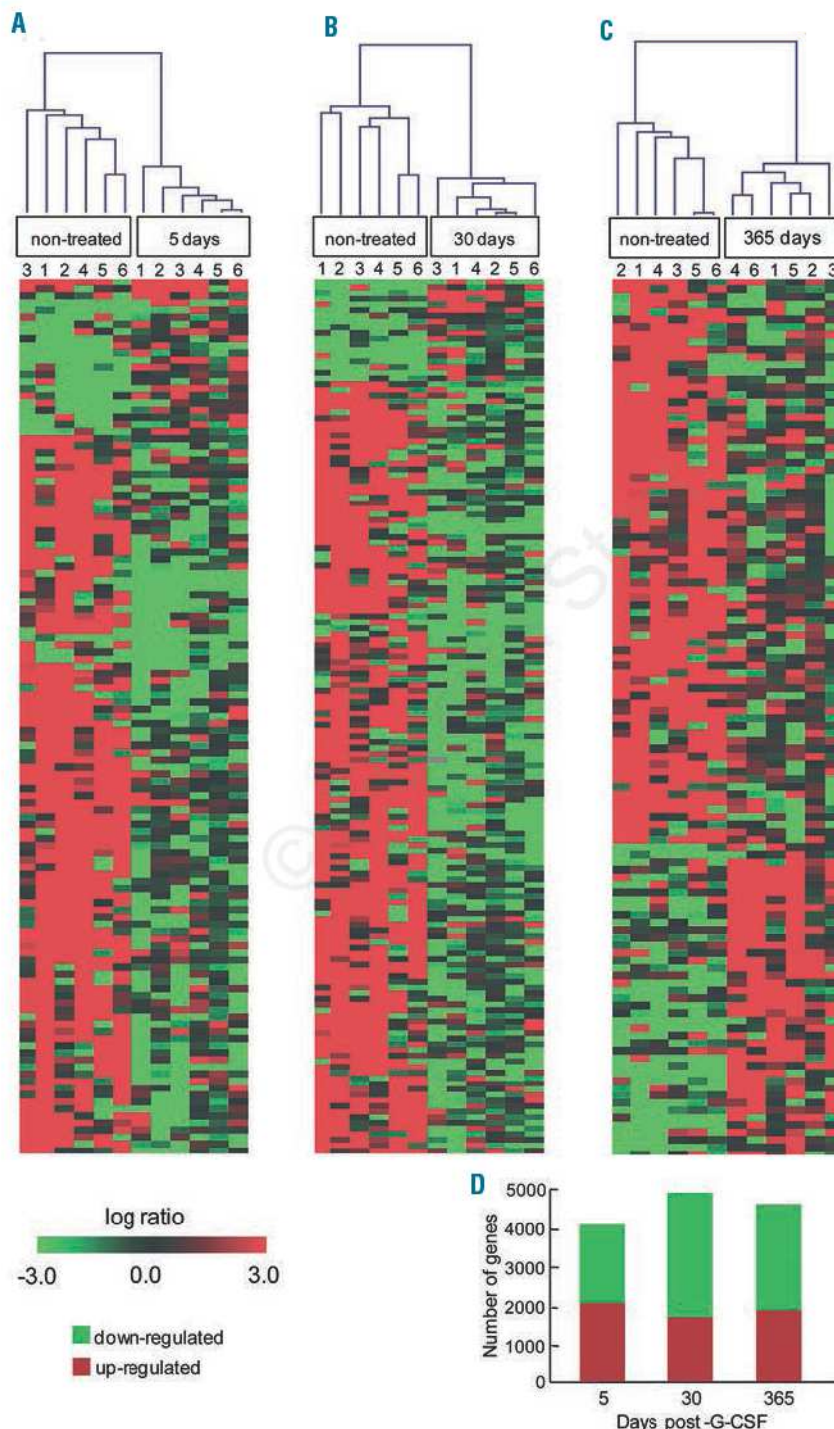
Expression levels of the differentially expressed miRNA at all time-points analyzed after G-CSF mobilization relative to expression in non-treated samples, and biological processes in which they are implicated. Statistical significance:  $P < 0.05$ .

development and function, and *EEF1A2* is a translation elongation factor implicated in cell death and survival. Moreover, *CCL3L3*, *SCIMP*, *FGF3*, *MAP4K1* and *EEF1A2* showed up-regulation post-mobilization and, interestingly, they were even more over-expressed 1 year after mobilization. In addition, *IRF2BP2*, *BNIP3L* and *RPS27* were also selected because, according to the different databases available in internet (<http://www.targetscan.org> and <http://www.mirbase.org>), they are targets of the differentially expressed miRNA identified in the current study. These three genes appeared down-regulated after the treatment as compared to the controls. *IRF2BP2* is a

growth factor and *BNIP3L* is a tumor suppressor that inhibits cell proliferation. Finally, *RPS27* participates in the synthesis of proteins and its down-regulation is related to some hematologic diseases.

## Discussion

The use of G-CSF is considered safe, according to several studies which have not found an increased risk of hematologic diseases among donors exposed to the drug; however, there are no studies analyzing its effects on gene and



**Figure 3.** Unsupervised hierarchical cluster analysis of genes. The analysis was performed with the genes differentially expressed between CD34<sup>+</sup> cells from non-treated samples and at 5 days (A), 30 days (B), and 1 year (C) after G-CSF administration. Each numbered column represents an individual sample and each row represents a single gene. Panels contain representative portions of the respective sets of genes. The red and green color code indicates gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney test. (D) Number of up- and down-regulated genes at the different times after G-CSF administration relative to non-treated samples.



**Table 2.** Differentially expressed genes after G-CSF mobilization.

Top function		Focus Molecules	Down-regulated	Expression Levels	Up-regulated
Diseases and disorders	Cancer	21	AKIRIN2, ATF3, CASP3, CAST, CSNK1E, CXCL2, EGR1, FOS, GNAS, HIF1A, KLF6, NFKBIA, NPM1, PRNP, RRM1, TXNIP		CACYBP, CD82, DUSP2, EIF2AK2, FGF3
	RNA post-transcriptional modification	31	AKAP17A, C1QBP, EXOSC7, FBL, HNRNPK, HNRNPM, INTS10, MBNL1, NPM1, PNN, RBM39, RBMS1, RPL14, RPL26, RPL7, RPS15, RPS27, RPS28, RPS6, RPS7, SNRPC, SNRPD1, SRSF2, SSB, SYNCRIP, TRA2B, WDR55, YTHDC1		APLP1, POLR2A, RNGTT, SNRNP70
	Protein synthesis	41	BCR, CASP3, EEF1B2, EIF1, EIF3D, EIF3K, EIF3L, EIF4B, EIF4H, FOS, GSK3A, HNRNPK, KLF2, NACA, NPM1, PPP1R2, PRNP, RPL13A, RPL17, RPL24, RPL30, RPL37, RPL39, RPS15A, RPS27, RPS29, RPS6, RPS7, SERINC1, SOD1, SSB, SYNCRIP, TNIP1, TNRC6B		APLP1, EEF1A2, EIF2AK2, IGFBP3, LIF, PASK, SNRNP70, WIBG
	Gene expression	109	AES, AKIRIN2, ATF3, BAG1, BCLAF1, BCR, BPTF, BTG3, C14orf166, C1QBP, CBX5, CCNH, CITED2, CSNK1E, DCP1A, DNAJB6, DUSP1, E2F3, EAPP, EGR1, EIF1, EIF3D, EIF3K, EIF3L, EIF4B, EIF4H, FOS, HIF1A, HINT1, HIPK1, HMGN1, HMGN2, HOPX, ID1ID2, IGBP1, IKZF2, ILF2, INPP5D, KLF2, KLF6, KLF9, KPNA2, MATR3, MED26, NACA, NAE1, NDNL2, NFKBIA, NPM1, POLA1, PSIP1, PTGES3, PURB, RBBP6, RBM39, RCOR1, RPL13A, RPL17, RPL24, RPL30, RPL37, RPL39, RPL6, RPS27, RPS29, S1PR1, SAP18, SATB1, SSB, STRAP, SUB1, SUPT4H1, SYNCRIP, TAF6, TCEB1, TDG, TNIP1, TRAF6, TXNIP, UBE2I, VAPA, WRN, YWHAQ, ZMIZ1		APLP1, BHLHE23, CCL3L1, CD3EAP, CD82, CHRM1, EIF2AK2, GPR183, HOXB4, HOXB7, IGFBP3, LIF, MYBL2, NFE2L1, NFIA, PHOX2A, POU3F4, PRKG1, SIK1, SP100, TEAD3, TNFRSF1A, ZNF467, ZNF496
Molecular and cellular functions	Nucleic acid metabolism	19	ATP2A2, ATP5E, ATP5F1, ATP5O, ATP6V0C, CYCS, HIF1A, IMPDH1, MAP1LC3B, MSH6, NT5C2, SLC25A5, SOD1, TXNIP, WRN		ACTC1, AK4, ASK, PPP2R4
	Cellular growth and proliferation	179	ACTB, ADAR, AES, AHNAK, AKIRIN2, AMBRA1, ANXA2, ARF1, ARL2BP, ATF3, ATP2A2, ATP5F1, BAG1, BBC3, BCLAF1, BCR, BNIP3L, BRK1, BTG3, C1QBP, CALCOCO2, CASP3, CAST, CCNH, CCT2, CD69, CDK6, CHKA, CITED2, CNP, CSNK1E, CXCL2, DNAJB6, DUSP1, E2F3, EAPP, EEF1B2, EGR1, EIF1, EIF4B, FBRS, FOS, GNAS, GNE, GNL3, H2AFY, HIF1A, HINT1, HIPK1, HK2, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HNRNPK, HNRNPM, HOPX, HOXA9, HPGDS, ID1, ID2, IGBP1, IGF1R, IKZF2, ILF2, ILKAP, IMPDH1, INPP5D, IRF2PB2, KDM6A, KLF2, KLF6, KLF9, KPNA2, LTB, MCFD2, MLLT3, MSH6, NAA30, NACA, NAE1, NAP1L1, NDE1, NDNL2, NFKBIA, NPM1, NUP98, PNN, POLA1, PRKCSH, PRNP, PSMF1, PTGES3, PTP4A2, RANBP9, RBBP6, RGCC, RHEB, RPL26, RPS15A, RPS6, RRM1, S100A13, S1PR1, SATB1, SKP1, SLC25A5, SLC9A3R1, SMYD3, SOD1, SRSF2, STRAP, SUGT1, TAF6, TCP1, TOP1MT, TRAF6, TSPAN3, TXNDC5, TXNIP, UBC, UBE2E3, UBE2I, WRN, WTAP, YME1L1, YWHAQ, ZMIZ1, ZSCAN18		AK4, ANGPTL6, AVPR1B, AXL, CACNA1A, CACYBP, CCL3L3, CD248, CD82, CHRM1, CKLF, CLDN15, CRHR1, CX3CL1, DBF4B, DPT, DUSP2, EIF2AK2, FGF3, GAPT, GAS2L1, GNG4, GPR183, HOXB4, HOXB7, IGFBP3, IL10RA, LAMA1, LIF, LILRB4, MADD, MAP4K1, MLL3, MMP19, MYBL2, NDRG4, NOP2, PIK3C3, PPP2R1B, PRKG1, PSAP, RERG, SCARB1, SH3BP2, SIK1, SLPI, STAMBP, TAGLN2, TMEFF2, TNFRSF1A, TNFRSF21, TP53I11
	Cell death and survival	21	BAG1, BNIP3L, CASP3, CYCS, E2F3, GNAS, GSK3A, HIF1A, HK2, ID1, ID2, IGF1R, NFKBIA, TXNIP, WTAP		ACTC1, EEF1A2, HLA-B, HOXB4, LIF, TNFRSF1A
	Cell cycle	41	ANXA2, ATF3, BCR, BRCC3, CDK6, CHKA, DUSP1, E2F3, EGR1, FOS, GNL3, GORASP2, HMGN1, ID1, ID2, IGF1R, ILKAP, KLF6, KPNA2, NAE1, NFKBIA, NPM1, POLA1, PRNP, PTGES3, RGCC, RPL7A, RPS6, SRSF2, TCP1, TXNIP, YWHAQ		BRSK2, EIF2AK2, IGFBP3, LIF, MYBL2, POLR2A, PSAP
Physiological system development and function	Hematologic system development and function	42	AES, AHNAK, BCLAF1, BCR, C1QBP, CASP3, CD69, CDK6, CXCL2, DUSP1, EGR1, FOS, HIF1A, HLA-DQB1, HOXA9, HPGDS, ID2, IKZF2, IMPDH1, INPP5D, KLF2, KLF9, MLLT3, NFKBIA, NPM1, NUP98, S1PR1, SATB1, TRAF6, TXNIP		AXL, EIF2AK2, GAPT, GPR183, HOXB7, IL10RA, LILRB4, MAP4K1, SH3BP2, SLPI, TNFRSF1A, TNFRSF21
	Hematopoiesis	14	ADAR, BCR, EGR1, HOXA9, ID1, NFKBIA, NUP98, RCOR1, MAP4K1, SLC37A4		AXL, EIF2AK2, HOXB4, LFNG

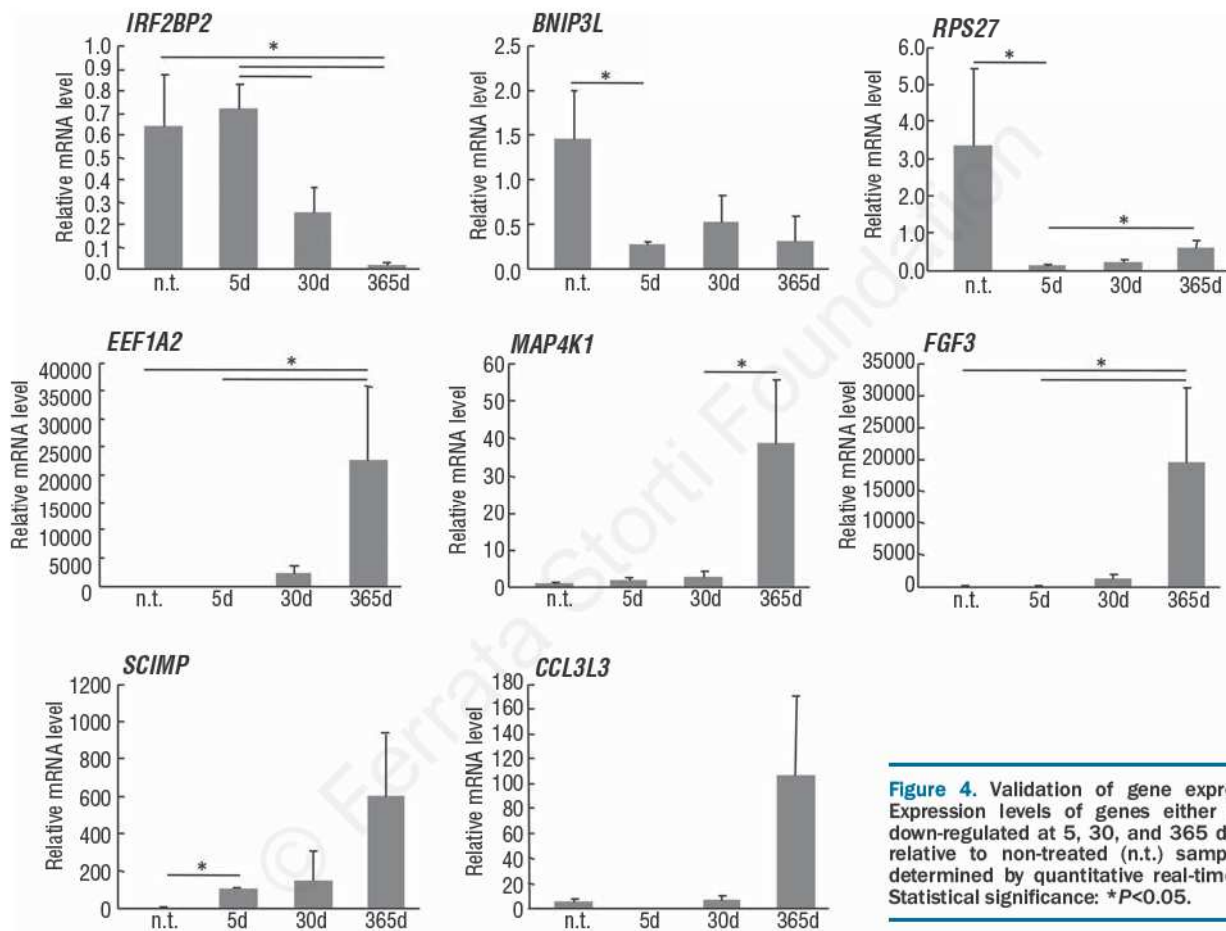
Differentially expressed genes at all time-points analyzed after G-CSF mobilization relative to expression in non-treated samples, and biological processes in which they are implicated. Statistical significance:  $P < 0.05$ .



miRNA expression of mobilized HPC in the long-term. It is already known that the mechanism of action of G-CSF is rather fast in terms of mobilization; in fact, the maximum release of HPC into peripheral blood appears only 5 days after the administration of G-CSF.<sup>21</sup> However, in our study, we observed that G-CSF produces changes much later among HPC and, remarkably, most of these changes persist for a long period of time. In this regard, we found that G-CSF modifies the gene and miRNA expression patterns of HPC even 1 year after its administration.

G-CSF induced the over-expression of most miRNA at

all the different time-points analyzed. Moreover, the levels of expression of six of these miRNA (miR182, miR21, miR339-3p, miR483-5p, miR500 and miR576-3p) remained above the levels of their respective controls for at least 1 year after exposure to G-CSF. Among all of them, miR21, miR182 and miR339-3p may be the most relevant since they play a role as onco-miRNA. Thus, each of these miRNA regulates the expression of hundreds of genes and also targets several tumor suppressor genes, inhibiting their expression.<sup>22-25</sup> miR21 is involved in the control of angiogenesis, apoptosis, cell cycle, proliferation, stemness



**Figure 4.** Validation of gene expression. Expression levels of genes either up- or down-regulated at 5, 30, and 365 days (d) relative to non-treated (n.t.) samples as determined by quantitative real-time PCR. Statistical significance: \**P*<0.05.

