



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



800 AÑOS  
VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

## TESIS DOCTORAL

# DIANAS TERAPÉUTICAS EN MIELOMA MÚLTIPLE: DESREGULACIÓN DE miRNAs Y TRAIL

FANY VERÓNICA, TICONA PÉREZ

2019



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS







D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y María Elena Díaz Rodríguez, investigadora del Centro de Investigación del Cáncer.

CERTIFICAN,

Que la presente tesis doctoral titulada: **“Dianas terapéuticas en mieloma múltiple: desregulación de miRNAs y TRAIL”**, presentada por D<sup>a</sup>. Fany Verónica, Ticona Pérez, licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, centro mixto CSCI-Universidad de Salamanca y reúne a su juicio, originalidad y contenido suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales expiden el presente certificado en Salamanca 08 de marzo del 2019.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso

Fdo: María Elena Díaz Rodríguez



*A Fiorelita mi motor y motivo*



*“Aprendí la lucha y perseverancia gracias a las mujeres de mi familia; creo que las mujeres junto a nuestras familias podemos hacer historia y este es nuestro momento”*



*Índice*



<i>Abreviaturas</i> .....	1
<i>Introducción</i> .....	7
1. MIELOMA MULTIPLE.....	9
1.1 Ontogenia y oncogenómica de las células mielomatosas .....	12
1.2 TRATAMIENTO DEL MM .....	13
1.2.1 Agentes inmunomoduladores (IMiDs).....	14
1.2.2 Nuevos fármacos .....	14
1.2.3 Inhibidores del proteosoma (IP).....	15
1.2.4 Inhibidores de las deacetilasas de histonas.....	18
1.2.5 Inmunoterapia y MM.....	21
2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PEQUEÑAS MOLECULAS DE RNA NO CODIFICANTE (miRNAs). .....	22
2.1. Biogénesis .....	23
2.2. miRNAs y cáncer .....	25
2.3. miRNAs en mieloma múltiple .....	27
2.4. Interacción de miRNAs y fármacos .....	28
3. MUERTE CELULAR .....	29
3.1. Apoptosis. ....	32
3.2. Vía INtrínseca de apoptosis mediada por LA MITOCONDRIA .....	34
3.3. Vía extrínseca de apoptosis mediada por receptores de muerte .....	35
<i>Objetivos</i> .....	39
<i>Material y métodos</i> .....	43
1. REACTIVOS .....	45
2. ANTICUERPOS .....	45
<b>Antígeno</b> .....	46
<b>Molécula conjugada</b> .....	46
<b>Casa comercial</b> .....	46
Ig de conejo (H+L) .....	46
HRP .....	46
Bio Rad Laboratories.....	46
Ig de Conejo(L).....	46
HRP .....	46
Jackson Inmuno-Research Laboratories .....	46
3. CULTIVOS CELULARES .....	47
3.1. Condiciones de cultivo.....	47
3.2. Preservación de las líneas celulares .....	48

2.3	Contaje del número de células .....	48
4.	OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA.....	48
4.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	49
4.2.	INMUNOPRECIPITACIÓN (IP).....	49
5	ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT.....	50
6	PRODUCCIÓN Y PURIFICACION DE PROTEÍNAS: TRAIL RECOMBINANTE .....	52
7	TRANSFECCIÓN Y PRODUCCION RETROVIRAL Y LENTIVIRAL .....	55
7.1.	Transfección con plásmidos.....	55
7.2.	Infección con lentivirus.....	56
7.3.	Infección con retrovirus.....	57
8.	ENSAYOS DE MUERTE CELULAR.....	58
8.1.	Ensayo de apoptosis por citometría de flujo .....	58
8.2.	Ensayos fluorimétricos de actividad caspasa .....	59
9.	PROLIFERACION CELULAR: METABOLIZACION DEL MTT .....	59
10.	EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA .....	60
11.	Estudios deL perfil de expresión DE RNA .....	61
11.1.	Reacción de transcripción reversa (RT) para la obtención de cDNA .....	61
11.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	62
12.	Estudios de perfil de expresión de MIRNAS mediante arrays.....	63
12.1.	Induccion de la apoptosis .....	63
12.2.	Reacción de RT para LA obtención de cDNA. ....	64
12.3.	PCR cuantitativa en tiempo real (qrt-PCR) .....	64
12.4.	Análisis bioinformático de miRNAs.....	66
13.	ARRAYS DE EXPRESION DE RNA.....	67
14.	ANALISIS ESTADÍSTICO .....	68
	<i>Resultados</i> .....	69
1.	Capitulo I. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT.....	71
1.1	Inducción de apoptosis en líneas de mieloma múltiple .....	71
1.2	ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESION DE ARRAYS DE miRNAs .....	73
1.2.1	Análisis EXPLORATORIO DE DATOS .....	73
1.2.2	Análisis de expresión diferencial de miRNAs.....	74
1.3	miRNAs desregulados después del tratamiento con bortezomib y panobinostat.....	75
1.4	Análisis de enriquecimiento de vías funcionales desreguladas TRAS el tratamiento con bortezomib y panobinostat. ....	78

1.5	Análisis de miRNAs relacionados con la vía de apoptosis TRAS el tratamiento CON bortezomib.....	82
1.6	Análisis de miRNAs involucrados en el ciclo celular después del tratamiento con panobinostat.....	85
	<i>Discusiones</i> .....	89
1.	ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MIRNAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT .....	91
	<i>Conclusiones</i> .....	97
	<i>Bibliografía</i> .....	101
	<i>Financiación</i> .....	117
	<i>Agradecimientos</i> .....	121
	<i>Anexo I</i> .....	125
	<i>Listado de genes desregulados entre OPM2 y OPM2-TRAIL</i> .....	125
	<i>ANEXO II</i> .....	131
	<i>ARTICULOS PUBLICADOS</i> .....	131



## *Abreviaturas*



<b>ADCC</b>	<u>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</u> Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo
<b>ADCP</b>	<u>Antibody Dependent Cellular Phagocytosis</u> Fagocitosis celular dependiente de anticuerpo
<b>ADP</b>	<u>Poly (ADP-Ribose)</u> Poli ADP-ribosa polimerasa
<b>AGO</b>	<u>Protein ArGOnaut</u> Proteína argonauta
<b>AIF1</b>	<u>Allograft Inflammatory Factor 1</u> Factor inflamatorio de aloinjerto 1
<b>AMPK</b>	<u>AMP-activated protein Kinase</u> Proteína quinasa activada por AMP
<b>APAF-1</b>	<u>Apoptotic Protease Activating Factor -1</u> Factor de activación de proteasas apoptóticos 1
<b>ATCC</b>	<u>American Type Culture Collection</u>
<b>Bcl-2</b>	<u>B cell lymphoma-2</u> Antagonista de muerte celular Bcl-2
<b>Bcl-xL</b>	<u>B cell lymphoma-xL</u> Antagonista de muerte celular Bcl-xL
<b>BSA</b>	<u>Bovine Serum Albumin</u> Albumina sérica bovina
<b>CARTs</b>	<u>Chimeric Antigen Receptor T Cells</u> Receptor de antígeno quimérico de células T
<b>Ct</b>	<u>Cycle threshold</u> Ciclo umbral
<b>CDC</b>	<u>Complement-Dependent Cytotoxicity</u> Citotoxicidad dependiente del complemento
<b>cDNA</b>	<u>complementary DesoxyriboNucleic Acid</u> Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>CGH</b>	<u>Comparative Genomic Hybridization</u> Hibridación génica comparativa
<b>DD</b>	<u>Death Domains</u> Dominio de muerte
<b>DISC</b>	<u>Death-Inducing Signaling Complex</u> Complejo señalización inductor de muerte
<b>DNA</b>	<u>DeoxyriboNucleic Acid</u> Ácido desoxirribonucleico
<b>DMEM</b>	<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium</u>
<b>DMSZ</b>	<u>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen</u>

<b>DMSO</b>	<i><u>D</u>i<u>M</u>ethyl<u>S</u>ulf<u>O</u>xide</i> Dimetilsulfoxido
<b>DO</b>	<i><u>O</u>ptical <u>D</u>ensity</i> Densidad óptica
<b>FADD</b>	<i><u>F</u>as-<u>A</u>ssociated protein with <u>D</u>eath <u>D</u>omain</i> Proteína asociada a Fas con dominios de muerte
<b>FBS</b>	<i><u>F</u>etal <u>B</u>ovine <u>S</u>erum</i> Suero bovino fetal
<b>FC</b>	<i><u>F</u>old <u>C</u>hange</i> Tasa de cambio
<b>FDA</b>	<i><u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>dmistration</i> Administración de alimentos y drogas
<b>FISH</b>	<i><u>F</u>luorescence <u>I</u>n <u>S</u>itu <u>H</u>ybridization</i> Fluorescencia in situ
<b>CFLAR</b>	<i><u>C</u>ASP8 and <u>F</u>ADD-<u>L</u>ike <u>A</u>poptosis <u>R</u>egulator</i> Regulador de la apoptosis dependiente de caspasa 8 y unión a FADD
<b>FGF</b>	<i><u>F</u>ibroblast <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i> Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FITC</b>	<i><u>F</u>luorescein <u>I</u>so<u>T</u>hia<u>C</u>yanate</i> Isotiocianato de fluoresceína
<b>GAPDH</b>	<i><u>G</u>lycer<u>A</u>ldehyde 3-<u>P</u>hosphate <u>D</u>e<u>H</u>ydrogenase</i> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFP</b>	<i><u>G</u>reen <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i> Proteína fluorescente verde
<b>HDAC</b>	<i><u>H</u>istone <u>D</u>e<u>A</u>Cetylase</i> Histonas deacetilasas
<b>HDACi</b>	<i><u>H</u>istone <u>D</u>e<u>A</u>Cetylase <u>I</u>nhibitor</i> Inhibidores de histonas deacetilasas
<b>HLA</b>	<i><u>H</u>uman <u>L</u>eukocyte <u>A</u>ntigen</i> Antígeno leucocitario humano
<b>Hsp90</b>	<i><u>H</u>eat <u>s</u>hock <u>p</u>rotein <u>90</u></i> Proteína de shock térmico de 90 kDa
<b>IAPs</b>	<i><u>I</u>nhibitors of <u>A</u>poptosis <u>P</u>roteins</i> Inhibidores de las proteínas de apoptosis
<b>Ig</b>	<i><u>I</u>mmuno<u>G</u>lobulin</i> Inmunoglobulina
<b>IPTG</b>	<i><u>I</u>so<u>P</u>ropyl-<math>\beta</math>-<u>D</u>-<u>T</u>hio<u>G</u>alactopyranoside</i> Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>IP</b>	<i><u>I</u>mmuno<u>P</u>recipitation</i> Inmunoprecipitación

<b>LDCD</b>	<i>Called <u>L</u>ysosome-<u>D</u>ependent <u>C</u>ell <u>D</u>eath</i> Muerte celular dependiente de lisosomas
<b>LB</b>	<i><u>L</u>uria-<u>B</u>ertani médium</i> Medio de Luria Bertani
<b>MAPKs</b>	<i><u>M</u>itogen-<u>A</u>ctivated <u>P</u>rotein <u>K</u>inase</i> Proteína quinasa activada por mitogeno
<b>MDS</b>	<i><u>M</u>ulti<u>D</u>imensional <u>S</u>caling</i>
<b>MGUS</b>	<i><u>M</u>onoclonal <u>G</u>ammopathy of <u>U</u>ndetermined <u>S</u>ignificance</i> Gammapatia monoclonal de significado incierto
<b>mTOR</b>	<i><u>m</u>ammalian <u>T</u>arget <u>O</u>f <u>R</u>apamycin</i> Diana de la rapamicina en mamíferos
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-di<u>M</u>e<u>T</u>iazol-2-il)-2,5-difenil<u>T</u>etrazolio bromide</i> Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NCCD,</b>	<i><u>N</u>omenclature <u>C</u>ommittee on <u>C</u>ell <u>D</u>eath</i> Nomenclatura del comité de muerte celular
<b>NF-κB</b>	<i><u>N</u>uclear <u>F</u>actor <u>κ</u>B ligand</i> Ligando del factor nuclear κβ
<b>NK</b>	<i><u>N</u>atural <u>K</u>iller cells</i> Células natural killer
<b>PARP</b>	<i><u>P</u>oly (<u>A</u>DP-<u>R</u>ibose) <u>P</u>olymerase</i> Polimerasa poly (ADP-ribosa)
<b>PBS</b>	<i><u>P</u>hosphate-<u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i> Tampon fosfato salino
<b>PCA</b>	<i><u>P</u>rincipal <u>C</u>omponent <u>A</u>nalysis</i> Análisis principal de componentes
<b>PI</b>	<i><u>I</u>odide <u>P</u>ropidium</i> ioduro de propidio
<b>PID</b>	<i><u>P</u>athway <u>I</u>nteraction <u>D</u>atabase</i>
<b>PMSF</b>	<i><u>P</u>henyl<u>M</u>ethyl<u>S</u>ulfonyl <u>F</u>luoride</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PVDF</b>	<i><u>P</u>oly<u>V</u>inylidene <u>D</u>i<u>F</u>luoride</i> Difluoruro de polivinilideno
<b>PMSF</b>	<i><u>P</u>henyl<u>M</u>ethyl<u>S</u>ulfonyl <u>F</u>luoride</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonil
<b>qRT-PCR</b>	<i>quantitative <u>R</u>everse <u>T</u>ranscription <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
<b>RNAi</b>	<i><u>I</u>nterfering <u>R</u>ibo<u>N</u>ucleic <u>A</u>cid</i> Ácido ribonucleico de interferencia
<b>RPMI1640</b>	<i><u>R</u>oswell <u>P</u>ark <u>M</u>emorial <u>I</u>nstitute 1640</i>

<b>RISC</b>	-	<i>RNA-Induced <u>Silencing</u> <u>Complex</u></i> Complejo inductor de silenciamiento de RNA
<b>RMA</b>		<i><u>Robust</u> <u>Multigene</u> <u>Analysis</u></i>
<b>RNA</b>		<i><u>Ribo</u><u>Nucleic</u> <u>Acid</u></i> Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>		<i><u>messenger</u> <u>Ribo</u><u>Nucleic</u> <u>Acid</u></i> Ácido ribonucleico mensajero
<b>smar</b>		<i><u>Substitution</u> <u>Augmentation</u> <u>Modification</u> <u>Redefinition</u></i>
<b>Smac</b>		<i><u>Second</u> <u>Mitochondria-derived</u> <u>Activator</u> of <u>Caspases</u></i> Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
<b>SDS-PAGE</b>		<i><u>Sodium</u> <u>Dodecyl</u> <u>Sulfate</u> <u>Poly</u><u>Acrylamide</u> <u>Gel</u> <u>Electrophoresis</u></i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SC</b>		<i><u>Cell</u> <u>Sorting</u></i> Classification celular
<b>SIMFIT</b>		<i>Simulation, statistical analysis, curve fitting and graph plotting</i>
<b>shRNA</b>		<i><u>Short</u> <u>Hairpin</u> <u>RNA</u></i> ARN de horquilla pequeña
<b>TAC</b>		<i><u>Transcriptome</u> <u>Análisis</u> <u>Console 4</u></i>
<b>TBS-T</b>		<i><u>Tris-Buffer</u> <u>Saline</u> with <u>Tween</u></i> Tampon Tris salino con Tween
<b>TGFβ</b>		<i><u>Transforming</u> <u>Growth</u> <u>Factor</u> <u>β</u></i> Factor de crecimiento y transformación beta
<b>TLDA</b>		<i><u>Taqman</u> <u>Low</u> <u>Density</u> <u>Array</u></i>
<b>TNF-α</b>		<i><u>Tumoral</u> <u>Grown</u> <u>Factor</u> <u>α</u></i> Factor de crecimiento y transformación de tipo alfa
<b>TNFRSF10A</b>		<i><u>Tumor</u> <u>Necrosis</u> <u>Factor</u> <u>Receptor</u> <u>SuperFamily</u> member <u>10A</u></i> Miembro 10A de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral
<b>TNFRSF10B</b>		<i><u>Tumor</u> <u>Necrosis</u> <u>Factor</u> <u>Receptor</u> <u>SuperFamily</u> member <u>10B</u></i> Miembro 10B de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral
<b>TRADD</b>		<i><u>Tumor</u> <u>necrosis</u> <u>factor</u> <u>Receptor</u> <u>type</u> <u>1-Associated</u> <u>Death</u> <u>Domain</u></i> Proteína del dominio de muerte asociada con el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1
<b>WB</b>		<i><u>Western</u> <u>Blot</u></i>

## *Introducción*

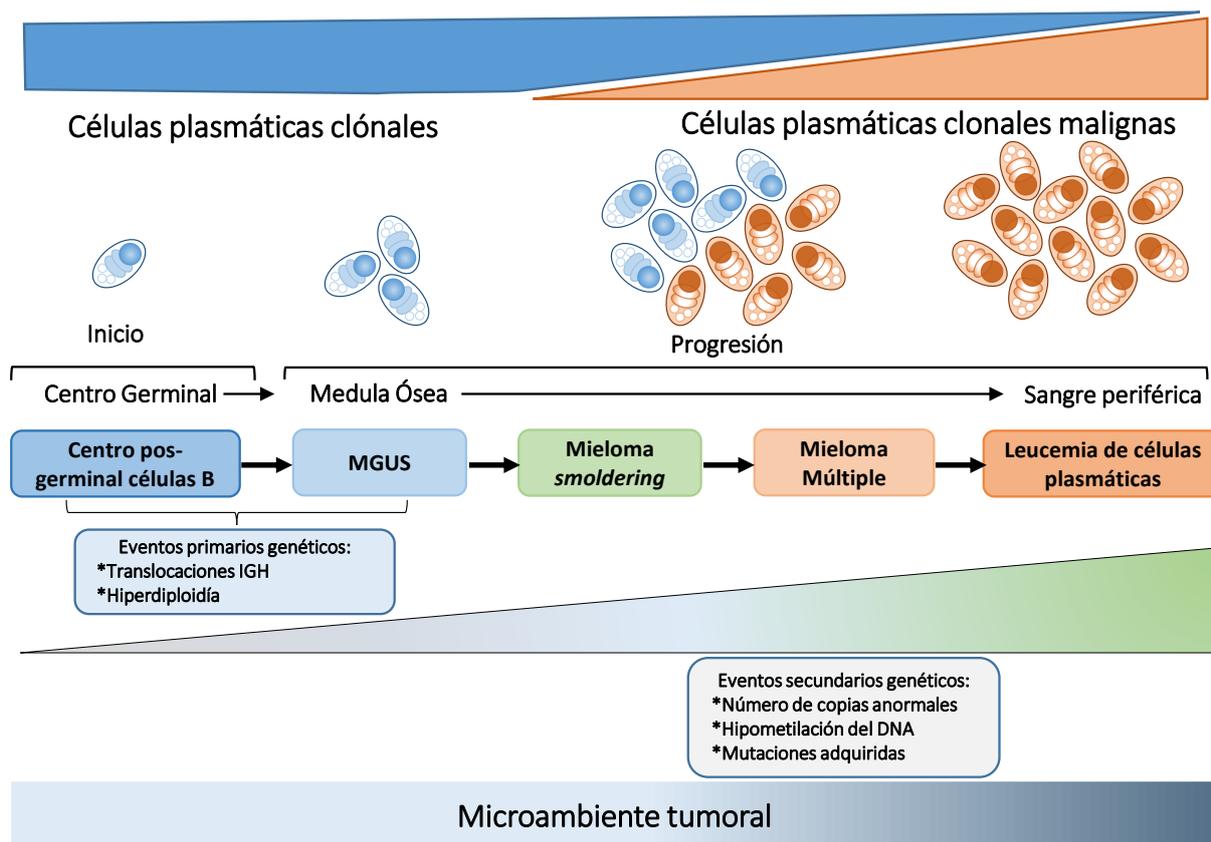


## 1. MIELOMA MULTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una hemopatía maligna de células B clonales, caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CPs) malignas en la medula ósea (MO). Las células mielomatosas secretan, en la mayoría de los casos, una inmunoglobulina (Ig) de carácter monoclonal que puede ser detectada en suero y/u orina, y que puede ser usada como elemento de diagnóstico y evolución de la enfermedad. Otra peculiaridad muy frecuente de esta enfermedad es la presencia de lesiones óseas debido al incremento de la actividad osteoclástica como consecuencia de la interacción de las células mielomatosas con el microambiente de la medula ósea (Sirohi et al., 2004; Kyle et al., 2008). Otros síntomas característicos del MM son el dolor óseo asociado a las lesiones líticas, la hipercalcemia, la anemia y la insuficiencia renal.

El MM es una enfermedad oncohematológica cuyos mecanismos involucran distintos estadios evolutivos, desde una condición premaligna denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI o MGUS del inglés *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), pasando por un estadio de mieloma indolente o asintomático (*smoldering myeloma*) hasta un estadio plenamente maligno denominado MM (San Miguel et al., 2014). Al parecer, el proceso de transición del MGUS al MM se debe principalmente a la expansión del número de CPs clonales aberrantes (López-Corral et al., 2011)(Figura 1).

En las MGUS hay una expansión clonal de CPs que da lugar a una única línea celular anormal. Estas células pueden producir una Ig intacta, una Ig libre de cadenas ligeras o una Ig libre de cadenas pesadas (más excepcional). Cada línea celular anormal produce sólo una cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$ , pero nunca ambas (Fonseca et al., 2001).



**Figura 1. Modelo de la patogénesis del MM.** Muestra la secuencia de eventos genéticos desde la etapa premaligna (MGUS) y la expansión clonal. Adaptado de Kumar *et al.*; 2017.

A nivel clínico y diagnóstico, el MGUS se define por presentar una concentración de Ig monoclonal menor de 3 g/dl, una cantidad de CPs clonales en la MO menor del 10%, y la ausencia de daño óseo (Rajkumar *et al.*, 2006). Considerando las características de las Igs, se clasifica al MGUS en varios subtipos clínicos: MGUS sin IgM, MGUS con IgM y MGUS de cadena ligera (Korde *et al.*, 2011).

Las características o criterios tradicionales de diagnóstico del MM activo que requiere tratamiento son: componente monoclonal en suero y/u orina mayor de 3g/dl, presencia de CPs clonales en MO mayor del 10% o la presencia de plasmocitoma probado por biopsia, además de sintomatología derivada de la afectación de órganos o tejidos por el mieloma (Kuehl *et al.*, 2012).

Más recientemente se han propuesto tres nuevos criterios para completar el diagnóstico del MM (Rajkumar *et al.*, 2014) y que son:

- La presencia de más del 60% de células plasmáticas en la MO
- Lesiones óseas focales por resonancia magnética y/o
- Un cociente de cadena ligera libre en suero (cadena afectada/no afectada) menor de 100.

Un estadio intermedio en la evolución de esta enfermedad es el mieloma quiescente (o *smoldering*) en el que el componente monoclonal sérico es mayor de 3 g/dl y/o la infiltración de CPs en la MO es mayor del 10%, pero no existe anemia, osteólisis, insuficiencia renal, hipercalcemia ni otros criterios del MM activo de los que se han mencionado previamente. Por otro lado, estudios recientes muestran de que aquellos pacientes con mieloma *smoldering* tienen un riesgo de progresión a MM sintomático de un 10% por año (Kyle et al., 2007; San Miguel et al., 2014).

Si bien el tratamiento del MM está estandarizado, puede variar principalmente en función de las condiciones propias del paciente así como de la edad y/o su estado general. Durante más de 3 décadas se utilizó como estándar de tratamiento la quimioterapia combinada con fármacos alquilantes como el melfalán asociado a esteroides, observándose como inconveniente la inespecificidad de la terapia. En los últimos años se han descubierto, desarrollado y aprobado diferentes agentes frente a la célula mielomatosa (Ocio et al., 2014). Entre ellos destacan aquellos que, a día de hoy, ya forman parte de los estándares de tratamiento para esta enfermedad y que han permitido mejorar la supervivencia de los pacientes con MM, como son los inhibidores del proteosoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib) y los agentes inmunomoduladores, también denominados IMiDs (talidomida, lenalidomida y pomalidomida)(McCarthy et al., 2014). Más recientemente se ha aprobado el uso para el tratamiento del MM de otros tipos de agentes como los inhibidores de deacetilasas de histonas (HDACi) como el panobinostat (Laubach et al., 2015) o anticuerpos

monoclonales como el daratumumab, anticuerpo contra CD38 (de Weers et al., 2011), y elotuzumab (contra la IgG1)(Moreau et al., 2014).

