



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**HEMATOLOGÍA**

---



**TESIS DOCTORAL**

**OPTIMIZACIÓN Y ANÁLISIS CRÍTICO DEL ESTUDIO DE LA  
MONITORIZACIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL  
MEDIANTE ASO RQ-PCR EN PACIENTES CON MIELOMA  
MÚLTIPLE. COMPARACIÓN CON LA CITOMETRÍA DE FLUJO**

Noemí Puig Morón

2013



La presente tesis doctoral corresponde a un compendio de 3 trabajos previamente publicados o aceptados para publicación, que se especifican a continuación:

**1) *Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma***

Noemí Puig<sup>1</sup>, María E. Sarasquete<sup>1,2</sup>, Miguel Alcoceba<sup>1,2</sup>, Ana Balanzategui<sup>1</sup>, María C. Chillón<sup>1,2</sup>, Elena Sebastián<sup>1</sup>, Marcos González Díaz<sup>1,2</sup>, Jesús F. San Miguel<sup>1,2</sup> y Ramón García Sanz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; <sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca

European Journal of Haematology 2012; 89: 328-335; DOI: 10.1111/ejh. 12000

**2) *The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma***

Noemí Puig<sup>1</sup>, María E. Sarasquete<sup>1,2</sup>, Miguel Alcoceba<sup>1,2</sup>, Ana Balanzategui<sup>1</sup>, María C. Chillón<sup>1,2</sup>, Elena Sebastián<sup>1</sup>, Luis A. Marín<sup>1</sup>, Marcos González Díaz<sup>1,2</sup>, Jesús F. San Miguel<sup>1,2</sup> y Ramón García Sanz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; <sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca

Annals of Hematology 2013, 92: 97-100; DOI: 10.1007/s00277-012-1566-3

**3) *Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry***

Noemí Puig<sup>1</sup>, María E. Sarasquete<sup>1</sup>, Ana Balanzategui<sup>1</sup>, Joaquín Martínez<sup>2</sup>, Bruno Paiva<sup>1</sup>, Herbert García<sup>1</sup>, Silvia Fumero<sup>1</sup>, Cristina Jiménez<sup>1</sup>, Miguel Alcoceba<sup>1</sup>, María C. Chillón<sup>1</sup>, Elena Sebastián<sup>1</sup>, Luis Marín<sup>1</sup>, María A. Montalbán<sup>2</sup>, María V. Mateos<sup>1</sup>, Albert Oriol<sup>3</sup>, Luis Palomera<sup>4</sup>, Javier de la Rubia<sup>5</sup>, María B Vidriales<sup>1</sup>, Joan Bladé<sup>6</sup>, Juan José Lahuerta<sup>2</sup>, Marcos González Díaz<sup>1</sup>, Jesús F San Miguel<sup>1</sup>, Ramón García Sanz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid

<sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona

<sup>4</sup>Servicio de Hematología, Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza

<sup>5</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Universidad Católica San Vicente Mártir, Valencia

<sup>6</sup>Servicio de Hematología, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona

Enviado a Leukemia (JILL13-LEU-0580); reenviado con correcciones el 17/6/2013.

D. Jesús F. San Miguel Izquierdo, Catedrático de Hematología y Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, D. Marcos González Díaz, Doctor en Medicina, Profesor Titular de la Facultad de Medicina y Jefe de Sección del Departamento de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y D. Ramón García Sanz, Doctor en Medicina, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina y Médico Adjunto del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo doctoral por compendio de artículos realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> Noemí Puig Morón, titulado *“OPTIMIZACIÓN Y ANÁLISIS CRÍTICO DE LA MONITORIZACIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL MEDIANTE ASO RQ-PCR EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE. COMPARACIÓN CON LA CITOMETRÍA DE FLUJO”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 9 de Julio de 2013

Fdo. Prof. Jesús F. San Miguel      Fdo. Dr. Marcos González Díaz Fdo.      Dr. Ramón García Sanz



## **Glosario de abreviaturas**

---





**AG:** antígeno  
**ASO:** oligonucleótido específico de alelo  
**BCR:** receptor de célula B  
**C:** región constante  
**CDR:** región determinante de complementariedad  
**CMF:** citometría de flujo  
**CP:** célula plasmática  
**CPN:** célula plasmática normal  
**CPP:** célula plasmática patológica  
**C<sub>T</sub>:** ciclo umbral  
**D:** región de diversidad  
**EF:** electroforesis  
**EMR:** enfermedad mínima residual  
**FR:** región conservada  
**IF:** inmunofijación  
**IG:** inmunoglobulina  
**IgH:** cadenas pesadas de las inmunoglobulinas  
**IGH:** genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas  
**IgK:** cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas  
**IGK:** genes de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas  
**IgL:** cadenas ligeras lambda de las inmunoglobulinas  
**IGL:** genes de las cadenas ligeras lambda de las inmunoglobulinas  
**J:** región de unión  
**κ:** kappa  
**Kb:** kilobases  
**λ:** lambda  
**LB:** linfocito B  
**MM:** mieloma múltiple  
**MO:** médula ósea  
**NA:** no alcanzado/a  
**PB:** pares de bases  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**RC:** repuesta completa

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

**RSS:** secuencia señal de la recombinación

**SG:** supervivencia global

**SIG:** inmunoglobulina de superficie

**SLP:** supervivencia libre de progresión

**TASPE:** trasplante autólogo de sangre periférica

**TDT:** deoxinucleotidil transferasa terminal

**TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos

**V:** región variable

# Índice

---



## INTRODUCCIÓN

### 1 GENERALIDADES SOBRE EL MIELOMA MÚLTIPLE

### 2 TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

### 3 DETECCIÓN DE ENFERMEDAD TRAS TRATAMIENTO EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

#### 3.1 Criterios de respuesta al tratamiento

#### 3.2 Estrategias para la detección de enfermedad residual tras tratamiento

### 4 ESTUDIOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD RESIDUAL EN MIELOMA MÚLTIPLE

#### 4.1 ONTOGENIA DE LA CÉLULA TUMORAL

#### 4.2 RECEPTOR DE LA CÉLULA B

##### 4.2.1 Genes de las inmunoglobulinas

##### 4.2.1.1 Variabilidad genética de las inmunoglobulinas

##### 4.2.2 Diferenciación linfoide B normal

##### 4.2.2.1 *Maduración independiente del antígeno*

##### 4.2.2.1.1 Recombinación secuencial de los genes de las inmunoglobulinas durante la diferenciación linfoide B

##### 4.2.2.1.2 Mecanismo de recombinación VH-JH

##### 4.2.2.1.3 Estructura de la unión VH-JH

##### 4.2.2.1.4 Edición del receptor

##### 4.2.2.2 *Maduración dependiente del antígeno*

##### 4.2.2.2.1 Hipermutación somática

##### 4.2.2.2.2 Cambio de isotipo

#### 4.3 DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN MIELOMA MEDIANTE PCR

##### 4.3.1 Análisis de los estudios sobre detección de enfermedad mínima residual en mieloma mediante PCR

## HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

## MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

1. Artículo 1: *Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma*
2. Artículo 2: *The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma*
3. Artículo 3: *Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry*

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFÍA



# Introducción

---





## 1. GENERALIDADES

El MM (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por una acumulación incontrolada de CP (CP) clonales en la MO (MO), la producción de una inmunoglobulina (IG) monoclonal detectable en suero y/o orina, y la presencia de lesiones osteolíticas. Es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia de 3-5 casos/100.000 habitantes/año y, aunque es el segundo cáncer hematológico más frecuente tras el linfoma, sólo supone aproximadamente un 1,5% de todas las neoplasias y un 15% de las hemopatías malignas. Presenta gran variabilidad geográfica y racial, con mayor incidencia entre la población negra americana, y es más frecuente en varones. La edad media de los pacientes con MM en el momento del diagnóstico es de 69 años en varones y 71 en mujeres y aparece excepcionalmente antes de los 30 años de edad. <sup>1</sup>

Según el *International Myeloma Working Group* (Tabla 1), el diagnóstico de MM sintomático requiere los siguientes criterios: 1) presencia de una proteína monoclonal en suero u orina (en caso de mielomas no secretores, esta condición puede sustituirse por la presencia de más de un 10% de CP clonales en MO), 2) detección de  $\geq 10\%$  CP clonales en MO y 3) presencia de uno o más de los siguientes: hipercalcemia ( $\geq 11,5$  mg/dL), insuficiencia renal (creatinina  $> 2$  mg/dL), anemia (hemoglobina  $< 10$  g/dL o 2 g/dL por debajo del rango de normalidad), enfermedad ósea (lesiones líticas, osteopenia severa o fracturas patológicas). Actualmente existe consenso sobre que los pacientes con MM sólo deben recibir tratamiento si presentan signos/síntomas CRAB (siglas que en inglés corresponden a *increased Calcium, Renal failure, Anaemia* y *Bone lesions*) tal y como quedan definidos en el apartado 3. <sup>2</sup>

**Tabla 1.** Criterios establecidos por el *International Myeloma Working Group* para el diagnóstico de las discrasias de células plasmáticas (GMSI, MM quiescente y MM sintomático)

<b>Patología/Criterios</b>	
<b>GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO</b>	
	Componente M en suero < 3g/dL
	<10% de células plasmáticas clonales en médula ósea
	Ausencia de daño tisular (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y/o lesiones óseas, atribuibles a la discrasia de células plasmáticas)
<b>MIELOMA MÚLTIPLE QUIESCENTE (O ASINTOMÁTICO)</b>	
	Componente M en suero (IgG o IgA) ≥ 3g/dL y/o ≥ 10% de células plasmáticas clonales en médula ósea
	Ausencia de daño tisular (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y/o lesiones óseas, atribuibles a la discrasia de células plasmáticas)
<b>MIELOMA MÚLTIPLE SINTOMÁTICO</b>	
	≥ 10% de células plasmáticas clonales en médula ósea
	Componente M en suero y/o orina (salvo en pacientes con mieloma no secretor)*
	Daño tisular atribuible a la discrasia de células plasmáticas, específicamente:
	1. Hipercalcemia: calcio sérico ≥ 11,5mg/dL
	2. Insuficiencia renal: creatinina sérica >2mg/dL
	3. Anemia: normocítica, normocrómica con hemoglobina <10g/dL o >2g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad
	4. Lesiones óseas: líticas, osteopenia severa o fracturas patológicas

\*Para el diagnóstico de mieloma no secretor se requiere >10% de células plasmáticas clonales en médula ósea. Adaptada de Dimopoulos *et al*; Blood 2011; 117(18): 4701-4705

## 2. TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

El MM es, todavía, una enfermedad básicamente incurable. Durante 3 décadas (1969-1989), el tratamiento se basó en la combinación de melfalán y prednisona, con la que se obtenía algún tipo de respuesta en el 55-60% de los pacientes, con excepcionales respuestas completas (RCs) y una mediana de supervivencia de 2,5-3 años. La introducción de pautas de poliquimioterapia como VAD (vincristina, adriamicina, dexametasona), VBMCP (vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida y prednisona), VBAD (vincristina, BCNU, adriamicina, dexametasona), etc., incrementó inicialmente el índice de respuestas en algunas series, sin traducción sin embargo en una mejora de la supervivencia. En 1983, McElwain *et al* demuestran una relación dosis-respuesta con dosis altas de melfalán, consiguiendo remisiones en pacientes previamente resistentes.<sup>3</sup> Estos resultados, confirmados por los mismos autores en 1987 y por Barlogie *et al* en 1988 sentaron las bases para la introducción del trasplante de progenitores hematopoyéticos en los esquemas terapéuticos del MM<sup>4;5</sup>. El *Intergroupe Française du Myelome* (IFM), en un ensayo randomizado comparando trasplante de progenitores hematopoyéticos *versus* quimioterapia convencional, demostró mejores resultados en cuanto a RCs, supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en la rama de TPH.<sup>6</sup> Estos resultados fueron confirmados en un estudio del MRC<sup>7</sup>, aunque otros estudios multicéntricos, incluido el del grupo español PETHEMA<sup>8</sup>, no demostraron ventaja del TPH sobre la quimioterapia convencional en cuanto a SG. Pese a estos resultados contradictorios, el consenso actual es que melfalán (200mg/m<sup>2</sup>) con soporte de progenitores hematopoyéticos es un tratamiento efectivo y seguro en MM y se considera el estándar en pacientes menores de 65 años. El índice de RCs post-TPH en un paciente previamente tratado con quimioterapia convencional es entre 20 y 40% y la mediana de supervivencia de 4,5-5 años.

En la última década se han desarrollado nuevos fármacos tales como los inmunomoduladores y los inhibidores de proteasomas que actúan tanto sobre las CP patológicas como sobre el microambiente medular<sup>9</sup> y que, tras haber demostrado eficacia en pacientes con MM refractario o en recaída<sup>10-24</sup> se han utilizado en enfermos de nuevo diagnóstico.<sup>25-43</sup> La incorporación de estos agentes al tratamiento tanto de pacientes jóvenes<sup>30;39;43</sup> como mayores<sup>32;36;41</sup> ha incrementado significativamente la tasa de respuesta, incluida la tasa de RCs, lo que también se ha traducido en un beneficio en la SLP y en la SG.

### 3. DETECCIÓN DE ENFERMEDAD TRAS TRATAMIENTO EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

#### 3.1. Criterios de respuesta al tratamiento

En la era pre-trasplante, los criterios de respuesta más utilizados fueron los propuestos por el *Chronic Leukemia-Myeloma Task Force* y los del *Southwest Oncology Group*, ambos basados en el porcentaje de reducción de la paraproteína en suero y/o orina medida mediante técnicas electroforéticas.<sup>44-46</sup> Con el uso de melfalán a altas dosis, el grupo del *Hospital Royal Marsden* publicó en el año 1983 por primera vez una tasa relativamente elevada de RCs (50%),<sup>3,47</sup> definida como la desaparición de la paraproteína en la electroforesis (EF). La introducción de la inmunofijación (IF) como método de detección de la paraproteína en la definición de RC se debe al grupo de Arkansas, en 1989.<sup>48</sup> Así, la EF y la IF coexistieron durante un tiempo hasta la publicación de los criterios de respuesta del EBMT (*European group for Blood and Marrow Transplantation*) en 1998, elaborados por consenso de los representantes del subcomité de mieloma del mismo, del *Myeloma Working Group* y del *International Bone Marrow Registry*.<sup>49</sup> La clasificación establece criterios de respuesta, progresión y recidiva y, como novedad, define RC como la desaparición de la paraproteína por IF, exigiendo además la desaparición de todos los plasmocitomas y la detección de < 5% CP en MO. Recientemente, el *International Myeloma Working Group* ha modificado algunos de los criterios de respuesta/progresión con el propósito de homogeneizar la terminología empleada en los ensayos clínicos. Recoge categorías ampliamente utilizadas no reconocidas sin embargo por el EBMT, tales como muy buena respuesta parcial (VGPR, >90% de reducción de la paraproteína por EF) y “casi RC” (nCR: EF negativa, IF positiva), unificándolas como VGPR, e incluye remisión completa estricta (*Stringent CR*) como categoría superior a la RC en la que la desaparición de la paraproteína por IF se acompaña de ausencia de detección de clonalidad en MO por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia así como la normalización del ratio  $\kappa/\lambda$  en el test de cadenas ligeras libres en suero.<sup>50</sup>

**Tabla 2.** Criterios de respuesta y progresión en pacientes con mieloma múltiple establecidos por el International Myeloma Working Group.

<b>REMISIÓN COMPLETA</b>	IF negativa en suero y orina <5% CP en MO Desaparición de los plasmocitomas
<b>REMISIÓN COMPLETA Estricta</b>	Todos los criterios de la remisión completa Normalización del ratio $\kappa/\lambda$ en el test de cadenas ligeras libres en suero Ausencia de CP clonales en MO por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia
<b>MUY BUENA RESPUESTA PARCIAL</b>	CM detectable en suero u orina por IF pero no por EF o ↓>90% del CM sérico y <100mg/24h de paraproteína en orina
<b>REMISIÓN PARCIAL</b>	↓≥50% del CM en suero ↓del CM en orina/24h ≥90% o hasta <200mg/24h
<b>ENFERMEDAD ESTABLE</b>	No se cumplen los criterios de otros tipos de respuesta
<b>RECIDIVA CLÍNICA</b>	↑>25% del CM o incremento absoluto >0,5g/dL ↑>25% de la paraproteína en orina/24h o >200mg/24h CP en MO>10% ↑del tamaño de las lesiones óseas o plasmocitomas Aparición de nuevas lesiones líticas o plasmocitomas Hipercalcemia (>11,5mg/dL) no atribuible a otra causa

EF: electroforesis, IF: inmunofijación, CP: células plasmáticas, MO: médula ósea, CM: componente M, ↑: incremento, ↓: reducción; Adaptado de Durie *et al*; Leukemia 2007; 21:1134

### 3.2. Estrategias para la detección de enfermedad residual tras tratamiento

La persistencia de enfermedad en pacientes con MM tras tratamiento puede evaluarse a través de la célula tumoral, la paraproteína o la sintomatología clínica. En cuanto a la primera, el análisis histológico o citomorfológico de muestras de MO es rápido, relativamente sencillo y barato, aunque de baja sensibilidad y especificidad, dado que la infiltración medular por mieloma suele ser parcheada (y por tanto el recuento con frecuencia inexacto)<sup>51</sup> y, además, en la mayoría de los casos no se puede distinguir entre CP normales y patológicas. La paraproteína o componente M se ha detectado durante décadas mediante EF, técnica sencilla y de bajo coste pero también de sensibilidad limitada (0,2-0,6 g/L).<sup>4;51;52</sup> La introducción de la IF como técnica para la detección de la paraproteína en suero y/o orina ha supuesto un aumento en la sensibilidad (0,12-0,25g/L) con respecto a la EF. Más recientemente, la cuantificación en suero mediante nefelometría de cadenas ligeras libres  $\kappa$  y  $\lambda$  (circulantes como monómeros o dímeros, pero no ligadas a la cadena pesada de la IG) podría tener mayor sensibilidad que la IF, aunque los resultados todavía deben ser confirmados.<sup>53;54</sup> En los últimos años también se ha sugerido que el estudio de lesiones residuales por técnicas de imagen como la resonancia magnética o la tomografía por emisión de positrones (PET) podría ser útil en la evaluación de pacientes con mieloma en RC, aunque su valor pronóstico también ha de ser confirmado.<sup>55-57</sup>

Así, parece obvia la necesidad de incluir nuevas técnicas para mejorar la evaluación de la calidad de la respuesta en pacientes con MM. La CMF empezó a usarse hace ya más de 20 años como herramienta para el estudio de EMR post-quimioterapia en leucemias agudas demostrando gran valor clínico.<sup>58-63</sup> Esta técnica permite analizar simultáneamente múltiples características de una célula en un gran número de células y en poco tiempo, con la posibilidad de almacenar la información generada para su análisis o revisión posterior. Las CPs se identifican mediante el análisis simultáneo de los antígenos (AGs) CD38 y CD138<sup>64-67</sup> y pueden cuantificarse, para lo que se recomienda la adquisición de entre 0,2 y  $1 \times 10^5$  eventos de la celularidad total.<sup>65;68-70</sup> Para la detección de EMR se requiere la caracterización detallada de las CPs y así, varios estudios han demostrado que el perfil de expresión antigénica de las CP patológicas (CPP) permite diferenciarlas de las CP normales (CPN), concretamente en base a la infraexpresión de CD19, CD27, CD38 y CD45, la sobreexpresión de CD28, CD33 y CD56 y/o la expresión asincrónica de CD20, CD117 y slg.<sup>71-74</sup> Mediante esta estrategia podemos establecer en cada enfermo el perfil aberrante "mielomatoso" de la CP tumoral, diferente del de las CPN. Estudios dilucionales han demostrado que la CMF de 4 colores es capaz de discriminar entre CPP y CPN con una sensibilidad de  $10^{-4}$  en 2/3 de los casos e incluso es capaz de alcanzar  $10^{-5}$  en el tercio restante, independientemente del tipo de perfil de expresión empleado para

distinguir las.<sup>65</sup> Entre las posibles desventajas del uso de la CMF para el estudio de EMR en MM se encuentra la ausencia de marcadores tumorales específicos en la CP y la posibilidad de cambios fenotípicos durante la evolución de la enfermedad.<sup>75;76</sup> Sin embargo, el uso de combinaciones de varios anticuerpos monoclonales permite la identificación inequívoca de CPP en >95% de los pacientes.<sup>77;78</sup> Por otro lado, los cambios fenotípicos descritos en varios estudios<sup>79;80</sup> pueden atribuirse a problemas técnicos y/o a AGs irrelevantes para la definición del fenotipo aberrante, ya que otras series con estrategias mejor dirigidas no han confirmado tales resultados.<sup>68;81;82</sup> Finalmente, otro inconveniente podría ser que la CMF sólo analiza el compartimento medular y dentro del mismo sólo las CP, de manera que tanto la enfermedad extramedular como LB con igual *VH-JH* que la CP potencialmente implicados en la recaída o progresión de la enfermedad quedarían ocultos para la CMF traduciendo en falsos negativos.<sup>83;84</sup> Sin embargo, ni la existencia ni el papel patogénico de tales LB clonales ha sido definitivamente probado todavía.<sup>85</sup>

Los primeros trabajos publicados en MM datan del año 2002, en que San Miguel *et al* observaron un porcentaje superior de casos con EMR negativa en 47 pacientes con mieloma tratados con trasplante autólogo de sangre periférica (TASPE) comparado con 40 pacientes que habían recibido quimioterapia convencional (36% vs 15%,  $p=0,04$ ).<sup>68</sup> Estos resultados fueron confirmados ese mismo año por el grupo de Leeds en 45 pacientes sometidos a TASPE en los que la detección de EMR por CMF (42% de los casos) se asociaba a menor SLP aun sin impacto en la SG.<sup>81</sup> Más recientemente, los resultados del análisis de pacientes tratados según el protocolo GEM2000 han mostrado el valor pronóstico de la erradicación de la EMR por CMF en cuanto a SLP y SG, apreciable incluso entre aquéllos pacientes que habían alcanzado RC con IF negativa. Así, la mediana de la SLP en el grupo de pacientes con y sin EMR detectable por CMF fue de 71 vs 37 meses ( $p < 0,001$ ) respectivamente y la mediana de SG no alcanzada (NA) vs 89 meses ( $p=0,002$ ). Además, la SLP de los pacientes con EMR indetectable por CMF e IF positiva fue superior a la de aquéllos con EMR detectable e IF negativa, confirmando así la importancia clínica del análisis de la EMR por CMF.<sup>86</sup> Resultados similares han sido recientemente comunicados por el grupo inglés.