**Table 3.** Target genes.

miRNA	Target Genes
hsa-miR-182	ADSS, AHNAK, C20orf24, C6orf106, CBX5, CD69, CDK6, CDV3, CEP135, CITED2, CSNK1E, CYCS, DAZAP2, DNAJB6, DNAJB9, EEF1B2, FBXO33, GMFB, GNE, GNL3, GSK3A, HK2, HOXA9, IGF1R, INTS10, IRF2BP2, KDELR1, KDM6A, MAP1LC3B, MCFD2, MPP1, MYO9A, NAA30, NAP1L1, NPM1, NUP43, PMPCB, PPP1R2, PSMD3, PSMF1, RAB34, RAD23B, RANBP2, RGPD8, SH3BGRL, SYNCRIP, TAPT1, TKT, TMEM230, WHSC1L1, WIPI2, ZNF706
hsa-miR-21	AMBRA1, ARMCX1, ARMCX5, ATP2A2, ATXN10, BDH2, BRCC3, CD69, CDK6, DNAJB9, E2F3, FAM156A/FAM156B, GNL3, IRF2BP2, KLF6, LARP1B, LTV1, MATR3, MBNL1, PURB, RAB21, RBMS1, REPS1, RNF103, RPS15, RSRFC2, SATB1, SCRN1, STK40, TNRC6B, TSPAN3, UQCRB, WHSC1L1, YOD1, YPEL5
hsa-miR-339-3p	BDH2, CLASRP, DNAJB6, ID1, IGF1R, POLR3F
hsa-miR483-5p	AIPNL, BNIP3L, CDKN2, CXXC5, GNE, HYPK, IDS, IER2, KLF9, RAD23B, REPS1, RPL31, STK40
hsa-miR-500	ATP5F1
hsa-miR-576-3p	ARL2BP, ATP2A2, ATP6V0A1, BCLAF1, BNIP3L, BRCC3, BZW1, CBX5, CDV3, HS1BP3, KDM6A, KLF9, LAPTMYA, MED26, MMGT1, MPP1, MRPL43, PCNP, PGAM1, RCOR1, RPL37, RPS27, SRSF2, YWHAQ

Differentially expressed genes after G-CSF treatment regulated by the differentially expressed miRNA. All these genes were down-regulated in our analysis.

and immune response<sup>26,27</sup> and is frequently over-expressed in human cancers such as breast cancer, glioma, colorectal cancer, and hepatocellular carcinoma as well as hematologic malignancies.<sup>28</sup> miR182 and miR339-3p regulate cell growth, proliferation and cell cycle<sup>29-31</sup> and their over-expression has also been described in several hematologic diseases.<sup>32</sup> miR483-5p, miR500 and miR576-3p are involved in the processes of angiogenesis, cell cycle and immune response.<sup>33</sup> Our data raise the questions of whether the sustained over-expression of these miRNA induced by G-CSF could lead to modifications in any of these biological processes and whether or not this has any clinical implication.

On the other hand, G-CSF produced changes in protein-encoding gene expression levels at all time-points analyzed during the follow up. In our study we identified 617 genes with a greater modification in their expression levels after treatment. These genes are involved in several biological processes such as cancer, gene expression, protein synthesis, nucleic acid metabolism, cellular growth and proliferation, cell death and survival, hematopoiesis and hematologic system development and function. Of note, among all of them we found some interesting genes related to hematologic diseases; 11 of these genes were down-regulated after G-CSF mobilization (*BCR*, *CASP3*, *CXCL2*, *EGR1*, *FOS*, *HIF1A*, *HOXA9*, *NFKB1A*, *NPM1*, *NUP98* and *TXNIP*) and three were up-regulated (*AXL*, *EIF2AK2* and *MAP4K1*). BCR inhibits BCR-ABL oncogenic effects in chronic myeloid leukemia,<sup>34</sup> and it also participates in the regulation of cell cycle and gene expression. *CASP3* plays an important role in apoptosis and it is used as a prognostic marker for hematologic diseases such as chronic myeloid leukemia and B-cell lymphoma.<sup>35</sup> *CXCL2* encodes for a chemokine involved in neutrophil proliferation and migration during an immune response.<sup>36</sup> *EGR1* is a cancer suppressor gene that participates in cell differentiation and mitogenesis.<sup>37</sup> *FOS* encodes for a regulator of cell proliferation, differentiation, and transformation. In some cases, expression of the *FOS* gene has also been associated with apoptotic cell death.<sup>38</sup> The *HIF1A* encoded protein functions as a regulator of cellular and systemic homeostatic response to hypoxia by activating transcription of many genes, including those involved in energy metabolism, angiogenesis, apoptosis, and other genes whose protein products increase oxygen delivery or facilitate metabolic adaptation to hypoxia.<sup>39</sup> *HOXA9* is a homeobox gene encoding for a DNA-binding transcription factor which may regulate gene expression, differentiation, leukemogenesis and hematopoiesis.<sup>40</sup> *NFKB1A* encodes for a member of the NF-kappa-B inhibitor family and it is involved in inflammatory responses and tumor growth upon down-regulation.<sup>41</sup> *NPM1* is involved in several processes includ-

ing regulation of the ARF/p53 pathway and tumor progression.<sup>42</sup> *NUP98* is a potential tumor suppressor gene found to be rearranged with many other genes in human hematologic malignancies.<sup>43</sup> *TXNIP* is also a tumor suppressor gene and it plays a pivotal role in the maintenance of hematopoietic cells.<sup>44</sup> *AXL* encodes for a tyrosine kinase receptor involved in several cellular functions including growth, migration, aggregation and anti-inflammation in multiple cell types.<sup>45</sup> The activated form of the *EIF2AK2* encoded protein can inhibit protein synthesis giving rise to various diseases<sup>46</sup> and *MAP4K1* is principally expressed in hematopoietic cells and is known to regulate stress responses, apoptosis and cell proliferation in cancer cells.<sup>47</sup>

Interestingly, among the 617 genes identified in our study, 109 were targets of the six miRNA over-expressed from day 5 to 1 year post-mobilization. To note, all these 109 genes were found to be down-regulated in our analysis (Table 3). Based on the information contained in the aforementioned databases, it is conceivable that the down-regulation of these 109 genes could be related to the over-expression of their corresponding regulatory miRNA.

Finally, when we validated some of the significant genes by quantitative real-time PCR, we confirmed that the G-CSF produced changes to the gene expression of HPC and, interestingly, some of these changes were even greater 1 year after the mobilization. Moreover, three of these validated genes were down-regulated after treatment and were targets of the differentially over-expressed miRNA.

From the information currently available in the literature,<sup>56</sup> we can assume that the administration of growth factors to healthy donors is safe; nevertheless, the potential effect in the long-term of these novel findings will require longer follow-up of larger series of donors.

In summary, we conclude that G-CSF modifies gene expression profiles and miRNA of HPC from healthy donors. These changes were observed from early time-points and most of them persisted for at least 1 year after exposure to the drug.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Francisco de Paula, Joaquín Alcántara, Dr Ricardo Pardo and M. José Castro for the technical assistance provided.

#### Funding

This work was supported by a grant from the Consejería de Salud (PI0079) of Junta de Andalucía.

#### Authorship and Disclosures

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](http://www.haematologica.org).

## References

- Abrams RA, Glaubiger D, Appelbaum FR, Deisseroth AB. Result of attempted hematopoietic reconstitution using isologous peripheral blood mononuclear cells: a case report. *Blood*. 1980;56(3):516-20.
- Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol*. 1986;14(3):192-6.
- Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supra-lethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol*. 1985;61(4):739-45.
- Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Flidner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood*. 1986;67(2):529-32.
- Hölig K, Kramer M, Kroschinsky F, Bornhäuser M, Mengling T, Schmidt AH, et al. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. *Blood*. 2009;114(18):3757-63.
- de la Rubia J, de Arriba F, Arbona C, Pascual MJ, Zamora C, Insunza A, et al. Follow-up of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor for peripheral



- blood progenitor cell mobilization and collection. Results of the Spanish Donor Registry. *Haematologica*. 2008;93(5):735-40.
7. Mielcarek M, Storer B, Martin PJ, Forman SJ, Negrin RS, Flowers ME, et al. Long-term outcomes after transplantation of HLA-identical related G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow. *Blood*. 2012;119(11):2675-8.
  8. Semerad CL, Christopher M, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 2005;106(9):3020-7.
  9. Levesque JF, Hendy J, Takamatsu Y. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol*. 2002;30(5):440-9.
  10. Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC. The granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for the mobilization of murine hematopoietic progenitors into peripheral blood by cyclophosphamide or interleukin-8 but not flt-3 ligand. *Blood*. 1997;90(7):2522-8.
  11. Pruijt JF, Verzaal P, Van-oss R. Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(9):6228-33.
  12. Pelus LM, Bian H, King AG. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRO beta/CXCL2 and GRObeta1/CXCL2 delta4. *Blood*. 2004;103(1):110-9.
  13. Levesque JF, Takamatsu Y, Nilsson SK. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 2001;98(5):1289-97.
  14. Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler Jc, Koprunner M, Dorries J, Dea M. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*. 2002;111(5):647-59.
  15. Jin P, Wang E, Ren J, Childs R, Won Shin J, Khuu H, et al. Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med*. 2008;6:39.
  16. Donahue RE, Jin P, Bonifacio AC, Metzger ME, Ren J, Wang E, et al. Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures. *Blood*. 2009;114(12):2530-41.
  17. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.
  18. Naglera A, Korenstein-Ilanb A, Amielc A, Avivib L. Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells. *Exp Hematol*. 2004;32(1):122-30.
  19. Hernández JM, Castilla C, Gutiérrez NC, Isidro IM, Delgado M, de las Rivas J, et al. Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. *Leukemia*. 2005;19(6):1088-91.
  20. Amariglio N, Jacob-Hirsch J, Shimoni A, Leiba M, Rechavi G, Nagler A. Changes in gene expression pattern following granulocyte colony-stimulating factor administration to normal stem cell sibling donors. *Acta Haematol*. 2007;117(2):68-3.
  21. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1997;89(7):2233-58.
  22. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008;18(3):350-9.
  23. Ge TT, Liang Y, Fu R, Wang GJ, Ruan EB, Ou W, et al. Expressions of miR-21, miR-155 and miR-210 in plasma of patients with lymphoma and its clinical significance. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012;20(2):305-9.
  24. Li S, Liang Z, Xu L, Zou F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem*. 2012;360(1-2):147-58.
  25. Jiang L, Mao P, Song L, Wu J, Huang J, Lin C, et al. miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival. *Am J Pathol*. 2010;177(1):29-38.
  26. Xiong Q, Zhong Q, Zhang J, Yang M, Li C, Zheng P, et al. Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2012;11(4):2078-90.
  27. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 $\alpha$  expression. *PLoS One*. 2011;6(4):e19139.
  28. Knichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. 2009;13(1):39-53.
  29. Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, et al. MiR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol*. 2012;228(2):204-15.
  30. Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011;41(2):210-20.
  31. Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, Fujita M, Zhu X, Kastenhuber ER, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(26):10746-51.
  32. Chigrinova E, Mian M, Shen Y, Greiner TC, Chan WC, Vose JM, et al. Integrated profiling of diffuse large B-cell lymphoma with 7q gain. *Br J Haematol*. 2011;153(4):499-503.
  33. Qiao Y, Ma N, Wang X, Hui Y, Li F, Xiang Y, et al. MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett*. 2011;585(19):3095-100.
  34. Perazzone B, Lin H, Sun T, Wang Y, Arlinghaus R. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene*. 2008;27(15):2208-14.
  35. Provencio M, Martín P, García V, Candia A, Sánchez AC, Bellas C. Caspase 3a: new prognostic marker for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(11):2021-30.
  36. Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, Kobayashi T, Abo T. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology*. 2012;136(4):448-58.
  37. Gibbs JD, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia. *Oncogene*. 2008;27(1):98-106.
  38. Lee SY, Yoon J, Lee MH, Jung SK, Kim DJ, Bode AM, et al. The role of heterodimeric AP-1 protein comprised of JunD and c-Fos proteins in hematopoiesis. *J Biol Chem*. 2012;287(37):31342-8.
  39. Gibbs BF, Yasinska IM, Pchejetski D, Wyszynski RW, Sumbayev VV. Differential control of hypoxia-inducible factor 1 activity during pro-inflammatory reactions of human haematopoietic cells of myeloid lineage. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(11):1739-49.
  40. Ohno Y, Yasunaga S, Janmohamed S, Ohtsubo M, Saeki K, Kurogi T, et al. Hoxa9 transduction induces hematopoietic stem and progenitor cell activity through direct down-regulation of geminin protein. *PLoS One*. 2013;8(1):e53161.
  41. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16639-47.
  42. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, Della Porta MG, et al. Marked down-regulation of nucleophosmin-1 is associated with advanced del(5q) myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2011;155(2):272-4.
  43. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*. 2011;118(24):6247-57.
  44. Jung H, Kim MJ, Kim DO, Kim WS, Yoon SJ, Park YJ, et al. TXNIP maintains the hematopoietic cell pool by switching the function of p53 under oxidative stress. *Cell Metab*. 2013;18(1):75-85.
  45. Park IK, Mishra A, Chandler J, Whitman SP, Marcucci G, Caligiuri MA. Inhibition of the receptor tyrosine kinase Axl impedes activation of the FLT3 internal tandem duplication in human acute myeloid leukemia: implications for Axl as a potential therapeutic target. *Blood*. 2013;121(11):2064-73.
  46. Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, Clissa C, Bosi C, Martinelli G, et al. PKR is activated in MDS patients and its subcellular localization depends on disease severity. *Leukemia*. 2008;22(12):2267-9.
  47. Chen-Deutsch X, Studzinski GP. Dual role of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) as a positive regulator of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D-induced differentiation and cell cycle arrest of AML cells and as a mediator of vitamin D resistance. *Cell Cycle*. 2012;11(7):1364-73.

### **Artículo 3. Las células B de memoria CD27<sup>+</sup> muestran cambios en los patrones de expresión génica en función de la edad del sujeto**

Los LBM constituyen una de las estirpes celulares de más larga vida media, permaneciendo viables en estado no proliferativo durante años, a diferencia de otras células de vida más corta como los LBN. Los individuos de edad avanzada poseen menor cantidad de LBM y producen menos anticuerpos; como consecuencia, su sistema inmune se vuelve menos eficiente. Debido a su longevidad, el LBM podría ser clave para el estudio de numerosas hemopatías relacionadas con la edad. Con estos antecedentes, quisimos analizar los patrones de expresión génica de LBM frente a LBN tanto en sujetos jóvenes como mayores, con el fin de identificar genes relacionados con la longevidad de los LBM que pudieran alterarse en la población añosa y relacionarse con un mayor riesgo de desarrollar determinadas neoplasias linfoides.

A partir de 14 *buffy coats* de donantes sanos: 7 jóvenes (20-25 años) y 7 de edad más avanzada (60-70 años), se obtuvieron células mononucleadas mediante centrifugación por gradiente de densidad, y a partir de ellas se aislaron LBN CD27<sup>-</sup> y LBM CD27<sup>+</sup> mediante separación inmunomagnética. Para inmunofenotipar todas las muestras por citometría de flujo antes y después del aislamiento de las células B, se incubaron con los anticuerpos monoclonales IgG-FITC, IgG/IgA-PE, CD19-PERCP, CD10/CD25-PECy7, CD27-APC, CD38-APCH7, CD20/CD45-PACB, CD45-PACO. Las células muertas fueron descartadas del análisis, el cual se realizó con el programa Infinicit 1.7. La pureza del aislamiento de los LBN y LBM fue en todos los casos superior al 95%. A continuación se extrajo el ARN de todas las muestras de LBN CD27<sup>-</sup> y LBM CD27<sup>+</sup>, y se analizó la expresión de todo el genoma usando los arrays *Whole Human Genome 4x44K oligo microarray kit*. Los valores de expresión génica se obtuvieron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Con los datos de expresión se realizaron análisis jerárquicos no supervisados empleando el método de la distancia Euclídea y para identificar los genes expresados diferencialmente entre los distintos grupos experimentales de células B se aplicó el test estadístico no paramétrico *U de Mann Whitney*. Se consideraron significativos los genes con un valor  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa *Multiexperiment Viewer 4.7.1* y la funcionalidad de los genes de interés se determinó a partir de distintas bases de datos disponibles en internet.

Al comparar los inmunofenotipos de las muestras de SP de donantes jóvenes frente a los de edad avanzada, observamos diferencias significativas en la proporción de células inmaduras, LBN, LBM y PB entre los dos grupos de edad. Sin embargo, cuando estudiamos

las posibles diferencias en las Ig de superficie (IgM, IgA, and IgG) entre los LBM aislados de jóvenes y mayores no observamos diferencias significativas; lo mismo ocurría con las Ig de superficie (IgA e IgG) en los LBN aislados de los dos grupos de edad.

Para poder identificar genes implicados en la longevidad de los LBM, comparamos los perfiles de expresión de los LBM y LBN. En los donantes jóvenes se identificaron 3037 genes expresados diferencialmente entre ambas subpoblaciones, y en mayores 1567. Por otro lado, para evaluar el efecto de la edad sobre las dos poblaciones linfocitarias, comparamos los patrones de expresión de ambos grupos de edad en LBM y LBN. Curiosamente, en la población de LBN no se encontraron diferencias significativas entre sujetos jóvenes y añosos, mientras que en LBM se identificaron 925 genes expresados diferencialmente entre los donantes jóvenes y los de edad más avanzada. Finalmente, se buscaron genes expresados diferencialmente en LBM de donantes de mayor edad respecto a jóvenes y LBN de mayor edad. En este caso encontraron 193 genes que participan en rutas relacionadas con señalización de IL-8, HMGB1 y PEDF, y activación de NF-KB, entre otros. De los 193 genes identificados, validamos algunos de interés por qRT-PCR y por *Western Blot*. De este modo pudimos confirmar que existen diferencias significativas en la expresión génica de LBM y LBN, y además identificamos algunos genes expresados diferencialmente en LBM en sujetos de edad avanzada.

# The CD27<sup>+</sup> memory B cells display changes in the gene expression pattern in elderly individuals

Alicia Báez, Isabel Álvarez-Laderas,  
José I. Piruat, Teresa Caballero-  
Velázquez, María Victoria Barbado,  
África Millán-Uclés, Mayte  
Medrano, Estefanía  
García-Guerrero, Luis Ignacio  
Sánchez-Abarca and José Antonio  
Pérez-Simón

*Haematology Department, Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain*

doi:10.1111/imm.12381

Received 3 June 2014; revised 30 July 2014;  
accepted 27 August 2014.

Correspondence: Dr José Antonio Pérez-Simón, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/CSIC/Universidad de Sevilla, Avenida de Manuel Siurot s/n 41013 Sevilla, Spain.

Email: josea.perez.simon.sspa@

juntadeandalucia.es

Senior author: José Antonio Pérez-Simón

## Summary

Memory B cells (MBCs) have a long lifespan compared with naive B cells (NBCs), remaining viable for years. This could predispose them to suffer misbalances in the gene expression pattern in the long term, which might be involved in the development of age-related B-cell disorders. In order to identify genes whose expression might change during life, we analysed the gene expression patterns of CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs in young and old subjects. Using microarray assays we observed that the expression pattern of CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs is significantly different. Furthermore, to evaluate the age effect, we compared the gene expression pattern of young versus aged subjects in both cell populations. Interestingly, we did not find significant differences in the CD27<sup>-</sup> NBC population between young and aged individuals, whereas we found 925 genes differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs. Among these genes, 193 were also differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs compared with CD27<sup>-</sup> NBCs, most of them involved in cell survival, cell growth and proliferation, cellular development and gene expression. We conclude that gene expression profiles of CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs are different. Moreover, whereas the gene expression pattern of CD27<sup>+</sup> MBCs varies with age, the same does not happen in CD27<sup>-</sup> NBCs. This suggests that MBCs undergo time-dependent changes, which could underlie a higher susceptibility to dysfunction with age.