No obstante, y a pesar de todos estos avances, el MM sigue siendo una enfermedad incurable. Esto se debe a la aparición de resistencia primaria o secundaria a los tratamientos terapéuticos. Por ello sigue siendo fundamental la investigación y desarrollo de nuevos agentes, así como explorar sinergismos con los ya descubiertos que nos permitan vencer estas resistencias (Robak et al., 2018).

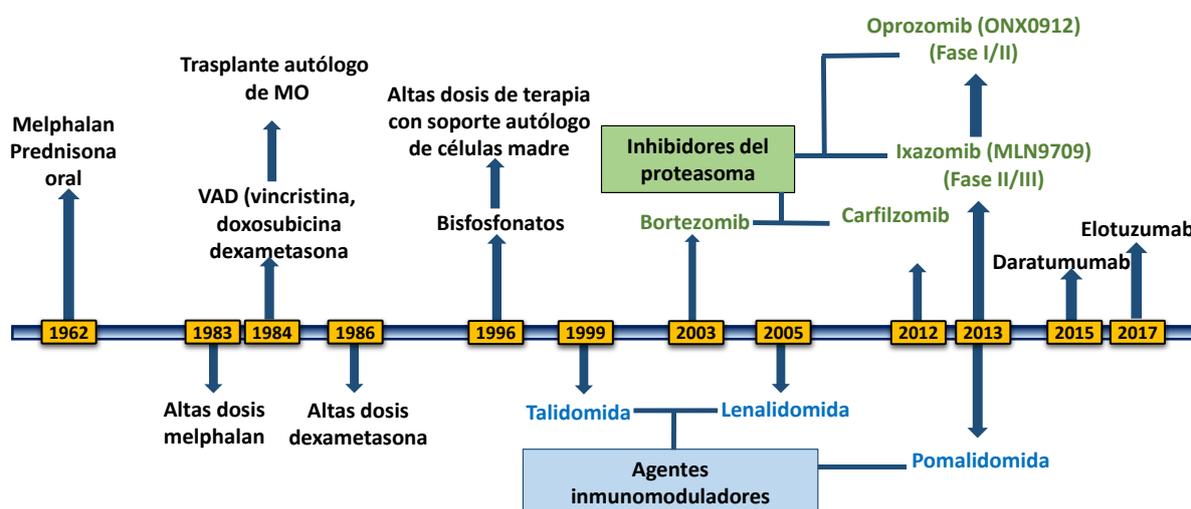
### **1.1 ONTOGENIA Y ONCOGENÓMICA DE LAS CÉLULAS MIELOMATOSAS**

El MM es el resultado de una evolución errática clonal principalmente en las últimas etapas del desarrollo de las células B (Vescio et al., 1995). En la MO esta estirpe maligna se asocia con células estromales, incluidos los osteoclastos, los cuales secretan citoquinas que favorecen el crecimiento y supervivencia de estas células mielomatosas (Bakkus et al., 1992; Hallek et al., 1998). Estudios moleculares y citogenéticos muestran que el MM está caracterizado por una combinación entre ganancias y pérdidas en todos los cromosomas (Díaz-Rodríguez et al., 2011). La mayoría de las traslocaciones cromosómicas afectan al locus de la IgH, la presencia de las traslocaciones t(4;14), t(14;16) o t(14;20) se han asociado con un pronóstico desfavorable (Hideshima et al., 2007; Morgan et al., 2012). Estudios de arrays de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) muestran además cambios epigenéticos como alteraciones en la metilación y una gran variedad de pequeñas lesiones focales en el genoma de las células mielomatosas (Carrasco et al., 2006). Debido a que el MM es una enfermedad citogenéticamente heterogénea, estudios de citogenética convencional e hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), evidenciaron diferentes tipos de alteraciones genéticas como traslocaciones, anomalías en el número de copias (ANC) y mutaciones puntuales. Desde este punto de vista, cinco traslocaciones

cromosómicas representarían el 50% de las alteraciones presentes en MM. Estas alteraciones ocurren en las posiciones 11q13, 4p16, 16q23, 6p21, y 20q11, que están implicadas directamente en la sobreexpresión de ciclina D1, FGFR3/MMSET, c-MAF, ciclina D3 y MAF-b, respectivamente (Gutiérrez et al., 2007; Morgan et al., 2012; Binder et al., 2017).

## 1.2 TRATAMIENTO DEL MM

A día de hoy no hay tratamiento que permita la remisión completa y duradera del MM, por lo que se sigue considerando una neoplasia hematológica incurable (Kumar et al., 2008)(Figura 2).



**Figura 2. Historia cronológica del tratamiento de MM.** Desarrollo de los agentes terapéuticos más relevantes a partir de la década de los 60 hasta la actualidad. *Adaptada de Anderson, K.C. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2011.*

Inicialmente los pacientes con MM eran tratados con quimioterapia convencional y hoy en día se utilizan terapias dirigidas de alta especificidad basadas en los mecanismos oncogénicos que han sido identificados previamente como causantes de la enfermedad. En la década de los 60 únicamente se disponía de quimioterapia combinada con glucocorticoides (melphalan, prednisona y dexametasona) que

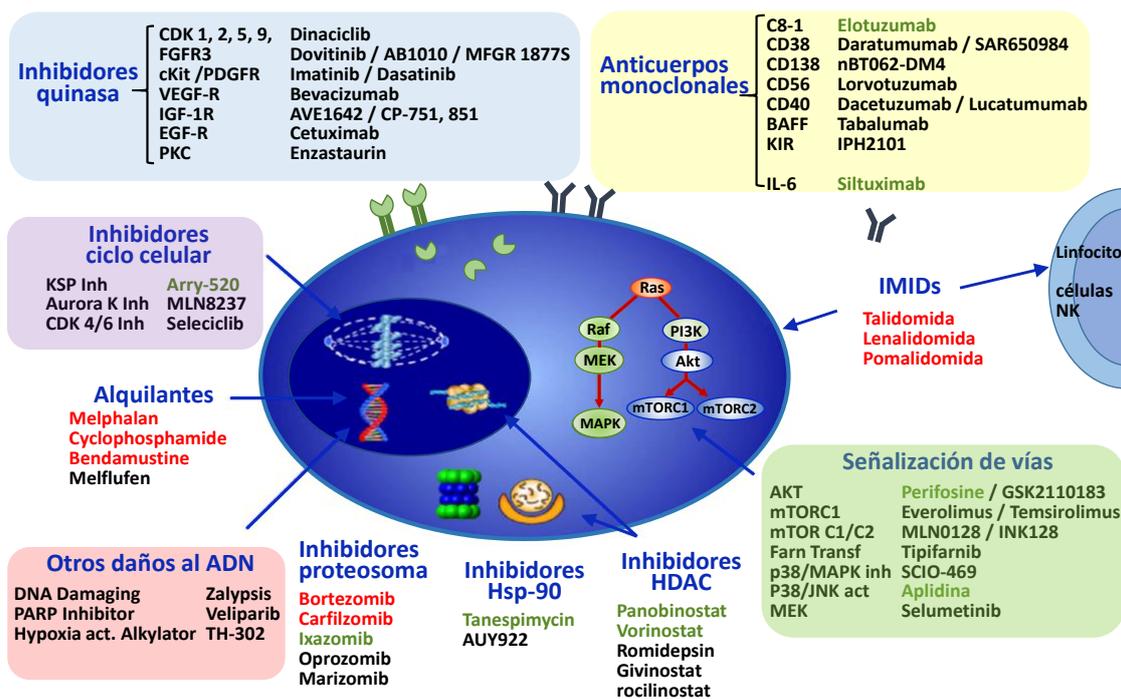
permitían solo un 5% de remisión completa (RC) y la mediana de supervivencia global (SG) era muy baja, de entre 2 y 3 años (Rajkumar et al., 2016). Esto se debía a que muchos de los pacientes no respondían a las terapias disponibles, que tenían muy poco margen de actividad, apareciendo rápidamente recidivas inevitables y bastante más agresivas en un gran porcentaje de pacientes. En los años 90 aparece el concepto de dosis alta de quimioterapia con rescate celular (trasplante autólogo), llevando a una RC en el 30-40% de los pacientes y acompañado de un significativo incremento en la SG (Alegre et al., 1995; Palumbo et al., 2014).

### **1.2.1 AGENTES INMUNOMODULADORES (IMIDS)**

Fue a partir de 1998 con la introducción de la talidomida, un agente que mostró resultados bastante alentadores en pacientes con recaídas, cuando se observaron respuestas duraderas. Estudios llevados a cabo en aquel momento mostraron que la talidomida actuaba tanto directamente sobre las CPs como sobre el microambiente de la medula ósea (Siegel et al., 2002). Por todo ello, se le considero como el primer fármaco inmunomodulador o IMiD (Singhal et al., 1999). A partir de ella se desarrollaron otros agentes más potentes y con mejor tolerancia como la lenalidomida y más reciente la pomalidomida (Ocio et al., 2015)(Figura 2).

### **1.2.2 NUEVOS FÁRMACOS**

En la actualidad se vienen explorando distintos fármacos dirigidos frente a diferentes rutas biológicas implicadas en la patogénesis del MM. Un resumen de ellos se muestra en la figura 3, donde se indican los que están en fase preclínica o clínica. Entre ellos están los inhibidores del proteasoma o los inhibidores de las HDAC, de los que hablaremos a continuación.



**Figura 3. Representación de nuevas dianas terapéuticas de MM y los fármacos probados para su tratamiento.** En rojo se muestra los fármacos aprobados, en verde los que se encuentran en la fase III del desarrollo clínico, y en negro fármacos en ensayos preclínicos. Adaptado de *Ocio et al., 2014*.

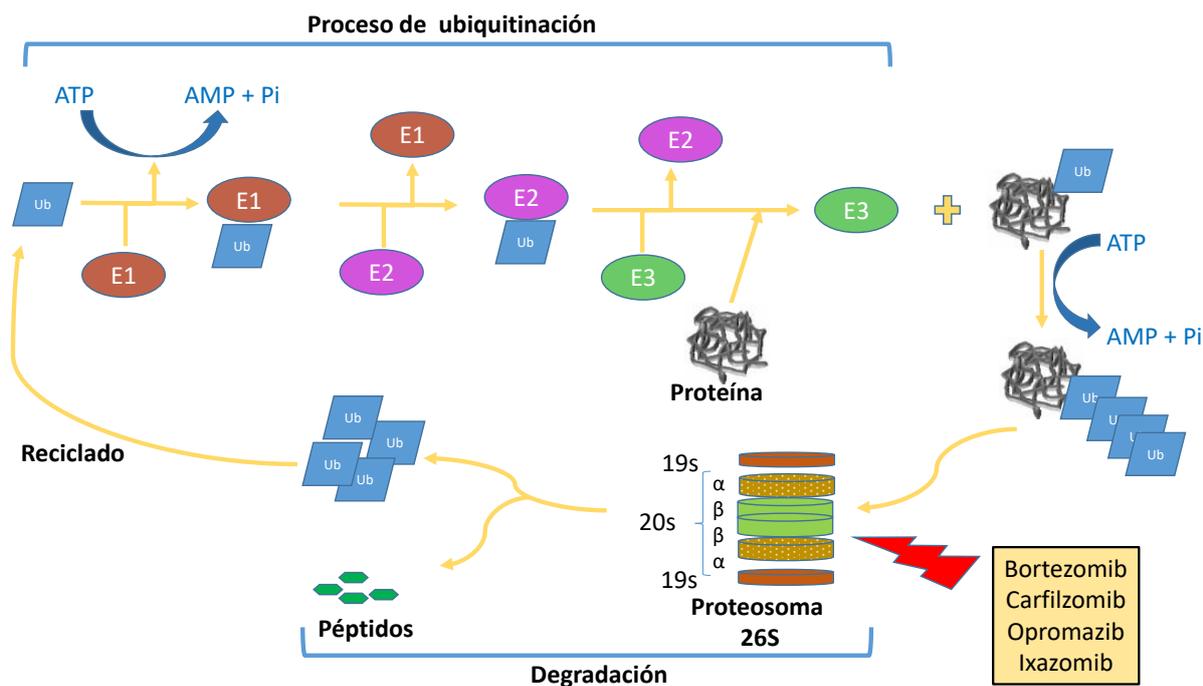
### 1.2.3 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA (IP)

La vía ubiquitina-proteasoma juega un papel esencial en la regulación homeostática entre síntesis y degradación de diversos eventos celulares, incluidos aquellos involucrados en la tumorigénesis (Manasanch et al., 2017). La inhibición farmacológica de la función del proteasoma resulta útil como concepto para el desarrollo de una nueva clase de medicamentos antitumorales, y conduce a la acumulación de proteínas proapoptóticas en células tumorales pero no en tejido normal (Kane et al., 2006).

La aprobación del bortezomib por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), ejemplificó el primer inhibidor del proteasoma que se implementó en el tratamiento de enfermedades malignas. Se utilizó como tratamiento de primera línea para pacientes con MM recién diagnosticados, mieloma recidivante y/o refractario y linfoma de células del manto (Kane et al., 2003; Chen et al., 2011). El proteasoma es un gran complejo proteolítico cuya misión es la degradación de

proteínas. Para que esto ocurra la proteína debe ser reconocida e iniciar el proceso de ubiquitinación o incorporación de la ubiquitina (Ub)(Chen et al., 2011).

Este sistema está formado por tres enzimas distintas (Figura 4): la enzima activadora de la Ub o E1, la enzima conjugadora de la ubiquitina o E2 y la ubiquitina ligasa o E3 (Kisselev et al., 2001). La ruta ubiquitina-proteosoma involucra dos pasos críticos: la unión covalente del complejo de ubiquitina a la proteína sustrato y la degradación de la proteína sustrato por la acción del proteasoma 26S, cuya función se ejerce en el citoplasma de células eucariotas degradando proteínas no necesarias (Chen et al., 2011). El proteasoma 26S contiene dos subunidades 20S, que sirven como núcleo catalítico, y dos subunidades reguladoras 19S, que actúan como sitio de reconocimiento y entrada para las proteínas destinadas a la proteólisis (Peters et al., 1993). Además, el núcleo 20S está formado por dos anillos  $\alpha$  no catalíticos idénticos y dos anillos  $\beta$  catalíticos formando una estructura cilíndrica (Chen et al., 2011). La actividad proteolítica se limita a las subunidades  $\beta$  como responsables de la actividad enzimática del complejo proteasoma (Gallastegui et al., 2010), mientras que las subunidades 19S sirven como subunidades reguladoras de la actividad del proteosoma 26S (Goldberg et al., 2002). Para iniciar el proceso de ubiquitinación es necesaria la presencia de ATP como fuente de energía (Figura 4). Alteraciones en el proteasoma están presentes en muchos trastornos patológicos, incluido el cáncer, donde su actividad puede estar desestabilizada (Ciechanover et al., 2005). Muchas proteínas normalmente degradadas por el proteasoma se han identificado como importantes mediadores del cáncer, como la proteína pro-apoptótica Bax (Liu et al., 2008) o NF- $\kappa$ B (Chen et al., 2012).



**Figura 4. Sistema ubiquitina-proteosoma.** Fases de la ubiquitinación de las proteínas diana mediada por las enzimas E1, E2 y E3. La ubiquitina se une a la proteína sustrato que queda marcada para su consiguiente degradación por el proteosoma 26S, que está formado por dos subunidades catalíticas 20S y dos subunidades reguladoras 19S. Adaptada de Chen *et al.*, 2011.

La inhibición del proteosoma produce una acumulación intracelular de diferentes proteínas, confiriendo toxicidad a las células que, en muchos casos, mueren por apoptosis. Por tanto, los fármacos inhibidores del proteosoma que se han introducido recientemente en la terapia del MM inducen apoptosis, un fenómeno que se observa preferentemente en las células malignas (Manasanch *et al.*, 2017).

El bortezomib es el primer inhibidor del proteosoma desarrollado inicialmente como agente antineoplásico (LeBlanc *et al.*, 2002). Desde su ingreso como parte de la terapéutica, su indicación está establecida para el tratamiento del mieloma recidivante en pacientes que habían recibido al menos dos tratamientos previos (Dunn *et al.*, 2012), además de usarse en combinación con otros agentes antimielomatosos como doxorubicina, melfalan, prednisona, dexametasona y/o talidomida. También está indicado en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona en el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células del manto que no han sido previamente tratados y que no sean considerados apropiados para un trasplante de

progenitores hematopoyéticos (Richardson et al., 2005; San Miguel et al., 2013; Mateos et al., 2017). El bortezomib ha demostrado una mejor eficacia y tolerancia al administrarse de forma subcutánea (Moreau et al., 2011).

Hay estudios que indican que tanto la inhibición del proteasoma como la modulación del sistema inmune son buenas estrategias para atacar a las células tumorales mielomatosas. Además, la ausencia de resistencia cruzada entre estos fármacos, abre nuevas vías para optimizar su uso a través de las secuencias y combinaciones más adecuadas (Mateos et al., 2013).

Más recientemente se ha incorporado a la clínica del MM la segunda generación de fármacos pertenecientes a este grupo, entre los que destaca el carfilzomib (Moreau et al., 2014). Se ha aprobado su uso para tratamiento individualizado o en combinación en pacientes con MM que hayan recibido como mínimo un tratamiento previo. Se trata de un tetrapéptido epoxicetona inhibidor del proteasoma que, de forma selectiva e irreversible, se une a la subunidad 20S, que es la que presenta la actividad catalítica (Magill et al., 2004). Otro fármaco de esta familia es el ixazomib, un inhibidor oral que se une de forma selectiva y reversible a la subunidad 19 $\beta$  del proteasoma 26S. Al inhibir el proteasoma, ixazomib reduce la capacidad de degradación de proteínas dentro de la célula tumoral, afectando a múltiples cascadas de señalización intracelulares y originando finalmente la muerte de la célula tumoral. Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con MM que hayan recibido al menos una terapia previa (Allegra et al., 2014).

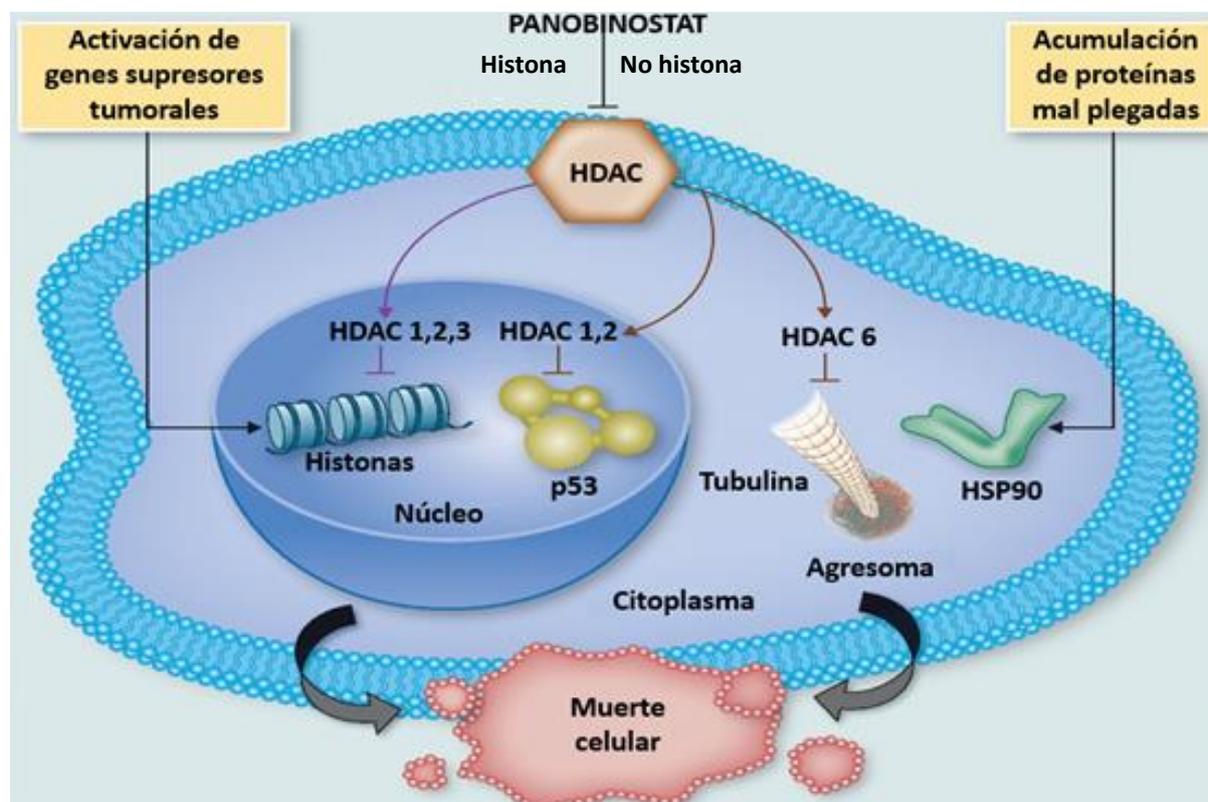
#### **1.2.4 INHIBIDORES DE LAS DEACETILASAS DE HISTONAS**

El rol de la epigenética en los mecanismos de desarrollo del cáncer se ha demostrado crucial en los últimos años (Hatada et al., 2010). De hecho, alteraciones en la metilación del DNA, la modificación de histonas, la desregulación del RNA no

codificante o las alteraciones en la condensación de la cromatina entre otros factores, son procesos epigenéticos que están emergiendo como posibles dianas terapéuticas (Jin et al., 2011).

Las deacetilasas de histonas (HDAC) constituyen una de estas dianas terapéuticas de gran importancia, por lo que se han desarrollado inhibidores de estas moléculas (HDACi o inhibidores de HDAC) para su uso en el clínica (Eckschlager et al., 2017). Nuestro grupo fue el primero en descubrir la acción antimieloma del panobinostat inicialmente denominado LBH58 (Maiso et al., 2006). Este fármaco, se une al dominio catalítico de las HDAC, reduciendo su actividad e inhibiendo la supervivencia y proliferación celular de las células mielomatosas (Laubach et al., 2017). En la figura 5 mostramos el mecanismo de acción del panobinostat al catalizar la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 y de algunas proteínas no histonas (Minucci et al., 2006). Se ha descrito que las HDAC 1, 2 y 3 están implicadas en procesos oncogénicos, mientras que HDAC 6 presenta características catalíticas distintas a las anteriores (Harada et al., 2016). Panobinostat inhibe las HDAC 1, 2, y 3 (Clase I), dando lugar a la relajación de la cromatina, la activación transcripcional y reactivación de supresores tumorales como el factor de transcripción p53, (Kalushkova et al., 2010). Además, modifica la expresión génica a través de la inhibición de Akt y del factor HIF1 $\alpha$  (Atadja et al., 2009). En paralelo, el panobinostat inhibe a HDAC 6 (Clase IIb), produciendo una hiperacetilación de los microtúbulos y una acumulación de proteínas mal plegadas por la acetilación de Hsp90 y la inhibición de su función como chaperona (Ocio et al., 2010). Estas dos vías de acción son las responsables de la actividad antitumoral del panobinostat (Mitsiades et al., 2004; Laubach et al., 2015; Manasanch et al., 2017)(Figura 5).

Estudios preclínicos en MM muestran que el panobinostat actúa además sobre el ciclo celular e induce la apoptosis mediada por los miembros de la familia Bcl-2 (Mitsiades et al., 2003; Cheng et al., 2015).



**Figura 5. Mecanismo de acción dual del panobinostat.** El panobinostat induce muerte celular mediante la reactivación de genes supresores tumorales por las HDAC 1, 2 y 3, provocando la relajación de la cromatina además de reactivar al supresor tumoral p53. En paralelo induce la acumulación de proteínas mal plegadas originadas por la acción de HDAC 6. Ambos mecanismos son responsables de la actividad antitumoral de este fármaco. Adaptado de Laubach *et al.*, 2015.

Como hemos citado previamente, las células cancerosas son más sensibles a la inhibición del proteasoma que las células normales, debido a su dependencia para la eliminación de proteínas citotóxicas. Estudios recientes de sinergismo entre panobinostat y bortezomib, pueden ser explicados, en parte, a través del efecto de panobinostat sobre la degradación de proteínas (Richardson et al., 2013). Las células mielomatosas tienen altos niveles de reciclaje de proteínas y por tanto son más susceptibles a los inhibidores del proteasoma, que inhiben el metabolismo y eliminación de las proteínas generadas dentro de la célula y, a través de este

mecanismo, producen una señal proapoptótica (LeBlanc et al., 2002). El bortezomib inhibe la degradación mediada por el proteasoma e induce la formación del agresoma (Atadja 2009; An et al., 2015).