## 4. ESTUDIOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN MIELOMA MÚLTIPLE

### 4.1. Ontogenia de la célula tumoral

Se acepta que el origen de la célula tumoral del mieloma es un linfocito B (LB) post-germinal de larga supervivencia que ha sufrido el cambio de isotipo y el proceso de hipermutación somática en los órganos linfoides secundarios. Esta célula se traslada posteriormente a la MO donde consigue sobrevivir gracias al contacto con las células del estroma.<sup>87</sup>

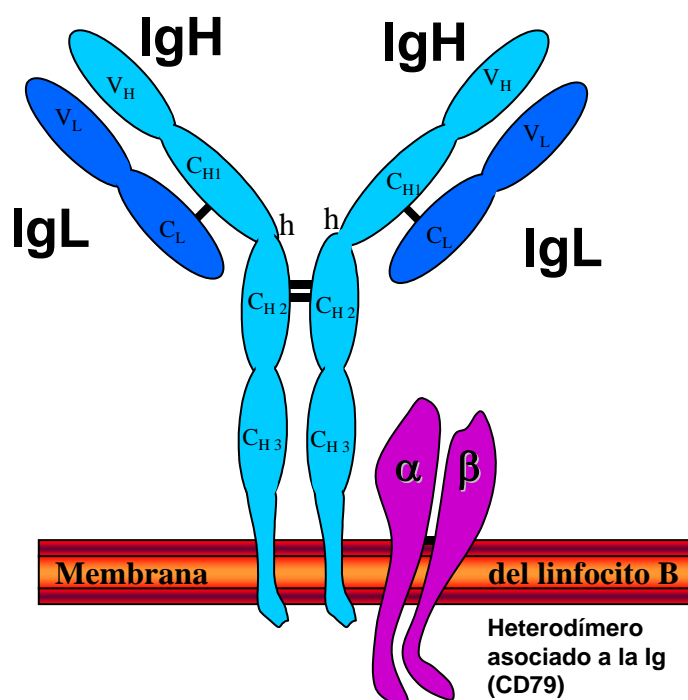
Los LB maduros reconocen AGs extraños mediante receptores de membrana llamados receptores de la célula B (BCR o *B-cell receptor*). La diferenciación de los progenitores B en LB maduros tiene lugar en la MO, regulada por interacciones con las células del estroma medular.<sup>88;89</sup> Posteriormente, los LB viajan hasta los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas) donde se produce la maduración dependiente de AG, principalmente en los centros germinales de los folículos linfoides.<sup>90;91</sup> La respuesta inmune que se produce en los órganos linfoides secundarios requiere la presencia de macrófagos, células presentadoras de AG, linfocitos T y LB maduros.<sup>92;93</sup> En este ambiente se produce el contacto entre los LB y los AGs, tras el cual aquellos LB capaces de reconocer AGs extraños proliferan y aumentan la afinidad de su BCR con el AG mediante el proceso de hipermutación somática.<sup>94;95</sup> Es también en este ambiente donde los LB pueden cambiar el isotipo de sus IGs con el fin de disponer de funciones efectoras diferentes. Tras la maduración dependiente de AG, los LB se diferencian a células de memoria o a CP productoras de anticuerpos.<sup>96</sup>

### 4.2. Receptor de la célula B

Los LB presentan en su membrana unas moléculas de carácter proteico denominadas IGs que son responsables del reconocimiento antigénico característico de la inmunidad específica.<sup>93</sup> Aunque todas las células humanas tienen la dotación genética necesaria para la síntesis de tales proteínas, sólo se expresan en los LB.<sup>97;98</sup>

Hay 5 tipos de IGs (G, A, D, E y M), diferentes por su tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos.<sup>99</sup> Estructuralmente, las IG se componen de 2 cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (IgL) y otras 2 pesadas (IgH) de mayor peso molecular también idénticas y unidas entre sí por puentes disulfuro.<sup>97</sup> Ambos tipos de cadenas están formadas por dos regiones distintas, una constante (C) en la región carboxiterminal y otra

variable (V) en el extremo aminoterminal.<sup>100</sup> El tipo de IG se define por la región constante de la cadena pesada: M, D, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> y E. Las regiones constantes de las IgH están compuestas por 3 ó 4 dominios globulares y, en algunos casos, contienen regiones “bisagra” que mejoran la adaptación al AG al posibilitar el funcionamiento independiente de los heterodímeros. Por su parte, las regiones constantes de las cadenas ligeras también presentan pequeñas variaciones que distinguen los dos tipos de cadenas: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). La molécula de BCR o IG de superficie se asocia a un heterodímero (CD79 $\alpha/\beta$ ) que interviene en la transmisión de señales transmembrana.<sup>101</sup>



**Figura 1:** Estructura básica de una molécula de inmunoglobulina IgG.

Funcionalmente, las regiones variables están implicadas en el reconocimiento antigénico (región Fab) mientras que las regiones constantes participan en funciones efectoras celulares (región Fc), como las señales de transducción transmembrana, siendo además las responsables de la unión de las IG a los tejidos, células del sistema inmune y proteínas del sistema del complemento.<sup>102</sup>

#### 4.2.1. Genes de las inmunoglobulinas

Cada una de las partes de la molécula de IG, tanto la región constante como la variable, están codificadas por distintos genes. La región constante se codifica a partir de los segmentos génicos C, mientras que la región variable se obtiene de la combinación de varios segmentos génicos V (*Variability*), D (*Diversity*, sólo en las cadenas pesadas) y J (*Joining*).<sup>103</sup> Esta recombinación génica se traduce en una gran variabilidad proteica, necesaria e idónea para el reconocimiento antigénico, y permite el ahorro de material genético. Además, como cada linfocito reordena estos segmentos génicos de manera única, representa un marcador altamente específico, ya que la probabilidad de encontrar dos linfocitos con el mismo reordenamiento es prácticamente nula.<sup>103;104</sup> Esto, a su vez, se convierte en una diana ideal para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) en el caso de la células tumoral, ya que la presencia de estos reordenamientos identifica específicamente a dicha célula y la distingue de las células normales, que o carecen del reordenamiento de IG o tienen otro diferente.

Hay 3 genes que codifican la síntesis de IG, localizados en distintos *loci* cromosómicos: los de la cadena pesada en el cromosoma 14 (14q32),<sup>105</sup> los de la cadena ligera  $\kappa$  en el cromosoma 2 (2p12)<sup>106</sup> y los de la cadena ligera  $\lambda$  en el cromosoma 22.<sup>107;108</sup>

El locus de la cadena pesada de las IG (IgH) comprende una región de 1,2 Mb en la que se definen entre 123 y 129 segmentos *VH*, 27 segmentos *DH* y 6 segmentos *JH*,<sup>109-111</sup> aunque no todos son funcionales. IgH se compone de 38-46 segmentos *VH* agrupados en 7 familias, 27 segmentos *DH* distribuidos en 7 familias y 6 segmentos *JH*. Estos segmentos *VH*, *DH* y *JH* preceden a nueve genes funcionales ( $\mu, \delta, \gamma_{1-4}, \alpha_{1-2}$  y  $\epsilon$ ) y a 2 pseudogenes de la región constante (C) que codifican para cada uno de los isotipos de cadena pesada (M, D,  $G_{1-4}$ ,  $A_{1,2}$  y E, respectivamente). Además, todos los segmentos *CH*, excepto  $C\delta$ , tienen en 5' un segmento génico S (*switch*) necesario para el cambio de isotipo de cadena pesada que tiene lugar en el proceso de diferenciación linfocitoide B.<sup>112;113</sup>

El locus de la cadena ligera  $\kappa$  comprende una región de 1,8 Mb y está formado por 76 segmentos  $V\kappa$  clasificados en 7 familias, 5 segmentos  $J\kappa$  y una sola región constante  $C\kappa$ .<sup>111;114</sup> Además, contiene una región localizada a 24 Kb en dirección telomérica respecto a  $C\kappa$ , que se yuxtapone a la unión *VJ* cuando se produce la delección de  $C\kappa$  en los alelos no funcionales<sup>115</sup> denominada *Kappa deleting element* ó *Kde*. Por su parte, la región codificante de la cadena ligera  $\lambda$ , ocupa una región de 1 Mb<sup>116</sup> y contiene 73 ó 74 segmentos  $V\lambda$ , de los cuales 29-33 son funcionales, y 7 segmentos  $J\lambda$  que preceden a siete segmentos  $C\lambda$ , casi idénticos entre sí, 3

de las cuales son genes no funcionantes o pseudogenes.<sup>107,117</sup> Los genes de las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  no tienen regiones D.

#### 4.2.1.1. Variabilidad genética de las inmunoglobulinas

El objetivo del proceso de diferenciación B es la síntesis de una IG capaz de reconocer específicamente un AG. Teniendo en cuenta que el número de potenciales AGs es infinito, ha de conseguirse que las moléculas de IGs del *pool* de LB presenten una gran diversidad. Esta diversidad se consigue mediante una triple estrategia. Inicialmente tiene lugar el proceso denominado “recombinación V (D) J”, en los estadios más tempranos de la diferenciación B, a través del que la diversidad combinatoria de los genes V, (D) y J permite alcanzar hasta  $10^7$  posibles combinaciones. En segundo lugar, durante el proceso de recombinación V (D) J se producen además deleciones e inserciones aleatorias de nucleótidos que incrementan hasta  $10^6$  la variabilidad en las regiones de unión. Y por último, en la fase de maduración de afinidad, el mecanismo de hipermutación somática que detallaremos más adelante consigue incrementar aún más la variabilidad en las regiones V.

#### 4.2.2. Diferenciación linfóide B normal

Durante la diferenciación linfóide B tienen lugar una serie de procesos de recombinación en los genes de las IG cuyo objetivo final es la formación de un reordenamiento capaz de codificar una molécula de IG funcional capaz de reconocer AGs extraños. Estos procesos están regulados por una serie de proteínas cuya expresión aumenta o disminuye en los diferentes estadios madurativos.<sup>103</sup>

Se pueden distinguir dos fases en el proceso de diferenciación de la célula B, determinadas por el contacto de la célula B con el AG.<sup>118</sup> Inicialmente tendría lugar la maduración temprana, previa al contacto con el AG, que tiene lugar en la MO desde los estadios más inmaduros de la célula B (pro-B) hasta el desarrollo de un LB inmunocompetente, que expresa en su superficie una única IG funcional. Posteriormente, las células B migran a órganos linfoides secundarios donde tiene lugar la maduración tardía por el contacto con el AG a través de la que aumentará su afinidad por dicho AG, transformándose en un LB de memoria o célula plasmática, imprescindibles en la respuesta inmune secundaria.<sup>96</sup>

##### 4.2.2.1. Maduración independiente del antígeno

En esta etapa inicial se produce la recombinación de los diferentes segmentos génicos de los genes IGH e IGL. Este proceso tiene lugar en los estadios más precoces de la diferenciación linfóide B y determinará la variabilidad del repertorio primario de las IG. Tiene

lugar en la MO y termina cuando el LB abandona la MO para migrar a órganos linfoides secundarios a través del torrente circulatorio.

#### 4.2.2.1.1. Recombinación secuencial de los genes de las inmunoglobulinas durante la diferenciación linfoide B

La recombinación de los genes de las IG comienza en el estadio pro-B con el reordenamiento de IGH, en que un segmento DH se une con uno JH.<sup>119</sup> En el estadio pre-B, un segmento VH se reordena con el DJH anteriormente constituido.<sup>120</sup> Puede ocurrir que este segundo paso no tenga lugar en uno o en los dos alelos, en cuyo caso el (los) reordenamiento(s) se denominan incompleto(s). Una vez que se ha producido un reordenamiento IGH funcional en uno de los 2 alelos, el proceso de recombinación se detiene, la cadena IGH se une a la  $\phi$ -LC y a CD79 y el complejo se expresa en la superficie externa de la membrana celular. Si el reordenamiento de los genes VH-JH producido es funcional se inicia la producción de cadenas pesadas  $\mu$  aunque también pueden producirse cadenas  $\delta$  por un fenómeno de *splicing* alternativo. Así, la detección de la cadena  $\mu$  citoplasmática se considera uno de los primeros marcadores de la célula B.<sup>121</sup>

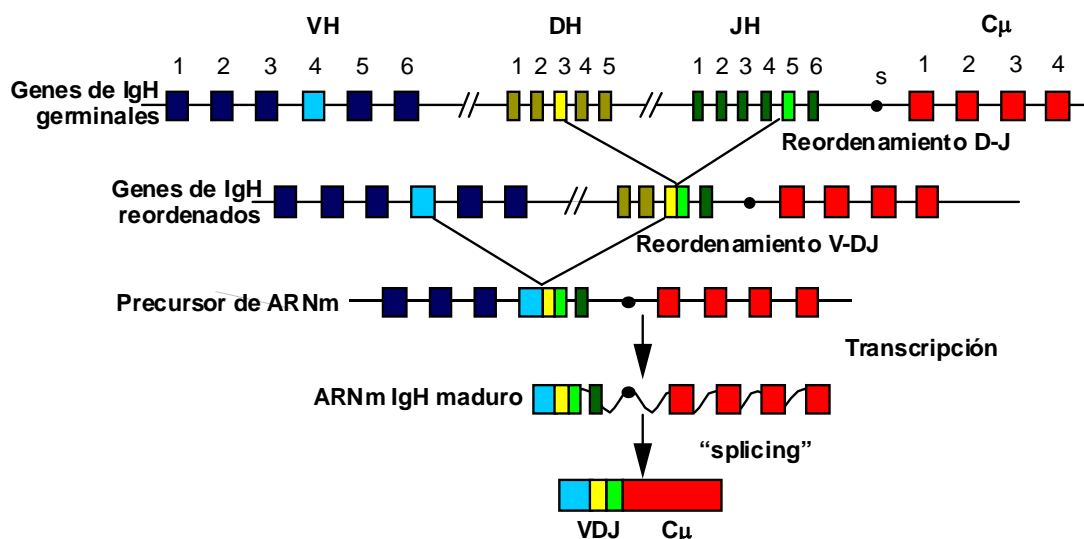
La ausencia de síntesis de cadenas ligeras impide el ensamblaje de la IG completa, por lo que las cadenas pesadas  $\mu$  se acumulan en el citoplasma. No obstante, algunas cadenas  $\mu$  se unen a otras proteínas VpreB- $\lambda$ 5 que forman las pseudo-cadenas ligeras ( $\phi$ -LC).<sup>122</sup> Estas proteínas VpreB- $\lambda$ 5 tienen una homología significativa con los dominios variables y constantes de las IgL, respectivamente pero los genes que las codifican no sufren procesos de reordenamiento.<sup>123-125</sup> El complejo formado por las dos cadenas Ig $\mu$  asociadas covalentemente con las pseudo-cadenas ligeras ( $\phi$ -LC) se conoce como complejo pre-BCR.<sup>126</sup> Se cree que la llegada a la superficie celular del complejo pre-BCR permite a la célula recibir una señal desde el exterior que, por un lado, bloquea el proceso de reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas del cromosoma homólogo (mecanismo de exclusión alélica) y, por otro, activa el reordenamiento también jerárquico y secuencial de los genes de las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ . Si el primer reordenamiento VH-JH no es funcional, no habrá cadenas  $\mu$  ó  $\delta$  y por tanto tampoco complejo pre-BCR. Sin dicho complejo, la célula no recibirá señales y no se bloqueará el proceso de reordenamiento, que continuará con el segundo alelo. Si éste ya es funcional, el complejo se expresará en superficie y se inducirá el reordenamiento de cadenas ligeras, continuándose la diferenciación. Sin embargo, si este segundo alelo tampoco es funcional, la

célula no expresará nunca el receptor, no podrá recibir las señales que le hagan avanzar en la diferenciación y entrará en apoptosis.<sup>127</sup>

Si el proceso anterior ha concluido con éxito y se ha activado el reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras, éste tiene lugar de forma similar al de la cadena pesada. En primer lugar se reordenarían los genes  $\kappa$ . Si este reordenamiento es funcional, la célula comenzaría la transcripción de las cadenas ligeras  $\kappa$  que se ensamblan con las cadenas pesadas  $\mu$  o  $\delta$  citoplasmáticas formando una IG completa (IgM- $\kappa$  o IgD- $\kappa$ ) que ya puede expresarse en la superficie celular. La expresión en superficie de una IG completa es característica de los últimos estadios de la diferenciación B AG-independiente, y bloquea la formación de nuevos reordenamientos en los genes de IgL. En caso de que el reordenamiento del primer alelo  $\kappa$  no resultara funcional, se procederá al reordenamiento del segundo, y si no se consigue la formación de una IgL funcional entonces se procede a reordenar el gen de la cadena  $\lambda$ .<sup>119</sup> Este orden es el que justifica que en poblaciones linfoides B normales la relación  $\kappa/\lambda$  sea aproximadamente 2:1. Además, en caso de reordenamiento de los genes *IgL*, se produce la delección del reordenamiento improductivo *IGK*.<sup>128-130</sup> De esta forma se evita la competencia entre la cadena aberrante Ig $\kappa$  y la Ig $\lambda$  funcional por la unión con la cadena IgH. Si la cadena ligera es capaz de ensamblarse con cadena IgM previamente formada, la célula entonces alcanza el estadio de LB inmaduro inmunocompetente Ig $\mu^+$ . Aquellos LB inmaduros que sean autorreactivos son eliminados por apoptosis o anergia, pero también pueden ser rescatados a través del proceso de edición del receptor.<sup>130-132</sup>

Finalmente, la molécula de IG sintetizada se une al heterodímero CD79 que permite su anclaje a la membrana y la transmisión de señales al interior de la célula. A este nivel de la diferenciación nos encontramos con un LB precoz inmaduro pero inmunocompetente, pues ya es capaz de reconocer AGs a través de su receptor antigénico. A partir de este momento el proceso madurativo estará orientado a aumentar la afinidad por el AG.

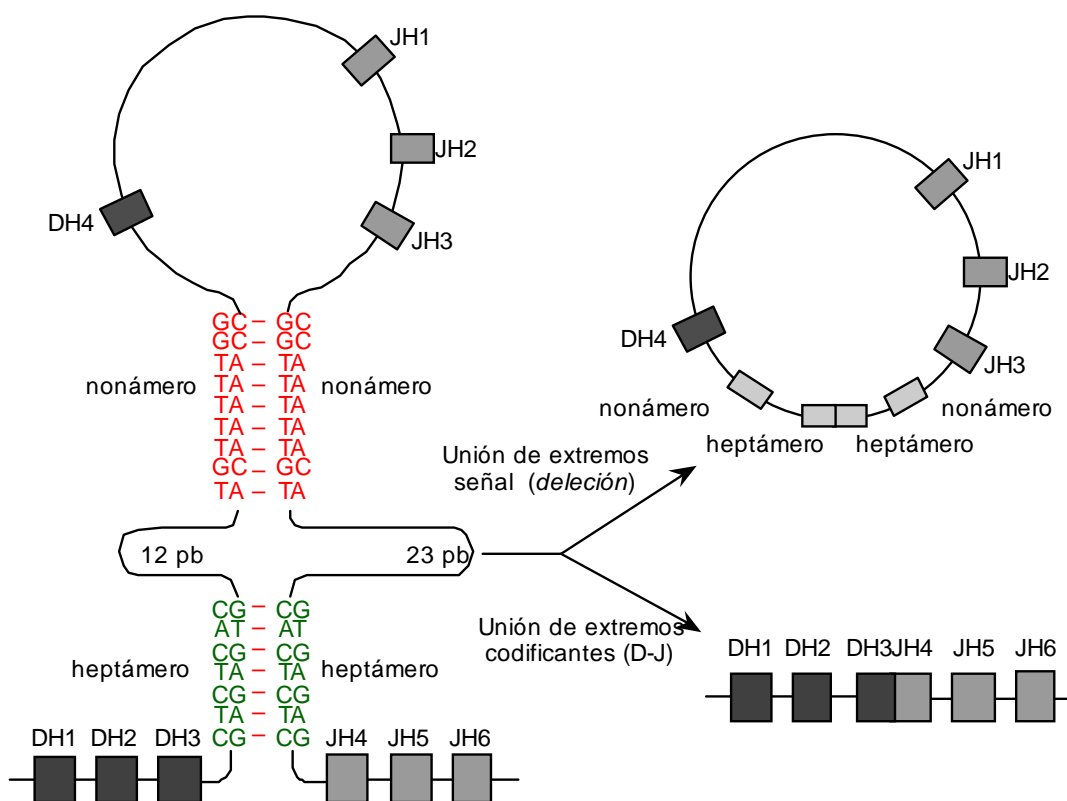
**Figura 2.** Esquema del proceso de reordenamiento y transcripción de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas



#### 4.2.2.1.2. Mecanismo de recombinación *VH-JH*

La recombinación *VH-JH* está mediada por la expresión regulada de varias proteínas, entre las que se encuentran las codificadas por los genes activadores de la recombinación RAG1 y RAG2, así como la proteín-kinasa dependiente de ADN (ADN-PK) y el complejo heterodimérico formado por las proteínas de unión al ADN Ku-70 y Ku-80.<sup>133;134</sup> El proceso de recombinación *VH-JH* se produce en 3 fases: primero se produce un corte en una de las cadenas del extremo 5' del heptámero, luego este corte se convierte en una estructura en horquilla en la parte codificante, quedando un extremo libre en la región no codificante.<sup>135</sup> Tanto el corte como la formación de la horquilla requieren de la RSS y las proteínas RAG1 y RAG2.<sup>136</sup> Los extremos de las regiones no codificantes se unen formando las denominadas uniones señal. La apertura de la estructura en horquilla y la unión de los extremos codificantes están mediadas por las proteínas de unión al ADN Ku-70 y Ku-80 y la ADN-PK.<sup>137-139</sup> Durante la apertura y unión de los extremos codificantes, se produce la inserción al azar de nucleótidos no complementarios (N) por acción de la enzima TdT,<sup>140</sup> mientras que la delección de nucleótidos germinales de los extremos de los segmentos génicos que se están reordenando y las pequeñas adiciones de nucleótidos autocomplementarios (P) son producidos por nucleasas y polimerasas, respectivamente. Estas uniones "incorrectas" permiten aumentar la variabilidad de los genes de las IG.

**Figura 3:** Esquema del mecanismo de recombinación DH-JH. Las RSS que contienen los heptámeros y nonámeros hibridan formando una estructura en horquilla. A continuación se produce la unión de los extremos codificantes y la de los extremos señal, que se deletiona como un producto circular de escisión.

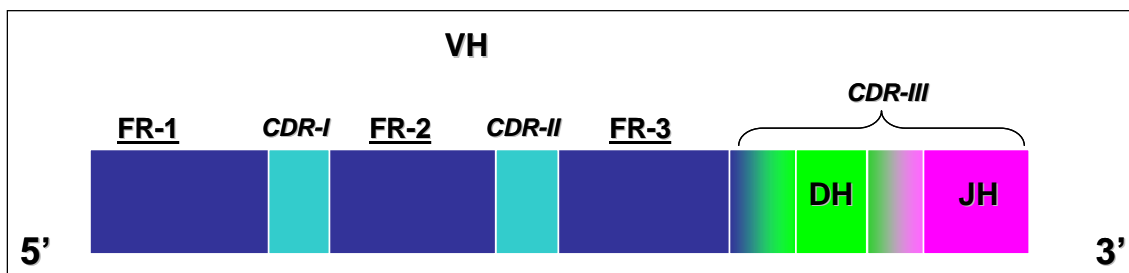


#### 4.2.2.1.3. Estructura de la unión VH-JH

Dentro de la región variable de las IG existen 3 zonas llamadas hipervariables flanqueadas por otras regiones relativamente conservadas (FR o *framework*). Las regiones hipervariables o CDR confieren a las IG la afinidad específica por un determinado AG. De las 3 regiones, CDR1 y CDR2 se componen de secuencias de los genes VH mientras que CDR3, la más variable y la responsable de la especificidad de la IG, está formada por la región de unión de los segmentos VH-JH.



**Figura 4:** Región de unión VH-JH de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas con las regiones hipervariables (CDR) y estructurales (FR).



#### 4.2.2.1.4. Edición del receptor

Si los LB maduros que salen de la médula resultan ser reactivos frente a autoantígenos se transforman en “tolerantes”, lo que significa que se produce un bloqueo en la cascada de transducción de señales mediadas por la *slg* y en consecuencia la célula es incapaz de activarse.<sup>141</sup> Sin embargo, durante la diferenciación B las células B inmaduras pueden evitar el reconocimiento de autoantígenos alterando las regiones de unión al AG de sus IG mediante un proceso de edición.<sup>130</sup>

La edición del receptor antigénico puede ser llevada a cabo cambiando tanto las IgH como las IGL.<sup>130;142</sup> Este proceso de edición tiene lugar fundamentalmente en el locus  $\kappa$  mediante reordenamientos secundarios V-J $\kappa$  aunque también puede producirse en los loci lambda y en IGH. La mayoría de los segmentos *VH* contienen en su extremo 5' una secuencia homóloga al heptámero de las RSS.<sup>143</sup> Los reemplazamientos pueden tener lugar por dos mecanismos. El primero consiste en que un segmento *VH* reemplaza al que se encuentra formando parte del reordenamiento *VH-JH* mediante el heptámero interno.<sup>143;144</sup> El segundo consiste en que un segmento *VH* puede reordenarse al complejo *DJH* preexistente en el alelo no funcional siguiendo el mismo esquema de los reordenamientos *VH-JH* normales.<sup>145</sup> Las regiones de unión de estos reordenamientos secundarios poseen las mismas inserciones y deleciones de nucleótidos que los reordenamientos *VH-JH* primarios. De hecho, la enzima TdT parece reactivarse durante este proceso de edición del receptor.<sup>146</sup> Dado el corto periodo de vida de las células B inmaduras, la capacidad de edición del receptor es limitada. Si no se logra una edición satisfactoria, las células mueren por un mecanismo de apoptosis.

#### 4.2.2.2. Maduración dependiente del antígeno

##### 4.2.2.2.1. Hipermutación somática

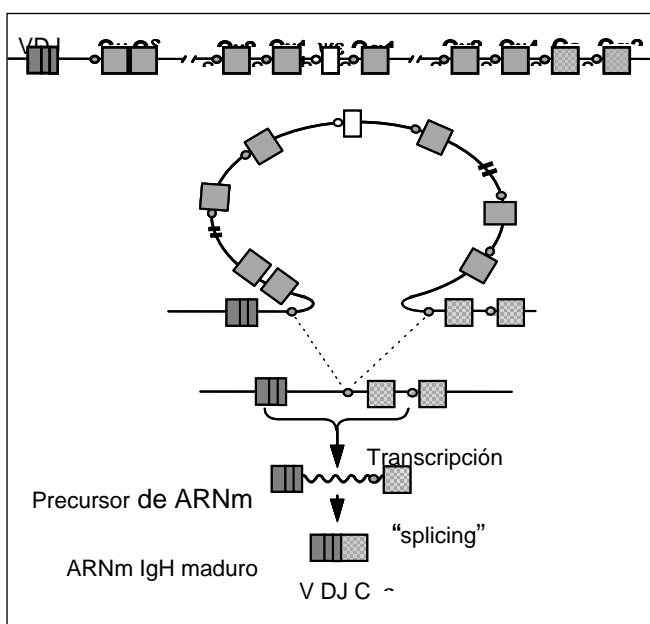
La hipermutación somática tiene lugar en los centros germinales tras la activación de las células B inducida por el AG. Se ha demostrado que es un proceso acoplado a la transcripción que se produce en una región de 1,5-2 Kb desde el promotor y que requiere tanto la presencia de un promotor como de potenciadores de la transcripción de los genes de las IG.<sup>147-150</sup> Funcionalmente, representa la base molecular de la maduración de afinidad de los LB *naïve* tras la exposición al AG,<sup>151</sup> pudiendo llegar a aumentar dicha afinidad entre 10 y 100 veces. Las mutaciones somáticas son principalmente mutaciones puntuales, aunque se han descrito también deleciones e inserciones<sup>152</sup> y pueden ocurrir en ambas cadenas de la doble hélice de DNA.<sup>153</sup> Normalmente los cambios afectan más a purinas que a pirimidinas y las transiciones son más frecuentes que las transversiones.<sup>154</sup>

##### 4.2.2.2.2. Cambio de isotipo

Tras la activación inducida por el AG, los LB proliferan y se diferencian produciendo diferentes tipos de IG pero manteniendo la afinidad del BCR. El proceso se produce a través de otro reordenamiento en los genes IGH denominado *switching* o cambio de isotipo, en el que se produce recombinación entre las secuencias repetitivas localizadas en el extremo 5' de cada uno de los genes que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas de las IG.<sup>155;156</sup> Al producirse la recombinación S-S se delecionan algunas de las regiones CH de la configuración germinal, de manera que se sustituye la región CH más cercana a la región *VH-JH* por la región CH correspondiente.<sup>157</sup>

En los estadios precoces, el isotipo IGH que expresan todos los linfocitos es I $\mu$  o I $\delta$ . Luego, ese mismo LB puede expresar cualquiera de los otros isotipos o seguir expresando el isotipo I $\mu$  según si se produce o no reordenamiento de esta región, sin que en ningún caso se produzcan cambios en la especificidad de la región de reconocimiento antigénico.<sup>158</sup>

**Figura 5:** Esquema del mecanismo de cambio de isotipo de las IgH. En este ejemplo, el resultado final es el cambio de IgM a IgE.