**Keywords:** B-cell disorders; cell survival; longevity

## Introduction

Long-term humoral immunity is provided by long-lived antibody-secreting plasma cells that reside mainly in the bone marrow, and memory B cells (MBCs) that reside in secondary lymphoid organs.<sup>1</sup> MBCs remain viable as non-proliferating cells for long periods of time, indicating that they have enhanced mechanisms of survival compared with naive B cells (NBCs).<sup>2</sup> Factors supporting MBCs survival remain poorly characterized. In this regard, members of the tumour necrosis factor family, specifically BAFF (B-cell-activating factor of the tumour necrosis factor family) and APRIL (a proliferation-inducing ligand), have been implicated in MBCs survival, but their precise role in supporting post-germinal centre

B-cell differentiation and survival is still unresolved.<sup>3</sup> MBCs also express higher levels of anti-apoptotic factors such as Bcl-2, A1 and Mcl-1, compared with NBCs.<sup>2</sup> At the molecular level, microarray assays of human B cells have identified some differences in the gene expression patterns between NBCs and MBCs.<sup>4-6</sup>

On the other hand, defects in haematopoietic stem cell biology involving B lymphopoiesis have been described during aging, including failures in telomere maintenance,<sup>7,8</sup> abnormal epigenetic modifications<sup>9</sup> and impaired ability to generate a naive young-like B-cell repertoire.<sup>10</sup> Both total and relative amount of mature B cells significantly decrease in peripheral blood with age. The same holds for immunoglobulin class switch in human B cells.<sup>11,12</sup> As a consequence, there is a collapse in B-cell

Abbreviations: MBCs, memory B cells; MM, multiple myeloma; NBCs, naive B cells; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction



diversity in the elderly population, which might correlate with poor health status.<sup>13</sup> In addition, *in vitro* studies have described that B cells from aged individuals produce lower amounts of antibody in response to seasonal influenza vaccines compared with B cells from young adults, and antibodies from aged individuals are relatively ineffective in neutralizing influenza virus.<sup>14</sup> Hence, in aged individuals episodes of immunization become less efficient in terms of quantity and quality.<sup>15</sup>

Studies in mice have also shown that impaired B-cell generation in aged individuals is associated with reduced B-cell progenitor frequencies,<sup>16</sup> diminished proliferative potential,<sup>17</sup> decreased interleukin-7 production<sup>18</sup> and impaired V-DJ rearrangement.<sup>19</sup> Furthermore, several haematological malignancies involving B-cell lineage, such as non-Hodgkin lymphomas, chronic lymphocytic leukaemia or multiple myeloma (MM), are increasingly common in the aging population. Accordingly, it would be of paramount importance to identify genes that are differentially expressed in B cells in young versus elderly individuals. Moreover, considering the long-term viability of MBCs, this subset of cells could present imbalances or suffer from abnormalities that might be involved in the development of age-related diseases, including B-cell malignancies, to a greater extent than other short-lived subpopulations. For this reason, in the current study we have analysed the different gene expression pattern of CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs in both young and elderly people in an attempt to identify factors involved in age related B-cell memory performance.

## Material and methods

### Samples

Total B cells were isolated from buffy coats of 14 volunteer healthy donors, seven young donors (age range: 20–25 years) and seven elderly donors (age range: 60–65 years). All samples were obtained from the regional centre of blood donation of the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain). The local ethics committee provided institutional review board approval for this study, and informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Isolation of B cells

Peripheral blood mononuclear cells from buffy coats were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque solution (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The isolation of CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs was performed in a two-step procedure by immunomagnetic sorting in an AutoMACS pro separator using the Memory B-cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch

Gladbach, Germany). First, magnetic labelling of non-B cells with Biotin-Antibody Cocktail (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 and CD235a) was performed and the negative fraction containing all B cells was retained. In a second step, direct magnetic labelling of this negative fraction with anti-CD27 conjugated MicroBeads was performed to obtain the positive fraction containing CD27<sup>+</sup> MBCs. From this step a CD27-negative fraction containing most of the NBCs was also obtained.

The purity of the isolated CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs samples was > 90% in all cases as demonstrated by flow cytometry in Figs S1 and S2 (see Supporting information).

### Flow cytometry

Samples before and after B-cell isolation were incubated with the monoclonal antibodies IgG-FITC, IgG/IgA-PE, CD19-PERCP, CD10/CD25-PECy7, CD27-APC, CD38-APCH7, CD20/CD45-PACB, CD45-PACO (Becton Dickinson, San Jose, CA) for 15 min in darkness and at room temperature. Populations were selected based on the intensity of antibodies as well as forward and side scattered components. Dead cells were discarded for further analyses. Flow cytometric analysis was performed with a FACScanto II cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using FACSDIVA 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA). For data analysis INFINICIT 1.7 (Cytognos SL, Salamanca, Spain) software was used.

### RNA extraction

Total RNA was extracted in CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs samples using the AllPrep DNA/RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quality and integrity of the RNA was verified by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). An RNA integrity number > 7.5 was required for further analyses of gene expression profiling.

### Gene expression

We analysed the expression profile of the whole genome in CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs samples using the Whole Human Genome Oligo microarray kit 4 × 44K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Total RNA (200 ng) was transcribed into cRNA and labelled with the Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). The quality and integrity of the cRNA was verified by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Every experimental sample was cyanine 5-labelled and hybridized against a pool of samples using cyanine 3-labelled CD27<sup>-</sup> NBCs as reference group. Microarrays were scanned in a GenePix reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### Validation of significant genes

The expression of significant genes was validated by quantitative real-time (qRT-) PCR in the same samples of CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs used in microarrays and in different samples: three CD27<sup>-</sup> NBC samples from old donors, three CD27<sup>+</sup> MBC samples from young donors and three CD27<sup>+</sup> MBC samples from elderly donors. The qRT-PCR were performed in a 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using Quantitec Primer Assays and the Quantitec SYBR green Kit (both from Qiagen). Data were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -ACTIN. The relative gene expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### Western blot

For protein preparation, CD27<sup>+</sup> MBCs samples from young donors and elderly donors and CD27<sup>-</sup> NBCs samples from old donors were homogenized in ice-cold 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.3), containing 2 mM dithiothreitol, 1% amidosulphobetaine, 1% nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF (Sigma Aldrich, St Louis, MO) and 10% protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Homogenized samples were incubated at 4° for 30 min and then centrifuged at high speed in a microcentrifuge. Protein-containing supernatant was collected. Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid protein assay protein kit (reducing agent compatible; Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). From each sample, 15 µg of protein was separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto PVDF membranes. Blots were incubated in TTBS blocking solution (2% BSA, in Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20), followed by overnight incubation at 4° with the following antibodies: anti-Akt (9272; Cell Signaling, Danvers, MA), anti-Mapk1/Mapk2 (ab4819; Abcam, Cambridge, UK) and anti- $\beta$ -Actin (ab6276; Abcam). The membranes were then washed with TTBS and incubated with either a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (711-035-152; Jackson Immuno Research, Baltimore, MD) or horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (715-035-150; Jackson Immuno Research, Baltimore, MD). Antibody detection was performed with an enhanced chemiluminescence reaction (Western blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, sc-2048).

### Statistical analysis

Microarray background subtraction and data normalization were carried out by the *normexp* method and Loess algorithm, respectively by using the R version 3.1.0 software package (Revolution Analytics Limited Europe,

London, UK). Unsupervised hierarchical clusters of samples based on the gene expression data were performed using the average linkage and the Euclidean distance methods in the MULTI-EXPERIMENT VIEWER 4.7.1 software (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). To identify differentially expressed genes between experimental groups we applied non-parametric Mann-Whitney *U*-test. Those genes with a *P*-value < 0.05 were considered significant. Expression values are indicated as the logarithm of the ratio between the two fluorescent signals. The functional analysis of the genes of interest was performed with the INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS (<http://www.ingenuity.com>) and GENE ONTOLOGY (<http://www.geneontology.org/>) software.

## Results

### Immunophenotype of B cells from the experimental groups

To assess the representation of immature and mature B cells in every sample from young and old individuals we immunophenotyped them by flow cytometry before the separation of CD27<sup>-</sup> naive and CD27<sup>+</sup> memory populations. Since MBCs are a heterogeneous population, we selected the CD27<sup>+</sup> subset of MBCs. We observed significant differences between immature (CD10<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>), CD27<sup>-</sup> naive (CD10<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>) and CD27<sup>+</sup> memory B (CD10<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) cells of both age groups. Interestingly, older individuals seem to have a greater number of MBCs than young donors (see Supporting information, Fig. S1).

Furthermore, with the aim of testing possible differences in surface immunoglobulins between groups, we labelled the isolated CD27<sup>+</sup> MBCs (CD19<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) with anti-immunoglobulin heavy chain antibodies (IgM, IgA and IgG). We did not observe significant differences in the proportion of each immunoglobulin-expressing CD27<sup>+</sup> MBCs between young and old individuals (see Supporting information, Fig. S2).

Likewise, we also studied the proportion of IgA and IgG in all CD27<sup>-</sup> NBCs samples (CD19<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>) from young and elderly individuals. As in CD27<sup>+</sup> MBCs, we observed in all samples higher expression levels of IgG than IgA, and did not find significant differences between both age groups (see Supporting information, Fig. S3).

### Gene expression of CD27<sup>-</sup> naive versus CD27<sup>+</sup> memory B cells

To identify genes that might be involved in the longevity of MBCs, a high-throughput gene expression analysis was performed comparing CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs from peripheral blood of healthy donors. For this pur-



pose, we performed microarray hybridization of total RNA. Unsupervised hierarchical clustering of samples based on the individual gene expression profiles clearly identified two differentiated groups, irrespective of donor age, corresponding to the CD27<sup>-</sup> NBCs and the CD27<sup>+</sup> MBCs, respectively. To identify differentially expressed genes a non-parametric Mann–Whitney *U*-test was applied. Those genes with a *P*-value < 0.05 were considered significant. Two differentiated groups, corresponding to CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs, were also identified when samples were studied separately in young (3037 genes differentially expressed) and old healthy donors (1567 genes differentially expressed). These results are shown in Fig. 1(a,b) respectively. In both age groups we could find the marker CD80 among the differentially expressed genes between CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs, which appeared induced in CD27<sup>+</sup> MBCs (0.32 ± 0.12 and 0.21 ± 0.09, in old and young donors, respectively) with respect to CD27<sup>-</sup> NBCs (-0.14 ± 0.11 and -0.09 ± 0.06, in old and young donors, respectively).

#### Effect of age on CD27<sup>-</sup> naive and CD27<sup>+</sup> memory B cells

To evaluate the effect of age on these two subpopulations of B cells, we analysed gene expression patterns of both CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs separately, in young versus aged individuals.

Remarkably, unsupervised paired hierarchical clustering comparing CD27<sup>-</sup> NBCs obtained from young versus aged individuals did not identify different subgroups (data not shown). In contrast, when we analysed the gene expression pattern of CD27<sup>+</sup> MBCs from young and aged population, two clusters were clearly differentiated in unsupervised analysis, one including CD27<sup>+</sup> MBCs obtained from young and the other from aged individuals. Upon comparing both subpopulations, 925 genes were differentially expressed (Fig. 2) using a non-parametric Mann–Whitney test. Next, we searched among those genes differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs from aged donors that were also differentially expressed compared with CD27<sup>-</sup> NBCs from the same age group. With this approach, we identified 193 genes (see Supporting information, Table S1) which were subsequently analysed in INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS software (<http://www.ingenuity.com>).

These 193 genes are involved in several biological processes, such as cellular growth and proliferation, cellular development and movement, gene expression, as well as pathophysiological phenomena such as cancer, haematological diseases and normal haematological system development and function (Table 1).

In addition, these 193 genes participate in several canonical pathways, the most significant being: molecular

mechanism of cancer, interleukin-8 signalling, high-mobility group box-1 signalling, pigment epithelium-derived factor signalling and nuclear factor-κB activation (Table 2).

#### Validation of significant genes

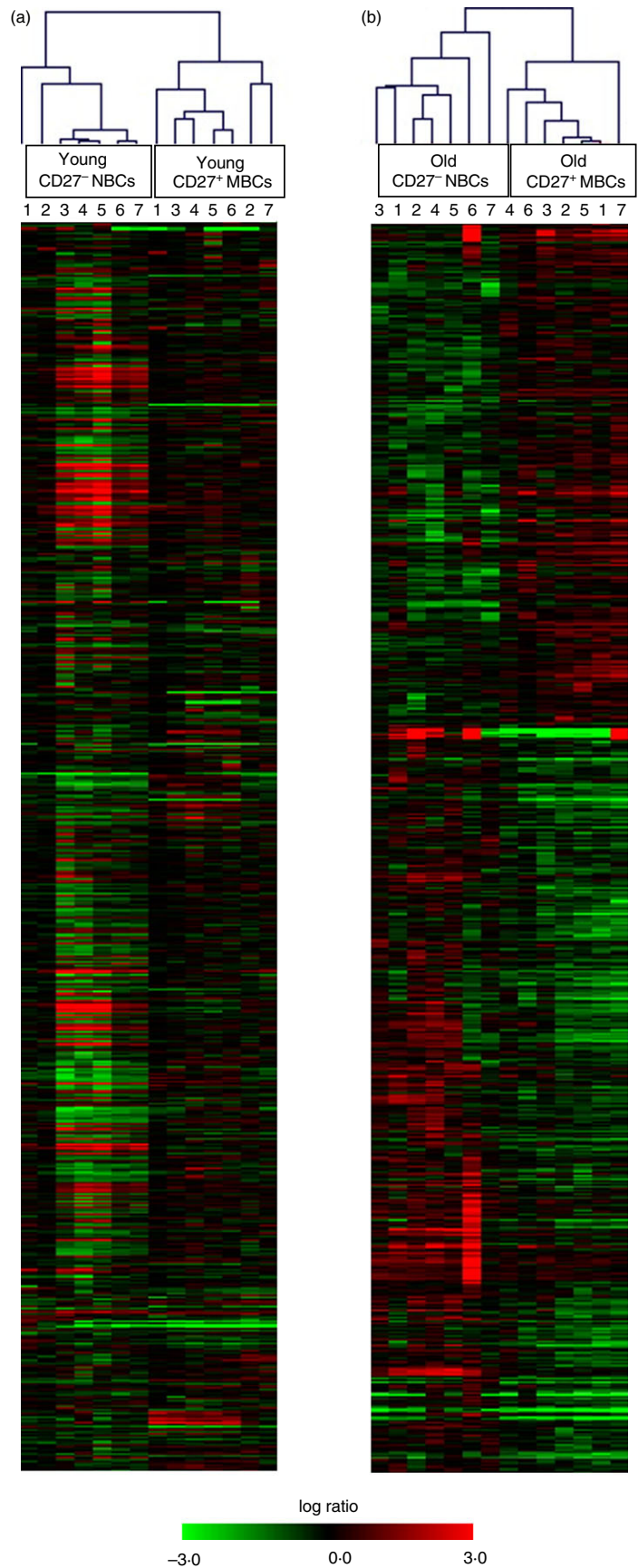
To validate our high-throughput screening, we confirmed by qRT-PCR the expression of several of the identified genes, *AKT1*, *BCL2*, *HRAS*, *ITGB2*, *ITGB3*, *JUN*, *MAPK1* and *NFKB1*. All of these genes were chosen because they are representative of the canonical pathways that are differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs from elderly individuals compared with CD27<sup>+</sup> MBCs from young donors and CD27<sup>-</sup> NBCs from old donors. Among them, *AKT1*, *BCL2* and *HRAS* displayed an up-regulation in their expression in old individuals (Fig. 3a). On the other hand, *ITGB2*, *JUN*, *MAPK1* and *NFKB1* showed a down-regulation in CD27<sup>+</sup> MBCs from old donors compared with young donors and CD27<sup>-</sup> NBC (Fig. 3b). Finally, *ITGB3* showed strong repression in CD27<sup>+</sup> MBCs compared with CD27<sup>-</sup> NBCs regardless of the age of the donors.

We analysed the expression of two proteins to verify the results observed in gene expression at mRNA level. For this purpose we performed Western blot analyses comparing the expression of AKT1 and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) proteins among CD27<sup>+</sup> MBCs from young and old individuals, and CD27<sup>-</sup> NBCs from old donors. We chose these proteins because their encoding genes were differentially and inversely expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs from old donors compared with young donors and CD27<sup>-</sup> NBCs from old individuals. Remarkably, AKT1 protein had a higher level of expression in CD27<sup>+</sup> MBCs from old donors than young donors or CD27<sup>-</sup> NBCs, whereas MAPK1 protein showed lower expression level in elderly CD27<sup>+</sup> MBCs (Fig. 4). These protein analyses were performed in triplicate and expression levels are shown in Fig. 4(b,c).

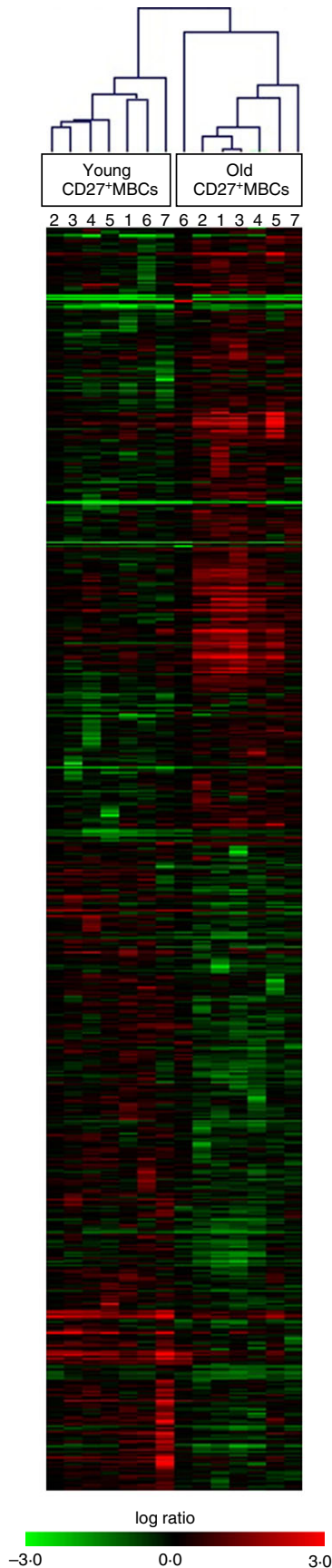
#### Discussion

Considering that MBCs remain viable for many years in steady-state conditions, this cell subset may offer a unique opportunity to identify genes and pathways that are physiologically involved in long-term cell survival. Furthermore, they might also allow us to evaluate the effect of age on these pathways, which might, in turn, underlie the higher incidence of humoral immune dysfunctions or even neoplasias of B-cell lineage in the elderly population. Remarkably, the expansion of the tumour compartment in several B-cell malignancies is mostly a result of a misbalance between pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in favour of the latter, leading to an abnormal cell accumulation, rather than to an increased cell proliferation. Hence, pathways that are physiologically involved in long

Gene expression in elderly CD27<sup>+</sup> memory B cells



**Figure 1.** Expression pattern of CD27<sup>-</sup> naive versus CD27<sup>+</sup> memory B cells in young and elderly population. Unsupervised hierarchical cluster analysis performed with the differentially expressed genes in CD27<sup>-</sup> naive B cells (NBCs) versus CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs) from seven young (a) and seven old (b) individuals. Each numbered column represents an individual sample and each row represents a single gene. Red and green colour code indicates gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann–Whitney *U*-test.