Por otro lado estudios de fase III en pacientes en recaída que habían recibido 3 tratamientos previos compararon el efecto del panobinostat, bortezomib y dexametasona frente a dexametasona y bortezomib (brazo control). Estos estudios mostraron que la media de supervivencia del grupo con panobinostat era mayor al grupo control en 4 meses. La presencia de diarrea como un efecto secundario grave en el grupo control, no evidenciado en el grupo del panobinostat, lo catapultó como un fármaco seguro para el tratamiento de segunda línea, por lo que la FDA aceleró su aprobación en noviembre de 2014 (San Miguel et al., 2014).

### **1.2.5 INMUNOTERAPIA Y MM**

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento oncológico que estimula las defensas naturales del organismo con el fin de combatir el cáncer pudiendo detener o retrasar el crecimiento de las células cancerígenas, impedir su diseminación y ayudar al sistema inmune a optimizar su función (Ritchie et al., 2010). Los anticuerpos monoclonales están entre los más estudiados en la actualidad y se usan tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes antimielomatosos (Dimopoulos et al., 2016).

CD38 es un antígeno celular transmembrana relacionado estructuralmente con el antígeno leucocitario humano (HLA) (Cotner et al., 1981). El 90% de las CPs malignas de pacientes muestran expresión de superficie de este antígeno (Leo et al., 1992). En 2011 se describió por primera vez el daratumumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD38 (de Weers et al., 2011). Actúa mediante diversos mecanismos como: citotoxicidad directa, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o citotoxicidad

celular dependiente del anticuerpo (ADCC), así como fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) mediada por macrófagos. Su eficacia lo llevo a su aprobación en monoterapia (Lokhorst et al., 2015), además de presentar eficacia en combinación con bortezomib y dexametasona o con lenalidomida y dexametasona (Dimopoulos et al., 2016; Palumbo et al., 2016).

Otro anticuerpo monoclonal que se ha introducido recientemente en la clínica del MM es el elotuzumab, dirigido contra el receptor SLAMF7. No tiene actividad antimieloma significativa en monoterapia, pero en combinación con lenalidomida y dexametasona mejora el resultado sustancialmente (Gavriatopoulou et al., 2017). Fue aprobado en 2015 para el tratamiento de pacientes de MM que habían recibido entre una y tres líneas prevías de tratamiento (Magen et al., 2016).

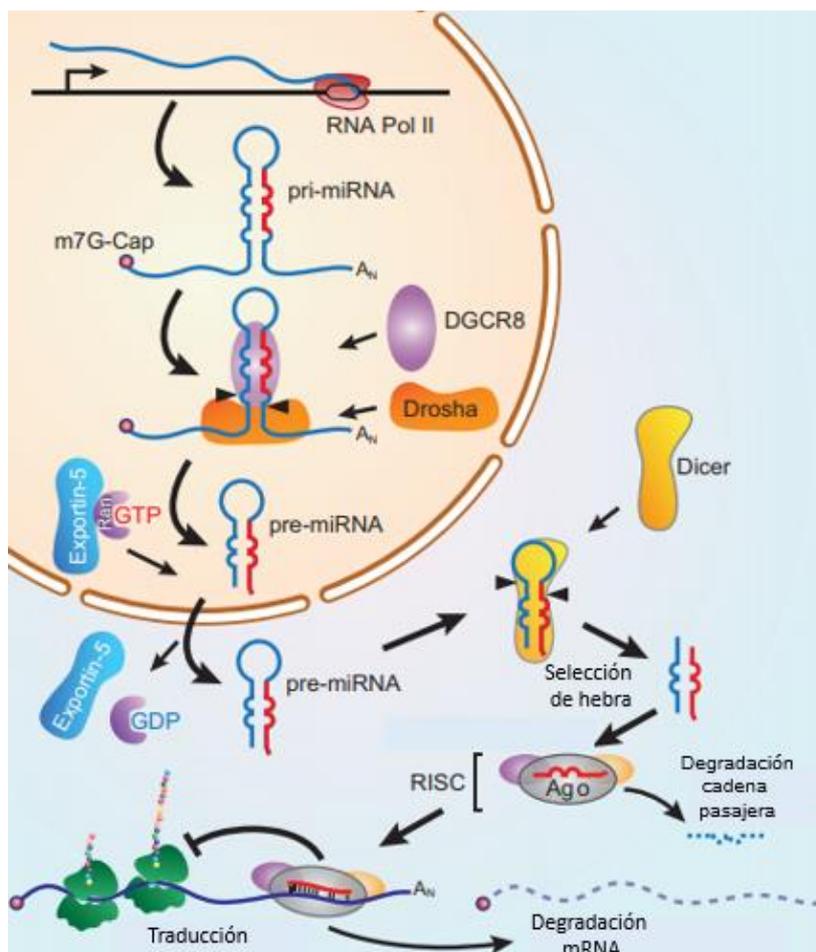
En paralelo se están desarrollando otras estrategias de inmunoterapia como las basadas en el uso de vacunas antiidiotipo, las combinadas con células dendríticas, el uso de terapia celular con células NK y la inmunoterapia adoptiva mediante CARTs (*Chimeric Antigen Receptor T Cells*) que son linfocitos T del paciente modificados. En MM se observó una eficacia de este tipo de terapias aunque su toxicidad debe ser considerada (Maus et al., 2014; Rodríguez-Otero et al., 2017).

## **2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PEQUEÑAS MOLECULAS DE RNA NO CODIFICANTE (MIRNAS).**

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años han puesto de manifiesto el hecho de que no solo los niveles de expresión de RNA mensajero (RNAm) son importantes para controlar los niveles de proteína, sino que hay otro nivel de regulación que implica, entre otros, a pequeñas unidades de RNA no codificantes llamadas microRNAs o miRNAs. Están constituidas por 21-25 nucleótidos y son capaces de interferir y/o regular la expresión de otros genes (Hammond et al., 2015)

## 2.1. BIOGÉNESIS

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde los miRNAs realizan su función (Figura 6). En el núcleo, los miRNAs son transcritos inicialmente por la enzima RNA polimerasa II (Pol II) a partir tanto de regiones intergénicas como intragénicas.



**Figura 6. Biogénesis de los miRNAs.** La generación de pri-miRNA se inicia a partir de ADN por acción de la polimerasa II originando una horquilla denominada pri-miRNA que es cortada en la base por acción del complejo DGR8/Drosha, dando lugar al pre-miRNA. La exportina 5 es el transportador del pre-miRNA del núcleo hacia el citoplasma, donde el pre-miRNA se acopla al complejo Dicer que lo procesa a nivel del bucle apical generando una hebra que será degradada y una hebra madura se une al complejo RISC/AGO, responsable de la unión del miRNA maduro con el RNAm diana, donde finalmente cumple su función de inhibición de la traducción de proteínas o la degradación del RNAm. Adaptada de (Strubberg *et al.*, 2017).

Así se transcriben fragmentos de RNA de hasta 1Kb y que son denominados miRNAs primarios (pri-miRNA)(Bartel *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006). Estos pri-miRNAs adquieren la forma de una horquilla irregular que contiene 3 bucles helicoidales y

están flanqueados por segmentos de RNA de cadena sencilla con un extremo m7G-cap y una cola de poliadeninas (AN)(Han et al., 2006; Hunter et al., 2005). En los pri-miRNA, la enzima RNA polimerasa III (Drosha) junto con el cofactor de la subunidad del complejo microprocesador 8 (*DGCR8*) reconocen al sustrato y actúan como guía de la enzima. En estas condiciones la enzima corta la horquilla en la base del pri-miRNA originando un fragmento denominado pre-miRNA (Bartel et al., 2003).

Los pre-miRNAs se forman en el núcleo de la célula y constan de aproximadamente 65 nucleótidos (Bartel et al., 2003; Hunter et al., 2005). El pre-miRNA se une entonces a la exportina 5 (Exp 5), miembro de la familia proteica de las carioferinas (Denli et al., 2004; Allen et al., 2005), y con la participación de Ran-GTP, un transportador implicado en el tráfico de péptidos y proteínas a través de la envoltura nuclear, es transportado al citoplasma (Kehlenbach et al., 1999). En el citoplasma la enzima endoribonucleasa III Dicer, es la encargada del procesamiento final de los pre-miRNAs. Dicer es una ribonucleasa compuesta por múltiples dominios (Lau et al., 2012). Los dominios RNasIII y dsRBD son los encargados de la unión y corte del pre-miRNA, cuando el dominio PAZ reconoce la doble cadena de RNA. Dicer corta entonces el bucle apical del pre-miRNA dando lugar a una doble cadena de RNA de unos 22 nucleótidos de longitud (Lau et al., 2012). Esta doble cadena es captada y acoplada al complejo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) por una proteína de la familia Argonata (complejo miRISC/Ago). Las proteínas Argonata (Ago), componentes principales del RISC, están formadas por 4 dominios comunes encargados del anclaje de la cadena (Schirle et al., 2012; Elkayam et al., 2012). En humanos están descritas 4 proteínas Argonata, AGO1, AGO3 y AGO4 con capacidad para reconocer los RNAm diana y AGO2 con capacidad de escisión de la doble cadena de RNA en dos cadenas simples (Fujimoto et al., 2012). Una de ellas

será descartada (“cadena pasajera”), y la otra permanecerá unida a RISC (“cadena madura”). Uno de los factores determinantes en la selección de la cadena madura, son las estabilidades termodinámicas relativas de los dos extremos de la doble hélice y que depende además del tipo de tejido (Biasiolo et al., 2011; Gao et al., 2010). Por norma general, la hebra que alberga el apareamiento de bases termodinámicamente menos estable en su extremos 5’ es la seleccionada (Tomari et al., 2007). Una vez que la cadena madura se une a la proteína AGO, estas le confieren estabilidad (Matranga et al., 2005). Recientemente hay datos que apuntan a que no en todos los casos una de las cadenas se destruye (cadena pasajera), abriendo la posibilidad de que ambas cadenas puedan ser funcionalmente activas (Biasiolo et al., 2011).

Cuando se incorpora la cadena madura al RISC, se producirá la unión al RNAm y su degradación. En el caso de complementariedad total actúan como un RNA de interferencia (RNAi) silenciando la expresión del gen. Si la complementariedad es imperfecta ocurre una represión post-transcripcional que inhibe la traducción del RNAm. En ambos casos se produce una disminución del nivel de proteínas codificadas por el gen diana (Tuschl et al., 2002; Xu et al., 2007).

## **2.2. MIRNAS Y CÁNCER**

Los miRNAs pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores tumorales dependiendo del RNAm complementario que interfieran (Esquela-Kerscher et al., 2006). Se ha descrito que diferentes tumores muestran alteraciones en la expresión de los mismos miRNAs, lo que indicaría que algunos miRNAs participarían en vías de señalización comúnmente alteradas en distintos tipos tumorales. Por todo ello el perfil de expresión de los miRNAs se han analizado, entre otras, en diversas neoplasias hematológicas (Lawrie, 2007; Ling et al., 2013).

Los análisis computacionales han revelado que cada miRNA puede regular la expresión de múltiples genes y que muchos RNAm pueden ser dianas para diferentes miRNAs. Esto explicaría por qué algunos miRNAs tienen una funcionalidad tan amplia y a la inversa, por qué el control en la traducción de algunos genes es tan complejo. El hecho de que algunos miRNAs regulen la traducción sin afectar a la estabilidad del RNAm puede justificar que los perfiles de expresión génica basados únicamente en el análisis del RNAm no siempre se correlacionen con la expresión protéica (Esquela-Kerscher et al., 2006). Toda esta información nos indicaría que la expresión aberrante de miRNAs, condicionada bien por reordenamientos cromosómicos, amplificaciones génicas, deleciones y/o mutaciones, y en muchos casos por mecanismos desconocidos, es un hallazgo común y frecuente en cáncer (Esquela-Kerscher et al., 2006; Teruya, et al., 2007).

Así, el descubrimiento de miRNAs que se encargan de regular la expresión génica, revela la existencia de mecanismos de regulación transcripcionales y post-transcripcionales que no se habían tenido en cuenta hasta el momento, y que podrían ser claves para profundizar en los procesos oncogénicos que determinan la evolución patogénica del clon tumoral (Cullen et al., 2004). Varios grupos han puesto de manifiesto que los miRNAs pueden actuar como reguladores claves en procesos biológicos tan diversos como desarrollo, diferenciación, apoptosis y proliferación (López-Camarillo et al., 2013). También se ha observado que tejidos con un mismo origen embrionario tienen un perfil de expresión de miRNAs característico (Lu et al., 2005). Además, cambios en las características de la expresión génica y molecular estudiadas en otras leucemias podrían explicar el papel de estos procesos poco conocidos en mieloma (Pichiorri et al., 2008).

### 2.3. MIRNAS EN MIELOMA MÚLTIPLE

Desde el descubrimiento del vínculo entre los miRNAs y el cáncer, estos se han investigado en prácticamente todos los tumores. Se han identificado aproximadamente 2000 miRNAs en humanos (Ling et al., 2013). Estudios de perfiles de expresión de miRNAs específicos han correlacionado su expresión con la hematopoyesis y el cáncer en general y específicamente con la patogénesis del MM (Roccaro et al., 2009; Garzon et al., 2006; Calin et al., 2006; Croce, 2008), demostrando que la expresión de miRNAs está desregulada en las células de mieloma, en comparación a las CPs normales (Chng et al., 2007; Corthals et al., 2011; Wong et al., 2012; Roccaro et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Los miRNAs están regulados por múltiples factores y mecanismos moleculares que afectan al DNA, desde el número de copias (Hanamura et al., 2006), la metilación de islas CpGs (Bird et al., 2002), los factores de regulación transcripcional de la expresión de miRNAs (Gutiérrez et al., 2010) y las posibles alteraciones en su biogénesis (revisado en Rupaimoole et al., 2016).

Estudios previos que hemos llevado a cabo en nuestro grupo de investigación en el contexto del MM, han puesto de manifiesto evidencias de la existencia de miRNAs significativamente desregulados en los diferentes subtipos citogenéticos de MM en comparación con las CPs normales de pacientes con esta dolencia (Gutiérrez et al., 2010). En estos estudios demostramos que en MM existen patrones de expresión de miRNAs asociados con anomalías genéticas y que la correlación del perfil de expresión de estos miRNAs y las predicciones de sus posibles dianas es de gran interés a nivel pronóstico en la patogénesis del MM (Gutiérrez et al., 2010).

Las pérdidas cromosómicas, específicamente la delección del cromosoma 13 (del13q), están presentes en más del 50% de casos de MM (Avet-Loiseau et al.,

2009). Muchos miRNAs localizados en esta región están infraexpresados en muestras de MM con del13q, principalmente de los *clusters* miR-15a/miR-16 y el *cluster* miR-17-92 (Roccaro et al., 2009; Gao et al., 2012; Misiewicz-Krzeminska et al., 2013). De hecho, estudios previos indican que la infraexpresión de miR-15a y miR-16 contribuyen a la patogénesis del MM (Roccaro et al., 2009). Por otro lado estudios en células de MM comparados con CPs normales han demostrado que la hipermetilación del DNA está particularmente asociada a la progresión tumoral, estando el miR-375 relacionado con el progreso y con la recaída del MM (Tatekawa et al., 2017).

#### **2.4. INTERACCIÓN DE MIRNAS Y FÁRMACOS**

Dada la importancia de los miRNAs en la patogénesis del MM, se están utilizando estas moléculas como posibles dianas terapéuticas. De hecho, ya están en marcha ensayos clínicos que utilizan el perfil de miRNAs para el pronóstico y predicción de la respuesta clínica de los pacientes (Hayes et al., 2014; Di Marzo et al., 2016).

Estudios previos de expresión génica por PCR cuantitativa mostraron que la sobreexpresión del miR-497 suprime la proliferación celular en líneas celulares de MM, promoviendo la apoptosis al activar la familia proapoptótica de Bcl-2. Además, la combinación de esta sobreexpresión con bortezomib muestra un gran sinergismo en las células mielomatosas (Tian et al., 2018). Otro miRNA relacionado con la resistencia a bortezomib es el miRNA 22-3p, que inhibe la expresión p53 a través de la señalización de Snail1 que interactúa selectiva y no covalentemente con NF- $\kappa$ B, inhibiendo la apoptosis que induce este fármaco. De hecho utilizando técnicas de silenciamiento génico para Snail1, se consiguió mejorar la sensibilidad a bortezomib (Lian et al., 2018).

También se ha demostrado que la expresión de EZH2, una multitransferasa cuya sobreexpresión en MM se asocia con mal pronóstico y resistencia a fármacos

antimielomatosos, está regulada por el miR-138. La administración *in vivo* de los miméticos de miR-138 o el inhibidor farmacológico de EZH2 en combinación con bortezomib induce una regresión significativa de los tumores en modelos de xenoinjerto (Nasrin et al., 2018).

### 3. MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso importante en el desarrollo fisiológico normal de los organismos así como en diferentes enfermedades. Siguiendo las directrices del comité de nomenclatura de muerte celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*), se considera muerte celular cuando la célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática, cuando el núcleo se ha fragmentado o cuando los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados. Este comité ha propuesto una clasificación y definición actualizada de las diferentes modalidades de muerte celular, que se describen a continuación (Galluzzi et al., 2007; Galluzzi et al., 2012; Galluzzi et al., 2018) y se muestran también en la figura 7.

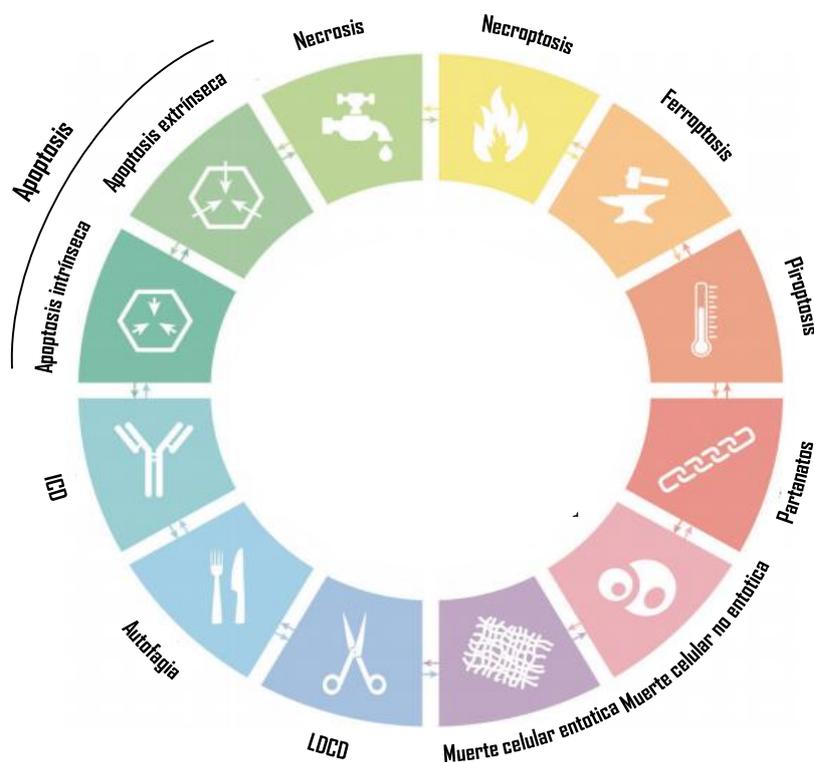
- Apoptosis o muerte celular programada. Se asocia a una serie de cambios morfológicos y una disminución de la adhesión y los contactos intercelulares, alteraciones del citoesqueleto, condensación de la cromatina, desintegración de los nucléolos, disminución del tamaño del núcleo y condensación del citoplasma y orgánulos. Puede ser a su vez dos subtipos:

Intrínseca: iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular, y dirigido por la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Extrínseca: iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular que es detectada por receptores específicos presentes en la membrana plasmática y propagada por la caspasa 8.

- Necrosis: muerte celular caracterizada por un aumento del volumen de los orgánulos y del citoplasma, moderada condensación de la cromatina y ruptura de la membrana plasmática asociada a la pérdida de componentes celulares.
- Necroptosis: iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular detectado por receptores de muerte específicos o receptores de reconocimiento de patógenos.
- Ferroptosis: iniciada por perturbaciones oxidativas del microambiente intracelular y controlada por la enzima peróxidasa 4 dependiente de glutatión. Puede ser inhibida por quelantes de hierro y antioxidantes lipofílicos.
- Piroptosis: depende de la formación de poros en la membrana plasmática por miembros de la familia de proteínas gasderminas, a menudo como consecuencia de la activación inflamatoria de las caspasas 8, 9 y 3.
- Partanatos: modalidad de muerte iniciada por la hiperactivación de la poly (ADP-ribosa) polimerasa 1 y precipitada por la consiguiente catástrofe bioenergética acoplada a la degradación del DNA, dependiente de los factores inductores de la apoptosis mitocondrial (AIF1) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).
- Muerte celular entótica: inicialmente caracterizada en neutrófilos. Asociado con la extrusión de una malla de fibras que contienen cromatina e histonas unidas a proteínas granulares y citoplásmicas conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos.
- Muerte celular no entótica: modalidad de muerte dependiente de estrés oxidativo, restringida a células de origen hematopoyético y asociada con un exceso de neutrófilos extracelulares.

- Muerte celular dependiente de lisosomas (LDCD): iniciada por perturbaciones de la homeostasis intracelular y limitada por la permeabilización de las membranas lisosomales. Es relevante en afecciones fisiopatológicas como la inflamación, la remodelación tisular, el envejecimiento, la neurodegeneración, los trastornos cardiovasculares y la respuesta a patógenos intracelulares.
- Autofagia: es un proceso catabólico en el cual el citoplasma incluyendo todos los orgánulos son secuestrados en vesículas de doble membrana y liberados dentro del lisosoma/vacuola para su descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes.
- Muerte celular inmunogénica (ICD): activada como una respuesta inmune adaptativa específica a antígenos endógenos (celulares) o exógenos (virales).



**Figura 7. Tipos de muerte celular.** El microambiente puede activar muchas cascadas de transducción de señales que finalmente llevan a la muerte celular. Cada célula regula su muerte celular (RCD), por procesos que son iniciados y propagados por mecanismos que exhiben un considerable grado de interconectividad. Adaptado de Galluzzi et al.2018

### **3.1. APOPTOSIS.**

La apoptosis, es una forma de muerte celular programada que puede ser desencadenada por diferentes situaciones (Rossi et al., 2003; Igney et al., 2002; Sjöström et al., 2006; Tracker et al., 2014).

La apoptosis, es un proceso fisiológico cuyo objetivo es mantener el desarrollo normal de los organismos multicelulares. Las anomalías en el control de la muerte celular pueden contribuir a una variedad de enfermedades como el cáncer, la autoinmunidad o los trastornos degenerativos (Favaloro et al., 2012). La señalización inductora de apoptosis se produce a través de múltiples vías independientes y se puede iniciar a partir de eventos desencadenantes desde dentro o desde fuera de la célula (Elmore et al., 2007). Todas estas vías de señalización convergen en una maquinaria común que es activada por una familia de cisteín proteasas denominadas *caspasas (cysteine aspartic proteases)* (Strasser et al., 2000).

La célula que muere por apoptosis experimenta una secuencia de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que son característicos y con frecuencia únicos y específicos de las células apoptóticas. Sirven como marcadores para identificar este tipo de muerte celular y para cuantificar la extensión de la apoptosis en cultivos o en tejidos (Darzynkiewicz et al., 1998).