#### 4.3. Detección molecular de enfermedad mínima residual en mieloma múltiple

Las elevadas tasas de respuesta logradas con los nuevos fármacos y estrategias de tratamiento en pacientes con MM han precipitado el uso de técnicas más sensibles para la detección de enfermedad residual que permiten no sólo cuantificar con mayor precisión la masa tumoral residual sino también la evaluación precoz de la eficacia del tratamiento administrado.<sup>7;159-162</sup> De entre las metodologías empleadas hasta la fecha, la PCR se basa en la amplificación de marcadores cromosómicos específicos de la enfermedad que en el caso que nos ocupa serían los genes de las IG.<sup>163-167</sup>

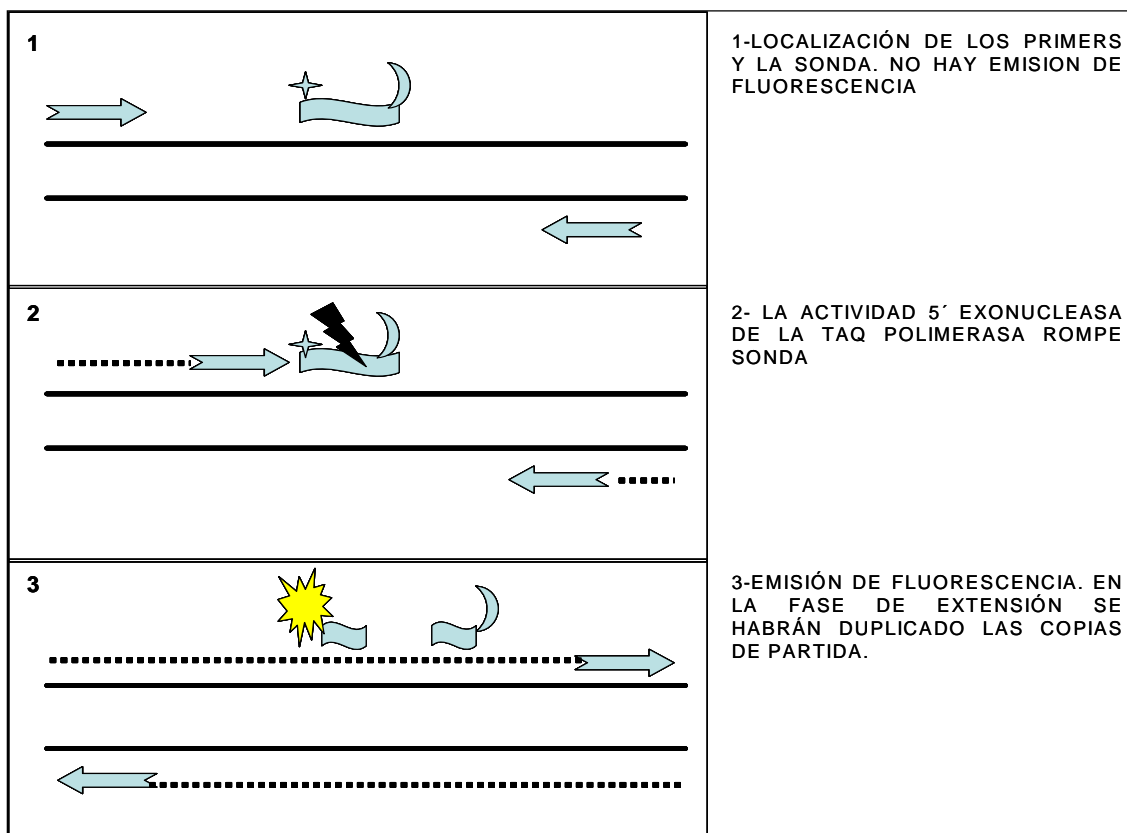
Varias técnicas de PCR se han empleado a tal fin. Las técnicas clásicas empleaban *primers* consenso pero tenían una sensibilidad muy baja ( $10^{-1} - 10^{-2}$ ), insuficiente para el estudio de la EMR. Esto se debía a que los *primers* consenso no sólo amplificaban los reordenamientos clonales sino también los de los linfocitos normales. Así, empezaron a utilizarse *primers* específicos del reordenamiento clonal o ASO (*allelic specific oligonucleotide primers*), complementarios con las CDRs del reordenamiento, junto con *primers JH* consenso. La estrategia de estudio de EMR consistía en amplificar el reordenamiento clonal del paciente en el momento del diagnóstico mediante *primers* consenso con el fin de obtener la secuencia de las CDRs. Con estas secuencias se diseña un primer o sonda específicos de tal reordenamiento

que permite la detección del mismo durante la monitorización de la EMR. La sensibilidad de la ASO PCR permite discriminar 1 célula tumoral entre  $10^4 - 10^6$  células normales, suficiente para su uso como técnica de detección de EMR. Sin embargo, tales estudios proporcionaban información meramente cualitativa, que no permitía establecer con exactitud el número de células tumorales presentes en la muestra.<sup>168;169</sup>

Se desarrollaron después técnicas semi-cuantitativas basadas en el método de dilución límite o en la cuantificación mediante análisis densitométrico comparado de las bandas post-PCR con diluciones estándar. Estos estudios, sin embargo, presentan una enorme variabilidad intra e inter-análisis, son muy laboriosos y de difícil estandarización.<sup>170-173</sup>

Finalmente, la RQ-PCR permite la cuantificación exacta de las células tumorales mediante PCR en tiempo real y no requiere procesamiento del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación. Se basa en el empleo de un oligonucleótido específico del reordenamiento tumoral (generalmente complementario a CDR3) junto con un consenso (en *JH*) y una sonda fluorescente para monitorizar la amplificación. Existen varios equipos en el mercado que permiten el análisis de los resultados.<sup>174;175</sup> El método más empleado se basa en la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa que emplea sondas TaqMan complementarias a la región diana.<sup>176</sup> La sonda TaqMan tiene un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' y está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, colocándose entre los 2 *primers*. Cuando se produce la etapa de extensión de la PCR, la actividad 5' exonucleasa de la Taq degrada la sonda liberando el fluorocromo que, al estar fuera de la influencia del amortiguador, emite luz de una longitud de onda específica, que será captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de PCR, de manera que se producirá un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de reacción de la PCR. Además, la Taq no digiere la sonda libre sino sólo la hibridada con lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado.

**Figura 17:** Esquema de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR)



La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que proporciona una información en tiempo real del proceso. Así, podemos establecer el ciclo umbral ( $C_T$  o *cycle threshold*) o el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto obtenido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, que a su vez se correlaciona con la cantidad de células que contienen la secuencia diana. Generalmente, el umbral se define como 10 veces la desviación estándar del valor de la señal de fluorescencia basal. La cuantificación del número de copias de una muestra se realiza mediante la comparación del  $C_T$  de la muestra problema con el de una serie de diluciones de una muestra control positiva, con las que se establece una recta patrón que refleja el número de copias frente al número de ciclos. Cuando se realiza la cuantificación de la muestra problema, el ciclo umbral se interpola en la recta patrón, lo que permite conocer el número de copias de partida de la secuencia diana en la muestra que estamos analizando. Por otro lado, al cuantificar una muestra problema debemos tener en cuenta la cantidad y calidad del DNA analizado. Esta variable puede controlarse mediante la amplificación en la misma muestra de un gen control presente en todas las células

como ABL, GADPH o albúmina, lo que nos permitiría compensar la distinta eficiencia de la PCR debida a diferencias en la cantidad o calidad del DNA de la muestra problema.

Varios estudios que analizaremos a continuación han demostrado que esta técnica es útil en la detección de EMR empleando los reordenamientos clonales de los genes de las IG.<sup>165;166;173;177-179</sup> Para ello, existen distintas estrategias de análisis dependiendo de cuál de los oligos o *primers* es el complementario a la región CDR3. Puede diseñarse una sonda específica de la región hipervariable combinada con *primers* consenso de las regiones *VH* y *JH*. Como alternativa, pueden usarse sondas consenso en la región *JH* combinadas con un primer específico de la región CDR3 y otro para la región intrónica de *JH*. Este último sistema reduce el coste y la variabilidad entre pacientes y ha demostrado ser útil en LLA-B y LLC-B.<sup>180-182</sup>

#### 4.3.1. Estudios de enfermedad mínima residual en mieloma múltiple mediante PCR

Varios estudios han explorado el valor de la PCR como técnica para la monitorización de EMR en MM.<sup>183-189</sup> Inicialmente, ya la mayoría de ellos empleaban ASO-PCR como técnica para la detección de enfermedad residual. Sin embargo, la efectividad de los tratamientos en los años previos a la aparición de los nuevos fármacos y del uso de la quimioterapia a altas dosis era limitada, de manera que los resultados eran siempre positivos y por tanto sin utilidad clínica alguna. Más tarde, varios estudios realizados en su mayoría en pacientes sometidos a trasplante autólogo y alogénico mostraron el valor pronóstico de la remisión molecular, alcanzada entre 27 y 50% de los casos según las series. Además, el grupo de Corradini, usando ASO PCR cualitativa, describe un porcentaje de remisiones moleculares significativamente superior en pacientes sometidos a trasplante alogénico en comparación con aquellos que habían recibidos trasplante autólogo, sugiriendo el valor de la técnica para monitorizar la eficacia de los tratamientos.<sup>190</sup>

En los últimos años se han empleado técnicas semi-cuantitativas y cuantitativas intentando estratificar la evolución de los pacientes en función de la cantidad de enfermedad residual.<sup>191-195</sup> Estos métodos pueden alcanzar una sensibilidad de hasta  $10^{-6}$  y no sólo ofrecen resultados absolutos en términos de positividad vs negatividad sino que permiten también monitorizar la evolución de la cantidad de enfermedad residual. Así, Korthals describe recientemente en un grupo de pacientes tratados con TASPE que la cuantificación mediante ASO RQ-PCR de los niveles de EMR antes del tratamiento permite identificar 2 grupos de pacientes con diferente SLE y SG (0,2% 2IgH/ $\beta$ -actina).<sup>196</sup> En la era de los nuevos fármacos, Ladetto ha documentado mediante ASO RQ-PCR reducciones significativas en la carga tumoral residual post-TASPE seguidas en algunos casos de remisiones moleculares mantenidas en

pacientes tratados con bortezomib, talidomida y dexametasona como tratamiento de consolidación. Así, tras una mediana de seguimiento de 42 meses, no se había documentado ninguna progresión entre pacientes en remisión molecular.<sup>197</sup> En una actualización del estudio con una mediana de seguimiento de 65 meses, la SG a los 5 años de aquellos pacientes que habían alcanzado remisión molecular era del 100%.

Sin duda, los resultados del análisis de la EMR en MM mediante PCR son relevantes clínicamente. Sin embargo, la técnica presenta problemas debidos a que las células tumorales del mieloma, como neoplasia B de origen post-germinal, presentan un porcentaje elevado de mutaciones somáticas tanto en los genes de las cadenas pesadas como en los de las cadenas ligeras de las IGs.<sup>198</sup> Así, con frecuencia, los *primers* consenso complementarios con las regiones FR de los genes de las IG no se unen al DNA de la muestra problema con la eficiencia necesaria. Esto dificulta tanto la amplificación de los reordenamientos clonales como la secuenciación de los mismos una vez amplificados y más aún, obliga con frecuencia al uso de *primers* y/o sondas específicos complementarios con la secuencia de cada paciente, haciendo en conjunto la técnica muy laboriosa y metodológicamente complicada y por tanto inadecuada para la rutina diaria. Además, a diferencia de lo que sucede en LLA, sólo *VH-JH* y *DJH* han sido testados como potenciales marcadores de EMR en mieloma. Mientras que el primero presenta el problema ya discutido de la presencia de mutaciones somáticas, *DJH*, descrito por nuestro grupo como tal, aunque útil por haber demostrado suficiente sensibilidad y especificidad y menos mutaciones somáticas que *VH-JH*, sólo se detecta en aproximadamente un 60% de los pacientes con mieloma.<sup>199</sup> Finalmente, la infiltración medular por esta enfermedad, con frecuencia parcheada y moderada, así como la afectación extramedular, dificultan o invalidan estos estudios en los que la muestra testada es siempre MO, bien porque no contiene células tumorales o porque estas se diluyen y enmascaran en un fondo celular normal y policlonal.

Hasta la fecha sólo 2 estudios han comparado directamente los resultados de la CMF y la PCR como técnicas de detección de EMR en pacientes con MM. El primero, publicado por Sarasquete *et al* 2005,<sup>200</sup> se llevó a cabo en 32 pacientes sometidos a TASPE en los que se cuantificó por ambas técnicas la EMR en el día +100. Con las limitaciones asociadas al reducido número de pacientes estudiados, la PCR mostró mayor sensibilidad y capacidad predictiva que la CMF mientras que ésta última se vio favorecida por una mayor aplicabilidad y menor dificultad técnica y laboriosidad. El segundo estudio, publicado por Lioznov *et al* sobre 69 muestras de 13 pacientes sometidos a trasplante alogénico encuentra una muy elevada correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas y atribuye a ambas similar valor clínico y tasa de aplicabilidad.<sup>201</sup>







## **Hipótesis y objetivos**

---



La evolución de los enfermos con MM ha cambiado significativamente en las últimas décadas debido a la introducción del trasplante hematopoyético y nuevos fármacos como los inhibidores de proteasoma y los inmunomoduladores. Esto se ha traducido en un aumento de la posibilidad de alcanzar RCs (en torno al 50% tras trasplante y nuevos fármacos) y asociados a la misma un aumento en la SLP y SG. Por ello, hoy día la RC constituye un objetivo en todos los esquemas terapéuticos de mieloma. Sin embargo, sabemos que los criterios actuales de RC son subóptimos ya que están basados en técnicas de baja sensibilidad como la IF (se requiere negatividad) y la morfología (se requiere <5% de CP en MO). Diversos estudios indican que las técnicas inmunofenotípicas y moleculares tienen una mayor sensibilidad y permitirían evaluar la EMR en MO, de forma que cuanto mayor sea la profundidad de la respuesta mayor será la supervivencia.

En el campo molecular existen distintas estrategias, con diferente grado de sensibilidad y especificidad, de entre las cuales aquéllas basadas en el uso de *primers* y/o sondas diseñados específicamente para cada paciente, y que además permiten la cuantificación de la masa tumoral residual, han mostrado valor clínico en pacientes con mieloma. Desafortunadamente, la aplicabilidad de algunas de ellas es baja, de manera que nuestra hipótesis es que la búsqueda de nuevos marcadores moleculares y/o el uso de muestras alternativas (por ejemplo, enriquecidas en CP mediante selección inmunomagnética CD138+) podrían aumentar esta aplicabilidad.

Por otro lado, hasta ahora no se han hecho estudios prospectivos que evalúen los problemas responsables de los fallos en cada uno de los pasos del estudio molecular de EMR. Por ello, nuestra segunda hipótesis es que la utilización de la estrategia propuesta por el grupo europeo Euro-MRD, ampliamente estandarizada pero todavía no aplicada a mieloma, permitiría investigar e identificar los pasos en los que se producen los errores en la técnica de detección de EMR. A su vez, este estudio prospectivo sería una oportunidad única para comparar la investigación de EMR por técnicas moleculares frente a inmunofenotípicas. Si la hipótesis de que las primeras tienen mayor sensibilidad y predicen mejor la supervivencia se demostrara, se convertirían en una alternativa clara a la CMF; de lo contrario, dada su mayor dificultad técnica y laboriosidad, habría que considerarlas un método de reserva y seguir explorando otras alternativas moleculares como la NGS.

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Investigar la optimización de técnicas moleculares para detección de EMR en MM

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Explorar la utilidad de *Kde* como marcador molecular de EMR en MM
- Analizar el papel del uso de muestras de MO enriquecidas en CP mediante selección inmunomagnética CD138+ como material inicial para el estudio de EMR en pacientes con MM

## **Material, métodos y resultados**

---



**ARTÍCULO 1: Uso de *Kde* como marcador molecular adicional para el estudio de la enfermedad mínima residual mediante RQ-PCR en pacientes con MM**

INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS: El estudio de la EMR mediante PCR en pacientes con MM presenta varios problemas, entre los que se incluye la ausencia de un marcador molecular óptimo. En este sentido, *VH-JH* presenta con frecuencia mutaciones somáticas y *DH-JH* sólo se detecta en aproximadamente 60% de los pacientes. Como alternativa, los reordenamientos de *Kde* se detectan en todos los síndromes linfoproliferativos B  $\lambda$  y en un tercio de los  $\kappa$  y no presentan mutaciones somáticas que comprometan la eficiencia de *primers* y sondas. Por ello, al igual que sucede en leucemia linfoblástica aguda, podrían usarse con éxito como marcadores de EMR en MM.

MÉTODOS: En primer lugar, investigamos la incidencia, uso de segmentos génicos y características de la región de unión del reordenamiento *Kde* en muestras de 96 pacientes con MM obtenidas en el momento del diagnóstico. Para ello, tras extraer DNA de las muestras mediante métodos estándar, amplificamos el reordenamiento siguiendo protocolos BIOMED-2, y secuenciamos los productos de amplificación mediante *Big-Dye terminators*. Tras estos estudios, investigamos el uso de *Kde* como marcador molecular para el seguimiento de EMR mediante RQ-PCR en 16 casos seleccionados al azar. Para esto, usamos un *primer forward* específico de la región de unión del reordenamiento en combinación con un *primer reverso* y una sonda TaqMan, ambos consenso y complementarios de la secuencia germinal, siguiendo la estrategia descrita por van der Velden *et al.*

RESULTADOS: En 43 de los 96 casos analizados (45%) se amplificaron reordenamientos monoclonales de *Kde*, monoalélicos en 29 casos (66%) y bialélicos en los restantes 14 casos. La secuencia del reordenamiento se obtuvo con éxito en el 88% de los casos, encontrándose *Kde* reordenado con igual frecuencia con *Vk* que con intrón-RSS. La mediana del número de nucleótidos añadidos o eliminados de la región de unión fue 1 y 5, respectivamente, siendo *Vk1* y *Vk3* los segmentos génicos identificados con mayor frecuencia. El 94% de las secuencias obtenidas presentaban más de un 98% de homología con la secuencia germinal. Tras aplicar la estrategia arriba descrita para analizar *Kde* como marcador de EMR, 5 de los 16 casos seleccionados tuvieron que excluirse por la presencia de amplificación inespecífica inasumible ( $C_T$  muestras  $> C_T$  *background*); 8 de los 10 casos restantes cumplían todos los requisitos del grupo Euro-MRD para la cuantificación de la EMR, alcanzándose una sensibilidad  $<5 \times 10^{-4}$  en el 87,5% de los casos y  $<10^{-4}$  en 50% de los casos.

CONCLUSIONES: En 50% de los pacientes con MM se detectan reordenamientos de *Kde*, la mayoría pueden secuenciarse con éxito y carecen de mutaciones somáticas. El uso de *Kde*



como marcador adicional para el estudio de EMR en pacientes con mieloma incrementa la aplicabilidad de estos estudios en un 9% de los casos en general y en 20% en casos lambda, grupo en el que supone un avance significativo. Por otro lado, las peculiaridades del reordenamiento de *Kde* en mieloma (patrón fijo, con región de unión única y muy corta), explican la aparición, relativamente frecuente, de amplificaciones inespecíficas, lo que reduce su sensibilidad como marcador de EMR.

## ORIGINAL ARTICLE

**Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma**Noemí Puig<sup>1</sup>, María E. Sarasquete<sup>1,2</sup>, Miguel Alcoceba<sup>1,2</sup>, Ana Balanzategui<sup>1</sup>, María C. Chillón<sup>1,2</sup>, Elena Sebastián<sup>1</sup>, Marcos G. Díaz<sup>1,2</sup>, Jesús F. San Miguel<sup>1,2</sup>, Ramón García-Sanz<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Paseo de San Vicente, Salamanca; <sup>2</sup>Center of Investigation in Cancer (CIC), Campus Miguel de Unamuno, University of Salamanca, Salamanca, Spain**Abstract**

*Background and Objectives:* Minimal residual disease (MRD) assessment by PCR in multiple myeloma (MM) has several shortcomings, including the lack of a suitable target. Kappa deleting element (*KDE*) rearrangements occur in virtually all Ig-lambda B-cell malignancies and in 1/3 of Ig-kappa are not affected by somatic hypermutation and, as in ALL, could be used as PCR targets. *Methods:* We have first investigated the incidence, gene segment usage, and CDR3 composition of *IGK-KDE* rearrangements in 96 untreated myeloma patients. Second, we tested 16 *KDE* gene rearrangements as molecular targets for MRD assessment by RQ-PCR using a germline reverse primer and a germline Taqman probe in combination with allele-specific oligonucleotides (ASO) as forward primers. *Results:* Monoclonal *KDE* rearrangements were amplified in 45% (43/96) of cases, monoallelic in 2/3 of them (29 cases), and biallelic in the remaining 14 cases. Overall, 88% of cases were successfully sequenced, *KDE* being equally frequently rearranged with *VK* and with intron-Recombination signal sequence (RSS). Median numbers of inserted and deleted nucleotides in the junctional region were one and five, respectively. *Conclusions:* Using *KDE* rearrangements as additional PCR target for MRD assessment in MM improves the applicability of these studies in 9% of cases overall and in 20% of lambda cases. Its use in the latter subset could represent a significant advance.

**Key words** multiple myeloma; minimal residual disease; real-time quantitative PCR; kappa deleting element; immunoglobulin kappa gene

**Correspondence** Ramón García-Sanz, Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Paseo de San Vicente, 58-182, Salamanca 37007, Spain. Tel: +34 923291384; Fax: +34 923294624; e-mail: rgarcias@usal.es

Accepted for publication 13 July 2012

doi:10.1111/ejh.12000

In patients with multiple myeloma (MM), response rates have significantly increased with the use of autologous stem cell transplantation and new drugs (1–4). This has prompted the introduction of highly sensitive techniques such as PCR and multiparameter flow cytometry (MFC) to detect residual disease as well as the definition of new response criteria accordingly (5). Minimal residual disease (MRD) detection by immunoglobulin heavy-chain real-time quantitative PCR (IGH RQ-PCR) and MFC has proved to be of prognostic value in MM patients (6–11). Compared with MFC, RQ-PCR seems to have higher sensitivity but lower applicability, partly due to the lack of a suitable target free of somatic

hypermutation (SHM), thus avoiding mismatches with the primers and probes (8). New strategies aimed at improving the applicability and performance of the PCR are thus needed.

Our group has previously shown the value of using incomplete DJH rearrangements instead of complete VDJH as molecular markers for investigating MRD in MM because the former have a much lower incidence of SHM (12). DJH rearrangements are detected in approximately 60% of patients, they are specific markers and allow the detection up to five tumor cells in a background of  $1.6 \times 10^{-5}$  normal cells (12). Alternative strategies include the use of patient-specific probes and primers to avoid mismatches

caused by SHM although these are expensive and time-consuming, as well as the use of nested-PCR, a qualitative approach that requires additional post-PCR manipulations that could lead to PCR cross-contamination (9,12).

*KDE* rearrangements in the human *IGK* light-chain locus occur in virtually all Ig-lambda B-cell malignancies and in one-third of Ig-kappa, they are not affected by SHM and could therefore be used as alternative targets for MRD assessment in B-cell proliferations (13). Thus, in precursor-B acute lymphoblastic leukemia, *IGK-KDE* rearrangements are considered excellent PCR targets for MRD analysis because they are frequent, highly stable at relapse and generate sensitive RQ-PCR assays (14). To our knowledge, the value of *IGK-KDE* as a potential molecular marker for MRD detection by PCR in MM has not been assessed.

The purpose of this study was to evaluate the applicability of *KDE* rearrangements as PCR targets for quantitative MRD detection by RQ-PCR analysis using the TaqMan technology in patients with MM. As a first step, we investigated the incidence, gene segment usage, and CDR3 composition of *KDE* rearrangements in a cohort of 96 untreated patients with myeloma. Monoclonal *KDE* rearrangements were amplified in 45% of cases and could be successfully sequenced in 88% of them. Based on these positive results, we then analyzed the potential value of this marker for MRD detection in 16 randomly selected cases. Our results showed that this strategy could represent an additional approach that would expand the applicability of MRD analysis in MM.