**Figure 2.** Expression pattern of CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs) from young versus aged individuals. Unsupervised hierarchical cluster analysis performed with the differentially expressed genes when comparing CD27<sup>+</sup> MBCs from seven young versus seven aged individuals. Each numbered column represents an individual sample and each row represents a single gene. Red and green colour code indicates gene expression levels in logarithmic scale. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann–Whitney *U*-test.

**Table 1.** Biological processes involving genes differentially expressed in CD27<sup>+</sup> memory B cells from elderly individuals

Top biological functions	Molecules
Diseases and disorders	
Cancer	115
Cardiovascular disease	35
Haematological disease	34
Respiratory disease	28
Developmental disorder	28
Molecular and cellular functions	
Cellular growth and proliferation	66
Cellular development	59
Gene expression	50
Cellular movement	40
DNA replication, recombination and repair	23
Physiological system development and function	
Tissue morphology	44
Haematological system development and function	42
Tissue development	31
Connective tissue development and function	22
Hepatic system development and function	11

lifespan in MBCs in normal conditions could also be involved in these processes upon dysregulation.

In the current study we found that the gene expression patterns of CD27<sup>+</sup> MBCs and CD27<sup>-</sup> NBCs are significantly different, which might explain the different biological properties of both cell subsets, including the very long half-life of MBCs compared with NBCs. In this regard, Kulis *et al.*<sup>20</sup> described DNA hypomethylation as the most prominent difference between NBCs and MBCs that could play a role in the differences in gene expression observed in this study. However, other studies described few differences in the gene expression profiles of NBCs and MBCs and suggested that the germinal centre reaction does not produce drastic changes in the cell phenotype.<sup>4</sup>

Among the differentially expressed genes in CD27<sup>+</sup> MBCs versus CD27<sup>-</sup> NBCs we found the MBC marker CD80. This gene appeared up-regulated in CD27<sup>+</sup> MBCs in both young and old individuals with respect to CD27<sup>-</sup> NBCs, confirming previous studies published in the literature.<sup>21,22</sup>

Although we observed significant differences between the starting percentage in peripheral blood of CD27<sup>-</sup>

Table 2. Most significantly affected pathways in elderly CD27<sup>+</sup> memory B cells

Canonical pathways	P-value	Ratio <sup>1</sup>	Genes
Oestrogen-dependent breast cancer signalling	1.49E-06	7/73 (0.096)	<i>AKT1, JUN, MAPK1, IGF1R, HRAS, NFKB1, EP300</i>
IL-8 signalling	7.37E-06	10/225 (0.044)	<i>ITGB2, AKT1, JUN, MAPK1, CYBB, HRAS, NFKB1, BCL2, ITGB3, IRAK1</i>
Molecular mechanisms of cancer	1.32E-05	13/388 (0.034)	<i>MAPK1, SMAD3, HRAS, GNAZ, NFKB1, BCL2, EP300, FADD, AKT1, JUN, RABIF, PTPN11, RASGRP1</i>
HMGB1 signalling	2.03E-05	7/109 (0.064)	<i>AKT1, JUN, HMGB1, MAPK1, HRAS, NFKB1, KAT6B</i>
Glucocorticoid receptor signalling	2.42E-05	11/299 (0.037)	<i>POLR2A, AKT1, JUN, HMGB1, MAPK1, SMAD3, HRAS, NFKB1, MED14, BCL2, EP300</i>
Aggrin interactions at neuromuscular junction	3.28E-05	6/70 (0.086)	<i>ITGB2, JUN, MAPK1, HRAS, DAG1, ITGB3</i>
Neurotrophin/TRK signalling	3.28E-05	6/76 (0.079)	<i>AKT1, JUN, PTPN11, MAPK1, HRAS, EP300</i>
Renal cell carcinoma signalling	3.87E-05	6/79 (0.076)	<i>AKT1, JUN, PTPN11, MAPK1, HRAS, EP300</i>
PEDF signalling	4.19E-05	6/79 (0.076)	<i>AKT1, MAPK1, HRAS, ZEB1, NFKB1, BCL2</i>
NF- $\kappa$ B activation	5.3E-05	6/83 (0.072)	<i>ITGB2, AKT1, MAPK1, HRAS, NFKB1, ITGB3</i>
Androgen signalling	6.74E-05	7/145 (0.048)	<i>POLR2A, JUN, MAPK1, SMAD3, GNAZ, NFKB1, EP300</i>
Ceramide signalling	8.23E-05	6/91 (0.066)	<i>AKT1, JUN, HRAS, NFKB1, ENPP7, BCL2</i>

<sup>1</sup>The ratio indicates the relation between the number of molecules affected in the study and the total number of molecules implicated in the pathway.

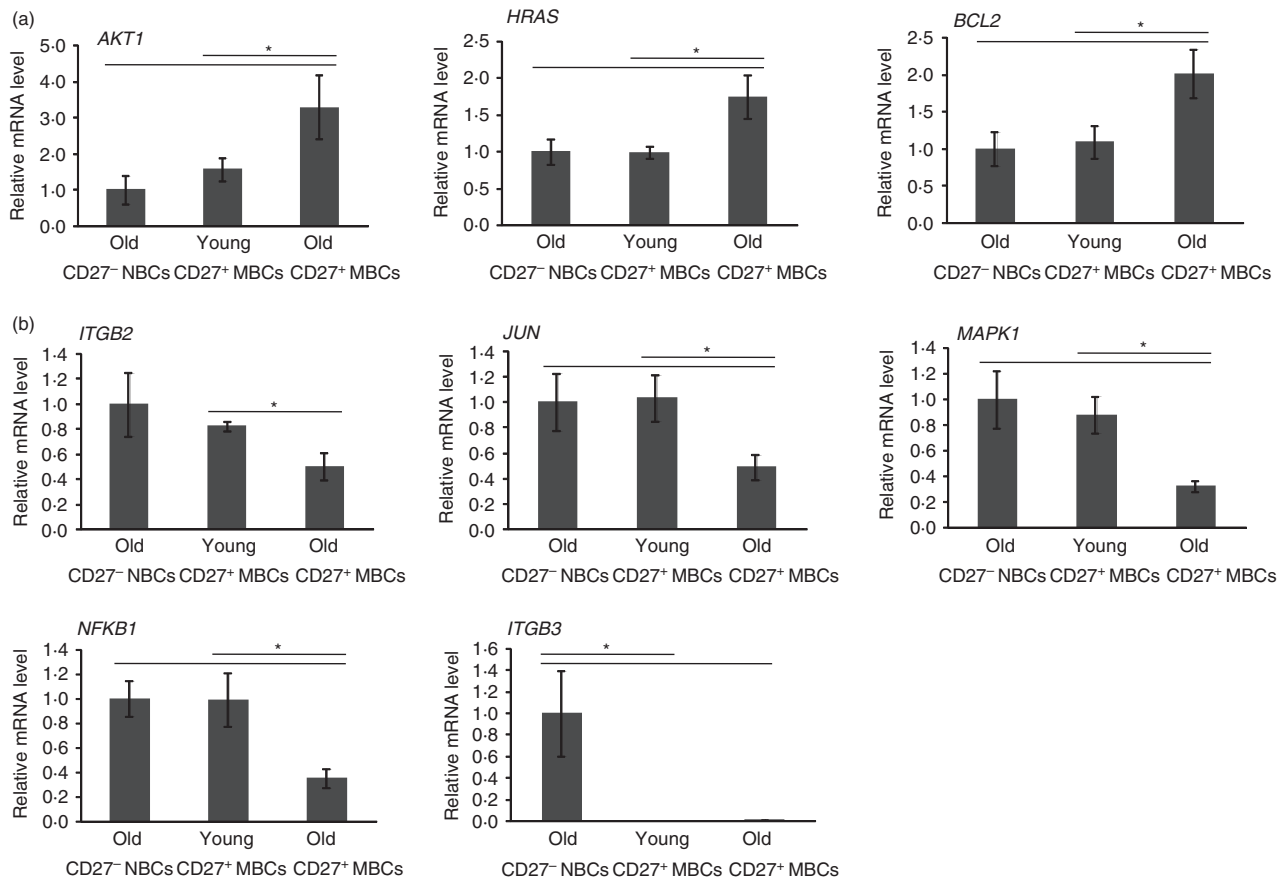
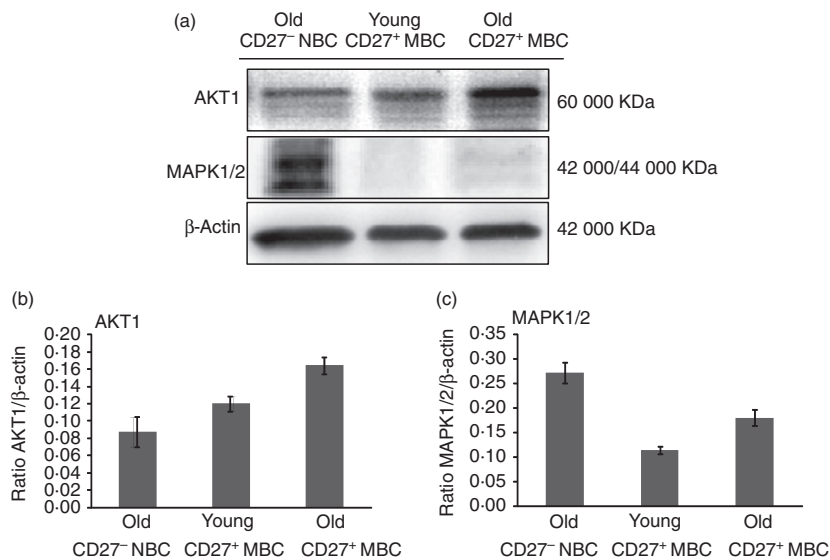


Figure 3. Validation of significant genes. Expression levels of up-regulated (a) and down-regulated (b) genes in 10 CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs) from aged donors respect to 10 CD27<sup>+</sup> MBCs from young donors and 10 CD27<sup>-</sup> naive B cells (NBCs) from elderly donors as determined by quantitative RT-PCR. Statistical significance: \*P < 0.05.



**Figure 4.** Protein expression. Representative Western blot (a) of AKT1 (b) and mitogen-activated protein kinase 1/2 (MAPK1/2) (c) proteins performed comparing CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs) from three elderly and three young individuals, and CD27<sup>-</sup> naive B cells (NBCs) from three old donors, normalized respect to β-actin ( $n = 3$ ).

NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs in young versus aged individuals, the most interesting finding was that unsupervised paired hierarchical clustering did not identify differences between isolated CD27<sup>-</sup> NBCs of young versus aged individuals, whereas it clearly identified two different subgroups of CD27<sup>+</sup> MBCs depending on the age of the donors, indicating that general gene expression changes during aging take place only in the CD27<sup>+</sup> MBC population. In this sense, there is not much information available in the literature describing differentially expressed genes in both B-cell subsets that are also associated with the age. From these data it is tempting to speculate that these changes make MBCs from aged donors more susceptible to functional impairments or malignant transformation. This approach allowed us to identify 193 differentially expressed genes involved in several biological processes such as cellular growth and proliferation, cellular development and movement, gene expression, as well as pathophysiological phenomena such as cancer, haematological diseases and normal haematological system development and function. These data have not been previously reported. These 193 genes participate in several canonical pathways, most of them related with cell survival: molecular mechanisms of cancer, interleukin-8 signalling, high-mobility group box-1 signalling, pigment epithelium-derived factor signalling and nuclear factor-κB activation.

In addition, when we validated some of these significant genes by qRT-PCR (*AKT1*, *BCL2*, *HRAS*, *ITGB2*, *ITGB3*, *JUN*, *MAPK1* and *NFKB1*) we could confirm that there were significant differences in gene expression of CD27<sup>-</sup> NBCs versus CD27<sup>+</sup> MBCs, and moreover, we could identify some differentially expressed genes in CD27<sup>+</sup> MBCs associated with the aged population. The gene *ITGB3* was differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs compared with CD27<sup>-</sup> NBCs. *ITGB3* is down-regulated in CD27<sup>+</sup> MBCs

and plays an important role in cell invasiveness in human MM.<sup>23</sup> On the other hand, we also found some genes differentially expressed in CD27<sup>+</sup> MBCs from young versus old individuals: *AKT1*, *BCL2* and *HRAS*, which were up-regulated in old individuals and *ITGB2*, *JUN*, *MAPK1* and *NFKB1*, which were down-regulated. *AKT1* is known to play a critical role in cell proliferation, migration and survival, keeping cells alive by blocking apoptotic pathways, and consequently it has been implicated in development and progression of many human cancers, including MM.<sup>24</sup> The *BCL2* family members play a central role in regulating apoptosis and arbitrating the cellular fate through an accurate balance between pro-apoptotic and pro-survival factors. High *BCL2* levels have been detected in most human lymphoid malignancies, but also in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and MM.<sup>25</sup> *HRAS* is an oncogene related to GTP-binding proteins that exhibits potent transforming potential, promoting oncogenesis by disturbing a multitude of cellular processes, such as gene expression, cell cycle progression and proliferation, cell survival and cell migration. Moreover, *HRAS* is well known to be associated with exceptional longevity and with healthy aging.<sup>26</sup> On the contrary, *ITGB2* is down-regulated in CD27<sup>+</sup> MBCs and encodes the integrin β-chain β2. The deficiency of this protein in humans and mice causes leucocyte adhesion deficiency syndrome, characterized by leucocytosis, increased susceptibility to infections and impaired wound healing.<sup>27,28</sup> *JUN* acts by promoting myeloma cell proliferation and maintaining cell survival when it is inhibited by the bone marrow microenvironment.<sup>29</sup> *MAPK1* plays a crucial role in cell survival, proliferation, cell adhesion, migration and differentiation in many tissues. Several groups have reported that the absence of *MAPK1* in murine haematopoietic cells leads to bone marrow aplasia, leukopenia, anaemia and early lethality.<sup>30</sup> Finally, *NFKB1* is a transcription factor related



to the pathogenesis of cancers, including MM, by regulating genes involved in proliferation, survival and drug resistance. Although several studies describe how *NFKB1* induction promotes cell survival, other groups have shown that the repression of this gene leads to apoptosis inhibition and survival stimulation.<sup>31</sup>

Lastly, when we analysed the expression levels of two proteins encoded by its validated genes (*AKT1* and *MAPK1*), we could confirm that CD27<sup>+</sup> MBCs from elderly individuals have a different expression pattern from CD27<sup>+</sup> MBCs from young donors and CD27<sup>-</sup> NBCs from old donors, as was observed in the gene expression studies. Interestingly, our results suggest that the AKT pathway seems to be induced in CD27<sup>+</sup> MBCs from elderly individuals, which could be increasing the proliferation and survival of these cells.<sup>32</sup> On the other hand, MAPK1 is a required protein for the maintenance of haematopoietic progenitor cells and the regulation of normal haematopoiesis.<sup>33</sup> However, in this study we found that the MAPK1 pathway is repressed in CD27<sup>+</sup> MBCs from old donors. These apparent contradictions allow us to speculate that lack of coordination in older individuals between the different mechanisms controlling cell proliferation could be responsible for failures in haematopoiesis, which ultimately could lead to the development of haematological diseases. In this regard these two pathways could be interesting targets for future therapeutic approaches.

In summary, we conclude that gene expression profiles of CD27<sup>-</sup> NBCs and CD27<sup>+</sup> MBCs are different, and that these differences may allow identifying genes involved in the longevity of CD27<sup>+</sup> MBCs compared with CD27<sup>-</sup> NBCs. In addition, age affects the gene expression pattern of CD27<sup>+</sup> MBCs but not CD27<sup>-</sup> NBCs, which correlate with the fact that MBCs seem to be more susceptible to dysfunction or malignant transformation with ageing.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Salvador Oyonarte from the Blood Transfusion Centre of Seville. Special thanks to Eduardo León from Bioinformatic Department of Biomedicine Institute of Seville (IBIS) for the technical assistance provided. This study was supported by a grant from the Ministry of Health (code EC10-289) and from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (code PI11/02366).

## Author contributions

AB processed all the samples, performed gene expression microarrays and protein experiments, analysed the data and wrote the manuscript; IAL wrote part of the manuscript and analysed the gene expression data; JIP analysed

the data and critically reviewed the manuscript; TCV performed all the cytometric analyses; MVM and MM analysed protein expression data; EGG and AMU performed the literature search; LISA critically reviewed the manuscript and JPS provided funding, designed the research project and critically reviewed the manuscript.

## Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 Good-Jacobson KL, Tarlinton DM. Multiple routes to B-cell memory. *Int Immunol* 2012; **24**:403–8.
- 2 Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 2009; **182**:890–901.
- 3 Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP, Noelle RJ. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 2008; **180**:3655–9.
- 4 Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA *et al.* Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**:2639–44.
- 5 Shen Y, Iqbal J, Xiao L *et al.* Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC Immunol* 2004; **5**:20.
- 6 Tomayko MM, Anderson SM, Brayton CE, Sadanand S, Steinel NC, Behrens TW, Shlomchik MJ. Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J Immunol* 2008; **181**:27–38.
- 7 Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; **132**:681–96.
- 8 Weng NP. Telomere and adaptive immunity. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**:60–6.
- 9 Issa JP. Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clin Immunol* 2003; **109**:103–8.
- 10 Guerretaz LM, Johnson SA, Cambier JC. Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**:11898–902.
- 11 Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev* 2004; **10**:330–5.
- 12 Frasca D, Landin AM, Lechner SC, Ryan JG, Schwartz R, Riley RL, Blomberg BB. Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J Immunol* 2008; **180**:5283–90.
- 13 Gibson KL, Wu YC, Barnett Y *et al.* B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Ageing Cell* 2009; **8**:18–25.
- 14 Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF *et al.* Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J Clin Invest* 2011; **121**:3109–19.
- 15 Kogut I, Scholz JL, Cancro MP, Cambier JC. B cell maintenance and function in aging. *Semin Immunol* 2012; **24**:342–9.
- 16 Miller JP, Allman D. The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol* 2003; **171**:2326–30.
- 17 Shahaf G, Johnson K, Mehr R. B cell development in aging mice: lessons from mathematical modeling. *Int Immunol* 2006; **18**:31–9.
- 18 Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor- $\beta$  levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; **229**:494–502.
- 19 Szabo P, Shen S, Telford W, Weksler ME. Impaired rearrangement of IgH V to DJ segments in bone marrow Pro-B cells from old mice. *Cell Immunol* 2003; **222**:78–87.
- 20 Kulis M, Heath S, Bibikova M *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012; **44**:1236–42.
- 21 Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Pozzetto B, Richard Y, Garraud O. Identification of two subpopulations of purified human blood B cells, CD27<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup> and CD27<sup>high</sup>CD80<sup>+</sup>, that strongly express cell surface Toll-like receptor 9 and secrete high levels of interleukin-6. *Immunology* 2008; **125**:430–7.
- 22 Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Krieger JI, Duddy M, O'Connor KC, Hafler DA. Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J Immunol* 2001; **167**:5669–77.