La apoptosis se lleva a cabo principalmente por dos vías que hemos comentado anteriormente y se muestran en la figura 8:

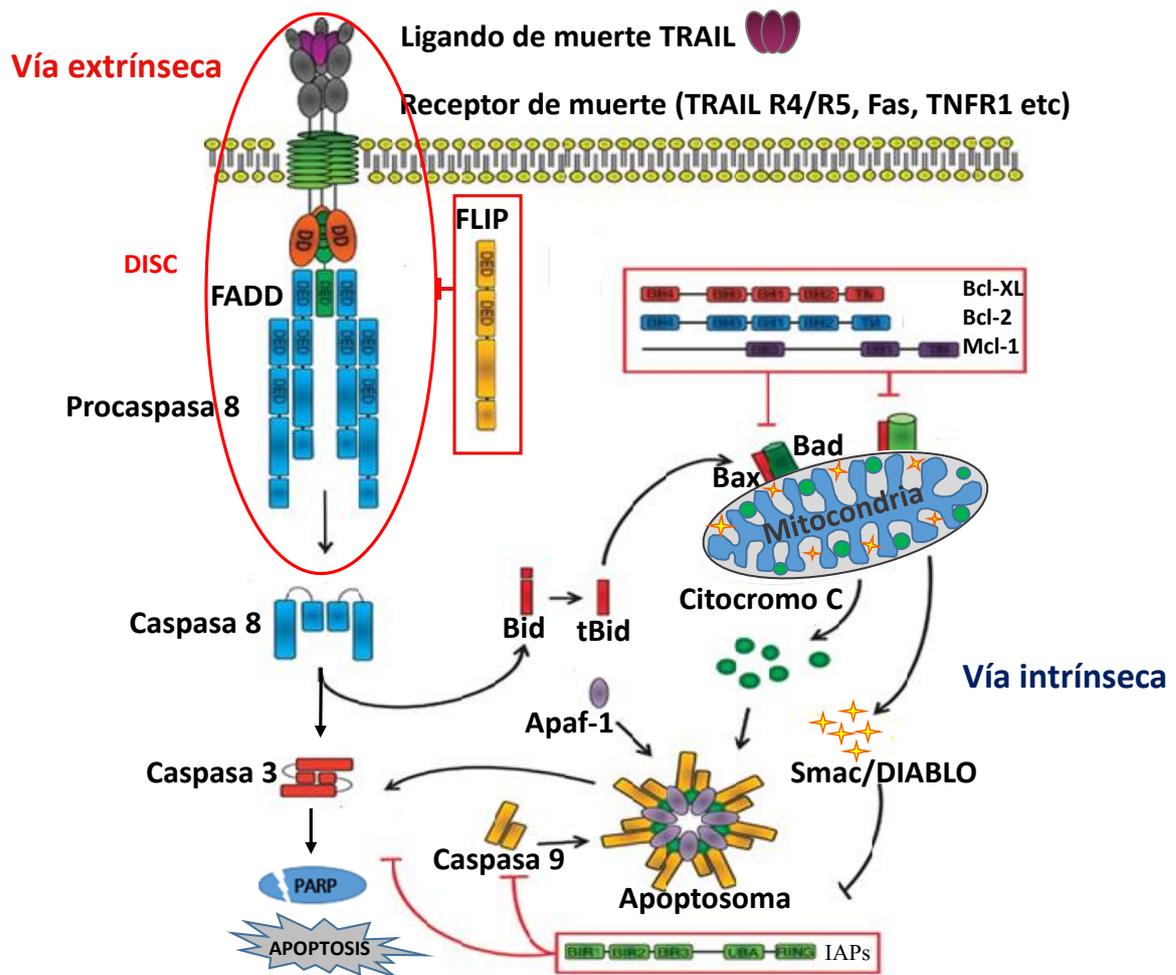


Figura 8. Apoptosis por vía intrínseca y vía extrínseca. Adaptada de Lemke et al., 2014

- 1) Vía intrínseca o apoptosis mediada por la mitocondria y
- 2) Vía extrínseca o apoptosis mediada por receptores de muerte expresados en la superficie celular

La vía común para la ejecución de la apoptosis involucra la activación de los miembros de la familia de proteasas conocidas como caspasas. Existen dos tipos de caspasas: las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, y 10) que son activadas en respuesta a señales de estrés o daño celular. Estas caspasas proteolizan y activan a las caspasas efectoras o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7), que serán las responsables de la proteólisis directa de diferentes sustratos que darán lugar a la muerte de la célula

(Rowan et al., 1997; Van Loo et al., 2002; Galluzzi et al., 2012). Uno de estos sustratos es PARP (Poly (ADP-Ribose) polymerase)(Thornberry et al., 1998).

### **3.2. VÍA INTRÍNSECA DE APOPTOSIS MEDIADA POR LA MITOCONDRIA**

La apoptosis intrínseca es un proceso activo que se inicia frente a un estímulo intracelular llevando a una muerte programada que parte desde la mitocondria (Rowan et al., 1997). De hecho, el primer proceso bioquímico involucrado en esta muerte es la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Para ello las proteínas de la familia Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*) son responsables de regular esta apoptosis mediante el control de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa que resulta en la liberación de agentes apoptogénicos al citoplasma. Estas proteínas presentan un dominio conservado en común Bcl-2 *homology domains* (BH1-BH4)(Adams et al., 2001) y son:

- Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Proteínas antiapoptóticas que contienen los 4 dominios, (excepto Mcl-1 que no tiene el dominio BH4).
- Bak y Bax. Proteínas proapoptóticas con dominios BH1-BH3. En este grupo se encuentran las proteínas efectoras. La activación de la vía intrínseca lleva a su activación conformacional, oligomerización y traslocación de Bax en la mitocondria para formar poros en su membrana y permitir el tránsito de factores apoptogénicos al citoplasma.
- Bim, Bad y Bid. Proteínas proapoptóticas que solo tienen el dominio BH3, esencial para su actividad apoptótica (Van Delft et al., 2006; Sarvothaman et al., 2015).

La permeabilización de la membrana mitocondrial resulta en la translocación al citosol de una serie de factores mitocondriales, entre ellos:

- ✓ Citocromo C. Participa en la cadena del transporte de electrones y se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria (Strasser et al., 2000). Cuando es liberado al citoplasma se une a la proteína Apaf-1 y a la procaspasa-9, originando el complejo denominado apoptosoma, que induce la activación de la caspasa-9 (MO et al., 2001) y finalmente de las caspasas efectoras (Figura 8).
- ✓ Smac/Diablo se une por su extremo N-terminal a la mitocondria y en el espacio intermembranal se separa, dejando libre el dominio que permite su unión con los inhibidores de las proteínas de apoptosis IAPs (Madeo et al., 2009). Cuando se produce una pérdida del potencial de membrana se libera en paralelo al citocromo C y se une a las IAPs en el citoplasma, bloqueando su función y potenciando la activación de las caspasas (Sun et al., 2002).
- ✓ Endonucleasa-G es una proteína esencial para la replicación del ADN mitocondrial. Una vez liberada al citoplasma se traslada al núcleo donde fragmenta el ADN e induce la formación cuerpos apoptóticos constituidos por fragmentos de núcleo recubiertos de membrana que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Strasser et al., 2000; Darzynkiewicz et al., 1998; MO., et al., 2001; Ormerod et al., 1993).

### **3.3. VÍA EXTRÍNSECA DE APOPTOSIS MEDIADA POR RECEPTORES DE MUERTE**

La vía extrínseca de apoptosis, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a sus receptores celulares (Figura 8). Estos ligandos pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral tipo alfa (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  o TNF- $\alpha$ ) y al unirse a los receptores de muerte, inducen su trimerización. Estos trímeros, a través de sus dominios de muerte (*death domains*, DD), reclutan a moléculas adaptadoras como FADD, y a la pro-caspasa 8 (Ormerod et al., 1993; Thornberry et al., 1998; Ashkenazi

et al., 1998). El conjunto de los receptores de muerte junto a FADD y la pro-caspasa 8 constituyen el complejo funcional activo o DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (Pennarun et al., 2010).

En función de las señales implicadas en la inducción de apoptosis tras la activación de los receptores de muerte, las células se pueden clasificar en células tipo I si no requieren de la vía mitocondrial para la muerte celular, o en células tipo II si requieren la co-activación de la vía intrínseca para la muerte efectiva (Scaffidi et al., 1999). En estas últimas, tras la formación del DISC y la caspasa 8 activa procesa el extremo carboxi-terminal de Bid, generándose Bid truncado (tBid) que inhibe la actividad de Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, mientras su unión con las proteínas proapoptóticas Bad y Bax genera poros mitocondriales que alteran el equilibrio de iones de la matriz mitocondrial produciéndose la pérdida del potencial de membrana (Sarvothaman et al., 2015). Estos fenómenos terminan permeabilizando la membrana mitocondrial que libera al citosol citocromo C y Smac/Diablo (Sun et al., 2002; Madeo et al., 2009).

Los receptores de muerte mejor estudiados son (Grell et al., 1999):

- ❖ Fas/APO-1 o CD95, es una proteína altamente expresada en linfocitos T y células NK activadas (Ashkenazi et al., 1998).
- ❖ TNF-Rs (*Tumor Necrosis Factor Receptors*). El receptor prototipo de esta familia es TNFR1, que se activa por la unión de TNF $\alpha$ . Sólo se expresa en macrófagos activados y en linfocitos en respuesta a infecciones. El TNFR1 se une a una molécula adaptadora TRADD que induce la asociación de FADD y la activación de la pro-caspasa 8 (Ashkenazi et al., 1998).
- ❖ TRAIL-R (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptors*). Este sistema de receptores parece tener predilección por inducir muerte en las células tumorales (Ashkenazi et al., 1998). De hecho las células normales expresan el

ligando TRAIL, pero son resistentes a la muerte celular inducida por el mismo. En cambio, las células tumorales son sensibles a esta proteína (Ashkenazi et al., 1998). Se han descrito cinco tipos de receptores de TRAIL (Figura 9). Contienen una fracción homotrimérica, un dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular. Son los receptores TRAIL-R1 o DR4 (TNFRSF10A *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A*), TRAIL-R2 o DR5 (TNFRSF10B *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B*), TRAIL-R3 o DcR1, TRAIL-R4 o DcR2 y un receptor soluble denominado osteoprotegerina (OPG); DcR1, DcR2 y OPG carecen de los dominios citoplasmáticos de muerte y por lo tanto, son incapaces de inducir señalización, antagonizando la acción proapoptótica de TRAIL (Ho et al., 2015). Únicamente DR4 y DR5 presentan esta estructura completa y son capaces de inducir la manera eficiente la señal de muerte.

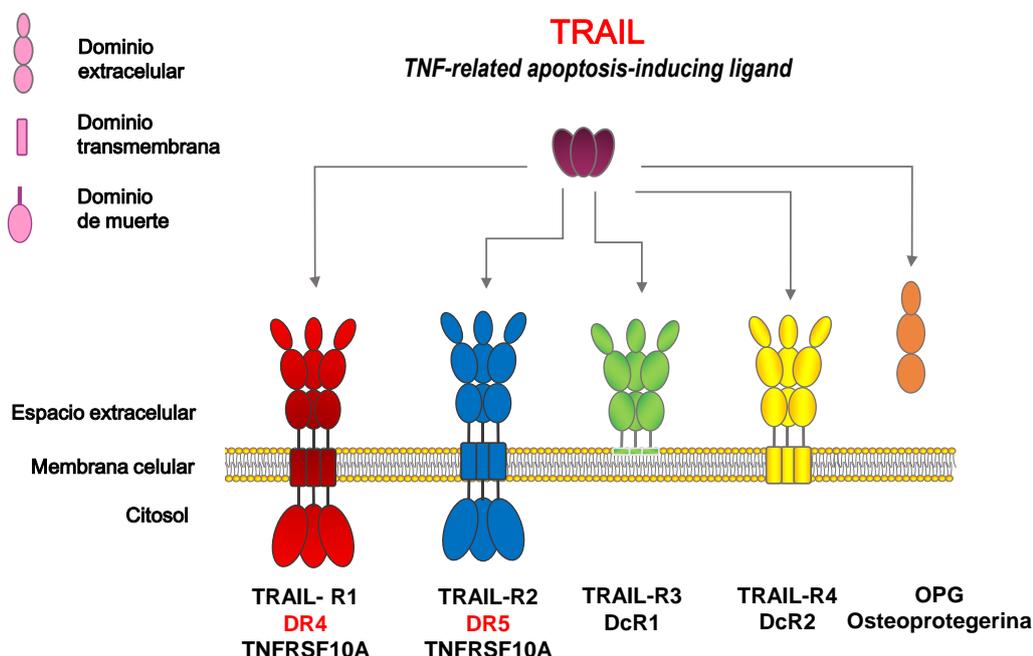


Figura 9. Receptores celulares de TRAIL. Esquema de los receptores TRAIL-R1 o DR4, TRAIL-R2 o DR5, TRAIL-R3 o DcR1, TRAIL-R4 o DcR2 y osteoprotegerina (OPG). Adaptada de Kimberley et al., 2004.

Apo2 (Apo2/TRAIL) es el ligando de inducción de apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$ , capaz de estimular la acción de estos últimos receptores.

Estudios previos han demostrado que induce selectivamente la apoptosis en células tumorales de pacientes con MM siendo inactivo sobre células no malignas (Chen et al., 2003)

Estudios previos realizados tanto en nuestro laboratorio como de otros grupos han demostrado que algunas líneas celulares procedentes de mieloma son muy sensibles al tratamiento con el factor inductor de muerte TRAIL (Mitsiades et al., 2001; Menoret et al., 2006; Borges et al., 2007). De hecho la eficacia de TRAIL o alguna forma modificada de esta molécula (CDT) está en estos momentos siendo evaluada en ensayos clínicos en el contexto de mieloma, tanto en monoterapia como en combinación con otras terapias ya utilizadas en la clínica (dexametasona y/o talidomida) con resultados prometedores (Leng et al., 2017). El desarrollo de agonistas o variantes multiméricas optimizadas de TRAIL están en desarrollo como estrategia terapéutica dirigidas contra esta vía (revisado por Von Karstedt et al., 2017).

## *Objetivos*



1. Determinar el perfil de expresión de miRNAs inducido por bortezomib y panobinostat y su efecto sobre rutas biológicas en líneas celulares de mieloma múltiple
2. Identificar mecanismos de resistencia a TRAIL en mieloma múltiple.



## *Material y métodos*



## **1. REACTIVOS**

Los medios de cultivo, el suero bovino fetal (FBS), la tripsina, la penicilina y la estreptomycin fueron comprados a GIBCO BRL. La proteína-A Sefarosa, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la puromicina se compraron a Sigma-Aldrich. Las membranas de transferencia Immobilon®-P (PVDF), se adquirieron a Millipore, el isotón a Beckman, el 2-isopropanol a Honeywell, el ácido clorhídrico a Merck, el jetPEI a Polyplus-transfection, el yoduro de propidio (PI) y la Annexina V-FITC a BD Biosciences, la resina Talon a Clontech y reactivo de tinción BlueSafe a NZYTECH. Otros reactivos necesarios fueron comprados a Millipore Corp., Sigma-Aldrich, Roche Biochemicals o Merck.

## **2. ANTICUERPOS**

Los anticuerpos utilizados en este trabajo están listados en las tabla 1 y 2, con sus respectivas casas comerciales.

Además de los anticuerpos comerciales descritos, hemos utilizado otros previamente generados en el laboratorio (Díaz-Rodríguez et al., 2016).

**Tabla 1. Anticuerpos primarios comerciales.**

Antígeno	Especie	Peso (KDa)	Dilución para WB	Casa comercial
FLIP	Conejo (policlonal)	50	2:5.000	Cell Signaling Technologies
Caspasa 8	Ratón (monoclonal)	18; 43; 57	1:2.000	Cell Signaling Technologies
Caspasa 3	Ratón (monoclonal)	32	1:10.000	BD Biosciences
Caspasa 3 procesada	Ratón (monoclonal)	17; 19	1:1.000	Cell Signaling Technologies
Caspasa 9	Conejo (policlonal)	17; 35; 37; 47	1:1.000	Cell Signaling Technologies
Caspasa 7	Conejo (policlonal)	20; 35	1:1.000	Cell Signaling Technologies
FADD	Conejo (policlonal)	28; 72	1:5.000	Millipore
GAPDH	Ratón (monoclonal)	37	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, INC
PARP	Ratón (monoclonal)	90; 115	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, INC
Calnexina	Conejo (policlonal)	90	1:3.000	Stressgen Bioreagents Corp
FADD	Ratón (monoclonal)	28; 37	1:5.000	Millipore
XIAPs	Ratón (monoclonal)	57	1:1.000	BD Biosciences
Bid	Ratón (monoclonal)	15	1:1.000	Cell Signaling Technologies
Mcl-1	Ratón (policlonal)	31; 43	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology, INC
Bcl-2	Ratón (monoclonal)	26	1:2.000	Cell Signaling Technologies
BAX	Ratón (monoclonal)	21	1:1.000	BD Biosciences

**Tabla 2. Anticuerpos secundarios.**

Antígeno	Molécula conjugada	Casa comercial
Ig de conejo (H+L)	HRP	Bio Rad Laboratories
Ig de Conejo(L)	HRP	Jackson Inmuno-Research Laboratories
Ig de Ratón(H+L)	HRP	Bio Rad Laboratories
Ig de Ratón(L)	HRP	GE Healthcare Life Sciences

H: cadena pesada de la Ig, L: cadena ligera de la Ig y HRP: Horseradish peroxidase

### 3. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1. CONDICIONES DE CULTIVO

Las células se cultivaron de acuerdo con sus necesidades (Tabla 3) en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) conteniendo L-glutamina, y suplementado con FBS al 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda y en presencia de 5% CO<sub>2</sub>, en condiciones de esterilidad.

Las líneas celulares NCI-H929, MM1S, U266, OPM2 y HEK-293T fueron adquiridas a la ATCC (*American Type Culture Collection*), y las RPMI-8226 a DMSZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). Las células se revisaron de forma rutinaria para comprobar la ausencia de micoplasma con el kit *MycoAlert Lonza GmbH*. Sólo células libres de micoplasma fueron utilizadas en los experimentos.

**Tabla 3. Líneas celulares humanas y sus características citogenéticas**

Línea celular	Origen	Características	Medio de cultivo
NCI-H929	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cariotipo hipodiploide</li> <li>• t( 4;14)</li> </ul>	RPMI+10%FBS
MM1S	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t( 14;16)</li> </ul>	RPMI+10%FBS
RPMI8226	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganancia 14q</li> <li>• t( 14;16)</li> </ul>	RPMI+10%FBS
U266	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t( 11;14)</li> <li>• del 17p</li> </ul>	RPMI+10%FBS
OPM2	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deleción de PTEN</li> <li>• t( 4;14)</li> <li>• del 17p</li> </ul>	RPMI+10%FBS
OPM2-TRAIL	Mieloma múltiple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deleción de PTEN</li> <li>• t( 4;14)</li> <li>• del 17p</li> </ul>	RPMI+10%FBS
HEK-293T	Células embrionarias de riñón humano	-	DMEM+10%FBS

Para subcultivar las células, se partió de éstas en crecimiento exponencial. Para la expansión y cambio de medio de las líneas de origen hematológico, que crecen en suspensión, se recogieron las células en tubos estériles, se centrifugaron a 1.200 rpm

durante 3 minutos y se eliminó el medio. Al sedimento se le agregó medio fresco y se colocaron en el número de placas necesarias.

Para subcultivar las células 293T, que crecen adheridas a la placa, se tripsinizaron y diluyeron en el medio correspondiente detallado en la tabla 3.

### **3.2. PRESERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES**

Para conservar las líneas celulares durante largos periodos de tiempo las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos, se descartó el medio y el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de medio de congelación que incluye DMSO al 10%, utilizado como agente crioprotector. Los crioviales se mantuvieron 24 horas a -80°C y, posteriormente, se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido donde se almacenaron durante largos periodos de tiempo.

### **2.3 CONTAJE DEL NÚMERO DE CÉLULAS**

Para llevar a cabo el conteo celular directo, se utilizó el contador de partículas Z1™ Coulter Particle Counter® (Beckman Coulter™ Life Sciences). Para ello se diluyeron las células a contar en isotón y se procedió a su conteo directo en el contador. El número de células final se calculó multiplicando las células que se obtienen en el contador por la dilución final utilizada.

## **4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA**

Para obtener la fracción proteica total se utilizó tampón de lisis (NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, Tris 20 mM, pH 8,0) al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 µg/ml aprotinina; 1 µg/ml leupeptina; 1 µM pepstatina; 1 mM PMSF; 1 mM ortovanadato sódico; 25 µM β-glicerofosfato; 10 mM fluoruro sódico).

Procedimiento:

- a. Las células fueron lavadas dos veces con PBS, manteniendo el proceso en frío. A los precipitados celulares se les agregó tampón de lisis frío. Se resuspendieron y se incubaron durante 10 minutos en hielo.
- b. Después de la incubación los extractos celulares se centrifugaron a 4°C y 12.000 rpm durante 10 minutos.
- c. El sobrenadante que contiene las proteínas se recogió en tubos nuevos y se conservó a -20°C o se utilizó para procedimientos posteriores.

#### **4.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para cuantificar la proteína presente en los extractos se utilizó el método BCA™ y el kit comercial *Pierce™ Protein Assay* (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procedimiento:

- a. En una placa de 96 pocillos se colocan 20 µl de agua, 5 µl de muestra y 200 µl de la mezcla de los reactivos del kit como indica el fabricante. Cada muestra se cuantificó como mínimo por duplicado.
- b. Se incubó durante 30 minutos a 37°C.
- c. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en el espectrofotómetro. Previamente se hace una recta patrón con la que se compara el valor y se extrapola la cantidad de proteína.

#### **4.2. INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)**

La técnica de inmunoprecipitación, se utiliza para enriquecer la muestra en una proteína de interés, utilizando anticuerpos específicos contra ella que son precipitados con proteína A unida a un soporte físico, en este caso sefarosa.

Procedimiento:

- a. A la cantidad de proteína requerida (en general 1 ó 2 mg) se agregó el anticuerpo específico que reconoce la proteína que se quiere enriquecer (generalmente 1  $\mu$ g de anticuerpo) y 50  $\mu$ l de proteína A-sefarosa o GammaBind, en función del tipo y origen del anticuerpo utilizado, para generar los inmunocomplejos.
- b. Se incubó la mezcla en agitación a 4°C durante al menos 2 horas.
- c. Los inmunocomplejos fueron lavados tres veces con 1 ml de tampón de lisis frío, mezclándose finalmente con 25  $\mu$ l de tampón de carga 2X (+) (SDS 4%, azul de bromofenol 0,05%, glicerina 20% y  $\beta$ -mercaptoetanol 2% en Tris-HCl 100 mM, pH 6,8).

## **5 ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT**

La separación de las proteínas presentes en las muestras se realizó por electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) que permite separar las proteínas de una muestra en función a su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Procedimiento:

- a. Se mezcló la muestra con el tampón de carga y se incubaron a 100°C durante 10 minutos con el objetivo de completar la desnaturalización de las proteínas.
- b. Se prepararon geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de distinto porcentaje de acuerdo al peso molecular de las proteínas a analizar. Normalmente oscilaba entre el 6 y 15 % de poliacrilamida.

- c. La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®3 (BioRad) o en cubetas grandes de tipo Sturdier.
- d. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular en tampón de electroforesis (Tris-HCl 20 mM, glicina 192 mM, y 1% de SDS), a un voltaje constante de 120 V, en el caso de los geles pequeños, o 200 V para geles grandes.
- e. Una vez finalizada la separación de las proteínas, los geles se transfirieron a membranas de PVDF. Para ello se utilizó el sistema Trans-Blot de BioRad (transferencia húmeda) en tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, glicina 192 mM) a 500 mA constantes durante un intervalo de tiempo variable en función del porcentaje de acrilamida del gel utilizado o 14 horas a 20 V de voltaje constante.
- f. Las membranas se bloquearon en agitación durante al menos una hora en tampón de bloqueo TBS-T (NaCl 140 mM, 0,05% Tween, Tris 10 mM pH 7,5) suplementado con 1% de BSA y 0,05% de azida sódica o 5% de leche desnatada en polvo.
- g. A continuación se incubaron en agitación con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en el mismo tampón de bloqueo o TBS-T. El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de al menos dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.
- h. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, durante 7 minutos cada vez, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP. Se lavaron nuevamente 3 veces durante 7 minutos.

- i. Las proteínas se visualizaron por autoradiografía usando un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y potenciado con iodofenol (Ausubel and Gitler, 1987; Cabrera et al., 1996). Para ello, las membranas se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (luminol 0,08%, *p*-iodofenol 0,02%, Tris-HCl 0,1 M, pH 9,3) al que se le añadió en el momento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,44 μM.

## **6 PRODUCCIÓN Y PURIFICACION DE PROTEÍNAS: TRAIL RECOMBINANTE**

Para producir TRAIL recombinante (rTRAIL), se utilizó el plásmido pET-28b que contiene el gen de TRAIL (aminoácidos 95-281). Este plásmido fue cedido por el Dr. Abelardo López-Rivas. Este vector es inducible con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y está diseñado para expresar una proteína de fusión de TRAIL con glutatión-S-transferasa (GST) en el amino terminal.