## Material and methods

### Cell samples and DNA extraction

Genomic DNA from bone marrow aspirates of 96 untreated patients with MM enrolled in Grupo Español de Mieloma (GEM) protocols was isolated using DNAzol reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Identification of *KDE* rearrangements

*KDE* rearrangements were amplified following the BIOMED-2 Concerted Action, using one multiplexed tube containing six family-specific *VK* primers and an additional forward primer recognizing a sequence upstream of the *intronRSS* in combination with the *KDE* reverse primer (14). All reactions were carried out in 25  $\mu\text{L}$  containing 0.1  $\mu\text{g}$  of DNA samples and 10 pmol of each primer. The clonal population was identified by fragment analysis in an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Sequencing and CDR3 identification

PCR products were directly sequenced using Big-Dye terminators (Applied Biosystems). *KDE* and *intron-RSS* segments

were identified by comparison with their corresponding germline sequences, and *VK* segments were identified using the ImMunoGeneTics (IMGT) database (<http://www.imgt.org/>) (15). The *VK* gene segments were named according to the nomenclature used in the IMGT database.

Once the segments were identified, the N region was analyzed and highlighted for the allele-specific oligonucleotides (ASO) primer design.

### ASO primer design

All ASO primers were designed using the OLIGO 6.1 software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) complementary to the *VK-KDE* or *intronRSS-KDE* junction regions following previously published recommendations (12). For ASO primer specificity testing, an RQ-PCR assay including diagnosis DNA as a positive control and a buffy coat pool from healthy individuals as a negative control was performed. Each ASO primer was tested at different annealing temperatures, ranging from 60 to  $69^{\circ}\text{C}$ , in an attempt to find the optimal temperature with the maximum sensitivity and specificity for each particular assay.

### RQ-PCR analysis

For the ASO primer approach, we used the germline *KDE* probe (5'- AGC TGC ATT TTT GCC ATA TCC ACT ATT TGG AGT-3') and the germline *KDE* reverse primer (5'- TAC AGA CAG GTC CTC AGA GGT CAG-3') described by van der Velden *et al.* (14) The ASO forward primers were designed at the same strand as the germline *KDE* probes. The 3' end of each ASO primer was positioned in the junctional region.

RQ-PCR was performed in MicroAmp 96-well optical plates on a Step One Plus real-time PCR system (PE Applied BioSystems). All reactions were carried out in a 25  $\mu\text{L}$  final volume, containing 12.5  $\mu\text{L}$  of  $1\times$  TaqMan Universal Mastermix (PE Applied BioSystems), 300 nm of each primer, and 200 nm of probe. A measure of 100 ng genomic DNA was added in triplicate for the RQ-PCR assay. RQ-PCR conditions were 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , and 50 cycles consisting of 15 s denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$ , and 60 s at  $60\text{--}64^{\circ}\text{C}$  for annealing/extension depending on each particular ASO primer. The cycle in which fluorescent emission reaches ten-fold the basal emission is known as the cycle threshold (CT), a value that is proportional to the copy number of the target gene.

Diagnostic DNA from each patient was serially diluted into the buffy coat pool from healthy individuals from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ . Furthermore, between the lower dilutions, we performed two additional five-fold dilution steps. The standard curves were calculated using the following dilutions:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5\times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5\times 10^{-5}$ , and  $10^{-5}$ . Calculations were made to allow amplification of 1  $\mu\text{g}$  of

each dilution. RQ-PCR data were interpreted according to van der Velden *et al.* (16) Sensitivity, quantitative range, slope, and correlation coefficient of each RQ-PCR assay were analyzed.

## Results

### Detection of *Vk-KDE/intronRSS-KDE* clonal rearrangements, gene segment usage and CDR3 composition

Monoclonal *KDE* rearrangements were amplified in 45% (43/96) of cases, being monoallelic (one peak) in 29 (67%) cases and biallelic (two peaks) in 14 of them (33%). Twenty-one samples did not amplify and 32 produced a polyclonal pattern.

Among the 29 monoallelic cases, we obtained the sequence in 28 (97%) with *Vk-KDE* rearrangements detected in eight cases (29%) and *intronRSS-KDE* rearrangements in 20 cases (71%). Of the 14 biallelic cases, ten (71%) were fully sequenced (20 sequences), with a double *Vk-KDE* rearrangement and *Vk-KDE/intron-KDE* detected in five cases each. In four cases, we were unable to obtain the sequence of one ( $n = 1$ ) or both ( $n = 3$ ) rearrangements. Overall, we identified at least one sequence in 39 of the 43 clonal cases (91%). All patients with biallelic rearrangements and 13 of the 29 cases with monoallelic rearrangements had lambda MM, while the remaining 16 had kappa MM.

Frequencies of IgK-*KDE* gene rearrangements (*Vk-KDE/intronRSS-KDE*) and *Vk* family gene usage in *Vk-KDE* rearrangements are summarized in Table 1. *Vk1* and *Vk3* gene segments were the most frequently used, whereas no rearrangements involving *Vk5* and *Vk7* were found. Overall, the median number of inserted nucleotides in the junctional region was one (range: 0–6), and the median number of deletions was five (range: 0–16). Among

**Table 1** Frequencies of *IGK-KDE* gene rearrangements (*Vk-KDE/intronRSS-KDE*) and *Vk* family gene usage in *Vk-KDE* rearrangements in multiple myeloma

	Monoallelic ( $n = 28$ ) (%)	Biallelic ( $n = 10$ ) (%)	Total ( $n = 48$ ) (%)	Normal B cells (%)
Intron RSS-Kde	20 (71)	5 (25)	25 (52)	–
Vk-Kde	8 (29)	15 (75)	23 (48)	–
Vk1	4 (50)	5 (33)	9 (39)	50–56
Vk2	1 (12.5)	3 (20)	4 (17)	6–10
Vk3	2 (25)	5 (33)	7 (30)	25–30
Vk4	1 (12.5)	1 (7)	2 (9)	4–19
Vk5	0	0	0	ND
Vk6	0	1 (7)	1 (5)	ND
Vk7	0	0	0	ND

ND, not determined; *KDE*, kappa deleting element.

*Vk-KDE* rearrangements, the median number of inserted and deleted nucleotides were one (range: 0–4) and five (range: 0–16), respectively, similar to the *intronRSS/KDE* rearrangements that had a median of one (range: 0–2) and four (range: 0–10) inserted and deleted nucleotides, respectively.

### Mutation status

The number, type, and location of mutations detected in *Vk*, *KDE*, and *intron-RSS* gene segments are detailed in Table 2. Thirty-two (67%) of the 48 sequences obtained were completely unmutated, and 13 (27%) had at least 98% homology with the corresponding germline sequences. In the three (6%) remaining cases, the mean number of mutations was 2.1%, ranging from 2.1% to 3.2%. *KDE* was mutated in seven of the 48 sequences analyzed, and *Vk* was only found to be mutated in three cases, all within biallelic *KDE* rearrangements. Mutations were mostly point mutations, and transitions were more frequently detected than transversions.

### Evaluation of ASO primer design

Sixteen cases were randomly selected for ASO primer design testing. Forward ASO primers were designed at the junction region of *intronRSS-KDE* in six cases and *Vk-KDE* in ten cases. Primer sequences and location are shown in Table 3. Based on the results of the initial evaluation with an annealing temperature of 60°C, five samples were excluded from further analysis because the CT of the target samples was similar or higher than that of the background (see Table 3). Eight cases exhibited amplification of normal mononuclear cells (MNC) DNA, with a median CT value of 37 (range: 33.5–41.3).

### Applicability of RQ-PCR analysis for MRD detection via IgK-*KDE* rearrangements

Standard curves were performed in ten cases. The quantitative range, sensitivity, correlation coefficient, and slope of the RQ-PCR assays using the ASO primer approach are summarized in Table 4. Eight cases fulfilled the criteria for sensitivity and quantitative range according to the EuroMRD group (formerly known as ESG-MRD-ALL) recommendations (16), reaching sensitivities of  $\leq 5 \times 10^{-4}$  (7/8 cases, 87.5%) and  $\leq 10^{-4}$  (4/8 cases, 50%). As far as clinical data are concerned, Table 5 details patient's characteristics, results of the MRD assessment by RQ-PCR and MFC, and outcome of these eight cases. Comparative analysis of both techniques showed similar results in three cases (953, 1139 and 1477) and slightly discordant in three, presumably being PCR more predictive in one case (1160) and MFC in two (1391 and 1493). In the remaining two cases (876 and 1612)

**Table 2** Junctional region description and gene segment mutations of Kde rearrangements

Patient code	Kde RA	Junctional region	Intron	Vk	Kde	% Of mutations
Monoallelic cases						
1160	Vk1	-1/GG/-5		0	0	0
1256	Vk1	-3/C/-2		0	13G>A	0.8
1391	Vk1	-4/CC/-1		0	0	0
1431	Vk1	-1/0/-2		0	0	0
1102	Vk2	-9/A/-7		0	0	0
1213	Vk3	0/T/-2		0	0	0
1499	Vk3	0/0/-4		0	0	0
1166	Vk4	0/C/0		0	0	0
1133	Intron	-3/T/-7	59A>G		0	0.9
1113	Intron	-4/0/-3	24A>G		0	0.7
1277	Intron	-4/0/-1	0		0	0
1504	Intron	-4/C/-2	0		0	0
1484	Intron	-2/0/-1	0		0	0
09-3130	Intron	-4/CC/-2	0		0	0
07-6720	Intron	-5/C/0	0		0	0
974	Intron	-1/C/-3	61A>G		0	0.7
06-4764	Intron	-4/0/-1	0		0	0
1612	Intron	-2/0/-1	26A>G		0	0.7
07-4116	Intron	-3/CC/0	0		0	0
07-4971	Intron	-3/CT/-1	0		0	0
07-2471	Intron	-1/0/-8	2C>A-62A>G		0	2.1
08-0726	Intron	0/GG/-3	28A>G		0	0.9
08-0957	Intron	0/CC/-3	0		2A>C	0.9
09-4545	Intron	0/C/-2	0		0	0
876	Intron	0/TG/-3	0		0	0
1250	Intron	0/0/-1	0		3A>G	0.7
1297	Intron	-1/C/0	0		0	0
1245	Intron	0/CATAGG/-3	63A>G		0	1
Biallelic cases						
08-1640	Vk1	0/GGAC/-4		10T>G	0	1.8
	Vk2	-9/0/-4		0	4_5insTC	1.6
1424	Vk1	-7/0/-4		22C>T	5_7delA	2.1–0.9
	Vk3	-1/0/-4		0	0	0
1477	Vk1	-4/0/-1		0	0	0
	Vk3	-4/0/-1		0	0	0
1493	Vk1	-4/0/-4		0	0	0
	Vk4	-5/TCC/-1		0	0	0
1315	Vk2	0/0/0		0	0	0
	Vk3	-7/0/0		0	0	0
1304	Vk1	0/C/-1		0	0	0
	Intron	0/0/0	28A>G		0	0.9
953	Vk1	-2/TT/-4		0	4PM	3.2
	Intron	-1/0/-9	0		0	0
1139	Vk2	0/C/0		1T>C	0	0.5
	Intron	-1/0/-5	0		0	0
1328	Vk3	-4/0/-1		0	0	0
	Intron	-5/0/0	0		0	0
1066	Vk3	0/TT/-6		0	92G>C	2
	Intron	-3/TT/-1	0		0	0

RA, rearrangement; PM, point mutations: 6C>G, 60G>A, 65C>T, 69G>A.

comparisons were not possible because MRD assessment by one of the two methods could not be performed (PCR and MFC respectively) due to the unavailability of the corresponding follow-up sample.

## Discussion

The lack of a suitable marker is one of the main problems for using PCR techniques for MRD investigation in patients

**Table 3** ASO primer sequences, locations and tests

UPN	Kde RA	Primer sequence and location	AT (°C)	C <sub>T</sub> sample	C <sub>T</sub> MNC	ΔC <sub>T</sub>
07-4640	Kde-intron	ATGCTG <u>CCGTAGCCAGCTTTCTG</u> <b>t</b> ACCGGCAGCC	60	41.12	40.38	–
07-4329	Kde-intron	ATGCTG <u>CCGTAGCCAGCTTTCTG</u> <b>g</b> CCCTAGTGG	60	26.44	33.50	7.06
			62	25.71	33.27	7.56
			<b>64</b>	25.51	33.35	7.84
974	Kde-intron	TGCCGTAGCCAGCTTTCTGAT <b>c</b> GCCCTAGTGGCA	60	42.64	42.60	–
1612	Kde-intron	TGCTG <u>CCGTAGCCAGCTTTCTG</u> <b>a</b> GAGCCCTAGT	60	24.67	36.48	11.81
			<b>62</b>	23.79	35.71	11.92
07-4116	Kde-intron	TGCCGTAGCCAGCTTTCTG <b>cc</b> GGAGCCC	60	33.06	33.74	–
876	Kde-intron	AGCCAGCTTTCTGATG <b>ggcccta</b> GTGGCAG	60	26.87	35.41	8.54
			<b>62</b>	26.19	35.11	8.92
			64	28.29	36.47	8.18
06-6087	Vk3-intron	GTATAATAACTGGCCT <b>cttagtggc</b> AGCCAGGGCG	60	30.54	32.38	–
1160	Vk1/Kde	TATTACTGTCACAGTTTAATAGTTACCCT <b>g</b> GCCTAGTG	60	24.11	38.98	14.87
			<b>62</b>	23.80	39.03	15.23
1391	Vk1/Vk3	ATTACTGTCAACAGTATTATAGTTTCC <b>cc</b> GAGCCCTAGTGGC	<b>60</b>	23.57	40.31	16.74
953	Vk1/intron	TTAGTGTGCAAAGTATGATAATCTCC <b>tt</b> CCCTACTG	<b>60</b>	27.90	50.00	22.10
1477	Vk1/Vk3	CAACTTACTATTGTCA <b>caggtaacagtttcc</b> GAGCC	60	25.41	34.94	9.53
			<b>62</b>	25.33	35.78	10.45
			64	25.53	35.56	10.03
1484	Vk2/intron	TTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC <b>ct</b> AGCCCTAG	<b>60</b>	31.63	50.00	18.37
08-1640	Vk1/Vk2	ACCCCTC <b>ggac</b> CCCTAGTGGCAGCCAG	60	34.34	27.75	–
1493	Vk1/Vk4	AGTTTACTACTGTCAGCAATATTATAGTACT <b>tcc</b> GAGCCCTAG	<b>60</b>	22.36	41.25	18.89
1315	Vk3/Vk2	TACTGCATGCRGGGTACACACTGGCC <b>tcc</b> GGAGCCC	60	27.70	33.93	6.23
			<b>62</b>	27.50	35.78	8.28
			64	27.12	33.52	6.40
1139	Vk2/intron	ATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC <b>ctc</b> GGAGCCCT	<b>60</b>	25.66	50.00	24.34

Locations of the ASO primers are underlined, and N nucleotides are represented in bold lower case letters. 974, 07-4640, 06-6087, 07-4116, and 08-1640 were excluded from further analysis after initial testing at 60°C. Optimal temperatures for selected primers are in bold.

ASO, allele-specific oligonucleotides; UPN, unknown patient number; RA, rearrangement; AT, annealing temperature; MNC, mononuclear cells.

**Table 4** Quantitative range, sensitivity, correlation coefficient and slope of the ASO-RQ-PCR analysis

Case	074329	1612	876	1160	1391	953	1477	1493	1315	1139
Sensitivity	10 <sup>-2</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>
Quantitative range	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>	5 × 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Slope		-3.352	-3.020	-3.546	-3.765	-3.615	-3.566	-3.648		-3.467
R <sup>2</sup>		0.994	0.980	0.995	0.993	0.991	0.999	0.991		0.985

ASO, allele-specific oligonucleotides.

with MM (8,9). As in other postgerminal center lymphoproliferations, IGH is somatically mutated in MM and, alternatively, DJH rearrangements are only present in approximately 60% of cases (17). We thus decided to evaluate the frequency and characteristics of *IgK-KDE* rearrangements in a series of 96 untreated patients with myeloma, and the potential applicability of this rearrangement as a target for RQ-PCR analysis. As mentioned above, the constant presence of SHM in VDJH rearrangements (18) is responsible for the frequent mismatches between primers, probes, and the target, leading to inaccurate quantification of tumor cells. By contrast, *KDE*, similarly to incomplete DJH rearrangements, are assumed to be free of SHM. Accordingly, it has recently been shown that *KDE* is an excellent marker

for the detection of MRD by RQ-PCR analysis in precursor-B acute lymphoblastic leukemia (14).

*KDE* rearrangements to the *VK/intron-RSS* segments were amplified in 45% of cases in our study, a figure comparable to the 57% observed in a series of 84 patients analyzed by Southern Blotting (19) and similar to the 55% rate (47/85 cases) reported by Hadzidimitriou *et al.* (20) As expected, all those patients with biallelic *KDE* rearrangements showed an Ig lambda monoclonal component ( $n = 14$ ) in serum and/or urine, whereas 16 of the 29 cases with monoallelic rearrangements had an Ig kappa monoclonal component. A recent review detailed the *VK* gene segment usage in MM, showing a clear preference for *VK1* family followed by *VK3*, results also confirmed by our study (21). These



**Table 5** Clinical data and comparative analysis of KDE ASO-PCR vs. multiparametric flow cytometry in eight selected cases with adequate PCR standard curve

Pt. number	Age (yr)	M-protein	ISS score	Hb (g/dL)	Creat (mg/dL)	Ca <sup>++</sup> (mg/dL)	CRP (mg/dL)	Bone lesions	Treatment	13q-	MRD		PROGR (Y/N)	PFS (mo)	Status	OS (mo)
											PCR	MFC				
876	61	A-λ	I	11	0.8	8.20	0.20	None	TD	N	NA	-	N	52	Alive	52
953	74	G-λ	II	10.8	0.94	9	0.22	None	VMP	N	+	+	Y	31.4	Alive	56
1160	60	A-κ	II	9.8	0.76	8.80	1.20	Minor	Polychemotherapy + Bortezomib	Y	+	+	Y	28	Alive	39
1139	60	G-λ	II	11.5	1.20	9.42	NA	Major	TD	N	+	+	Y	16	Alive	41
1391	57	G-κ	II	13.8	1.10	9	1	Minor	Polychemotherapy + Bortezomib	Y	+	+	N	33	Alive	33
1477	63	A-λ	III	8.7	1.40	9.40	0.06	Minor	Polychemotherapy + Bortezomib	N	-	-	N	31	Alive	31
1493	55	BJ-λ	I	12	0.97	8.90	0.03	Minor	VTD	Y	+	+	N	30	Alive	30
1612	53	G-λ	II	10.2	1	10	0.68	Minor	Polychemotherapy + Bortezomib	Y	-	NA	N	29	Alive	29

Pt, patient; ISS, international scoring system; Hb, hemoglobin; Creat, creatinine; CRP, C-reactive protein; MRD, minimal residual disease; ASO-PCR, allelic specific oligonucleotide polymerase chain reaction; MFC, multiparametric flow cytometry; PROGR, progression; PFS, progression free survival; mo, months; OS, overall survival; TD, thalidomide and dexamethasone; VMP, velcade, melphalan & prednisone; VTD, velcade, thalidomide & dexamethasone; NA, unavailable; BJ, bence jones; KDE, kappa deleting element. Discordant results are shaded; in dark gray, MRD technique with higher predictive value.

percentages are in line with *VK* family usage in normal B cells and other B-cell lymphoproliferations, largely reflecting the distribution of *VK* gene segments in the germ line pool (21). Unlike other malignancies, we found no preferential recombination of *KDE* (50% *VK-KDE*, 50% *intronRSS-KDE*) (13).

Rearrangements involving *KDE* are assumed to be free of SHM because deletion of intervening sequences in the *JK-CK intron* results in the removal of the *IGK* enhancer, which is thought to be essential for the SHM process to occur (13). In line with this concept, 94% of our sequences were unmutated and the percentage of mutations found in the rest was close to the limit of significance (mean: 2.1%; range: 2.1–3.2). As in *VDJH* and *DJH* (18), mutations in *KDE* rearrangements were mostly point mutations and transitions. *CDR3* composition and exonuclease activity did not differ between the two types of *KDE* rearrangements (*intronRSS* vs. *VK*) but were significantly shorter than previously reported for *VDJH* and *DJH* rearrangements as well as for *KDE* rearrangements in *ALL* (14,18).

The ASO primer test showed a high rate of non-specific amplification of normal MNC DNA (13 of 16 cases: 81%) compared with *ALL* that did so only in 11% of the *KDE* rearrangements tested (14). Seventy percent of cases reached a sensitivity of  $\geq 5 \times 10^{-4}$  with our ASO primer approach, a figure slightly inferior to that reported in *ALL*, which had sensitivity  $\geq 10^{-4}$  in 75% of cases (22). These two pitfalls of *KDE* as an MRD target in MM could be further clarified by the following explanations: (i) *IgK-KDE* rearrangements only have a single junction that limits the possibilities for designing an ASO primer; (ii) the *CDR3* region is very short; and (iii) *IgK-KDE* rearrangements in MM have a highly constant pattern of rearrangement, which have represented a disadvantage since traduced in frequent non-specific amplification. The two latter features are different from *ALL*, in which *KDE* is considered an excellent target for MRD assessment (14). Based on our data, the use of *KDE* as a complementary MRD target to *DJH* in patients with MM would increase the applicability of these studies in 9% of cases. Focusing on lambda patients, the addition of *KDE* would further increase this figure to 20%; therefore, the use of *KDE* as a target in this subset of patients could represent a significant advance.

From a clinical perspective, the number of cases here analyzed is insufficient to extract definitive conclusions. However, in this study, the use of *KDE* rearrangements as molecular target for MRD assessment in MM demonstrated predictive value (in 5/7 cases), in occasions more accurately than MFC (sample 1160), thus representing a valid alternative for cases not assessable with other approaches. These results suggest that MRD monitoring with *KDE* strategies merits further evaluation in a large series as a complement of other MRD strategies.

In summary, *KDE* rearrangements can be found in approximately 50% of cases in MM, they can be quite easily

sequenced and are essentially free of SHM. KDE rearrangements as alternative PCR targets for MRD assessment in MM improve the applicability of these studies in 9% of cases overall and in 20% of lambda cases. Owing to the singular characteristics of KDE in MM frequent background amplification could be observed, thus reducing the sensitivity of this marker as compared to ALL.

### Acknowledgements

The authors thank Phil Mason for checking the English usage and grammar of the manuscript & Alicia Antón for their technical assistance. This study was partly supported by the grant number PS09/01450 from the Spanish 'Fondo de Investigaciones Sanitarias'. N. Puig was partly supported by a grant from the SEHH (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia).

### Conflict of interests

The authors declare that they have no potential conflicts of interest.

### References

- Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, *et al.* High-dose therapy intensification versus continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood* 2005;**106**: 3755–9.
- Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;**348**:1875–83.
- Cavo M, Tosi P, Zamagni E, *et al.* Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol* 2007;**25**:2434–41.
- Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol* 2008;**9**:1157–65.
- Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, *et al.* Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;**117**:4691–5.
- Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, *et al.* Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;**112**:4017–23.
- Martinez-Sanchez P, Montejano L, Sarasquete ME, *et al.* Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. *Br J Haematol* 2008;**142**:766–74.
- Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, *et al.* Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;**90**:1365–72.
- Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, *et al.* Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 2010;**28**:2077–84.
- Rawstron AC, Davies FE, Dasgupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA, Morgan GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;**100**: 3095–100.
- Putkonen M, Kairisto V, Juvonen V, Pelliniemi TT, Rauhala A, Itälä-Remes M, Remes K. Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2010;**85**:416–23.
- Gonzalez D, Gonzalez M, Alonso ME, López-Pérez R, Balanzategui A, Chillón MC, Silva M, García-Sanz R, San Miguel JF. Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia* 2003;**17**:1051–7.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;**17**:2257–317.
- van der Velden V, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hählen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002;**16**:928–36.
- Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IGMT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:W503–8.
- van der Velden V, Cazzaniga G, Schrauder A, *et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;**21**:604–11.
- Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, García-Sanz R, Gutiérrez N, Seabra C, van Dongen JJ, González M, San Miguel JF. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia* 2003;**17**:1398–403.
- Gonzalez D, Gonzalez M, Balanzategui A, Sarasquete ME, López-Pérez R, Chillón MC, García-Sanz R, San Miguel JF. Molecular characteristics and gene segments usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica* 2005;**90**:906–13.



19. Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, Langerak AW, *et al.* Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 1999;**84**:328–35.
20. Hadzidimitriou A, Stamatopoulos K, Belessi C, *et al.* Immunoglobulin genes in multiple myeloma: expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica* 2006;**91**:781–7.
21. Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007;**110**:3112–21.
22. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, *et al.* Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;**115**:3206–14.