- 23 Ria R, Vacca A, Ribatti D, Di Raimondo F, Merchionne F, Dammacco F.  $\alpha_v\beta_3$  integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma. *Haematologica* 2002; **87**:836–45.
- 24 Zöllinger A, Stühmer T, Chatterjee M *et al.* Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* 2008; **112**:3403–11.
- 25 Scarfó L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunol Lett* 2013; **155**:36–9.
- 26 Jazwinski SM, Kim S, Dai J *et al.* HRAS1 and LASS1 with APOE are associated with human longevity and healthy aging. *Aging Cell* 2010; **9**:698–708.
- 27 Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol* 2005; **77**:129–40.
- 28 Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K *et al.* Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 1998; **188**:119–31.
- 29 Chen LJ, Xu JR, Zhou WH. Role of bone marrow microenvironment in regulation of AP-1 gene expression in multiple myeloma cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; **18**:103–6.
- 30 Chan G, Gu S, Neel BG. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood* 2013; **121**:3594–8.
- 31 Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF- $\kappa$ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000; **267**:3828–35.
- 32 Calamito M, Juntilla MM, Thomas M, Northrup DL, Rathmell J, Birnbaum MJ, Koretzky G, Allman D. Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood* 2010; **115**:4043–50.
- 33 Geest CR, Coffey PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009; **86**:237–50.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Phenotypes of B-cell subsets.

**Figure S2.** Expression of immunoglobulins in CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs).

**Figure S3.** Expression of immunoglobulins in CD27<sup>-</sup> naive B cells (NBCs).

**Table S1.** Expression levels of the differentially expressed genes between CD27<sup>+</sup> memory B cells (MBCs) from young and old individuals and CD27<sup>-</sup> naive B cells (NBCs) from elderly individuals.

**Artículo 4. Las células plasmáticas mielomatosas muestran un patrón de expresión génica similar al observado en las células B de memoria normales (*under review*)**

Los LBM permanecen viables en estado no proliferativo durante años; ello se debe a que expresan genes implicados en supervivencia celular y factores anti-apoptóticos, mientras que reprimen la expresión de genes reguladores del ciclo celular. Durante su diferenciación a CP, desarrollan un patrón de expresión génica opuesto, con una mayor expresión de genes de proliferación y activación celular, y menor expresión de genes de supervivencia. Sin embargo, en el MM las CP se acumulan en la MO debido a fallos en la apoptosis, a la vez que adquieren un patrón de activación y proliferación celular. Con estos datos en mente, en el presente estudio nos planteamos analizar los patrones de expresión génica de CP y LBM de donantes sanos y de CPm con el fin de determinar si éstas presentan un perfil de expresión génica intermedio entre el LBM y la CP.

Los LBM se obtuvieron mediante separación inmunomagnética a partir de 5 *buffy coats* de donantes sanos de edad avanzada (60-70 años). Así mismo, se aislaron CP a partir de MO de 6 donantes sanos y CPm de 6 pacientes diagnosticados de MM. Para ello se obtuvieron previamente las células mononucleadas mediante gradiente de densidad, en el caso de los LBM y mediante lisis celular, en el caso de las CP y CPm. La pureza del aislamiento de las todas las poblaciones celulares fue superior al 95%. A continuación se extrajo el ARN de todas las muestras, y se analizó la expresión de todo el genoma usando los arrays *Whole Human Genome 4x44K oligo microarray kit*. Se utilizó como control un *pool* de muestras de LBN. Los valores de expresión génica se obtuvieron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Con los datos de expresión se realizaron análisis jerárquicos no supervisados empleando el método de la distancia Euclídea y para identificar los genes expresados diferencialmente entre los distintos grupos experimentales de células B se aplicaron los test estadísticos no paramétricos U de *Mann Whitney* y *Kruskal Wallis*. Se consideraron significativos los genes con un valor  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa *Multiexperiment Viewer 4.7.1* y la funcionalidad de los genes de interés se determinó a partir de distintas bases de datos disponibles en internet.

A partir del análisis no supervisado obtenido se identificaron claramente dos grupos, uno formado por las muestras de CP y otro que incluía las muestras de CPm y LBM. Curiosamente, las CPm se situaban en medio de ambos tipos celulares. Con el fin de identificar genes característicos de una CPm que no se expresen en una CP normal,



comparamos los perfiles de expresión génica de CP y CPm, y encontramos 5159 genes expresados diferencialmente. Entre estos, se buscaron aquellos genes expresados diferencialmente en las CPm que tuviesen niveles de expresión similares a los observados en los LBM. En este caso se identificaron 3455 genes, la mayoría implicados en procesos de muerte y supervivencia celular, crecimiento y proliferación celular, síntesis de proteínas y expresión génica y regulación post-transcripcional del ARN, desarrollo y estructura del tejido linfoide y morfología de tumores. Además, estos genes juegan un papel importante en las vías de señalización de EIF2, mTOR, eIF4 y p70S6K, mitocondriales y de presentación de antígenos. Finalmente, se validaron algunos genes implicados en estas vías mediante qRT-PCR y pudimos confirmar que las CPm presentan un patrón de expresión génica “asincrónica” que se asemeja más al de un LBM que al de una CP normal.

## **Myelomatous plasma cells display an aberrant gene expression pattern similar to that observed in normal memory B cells**

Alicia Báez, José I Piruat, Teresa Caballero-Velázquez, LI Sánchez-Abarca, Isabel Álvarez-Laderas, M Victoria Barbado, África Millán-Uclés, Jesús Martín-Sánchez, Estefanía García-Guerrero, Mayte Medrano and José Antonio Pérez-Simón.

Hematology Department, University Hospital Virgen del Rocío / Institute of Biomedicine of Seville (IBIS) / CSIC / Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

### **Corresponding author:**

Dr. Jose Antonio Pérez-Simón

Head of Department of Hematology

Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) / CSIC / Universidad de Sevilla, Avenida de Manuel Siurot s/n 41013, Seville, Spain.

e-mail: [josea.perez.simon.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:josea.perez.simon.sspa@juntadeandalucia.es)

FAX: +34 955 013 265 / Telephone: +34 955 013 260

### **Abstract**

Memory B cells (MBCs) remain in a quiescent state for years, expressing pro-survival and anti-apoptotic factors while repressing cell proliferation and activation genes. During their differentiation into plasma cells (PCs), their expression pattern is reversed, with a higher expression of genes related to cell proliferation and activation, and a lower expression of pro-survival genes. To determine whether myelomatous plasma cells (mPCs) share characteristics with normal PCs and MBCs and to identify genes involved in the pathophysiology of multiple myeloma, we compared gene expression patterns in these three cell sub-types. Using microarray high-throughput techniques we analyzed the expression of whole genome in 6 samples of PCs, 6 of mPCS and 5 of MBCs. We observed that mPCs had features intermediate between those of MBCs and normal PCs, and identified 3455 genes differentially expressed in myelomatous relative to normal PCs but with a similar expression pattern to that in MBCs. Most of these genes are involved in cell death and survival, cell growth and proliferation and protein synthesis. According to our findings, mPCs have a gene expression pattern closer to a MBC than a normal PC with a high expression of genes involved in cell survival. These genes should be physiologically inactivated in the transit from MBC to PC, but remain overexpressed in mPCs and thus may play a role in the pathophysiology of the disease.

## Introduction

B-cell differentiation into antibody-secreting cells constitutes the basis of the humoral adaptive immune system. Upon encountering a foreign antigen, naive B cells are activated and differentiated into antibody-secreting plasma cells (PCs) that mediate the primary humoral immune responses. In addition, some of them differentiate into memory B cells (MBCs) that drive the secondary humoral immune response upon re-exposure to the same antigen [1,2]. Accordingly, during the differentiation from naive B cells to MBCs, B lymphocytes acquire a higher antigen binding affinity and, at the same time, change the expression patterns of multiple surface receptors and intracellular factors that contribute to increase their responsiveness [3]. Whereas PCs are terminally differentiated, MBCs are capable of undergoing consecutive phases of stimulation, expansion and generation of PCs [4-7]. Moreover, their detection more than 50 years after vaccination demonstrates that MBCs can remain viable in a non-proliferative state for decades [8]. In this regard, MBCs express high levels of genes involved in long-term survival, such as the

transcription factors BCL6 and PAX5, which induce the expression of B-cell lineage genes [9], and anti-apoptotic factors, such as Bcl-2, A1 and Mcl-1, which promote cell survival [10]. These cells express low levels of genes associated with cell cycle regulation, including members of the Krüppel-like factor family, which endows them with the ability to enter quickly into division, thus facilitating enhanced secondary responses [11]. During the process of differentiation into PCs, several morphological, phenotypic and molecular changes occur. In this regard, the gene expression pattern of PCs is very different from that observed in MBCs. Among others, higher levels of expression of genes related to cell proliferation, such as PRDM1 and XBP1 [12,13] and interferon regulatory factor IRF4, are apparent [14].

Multiple myeloma (MM) is characterized by the monoclonal expansion of malignant myelomatous PCs (mPCs) [15,16]. Remarkably, these mPCs share characteristics of both MBCs and normal PCs. On one hand, they accumulate in bone marrow (BM) due either to failure in the mechanisms involved in apoptosis and/or to the abnormal overexpression of mechanisms responsible for long-term

viability (similar to what occurs in MBCs). On the other hand, mPCs also show characteristics indicative of activated cell proliferation. In this regard, several reports have suggested that the mPC might be an abnormal MBC [17-19]. However, these findings have not been confirmed in other studies [20]. In fact, both hypotheses might be valid, i.e., mPCs could maintain features similar to MBCs. In turn, this would bestow long-term survival on this cell, which, at the same time, would acquire the functional, phenotypic and genetic characteristics of a PC in terms of activation. In the current study we compared the gene expression patterns of PCs and MBCs from healthy donors with that of mPCs with the dual aim of determining whether mPCs has an gene expression pattern intermediate between those of MBCs and PCs, and of identifying genes that may be associated with the physiopathology of the disease.

## **Material and Methods**

### *Samples*

MBCs were isolated from 5 buffy coats from volunteer healthy donors. PCs were isolated from BM of 6 healthy

donors and mPCS from BM of 6 patients diagnosed with MM. The local ethics committee of the University Hospital Virgen del Rocío provided institutional review board-approval for this study. Informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

### *Isolation of MBCs*

Peripheral blood mononuclear cells from buffy coats were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque solution (Amersham Biosciences, Uppsala). The isolation of MBCs was performed in a two-step procedure by immunomagnetic separation in an AutoMACS pro separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) using the Memory B cell isolation kit human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). MBCs were isolated by depletion of non-B cells and subsequent positive selection with anti-CD27 conjugated MicroBeads. Firstly, we performed an indirect magnetic labeling of non-B cells with Biotin-Antibody Cocktail and Anti-Biotin MicroBeads and we retained the negative fraction. The second step was a direct magnetic labeling of CD27+ MBCs with CD27 MicroBeads. The purity of the isolated

MBCs was higher than 95% in all cases as demonstrated by flow cytometry.

### ***Isolation of PCs and mPCs***

Mononuclear cells were isolated from BM using ammonium chloride. The CD138<sup>+</sup> cells from both healthy donors and patients were isolated in AutoMACS pro separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by positive immunomagnetic selection using the CD138 MACS microbead Human Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of the isolated CD138<sup>+</sup> cells was higher than 95% in all cases.

### ***RNA extraction***

Total RNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quality and integrity of the RNA was verified by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A RNA integrity number (RIN) higher than 7.5 was required for further analyses of gene expression profiling.

### ***Gene expression***

We analyzed the expression profile of whole genome in each sample using the Whole Human Genome Oligo microarray kit 4x44K (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA). Total RNA (200 ng) was transcribed into cRNA and labeled with the Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The quality and integrity of the cRNA was verified by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All experimental samples were hybridized with a pool of samples of B cells as reference sample. Microarrays were scanned in a GenePix reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### ***Validation of significant genes***

The expression of significant genes was validated by quantitative real-time PCR using Quantitec Primer Assays and the Quantitec SYBR green Kit (both from Qiagen, Hilden, Germany) in a 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data were normalized to the housekeeping gene *GAPDH*. The relative gene expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### ***Statistical analysis***

Unsupervised hierarchical clustering of gene expression data was performed using the average linkage and the Euclidean distance. To identify differentially expressed genes between

experimental groups we applied a non parametric Mann-Whitney test. The differences in expression with a p value < 0.05 were considered significant. To obtain positive and negative expression values data were transformed to logarithmic scale. All analyses were performed using the Multi-experiment Viewer 4.7.1 software. The functional analysis of the genes of interest was performed with the Ingenuity Pathways Analysis (<http://www.ingenuity.com>) and Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) software.

## Results

### *Gene expression in PCs, mPCs and MBCs*

The unsupervised hierarchical clustering of the expression data from all the samples clearly identified two groups, one including normal PCs samples and the other containing the mPC and MBC samples (Figure 1). Interestingly, mPCs were not only grouped with MBCs, but also clustered and located closer to the PC samples, implying that mPCs display an intermediate gene expression pattern between MBCs and normal PCs,

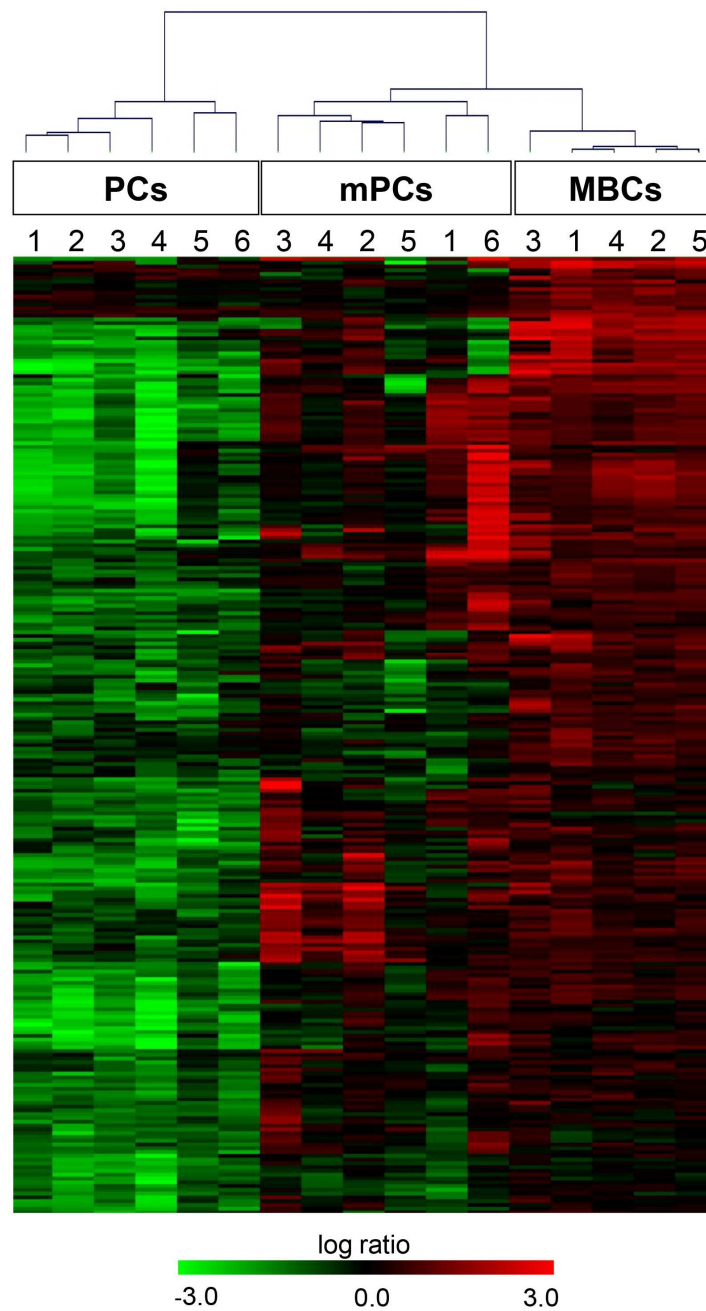
although with a profile closer to that of MBCs.

The Mann-Whitney test identified 5159 genes significantly differentially expressed in mPCs compared with normal PCs (p < 0.05). Of these, we were able to select 3455 genes with a similar (i.e., not significantly different) expression level to that observed in MBCs (Figure 2). Of this subset of genes, 1349 displayed a greater than 1.5-fold difference in their expression levels with respect to normal PCs, comprising 1062 upregulated and 287 downregulated genes in mPCs. The functional analysis using Ingenuity Pathway Analysis software showed these genes to be involved in several biological processes such as cell death and survival, cellular growth and proliferation, protein synthesis, and RNA post-transcriptional modification. Likewise, these genes appear to be involved in the development and function of various physiological systems, such as lymphoid tissue structure and development, and tumor morphology (Table 1).

The functional analysis showed that some of these 1349 differentially expressed genes play a precise role in several canonical pathways, the most significant being EIF2 signaling, mTOR

signaling, regulation of eIF4 and p70S6K signaling, mitochondrial

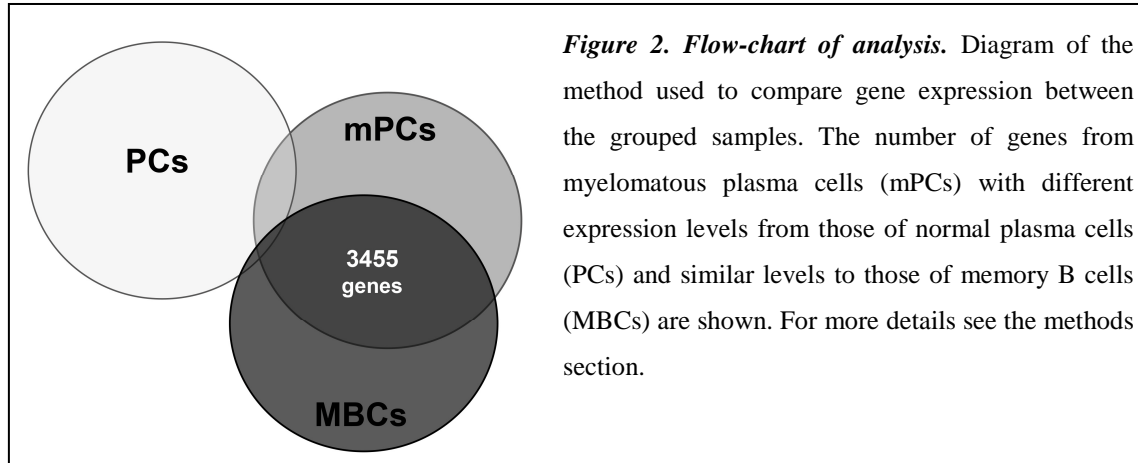
dysfunction and the antigen presentation pathway (Table 2).