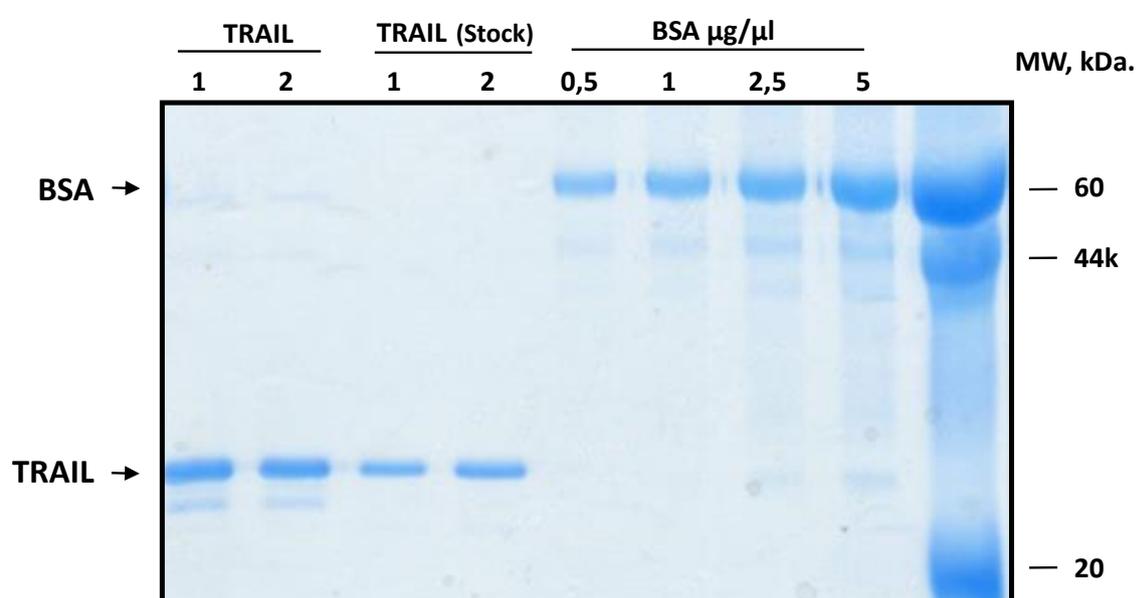
Procedimiento:

- a. Para la transformación del vector conteniendo TRAIL recombinante se utilizaron 50 μl de bacterias competentes BL21(DE3) que se dejaron descongelar en hielo durante 20 minutos. A ellas se añadió 1 μl del plásmido pET-28b. Tras ello se sometieron a choque térmico durante 2 minutos a 37<sup>0</sup>C y 2 minutos en hielo. Al contenido se le añadieron 400 μl de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se dejó en incubación a 37<sup>0</sup>C durante 1 hora.
- b. Transcurrida la incubación el inóculo se cultivó hasta la mañana siguiente en placas Petri conteniendo medio LB suplementado con agar y con kanamicina (30 μg/ml), dado que este plásmido contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

- c. Al día siguiente, se inocularon 200 ml del medio de cultivo LB conteniendo kanamicina, con una colonia del cultivo y se dejó crecer hasta que llegó a una DO (600 nm)= 0,8 -1.
- d. Para inducir la expresión de rTRAIL, las células se trataron con IPTG 0,2 mM durante 2 horas. Tras ello, se centrifugaron los cultivos bacterianos a 4 °C y 5.000 g durante 10 minutos y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM).
- e. Para la purificación de TRAIL recombinante, se resuspendió el pellet celular en tampón de lisis (fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 300 mM a pH 7,5) conteniendo 1 mg/ml lisozima y 1 mM fenilmetilsulfonil de fluoruro (PMSF) y se incubó en hielo durante 30 minutos.
- f. Las bacterias se rompieron por sonicación en hielo con ciclos de 15 segundos y 30 segundos apagado, durante un tiempo total encendido de 90 segundos. Posteriormente se incubaron en hielo durante 5 minutos y se repitió el ciclo de sonicación 2 veces, tras lo que se centrifugaron a 4°C y 10.000 g durante 30 minutos.
- g. Se preparó una columna conteniendo 1 ml de la resina TALON (Clontech) previamente equilibrada de acuerdo al protocolo del fabricante. A esta columna se agregó el sobrenadante obtenido en el paso anterior. Se incubó durante 2 horas a 4°C y en agitación.
- h. Se retiró el sobrenadante no acoplado a la columna, y esta se lavó con tampón de lavado (fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 300 mM e imidazol 10 mM a pH 7,5) abundantemente, eliminando el sobrenadante. Se

comprobó que estaba bien lavado leyendo la DO a 280 nm y demostrando que era menor a 0,05.

- i. Se procedió entonces a la elución del rTRAIL. Para ello sobre la columna previamente lavada se agregó 1 ml del tampón de elución (fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 300 mM, 150 mM de imidazol a pH 7,5). Se agitó 2 minutos y se colectó el eludido conteniendo la proteína purificada.
- j. Para comprobar la presencia de rTRAIL, se utilizaron geles de SDS-PAGE y tinción con BlueSafe (NZYTECH). Con este fin se preparó un gel de poliacrilamida del 12% y se cargaron las muestras a cuantificar así como un estándar de BSA (albumina de suero bovino) para determinar la concentración de TRAIL en nuestras muestras.
- k. Terminada la electroforesis se procedió a la tinción con 10 ml de la tinción BlueSafe, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente (Figura 10).



**Figura 10. Cuantificación de la proteína rTRAIL purificada.** Después de la purificación de rTRAIL se cuantificó en geles de SDS-PAGE y tinción con BlueSafe. Uno o dos  $\mu\text{l}$  de rTRAIL purificado (1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> carril) se compararon con uno o dos  $\mu\text{g}$  de rTRAIL obtenido en una purificación previa (TRAIL Stock). Además se incluyeron cantidades crecientes conocidas de BSA (carriles de la derecha).

## 7 TRANSFECCIÓN Y PRODUCCION RETROVIRAL Y LENTIVIRAL

Con el fin de manipular los niveles celulares de proteínas de interés (aumento o disminución) se llevaron a cabo infecciones virales. Se utilizaron sistemas retrovirales para incrementar los niveles (sobrexpresión) y basados en los vectores pLZR (DR4 o DR5) o p-Babe (FLIP). Para disminuir los niveles de proteína (silenciamiento) se utilizaron sistemas lentivirales basados en el pLKO para su disminución con pequeñas horquillas de RNA (*shRNA*). Un resumen de los distintos plásmidos utilizados se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4 Plásmidos necesarios para las transfecciones virales de acuerdo a su condición**

Transfección viral						
	FLIP		DR4		DR5	
Cantidad (µg)	Rtv	Lnv	Rtv	Lnv	Rtv	Lnv
pMDG-VSV-G	2,5	4	2,5	4	2,5	4
Gag/pol	5	-	5	-	5	-
pMDLg/RRE	-	4	-	4	-	4
pRSV-Rev	-	4	-	4	-	4
pLKO-GFP	-	8	-	8	-	8
p-Babe-puro	3	-	-	-	-	-
pLZR-GFP-IRES	-	-	3	-	3	-
p-Babe-FLIP	3	8	-	-	-	-
<i>sh</i> -FLIP	-	8	-	-	-	-
DR4	-	-	3	-	-	-
DR5-L	-	-	-	-	3	-
DR5-S	-	-	-	-	3	-
<i>sh</i> -08	-	-	-	4	-	-
<i>sh</i> -11	-	-	-	4	-	-
<i>sh</i> -05	-	-	-	-	-	4
<i>sh</i> -06	-	-	-	-	-	4
Selección	Puro	Puro	SC	Puro	SC	Puro

Rtv: retroviral, Lnv: lentiviral. Puro: puromicina, SC: Cell Sorting

### 7.1. TRANSFECCIÓN CON PLÁSMIDOS

Procedimiento:

- Los experimentos de transfección se realizaron usando el reactivo jetPEI, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se mezclaron 10 µg del plásmido de interés con 500 µl de NaCl 150 mM y 50 µl de jetPEI con 500 µl de NaCl.

A continuación, se transfirió la dilución de jetPEI al DNA y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- b. Finalmente se adicionó, gota a gota, sobre el medio de cultivo de una placa de 100 mm con las células diana (HEK-293T) que habían sido plaqueadas el día anterior ( $2.5 \times 10^6$  células por placa).

## **7.2. INFECCIÓN CON LENTIVÍRUS**

Los experimentos de silenciamiento génico se llevaron a cabo mediante transducción celular con lentivirus, utilizando secuencias de *shRNA* (*short hairpin RNA*) clonadas en el vector pLKO.1.

Procedimiento:

- a. Para producir los virus se transfectaron las células HEK293T como hemos descrito, y con los siguientes plásmidos:
  - ✓ Vector lentiviral (8  $\mu$ g): pLKO.1-puro (vector vacío con sh no codificante, control negativo) o pLKO.1-shRNA (con los sh de las proteínas de interés)
  - ✓ pMDG-VSV-G (2,5  $\mu$ g). Contiene el cDNA de la envuelta del virus.
  - ✓ pRSV-Rev (4  $\mu$ g). Contiene el cDNA de Rev (proteína que permite la exportación del núcleo al citoplasma de fragmentos del mRNA que contienen el elemento RRE).
  - ✓ pMDL-RRE (4  $\mu$ g). Contiene el cDNA de gag (codifica para proteínas estructurales principales del virión), pol (codifica una DNA polimerasa específica de retrovirus) y RRE (sitio de unión para la proteína Rev).
- b. Transcurridas 24 horas de la transfección, se reemplazó el medio de las células HEK293T por medio fresco. 24 horas después se recogió el medio con los virus, se filtró con filtros de PVDF de 0,45  $\mu$ m (Millipore) y se le

añadió polibreno a una concentración final 6 µg/ml. Este medio se utilizó para transducir las células diana.

- c. Pasadas 6 horas de incubación con los virus, se sustituyó el medio por medio fresco. 48 horas después se seleccionaron las células infectadas con puromicina (3 µg/ml).

### 7.3. INFECCIÓN CON RETROVÍRUS

Los experimentos de sobreexpresión se llevaron a cabo mediante transducción celular con retrovirus basados en los vectores pLZR (DR4 o DR5) o p-Babe (FLIP).

Procedimiento:

- a. Para producir los virus se transfectaron las células HEK293T como hemos descrito, y con los siguientes plásmidos:
  - ✓ Vector retroviral (3 µg): pLZR-IRES-GFP (vector vacío), pLZR-DR4, pLZR-DR5-L, pLZR-DR5-S, o pBabe (vector vacío) o pBabe-FLIP.
  - ✓ pMDG-VSV-G (2,5 µg). Contiene el cDNA de la envuelta del virus.
  - ✓ pNGVL-MLV-gag-pol (5 µg). Contiene el cDNA de gag (codifica para proteínas estructurales principales del virión) y pol (codifica una DNA polimerasa específica de retrovirus)
- b. De manera análoga a la descrita para los lentivirus se infectaron las células diana.
- c. Para la selección de clones con sobreexpresión de los receptores DR4 y DR5 los plásmidos expresan también la proteína GFP, por lo cual la selección celular se hizo por citometría de flujo con el citómetro FACSAria (BD).
- e. Para seleccionar las células sobreexpresoras de FLIP, se utilizó el antibiótico puromicina (3 µg/ml).

## **8. ENSAYOS DE MUERTE CELULAR**

### **8.1. ENSAYO DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Para analizar la muerte celular en ensayos de citometría de flujo, se utilizó la doble tinción celular con los fluorocromos anexina V-FITC e ioduro de propidio (PI). La anexina V-FITC, es una proteína de unión a fosfolípidos dependientes de  $Ca^{2+}$  que se une con gran afinidad con las fosfatidilserinas que se generan por la hidrofobicidad de la membrana cuando la célula muere por apoptosis. Cuando el proceso de apoptosis está avanzado, la membrana celular se permeabiliza y deja pasar al ioduro de propidio, que marca el DNA nuclear indicando la apoptosis tardía, que se ve como doble tinción (Anexina V+/PI+) (Chen et al., 2014). Finalmente en los últimos estadios, las células pierden la tinción anexina, por lo que son anexinaV-/PI+.

Procedimiento:

- a. Una vez sometidas al tratamiento deseado, se recogieron 250.000 células y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos. Se lavaron dos veces con PBS.
- b. Se lavaron entonces con tampón de unión (Hepes 0,01 M, NaCl 0,14 mM y  $CaCl_2$  2,5 mM), tras lo que se resuspendieron en 50  $\mu$ l de tampón de unión, al que se añadieron 5  $\mu$ l de anexina V-FITC y 5  $\mu$ l de PI (50  $\mu$ g/ml). Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se agregaron 200  $\mu$ l del tampón de unión para adquirir por citometría.
- c. Las muestras se analizaron en un citómetro BD Accuri™ C6 con el software (C6 Versión 1.0.264.21).
- d. Para el análisis de apoptosis de miRNAs, la apoptosis se analizó de manera similar, aunque en este caso se utilizó el kit comercial DY634 de INMUNOSTEP, siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso las

células fueron adquiridas en el citómetro FACSCalibur (Becton, Dickinson) y se analizaron con el programa informático CellQuest.

## **8.2. ENSAYOS FLUORIMÉTRICOS DE ACTIVIDAD CASPASA**

Otra forma de analizar la muerte celular es mediante ensayos de actividad caspasa, usando técnicas fluorimétricas.

Procedimiento:

- a. Las células fueron tratadas, lisadas y las proteínas se extrajeron como hemos descrito. 50 µg de la proteína se llevaron a un volumen final de 100 µl con tampón de caspasa 1X (25 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % CHAPS, 10% sucrosa, 10 mM DTT). Se plaquearon al menos por triplicado en placas de 96 pocillos.
- b. Se añadieron 100 µl de tampón caspasa 2X (50 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 0,2 % CHAPS, 20% sucrosa, 2 mM EDTA, 20 mM DTT) al que se añadió el sustrato de caspasa 3 Ac-IETD-AFC (10 µM).
- c. Se incubó durante 1 hora a 37°C en oscuridad y se procedió a la lectura de la placa a una longitud de onda de 400/505 nm en un equipo lector de fluorescencia BioTek3 utilizando el software Gen5 versión 1.05.11.

## **9. PROLIFERACION CELULAR: METABOLIZACION DEL MTT**

Para estudiar la proliferación celular se utilizó el método indirecto basado en la metabolización del MTT (Mosmann, 1983). El ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias para reducir el compuesto MTT, de color amarillo y soluble en agua, dando lugar a un compuesto morado que precipita en forma de cristales insolubles en agua (formazán). La medición de la absorbancia permite estimar la tasa de proliferación de las células de forma indirecta.

Procedimiento:

- a. Se contaron las células de interés, que fueron sembradas en placas de 48 pocillos. En estudios previos habíamos determinado la cantidad idónea de células a plaquear y para nuestros estudios se utilizaron 15.000 células por pocillo. Se sembraron 3 pocillos por cada condición.
- b. Para medir la capacidad reductora de las mitocondrias se adicionaron 22  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) sobre las células. Se incubó durante 2 horas a 37°C.
- c. Se añadieron 200  $\mu$ l por pocillo de la solución isopropanol:HCl (HCl 0,04 M en isopropanol 20%) para lisar las células y disolver los cristales de formazán.
- d. Se homogenizó completamente la solución antes de medir la absorbancia en un lector de placas (TECAN, Mannedorf), utilizando el programa XFLUOR4 versión V4.5 a una  $\lambda$ = 570 nm y  $\lambda$ =630 nm, que fue utilizado como referencia.

## **10. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA**

La extracción del RNA total se llevó a cabo mediante el kit miRNeasy Mini Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad e integridad del RNA fue valorada mediante electroforesis de alta resolución en un bioanalizador Agilent 2100.

Procedimiento:

- a. Las células a analizar ( $3 \times 10^6$ ) se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos y se lavaron dos veces con PBS.
- b. El pellet celular se resuspendió con 350  $\mu$ l de tampón RLT (tampón de lisis del kit), para su posterior lisis mecánica con ayuda de una jeringuilla.

- c. Se añadieron 350 µl de etanol 70% y el volumen total fue pasado a través de las columnas del kit, por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 segundos. El sobrenadante fue descartado.
- d. La columna se lavó con 700 µl de solución RW1 y se dejó en reposo durante 5 minutos, tras lo que se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 segundos y se desechó el sobrenadante.
- e. A continuación se lavaron las columnas 2 veces con 500 µl de RPE, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 segundos y se descartó el sobrenadante, tras el 2<sup>do</sup> lavado se volvió a centrifugar de manera adicional 1 minuto más.
- f. La elución final se hizo en un tubo colector nuevo con 20 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto.
- g. El RNA extraído se mantuvo en hielo y se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 versión 3.8.1 de *Thermo Scientific*.

La concentración de RNA fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza mediante la razón A260/A280. La calidad de RNA se analizó con el bioanalizador Agilent 2100.

## **11. Estudios deL perfil de expresión DE RNA**

Para cuantificar los niveles de los receptores DR4 y DR5 utilizamos RT-PCR a tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos. La cuantificación relativa de la expresión génica fue normalizada con GAPDH.

### **11.1. REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) PARA LA OBTENCIÓN DE cDNA**

Procedimiento:

- a. A 2 µg de RNA total, se agregaron 0,5 µg de oligo-dT y 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM. La reacción se llevó a un volumen final de 12 µl y se incubó en el termociclador *Thermal Cycle* (Eppendorf) a 65°C durante 5 minutos. Inmediatamente se colocó en hielo.
- b. Se preparó una mezcla con 4 µl del tampón de reacción 6X, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl del inhibidor de RNAsa. Se añadieron 7 µl de ella sobre la mezcla anterior y hasta un volumen final de 19 µl.
- c. En conjunto se incubó a 37°C durante 2 minutos tras lo que se agregó 1 µl de transcriptasa reversa. La reacción se incubó en el termociclador a 37°C durante 50 minutos, 70°C durante 15 segundos y se mantuvo a 4°C. El producto se almacenó a largo plazo a -20°C.

#### **11.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR)**

- a. Para la realización de la PCR en tiempo real, se utilizaron 5 µl de una dilución 1:25 del cDNA (DNA complementario) correspondiente previamente sintetizado que se mezclaron con 12,5 µl de SYBR Green, 0,4 µl de cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) y 6,7 µl de H<sub>2</sub>O para completar un volumen final de 25 µl.
- b. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el termociclador iCycler IQ5 PCR Thermal cycler (Bio-Rad), utilizando las siguientes condiciones: 94°C 1 minuto, 56°C 1 minuto, 72°C 30 segundos. Estos 3 pasos se repitieron un total de 40 ciclos. A continuación se extendió a 72°C durante 7 minutos y se mantuvo a 4°C.
- c. La expresión génica relativa se normalizó con GAPDH y se determinaron los niveles de las proteínas de utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los distintos genes son:

DR4	sentido:	5'-AGTGCAAACCAGGAACTTTC-3'
	antisentido:	5'-GTCCATTGCCTGATTCTTTGTG-3'
DR5	sentido:	5'-ACCACGACCAGAAACACAG-3'
	antisentido:	5'-CATTTCGATGTCAACTCCAGGG-3'
GAPDH	sentido:	5'-TGCACCACCAACTCCAGGG-3'
	antisentido:	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

## 12. Estudios de perfil de expresión de MIRNAS mediante arrays.

### 12.1. INDUCCION DE LA APOPTOSIS

Para la inducción de apoptosis en líneas de MM se utilizó bortezomib, que fue adquirido a *MBL International Corporation* y panobinostat que se obtuvo de *Novartis Pharmaceuticals*. La concentración de los fármacos que se utilizaron para la inducción de la apoptosis en las líneas celulares de MM se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Fármacos**

Línea celular	Bortezomib	Panobinostat
MM1S	5 nM	5 nM
RPMI 8226	5 nM	20 nM
U266	5 nM	10 nM
NCIH-929	5 nM	100 nM

Procedimiento:

- $3 \times 10^6$  células fueron sembradas en 10 ml de medio de cultivo, y se añadió el fármaco correspondiente. Se incubaron durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Transcurrido el tiempo indicado, se recogieron 500  $\mu\text{l}$  de cada cultivo y se cuantificó la apoptosis por citometría de flujo como hemos descrito.
- Los restantes 9,5 ml fueron utilizados para la extracción del RNA y posterior análisis de arrays.

Para analizar el perfil de expresión de los miRNAs empleamos los *arrays* de expresión TLDA (*Taqman Low Density Array*, de Applied Biosystems) formados por

dos tarjetas (pool A y B), con un total de 738 miRNAs, además de 8 controles internos utilizados para la normalización de los datos. El protocolo consta de dos partes: una fase de transcripción reversa para la obtención del cDNA a partir del RNA para lo cual empleamos el kit *TaqMan miRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* y una segunda fase que permitirá la detección y cuantificación de los microRNAs mediante PCR cuantitativa en tiempo real empleando sondas TaqMan.

### **12.2. REACCIÓN DE RT PARA LA OBTENCIÓN DE CDNA.**

La síntesis del cDNA se realizó partiendo de 350 ng de RNA total.

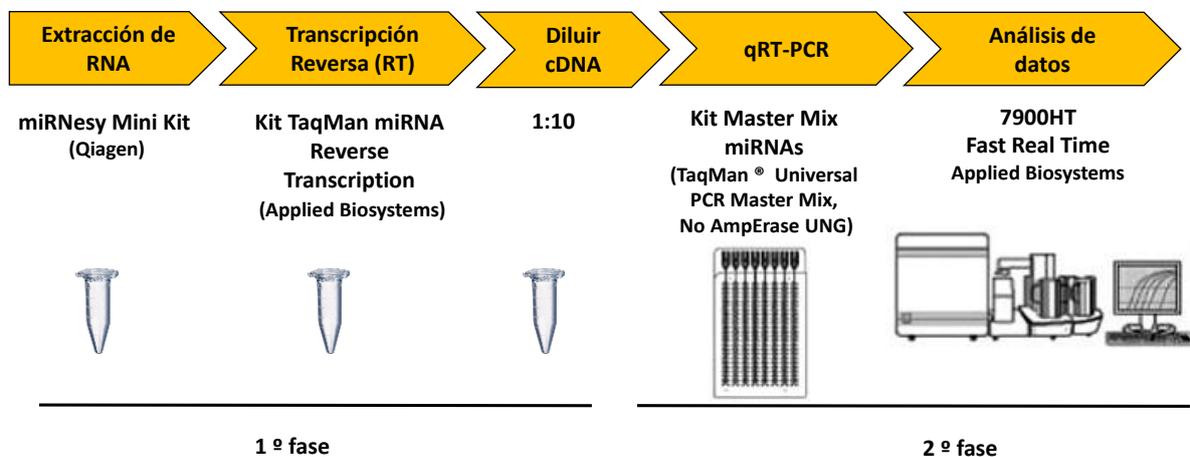
- a. Se preparó la mezcla con 100 mM dNTPs, 50 µl de transcriptasa reversa, 0,8 µl de tampón de reacción 10X, 20 µl de inhibidor de RNAsa, 25 mM de MgCl y 10 µl del pool A o B. Se completó con agua hasta un volumen final de 4,5 µl y se incubó en hielo durante 5 minutos.
- b. A continuación, se añadieron 4,5 µl de la mezcla a cada pocillo, junto con 3 µl de RNA de cada muestra hasta un volumen final de 7,5 µl. Para la amplificación se utilizó el termociclador Veriti® 96-Well de Applied Biosystems®, utilizando las siguientes condiciones: utilizando las siguientes condiciones: el primer paso a 16°C 30 minuto, 42°C 30 minuto, 85°C 5 minutos se mantuvo a 4°C.
- c. En este punto el cDNA puede ser almacenado a -80 °C hasta la realización de la PCR en tiempo real.

### **12.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QRT-PCR)**

La cuantificación de los miRNAs se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real empleando sondas TaqMan en el sistema *Fast Real Time 7900HT PCR (Applied Biosystems)* de acuerdo al protocolo establecido.

Procedimiento:

- a. Atemperar las tarjetas de *arrays* a temperatura ambiente.
- b. Preparar la mezcla correspondiente a los pools A o B con 450 µl de Master Mix miRNAs (*TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X*), 6 µl de cDNA (previamente diluido 1:10) y 444 µl de agua.
- c. Cargar la placa con 100 µl de la mezcla previa, por cada dispensador evitando, en lo posible, la presencia de burbujas.
- d. Centrifugar a 1.200 rpm durante 1 minuto para distribuir homogéneamente la muestra contenida en cada uno de los pocillos.
- e. Sellar las tarjetas ajustando los 4 enganches de forma uniforme e incubar en el termociclador 7900HT *Fast Real-Time* con las siguientes condiciones: 94,5°C 10 minutos, 97°C 30 segundos, 59,7°C 1 minuto. Estos 3 pasos se repitieron un total de 40 ciclos y la reacción se mantuvo entonces a 4°C. (Figura11).



**Figura 11. PCR cuantitativa en tiempo real de los arrays de miRNAs.** Esquema de flujo de trabajo. Después de obtener el RNA total de las 4 líneas celulares tratadas con bortezomib y panobinostat, se procedió a la obtención del cDNA (TR) que fue diluido y utilizado para la cuantificación de miRNAs por qRT-PCR en el termociclador 7900HT *Fast Real-Time*. Terminada la reacción de RT-PCR, el análisis de datos se realizó siguiendo el análisis bioinformático de miRNAs.