**ARTÍCULO 2: El uso de muestras de médula ósea enriquecidas en células plasmáticas mediante selección inmunomagnética CD138+ aumenta la aplicabilidad de los estudios de detección de enfermedad mínima residual mediante PCR en mieloma múltiple**

INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS: Con el uso de los nuevos fármacos y nuevas estrategias de tratamiento, la tasa de RCs en pacientes con MM ha aumentado significativamente. Ello ha propiciado la introducción de criterios de respuesta más estrictos y de técnicas más sensibles para la detección de la enfermedad residual, de entre las que tanto la CMF como la PCR han demostrado tener valor pronóstico claro. Sin embargo, los estudios de EMR en MM mediante PCR se ven significativamente limitados, entre otros motivos, por el uso de muestras con escasa infiltración tumoral. Por ello, hemos investigado la utilidad de enriquecer la muestra en CP, mediante selección inmunomagnética CD138+, con el fin de ver si estas muestras enriquecidas mejoraban la identificación de las dianas moleculares para el estudio de EMR en pacientes con MM. Los resultados se compararon con los obtenidos en muestras completas de MO sin enriquecer de los mismos pacientes.

MATERIAL y MÉTODOS: De cada una de las 25 muestras de MO analizadas, una fracción se sometió a selección inmunomagnética CD138+ usando el equipo AutoMacs y el resto, no procesado, sirvió como control. Siguiendo protocolos BIOMED2, amplificamos *VH-JH*, *DH-JH* y *Kde* como potenciales marcadores moleculares y los productos de PCR obtenidos se secuenciaron directamente en un dispositivo ABI 3130 mediante *Big-Dye terminators*.

RESULTADOS: En primer lugar, el análisis de la detección de clonalidad mostró que todas las muestras seleccionadas y un 84% de las no seleccionadas resultaron clonales por uno o más de los marcadores testados. Después, cuando tratamos de obtener la secuencia de los marcadores amplificados, comprobamos que mientras que en el grupo de las muestras seleccionadas 24 de los 25 casos (96%) resultaron aptos para estudios moleculares por disponer de la secuencia completa de uno o más de ellos, esto sólo se consiguió en 60% de las no seleccionadas. Dado que los procedimientos aplicados a los dos grupos de muestras comparados son idénticos, el beneficio en los resultados debe atribuirse a las características de las muestras enriquecidas. Al analizar los factores que influían en el éxito del procedimiento vimos que las muestras enriquecidas no sólo contenían más CP sino que también tenían una mayor concentración de DNA y por ende mayor concentración de DNA por PCR. Además, al comparar los casos en los que conseguimos detectar clonalidad frente a los negativos/fallos, como era de esperar, los primeros presentaban concentraciones significativamente más altas

de DNA. La misma observación se aplicaba para la comparación entre casos con secuenciación exitosa frente a aquellos en los que la secuenciación fracasó.

CONCLUSIONES: El uso de muestras de MO enriquecidas en CP mediante selección CD138+ incrementa significativamente la aplicabilidad de los estudios de EMR en MM dado que aumenta de 60% a 96% el porcentaje de pacientes inicialmente aptos para tales estudios por disponer de, al menos, un marcador molecular.

# The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma

Noemí Puig · María E. Sarasquete · Miguel Alcoceba · Ana Balanzategui · María C. Chillón · Elena Sebastián · Luis A. Marín · Marcos González Díaz · Jesús F. San Miguel · Ramón García Sanz

Received: 17 May 2012 / Accepted: 24 August 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** We have evaluated the use of CD138+ positively selected bone marrow samples to identify a molecular target for minimal residual disease assessment by polymerase chain reaction (PCR) in 25 untreated patients with multiple myeloma. A fraction of each sample was used for CD138+ selection, and the rest served as a reference control. VDJH, DJH, and Kde gene rearrangements were tested for amplification according to the BIOMED-2 Concerted Action. PCR products were directly sequenced in an automated ABI 3130 DNA sequencer using Big-Dye terminators. Within the CD138+ selected group, VDJH rearrangements were detected in all cases (100 %), DJH in 16 (64 %), and Kde in 18 (72 %) cases; whereas in the control samples, VDJH, DJH, and Kde rearrangements were detected in 19 (76 %), 11 (44 %), and 12 (48 %) cases, respectively. After sequencing, 24 (96 %) cases within the CD138+ group had a PCR target for MRD detection compared with 15 (60 %) cases in the control group. We conclude that the use of CD138+ positively selected bone marrow samples increases

the applicability of minimal residual disease studies by PCR in patients with multiple myeloma.

**Keywords** Multiple myeloma · Minimal residual disease · Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) · CD138+ selection · Applicability

## Introduction

Minimal residual disease (MRD) assessment has become routine practice in the management of several hematological malignancies, such as chronic myeloid leukemia, promyelocytic leukemia, and acute lymphoblastic leukemia. In multiple myeloma (MM), the situation has been very different until recently since the quality of response with conventional chemotherapy has been rather poor. Nevertheless, the high response rates associated with the use of autologous stem cell transplantation and novel agents have made complete response one of the treatment goals in MM [1, 2]. In this context, highly sensitive techniques, such as multiparametric flow cytometry (MFC) and polymerase chain reaction (PCR), have revealed their prognostic value, and, furthermore, immunophenotypic and molecular remissions have proved to be a key for long-term progression-free survival and potentially for overall survival (OS) [3–6]. Molecular analysis of MRD in MM is frequently hampered by inadequate diagnostic samples and/or the lack of a suitable molecular marker [5, 6]. In this study, we evaluated the use of CD138+ positively selected marrow samples from patients with MM at diagnosis as alternative material for identifying targets for MRD assessment by PCR, using total

---

N. Puig · M. E. Sarasquete · M. Alcoceba · A. Balanzategui · M. C. Chillón · E. Sebastián · L. A. Marín · M. G. Díaz · J. F. San Miguel · R. G. Sanz (✉)  
Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente, 58-182, Salamanca 37007, Spain  
e-mail: rgarcias@usal.es

M. E. Sarasquete · M. Alcoceba · M. C. Chillón · L. A. Marín · M. G. Díaz · J. F. San Miguel · R. G. Sanz  
Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

bone marrow samples from the same patients as a reference control.

## Design and methods

### Samples and DNA extraction

Cell samples were obtained from bone marrow aspirates of 25 untreated MM patients included in the Grupo Español de Mieloma/Programa Español para la Terapéutica en HEMopátias MALIGNAS protocols. Each sample was distributed into two fractions: one for CD138+ selection and the other, unselected, was used as a reference control. CD138+ plasma cell isolation was carried out using the AutoMACs automated separation system (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA). High molecular weight DNA was isolated using DNAzol reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) in unsorted samples and Qiagen columns in sorted samples. In sorted samples, a constant purity >90 % was confirmed. The median concentration of DNA was similar between both groups (27.9 vs. 32.3 ng/ $\mu$ L).

### Identification of rearrangements

All samples were tested for amplification of complete (VH-JH), incomplete (DH-JH), and Kde (Vk-Kde/intronRSS-Kde) rearrangements according to the BIOMED-2 Concerted Action [7]. For VDJH rearrangements, we used three family-specific primers covering framework regions 1 (FR1), 2 (FR2), and 3 (FR3) with a JH consensus primer. DJH rearrangements were amplified using family-specific primers DH1 to DH6 together with a consensus JH. Kde rearrangements were amplified using one multiplexed tube containing six family-specific Vk primers plus an additional forward primer recognizing a sequence upstream of the intron-RSS in combination with the Kde reverse primer. The clonal population was identified by fragment analysis in an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Sequencing

PCR products were directly sequenced using Big-Dye terminators (Applied Biosystems). We first tried to sequence FR1, DJH, and Kde in parallel; only if FR1 was unsuccessful that we sequence FR2, followed by FR3. Germline VH, DH, and JH segments from VDJH rearrangements were identified by comparison with the ImMunoGeneTics (IMGT) database (<http://www.imgt.org/>). DH and JH segments from DJH rearrangements were identified using BLAST search in the DH-JH germline locus sequence. Kde and intron-RSS segments were identified by comparison with their corresponding germline sequences and Vk segments by using the IMGT database.

**Table 1** Clonality detection by specific rearrangements ( $n=25$ )

	VDJH $n$ (%)	DJH $n$ (%)	Kde $n$ (%)	Suitable for sequencing <sup>a</sup> $n$ (%)
CD138+	25 (100)	16 (64)	18 (72)	25 (100)
Unselected	19 (76)	11 (44)	12 (48)	21 (84)

<sup>a</sup> Cases deemed to be clonal by GeneScan analysis

## Results and discussion

We first assessed clonality in all the 25 samples by amplifying VDJH, DJH, and KDE rearrangements (Table 1). VDJH was detected in all 25 cases within the CD138+ selected fraction but only in 19 (76 %) of the 25 unfractionated samples. Within the CD138+ selected samples, VDJH was detected using FR1 primers in 24 cases, and the other case was rescued by using FR3 primers; in the control samples, 15 cases were detected with FR1, three with FR2, and one with FR3 primers. DJH was amplified in 16 (64 %) cases within the CD138+ selected fraction and in 11 (44 %) cases within the control samples. Finally, KDE was detected in 18 (72 %) cases within the CD138+ selected samples and in 12 (48 %) cases within the unselected samples. If we pool the data from all three molecular markers investigated, we can conclude that all samples within the CD138+ selected group were suitable for sequencing, whereas only 21 (84 %) of the reference samples were suitable.

We then tried to identify the sequence of the previously amplified rearrangements (Table 2). VDJH sequencing was successful in 22 samples (88 %) within the CD138+ selected group and in 12 of the 19 (63 %) unselected samples. Most sequences within the CD138+ selected samples were obtained from FR1 (21), and only one was obtained from FR2; within the unfractionated samples, nine were obtained from FR1 and two from FR2. By contrast, only minor differences in sequence efficacy were observed for DJH (seven and five cases were successfully sequenced among the CD138+ and unfractionated samples, respectively) and KDE (11 and nine cases in each group). Interestingly, KDE was the only rearrangement to be successfully sequenced in three cases, two and one case per group, respectively. As expected, when both analyses were successful, sequences from the paired unsorted/sorted samples were identical. In summary, 96 % (24/25) of cases within the

**Table 2** Results of the sequencing by clonal rearrangements

	VDJH $n$ (%)	DJH $n$ (%)	Kde $n$ (%)	Suitable for MRD studies <sup>a</sup> $n$ (%)
CD138+ ( $n=25$ )	22/25 (88)	7/16 (44)	11/18 (61)	24 (96)
Unselected ( $n=21$ )	12/19 (63)	5/11 (45)	9/12 (75)	15 (60)

<sup>a</sup> Cases with one or more fully identified molecular targets

**Table 3** Characteristics of the samples

Sample	Heavy chain	Light chain	PPC (%)	[DNA] (ng/ $\mu$ L)	<i>VDJH</i>	<i>DJH</i>	<i>KDE</i>	Successfully Sequenced Targets
20081415	IgA	kappa	4	51	C	C	P	VDJH
1367			100	31	C	C	P	VDJH, DJ
20083745	IgG	kappa	11.1	15.9	C	C	C	VDJH, DJ
1499			100	229	C	C	C	VDJH, DJ
20085468	IgG	lambda	27	40	C	P	C	VDJH, KDE
1612			100	60.8	C	NA	C	VDJH, KDE
20064893	IgA	kappa	3.1	151.5	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
974			100	2.6	C	NA	C	KDE
20064028	IgA	lambda	14.6	21.8	C	C	NA	VDJH, DJH
876			100	21.8	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
20070281	IgG	lambda	1.2	31	C	P	C	–
1102			100	17.6	C	P	C	KDE
20071555	IgG	lambda	3.6	262	C	P	C	VDJH, KDE
953			89	167.4	C	P	C	VDJH
20072066	IgA	kappa	64	5.4	NA	NA	NA	–
981			100	167.4	C	C	P	VDJH
20073139	IgG	kappa	2.6	20.4	C	P	P	VDJH
1065			100	3.9	C	P	P	VDJH
20073977	IgG	lambda	6.7	106	NA	C	C	DJH
1123			100	14.2	C	P	C	VDJH
20074085	IgA	kappa	0.52	19	NA	NA	P	–
1369			100	14.1	C	C	P	VDJH, DJH
20074329	IgA	kappa	40	112.2	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
1113			100	725.5	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
20074555	IgG	lambda	0.14	26.8	C	P	P	–
1424			93	32.3	C	C	C	VDJH, DJH
20074640	IgG	kappa	12	452.2	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
1133			100	61.4	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
20075384	IgA	kappa	8.6	35.6	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
1160			100	94.6	C	C	C	VDJH, DJH, KDE
20075494	IgG	kappa	1.5	95.4	C	P	P	VDJH
1178			100	13.9	C	P	P	VDJH
20075706	IgA	kappa	1.74	23.4	C	P	P	–
1193			100	22.2	C	P	P	VDJH
20066087	IgG	lambda	26.8	25.3	NA	C	C	KDE
1066			100	83.7	C	C	C	–
20076331	IgD	lambda	26	62.5	C	P	NA	–
1213			100	147.6	C	C	C	VDJH, DJH
20076666	IgG	kappa	0.86	2.1	NA	NA	NA	–
1233			94	79.4	C	P	P	VDJH
20076722	IgG	kappa	26.8	35.8	C	P	C	–
1139			100	71	C	P	C	VDJH, KDE
20076892	IgA	kappa	4.3	24.7	C	P	NA	–
1250			100	22.1	C	P	C	VDJH, KDE
20080312	IgA	lambda	2	27.9	NA	NA	NA	–
1304			100	9.1	C	P	C	VDJH
20080371	IgA	kappa	29.3	23.1	C	P	C	KDE
1297			100	64.7	C	P	C	VDJH, KDE
20080625	IgA	lambda	4	21.2	C	P	C	KDE
1315			100	3.9	C	P	C	VDJH, KDE

Unsorted samples are LABELED with eight digits, and sorted samples are labeled with four digits. Discordant results between paired samples are italicized  
*C* clonal, *P* polyclonal, *NA* no amplification, *PPC* pathological plasma cells

CD138+ selected group were suitable for PCR-based MRD assessment, 14 (56 %) of them having two or more potential specific markers, while in the unselected samples, only 60 % (15/25) of cases were suitable for MRD studies, with eight (32 %) of them having two or more markers available.

The reasons underlying these differences in clonality detection and sequencing efficacy between both groups have to be necessarily related to the characteristics of the samples (Table 3) since methods of detection were uniform. One could think that the different percentage of pathological plasma cells between the two cohorts (100 vs. 6.7 %) is the only reason explaining the higher efficiency in target identification observed in the purified group. However, within the unselected samples, the percentage of plasma cells was not significantly different between clonal and nonclonal samples (6.7 vs. 1.4 %,  $P > .05$ ). In contrast, DNA concentration was higher in the clonal group than in the rest of the samples (35.6 vs. 12.2 ng/ $\mu$ L,  $P = 0.01$ ). Similar results were obtained when analyzing factors influencing the outcome of the sequencing, being DNA concentration higher in samples with at least one sequenced target than in those failing to provide any molecular marker (40 vs. 25.7 ng/ $\mu$ L,  $P = 0.09$ ). Obviously, the main variable influencing the success of target identification was the relative amount of tumoral DNA added per PCR assay (estimated by using both plasma cell percentage and DNA concentration; 23.4 vs. 2.3 ng/ $\mu$ L,  $P = 0.02$ ). Finally, in isolated cases in which target identification failed, reasons could rely on unobjectifiable poor DNA quality.

Previous studies of MRD in patients with MM have attributed molecular analysis failures to the lack of a molecular marker and to the inadequate quality of the diagnostic samples [5, 6]. In a recent study by Ladetto et al., 39 patients were successfully analyzed, but they had to previously exclude 62 cases due to the lack of a PCR marker, 38 of them due to unsuccessful sequencing [6]. Of the 62 patients initially enrolled for MRD assessment by Martinelli et al., 44 (71 %) could be analyzed (12 were not studied due to the lack of an adequate sample and neither CDRII nor CDRIII could be identified in six patients) [8]. In the study by Sarasquete et al., 12 of the 53 patients enrolled were excluded (four had degraded diagnostic DNA, nine had too few tumor cells to be able to obtain a PCR product that was good enough to be sequenced, and in three cases no IGH rearrangement could be amplified), thus giving an applicability rate of 77 % [5]. In our study, the applicability rate increased from 60 to 96 % with the use of CD138+ selected samples, which compares favorably with previous reports. Cloning of the PCR product could be an alternative strategy to further optimize the identification of PCR targets for MRD assessment in myeloma, although associated to high material and human costs and, thus, not easily applicable into the routine daily practice.

In MM, MRD assessment by RQ-PCR provides similar prognostic information to MFC [5], an approach that has

provided highly important information [3]. In addition, the PCR strategy can be used in cases where MFC cannot discriminate between pathological and normal plasma cells (~10 %) as well as to detect small tumor populations phenotypically different to the dominant clone. However, RQ-PCR for MRD evaluation in MM has not been implemented into the routine clinical practice, in part due to its low applicability, a problem that could be overcome with the use of CD138+ selected samples.

We conclude that the use of CD138 positively selected bone marrow samples increases the applicability of MRD studies by PCR in patients with MM, and we propose that it should be considered for inclusion as part of routine practice in the MM bone marrow samples processing.

**Acknowledgments** The authors thank Phil Mason for checking the English usage and grammar of the manuscript and Alicia Antón for her technical assistance. This work has been partially supported by the grant number PS09/01450 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. N. Puig was partially supported by a grant from the Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

1. Chanan-Khan AA, Giralt S (2010) Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol* 28:2612–2624
2. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC et al (2011) Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 117(18):4691–4695
3. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, Mateo G et al (2008) Multiparameter flow cytometry is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 112:4017–40213
4. Martínez-Sánchez P, Montejano L, Sarasquete ME, García-Sanz R et al (2008) Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-PCR: the prognostic impact of achieving molecular response. *Br J Haematol* 142:766–774
5. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J et al (2005) Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic specific real-time oligonucleotide polymerase quantitative and flow cytometry. *Haematologica* 90:1365–1372
6. Ladetto M, Pagliano A, Ferrero S, Cavallo F et al (2010) Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 28(12):2077–2084
7. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS et al (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257–2317
8. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S et al (2000) Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 18(11):2273–2281



**ARTÍCULO 3: Análisis crítico de la monitorización de enfermedad mínima residual mediante ASO RQ-PCR en pacientes con mieloma múltiple. Comparación con la citometría de flujo.**

INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS: Hemos analizado la aplicabilidad, sensibilidad y valor pronóstico de la ASO RQ-PCR como método para la cuantificación de EMR en pacientes con MM comparando los resultados con los obtenidos sobre las mismas muestras con CMF multiparamétrica.

MATERIAL y MÉTODOS: Estudiamos 170 pacientes previamente incluidos en 3 protocolos consecutivos de PETHEMA/GEM (GEM2000, GEM05<65 y GEM05>65) y que habían alcanzado al menos respuesta parcial post-tratamiento (día +100 post-TASPE en <65 años o tras inducción en >65 años). Para la cuantificación de EMR mediante PCR extrajimos DNA germinal mediante métodos convencionales, amplificamos *VH-JH*, *DH-JH* y *Kde* según BIOMED2 y, tras confirmar la existencia de clonalidad, secuenciamos los fragmentos de los genes amplificados para caracterizar la región CDR3 de uno o más de los 3 potenciales marcadores. Una vez diseñados los oligos complementarios a la región CDR3 y posteriormente validados, los usamos como primer "forward" junto con 1 de las 3 sondas consenso y 1 de 6 *JH* intrónicas según el método descrito por Verhagen; para *Kde*, usamos el método descrito por van der Velden para LLA. Construimos una curva estándar con diluciones de la muestra del diagnóstico que analizamos e interpretamos según van der Velden. Para el análisis de EMR mediante CMF usamos al diagnóstico una combinación validada de anticuerpos monoclonales, con la que se identificaron las aberraciones fenotípicas que luego se usaron para detectar las CP patológicas en las muestras de seguimiento.

RESULTADOS: El análisis de la aplicabilidad de la técnica de PCR mostró que 31 casos se perdieron por falta de detección clonalidad, 17 por no disponer de marcador molecular y 51 por funcionamiento subóptimo de los *primers*, de modo que la aplicabilidad final del procedimiento resultó del 42%. A estos 71 casos válidos, añadimos 32 de un estudio previo realizado por nuestro grupo, y por tanto analizamos la EMR en un total de 103 pacientes. La presencia de enfermedad residual se detectó en 54% de los casos por ASO RQ-PCR y en 46% por CMF. La correlación entre los resultados de la cuantificación de EMR obtenidos por ambas técnicas fue muy alta ( $r=0.881$ ,  $p<0.001$ ). La cantidad de EMR detectada reflejó la intensidad del tratamiento administrado (trasplante vs no-trasplante). El análisis del valor pronóstico de los resultados obtenidos por ambas técnicas puso de manifiesto la existencia de varios umbrales de EMR ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$ ) capaces de segregar grupos con diferente SLP, siendo  $10^{-2}$



<sup>4</sup> el de mayor capacidad predictiva, tanto en pacientes mayores (PCR: NR vs. 31 meses,  $p=0.029$ ; MFC: NR vs. 27 meses  $p=0.002$  como en sometidos a TASPE (PCR: 54 vs. 27 meses,  $p=0.001$ ; MFC: 45 vs. 27 meses,  $p=0.02$ ). Hasta la fecha, las diferencias observadas en la SG no han alcanzado significación estadística. Entre los pacientes en RC ( $n=62$ ), el umbral de  $10^{-4}$  discriminó 2 grupos de riesgo con diferente SLP (PCR: 49 vs. 26 meses,  $p=0.001$ ; MFC: 45 vs. 25 meses,  $p=0.001$ ) y diferente SG (PCR: NR vs. 60 meses,  $p=0.008$ ; MFC: 72 vs. 45 meses,  $p=0.014$ ).

CONCLUSIONES: La cuantificación de EMR en pacientes con MM, tanto mediante ASO RQ-PCR como con CMF, permite monitorizar la eficacia del tratamiento y demuestra tener valor pronóstico, estratificando a los pacientes en grupos con diferente riesgo de progresión. Mientras que la ASO RQ-PCR parece tener una sensibilidad ligeramente más alta, la aplicabilidad de la CMF es significativamente superior. Por ello, la CMF ha de considerarse la técnica de elección para la monitorización de EMR en MM, si bien la PCR tiene la ventaja de permitir trabajar sobre muestras almacenadas al no requerir inmediatez en el procesamiento de las células.

**TITLE:** Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry.

**RUNNING HEAD:** Residual disease in myeloma: PCR vs. flow

**AUTHORS:** Noemí Puig MD<sup>1</sup>, María E Sarasquete PhD,<sup>1</sup> Ana Balanzategui,<sup>1</sup> Joaquín Martínez PhD,<sup>2</sup> Bruno Paiva PhD,<sup>1</sup> Herbert García PhD,<sup>1</sup> Silvia Fumero MD,<sup>1</sup> Cristina Jiménez,<sup>1</sup> Miguel Alcoceba PhD,<sup>1</sup> María C Chillon PhD,<sup>1</sup> Elena Sebastián MD,<sup>1</sup> Luis Marín PhD<sup>1</sup>, María A Montalbán<sup>2</sup>, María V Mateos PhD,<sup>1</sup> Albert Oriol,<sup>3</sup> Luis Palomera,<sup>4</sup> Javier de la Rubia PhD,<sup>5</sup> María B Vidriales PhD,<sup>1</sup> Joan Bladé,<sup>6</sup> Juan J Lahuerta,<sup>2</sup> Marcos González PhD,<sup>1</sup> Jesús F San Miguel PhD,<sup>1</sup> Ramón García-Sanz PhD<sup>1</sup>

1. Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca; IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca, Spain
2. Department of Hematology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain
3. Department of Hematology, Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona, Spain
4. Department of Hematology, Hospital Clínico “Lozano Blesa”, Zaragoza, Spain
5. Department of Hematology, Hospital Universitario La Fe and Universidad Católica “San Vicente Mártir”, Valencia, Spain
6. Department of Hematology, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, Spain

**KEYWORDS:** Multiple myeloma, multiparameter flow cytometry, ASO RQ-PCR, minimal residual disease.

**ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:**

Ramón García-Sanz

Department of Hematology

University Hospital of Salamanca

Paseo de San Vicente, 58-182

Salamanca, 37007

SPAIN

Phone: +34 923291629 FAX: +34 923294624

Email: [rgarcias@usal.es](mailto:rgarcias@usal.es)

**RESEARCH GRANT SUPPORT:** This work has been supported with grants from the Spanish “Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)” (PS09/1450, PI12/02311, PI09/01882 and RTICC RD12/0036/0069 & 0058), “Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León” (HUS412A12-1), and the “Asociación Española Contra el Cáncer” (GCB 120981SAN). N. Puig was partially supported with a grant from the SEHH (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia).

## **ABSTRACT**

We have analyzed the applicability, sensitivity and prognostic value of Allele Specific Oligonucleotide Real time Quantitative Polymerase Chain Reaction (ASO RQ-PCR) as method for minimal residual disease (MRD) assessment in patients with multiple myeloma (MM), comparing the results with those of Multiparameter Flow Cytometry (MFC). 170 patients enrolled in 3 consecutive Spanish trials achieving at least partial response after treatment were included. Lack of clonality detection (n=31), unsuccessful sequencing (n=17), and suboptimal ASO performance (n=51) limited the applicability of PCR to 42% of cases. MRD was finally investigated in 103 patients (including 32 previously studied) with persistent disease identified by PCR and MFC in 54% and 46% of cases, respectively. A significant correlation in MRD quantitation by both techniques was noted ( $r=0.881$ ,  $p<.001$ ) being reflective of treatment intensity. Patients with  $<10^{-4}$  residual tumor cells showed longer progression free survival compared to the rest (not reached vs. 31 months,  $p=0.002$ ), with similar results observed with MFC. Among complete responders (n=62), PCR discriminated two risk groups with different PFS (49 vs. 26 months,  $p=0.001$ ) and OS (NR vs. 60 months,  $p=0.008$ ). Thus, although less applicable than MFC, ASO RQ-PCR is a powerful technique to assess treatment efficacy and risk stratification in MM.