**Figure 1. Gene expression pattern of mPCs versus normal PCs and MBCs.** Unsupervised hierarchical cluster analysis performed with samples of myelomatous plasma cells (mPCs), normal plasma cells (PCs) and memory B cells (MBCs). Each numbered column represents an

individual sample and each row represents a single gene. The panel contains a representative portion of the respective sets of genes. Red and green colors indicate gene expression levels on a logarithmic scale.





**Table 1. Biological processes involving genes differentially expressed in myelomatous plasma cells (mPCs).**

Top Biological Functions	Molecules
<b>Molecular and cellular functions</b>	
Cell death and survival	384
Cellular growth and proliferation	360
Protein synthesis	155
Cellular compromise	59
RNA post-transcriptional modification	56
<b>Physiological system development and functions</b>	
Lymphoid tissue structure and development	106
Tumor morphology	83
Embryonic development	83
Organ development	73
Connective tissue development and function	73

### **Validation of significant genes**

To validate our high-throughput screening, we confirmed the expression of several of the identified genes, analyzing *AKT1*, *BM11*, *CAV1*, *COX5A*, *GTF2I*, *HNRNPA3*, *IRF2BP2*, *NDUFA1*, *PCNA1*, *RPS15*, *RPS27*,

*SDHD* and *SF3B1*. Most of these genes were chosen because they are representative of the canonical pathways that are differentially expressed in mPCs and MBCs compared with PCs. *AKT1*, *RPS15* and *RPS27* are involved in EIF2 signaling,

**Table 2. Most significantly affected pathways in myelomatous plasma cells (mPCS).**

<b>Canonical Pathways</b>	<b>p</b>	<b>Ratio*</b>	<b>Genes</b>
EIF2 signaling	2E-09	62/201 (0.308)	AKT1, EIF1, EIF5, EIF1AX, EIF2AK2, EIF3A, EIF3C, EIF4A1, EIF4A2, EIF4G2, FAU, GSK3B, PABPC1, PPP1CC, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL8, RPL10, RPL14, RPL15, RPL17, RPL19, RPL21, RPL23, RPL24, RPL27, RPL29, RPL32, RPL34, RPL35, RPL39, RPL10A, RPL23A, RPL27A, RPL35A, RPL36A, RPL36AL, RPL37A, RPL7A, RPLP0, RPLP1, RPS3, RPS6, RPS7, RPS10, RPS13, RPS15, RPS16, RPS18, RPS19, RPS20, RPS24, RPS25, RPS27, RPS28, RPS3A, RPS4X, RPSA, RRAS, UBA52
mTOR signaling	2.22E -09	36/213 (0.169)	AKT1, ARHGAP8, DDIT4, EIF3A, EIF3C, EIF4A1, EIF4A2, EIF4B, EIF4G2, FAU, HMOX1, MAPKAP1, PPP2R1B, PRKCD, RAC1, RHOA, RHOC, RPS3, RPS6, RPS7, RPS10, RPS13, RPS15, RPS16, RPS18, RPS19, RPS20, RPS24, RPS25, RPS27, RPS28, RPS3A, RPS4X, RPSA, RRAS, ULK1
Regulation of eIF4 and p70S6K signaling	8.34E -09	30/175 (0.171)	AKT1, EIF1, EIF1AX, EIF3A, EIF3C, EIF4A1, EIF4A2, EIF4EBP2, EIF4G2, FAU, PABPC1, PPP2R1B, RPS3, RPS6, RPS7, RPS10, RPS13, RPS15, RPS16, RPS18, RPS19, RPS20, RPS24, RPS25, RPS27, RPS28, RPS3A, RPS4X, RPSA, RRAS
Mitochondrial dysfunction	3.25E-06	26/201 (0.129)	ATP5A1, ATP5B, ATP5D, ATP5E, CASP3, CASP8, COX5A, COX5B, COX6A2, COX6C, COX7A2L, MT-COI, NDUFA1, NDUFA4, NDUFA9, NDUFA11, NDUFA12, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB10, NDUFV1, PRDX5, SDHD, UQCR11, UQCRH, VPS9D1
Antigen presentation pathway	1.03E-05	11/42 (0.262)	B2M, CANX, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-F, NLRC5, PDIA3, TAP1, TAPBP

\* The ratio is of the number of molecules affected in the study to the total number of molecules involved in the pathway.

mTOR signaling and regulation of eIF4 and p70S6K signaling. *COX5A*, *NDFUA1* and *SDHD* encode proteins of several mitochondrial complexes. *BMI1*, *CAV1*, *GTF2I*, *HNRNPA3*, *IRF2BP2*, *PCNA1* and *SF3B1* were selected because they are well known pro-survival genes, and have already being implicated in the pathophysiology of MM. The results obtained confirmed that the level of expression for most of these genes was higher in mPCs and MBCs than in normal PCs (Figure 3), suggesting that the previously described molecular pathways are activated. The expression levels of some genes in mPC were intermediate between those of the other cell types, whereas for others, levels were even higher than those observed in MBCs.

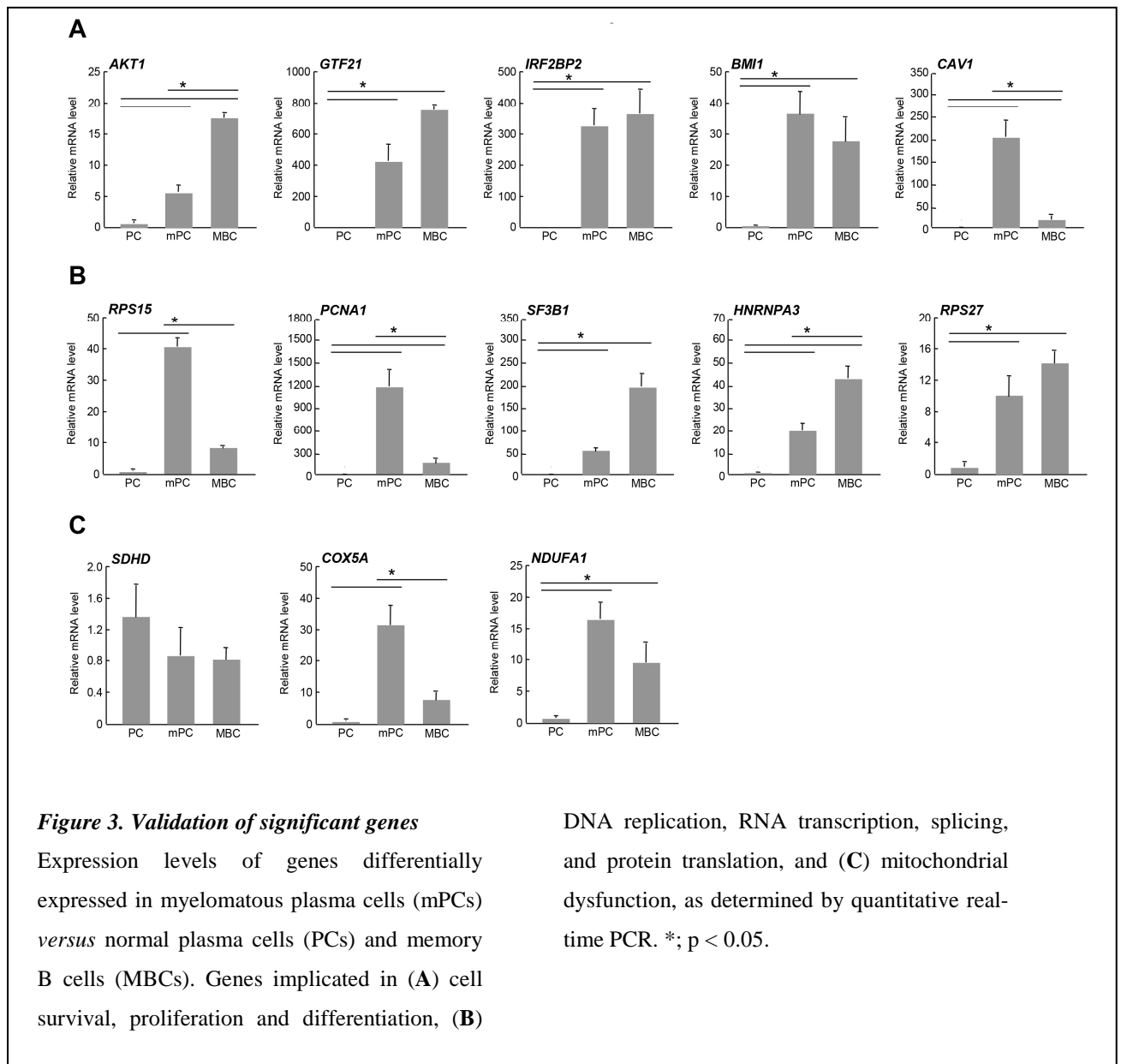
## Discussion

Many genetic aberrations have been described in MM, some of which may contribute to the pathogenesis of the disease, while others are secondary translocations [21,22]. In fact, it is a matter of intense debate whether these alterations really contribute to the transit from a normal PC to an mPC, or if they are secondary events.

Consequently, various studies have attempted to identify the origin of the myelomatous stem cell. The true nature and phenotype of cancer stem cells in MM remain unclear and controversial. Based on the expression of antigens such as CD19 or CD27, some authors have suggested that the neoplastic clone originates from a MBC [23] or even from a more immature stage B cell [24]. In fact, *in vivo* studies have shown that clonotypic B cells isolated from an advanced myeloma patient can generate disease in NOD/SCID mice [25], while CD138+ plasma cells fail to engraft NOD/SCID mice following tail vein injection [26,27]. Conversely, other authors have reported that mPCs display extensive somatic hypermutations of rearranged Ig-genes [28], indicating that the neoplastic clone originates from a B cell that has undergone antigen selection [29], and subsequent differentiation into a PC [30]. Furthermore, several studies have failed to demonstrate the presence of clonotypic B cells in patients diagnosed with MM [31]. Against this background, we hypothesized that mPCs might simultaneously gain the activation pattern acquired by a normal PC during its physiological maturation while not losing the gene expression

pattern displayed by the MBCs that confer long-term viability on these cells. Thus, mPCs would aberrantly share both activation and anti-apoptotic gene expression patterns from the normal PCs and MBCs counterparts, respectively. If this hypothesis were

correct, mPCs would be expected to display an intermediate gene expression pattern between those of the two normal subpopulations.



With this idea in mind, the current study compared the gene expression profile of mPCs and normal PCs obtained from healthy donor BM compared with MBCs obtained from healthy donor peripheral blood. An unsupervised hierarchical clustering showed that mPCs did have an intermediate gene expression pattern between normal PCs and MBCs that was closer to the expression profile observed in MBCs than to the normal PC counterparts. We also attempted to identify genes differentially expressed in mPCs compared with normal PCs but with a similar expression pattern to that observed in MBCs. Using a cut-off value of 1.5 above or below the difference of their expression levels with respect to normal PCs, we identified 1349 genes that were involved in several biological processes, such as cell death and survival, cellular growth and proliferation, protein synthesis and RNA post-transcriptional modification. These differentially expressed genes affect several canonical pathways, such as EIF2 signaling, mTOR signaling, regulation of eIF4 and p70S6K signaling, antigen presentation pathways and mitochondrial function. EIF2 and mTOR pathways are essential for modulating proliferation, growth

and survival of mPCs [32,33]. Other canonical pathway differentially expressed in mPCs involved protein synthesis, a crucial biological process affecting cell growth, survival and proliferation. In eukaryotes, translation initiation is facilitated by multiple protein factors collectively known as eIFs. Deregulated translational control plays an important role in oncogenic transformation. In fact, in various types of human cancers, eIFs are either overexpressed or ectopically activated by Ras-MAPK and PI3K-mTOR signaling cascades, resulting in increased survival and accelerated proliferation [34]. The antigen presentation pathway is also affected in MM and might contribute to the immune escape of mPCs from T-cell recognition due to the impaired antigen processing-presenting machinery [35,36]. In contrast to these previously identified pathways, information about mitochondrial dysfunction in myeloma is very limited, making the corresponding findings of the current study of particular interest, which might allow targets to be identified of use for developing new therapeutic approaches [37].

Upon validating by quantitative real-time PCR some of the 1349 genes

differentially expressed in mPCs that are involved in the previously mentioned pathways (*AKT1*, *RPS15*, *RPS27*, *HNRNPA3*, *BMII*, *CAVI*, *GTF2I*, *IRF2BP2*, *PCNA1*, *SF3B1*, *COX5A*, *NDUFA1* and *SDHD*) we confirmed the intermediate gene expression profile of mPCs between that of normal PCs and MBCs. Specifically, *AKT1* is upregulated in mPCs, resulting in sustained overexpression of the receptor activator of NF- $\kappa$ B [38]. *RPS15*, *RPS27* and *HNRNPA3* encode ribosomal proteins involved in translation processes [39-41]. *BMII*, *CAVI*, *GTF2I*, *IRF2BP2*, *PCNA1* and *SF3B1* are also upregulated in mPCs and MBCs relative to PCs. *BMII* is a member of the Polycomb group family of proteins involved in the epigenetic silencing of genes governing self-renewal, differentiation, and proliferation, and regulate the growth and clonogenic capacity of MM cells [42]. *CAVI* mediates growth and survival of MM cells, thereby representing a potential novel therapeutic target [43]. *GTF2I* is a multifunctional transcription factor that coordinates changes in the transcriptional program in response to developmental and proliferative signals [44]. *IRF2BP2* is a transcriptional

repressor of P53 involved in an apoptotic mechanism that maintains cell growth arrest, and is recognized as a potential prognostic marker of MM [45]. *PCNA1* is an important DNA replication factor in eukaryotic cells [46]. Finally, *SF3B1* is a critical component of the splicing machinery. Several studies have identified mutations in *SF3B1* in chronic lymphocytic leukemia, and various lines of evidence suggest that such mutations might be linked to genomic stability and epigenetic modification [47]. We also found several genes that are abnormally expressed in mPCs and involved in mitochondrial function. Since no studies have previously been reported concerning this aspect, we attempted to validate several of these genes (*COX5A*, *NDUFA1* and *SDHD*). *COX5A*, which was upregulated in mPCs in our study, encodes the Va subunit of the human mitochondrial respiratory chain enzyme. Several groups have reported that high levels of *COX5A* activity and mitochondrial respiration in tumor cells lead to the overexpression of Bcl-2, thus promoting survival of cancer cells [48]. *NDUFA1*, which is also upregulated in mPCs, codes for an essential component of complex I of the respiratory chain,

which transfers electrons from NADH to ubiquinone. Mutations in this gene lead to the development of several diseases [49]. Finally, *SDHD* was downregulated in mPCs and MBCs with respect to normal PCs in this study. *SDHD* encodes a member of complex II of the respiratory chain, which is responsible for the oxidation of succinate, and acts as a tumor suppressor. Several studies have shown that mutations in this gene are also associated with the formation of tumors [50]. Taken together, these data suggest that the activation and resting processes faced by an MBC during its life span could lead to a "derailment" mediated by the failure or wastage of the mechanisms regulating gene expression, leading to malignant transformation in mPCs.

In summary, we conclude that the expression of genes involved in cell survival, which should be normally inactivated in the transit from MBC to PC, is maintained in mPCs while simultaneously acquiring genes related to cell activation and proliferation, such as occurs in normal PCs. Accordingly, they have a gene expression pattern between those of normal PCs and MBCs. Moreover, mPCs display a high level of expression of survival and anti-

apoptotic genes closer to that of an MBC than of a normal PC.

### **Competing interests**

The authors have no conflicts of interests.

### **Authors' contributions**

AB processed all the samples, performed gene expression microarrays, analyzed the data and wrote the manuscript; JIP analyzed the data and critically reviewed the manuscript; TCV performed all the cytometric analyses; LISA and JM collected samples; IAL analyzed the gene expression data; MVB and MM produced all the figures; EGG and AMU did the literature search; JPS provided funding, designed the research project and critically reviewed the manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr Salvador Oyonarte, from the Blood Transfusion Center, Seville.

This study was supported by a grant from the Ministry of Health (code EC10-289) and from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, (FIS) (code PI11/02366).



## References

1. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2011;12(1):24-34.
2. Elgueta R, de Vries VC, Noelle RJ. The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2010;236:139-50
3. Kim L. Good, Danielle T. Avery, and Stuart G. Tangye. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol.* 2009;182:890–901.
4. Berek C, Jarvis JM, Milstein C. Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animals. *Eur J Immunol.* 1987;17(8):1121-9.
5. Tangye SG, Avery DT, Hodgkin PD. A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol.* 2003;170(1):261-9.
6. McHeyzer-Williams, M. G., R. Ahmed. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(2):172-9.
7. Slifka, M. K., R. Ahmed. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(3):252-8.
8. Taub DD, Ershler WB, Janowski M, Artz A, Key ML, et al. Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study. *Am J Med.* 2008;121(12):1058-64.
9. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol.* 2007;8(5):463-70.
10. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-37.
11. Good KL, Tangye SG. Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13420-5.
12. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity.* 2007; 26(5):555-66.
13. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein

- synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004;21(1):81-93.
14. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, et al. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-36.
15. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111: 2962-72.
16. Trepel M, Martens V, Doll C, Rahlff J, Gösch B, et al. Phenotypic detection of clonotypic B cells in multiple myeloma by specific immunoglobulin ligands reveals their rarity in multiple myeloma. *PLoS One*. 2012;7(2):e31998.
17. Agarwal JR, Matsui W. Multiple myeloma: a paradigm for translation of the cancer stem cell hypothesis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010;10(2):116-20.
18. Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Lett*. 2009;277(1):1-7.
19. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2895-900.
20. Paíno T, Ocio EM, Paiva B, San-Segundo L, Garayoa M, et al. CD20 positive cells are undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica*. 2012;97(7):1110-4.
21. Weiss BM. Multiethnic myeloma. *Blood*. 2013;121(16):3062-4.
22. Walker BA, Wardell CP, Ross FM, Morgan GJ. Identification of a novel t(7;14) translocation in multiple myeloma resulting in overexpression of EGFR. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(9):817-22.
23. Brennan SK, Matsui W. Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(11):1079-85.
24. Szczepek AJ, Bergsagel PL, Axelsson L, Brown CB, Belch AR, et al. CD34+ cells in the blood of patients with multiple myeloma express CD19 and IgH mRNA and have patient-specific IgH VDJ gene rearrangements. *Blood*. 1997;89(5):1824-33.
25. Pilarski LM, Seeberger K, Coupland RW, Eshpeter A, Keats JJ, et al. Leukemic B cells clonally identical to myeloma plasma cells are myelomagenic in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002;30(3):221-8.
26. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(6):2332-6.

27. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* 2008;68(1):190-7.
28. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood.* 1992;80(9):2326-35.
29. Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol.* 1994;87(1):68-74.
30. Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, et al. The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000;126(8):441-7.
31. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998;152(6):1655-65.
32. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res.* 2009;69(4):1545-52.
33. Li J, Zhu J, Cao B, Mao X. The mTOR signaling pathway is an emerging therapeutic target in multiple myeloma. *Curr Pharm Des.* 2013 Sep 3. Epub ahead of print.
34. Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Hershey J, Sonenberg N. eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways. *Cell Cycle.* 2010;9(20):4106-9.
35. Racanelli V, Leone P, Frassanito MA, Brunetti C, Perosa F, et al. Alterations in the antigen processing-presenting machinery of transformed plasma cells are associated with reduced recognition by CD8<sup>+</sup> T cells and characterize the progression of MGUS to multiple myeloma. *Blood.* 2010;115(6):1185-93.
36. Ozbas-Gerceker F, Bozman N, Gezici S, Pehlivan M, Yilmaz M, et al. Association of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms with hematological malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5213-7.
37. Dai Y, Pei XY, Rahmani M, Conrad DH, Dent P, et al. Interruption of the NF-kappaB pathway by Bay 11-7082

- promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(7):2761-70.
38. Cao H, Zhu K, Qiu L, Li S, Niu H, et al. Critical role of AKT protein in myeloma-induced osteoclast formation and osteolysis. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30399-410.
39. Fernandez-Pol JA. Increased serum level of RPMPS-1/S27 protein in patients with various types of cancer is useful for the early detection, prevention and therapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012;9(4):203-56.
40. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choismel V, O'Donohue MF, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):769-80.
41. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Lopez-Gonzalez JS. Transcriptional analysis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions. *Exp Lung Res*. 2013 Nov 18. Epub ahead of print.
42. Jagani Z, Wiederschain D, Loo A, He D, Mosher R, et al. The Polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2010;70(13):5528-38.
43. Podar K, Shringarpure R, Tai YT, Simoncini M, Sattler M, et al. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res*. 2004;64(20):7500-6.
44. Ashworth T, Roy AL. Phase specific functions of the transcription factor TFII-I during cell cycle. *Cell Cycle*. 2009;8(4):596-605.
45. Ni IB, Ching NC, Meng CK, Zakaria Z. Translocation t(11;14)(q13;q32) and genomic imbalances in multi-ethnic multiple myeloma patients: a Malaysian study. *Hematol Rep*. 2012;4(3):e19.
46. Strzalka W, Labecki P, Bartnicki F, Aggarwal C, Rapala-Kozik M, Tani C, et al. Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites. *J Exp Bot*. 2012;63(8):2971-83.
47. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(23):4627-34.
48. Chen WL, Kuo KT, Chou TY, Chen CL, Wang CH, et al. The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells: association with migration, invasion and

prediction of distant metastasis. *BMC Cancer*. 2012;12:273.

49. Potluri P, Davila A, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, O'Hearn S, et al. A novel NDUF1A mutation leads to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease. *Mol Genet Metab*. 2009;96(4):189-95.

50. Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, et al. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep*. 2003;10(5):1375-80.



## **Discusión**

---





En el presente trabajo hemos identificado patrones de expresión génica y de miRNAs diferentes para cada una de las fuentes de CPH empleadas en la actualidad en el TPH (MO, CU y SP movilizada). Hasta la fecha, no existían estudios genéticos y/o epigenéticos que explicasen las diferencias biológicas entre las CPH de las distintas fuentes y que a su vez pudiesen aclarar las diferencias de injerto observadas tras trasplante. Nosotros encontramos que las CPH poseen distintos perfiles de expresión génica y de miRNAs según su origen y, especialmente, observamos que las CPH movilizadas con G-CSF muestran un patrón de expresión muy diferenciado respecto al de las otras fuentes. Identificamos 36 miRNAs expresados diferencialmente entre las CPH de las tres fuentes, y la mayoría se encontraban sobreexpresados en las CPH movilizadas con G-CSF. De entre ellos, 8 miRNAs (*miR103*, *miR106a*, *miR125a-5p*, *miR126*, *miR140-5p*, *miR20a*, *miR221* y *miR320*) aparecían sobreexpresados solamente en las CPH movilizadas. Estos miRNAs están implicados en el control del ciclo celular, reprimiendo el proceso de apoptosis y promoviendo la proliferación y diferenciación celular<sup>138-141</sup>. Por el contrario, en las CPH de MO y CU encontramos el mismo número de miRNAs infra y sobreexpresados con un patrón de expresión muy similar. También pudimos identificar 43 genes diferencialmente expresados entre las CPH de las distintas fuentes, y volvimos a encontrar más diferencias en las CPH movilizadas con respecto a las CPH de las otras dos fuentes. De todos esos genes identificamos 10 genes reprimidos (*GHDC*, *IGLL1*, *KIAA0101*, *PDE4B*, *PHIP*, *SVOPL*, *TUBB2A*, *TYMS*, *ZFP91* y *ZWINT*) y 14 inducidos (*AHNAK*, *DPYSL3*, *GABRA1*, *HIST2H2BE*, *HOXA9*, *HSPA1A*, *IDS*, *LMNA*, *NACAD*, *NEAT1*, *NKX2-1*, *NR1H3*, *TPM2* y *ZBTB20*) en las CPH movilizadas con G-CSF. La mayoría de estos genes se encuentran involucrados en el ciclo celular, promoviendo la proliferación celular, la hematopoyesis y la respuesta inmune.<sup>142-145</sup> Además observamos que curiosamente 20 de estos genes son diana de los 36 miRNAs también identificados en este estudio; sus niveles de expresión son opuestos a los niveles de expresión de los miRNAs que actúan sobre ellos. Validamos los genes diana más interesantes mediante qRT-PCR y *Western Blot* y comprobamos de nuevo que las CPH de MO y CU tenían un patrón de expresión más parecido mientras que las CPH movilizadas tenían un perfil génico y proteico diferente. Todos estos resultados sugieren que en las CPH movilizadas con el G-CSF se produce una desregulación génica y de miRNAs que promueve la activación de numerosos genes implicados en proliferación y diferenciación celular, y la represión de algunos genes apoptóticos lo que, junto con las diferencias cuantitativas de CPH y otras poblaciones

celulares presentes en el inóculo en cada uno de los diferentes tipos de trasplante, podría explicar que las CPH movilizadas posean una mayor rapidez de injerto tras el trasplante.

Estos datos nos hicieron plantearnos si el G-CSF era el causante de esa desregulación génica y de miRNAs en las CPH movilizadas, y si esos cambios podían perdurar a largo plazo. La administración del G-CSF se considera un proceso seguro de acuerdo a numerosos estudios con miles de donantes y seguimientos de hasta 10 años, en los que no se describe un mayor riesgo de desarrollar enfermedades hematológicas<sup>146</sup>. Sin embargo, no se conocían los efectos del G-CSF a largo plazo en la expresión génica y de miRNAs de las CPH movilizadas. En nuestro estudio hemos demostrado que, aunque el G-CSF produce la máxima movilización de CPH al quinto día tras su administración, sus efectos sobre los CPH son duraderos. En este sentido, pudimos comprobar que el G-CSF produce la activación de numerosos miRNAs en las CPH tras su administración a los distintos tiempos analizados en este estudio. Seis de estos miRNAs (*miR182*, *miR21*, *miR339-3p*, *miR483-5p*, *miR500* y *miR576-3p*) permanecían activados desde el día 5 hasta un año después del tratamiento con la droga, algunos de los cuales actúan como onco-miRNAs inhibiendo la expresión de numerosos genes supresores de tumores<sup>147,148</sup>. Algunos de ellos como *miR21*, *miR182* y *miR339-3p* están involucrados en los procesos de ciclo celular, proliferación, angiogénesis y apoptosis y también se encuentran inducidos en varios tipos de cáncer y enfermedades hematológicas<sup>149,150</sup>. Estos datos nos plantearon la cuestión de si la sobreexpresión de estos miRNAs por el G-CSF podría dar lugar a modificaciones en cualquiera de estos procesos biológicos y si podría tener alguna implicación clínica. Igualmente, observamos que, el G-CSF produce cambios en la expresión de muchos genes que, también perduran al menos hasta un año después de la movilización y que están implicados en procesos como síntesis de proteínas, metabolismo de ácidos nucleicos, crecimiento y proliferación celular, muerte y supervivencia celular. Pudimos identificar 2424 genes alterados que mantenían sus niveles de expresión en las CPH desde día 5 hasta un año tras la administración del G-CSF. Entre ellos encontramos algunos genes interesantes (*AXL*, *BCR*, *CASP3*, *CXCL2*, *EGR1*, *EIF2AK2*, *FOS*, *HIF1A*, *HOXA9*, *MAP4K1*, *NFKBIA*, *NPM1*, *NUP98* y *TXNIP*) que están relacionados con el desarrollo de enfermedades hematológicas<sup>151,152</sup>. Además encontramos que 109 de todos estos genes son diana de los 6 miRNAs sobreexpresados desde el día 5 hasta un año tras la movilización identificados en este estudio. De este modo es concebible pensar que la represión de estos 109 genes podría estar relacionado con la sobreexpresión de sus correspondientes miRNAs reguladores. Tras validar por qRT-PCR algunos de estos genes confirmamos que el G-CSF produce cambios en la expresión génica de las CPH y observamos

interesantemente, que algunos de estos cambios son incluso mayores un año después de la movilización. Todos estos datos sugieren que el G-CSF puede alterar diversos procesos biológicos, por lo que sería conveniente un seguimiento más exhaustivo y prolongado de los donantes.

A continuación nos centramos en otra de las poblaciones celulares hematopoyéticas que, junto con las CPH, tiene una vida media más larga, como son los LBM. Considerando la longevidad de esta subpoblación linfocitaria, nos planteamos que podrían acumular alteraciones en el patrón de expresión génica vinculadas al envejecimiento, alguna de las cuáles podría estar relacionado con el desarrollo de enfermedades cuya frecuencia aumenta con la edad, como linfoma no-Hodking, leucemia linfoblástica crónica o MM. Por esta razón nos planteamos en primer lugar identificar genes expresados diferencialmente en los LBM de individuos de edad avanzada frente a individuos jóvenes y frente a LBN. Al contrario que otros grupos<sup>153</sup>, encontramos que existen diferencias significativas entre los perfiles de expresión de los LBM y LBN independientemente de la edad, lo que podría explicar las diferencias existentes en las propiedades biológicas de ambos subtipos celulares, incluyendo la vida media de ambas subpoblaciones. Cuando comparamos los perfiles de expresión de donantes mayores frente a jóvenes, no encontramos diferencias significativas en los LBN pero si en los LBM. En concreto, este estudio nos permitió identificar 193 genes expresados diferencialmente en los LBM de individuos de edad avanzada frente a jóvenes y a LBN relacionados con crecimiento y proliferación celular, expresión génica, cáncer y ciertas enfermedades hematológicas. Además estos genes están implicados en importantes rutas de señalización, la mayoría relacionadas con supervivencia celular, como las rutas de IL-8, HMGB1, PEDF y NF-KB. Cuando validamos algunos de estos genes de interés (*AKT1*, *BCL2*, *HRAS*, *ITGB2*, *ITGB3*, *JUN*, *MAPK1* and *NFKB1*) por qRT-PCR y por *Western blot* pudimos confirmar que existen diferencias significativas en la expresión génica de los LBM frente a los LBN, y además pudimos identificar algunos genes propios de LBM asociados con una edad avanzada, algunos de ellos ya descritos en varias enfermedades hematológicas que curiosamente padecen individuos añosos<sup>154-158</sup>. Estos datos sugieren que los LBM, debido a su larga supervivencia parecen ser más susceptibles a desarrollar determinadas neoplasias linfoides asociadas a la edad.

Una vez identificado este patrón de expresión génica en los LBM de sujetos añosos, nos planteamos si las CPM podrían mantener similitudes con los LBM, que justificasen su elevada supervivencia y resistencia a la apoptosis. Así, cuando comparamos los perfiles de expresión

génica de CPm frente a LBM y CP normales comprobamos que las CPm presentan un patrón de expresión intermedio entre ambos tipos celulares y, de hecho, se asemeja más al de los LBM. Con este análisis identificamos en las CPm 1349 genes con un patrón de expresión similar en los LBM y diferente en las CP normales, muchos de ellos implicados en los procesos de muerte y supervivencia celular, proliferación y síntesis de proteínas afectando a las vías de señalización de EIF2 y mTOR, regulación de eIF4 y p70S6K, presentación de antígenos y función mitocondrial. Algunas de estas rutas, como la que implica a varios genes de los complejos mitocondriales, no se han descrito antes en el MM<sup>159</sup>. Identificamos otros genes no descritos previamente en las CPm, que podrían ser posibles dianas terapéuticas. *RPS15*, *RPS27* y *HNRNPA3* se encuentran sobreexpresados en CPm, y codifican varias proteínas ribosomales, lo que parece indicar que el proceso de traducción se ve afectado en el MM<sup>160,161</sup>. *SF3B1* es un gen que forma parte de la maquinaria de maduración y procesamiento del ARNm que ha sido identificado en otras enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica crónica o los síndromes mielodisplásicos, y que parece que podría estar relacionada con la estabilidad genómica y modificación epigenética<sup>162</sup>. *COX5A*, *NDFUAI* y *SDHD* son genes mitocondriales que también han sido identificados en otras enfermedades<sup>163-165</sup> y podrían servir como diana para nuevas estrategias terapéuticas en el MM. Todos estos datos sugieren que durante el proceso de diferenciación del LBM a una CP podrían darse fallos que afecten a los procesos de activación y silenciamiento de algunos genes, que podrían llevar a la transformación maligna de las CPm. En definitiva, la CPm “arrastraría” un patrón de expresión génica asincrónico, manteniendo la expresión de genes relacionados con supervivencia celular cuya expresión normalmente debe inhibirse en el tránsito a CP, mientras que adquieren la expresión de otros genes relacionados con proliferación y activación celular que se activan en condiciones normales en este tránsito, dando lugar a una célula con un perfil de expresión génica intermedio entre LBM y CP normal.

## **Conclusiones**

---



**En relación a las CPH:**

1. Existen diferencias significativas en los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las CPH en función de su procedencia.
2. El patrón de expresión de las CPH de SP movilizadas con G-CSF es muy distinto al de las CPH procedentes de MO y CU, las cuales parecen tener patrones de expresión más similares.
3. El G-CSF modifica los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las CPH de donantes sanos.
4. Muchos de los cambios producidos por el G-CSF en el patrón de expresión de las CPH persisten al menos un año después del proceso de movilización.

**En relación a las células B:**

1. Los perfiles de expresión génica de los LBM y LBN son diferentes.
2. La edad afecta al patrón de expresión génica de los LBM, a diferencia de los LBN en los que la edad no modifica los perfiles de expresión de manera significativa.
3. Las CPM tienen un patrón de expresión génica intermedio entre un LBM y una CP normal; mantienen la expresión de genes implicados en supervivencia celular, que deberían estar normalmente inactivos en el tránsito de un LBM a una CP, mientras que al mismo tiempo adquieren genes relacionados con activación y proliferación celular como una CP normal.
4. Las CPM poseen elevados niveles de expresión de genes de supervivencia y genes anti-apoptóticos, por lo que se asemejan más a un LBM que a una CP normal.





## **Bibliografía**

---



1. Pelus LM, Fukuda S: Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia* 2008;22:466-473.
2. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000;113 ( Pt 1):5-10.
3. Bhartiya D, Boheler KR, Rameshwar P. Multipotent to pluripotent properties of adult stem cells. *Stem Cells Int.* 2013;2013:813780.
4. Hsu YC, Chen SL, Wang DY, Chiu IM. Stem cell-based therapy in neural repair. *Biomed J.* 2013;36(3):98-105.
5. Li DR, Cai JH. Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(24):4504-10.
6. Bareja A, Holt JA, Luo G, Chang C, Lin J Hinken AC, Freudenberg JM, Kraus WE, Evans WJ, Billin AN. Human and mouse skeletal muscle stem cells: convergent and divergent mechanisms of myogenesis. *PLoS One.* 2014;9(2):e90398.
7. Sayadi L, Jafaraghaee F, Jeddian A, Atrian MK, Akbari A, Tootoonchian F. Views of patients undergo hematopoietic stem cell transplantation on their basic needs. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2013;7(2):23-9.
8. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):340-52.
9. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2:1366-9.
10. Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2011;117(24):6411-6.
11. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet.* 1988;1(8596):1194-8.
12. Prindull G, Prindull B, Meulen N. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand.* 1978;67(4):413-6.
13. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321(17):1174-8.
14. Brown RA, Adkins D, Khoury H, Vij R, Goodnough LT, Shenoy S, DiPersio JF. Long-term follow-up of high-risk allogeneic peripheral-blood stem-cell transplant

- recipients: graft-versus-host disease and transplant-related mortality. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):806-12.
15. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S, Ehninger G, Johnston L, Maziarz RT, Pulsipher MA, Porter DL, Mineishi S, McCarty JM, Khan SP, Anderlini P, Bensinger WI, Leitman SF, Rowley SD, Bredeson C, Carter SL, Horowitz MM, Confer DL; Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2012;367(16):1487-96.
  16. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol.* 2004;32:397-407.
  17. Liao R, Sun J, Zhang L, Lou G, Chen M, Zhou D, Chen Z, Zhang S. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem.* 2008;104(3):805-17.
  18. Merkerova M, Vasikova A, Belickova M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev.* 2010;19:17-26.
  19. Arber C, Halter J, Stern M, Rovó A, Gratwohl A, Tichelli A. Graft source determines human hematopoietic progenitor distribution pattern within the CD34(+) compartment. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(5):650-8.
  20. Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, Tani Y, Nakano T. Differences between peripheral blood and cord blood in the kinetics of lineage-restricted hematopoietic cells: implications for delayed platelet recovery following cord blood transplantation. *Stem Cells.* 2003;21(2):143-51.
  21. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
  22. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2008;8(4):290-301.
  23. Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012;741:152-70.
  24. Thoren LA, Liuba K, Bryder D et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* 2008;180(4):2045-2053.
  25. Arai F, Hirao A, Ohmura M et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118(2):149-161.

26. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T et al. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 2003;19(2):257-267.
27. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10(1):64-71.
28. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 2007;1(6):685-697.
29. Stier S, Ko Y, Forkert R et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 2005;201(11):1781-1791.
30. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2008;2(3):274-283.
31. Nemeth MJ, Bodine DM. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 2007;17(9):746-758.
32. Chadwick N, Nostro MC, Baron M et al. Notch signaling induces apoptosis in primary human CD34<sub>+</sub> hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2007;25(1):203-210.
33. Abrams RA, Glaubiger D, Appelbaum FR, Deisseroth AB: Result of attempted hematopoietic reconstitution using isologous peripheral blood mononuclear cells: a case report. *Blood* 1980;56:516-520.
34. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD: Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986;14:192-196.
35. Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ: Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 1985;61:739-745.
36. Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Flidner TM: Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-532.

37. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3:687-694.
38. Semerad CL, Christopher M, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al: G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005;106:3020-3027.
39. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ: Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003;111:187-196.
40. Rinaldi C, Savignano C, Pasca S, Sperotto A, Patriarca F, Isola M, Fanin R, De Angelis V. Efficacy and safety of peripheral blood stem cell mobilization and collection: a single-center experience in 190 allogeneic donors. *Transfusion* 2012;52(11):2387-94.
41. Halter J, Kodera Y, Ispizua AU, Greinix HT, Schmitz N, Favre G, Baldomero H, Niederwieser D, Apperley JF, Gratwohl A. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. *Haematologica*. 2009;94(1):94-101.
42. Hölig K. G-CSF in Healthy Allogeneic Stem Cell Donors. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(4):225-235.
43. Tassi C, Tazzari PL, Bonifazi F, Giudice V, Nannetti A, Ricci F, Rizzi S, Bandini G, Conte R. Short- and long-term haematological surveillance of healthy donors of allogeneic peripheral haematopoietic progenitors mobilized with G-CSF: a single institution prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:289–294.
44. Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, Storb R, Appelbaum FR, Rowley SD, Bensinger WI. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:85–89.
45. Tehranchi R, Fadeel B, Schmidt-Mende J, Forsblom AM, Emanuelsson E, Jadersten M, Christensson B, Hast R, Howe RB, Samuelsson J, Zhivotovsky B, Hellström-Lindberg E. Antiapoptotic role of growth factors in the myelodysplastic syndromes: concordance between in vitro and in vivo observations. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6291-9.
46. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: results of a long-term survey. *Blood* 2007;109:93–99.

47. Nagler A, Korenstein-Ilan A, Amiel A, Avivi L. Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells. *Exp Hematol* 2004;32:122–130.
48. Hirsch B, Oseth L, Cain M, Trader E, Pulkrabek S, Lindgren B, Luo X, Clay M, Miller J, Confer D, Weisdorf D, McCullough J. Effects of granulocyte colony stimulating factor on chromosome aneuploidy and replication asynchrony in healthy peripheral blood stem cell donors. *Blood* 2011;118:2602–2608.
49. Shapira MY, Kaspler P, Samuel S, Shoshan S, OrR. Granulocyte colony stimulating factor does not induce long-term DNA instability in healthy peripheral blood stem cell donors. *Am J Hematol* 2003;73:33–36.
50. Hernandez JM, Castilla C, Gutierrez NC, Isidro IM, Delgado M, de las Rivas J, Ferminan E, Garcia JL, Ocio EM, del Canizo MC, San Miguel JF: Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. *Leukemia* 2005;19:1088–1091.
51. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006;6:107–116.
52. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190–202.
53. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487–513.
54. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EF, Reinders MJ, Lankester AC, Re´ve´sz T, Staal FJ, van Dongen JJ. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 2005;175:5912–5922.
55. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R, Fujii N, Kishimoto T, Katsura Y, Nagasawa T. The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/ pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 2001;15:323–334.
56. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004;20:707–718.
57. Hillion S, Rochas C, Youinou P, Jamin C. Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes. *Autoimmun Rev* 2009; 8:599–604.



58. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. St. Louis, MO: WB Saunders Company; 2007.
59. Fuentes-Pananá EM, Bannish G, van der Voort D, King LB, Monroe JG. Ig alpha/Ig beta complexes generate signals for B cell development independent of selective plasma membrane compartmentalization. *J Immunol.* 2005;174:1245-52.
60. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60B:1–13.
61. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996;5:505–511.
62. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190–202.
63. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2065-75.
64. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med.* 1998;188(9):1691-703.
65. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188(9):1679-89.
66. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF Jr, Marti GE, Rawstron AC, Van Zelm MC, Van Dongen JJ, Johnsen HE, Klein B, Orfao A. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78 Suppl 1:S47-60.
67. Good KL, Tangye SG. Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13420-5.
68. Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol.* 2009;182(2):890-901.

69. Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood*. 2009;113(11):2461-9.
70. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105(4):1614-21.
71. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M; Myeloma Stem Cell Network. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica*. 2010;95(6):1016-20.
72. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;5:230–242.
73. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004;21(1):81-93.
74. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-36.
75. Bladé J, Cibeira MT, Fernández de Larrea C, Rosiñol L. Multiple myeloma. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii313-9.
76. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M; International Myeloma Working Group. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-7.

77. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ 3rd. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2006;354(13):1362-9.
78. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002;346(8):564-9.
79. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ 3rd, Rajkumar SV. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007;356(25):2582-90.
80. Fernández de Larrea C, Kyle RA, Durie BG, Ludwig H, Usmani S, Vesole DH, Hajek R, San Miguel JF, Sezer O, Sonneveld P, Kumar SK, Mahindra A, Comenzo R, Palumbo A, Mazumber A, Anderson KC, Richardson PG, Badros AZ, Caers J, Cavo M, LeLeu X, Dimopoulos MA, Chim CS, Schots R, Noeul A, Fantl D, Mellqvist UH, Landgren O, Chanan-Khan A, Moreau P, Fonseca R, Merlini G, Lahuerta JJ, Bladé J, Orłowski RZ, Shah JJ; International Myeloma Working Group. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia.* 2013;27(4):780-91.
81. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood.* 2002;99(10):3735-41.
82. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood.* 1998;92(9):3025-34.
83. Lauring J, Abukhdeir AM, Konishi H, Garay JP, Gustin JP, Wang Q, Arceci RJ, Matsui W, Park BH. The multiple myeloma associated MMSET gene contributes to cellular adhesion, clonogenic growth, and tumorigenicity. *Blood.* 2008;111(2):856-64.
84. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell.* 2004;5(2):191-9.

85. Shaughnessy J Jr, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):217-23.
86. Stralen E, Leguit RJ, Begthel H, Michaux L, Buijs A, Lemmens H, Scheiff JM, Doyen C, Pierre P, Forget F, Clevers HC, Bast B. MafB oncoprotein detected by immunohistochemistry as a highly sensitive and specific marker for the prognostic unfavorable t(14;20) (q32;q12) in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2009;23(4):801-3.
87. Kuehl WM, Bergsagel PL. MYC addiction: a potential therapeutic target in MM. *Blood*. 2012;120(12):2351-2.
88. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R; Intergroupe Francophone du Myélome. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 2001;98(10):3082-6.
89. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7):2229-38.
90. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;80(1):203-8.
91. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, Ahmann G, Price-Troska T, Henderson K, Chung TH, Kim S, Mulligan G, Bryant B, Carpten J, Gertz M, Rajkumar SV, Lacy M, Dispenzieri A, Kyle R, Greipp P, Bergsagel PL, Fonseca R. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res*. 2007;67(7):2982-9.
92. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:117-26.
93. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, Johnson DC, Gonzalez D, Dagrada GP, Protheroe RK, Konn ZJ, Stockley DM, Gregory WM, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116(15):e56-65.

94. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, Dagrada G, Konn ZJ, Gregory WM, Jackson GH, Child JA, Davies FE, Morgan GJ; NCRI Haematology Oncology Studies Group. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7776-84.
95. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia.* 2001;15(6):981-6.
96. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Lodé L, Decaux O, Godmer P, Garderet L, Voillat L, Facon T, Stoppa AM, Marit G, Hulin C, Casassus P, Tiab M, Voog E, Randriamalala E, Anderson KC, Moreau P, Munshi NC, Minvielle S. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia.* 2013;27(2):473-81.
97. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling RP, Gertz MA, Henderson K, Greipp PR, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Bergsagel PL, Stewart AK, Fonseca R. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia.* 2008;22(5):1044-52.
98. Lodé L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuillème S, Richebourg S, Magrangeas F, Ifrah N, Champion L, Traullé C, Guilhot F, Caillot D, Marit G, Mathiot C, Facon T, Attal M, Harousseau JL, Moreau P, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica.* 2010;95(11):1973-6.
99. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, Ross FM, Johnson DC, Gonzalez D, Chiecchio L, Dachs Cabanas E, Dagrada GP, Nightingale M, Protheroe RK, Stockley D, Else M, Dickens NJ, Cross NC, Davies FE, Morgan GJ. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood.* 2007;110(9):3291-300.
100. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM, Staudt LM. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2007;12(2):115-30.

101. Gmidène A, Saad A, Avet-Loiseau H. 8p21.3 deletion suggesting a probable role of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate tumor suppressor genes in the pathogenesis of multiple myeloma. *Med Oncol*. 2013;30(2):489.
102. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*. 1996;87(3):1104-12.
103. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):131-44.
104. Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*. 2005;105(1):317-23.
105. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, Pucciarini A, Bigerna B, Pacini R, Wells VA, Sportoletti P, Pettrossi V, Mannucci R, Elliott O, Liso A, Ambrosetti A, Pulsoni A, Forconi F, Trentin L, Semenzato G, Inghirami G, Capponi M, Di Raimondo F, Patti C, Arcaini L, Musto P, Pileri S, Haferlach C, Schnittger S, Pizzolo G, Foà R, Farinelli L, Haferlach T, Pasqualucci L, Rabadan R, Falini B. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2305-15.
106. Patrawala S, Puzanov I. Vemurafenib (RG67204, PLX4032): a potent, selective BRAF kinase inhibitor. *Future Oncol*. 2012;8(5):509-23.
107. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. 1999;10(1):105-15.
108. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*. 1995;85(4):863-72.

109. Tu Y, Renner S, Xu F, Fleishman A, Taylor J, Weisz J, Vescio R, Rettig M, Berenson J, Krajewski S, Reed JC, Lichtenstein A. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res.* 1998;58(2):256-62.
110. Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol.* 2003;171(7):3863-71.
111. De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol.* 2000;109(4):823-8.
112. Ramakrishnan V, Kimlinger T, Haug J, Painuly U, Wellik L, Halling T, Rajkumar SV, Kumar S. Anti-myeloma activity of Akt inhibition is linked to the activation status of PI3K/Akt and MEK/ERK pathway. *PLoS One.* 2012;7(11):e50005.
113. Dib A, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM. Methylation and expression of the p16INK4A tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Blood.* 2007;109(3):1337-8.
114. Kummur S, Chen A, Parchment RE, Kinders RJ, Ji J, Tomaszewski JE, Doroshow JH. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Med.* 2012;10:25.
115. Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Séraphin B. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(1):15-22.
116. Ibrahim H, Wilusz J, Wilusz CJ. RNA recognition by 3'-to-5' exonucleases: the substrate perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779(4):256-65.
117. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, Zheng M, Mani M, Henderson J, Pinkus GS, Munshi N, Horner J, Ivanova EV, Protopopov A, Anderson KC, Tonon G, DePinho RA. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell.* 2007;11(4):349-60.
118. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 2001;412(6844):300-7.
119. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, Powell J, Dave S, Yu X, Zhao H, Zeng Y, Chen B, Epstein J, Staudt LM. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature.* 2008;454(7201):226-31.
120. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, Mo T, Brahmachary M, Shen Q, Chadburn A, Rajewsky K, Tarakhovsky A, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. BLIMP1 is a tumor

- suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2010;18(6):568-79.
- 121.Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 2008;642(1-2):1-13.
- 122.Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2011;117(2):553-62.
- 123.Brito JL, Walker B, Jenner M, Dickens NJ, Brown NJ, Ross FM, Avramidou A, Irving JA, Gonzalez D, Davies FE, Morgan GJ. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2009;94(1):78-86.
- 124.Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE, Drier Y, Fonseca R, Gabriel SB, Hofmeister CC, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Krishnan A, Levy J, Liefeld T, Lonial S, Mahan S, Mfuko B, Monti S, Perkins LM, Onofrio R, Pugh TJ, Rajkumar SV, Ramos AH, Siegel DS, Sivachenko A, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Voet D, Winckler W, Zimmerman T, Carpten J, Trent J, Hahn WC, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-72.
- 125.Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:857-866.
- 126.Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, Todoerti K, Mosca L, Fabris S, Sales G, Deliliers GL, Bicciato S, Lombardi L, Bortoluzzi S, Neri A. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(25):e20-6.
- 127.Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, Fermiñán E, Martín-Jiménez P, Chillón C, Risueño A, Hernández JM, García-Sanz R, González M, San Miguel JF. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia*. 2010;24(3):629-37.
- 128.Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM Jr, Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti



- D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010;18(4):367-81.
- 129.**Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008;40(1):43-50.
- 130.**Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol*. 1994;87(1):68-74.
- 131.**Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Huber H. The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126(8):441-7.
- 132.**Brennan SK, Matsui W. Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(11):1079-85.
- 133.**Pilarski LM, Seeberger K, Coupland RW, Eshpeter A, Keats JJ, Taylor BJ, Belch AR. Leukemic B cells clonally identical to myeloma plasma cells are myelomagenic in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002;30(3):221-8.
- 134.**Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(6):2332-6.
- 135.**Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008;68(1):190-7.
- 136.**Berenson JR, Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Lee CC, Schiller G, Berenson RJ, Lichtenstein AK. Multiple myeloma clones are derived from a cell late in B lymphoid development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;194:25-33.
- 137.**Szcepek AJ, Bergsagel PL, Axelsson L, Brown CB, Belch AR, Pilarski LM. CD34+ cells in the blood of patients with multiple myeloma express CD19 and IgH mRNA and have patient-specific IgH VDJ gene rearrangements. *Blood*. 1997;89(5):1824-33.
- 138.**Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J, Han Q, Liao L, Shao C, Zhao RC. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adiposederived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2013;10:313-324.
- 139.**Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Schira J, Müller HW, Wernet P. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert

- to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS ONE*. 2011;6:e16138.
- 140.**Huang X, Gschweng E, Van Handel B, Cheng D, Mikkola HK, Witte ON. Regulated expression of microRNAs-126/126\* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117:2157-2165.
- 141.**Kim BM, Choi MY. Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in *Dgcr8*-deficient embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426:183-189.
- 142.**Kouno M, Kondoh G, Horie K, Komazawa N, Ishii N, Takahashi Y, Takeda J, Hashimoto T. Ahnak/Desmoyokin is indispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123:700-707.
- 143.**Freire J, Covelo G, Sarandeses C, Díaz-Jullien C, Freire M. Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol*. 2001;79:123-131.
- 144.**Selkirk GA, McLellan TM, Wright HE, Rhind SG. Expression of intracellular cytokines, HSP72, and apoptosis in monocyte subsets during exertional heat stress in trained and untrained individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R575-R586.
- 145.**Vaknin UA, Hann SR. The alpha1 subunit of GABAA receptor is repressed by c-myc and is pro-apoptotic. *J Cell Biochem*. 2006;97:1094-1103.
- 146.**de la Rubia J, de Arriba F, Arbona C, Pascual MJ, Zamora C, Insunza A, Martínez D, Paniagua C, Díaz MA, Sanz MA. Follow-up of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection. *Results of the Spanish Donor Registry. Haematologica*. 2008;93(5):735-40.
- 147.**Xiong Q, Zhong Q, Zhang J, Yang M, Li C, Zheng P, Bi LJ, Ge F. Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2012;11(4):2078-90.
- 148.**Chigrinova E, Mian M, Shen Y, Greiner TC, Chan WC, Vose JM, Inghirami G, Chiappella A, Baldini L, Ponzoni M, Ferreri AJ, Franceschetti S, Gaidano G, Tucci A, Facchetti F, Lazure T, Lambotte O, Montes-Moreno S, Piris MA, Zucca E, Kwee I, Bertoni F. Integrated profiling of diffuse large B-cell lymphoma with 7q gain. *Br J Haematol*. 2011;153(4):499-503.

149. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* . 2009;13:39–53. *J Cell Mol Med*. 2009;13(1):39-53.
150. Chigrinova E, Mian M, Shen Y, Greiner TC, Chan WC, Vose JM, Inghirami G, Chiappella A, Baldini L, Ponzoni M, Ferreri AJ, Franceschetti S, Gaidano G, Tucci A, Facchetti F, Lazure T, Lambotte O, Montes-Moreno S, Piris MA, Zucca E, Kwee I, Bertoni F. Integrated profiling of diffuse large B-cell lymphoma with 7q gain. *Br J Haematol*. 2011;153(4):499-503.
151. Perazzona B, Lin H, Sun T, Wang Y, Arlinghaus R. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene*. 2008;27(15):2208-14.
152. Provencio M, Martín P, García V, Candia A, Sánchez AC, Bellas C. Caspase 3a: new prognostic marker for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(11):2021-30.
153. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J Jr, Miljkovic V, Cattoretti G, Califano A, Dalla-Favera R. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2639-44.
154. Zöllinger A, Stühmer T, Chatterjee M, Gattenlöhner S, Haralambieva E, Müller-Hermelink HK, Andrusis M, Greiner A, Wesemeier C, Rath JC, Einsele H, Bargou RC. Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood*. 2008;112(8):3403-11.
155. Scarfò L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immun Lett*. 2013;155(1-2):36-9.
156. Chen LJ, Xu JR, Zhou WH. Role of bone marrow microenvironment in regulation of AP-1 gene expression in multiple myeloma cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye XueZaZhi*. 2010;18(1):103-6.
157. Jazwinski SM, Kim S, Dai J, Li L, Bi X, Jiang JC, Arnold J, Batzer MA, Walker JA, Welsh DA, Lefante CM, Volaufova J, Myers L, Su LJ, Hausman DB, Miceli MV, Ravussin E, Poon LW, Cherry KE, Welsch MA. HRAS1 and LASS1 with APOE are associated with human longevity and healthy aging. *Aging Cell*. 2010;9(5):698-708.
158. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*. 2000;267(12):3828-35.
159. Dai Y, Pei XY, Rahmani M, Conrad DH, Dent P, Grant S. Interruption of the NF-kappaB pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial

- dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(7):2761-70.
- 160.** Fernandez-Pol JA. Increased serum level of RPMPS-1/S27 protein in patients with various types of cancer is useful for the early detection, prevention and therapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012;9(4):203-56.
- 161.** Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Lopez-Gonzalez JS. Transcriptional analysis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions. *Exp Lung Res*. 2014;40(1):12-21.
- 162.** Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(23):4627-34.
- 163.** Chen WL, Kuo KT, Chou TY, Chen CL, Wang CH, Wei YH, Wang LS. The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells: association with migration, invasion and prediction of distant metastasis. *BMC Cancer*. 2012;12:273.
- 164.** Potluri P, Davila A, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, O'Hearn S, Hancock S, Simon M, Scheffler IE, Wallace DC, Procaccio V. A novel NDUFA1 mutation leads to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease. *Mol Genet Metab*. 2009;96(4):189-95.
- 165.** Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep*. 2003;10(5):1375-80.