- f. El ensayo fue analizado con el software SDS 2.2.2 (*Applied Biosystems*) para comprobar la correcta amplificación del control interno (RNU, RNA

nuclear pequeño), resultando en gráficos conteniendo los diferentes Cts (Ciclo umbral), correspondientes a cada miRNA. Entendemos por Ct la intersección entre la curva de amplificación y la línea umbral. Los datos de Cts fueron exportados a archivos Excel para su posterior análisis bioinformático.

#### **12.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE MIRNAS**

El análisis bioinformático se realizó de manera independiente para los dos fármacos analizados.

- a. Como punto de partida se utilizaron los valores de Cts obtenidos directamente del sistema de detección. De este modo, se disponía inicialmente de valores de Ct para 738 variables, correspondientes a 730 miRNAs y 8 RNAs control únicos, en cada una de las muestras. Para cada fármaco y línea celular analizamos 1 muestra control sin tratar y 3 muestras tratadas.
- b. Los valores de Ct fueron normalizados mediante el cálculo del  $\Delta Ct$ , sustrayendo el valor del Ct promedio de los RNA controles del valor del Ct de cada microRNA, para mantener la relación de proporcionalidad directa entre el  $\Delta Ct$  y la expresión génica.
- c. Con el fin de poder agrupar las muestras correspondientes a las cuatro líneas celulares estudiadas se procedió al ajuste de los valores de  $\Delta Ct$  mediante el método ComBat (Johnson et al., 2007) del paquete SVA (versión 3.28.0) en el entorno R (versión 3.5.1). Este ajuste condujo a la eliminación del efecto dependiente de línea celular sobre la expresión de los microRNA manteniendo el efecto del fármaco analizado.

- d. El resultado del ajuste fue comprobado mediante técnicas de clasificación no supervisadas (dendrogramas y *multidimensional scaling* (MDS)) en SIMFIT (versión 7.5.1). Tanto los dendrogramas como el MDS se llevaron a cabo utilizando la distancia Euclídea como medida de la distancia y el promedio de grupos como técnica de agrupamiento.
- e. A continuación, se procedió al análisis de expresión diferencial donde fueron comparadas estadísticamente las muestras sometidas a tratamiento frente a las no tratadas, aplicando el algoritmo samr (*Substitution, augmentation, modification, redefinition*) (versión 3.0). El análisis samr adicionalmente utiliza un  $p$ -valor justado por el método de Benjamini-Hochberg que da valores estadísticamente significativamente cuando el  $q$ -valor es menor a 0,05.
- f. La determinación de las rutas biológicas y de los genes diana asociadas a estos microRNA se realizó con la herramienta online mirPath (versión 3.0) (Vlachos et al., 2015). Como referencia de las interacciones microRNA-gen se utilizó la base de datos TarBase (versión 7.0), y como base de datos de referencia de rutas biológicas, la base KEGG (Kanehisa et al., 2018).

### 13. ARRAYS DE EXPRESION DE RNA

Con el fin de estudiar los genes desregulados una vez adquirida resistencia al factor trófico TRAIL, se llevaron a cabo *arrays* de expresión génica a partir de RNA obtenido de la línea celular sensible (OPM2) y resistente a TRAIL (OPM2-TRAIL).

Procedimiento:

- a. Se prepararon triplicados de RNA total de células sensibles OPM2 y células resistentes OPM2-TRAIL que fueron hibridados por el servicio de Genómica y Proteómica del CIC, en los arrays HuGene 1.0 de Affymetrix.
- b. Los archivos .CEL obtenidos tras la hibridación, fueron normalizados mediante el algoritmo RMA (*Robust Multigene Analysis*) implementado en el programa Expression Console 4 (Affymetrix).
- c. Los archivos con formato CHP obtenidos fueron analizados mediante el programa *Transcriptome Analysis Console 4* (TAC) de Affymetrix, estableciendo un corte de FC  $\geq 2$ .
- d. Para el análisis de la vía de TRAIL se utilizó la herramienta online *Pathway Interaction Database* (PID) (Schaefer et al., 2009) utilizando como base de datos NDEX (www.ndexbio.org) (Pratt et al., 2015).

#### **14. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Cada condición se analizó en triplicado o cuadruplicado y los datos se muestran como media  $\pm$  SD de un experimento que fue repetido al menos 2 veces. Las comparaciones de variables continuas entre dos grupos se llevaron a cabo mediante el ensayo *t* de student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el *p* valor era menor a 0,05. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SPSS 20.0.

## *Resultados*

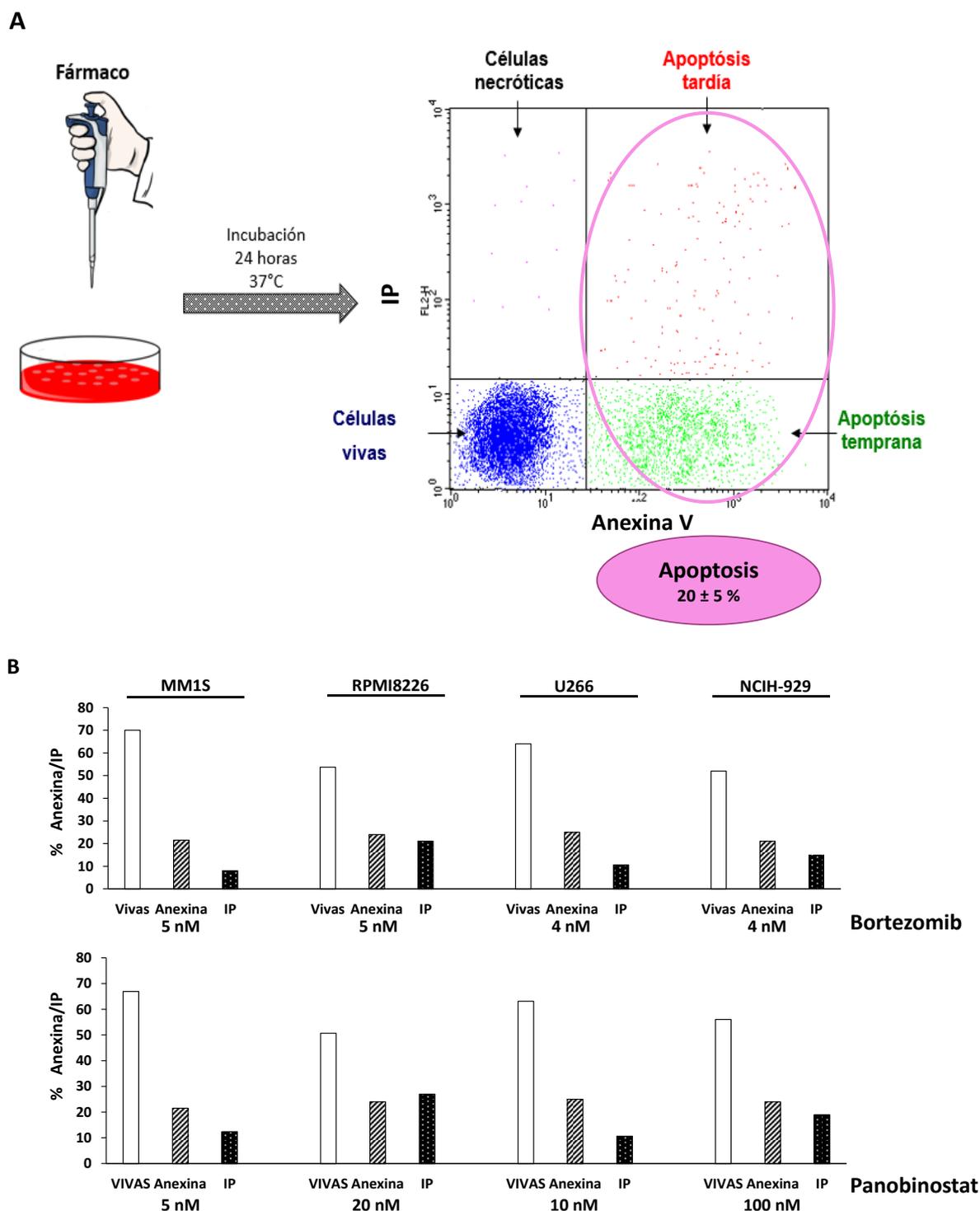


## **1. Capítulo I. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT**

### **1.1 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LÍNEAS DE MIELOMA MÚLTIPLE**

Para determinar los cambios en los perfiles de expresión de miRNAs inducidos por el tratamiento con los fármacos bortezomib y panobinostat al inicio de la muerte celular, se llevaron a cabo ensayos de optimización utilizando 4 líneas celulares de MM que son: MM1S, RPMI8226, U266 y NCI-H929. En primer lugar se realizaron ensayos de dosis-respuesta con los dos fármacos en estudio con la finalidad de inducir una apoptosis de en torno al  $20 \pm 5\%$  después de 24 horas de tratamiento, tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos. Para ello se realizaron ensayos de doble tinción con Anexina V/IP y análisis por citometría de flujo (Figura 12). Este porcentaje de células apoptóticas nos permite obtener células viables con RNA de buena calidad con las que llevar a cabo los estudios posteriores.

Una vez determinada la concentración de fármaco óptima para la inducción de la apoptosis ( $20 \pm 5\%$ ), se sembraron  $5 \times 10^6$  células de cada línea celular y fueron tratadas con los fármacos a las concentraciones correspondientes durante 24 horas. Tras el periodo de tratamiento las células fueron recogidas y se procedió a realizar la extracción, purificación y cuantificación del RNA total como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez verificada la calidad óptima del RNA total extraído, se hibridó en los arrays de expresión de miRNAs TLDA (*Applied Biosystems*), que permite la evaluación de 738 miRNAs siguiendo el protocolo descrito para el estudio de perfil de expresión de miRNAs mediante arrays y cuyo flujo de trabajo se muestra en la figura 11.



**Figura 12. Inducción de apoptosis.** (A) Se realizaron ensayos de dosis-respuesta utilizando  $3 \times 10^5$  células de cada línea celular de MM. Las células fueron tratadas con bortezomib o panobinostat durante 24 horas, hasta encontrar la concentración óptima que genera una apoptosis del  $20 \pm 5\%$ . (B) Concentraciones de bortezomib y panobinostat que inducen la apoptosis óptima en las distintas líneas de MM que se indican. Se muestran las células vivas, las apoptóticas (Anexina) y las necróticas (PI).

Este protocolo consta de dos etapas bien diferenciadas: una primera fase de transcripción para la obtención de DNA complementario o copia (cDNA) a partir del RNA total utilizando el *kit TaqMan miRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* y una segunda fase que permite la detección y cuantificación de miRNAs mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando sondas TaqMan con el kit Master Mix miRNAs (*TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG*).

## **1.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESION DE ARRAYS DE MIRNAS**

### **1.2.1 ANÁLISIS EXPLORATORIO DE DATOS**

En esta primera etapa, se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante un análisis descriptivo estándar que nos permitió conocer las características generales y la distribución de las muestras empleadas. Este análisis no supervisado de los Cts de estas muestras se realizó mediante técnicas de agrupamiento *MultiDimensional Scaling* (MDS). A continuación se normalizaron los Cts iniciales transformándolos a  $\Delta Ct$ . El cálculo del  $\Delta Ct$  se llevó a cabo sustrayendo a los Cts de cada muestra el promedio de los Cts de los controles internos del array. Mediante esta transformación se conseguirá que el  $\Delta Ct$  mantenga la direccionalidad correcta de la expresión del miRNA, siendo este valor directamente proporcional a dicha expresión. Tras esta transformación, se procedió a un nuevo análisis con MDS. En él observamos que las líneas celulares se reagrupan por las características intrínsecas de cada una de ellas pero en este caso con una clara disminución del ruido de fondo, que lleva a un agrupamiento más limpio de las muestras de una misma línea celular. Sabemos por estudios citogenéticos previos que tanto la línea MM1S como la línea RPMI8226 presentan la traslocación t(14;16). Ambas líneas celulares quedan agrupadas en el mismo componente a través de este análisis con MDS. Del mismo modo la línea celular NCI-H929, que presenta una translocación t(4;14), se encuentra en un

componente separado, al igual que la línea U266 cuya translocación es t(11;14) (Drexler et al., 2000; Greenstein et al., 2003). Las figuras 13A y 13B muestran los MDS para las muestras tratadas con bortezomib y panobinostat respectivamente.

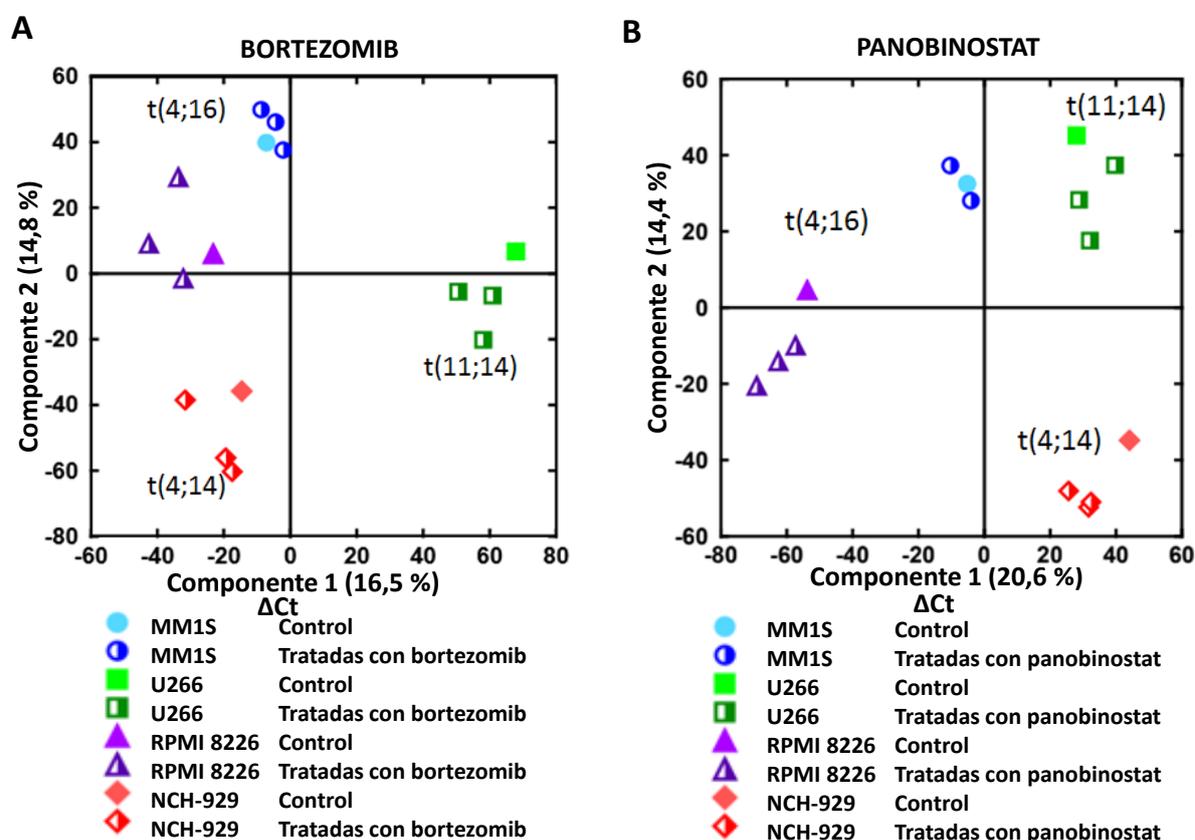
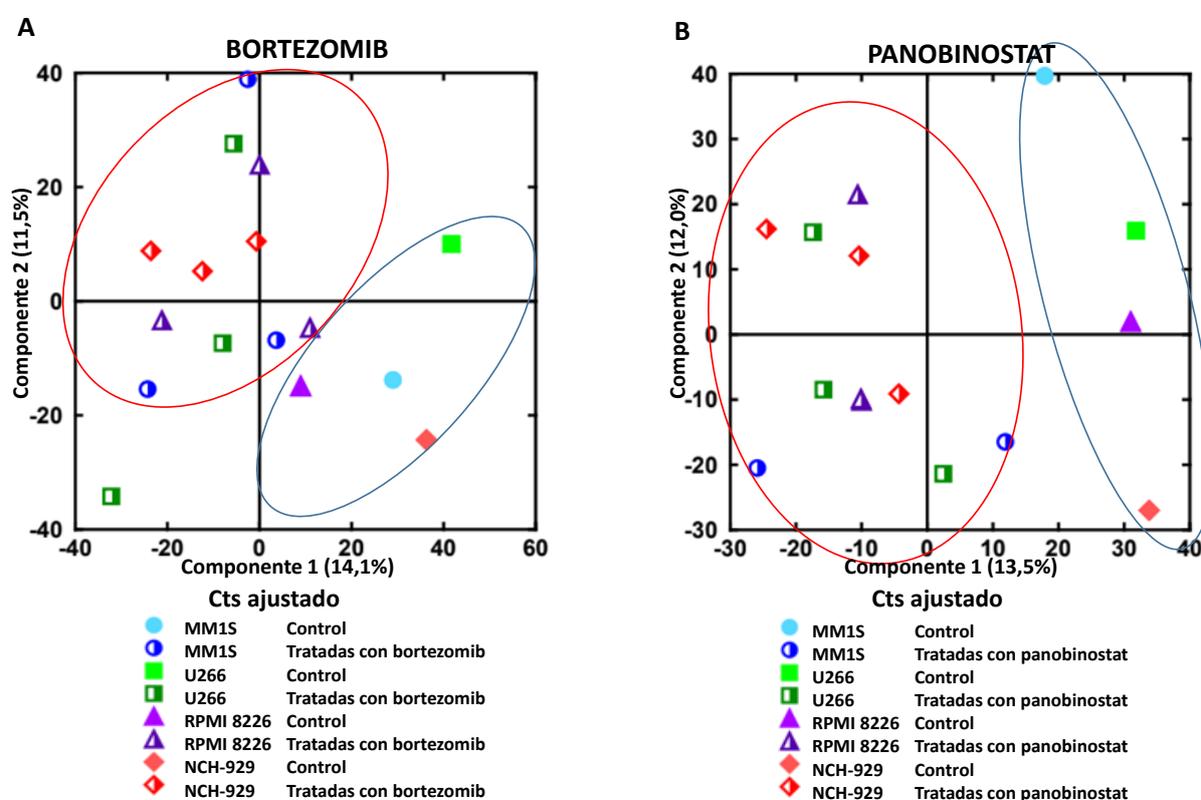


Figura 13. Análisis no supervisado de las muestras agrupadas por su contexto citogenético. Los Cts obtenidos de la matriz inicial se transformaron a  $\Delta Ct$  previa normalización. El gráfico muestra el análisis de MDS de las 4 líneas celulares tratadas con bortezomib (A) o panobinostat (B).

## 1.2.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE miRNAs

Sabemos que las diferencias de expresión génica en subtipos neoplásicos son muy sutiles, pudiendo escapar a la detección del análisis de agrupamiento no supervisado (Gutiérrez et al., 2010). Por esta razón, llevamos a cabo un análisis de subpoblaciones mediante el programa bioinformático *ComBat* (Johnson et al., 2007) tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Mediante este análisis se trató de eliminar la variabilidad en la expresión de los miRNAs debida a la utilización de diferentes líneas celulares. Como se muestra en la figura 16, la aplicación de esta

metodología logró la eliminación de este efecto en la expresión dependiente de la línea celular utilizada, mostrando dos subpoblaciones claramente separadas. La primera subpoblación recogería las cuatro muestras control no tratadas y la segunda subpoblación las doce muestras tratadas, como se observa en la figura 16A (bortezomib) y 16B (panobinostat). Para discriminar las diferencias estadísticamente significativas se utilizó el algoritmo samr con un  $q$ -valor  $< 0,05$  como se describe en el apartado de materiales y métodos.



**Figura 16. Análisis supervisado de la expresión diferencial de miRNAs en las 4 líneas de MM.** El análisis se realizó utilizando el método ComBat a partir de los valores de  $\Delta$ Ct del análisis no supervisado. Este ajuste elimina el efecto de las líneas celulares manteniendo el efecto del fármaco analizado. El gráfico muestra el análisis de MDS de las 4 líneas celulares tratadas con bortezomib (A) o panobinostat (B).

### 1.3 miRNAs DESREGULADOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT.

Tras la normalización y el ajuste de los datos de expresión de miRNAs se procedió al análisis de expresión diferencial de miRNAs como hemos indicado en el apartado de materiales y métodos. Este análisis identificó un total de 24 miRNAs desregulados

de forma estadísticamente significativa ( $q$ -valor  $< 0,05$ ) después del tratamiento con bortezomib con respecto a la línea no tratada, correspondientes al 3,75% del total de los miRNAs analizados en los arrays. De este subtotal se identificaron 22 miRNAs infraexpresados y 2 miRNAs sobreexpresados en las muestra tratadas con bortezomib.

De manera similar se procedió al análisis de los miRNAs desregulados tras el tratamiento con panobinostat. En este caso se identificaron 16 miRNAs desregulados, todos ellos infraexpresados cuyas diferencias de expresión entre las dos condiciones estudiadas fueron consideradas estadísticamente significativas ( $q$ -valor  $< 0,05$ ). Los 16 miRNAs detectados, que representan el 2,4% del total de miRNAs analizados, mostraron infraexpresión tras el tratamiento con panobionostat.

A continuación mostramos los miRNAs desregulados por bortezomib (Tabla 6) y panobinostat (Tabla 7), ordenados según la significancia de  $q$ -valor  $< 5\%$ .

miRNAs infraexpresados					
Orden	miRNA	Score	q-valor (%)	Cromosoma	* "Cluster"
1	hsa-miR-148a-3p	-2,589676554	4,87804878	7p15.2	-
2	hsa-miR-15b-5p	-2,657051552	4,87804878	3q25.33	15-16
3	hsa-miR-576-5p	-2,71498097	3,53481796	4q25	-
4	hsa-miR-20b-5p	-2,736593897	3,53481796	Xq26.2	-
5	hsa-miR-941	-2,747387561	3,53481796	20q13.33	-
6	hsa-miR-454-3p	-2,757048865	3,53481796	17q22	-
7	hsa-miR-19b-3p	-2,758404529	3,53481796	13q31.2	17-92
8	hsa-miR-184	-2,75935582	3,53481796	15q25.1	-
9	hsa-miR-922	-2,776157355	3,53481796	3q29	-
10	hsa-miR-149-5p	-3,046834224	3,12695435	2q37.3	-
11	hsa-miR-301b-3p	-3,048180621	3,12695435	22q11.21	-
12	hsa-miR-93-3p	-3,160144038	3,12695435	7q22.1	-
13	hsa-miR-30d-5p	-3,197097943	3,12695435	8q24.22	30
14	hsa-miR-17-3p	-3,203494855	3,12695435	13q31.3	17-92
15	hsa-miR-130b-3p	-3,250364696	3,12695435	22q11.21	-
16	hsa-miR-18b-5p	-3,308904487	3,12695435	Xq26.2	17-92
17	hsa-miR-106a-5p	-3,340199125	3,12695435	Xq26.2	105-25
18	hsa-miR-16-5p	-3,40735062	3,12695435	13q14.2	17-92
19	hsa-miR-597-5p	-3,550348693	3,12695435	8p23.1	-
20	hsa-miR-656-3p	-3,654170741	0	14q32.31	-
21	hsa-miR-218-5p	-4,104174579	0	4p15.31	-
22	hsa-miR-490-3p	-4,318375883	0	7q33	-
miRNAs sobrepresados					
Orden	miRNA	Score	q-valor (%)	Cromosoma	* "Cluster"
1	hsa-miR-518b	4,367496719	0	19q13.42	-
2	hsa-miR-567	3,655120386	4,87804878	3q13.2	-

**Tabla 6. miRNAs desregulados tras el tratamiento con bortezomib.** Se identificaron un total de 24 miRNAs desregulados tras el tratamiento, 22 infraexpresados y 2 sobrepresados. Se utilizó el algoritmo samr para identificar valores estadísticamente significativos con un  $q$ -valor menor a 0,05. (\* "Cluster" de miRNAs).

miRNAs infraexpresados					
Orden	miRNA	Score	q-valor (%)	Cromosoma	* "Cluster"
1	hsa-miR-891a-3p	5,608501091	0	Xq27.3	-
2	hsa-miR-181a-5p	4,921523893	0	1q32.1	181a-181b
3	hsa-miR-517a-3p	4,635311915	0	19q13.42	517-518
4	hsa-miR-517c-3p	4,415305486	0	19q13.42	517-518
5	hsa-miR-522-3p	3,916877008	0	19q13.42	-
6	hsa-miR-375	3,895245128	0	2q35	-
7	hsa-miR-650	3,814943735	0	22q11.22	-
8	hsa-miR-210-3p	3,192074993	0	11p15.5	-
9	hsa-miR-768-3p	3,132339768	0	16q22.3	-
10	hsa-miR-449a	3,086959702	0	5q11.2	-
11	hsa-miR-542-5p	2,957129554	0	Xq26.3	-
12	hsa-miR-95-3p	2,889260044	0	4p16.1	-
13	hsa-miR-99b-5p	2,884764954	0	19q13.41	-
14	hsa-miR-183-5p	2,85264671	0	7q32.2	-
15	hsa-miR-512-3p	2,814209569	0	19q13.42	-
16	hsa-miR-30e-3p	2,81029925	0	19q13.42	-

**Tabla 7. miRNAs diferencialmente expresados tras el tratamiento con panobinostat.** Se encontraron 16 miRNAs desregulados tras el tratamiento todos ellos infraexpresados. Se utilizó el algoritmo samr para identificar valores estadísticamente significativos con un q-valor menor a 0,05. (\* "Cluster" de miRNAs).