**KEYWORDS:** Multiple myeloma, multiparameter flow cytometry, ASO RQ-PCR, minimal residual disease.

## 1. INTRODUCTION

Significant progress has been made in the treatment of multiple myeloma (MM) leading to 30-50% complete response (CR) rates in transplant but also in non-transplant eligible patients,<sup>1-10</sup> as well as increased progression free (PFS) and overall survival (OS). Thus, more stringent definitions of response and increasingly sensitive methods for monitoring treatment efficacy are needed.<sup>11</sup>

PCR is used for residual disease monitoring in CML, ALL and APL to determine prognosis and to guide therapy.<sup>12-14</sup> In MM, PCR with allele-specific oligonucleotide (ASO) primers complementary to the immunoglobulin heavy chain variable sequence (ASO PCR) is the most sensitive approach for the detection of malignant plasma cells (PC), reaching up to  $10^{-5}$ .<sup>15</sup> The clinical value of qualitative approaches has been modest because, due to its high sensitivity, most cases remain positive despite heterogeneous outcomes.<sup>16-18</sup> As alternative, real-time quantitative PCR (ASO RQ-PCR) provides an accurate quantification of residual disease thus overcoming the problem. However, the hypermutated configuration of the *IGHV* genes in PC causes mismatches between the gene segments and the corresponding primers hampering minimal residual disease (MRD) assessment in MM.<sup>19</sup> Despite this, several reports using quantitative PCR have been published in MM, showing effective outcome discrimination in the transplant setting.<sup>20-24</sup> Thus, the term molecular response has been included in the IMWG criteria, claimed as the highest degree of response.<sup>11</sup>

Multiparameter flow cytometry (MFC) can distinguish between normal and malignant PC by the aberrant expression of cell surface markers in approximately 90% of patients and is sufficiently sensitive to detect as few as  $10^{-4}$  atypical PC in a normal bone marrow (BM).<sup>25-27</sup> Recent studies conducted by the Spanish and UK groups have shown that negative MRD by MFC is predictive for prolonged PFS and OS, even in patients in CR.<sup>25-27</sup> These data support the concept of immunophenotypic response recently defined by the IMWG.<sup>11</sup>

ASO RQ-PCR and MFC have only been compared in few studies based on small number of patients.<sup>20, 28, 29</sup> Such a comparison is however crucial in order to determine their relative applicability, sensitivity and prognostic value and to guide clinical groups to define the optimal approach for prospective clinical trials. Here, we have performed an analysis in depth with a rigorous approach using the Euro-MRD consortium guidelines of the real applicability and potential pitfalls of the ASO RQ-PCR assay as analytic method for MRD quantification in a large series of patients with MM.<sup>15</sup> We have also compared ASO RQ-PCR and MFC as two different approaches for MRD assessment in patients with MM treated with and without ASCT in the era of novel anti-myeloma agents.

## 2. METHODS

### 2.1. Patients and treatments

All patients under study were included in Spanish PETHEMA/GEM trials, namely the GEM2000 (NCT00560053; VBMCP/VBADx6 followed by ASCT), GEM05MENOS65 (NCT00461747; either VBMCP/VBAD plus bortezomib in the last two cycles, thalidomide/dexamethasone or bortezomib/thalidomide/dexamethasone) for transplant-eligible patients, whereas elderly patients were treated according to the GEM05MAS65 study (NCT00443235; six induction cycles with bortezomib/melphalan/prednisone or bortezomib/thalidomide/prednisone). Drug dosage and schedule have been extensively described elsewhere.<sup>30, 31</sup> Patients achieving at least partial response either at day +100 after ASCT (if included in the GEM2000 and GEM05MENOS65 protocols) or after induction therapy (if enrolled in the GEM05MAS65 protocol) were referred for MRD investigations. Response to treatment was assessed according to the European Bone Marrow Transplantation group, slightly modified to include the near CR category.<sup>32</sup> Samples were collected after informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and with approval from the ethics committees of all participating institutions.

### 2.2. Sampling, DNA extraction, PCR amplification and sequencing of IGH and IGK genes

A total of 170 patients achieving at least a partial response had BM samples available both at diagnosis and after treatment. Genomic DNA was extracted using standard methods. PCR amplifications of complete IGHV-J, incomplete IGHD-J and IGKDEL rearrangements were performed according to the BIOMED-2 Concerted Action.<sup>33</sup> The clonal population was identified by fragment analysis in an ABI3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to well-established procedures.<sup>34</sup>

Clonal products were directly sequenced twice using an automated ABI3130 DNA Sequencer using Big-Dye terminators. Germline IGHV, IGHD, IGHJ, IGHKDEL and intron-RSS genes were identified using the ImMunoGeneTics (IMGT)(<http://www.imgt.org/>) and BLAST (accession number EMB/X97051, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) public databases.<sup>35,36</sup> Once the segments were identified, the N-region/s were highlighted for ASO-primer design.

### 2.3. ASO-primer design and Real-time Quantitative PCR (RQ-PCR)

All ASO primers were designed using the OLIGO 6.1 software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) complementary to the corresponding junction region/s following previously published recommendations.<sup>37</sup>

ASO-primer specificity testing was done with DNA from diagnosis and a buffy coat from healthy donors as positive and negative controls, respectively. If available, IGHD-J rearrangements were preferred as a target, followed by IGHV-J and IGHKDEL.<sup>38</sup>

For IGHV-J and IGHD-J rearrangements, the method established by Verhagen's *et al* was used for RQ-PCR.<sup>39</sup> For IGHKDEL rearrangements, we used the germline IGHKDEL probe and reverse primer described by van der Velden *et al*, together with the forward ASO designed at the same strand as the germline probe.<sup>40</sup> All reactions were carried out according to the EuroMRD guidelines recommendations.<sup>15</sup>

DNA from baseline samples was serially diluted into the buffy coat pool from healthy individuals from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ , and standard curves were performed with appropriate dilutions. Calculations were made to allow amplification of 1.5  $\mu$ g of MRD samples. RQ-PCR data were interpreted according to van der Velden *et al*.<sup>15</sup>

### 2.4. Minimal residual disease assessment by multiparameter flow cytometry

Erythrocyte-lysed whole BM samples were immunophenotyped using a four-color direct immunofluorescence technique. The phenotypic aberrancies detected at diagnosis were used as patient-specific probes for MRD assessment.<sup>25,41</sup> For MRD analysis we used a two-step acquisition procedure: first, information from  $2 \times 10^4$  events corresponding to whole sample cellularity was stored; then data about CD38<sup>hi</sup> gated events were stored, between  $2 \times 10^5$  –  $2 \times 10^6$  leukocytes per tube. The multiparameter strategy used to differentiate normal and pathological PC has been previously described.<sup>25,41</sup> MRD negative patients were classified as those showing absence of phenotypically aberrant PC with a sensitivity between  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ .

### 2.5. Statistical methods

To estimate the statistical significance of the differences observed between means, the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were employed. The  $\chi^2$  test was used for comparison of dichotomous variables between groups. The relationship between the percentage of PC detected by ASO RQ-PCR and MFC was evaluated through Pearson correlation. Survival was analyzed by the Kaplan-Meier method, and differences between curves were tested for statistical significance with the two-sided log-rank test. PFS was measured from the start

of treatment to the date of progression or death. OS was measured from the start of treatment to the date of death or last visit. For all statistical analyses, SPSS software (version 15.0; SPSS, Chicago, IL) was used.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. PCR amplification of IGH and IGK genes**

Results of the amplification of IGH (V-J and D-J) and IGKDEL genes as per BIOMED 2 guidelines are summarized in Tables 1 and 2. In 31 out of the 170 (18%) patients included in the study none of the 3 markers tested could be amplified and thus, these cases were excluded from further analysis. Comparing the characteristics of these false negative cases *versus* those found to be clonal, we observed that the percentage of pathological PC and the concentration of tumor DNA were both significantly lower in the former group. From the remaining 139 cases, one marker could be amplified in 69 cases (50%) (IGHV-J in 44, IGHD-J in 16 and IGKDEL in 9) and two markers in 54 (39%) (IGHV-J + IGHD-J in 37, IGHV-J + IGKDEL in 16, and IGHD-J + IGKDEL in 1 case). In 16 samples (11%) all the 3 markers tested were amplified. A flow diagram depicting samples evolution can be found in the Supplemental section (Figure 1).

#### **3.2. Sequencing of IGH and IGK genes**

Out of the 139 cases found to be clonal, in 17 cases (14%), no successful sequencing was obtained. Comparing the characteristics of the samples successfully sequenced and the failures, again tumor DNA concentration was found to be significantly lower in the unsuccessfully sequenced group (Table 2). From the remaining 122 samples, one marker was sequenced in 77 cases, (63%; 48 IGHV-J, 17 IGHD-J and 12 IGKDEL), 2 markers in 34 cases (28%; IGHV-J + IGHD-J in 19, IGHV-J + IGKDEL in 13 and IGHD-J + IGKDEL in 2 cases) and all 3 markers could be identified in 11 samples (9%). Results of the gene segments identified by rearrangement are detailed in Table 3.

#### **3.3. ASO-primer design and testing**

The 122 samples with an available target were used for primer design. A total of 154 ASO-primers were designed: 91 in IGHV-J, 42 in IGHD-J and 16 in IGKV/intron-RSS-IGKDEL region. Five primers were designed in the corresponding IGHJ region. In 71 samples one primer was designed whereas two, three and four primers were designed in 23, 11 and one samples, respectively. Out of the 154 ASO-primers tested, 96 (62%)



were considered suitable for further analysis, whereas 58 had to be discarded. Among the 91 primers designed in IGHV-J, 38 (42%) performed successfully, 35/42 (83%) of those designed in IGHD-J and 12/16 in IGHKDEL (75%).

### **3.4. ASO RQ-PCR vs. multiparameter flow cytometry**

Out of the 170 cases initially included in the study, a total of 71 fulfilled Euro-MRD criteria and were considered suitable for MRD assessment, thus conferring a final applicability to ASO RQ-PCR for MRD monitoring in MM of 42%. Nevertheless this percentage would increase to 70% if we exclude the 48 failures (31 patients in which clonality could not be detected plus the 17 cases with no successful sequencing) attributable to pre-analytical problems. In order to obtain a larger series allowing us to draw stronger conclusions, for the subsequent MRD analyses we added the data from 32 additional patients previously studied by our group. These 32 cases mentioned were obtained from a total of 71 initially analyzed, therefore with a similar applicability than the present series (45%). However, since analyzed before the Euro-MRD guidelines were available, we have not included them in the analysis of applicability and pitfalls of the ASO RQ-PCR technique based on the Euro-MRD guidelines.<sup>15</sup> All these samples had both a molecular marker and a patient-specific immunophenotypic profile available for MRD assessment by ASO RQ-PCR and MFC, respectively.

A comparison between the sensitivities of ASO RQ-PCR and MFC for MRD detection in the 103 follow-up samples obtained after treatment showed that ASO RQ-PCR detected clonotypic cells in 55 (54%) cases, whereas phenotypically aberrant PC were identified by MFC in 47 (46%) cases. The mean (SD) percentage of tumor cells detected by ASO RQ-PCR and MFC was 0.31 (1.26) and 0.39 (1.36), respectively. A significantly high correlation between the MRD levels obtained by both techniques was observed (Figure 1;  $r=0.881$ ,  $p<0.001$ ), despite 18 (17.5%) discordant cases (11 with positive MRD by ASO RQ-PCR but negative by MFC, and 7 negative by ASO RQ-PCR but MRD positive by MFC). Grouping patients by treatment protocol, the quantity of tumor cells detected by both techniques correlated with the intensity of the treatment received, although not reaching statistical significance. Thus, the mean (SD) of tumor cells detected by ASO-RQ PCR was 0.60 (2.08), 0.35 (0.56) and 0.037 (0.11) for GEM2005MAS65, GEM2000, and GEM2005MENOS65 protocols, respectively [similar for MFC: 0.70 (2.20), 0.34 (0.52), and 0.14 (0.54)].

### 3.5. Prognostic value of MRD monitoring by ASO RQ-PCR and MFC

We have investigated the predictive prognostic value of different MRD thresholds ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$ ) on PFS. All of them discriminated two different risk categories, although  $10^{-4}$  was the most significant cut-off value. Thus, both techniques segregated two cohorts with significantly different PFS, both in intensively treated patients (PCR: 54 vs. 27 months,  $p=0.001$ ; MFC: 45 vs. 27 months,  $p=0.02$ ) and in non-intensively treated patients (PCR: NR vs. 31 months,  $p=0.029$ ; MFC: NR vs. 27 months  $p=0.002$ , Figure 2). The differences in OS have not reached statistically significant differences yet. Then, we combined the results obtained by both techniques to define 4 risk groups as follows: PCR+/MFC+, PCR-/MFC-, PCR-/MFC+ and PCR+/MFC-. No differences in PFS were observed between the two groups of patients with discordant results by both techniques who also showed a similar outcome to that of double negative patients (median PFS of 39, 45 and 48 months for PCR-/MFC+, PCR+/MFC- and PCR-/MFC-, respectively); by contrast, double positive patients showed a significantly shorter PFS (26 months,  $p<0.001$ ).

Finally, we focused only on patients in CR ( $n=62$ ). The MRD threshold of  $10^{-4}$  discriminated two groups of patients with different PFS (PCR: 49 vs. 26 months,  $p=0.001$ ; MFC: 45 vs. 25 months,  $p=0.001$ ), and also different OS (PCR: NR vs. 60 months,  $p=0.008$ ; MFC: 72 vs. 45 months,  $p=0.014$ ). These results are shown in Figure 3.

## 4. DISCUSSION

In the era of new treatment strategies in MM, with patients achieving unprecedentedly high CR rates, a new and yet unmet need has emerged: redefinition of response criteria. MFC has proven to be useful and clinically relevant but it requires experience and fully standardization and it is not broadly employed. As alternative, ASO RQ-PCR is a well standardized technique for MRD monitoring in ALL, AML, CML and also in MM, but it is time and labor-consuming which explains why patient series in MM are small and its clinical value remains to be established. This is counterbalanced by its high sensitivity for detection of MRD as well as the capacity to analyze not only the PC compartment but all clonal B cells.

Here, we report on a large series of MM patients investigated for MRD assessment by ASO RQ-PCR. First, we analyzed in depth the real applicability of this technique in MM, aiming to identify potential pitfalls. Our results show that ASO RQ-PCR yielded a limited applicability of 42%, which is significantly lower than that of MFC (>90%).<sup>25-27</sup> Exploring potential differences between the samples successfully analyzed and the

failures, we found the former group having a significantly higher percentage of pathological PC and tumor DNA concentration, thus highlighting the quality of the samples as an essential prerequisite to perform this type of studies. There were some cases with a successful PCR performance and low plasma cell infiltration that would not completely fit with this explanation, but they were a minority and further, our group has recently reported that the use of CD138+ selected samples can improve the percentage of successfully sequenced samples from 60% to 96%.<sup>42</sup> Most samples (88%) were referred from external centers but the analysis was performed within the first 24 hours from collection and thus the reliability of the studies by flow is preserved: molecular studies are not significantly affected by late sample arrival, which is of benefit in these type of centralized studies. Excluding pre-analytical problems, our study could show an applicability of 70% despite having used additional molecular markers, such as IGHD-J or IGKV-KDE/intron-RSS known to increase the applicability of the procedure in 10% and 9% additional cases, respectively.<sup>38,43</sup> We attribute these further failures to somatic hypermutations (SHM), characteristic of MM, that surely hampered clonality detection, sequencing success and ASO performance. Thus, despite various attempts of improvement, we observed a lower applicability rate than expected. This could be due to the following reasons: 1) our study is based on an unselected sample population; 2) we have strictly followed the Euro-MRD guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data and 3) we have used the standardized method designed for ALL, using only one specific forward primer, in order to test a method potentially applicable to the routine practice. However, applicability could be increased if two specific primers and a probe are also used. The reported rate of ASO RQ-PCR applicability rates is highly variable, ranging from 28 to 84%.<sup>16-18, 21,22,24,44,45</sup> These heterogeneous results are probably due to the use of different methods, including the use of specific primers and probes (mostly resulting in the higher applicability rates) as well as the use of selected cases without information regarding pre-analytical problems. As alternative, the use of the new high throughput sequencing strategies is opening new possibilities still under early evaluation.<sup>46,47</sup>

ASO-RQ PCR and MFC have been directly compared in two small studies, one of them performed by our own group, and none of the techniques could be considered definitively superior to the other.<sup>20,28,29</sup> In the present study, the mean percentage of residual tumor cells detected by ASO RQ-PCR and MFC was not significantly different (0.31 vs 0.39, respectively). However, residual clonotypic cells could be detected by ASO-RQ-PCR in 53% of cases while in 46% of patients using a 4-color MFC approach, thus suggesting a higher sensitivity of the former technique and further confirming the results of previous dilution experiments. Nevertheless, the sensitivity of MFC could be increased with the use of  $\geq 8$  colors<sup>48</sup>; moreover, the correlation among the results obtained by both techniques was very high ( $r=0.881$ ), and in fact discordances among both techniques were

relatively low (17.5%) and could be attributed to specific factors, such as the different sensitivity of both methods as well as the different targets analyzed. Thus, ASO RQ-PCR has the theoretical advantage of being able to identify all clonotypic cells, not only PC but also potential precursor clonal B cells, counterbalanced however by the fact that clonality is not equivalent to malignancy or poor outcome; this could explain the lack of differences in outcome noted between discordant cases. Regarding costs, we have estimated the prize of ASO RQ-PCR in Spain in 350 euros per diagnostic sample and in 100 euro for follow-ups, excluding human costs; in contrast, a 4-color flow cytometry test would cost approximately 50 euros per diagnostic sample and a similar quantity in follow-ups. However, prizes are greatly variable among countries and these numbers should be considered merely orientative.

We have also investigated the role of ASO RQ-PCR to evaluate treatment efficacy. The percentage of patients with undetectable disease by PCR noted in our study confirms the high efficacy of current treatment approaches in MM and highlights the efficacy of new drugs. Further, in patients with persistent disease, the residual tumor load correlates with the intensity of the treatment received. Thus, the lowest MRD level was detected in patients treated with novel agents plus ASCT, followed by conventional agents with ASCT, while the highest MRD level corresponded to patients treated with novel agents but not transplanted. It was also remarkable to see the parallelism of MFC and ASO RQ-PCR, showing both comparable results in terms of quantification of residual tumor cells in these three therapeutic subgroups. These results confirm the utility of MRD assessment to monitor treatment efficacy, as a valuable tool in the era of new drugs, particularly for the design of risk adapted consolidation and maintenance therapies.<sup>49</sup>

Finally, we have compared the ability of these 2 methods to predict outcome in the era of new treatment strategies and drugs in MM. As shown in Figure 2, both methods offered almost superimposable survival curves with a very high predictive value, both when used for MRD assessment in intensively treated and in non-intensively treated patients. This was demonstrated upon using different MRD thresholds ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , and  $10^{-4}$ ). Importantly, among patients in CR two cohorts with different PFS but also OS segregated using  $10^{-4}$  as MRD threshold, thus highlighting the heterogeneity of conventional responses and further confirming the significant value of both methods to predict outcome. Despite these findings, it is important to note that extramedullary relapses remain elusive for both methods.<sup>50</sup>

Overall, our results show that ASO RQ-PCR and MFC are two valid methods to monitor treatment efficacy, highly predictive of outcome both in transplanted and non-transplanted patients. ASO RQ-PCR is fa-

vored by a slightly higher sensitivity whereas MFC is significantly more applicable. Therefore, MFC should be considered the method of choice for MRD assessment in MM, while molecular methods can be deemed as a complementary tool until a substantial comparative advantage is demonstrated.

## **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Alicia Antón and Rebeca Maldonado for their technical assistance. This work has been partially supported by the grants PS09/01450 and PI12/02311 from the Spanish “Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)”, the grants RD12/0036/0069 & 0058 from “Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness” & European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”, grant number HUS412A12-1 from the “Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León”, and grant GCB-120981SAN from the “Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)”. N. Puig was partially supported with a grant from the SEHH (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia).

## **6. DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST**

Authors have no conflicting financial interests.

Supplemental information is available at Leukemia’s website.

## 7. REFERENCE LIST

1. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, Rosiñol L, Sureda A, de la Rubia J, et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol*. 2008;26:5775-5782.
2. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-3146.
3. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, Shaughnessy J, Rasmussen E, van Rhee F, et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2006;354:1021-1030.
4. Palumbo A, Gay F, Falco P, Crippa C, Montefusco V, Patriarca F, et al. Bortezomib as induction before autologous transplantation, followed by lenalidomide as consolidation-maintenance in untreated multiple myeloma patients. *J Clin Oncol*. 2010;28:800-807.
5. Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J, Gutiérrez N, Teruel AI, de la Paz R, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:934-941.
6. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359:906-917.
7. Kyle RA, Leong T, Li S, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, et al. Complete response in multiple myeloma: clinical trial E9486, an Eastern Cooperative Oncology Group study not involving stem cell transplantation. *Cancer*. 2006;106:1958-1966.
8. Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM, Caravita T, Falcone A, Callea V, et al. Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized, controlled trial. *Blood* 2008; 112(8): 3107-3114
9. Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007;370:1209-1218.

10. Chanan-Khan AA, Giralt S. Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol.* 2010;28:2612-2624.
11. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117:4691-4695.
12. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24:521-535.
13. Santamaría C, Chillón MC, Fernández C, Martín-Jiménez P, Balanzategui A, García-Sanz R, et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007;92:315-322.
14. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041-6051.
15. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-611.
16. Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, et al. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2003;102:1927-1929.
17. Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J.Clin Oncol.* 1999;17:208-215.
18. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S, Tosi P, Lemoli RM, et al. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J.Clin Oncol.* 2000;18:2273-2281.



19. García-Sanz R, López-Pérez R, Langerak AW, González D, Chillón MC, Balanzategui A, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica*. 1999;84:328-335.
20. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J, Mateo G, Martínez P, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
21. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L, et al. Major Tumor Shrinking and Persistent Molecular Remissions After Consolidation With Bortezomib, Thalidomide, and Dexamethasone in Patients With Autografted Myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28:2077-2084.
22. Bakkus MH, Bouko Y, Samson D, Apperley JF, Thielemans K, Van Camp B, et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126:665-674.
23. Putkonen M, Kairisto V, Juvonen V, Pelliniemi TT, Rauhala A, Itälä-Remes M, et al. Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur.J.Haematol*. 2010;85:416-423.
24. Korthals M, Sehnke N, Kronenwett R, Bruns I, Mau J, Zohren F, et al. The level of minimal residual disease in the bone marrow of patients with multiple myeloma before high-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation is an independent predictive parameter. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 423-431.
25. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009;94:1599-1602.
26. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002;100:3095-3100.
27. Paiva B, Martínez-López J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalbán MA, Fernández-Redondo E, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011;29:1627-1633.

28. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B, Bacher U, Zander AR, Kröger NM. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:913-916.
29. Martínez-Sánchez P, Montejano L, Sarasquete ME, García-Sanz R, Fernández-Redondo E, Ayala R, et al. Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. *Br.J.Haematol.* 2008;142:766-774.
30. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, López-Jiménez J, de la Rubia J, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood* 2012;120:1589-1596.
31. Martínez-López J, Bladé J, Mateos MV, Grande C, Alegre A, García-Laraña J, et al. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 2011; 118(3): 529-534
32. Bladé J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 1998;102:1115-1123.
33. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
34. López-Pérez R, García-Sanz R, González D, Balanzategui A, Chillón MC, Alaejos I, et al. Gene scanning of VDJH-amplified segments is a clinically relevant technique to detect contaminating tumor cells in the apheresis products of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:665-672.
35. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W503-W508.
36. González D, Balanzategui A, García-Sanz R, Gutiérrez N, Seabra C, van Dongen JJ, et al. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia.* 2003;17:1398-1403.

37. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-1034.
38. González D, González M, Alonso ME, López-Pérez R, Balanzategui A, Chillón MC, et al. Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia*. 2003;17:1051-1057.
39. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1426-1435.
40. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hählen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002;16:928-936.
41. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Bladé J, López-Berges C, Caballero D, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
42. Puig N, Sarasquete ME, Alcoceba M, Balanzategui A, Chillón MC, Sebastián E, et al. The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma. *Ann.Hematol.* 2013;92:97-100.
43. Puig N, Sarasquete ME, Alcoceba M, Balanzategui A, Chillón MC, Sebastián E, et al. Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2012;89:328-335.
44. Fenk R, Ak M, Kobbe G, Steidl U, Arnold C, Korthals M, et al. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004; 89: 557-566
45. Davies F, Forsyth PD, Rawstron AC, Owen RG, Pratt G, Evans PAS, et al. The impact of attaining a minimal residual disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2001; 112: 814-819

46. Ladetto M, Bruggemann M, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, Monitilo L, et al. Next-Generation Sequencing and Real-Time Quantitative PCR for Minimal Residual Disease (MRD) Detection Using the Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region: A Methodical Comparison in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), Mantle Cell Lymphoma (MCL) and Multiple Myeloma (MM). ASH Annual Meeting Abstracts 2012, #788
47. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization Of IgH breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur In pre-germinal center B cells. Blood 2013 Feb 22 [Epub ahead of print]
48. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 2012; 26(9): 1908-75
49. San Miguel J, Harousseau JL, Joshua D, Anderson KC. Individualizing Treatment of Patients With Myeloma in the Era of Novel Agents. J Clin Oncol 2008;26:2761-2766.
50. Wirk B, Wingard JR, Moreb JS. Extramedullary disease in plasma cell myeloma: the iceberg phenomenon. Bone Marrow Transplant. 2013;48:10-18.