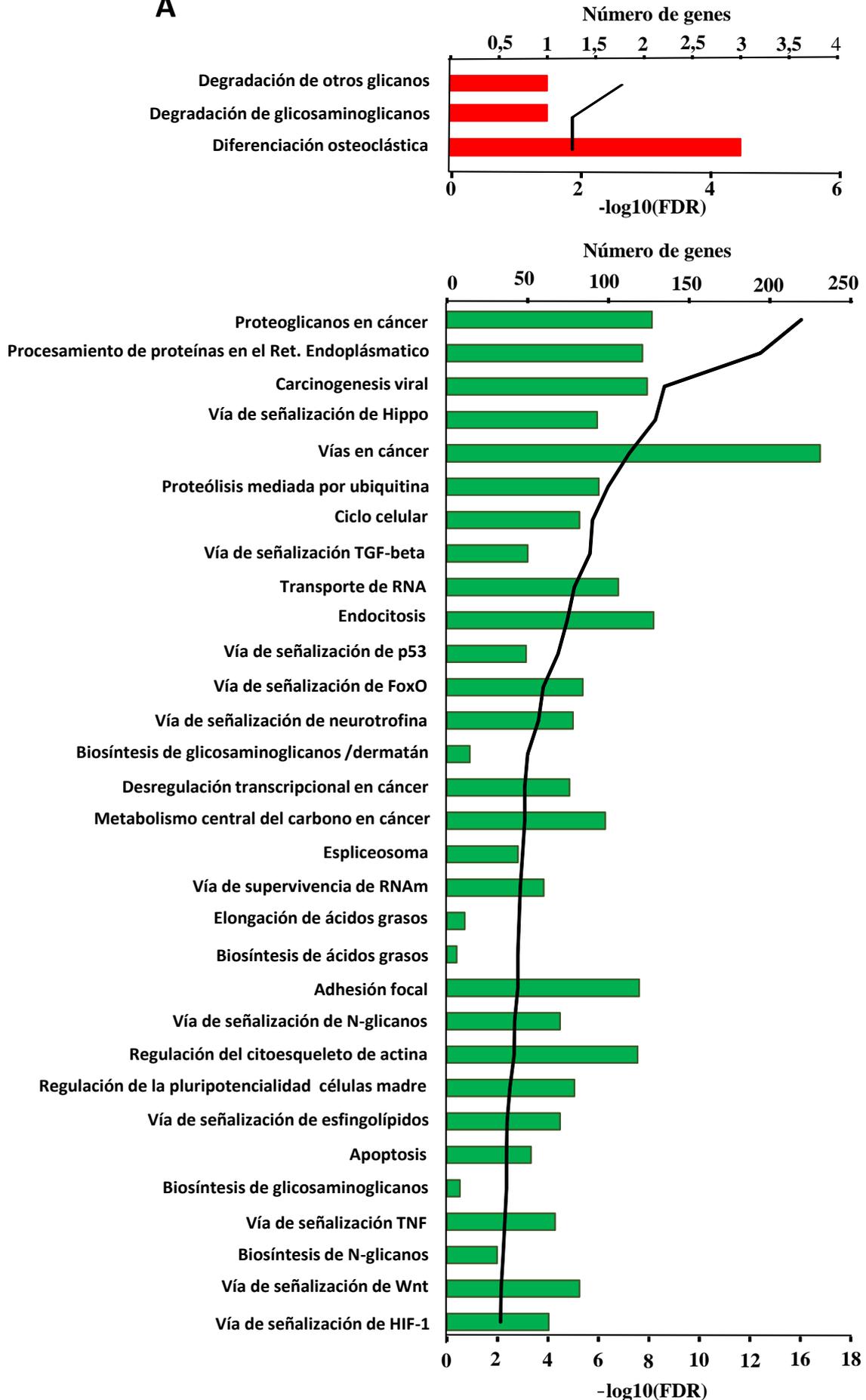
#### 1.4 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS FUNCIONALES DESREGULADAS TRAS EL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT.

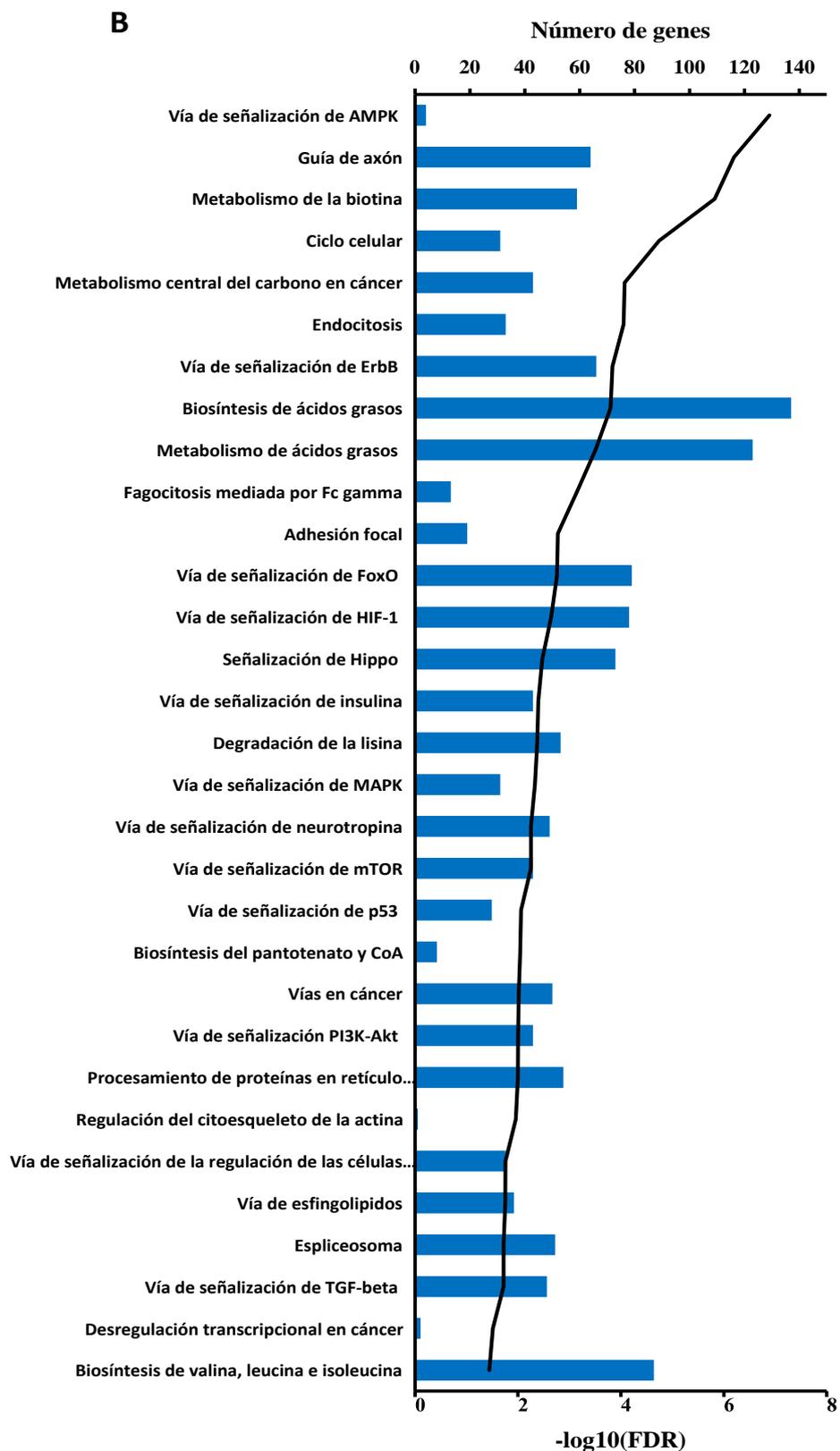
Una vez identificados los miRNAs desregulados tras el tratamiento con bortezomib y panobinostat, procedimos a estudiar la importancia biológica de estos cambios en los procesos biológicos. Para ello realizamos un análisis de enriquecimiento de rutas, siguiendo los pasos indicados en el apartado de análisis bioinformático de miRNAs.

Se utilizó la plataforma online mirPath (versión 3.0)(Vlachos et al., 2015) a la que se suministraron los miRNAs desregulados utilizando su nomenclatura correcta de acuerdo a la base de datos miRBASE (Kozomara et al., 2014). Dentro de mirPath, para estudiar las interacciones miRNA-gen, se utilizó la base de datos TarBase (versión 7.0) (<http://www.microrna.gr/tarbase>), y como base de datos de referencia se usó KEGG (Kanehisa et al., 2018) con un FDR  $p \leq 0,05$ .

En este estudio se encontraron 34 rutas desreguladas después del tratamiento con bortezomib (Figura 15A) de las que 3 corresponden a vías desreguladas por miRNAs sobrexpresados (rojo) y 31 a miRNAs infraexpresados (verde). Tras el tratamiento con panobinostat se encontraron 31 vías desreguladas (Figura 15B). De estas vías, 22 eran comunes a ambos tratamientos y son: la vía de señalización de AMPK, ciclo celular, metabolización del carbono central en cáncer, endocitosis, biosíntesis de ácidos grasos, metabolización de ácidos grasos, adhesión focal, las vías de señalización de FoxO, HIF-1, Hippo, insulina, mTOR, neurotrofina, p53, TGF-beta, esfingolípidos y la vía de cáncer, procesamiento de proteínas en retículo endoplasmático, regulación del citoesqueleto de actina, regulación de células pluripotenciales, espliceosoma, y desregulación transcripcional en cáncer.

**A**





**Figura 15. Vías potencialmente desreguladas tras el tratamiento farmacológico.** La determinación de las posibles rutas biológicas desreguladas por miRNAs tras el tratamiento farmacológico, se analizó con la herramienta bioinformática mirPath utilizando la base de datos TarBase y como base de datos de referencia se usó KEGG. **(A)** Vías desreguladas por miRNAs sobreexpresados (rojo) y infraexpresados (verde) tras del tratamiento con bortezomib o **(B)** tras el tratamiento con panobinostat.

## **1.5 ANÁLISIS DE MIRNAS RELACIONADOS CON LA VÍA DE APOPTOSIS TRAS EL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB.**

Nos planteamos investigar con más detalle qué miRNAs y genes estarían desregulando la ruta de muerte por apoptosis que encontramos desregulada en el análisis anterior.

Con tal fin utilizamos de nuevamente la plataforma miRPath en las mismas condiciones que para el análisis de las vías desreguladas. Nos centramos en la vía de apoptosis (FDR de 2,36 donde participan 37 genes)(Tabla 8), que muestra que son 4 miRNAs: miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-19b-3p y miR-218b-5p, los involucrados directamente en la regulación de esta ruta. Adicionalmente mostramos un diagrama de secuencia de la vía de apoptosis, donde se muestran en verde aquellos genes de esta vía que no son alterados por ningún miRNA, en amarillo cuando hay interacción con un solo miRNA y en naranja cuando la interacción se da con 2 o más miRNAs (Figura 16).

microRNA	Símbolo	Descripción
miR-15b miR-16 miR-19b miR-218b	AKT3	Proteína serina/treonina quinasa RAC/gamma
	APAF1	Factor activador de la proteasa apoptótica
	ATM	Proteína serina quinasa ATM
	BAX	Regulador de la apoptosis
	BCL2	Bcl-2 asociado a muerte celular
	BCL2L1	Bcl-2 proteína 1
	CASP10	Caspasa 10
	CASP3	Caspasa 3
	CFLAR	Regulador de la apoptosis caspasa 8/FADD
	CHUK	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad alfa
	CSF2RB	Receptor común de la citoquina de la subunidad beta
	CYCS	Citocromo C
	FADD	Regulador de la apoptosis caspasa 8
	FAS	Receptor del factor de necrosis tumoral 6
	IKBKB	Inhibitor de la subunidad nuclear del factor kappa-B quinasa
	IL1R1	Receptor tipo 1 de la interleukina
	IL1RAP	Receptor proteína accesoria interleukina 1
	MYD88	Proteína de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide
	NFKB1	Factor nuclear NF-kappa-B subunidad p105
	PIK3CA	Subunidad catalítica de la isoforma del fosfatidilinositol 4,5-bisfonato 3-quinasa
	PIK3CB	Subunidad beta de la isoforma del fosfatidilinositol 4,5-bisfonato 3-quinasa
	PIK3R1	Regulador fosfatidilinositol 3-quinasa subunidad alfa
	PIK3R3	Regulador del fosfatidilinositol 3-quinasa subunidad gama
	PIK3R5	Regulador del fosfatidilinositol 5-quinasa subunidad gama
	PPP3R1	Calcineurina subunidad B tipo 1
	PRKACA	Proteína catalítica quinasa dependiente del AMP cíclico subunidad alfa
	PRKACB	Proteína catalítica quinasa dependiente de AMP cíclico subunidad beta
	PRKAR1A	Receptor de proteína catalítica quinasa dependiente de AMP cíclico subunidad alfa
	PRKAR1B	Receptor de proteína catalítica quinasa dependiente de AMP cíclico subunidad beta
	PRKAR2A	Regulador de la proteína quinasa dependiente de la AMP cíclico
	PRKX	Proteína quinasa catalítica dependiente de AMP cíclico
	TNFRSF10A	Receptor del factor de necrosis tumoral miembro 10A
	TNFRSF10B	Receptor del factor de necrosis tumoral miembro 10B
	TNFRSF10D	Receptor del factor de necrosis tumoral miembro 10D
TNFRSF1A	Receptor del factor de necrosis tumoral miembro 1A	
TP53	Proteína p53	
XIAP	Proteína ubiquitina ligasa E3	

**Tabla 8. miRNAs y genes desregulados implicados en la vía de apoptosis tras el tratamiento con bortezomib.** El análisis se realizó considerando los 4 miRNAs relacionados con la vía de apoptosis (miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-19b-3p y miR-218b-5p) utilizando la herramienta bioinformática miRPath y considerándose exclusivamente la ruta de apoptosis.

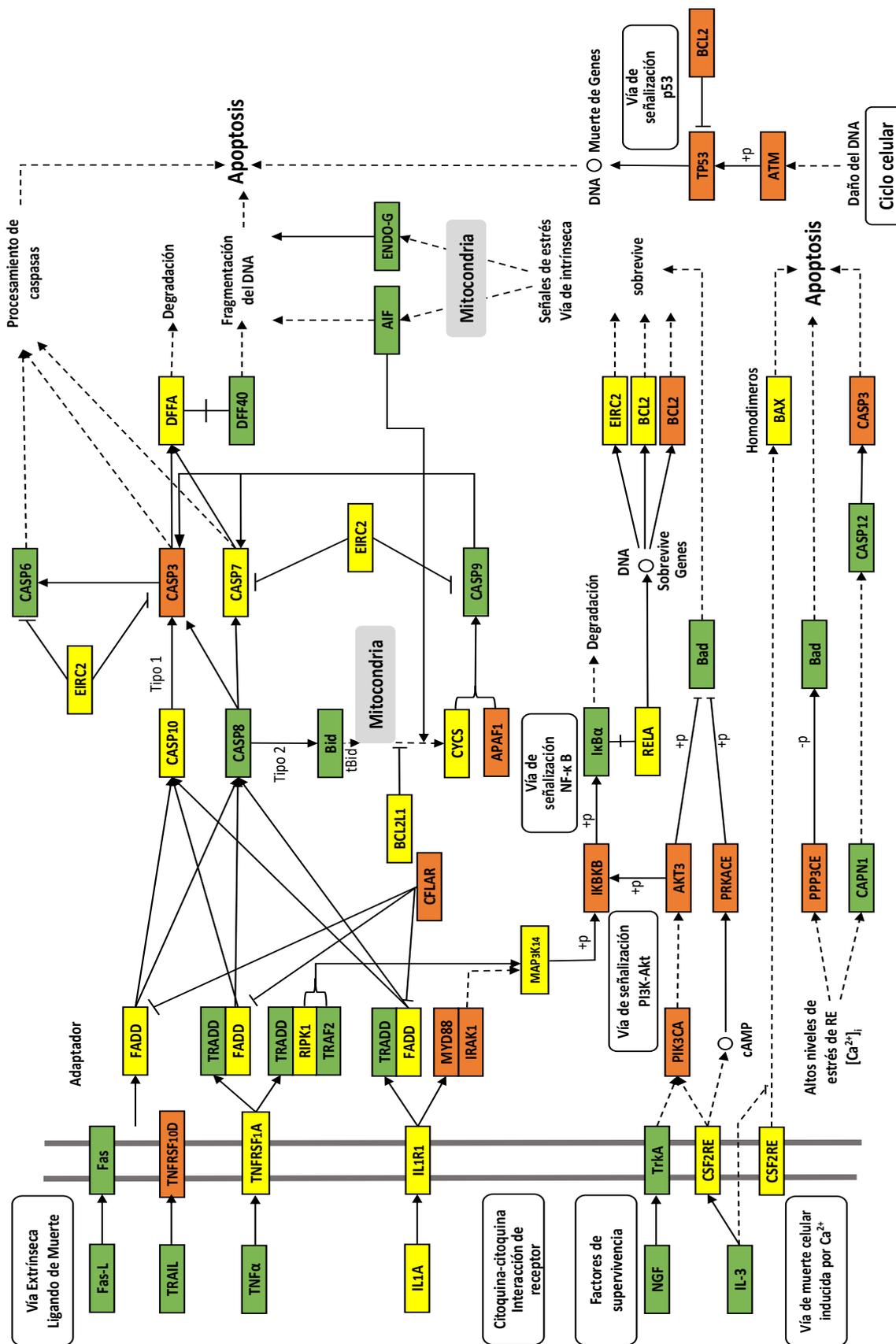


Figura 16. Vía de apoptosis desregulada tras el tratamiento con bortezomib. Utilizando el programa miRPath y como base de datos TarBase, se generó una esquema de la vía de apoptosis afectada por los miRNAs miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-19b-3p y miR-218b-5p. Se muestran en color verde los genes que no son desregulados por ningún miRNA, en amarillo los genes desregulados por uno y en naranja los desregulados por más de dos miRNAs.

## **1.6 ANÁLISIS DE MIRNAS INVOLUCRADOS EN EL CICLO CELULAR DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON PANOBINOSTAT.**

De manera análoga, investigaciones prevías indican el papel relevante del panobinostat sobre el ciclo celular (Eckschlager et al., 2017). Por ello analizamos de manera más concreta esta ruta en el contexto de miRNAs desregulados. Nos centramos en la vía de ciclo celular que muestra un FDR de 4,74 y 43 genes involucrados. En este caso encontramos 7 miRNAs involucrados de manera específica en la regulación del ciclo celular: miR-375, miR-30e-3p, miR-181a-5p, miR-183-5p, miR-449a, miR-99b-5p y el miR-650. El programa miRPath generó la lista de posibles genes diana implicados en esta vía (Tabla 9) y generó el diagrama de la vía de ciclo celular con los genes de esta ruta alterados (Figura 17), de manera similar a la expuesta para bortezomib.

miRNA	Símbolo	Descripción
miR-375 miR-30e miR-181a miR-183 miR-449a miR-99b miR-650	CDC6	Proteína de control de la división celular
	RBL2	Proteína 2 de unión de retinoblastoma
	CDKN2C	Ciclina quinasa 4 dependiente del inhibidor C
	PCNA	Factor asociado a PCNA
	SMC1A	Proteína de mantenimiento del cromosoma 1A
	YWHAH	Proteína eta 14-3-3
	CCNB1	Ciclina B1
	CDK4	Quinasa dependiente de la ciclina 4
	SMAD2	Proteína de la vía TGFβ
	YWHAE	Proteína epsilon 14-3-3
	CCNA2	Ciclina A2
	HDAC1	Histona deacetilasa 1
	YWHAG	Proteína gamma 14-3-3
	CCND2	Ciclina D2
	MCM4	Complejo de mantenimiento de cromosoma tipo 4
	CDKN1B	Inhibidor de quinasa ciclina dependiente 1B
	CUL1	Culina 1
	STAG2	Subunidad SA-2 de cohesinas
	CDKN2B	Inhibidor de la ciclina dependiente de quinasa 4
	STAG1	Subunidad SA-1 de cohesinas
	YWHAB	Proteína beta/alfa 14-3-3
	WEE1	Proteína quinasa tipo wee1
	GADD45A	Proteína de parada e inducción de daño del DNA 45A
	ANAPC2	Proteína promotora de la anafase subunidad 2
	CDK6	Quinasa dependiente de ciclina 6
	BUB3	Control de la mitosis
	TP53	Proteína p53
	GADD45G	Proteína de parada e inducción de daño del DNA 45G
	CCND1	Ciclina-D1
	SMAD4	Proteína de la vía TGFβ
	CCNE2	Ciclina-E2
	E2F5	Factor de transcripción E2F5
	SKP2	Proteína asociada a la quinasa 2 S-fase
	E2F3	Factor de transcripción E2F3
	MYC	Proteína protooncogénica Myc
	TTK	Proteína quinasa de doble especificidad
	RB1	Proteína asociada al retinoblastoma
	MAD2L2	Proteína ensamblaje del huso mitótico de la proteína de control
	YWHAZ	Proteína zeta/delta 14-3-3
	MAD2L1	Proteína de ensamblaje del huso mitótico proteína de control
	TGFB2	Factor de crecimiento transformante tipo beta-2
	EP300	Inhibidor de la diferenciación 300
CCNE1	Ciclina-E1	
CDC27	Proteína del ciclo de división celular	
CDKN1A	Inhibidor de la ciclina dependiente de quinasa 1A	
CHEK2	Proteína implicada en reparación del daño al DNA	
PRKDC	Subunidad catalítica de proteína quinasa dependiente de DNA	
ORC6	Complejo de reconocimiento de origen subunidad 6	
PLK1	Quinasa serine/treonina	
MDM2	Proteína ligasa de ubiquitina E3	
ABL1	Proteína tirosina quinasa	
MCM3	Complejo de mantenimiento de cromosoma tipo 3	
CDC25A	Fosfatasa del ciclo celular	

**Tabla 9. miRNAs y genes desregulados implicados en la vía de apoptosis tras el tratamiento con panobinostat.** El análisis se realizó considerando los siete miRNAs relacionados con la vía de ciclo celular (miR-375, miR-30e-3p, miR-181a-5p, miR-183-5p, miR-449a, miR-99b-5p y el miR-650) utilizando la herramienta bioinformática miRPath y considerándose exclusivamente la ruta de ciclo celular.





## *Discusiones*



## **1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MIRNAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y PANOBINOSTAT**

El mieloma múltiple es probablemente una de las neoplasias hematológicas que ha experimentado mayores avances en el conocimiento de su biología y terapéutica en las últimas décadas, permitiendo comprender mejor su patogénesis, las alteraciones intrínsecas propias de la célula plasmática y su relación con el microambiente de la médula ósea (San Miguel et al., 2014). Unido a esto, ha tenido lugar el desarrollo de nuevos fármacos que están siendo probados en ensayos clínicos, como posibles tratamientos para pacientes en los que no se ha conseguido controlar la enfermedad o que permita prolongar de forma importante la supervivencia de estos pacientes. No obstante, aparecen recaídas que suelen ser particularmente complejas de tratar y superar (McCarthy et al., 2014). Por esta razón es fundamental conocer e identificar nuevos fármacos con mecanismos de acción desconocidos que consigan rescatar a estos pacientes. Para ello será necesario plantear nuevas estrategias que nos permitan tener una mejor perspectiva sobre el desarrollo de la enfermedad, considerando siempre la heterogeneidad del MM (Ocio et al., 2014).