TABLES

**Table 1.** Results of the amplification of IGH and IGK genes as per BIOMED2 guidelines

	VH-JH	DH-JH	Kde <sup>1</sup>
	n(%)	n(%)	n(%)
Clonal	111 (65)	70 (41)	43 (46)
Polyclonal	32 (19)	27 (16)	25 (26)
Nonspecific /no amplification	27 (16)	73 (43)	26 (28)

<sup>1</sup>Performed in 94 cases

**Table 2.** Comparison of the characteristics of the samples between the successfully analyzed group and the rest

	All	Clonality Assessment			Sequencing of clonal samples		
	n=170	Successful	Unsuccessful	<i>p</i>	Successful	Unsuccessful	<i>p</i>
PPC	7.32	7.80	4.25	0.017	7.73	5.46	0.072
(%; median, range)	(0.02-95)	(0.02-95)	(0.01-38)		(0.02-69)	(0.02-45.30)	
[DNA]	51.10	58.20	29.60	0.000	57.90	33.85	0.044
(ng/μL; median, range)	(1.80-556.3)	(2.10-556.3)	(1.80-102.1)		(2.10-556.3)	(1.80-332.4)	
Ng of tumor DNA/PCR assay	14.94	17.99	2.42	0.000	18.33	7.90	0.015
	(0.03-505.6)	(0.01-505.6)	(0-167.7)		(0.01-505.68)	(0-285.84)	

PPC: pathological plasma cells

**Table 3.** Gene segments repertoire by rearrangement

IGHV-J (n=91)						IGHD-J (n=48)				IGKDEL rearrangements (n=37)			
IGHV		IGHD <sup>1</sup>		IGHJ		IGHD		IGHJ		Monoallelic (n=26)		Biallelic (n=11)	
1	11 (12%)	1	6 (6%)	1	1 (1%)	1	12 (25%)	1	2 (4%)	intronRSS	19 (73%)	intronRSS	6 (27%)
2	6 (6%)	2	20 (22%)	2	2 (2%)	2	14 (29%)	2	0	IGKV1	4 (15%)	IGKV1	6 (27%)
3	57 (63%)	3	27 (30%)	3	8 (9%)	3	4 (8%)	3	7 (14%)	IGKV2	1 (4%)	IGKV2	3 (14%)
4	15 (16%)	4	11 (12%)	4	44 (48%)	4	2 (4%)	4	17(35%)	IGKV3	2 (8%)	IGKV3	5 (23%)
5	2 (2%)	5	10 (11%)	5	13 (14%)	5	5 (10%)	5	7 (14%)	IGKV4	-	IGKV4	1 (5%)
6	-	6	14 (15%)	6	18 (20%)	6	6(12.5%)	6	10(21%)	IGKV5	-	IGKV5	-
7	1 (1%)	7	2 (2%)							IGKV6	-	IGKV6	1(5%)

<sup>1</sup>IGHD-J segment could not be identified in 2 cases

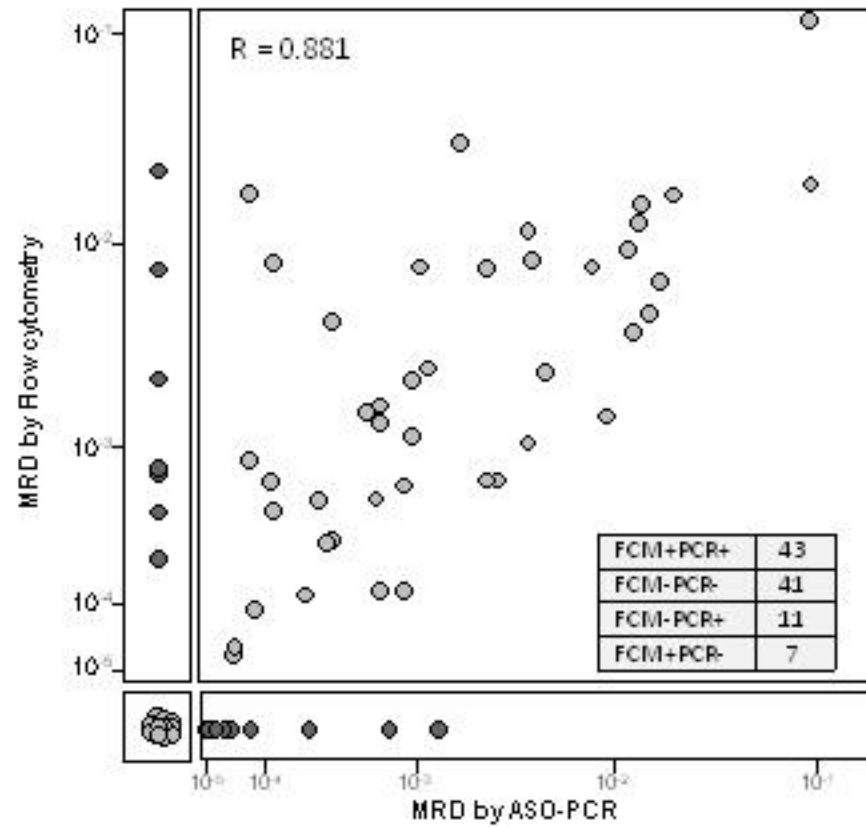
## 8. FIGURE LEGENDS

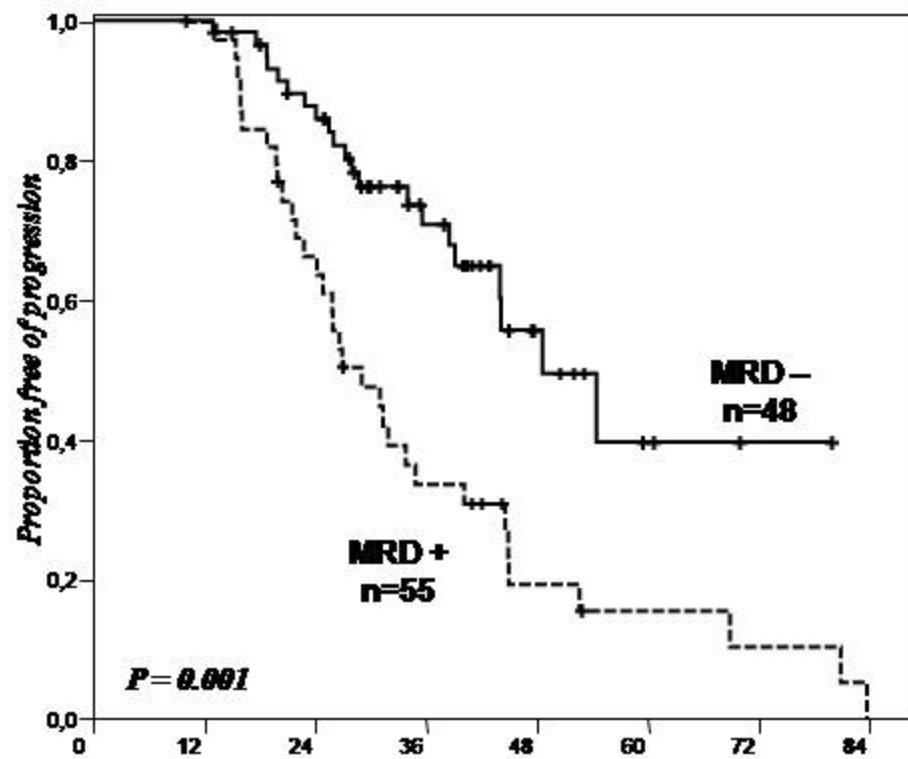
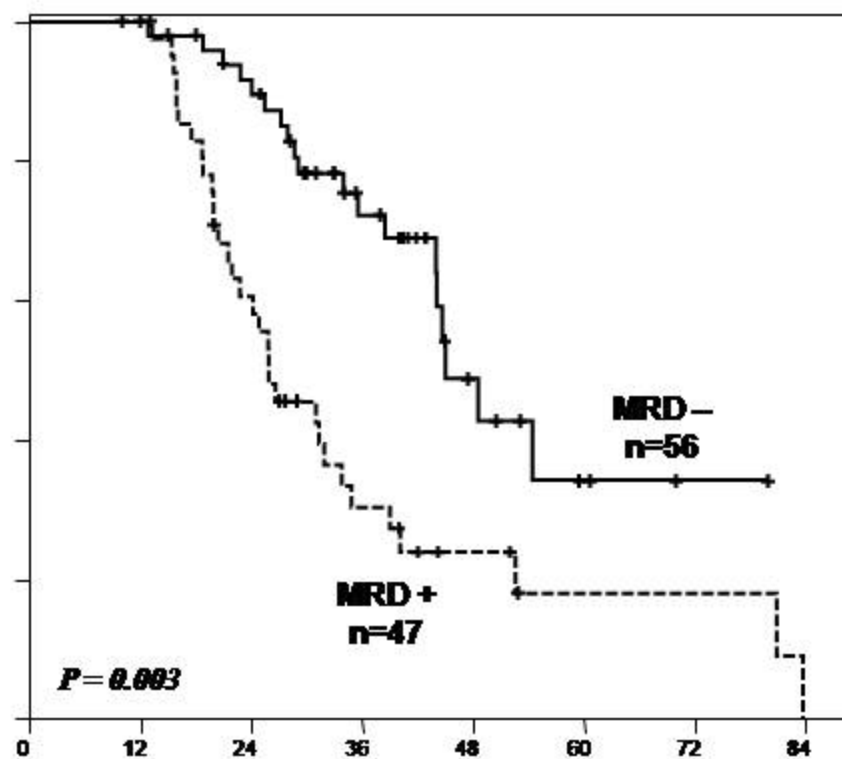
**Figure 1.** Correlation between the results of MRD quantitation by ASO-RQ PCR and MFC. Cases with discordant results (n=18) have been highlighted.

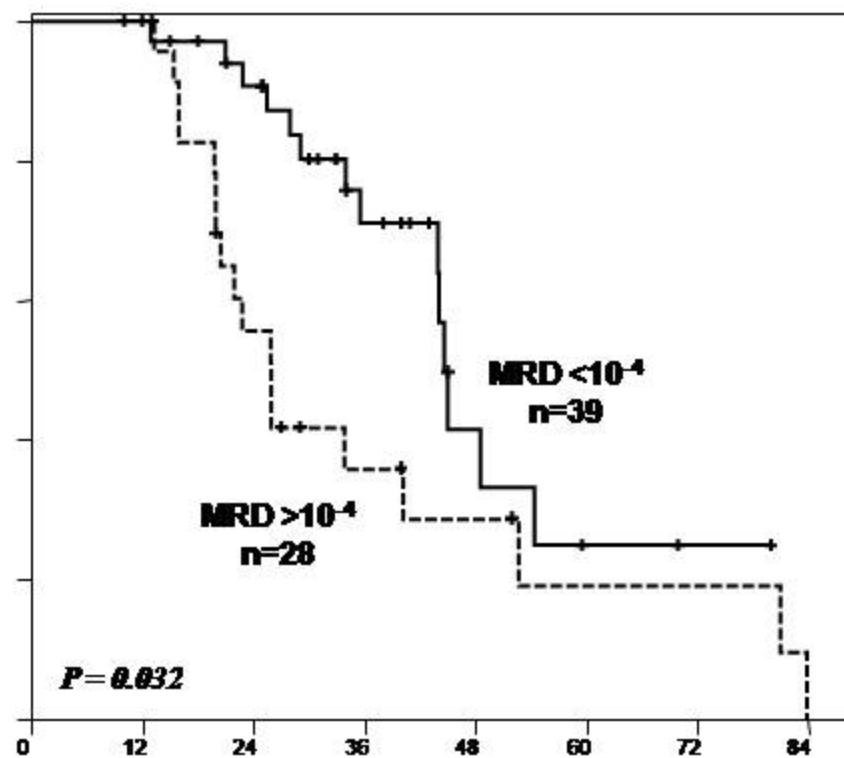
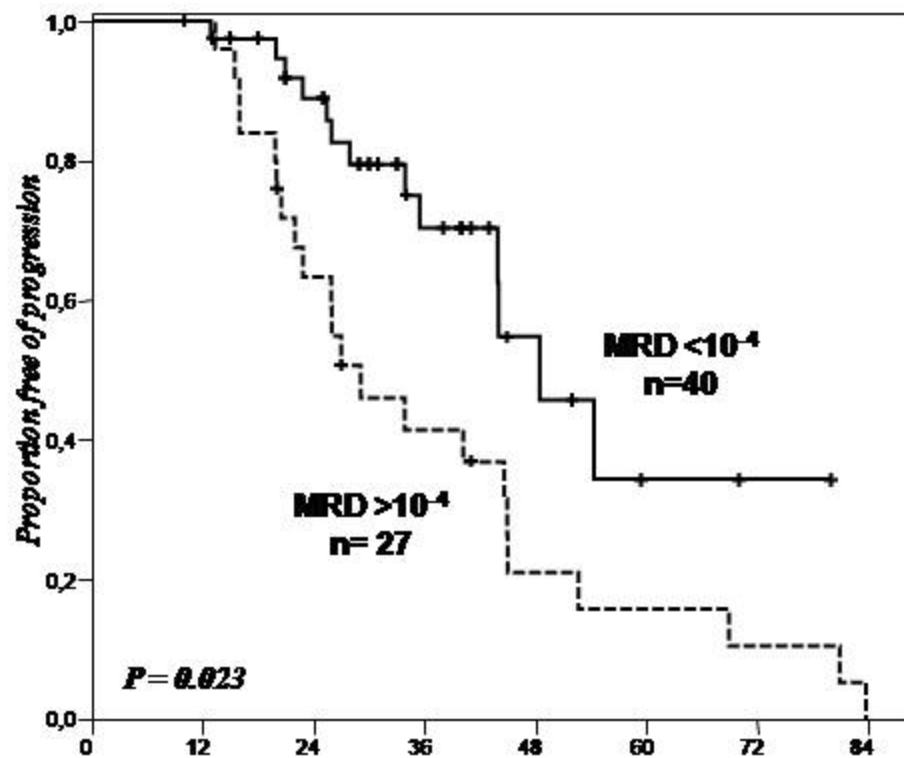
**Figure 2.** PFS according to MRD by ASO-PCR or MFC in; A) all patients; B) transplanted patients and; C) non-transplanted patients.

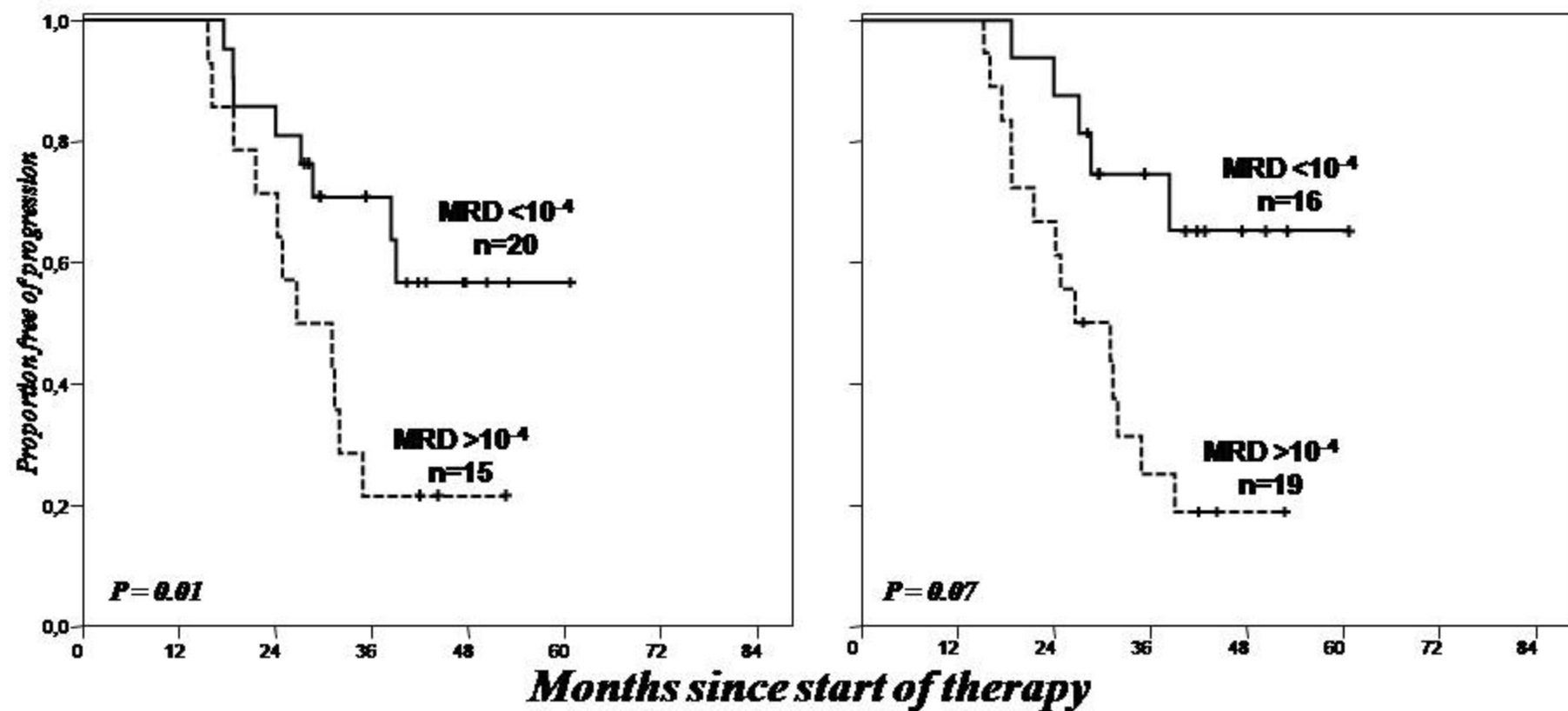
**Figure 3.** Progression Free and Overall Survival of Complete Responders according to MRD by ASO RQ-PCR



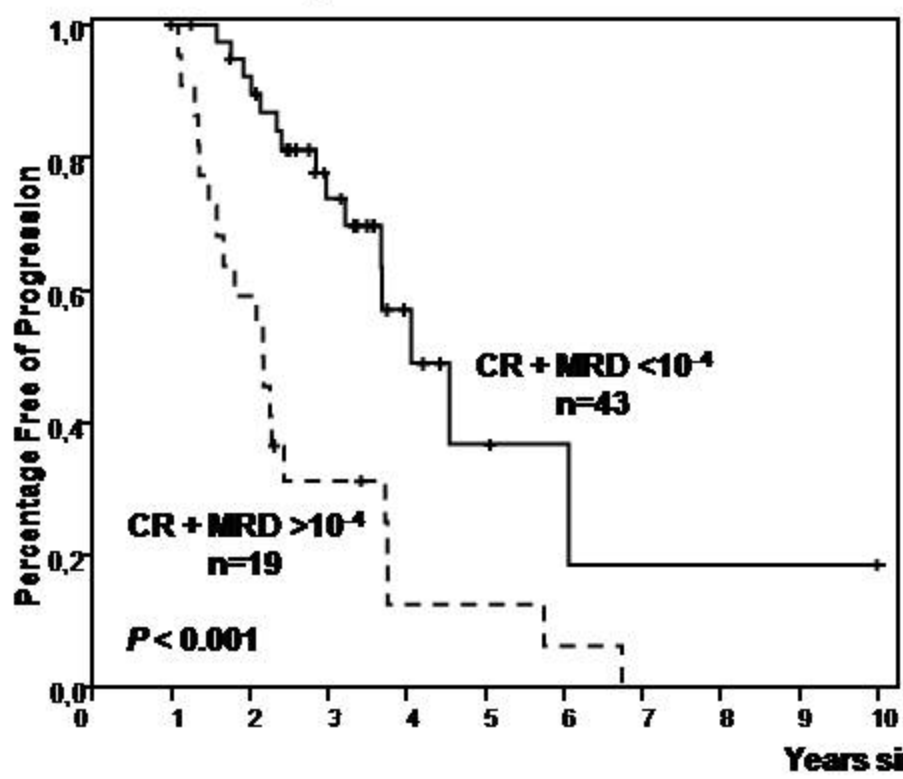


**A****ASO-RQ-PCR****MFC**

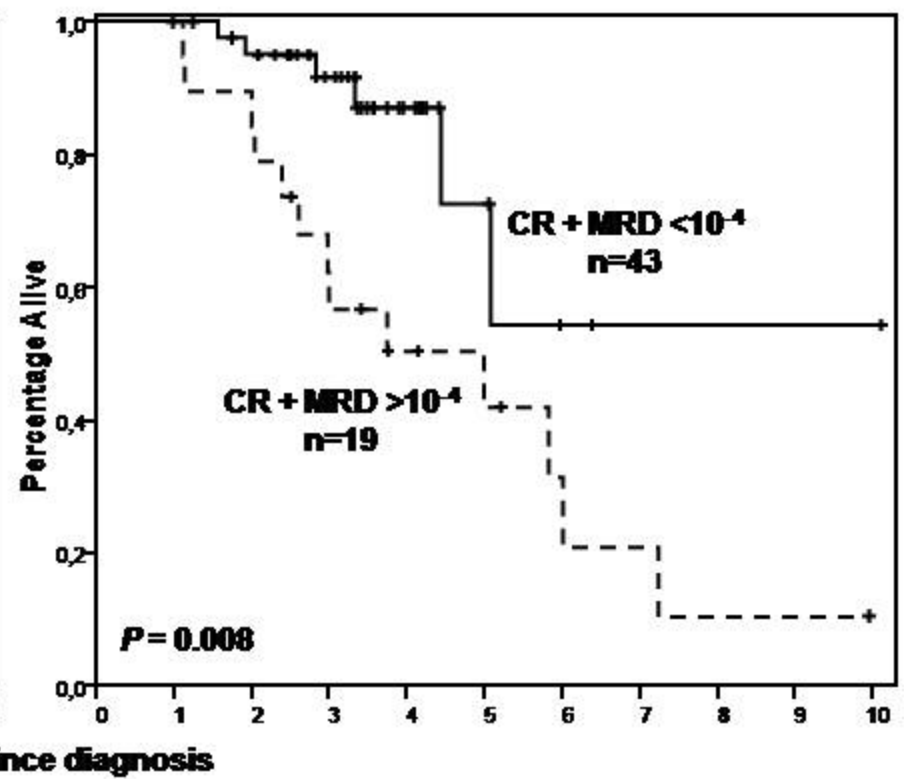
**B**

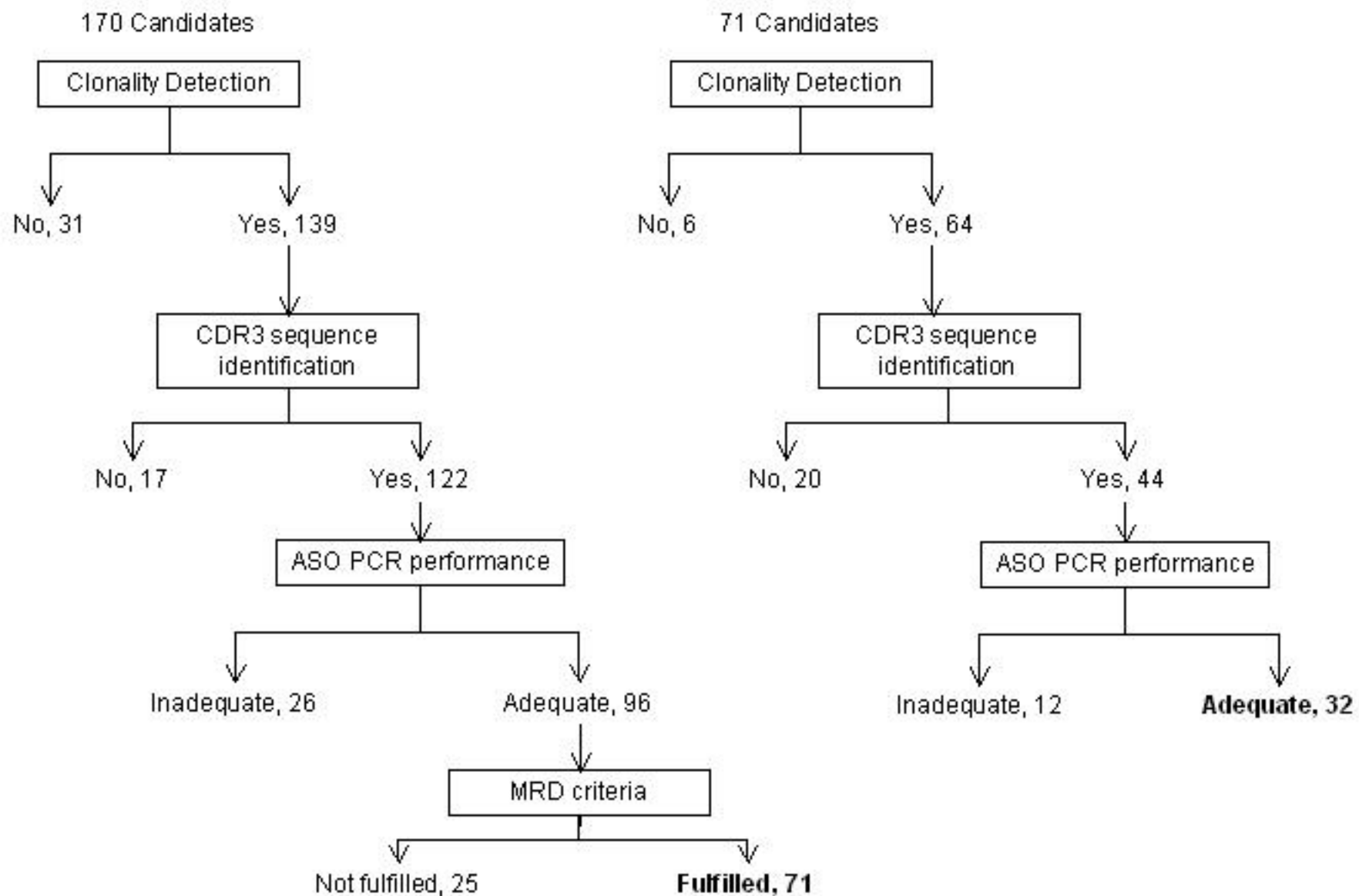
**C**

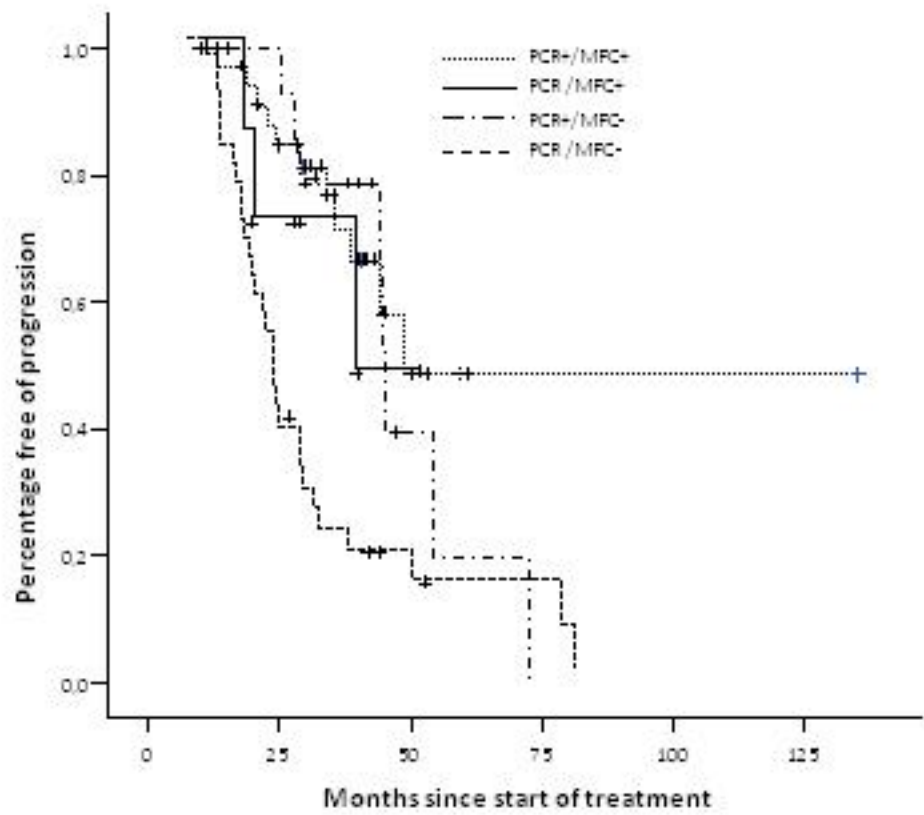
**Progression Free Survival**



**Overall Survival**







## **Conclusiones**

---





- **En relación con el uso de *Kde* como marcador molecular adicional para el estudio de la enfermedad mínima residual mediante RQ-PCR en pacientes con MM**

Nuestro estudio muestra que los reordenamientos de *Kde* se detectan en 50% de los pacientes con mieloma, pueden secuenciarse fácilmente y no presentan mutaciones somáticas. Su uso como marcador adicional para el estudio de EMR en pacientes con mieloma incrementa la aplicabilidad de estos estudios en un 9% de los casos en general y en 20% en casos de mieloma lambda, grupo en el que supone por tanto un avance significativo.

- **En relación con el uso de de muestras de MO enriquecidas en CP mediante selección inmunomagnética CD138+ como material alternativo para la obtención de marcadores moleculares para detección de enfermedad mínima residual mediante PCR en MM**

Nuestros resultados muestran que el uso de muestras de MO enriquecidas en CP mediante selección CD138+ como material para la obtención de marcadores moleculares de EMR en pacientes con MM incrementa de 60% a 96% el porcentaje de casos con, al menos, un marcador molecular disponible en el momento del diagnóstico. Su uso, por tanto, incrementaría la aplicabilidad de tales estudios.

- **En relación con el análisis crítico de la monitorización de enfermedad mínima residual en pacientes con MM mediante ASO RQ-PCR y la comparación con la CMF.**

Nuestros resultados muestran que:

1. La técnica de ASO RQ-PCR sólo permitiría el seguimiento de EMR en un 48% (71/170) de los enfermos debido a fallos en: la detección de clonalidad (n=31), la obtención de la secuencia de un marcador molecular (n=17), la disponibilidad de un ASO primer eficiente (n=51).
2. La cuantificación de EMR en pacientes con MM, tanto mediante ASO RQ-PCR como con CMF, permite monitorizar la eficacia del tratamiento y demuestra tener valor pronóstico, estratificando a los pacientes en grupos con diferente riesgo de progresión. Mientras que la ASO RQ-PCR tiene una sensibilidad ligeramente más alta, la aplicabilidad de la CMF es significativamente superior. Por ello, la CMF ha de considerarse la técnica de elección para la monitorización de EMR en MM, si bien la PCR tiene la ventaja de permitir trabajar sobre muestras almacenadas al no requerir inmediatez en el procesamiento de las células.



## Referencias

---



## Reference List

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.: IARC Press; 2008.
2. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel  
3. Blood. 2011;117:4701-4705.
3. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. Lancet 1983;2:822-824.
4. Selby PJ, McElwain TJ, Nandi AC et al. Multiple myeloma treated with high dose intravenous melphalan. Br.J Haematol. 1987;66:55-62.
5. Barlogie B, Dicke KA, Alexanian R. High dose melphalan for refractory myeloma--the M.D. Anderson experience. Hematol Oncol. 1988;6:167-172.
6. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. N.Engl.J Med. 1996;335:91-97.
7. Child JA, Morgan GJ, Davies FE et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. N.Engl.J Med. 2003;348:1875-1883.
8. Blade J, Rosinol L, Sureda A et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. Blood 2005;106:3755-3759.
9. San Miguel JF, Gutierrez NC, García-Sanz R. Thalidomide and new drugs for treatment of multiple myeloma. Hematol J 2003;4:201-207.

10. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N.Engl.J Med.* 2003;348:2609-2617.
11. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br.J.Haematol.* 2004;127:165-172.
12. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood.* 2007;110:3557-3560.
13. Orłowski RZ, Voorhees PM, Garcia RA et al. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood.* 2005;105:3058-3065.
14. Biehn SE, Moore DT, Voorhees PM et al. Extended follow-up of outcome measures in multiple myeloma patients treated on a phase I study with bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin. *Ann.Hematol.* 2007;86:211-216.
15. Orłowski RZ, Nagler A, Sonneveld P et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:3892-3901.
16. Berenson JR, Boccia R, Siegel D et al. Efficacy and safety of melphalan, arsenic trioxide and ascorbic acid combination therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a prospective, multicentre, phase II, single-arm study. *Br.J.Haematol.* 2006;135:174-183.
17. Berenson JR, Yang HH, Sadler K et al. Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:937-944.
18. Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 1999;341:1565-1571.

19. Barlogie B, Desikan R, Eddlemon P et al. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood*. 2001;98:492-494.
20. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:3063-3067.
21. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS et al. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:3458-3464.
22. Weber DM, Chen C, Niesvizky R et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N.Engl.J.Med*. 2007;357:2133-2142.
23. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N.Engl.J Med*. 2007;357:2123-2132.
24. Knop S, Gerecke C, Liebisch P et al. Lenalidomide, adriamycin, and dexamethasone (RAD) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma: a report from the German Myeloma Study Group DSMM (Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom). *Blood*. 2009;113:4137-4143.
25. Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA et al. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin.Oncol*. 2002;20:4319-4323.
26. Weber D, Rankin K, Gavino M, Delasalle K, Alexanian R. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *J Clin.Oncol*. 2003;21:16-19.
27. Cavo M, Zamagni E, Tosi P et al. First-line therapy with thalidomide and dexamethasone in preparation for autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:826-831.



28. Harousseau JL, Attal M, Leleu X et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica* 2006;91:1498-1505.
29. Rosinol L, Oriol A, Mateos MV et al. Phase II PETHEMA trial of alternating bortezomib and dexamethasone as induction regimen before autologous stem-cell transplantation in younger patients with multiple myeloma: efficacy and clinical implications of tumor response kinetics. *J Clin.Oncol.* 2007;25:4452-4458.
30. Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A et al. Long-term results of response to therapy, time to progression, and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin.Proc.* 2007;82:1179-1184.
31. Niesvizky R, Jayabalan DS, Christos PJ et al. BiRD (Biaxin [clarithromycin]/Revlimid [lenalidomide]/dexamethasone) combination therapy results in high complete- and overall-response rates in treatment-naive symptomatic multiple myeloma. *Blood* 2008;111:1101-1109.
32. Palumbo A, Falco P, Corradini P et al. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:4459-4465.
33. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:431-436.
34. Rajkumar SV, Rosinol L, Hussein M et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2171-2177.

35. Facon T, Mary JY, Hulin C et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007;370:1209-1218.
36. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367:825-831.
37. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N.Engl.J.Med*. 2006;354:1021-1030.
38. Lokhorst HM, Schmidt-Wolf I, Sonneveld P et al. Thalidomide in induction treatment increases the very good partial response rate before and after high-dose therapy in previously untreated multiple myeloma. *Haematologica*. 2008;93:124-127.
39. Zervas K, Mihou D, Katodritou E et al. VAD-doxil versus VAD-doxil plus thalidomide as initial treatment for multiple myeloma: results of a multicenter randomized trial of the Greek Myeloma Study Group. *Ann.Oncol*. 2007;18:1369-1375.
40. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N.Engl.J.Med*. 2008;359:906-917.
41. Mateos MV, Hernandez JM, Hernandez MT et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood*. 2006;108:2165-2172.
42. Harousseau JL, Attal M, Leleu X et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica*. 2006;91:1498-1505.

43. Oakervee HE, Popat R, Curry N et al. PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2005;129:755-762.
44. Durie BG, Jacobson J, Barlogie B, Crowley J. Magnitude of response with myeloma frontline therapy does not predict outcome: importance of time to progression in southwest oncology group chemotherapy trials. *J Clin.Oncol.* 2004;22:1857-1863.
45. Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma cell myeloma. Prepared by a Committee of the Chronic Leukemia--Myeloma Task Force, National Cancer Institute. *Cancer Chemother.Rep.*3 1968;1:17-39.
46. Proposed guidelines for protocol studies. I. Introduction. II. Plasma cell myeloma. 3. Chronic lymphocytic leukemia. IV. Chronic granulocytic leukemia. *Cancer Chemother.Rep.*3 1973;4:141-173.
47. Gore ME, Selby PJ, Viner C et al. Intensive treatment of multiple myeloma and criteria for complete remission. *Lancet* 1989;2:879-882.
48. Vesole DH, Tricot G, Jagannath S et al. Autotransplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood* 1996;88:838-847.
49. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br.J Haematol.* 1998;102:1115-1123.
50. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-1473.
51. Harousseau JL, Attal M, vet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-3146.

52. Samson D, Gaminara E, Newland A et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet* 1989;2:882-885.
53. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008;111:4908-4915.
54. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
55. Lin C, Luciani A, Belhadj K et al. Multiple myeloma treatment response assessment with whole-body dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 2010;254:521-531.
56. Walker R, Barlogie B, Haessler J et al. Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *J Clin.Oncol.* 2007;25:1121-1128.
57. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 2009;23:1545-1556.
58. Campana D, Coustan-Smith E. The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. *Eur.J Histochem.* 1996;40 Suppl 1:39-42.
59. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-152.
60. Orfao A, Ciudad J, Lopez-Berges MC et al. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk.Lymphoma* 1994;13 Suppl 1:87-90.
61. San-Miguel JF, Vidriales MB, Orfao A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2002;15:105-118.

62. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2003;16:599-612.
63. Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 2003;101:4695-4700.
64. Rawstron A, Barrans S, Blythe D et al. Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *Br.J Haematol.* 1999;104:138-143.
65. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J Haematol.* 1999;107:121-131.
66. Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999;93:1032-1037.
67. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am.J Clin.Pathol.* 2004;121:482-488.
68. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
69. Mateo MG, San M, I, Orfao de MA. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol.Med.* 2005;113:5-24.
70. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood.* 2007;110:2586-2592.

71. Bataille R, Jego G, Robillard N et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234-1240.
72. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-438.
73. Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81:2658-2663.
74. Perez-Andres M, Santiago M, Almeida J et al. Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *J Biol.Regul.Homeost.Agents* 2004;18:392-398.
75. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2002;15:1-19.
76. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales MB et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Crit Rev.Oncol.Hematol* 1999;32:175-185.
77. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J 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;152:1655-1665.
78. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
79. Cao W, Goolsby CL, Nelson BP et al. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. *Am.J Clin.Pathol.* 2008;129:926-933.

80. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am.J Clin.Pathol.* 2009;132:728-732.
81. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
82. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma.* 2008;49:306-314.
83. Rottenburger C, Kiel K, Bosing T et al. Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Br.J Haematol.* 1999;106:545-552.
84. Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Lett.* 2009;277:1-7.
85. Johnsen HE, Kjeldsen MK, Urup T et al. Cancer stem cells and the cellular hierarchy in haematological malignancies. *Eur.J Cancer* 2009;45 Suppl 1:194-201.
86. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112:4017-4023.
87. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood.* 1998;91:3-21.
88. Liesveld JL, Abboud CN, Duerst RE et al. Characterization of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis. *Blood.* 1989;73:1794-1800.
89. Hemler ME. Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol.Today.* 1988;9:109-113.
90. Tarlinton D. Germinal centers: getting there is half the fun. *Curr.Biol.* 1998;8:R753-R756.

91. Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin.Immunol.* 1999;11:73-83.
92. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:108-117.
93. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:37-49.
94. Tarlinton D. Germinal centers: form and function. *Curr.Opin.Immunol.* 1998;10:245-251.
95. Kelsoe G. V(D)J hypermutation and receptor revision: coloring outside the lines. *Curr.Opin.Immunol.* 1999;11:70-75.
96. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity.* 1998;8:363-372.
97. Van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin.Chim.Acta.* 1991;198:93-174.
98. Jensen GS, Mant MJ, Pilarski LM. Sequential maturation stages of monoclonal B lineage cells from blood, spleen, lymph node, and bone marrow from a terminal myeloma patient. *Am.J.Hematol.* 1992;41:199-208.
99. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 1992;10:97-121.:97-121.
100. Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science.* 1973;180:830-840.
101. Chu PG, Arber DA. CD79: a review. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2001;9:97-106.
102. Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. *Science.* 1973;180:713-716.



103. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science*. 1987;238:1079-1087.
104. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302:575-581.
105. Kirsch IR, Morton CC, Nakahara K, Leder P. Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes. *Science*. 1982;216:301-303.
106. Malcolm S, Barton P, Murphy C et al. Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1982;79:4957-4961.
107. Fripiat JP, Williams SC, Tomlinson IM et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum.Mol.Genet.* 1995;4:983-991.
108. Erikson J, Martinis J, Croce CM. Assignment of the genes for human lambda immunoglobulin chains to chromosome 22. *Nature*. 1981;294:173-175.
109. Ruiz M, Pallares N, Contet V, Barbi V, Lefranc MP. The human immunoglobulin heavy diversity (IGHD) and joining (IGHJ) segments. *Exp.Clin.Immunogenet.* 1999;16:173-184.
110. Pallares N, Lefebvre S, Contet V, Matsuda F, Lefranc MP. The human immunoglobulin heavy variable genes. *Exp.Clin.Immunogenet.* 1999;16:36-60.
111. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database: a high-quality information system for comparative immunogenetics and immunology. *Dev.Comp Immunol.* 2002;26:697-705.
112. Hofker MH, Walter MA, Cox DW. Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:5567-5571.
113. Dunnick W, Hertz GZ, Scappino L, Gritzmacher C. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:365-372.

114. Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Exp.Clin.Immunogenet.* 1998;15:171-183.
115. Klobeck HG, Zachau HG. The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:4591-4603.
116. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E et al. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res.* 1997;7:250-261.
117. Lefranc MP, Pallares N, Frippiat JP. Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum.Genet.* 1999;104:361-369.
118. Busslinger M, Nutt SL, Rolink AG. Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr.Opin.Immunol.* 2000;12:151-158.
119. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 1984;3:1209-1219.
120. Sleckman BP, Gorman JR, Alt FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu.Rev.Immunol.* 1996;14:459-81.:459-481.
121. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 2005;5:578-584.
122. Lanig H, Bradl H, Jack HM. Three-dimensional modeling of a pre-B-cell receptor. *Mol.Immunol.* 2004;40:1263-1272.
123. Schiff C, Bensmana M, Guglielmi P et al. The immunoglobulin lambda-like gene cluster (14.1, 16.1 and F lambda 1) contains gene(s) selectively expressed in pre-B cells and is the human counterpart of the mouse lambda 5 gene. *Int.Immunol.* 1990;2:201-207.
124. Minaee S, Farmer D, Georgiou A et al. Mapping and functional analysis of regulatory sequences in the mouse lambda5-VpreB1 domain. *Mol.Immunol.* 2005;42:1283-1292.
125. Sabbattini P, Dillon N. The lambda5-VpreB1 locus--a model system for studying gene regulation during early B cell development. *Semin.Immunol.* 2005;17:121-127.

126. Melchers F, ten BE, Yamagami T, Andersson J, Rolink A. The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin.Immunol.* 1999;11:307-317.
127. Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology.* 2003;110:411-420.
128. Graninger WB, Goldman PL, Morton CC, O'Brien SJ, Korsmeyer SJ. The kappa-deleting element. Germline and rearranged, duplicated and dispersed forms. *J.Exp.Med.* 1988;167:488-501.
129. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature.* 1985;316:260-262.
130. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J.Exp.Med.* 1993;177:999-1008.
131. Sandel PC, Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity.* 1999;10:289-299.
132. Nemazee D. Receptor editing in B cells. *Adv.Immunol.* 2000;74:89-126.:89-126.
133. Notarangelo LD, Santagata S, Villa A. Recombinase activating gene enzymes of lymphocytes. *Curr.Opin.Hematol.* 2001;8:41-46.
134. Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr.Opin.Immunol.* 1998;10:172-180.
135. van G, Mizuuchi K, Gellert M. Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration. *Science.* 1996;271:1592-1594.
136. Hiom K, Gellert M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell.* 1997;88:65-72.
137. Nussenzweig A, Chen C, da CS, V et al. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature.* 1996;382:551-555.

138. Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:8076-8081.
139. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 1993;72:131-142.
140. Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv.Immunol.* 1994;56:27-150.:27-150.
141. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* 1988;334:676-682.
142. Prak EL, Trounstein M, Huszar D, Weigert M. Light chain editing in kappa-deficient animals: a potential mechanism of B cell tolerance. *J.Exp.Med.* 1994;180:1805-1815.
143. Chen C, Nagy Z, Prak EL, Weigert M. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity.* 1995;3:747-755.
144. Reth M, Gehrman P, Petrac E, Wiese P. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature.* 1986;322:840-842.
145. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van den BH et al. Rearrangement status of the malignant cell determines type of secondary IgH rearrangement (V-replacement or V to DJ joining) in childhood B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1997;11:1258-1265.
146. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science.* 1993;261:1175-1178.
147. Tumas-Brundage K, Manser T. The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J.Exp.Med.* 1997;185:239-250.

148. Fukita Y, Jacobs H, Rajewsky K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity*. 1998;9:105-114.
149. Betz AG, Milstein C, Gonzalez-Fernandez A et al. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*. 1994;77:239-248.
150. Lebecque SG, Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J.Exp.Med*. 1990;172:1717-1727.
151. Muller-Hermelink HK, Greiner A. Molecular analysis of human immunoglobulin heavy chain variable genes (IgVH) in normal and malignant B cells. *Am.J.Pathol*. 1998;153:1341-1346.
152. Goossens T, Klein U, Kuppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1998;95:2463-2468.
153. Milstein C, Neuberger MS, Staden R. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1998;95:8791-8794.
154. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr.Opin.Immunol*. 1995;7:248-254.
155. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr.Opin.Immunol*. 1996;8:199-205.
156. Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv.Immunol*. 1996;61:79-146.:79-146.
157. Iwasato T, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell*. 1990;62:143-149.
158. Esser C, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu.Rev.Immunol*. 1990;8:717-35.:717-735.
159. Blade J, Rosinol L, Sureda A et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the

- initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood*. 2005;106:3755-3759.
160. Cavo M, Tosi P, Zamagni E et al. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J.Clin.Oncol*. 2007;25:2434-2441.
161. Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol*. 2008;9:1157-1165.
162. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117:4691-4695.
163. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1901-1928.
164. Drunat S, Olivi M, Brunie G et al. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol*. 2001;114:281-289.
165. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia*. 2000;14:324-328.
166. Donovan JW, Ladetto M, Zou G et al. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95:2651-2658.

167. Voso MT, Hohaus S, Moos M, Haas R. Lack of t(14;18) polymerase chain reaction-positive cells in highly purified CD34+ cells and their CD19 subsets in patients with follicular lymphoma. *Blood*. 1997;89:3763-3768.
168. Martinelli G, Terragna C, Lemoli RM et al. Clinical and molecular follow-up by amplification of the CDR-III IgH region in multiple myeloma patients after autologous transplantation of hematopoietic CD34+ stem cells. *Haematologica*. 1999;84:397-404.
169. Owen RG, Goulden NJ, Oakhill A et al. Comparison of fluorescent consensus IgH PCR and allele-specific oligonucleotide probing in the detection of minimal residual disease in childhood ALL. *Br.J.Haematol*. 1997;97:457-459.
170. Vescio RA, Han EJ, Schiller GJ et al. Quantitative comparison of multiple myeloma tumor contamination in bone marrow harvest and leukapheresis autografts. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18:103-110.
171. Schiller G, Vescio R, Freytes C et al. Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 1995;86:390-397.
172. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*. 1992;13:444-449.
173. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res*. 1998;58:3957-3964.
174. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995;4:357-362.
175. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*. 1997;22:176-181.

176. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-362.
177. Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998;12:2006-2014.
178. Rasmussen T, Poulsen TS, Honore L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp.Hematol.* 2000;28:1039-1045.
179. Wattjes MP, Krauter J, Nagel S et al. Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2000;14:329-335.
180. Bruggemann M, Droese J, Bolz I et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia.* 2000;14:1419-1425.
181. Pfitzner T, Engert A, Wittor H et al. A real-time PCR assay for the quantification of residual malignant cells in B cell chronic lymphatic leukemia. *Leukemia.* 2000;14:754-766.
182. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000;14:1426-1435.
183. Corradini P, Voena C, Astolfi M et al. High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood.* 1995;85:1596-1602.



184. Bjorkstrand B, Ljungman P, Bird JM, Samson D, Gahrton G. Double high-dose chemoradiotherapy with autologous stem cell transplantation can induce molecular remissions in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:367-371.
185. Swedin A, Lenhoff S, Olofsson T, Thuresson B, Westin J. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumour cell detection in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1998;103:1145-1151.
186. Corradini P, Voena C, Tarella C et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:208-215.
187. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2000;85:930-934.
188. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E et al. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:2273-2281.
189. Cavo M, Terragna C, Martinelli G et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood.* 2000;96:355-357.
190. Corradini P, Voena C, Tarella C et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:208-215.
191. Ladetto M, Donovan JW, Harig S et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2000;6:241-253.

192. Rasmussen T, Poulsen TS, Honore L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp.Hematol.* 2000;28:1039-1045.
193. Bakkus MH, Bouko Y, Samson D et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2004;126:665-674.
194. Fenk R, Ak M, Kobbe G et al. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2004;89:557-566.
195. Novella E, Giaretta I, Elice F et al. Fluorescent polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for IgH rearrangement and minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *Haematologica.* 2002;87:1157-1164.
196. Korthals M, Sehne N, Kronenwett R et al. The level of minimal residual disease in the bone marrow of patients with multiple myeloma before high-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation is an independent predictive parameter. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2012;18:423-431.
197. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J.Clin.Oncol.* 2010;28:2077-2084.
198. Hadzidimitriou A, Stamatopoulos K, Belessi C et al. Immunoglobulin genes in multiple myeloma: expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica.* 2006;91:781-787.
199. Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R et al. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia.* 2003;17:1398-1403.

200. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-1372.
201. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B et al. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:913-916.