Es cada vez mayor el número de estudios que correlacionan a los miRNAs con procesos biológicos tales como el crecimiento y la diferenciación celular y que contribuyen a la patogénesis del cáncer (Bartel et al., 2007; Ambros et al., 2011; Bartel et al., 2018). Del mismo modo, estudios previos de nuestro grupo y de otros han demostrado que los miRNAs están desregulados cuando se comparan células mielomatosas y no mielomatosas (Pichiorri et al., 2008; Lionetti et al., 2009; Gutiérrez et al., 2010). Además, la literatura nos demuestra que estas moléculas tienen un rol fundamental en la patogénesis del MM (Misiewicz-Krzeminska et al., 2013; Yang et al., 2015; Li et al., 2016).

En el primer capítulo de esta tesis presentamos una investigación descriptiva, derivada del análisis del perfil de expresión de miRNAs en 4 líneas celulares de MM que representan la heterogeneidad de esta enfermedad. Estas líneas fueron tratadas con dos fármacos que actúan a través de diferentes mecanismos de acción: bortezomib y panobinostat. Comparamos la expresión de miRNAs de las líneas tratadas frente a los controles sin tratar.

En un primer análisis no supervisado observamos que las distintas líneas celulares se agrupaban en función de sus características citogenéticas. No obstante nuestro objetivo era estudiar los miRNAs desregulado por cada tratamiento o fármaco, independiente de la línea celular. Por ello se llevaron a cabo estudios supervisados que separaban claramente las subpoblaciones de células tratadas de los controles sin tratamiento.

Estos análisis muestran que hay distintos miRNAs sobreexpresados e infraexpresados después del tratamiento con bortezomib. De hecho hasta encontramos dos miRNAs sobreexpresados en estas condiciones y hasta 22 infraexpresados. El mismo análisis realizado tras el tratamiento con panobinostat muestra que únicamente hay miRNAs infraexpresados en esta situación (Amodio et al., 2016).

Nuestros resultados proporcionan una visión global de los miRNAs desregulados en MM tras el tratamiento con fármacos, que podrían estar involucrados en diferentes rutas biológicas. Dentro de las rutas desreguladas por estos miRNAs están, entre otras, la diferenciación osteoclástica que está alterada por la sobreexpresión de miRNAs tras el tratamiento con bortezomib. Estudios previos realizados por el grupo del Dr. Campos y colaboradores indican que la infraexpresión del miR-149 estaría implicada en numerosas vías como la unión del calcio, la resorción ósea, la

mineralización de la matriz y la diferenciación ósea en pacientes con MM (Musolino et al., 2018). Por todo ello, la vía de diferenciación osteoclástica esta desregulada y más activa. Nuestro análisis muestra que tras el tratamiento con bortezomib el miR-149 está sobreexpresado y podría invertir la actividad osteoclástica. Estos datos sugieren que el bortezomib podría regenerar la resorción ósea, hecho que confirman los estudios de Lee y colaboradores, que indican que el bortezomib es un potente agente inhibidor de la resorción ósea (Kim et al., 2018).

Por otro lado vías como la apoptosis, la proteólisis mediada por ubiquitina, la vía de señalización de TGF- $\beta$ , la vía de señalización de p53, el ciclo celular y la vía de señalización de TNF $\alpha$  son vías desreguladas con miRNAs infraexpresados tras el tratamiento con bortezomib citando sólo algunas de las vías más relevantes en el contexto del cáncer.

Diversos estudios previos han descrito el papel de los miRNAs como biomarcadores de pronóstico a la respuesta clínica de los pacientes (Hayes et al., 2014; Di Marzo et al., 2016; Ren et al., 2017). De forma análoga los miRNAs desregulados por bortezomib y panobinostat podrían ser utilizados como posibles biomarcadores de respuesta a estos tratamientos.

El rol de los miRNAs en la apoptosis se presenta como una prometedora vía de estudio en el desarrollo del cáncer. El grupo de Slack y colaboradores identificó miRNAs involucrados en la regulación de la apoptosis en MM, demostrando que la asociación de fármacos como el bortezomib con el miR-497 tenía un sinergismo positivo en la generación de apoptosis (Tian et al., 2018). Por el contrario, estudios de asociación del miR-22-3p con bortezomib muestran un sinergismo negativo, al inhibir la apoptosis generada por el fármaco (Lian-X et al., 2018). Nuestro análisis demuestra

que otros miRNAs distintos de estos, los miR-15b, miR-16, miR-19b y miR-218b, están igualmente desregulando la vía de apoptosis en respuesta a bortezomib. De hecho el análisis específico de estos miRNAs en el contexto de la ruta de apoptosis muestra 27 genes de esta vía desregulados. Entre ellos los genes FADD, TNFRSF10D, TNFRSF1A y CFLAR (FLIP) que son genes claves en la vía extrínseca de apoptosis (Chen et al., 2003).

Hemos encontrado desregulado el miR-15b-5p, que pertenece al *cluster* 15/16 (miR-15a, miR-15b, miR-16) y el miR-19b-3p que pertenece al *cluster* 17-92 (miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a). Ambos miRNAs son considerados como proapoptóticos, dado que han sido identificados como inhibidores de múltiples vías oncogénicas debido a su capacidad de bloquear el efecto de Bcl-2 (Roccaro et al., 2009).

Por otro lado se conoce que la delección del cromosoma 13 es un evento muy frecuente en MM y se detecta en el 50% de los casos de esta dolencia. Estudios previos de miRNAs ubicados en esta región muestran la sobreexpresión del *cluster* 15/16 (Pichiorri et al., 2008). Nuestros datos muestran que los miRNAs miR-16, miR-19b y miR-17, que están presentes en esta región, están infraexpresados tras el tratamiento con bortezomib, por lo que devolverían a las células mielomatosas a condiciones próximas a las basales.

Otro miRNA descrito e involucrado en apoptosis es el miR-106a que, en condiciones basales, se encuentra sobreexpresado en cáncer gástrico, y es considerado un regulador negativo de los genes proapoptóticos p21 y Bim en la vía de TGF $\beta$  (Petrocca et al., 2008). En nuestro análisis encontramos que este miRNA está infraexpresado

después del tratamiento con bortezomib lo que reforzaría el papel proapoptótico de este fármaco mediante la desregulación del miR-106a.

Nuestro análisis observó que el bortezomib, un inhibidor del proteosoma, podría desregular el ciclo celular a través de la señalización de TNF $\alpha$  y la vía de mTOR. Resultados similares fueron encontrados en estudios con carfilzomib, otro fármaco de este grupo, en los que se demostró que el mecanismo de acción de este fármaco podría estar mediado por la desregulación del ciclo celular (Zheng et al., 2017).

En cuanto a las vías desreguladas por panobinostat, nuestro análisis encontró alteraciones en el ciclo celular, la regulación de células pluripotenciales, la regulación transcripcional en cáncer o las vías de señalización de MAPKs, mTOR, p53 o TGF- $\beta$  entre otras. Es importante destacar que el mecanismo de acción del panobinostat involucra algunas de estas vías (Bruzzese et al., 2013). Además, este fármaco actúa como un nuevo circuito epigenético que podría regular el crecimiento y supervivencia de las células de MM a través de la desregulación de miRNAs, ofreciendo nuevas vías para los enfoques epi-terapéuticos (Amodio et al., 2016). En este sentido nuestro estudio aporta información sobre los miRNAs que podrían estar involucrados en el mecanismo de acción del fármaco en su actividad antimielomatosa (Sampath et al., 2012) .

Una de las vías claves desreguladas por panobinostat es el ciclo celular. En su control hemos identificado que están implicados los miRNAs miR-375, miR-30e, miR-181a, miR-183, miR-449, miR-99b y miR-650 (Liu et al., 2008).

Otra vía de interés desregulada por panobinostat es la que afecta al factor de transcripción FoxO. Estudios previos han demostrado que la alteración de esta vía

resulta en el incremento de la supervivencia de las células mielomatosas (De Bruyne et al., 2010).

Otros estudios previos muestran que el miR-375 está infraexpresado en MGUS y en MM contribuyendo al progreso de la enfermedad al disminuir la cantidad de los receptores celulares PDK1 y IGF1R (Tatekawa et al., 2017). Nuestros resultados identifican que este miRNA está infraexpresado en las líneas tratadas con panobinostat, y podría estar actuando a través de la vía de señalización de IGFR1, que está desregulada.

El análisis llevado a cabo en este estudio muestra miRNAs y rutas de señalización desregulados tras el tratamiento con fármacos normalmente utilizados en el tratamiento de pacientes y que nos permiten entender mejor su mecanismo de acción. Estudios previos de otros grupos demuestran que la monitorización del cambio en el patrón de expresión de miRNA se puede utilizar como un marcador de terapia que nos proporcione un tratamiento basado en evidencia molecular (Di Leva et al., 2015). Por ello, es necesario profundizar en nuestro conocimiento de los miRNAs desregulados, validando la importancia funcional de dicha desregulación, para poder utilizar esta estrategia con fines pronósticos en el contexto del MM.

## *Conclusiones*



Basados en los datos obtenidos de esta tesis, nuestras conclusiones son los siguientes:

1. Los perfiles de expresión de miRNAs inducidos por el tratamiento con bortezomib y panobinostat son diferentes, y no presentan miRNAs comunes desregulados tras del tratamiento con ambos fármacos.
2. El bortezomib desregula miRNAs implicados en vías de apoptosis y proteólisis mediada por ubiquitinas, rutas clave en el mecanismo de acción de este fármaco, así como la diferenciación osteoclástica, importante en el desarrollo del MM.
3. El panobinostat muestra, a nivel de expresión de miRNAs, un papel en la regulación del ciclo celular.



## *Bibliografía*



- Adams, Jerry M. and Suzanne Cory. 2001. "Life-or-Death Decisions by the Bcl-2 Protein Family." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Alegre, A., M. Lamana, R. Arranz, M. J. Fernández-Villalta, J. F. Tomás, A. Figuera, R. Cámara, J. L. Steegman, F. Casado, M. J. Requena, J. L. Planas, L. Vazquez, A. Granda, and J. M. Fernández-Rañada. 1995. "Busulfan and Melphalan as Conditioning Regimen for Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma." *British Journal of Haematology*.
- Allegra, Alessandro, Andrea Alonci, Demetrio Gerace, Sabina Russo, Vanessa Innao, Laura Calabrò, and Caterina Musolino. 2014. "New Orally Active Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma." *Leukemia Research*.
- Allen, Edwards, Zhixin Xie, Adam M. Gustafson, and James C. Carrington. 2005. "MicroRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants Some Plant miRNAs Function to Repress Expression At." *Cell*.
- Ambros, Victor. 2011. "MicroRNAs and Developmental Timing." *Current Opinion in Genetics and Development*.
- Amodio, N., M. A. Stamato, A. M. Gulla, E. Morelli, E. Romeo, L. Raimondi, M. R. Pitari, I. Ferrandino, G. Misso, M. Caraglia, I. Perrotta, A. Neri, M. Fulciniti, C. Rolfo, K. C. Anderson, N. C. Munshi, P. Tagliaferri, and P. Tassone. 2016. "Therapeutic Targeting of MiR-29b/HDAC4 Epigenetic Loop in Multiple Myeloma." *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Amodio, Nicola, Maria Angelica Stamato, Anna Maria Gullà, Eugenio Morelli, Enrica Romeo, Lavinia Raimondi, Maria Rita Pitari, Ida Ferrandino, Gabriella Misso, Michele Caraglia, Ida Perrotta, Antonino Neri, Mariateresa Fulciniti, Christian Rolfo, Kenneth C. Anderson, Nikhil C. Munshi, Pierosandro Tagliaferri, and Pierfrancesco Tassone. 2016. "Therapeutic Targeting of MiR-29b/HDAC4 Epigenetic Loop in Multiple Myeloma." *Molecular Cancer Therapeutics*.
- An, Heeseon and Alexander V. Statsyuk. 2015. "An Inhibitor of Ubiquitin Conjugation and Aggresome Formation." *Chemical Science*.
- Arhoma, A., A. D. Chantry, S. L. Haywood-Small, and N. A. Cross. 2017. "SAHA-Induced TRAIL-Sensitisation of Multiple Myeloma Cells Is Enhanced in 3D Cell Culture." *Experimental Cell Research*.
- Ashkenazi, Avi and Vishva M. Dixit. 1998. "Death Receptors: Signaling and Modulation." *Science*.
- Atadja, Peter. 2009. "Development of the Pan-DAC Inhibitor Panobinostat (LBH589): Successes and Challenges." *Cancer Letters*.
- Avet-Loiseau, Hervé, Cheng Li, Florence Magrangeas, Wilfried Gouraud, Catherine Charbonnel, Jean Luc Harousseau, Michel Attal, Gerald Marit, Claire Mathiot, Thierry Facon, Philippe Moreau, Kenneth C. Anderson, Loïc Campion, Nikhil C. Munshi, and Stéphane Minvielle. 2009. "Prognostic Significance of Copy-Number Alterations in Multiple Myeloma." *Journal of Clinical Oncology*.
- Bakkus, M. H., Carlo Heirman, I. Van Riet, B. Van Camp, and Kris Thielemans. 1992. "Evidence That Multiple Myeloma Ig Heavy Chain VDJ Genes Contain Somatic Mutations but Show No Intraclonal Variation." *Blood*.
- Bartel, B. 2003. "MicroRNAs: At the Root of Plant Development?" *PLANT PHYSIOLOGY*.
- Bartel, D. P. 2007. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function (Reprinted from Cell, Vol 116, Pg 281-297, 2004)." *Cell*.
- Bartel, David P. 2018. "Metazoan MicroRNAs." *Cell*.
- Biasiolo, Marta, Gabriele Sales, Marta Lionetti, Luca Agnelli, Katia Todoerti, Andrea Bisognin, Alessandro Coppe, Chiara Romualdi, Antonino Neri, and Stefania Bortoluzzi. 2011. "Impact of Host Genes and Strand Selection on miRNA and miRNA\* Expression." *PLoS ONE*.
- Binder, M., S. V. Rajkumar, R. P. Ketterling, P. T. Greipp, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, M. A. Gertz, F. K. Buadi, S. R. Hayman, Y. L. Hwa, S. R. Zeldenrust, J. A. Lust, S. J. Russell, N. Leung, P. Kapoor, R. S. Go, W. I. Gonsalves, R. A. Kyle, and S. K. Kumar. 2017. "Prognostic Implications of Abnormalities of Chromosome 13 and the Presence of

- Multiple Cytogenetic High-Risk Abnormalities in Newly Diagnosed Multiple Myeloma.” *Blood Cancer Journal*.
- Bird, A. 2002. “DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory.” *Genes and Development*.
- Borges, Joana, Atanasio Pandiella, and Azucena Esparís-Ogando. 2007. “Erk5 Nuclear Location Is Independent on Dual Phosphorylation, and Favours Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis.” *Cellular Signalling*.
- De Bruyne, Elke, Tomas J. Bos, Frans Schuit, Els Van Valckenborgh, Eline Menu, Lieven Thorrez, Peter Atadja, Helena Jernberg-Wiklund, and Karin Vanderkerken. 2010. “IGF-1 Suppresses Bim Expression in Multiple Myeloma via Epigenetic and Posttranslational Mechanisms.” *Blood*.
- Bruzzese, F., B. Pucci, M. R. Milone, C. Ciardiello, R. Franco, M. I. Chianese, M. Rocco, E. Di Gennaro, A. Leone, A. Luciano, C. Arra, D. Santini, M. Caraglia, and A. Budillon. 2013. “Panobinostat Synergizes with Zoledronic Acid in Prostate Cancer and Multiple Myeloma Models by Increasing ROS and Modulating Mevalonate and P38-MAPK Pathways.” *Cell Death and Disease*.
- Calin, George A. and Carlo M. Croce. 2006. “MicroRNA Signatures in Human Cancers.” *Nature Reviews Cancer*.
- Carrasco, Daniel R., Giovanni Tonon, Yongsheng Huang, Yunyu Zhang, Raktim Sinha, Bin Kenneth C. Anderson, Lynda Chin, John D. Shaughnessy, Cameron Brennan, and Ronald A. DePinho. 2006. “High-Resolution Genomic Profiles Define Distinct Clinico-Pathogenetic Subgroups of Multiple Myeloma Patients.” *Cancer Cell*.
- Chang, David W., Zheng Xing, Yi Pan, Alicia Algeciras-Schimmich, Bryan C. Barnhart, Shoshanit Yaish-Ohad, Marcus E. Peter, and Xiaolu Yang. 2002. “C-FLIPL Is a Dual Function Regulator for Caspase-8 Activation and CD95-Mediated Apoptosis.” *EMBO Journal*.
- Chen, D., M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, and Q. P. Dou. 2011. “Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives.” *Current Cancer Drug Targets*.
- Chen, Quan, Bendi Gong, Ashraf S. Mahmoud-Ahmed, Aimin Zhou, Eric D. Hsi, Mohamad Hussein, and Alexandru Almasan. 2001. “Apo2L/TRAIL and Bcl-2-Related Proteins Regulate Type I Interferon-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma.” *Blood*.
- Chen, Quan, Subrata Ray, Muhamad A. Hussein, Gordan Srkalovic, and Alexandru Almasan. 2003. “Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-Family Proteins Apoptosis of Multiple Myeloma.” *Leukemia and Lymphoma*.
- Chen, Xi, Elena Diaz-Rodriguez, Enrique M. Ocio, Bruno Paiva, Deborah S. Mortensen, Antonia Lopez-Girona, Rajesh Chopra, Jesus San Miguel, and Atanasio Pandiella. 2014. “Genetic and Pharmacologic Evidence That MTOR Targeting Outweighs MTORC1 Inhibition as an Antimyeloma Strategy.” *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Chen, Zhijian J. 2012. “Ubiquitination in Signaling to and Activation of IKK.” *Immunological Reviews*.
- Cheng, T., L. Grasse, J. Shah, and J. Chandra. 2015. “Panobinostat, a Pan-Histone Deacetylase Inhibitor: Rationale for and Application to Treatment of Multiple Myeloma.” *Drugs of Today*.
- Chng, W. J., O. Glebov, P. L. Bergsagel, and W. M. Kuehl. 2007. “Genetic Events in the Pathogenesis of Multiple Myeloma.” *Best Practice and Research: Clinical Haematology*.
- Ciechanover, Aaron. 2005. “Proteolysis: From the Lysosome to Ubiquitin and the Proteasome.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Corthals, S. L., S. M. Sun, R. Kuiper, Y. de Knecht, A. Broyl, B. van der Holt, H. B. Beverloo, J. K. Peeters, L. el Jarari, H. M. Lokhorst, S. Zweegman, M. Jongen-Lavrencic, and P. Sonneveld. 2011. “MicroRNA Signatures Characterize Multiple Myeloma Patients.” *Leukemia*.
- Cotner, T., H. Mashimo, P. C. Kung, G. Goldstein, and J. S. Strominger. 1981. “Human T Cell Surface Antigens Bearing a Structural Relationship to HLA Antigens.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.

- Croce, Carlo M. 2008. "Oncogenes and Cancer. Supplementary Appendix." *The New England Journal of Medicine*.
- Cullen, Bryan R. 2004. "Transcription and Processing of Human MicroRNA Precursors." *Molecular Cell*.
- Cullen, S. P., C. Gerner, S. J. Martin, J. G. Walsh, C. Sheridan, and A. U. Luthi. 2008. "Executioner Caspase-3 and Caspase-7 Are Functionally Distinct Proteases." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Darzynkiewicz, Zbigniew and Frank Traganos. 1998. "Measurement of Apoptosis." in *Apoptosis*.
- Van Delft, Mark F. and David C. S. Huang. 2006. "How the Bcl-2 Family of Proteins Interact to Regulate Apoptosis." in *Cell Research*.
- Denli, Ahmet M., Bastiaan B. J. Tops, Ronald H. A. Plasterk, René F. Ketting, and Gregory J. Hannon. 2004. "Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature*.
- Díaz-Rodríguez, Elena, Stela Álvarez-Fernández, Xi Chen, Bruno Paiva, Ricardo López-Pérez, Juan Luis García-Hernández, Jesús F. San Miguel, and Atanasio Pandiella. 2011. "Deficient Spindle Assembly Checkpoint in Multiple Myeloma." *PLoS ONE*.
- Díaz-Rodríguez, Elena and Atanasio Pandiella. 2016. "Modulation of Cereblon Levels by Anti-Myeloma Agents." *Leukemia and Lymphoma*.
- Dimberg, L. Y., C. K. Anderson, R. Camidge, K. Behbakht, A. Thorburn, and H. L. Ford. 2013. "On the TRAIL to Successful Cancer Therapy: Predicting and Counteracting Resistance against TRAIL-Based Therapeutics." *Oncogene*.
- Dimopoulos, Meletios A., Albert Oriol, Hareth Nahi, Jesus San-Miguel, Nizar J. Bahlis, Saad Z. Usmani, Neil Rabin, Robert Z. Orlowski, Mieczyslaw Komarnicki, Kenshi Suzuki, Nushmia Z. Khokhar, Lisa O'Rourke, Christopher Chiu, Xiang Qin, Mary Guckert, Tahamtan Ahmadi, and Philippe Moreau. 2016. "Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Drexler, Hans G. and Yoshinobu Matsuo. 2000. "Malignant Hematopoietic Cell Lines: In Vitro Models for the Study of Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia." *Leukemia Research*.
- Eckschlager, Tomas, Johana Plch, Marie Stiborova, and Jan Hrabeta. 2017. "Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Ehrhardt, Harald, Simone Fulda, Irene Schmid, John Hiscott, Klaus Michael Debatin, and Irmela Jeremias. 2003. "TRAIL Induced Survival and Proliferation in Cancer Cells Resistant towards TRAIL-Induced Apoptosis Mediated by NF-KB." *Oncogene*.
- Elkayam, Elad, Claus D. Kuhn, Ante Tocilj, Astrid D. Haase, Emily M. Greene, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2012. "The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with MiR-20a." *Cell*.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology*.
- Esquela-Kerscher, Aurora and Frank J. Slack. 2006. "Oncomirs - MicroRNAs with a Role in Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- F, Tian, Zhan Y. 2018. "MicroRNA-497 Inhibits Multiple Myeloma Growth and Increases Susceptibility to Bortezomib by Targeting Bcl-2." *International Journal of Molecular Medicine* 43(2):1058–66.
- Favaloro, B., N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, and V. De Laurenzi. 2012. "Role of Apoptosis in Disease." *Aging*.
- Fujimoto, Yuri, Yoshimi Nakagawa, Akiko Shingyouchi, Naoko Tokushige, Noriko Nakanishi, Ao Suzuki, Naoya Yahagi, Osamu Urayama, Nobuhiro Yamada, and Hitoshi Shimano. 2012. "Dicer Has a Crucial Role in the Early Stage of Adipocyte Differentiation, but Not in Lipid Synthesis, in 3T3-L1 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Gallastegui, Nerea and Michael Groll. 2010. "The 26S Proteasome: Assembly and Function of a Destructive Machine." *Trends in Biochemical Sciences*.

- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. "Cell Death Modalities: Classification and Pathophysiological Implications." *Cell Death and Differentiation*.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. "Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death and Differentiation*.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Wang, James A. Wells, Will Wood, Junying Yuan, Zahra Zakeri, Boris Zhivotovsky, Laurence Zitvogel, Gerry Melino, and Guido Kroemer. 2018. "Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death and Differentiation*.
- Gao, Jin Song, Yingjie Zhang, Ming Li, Lynne D. Tucker, Jason T. Machan, Peter Quesenberry, Isidore Rigoutsos, and Bharat Ramratnam. 2010. "Atypical Transcription of MicroRNA Gene Fragments." *Nucleic Acids Research*.
- Gao, Xiao, Run Zhang, Xiaoyan Qu, Min Zhao, Sensen Zhang, Hanxin Wu, Li Jianyong, and Lijuan Chen. 2012. "MiR-15a, MiR-16-1 and MiR-17-92 Cluster Expression Are Linked to Poor Prognosis in Multiple Myeloma." *Leukemia Research*.
- Garzon, Ramiro, Muller Fabbri, Amelia Cimmino, George A. Calin, and Carlo M. Croce. 2006. "MicroRNA Expression and Function in Cancer." *Trends in Molecular Medicine*.
- Gavriatopoulou, Maria, Evangelos Terpos, Efsthios Kastiris, and Meletios A. Dimopoulos. 2017. "Efficacy and Safety of Elotuzumab for the Treatment of Multiple Myeloma." *Expert Opinion on Drug Safety*.
- Goldberg, Alfred L., Paolo Cascio, Tomo Saric, and Kenneth L. Rock. 2002. "The Importance of the Proteasome and Subsequent Proteolytic Steps in the Generation of Antigenic Peptides." *Molecular Immunology*.
- Gómez-Benito, Maria, Maria José Martínez-Lorenzo, Alberto Anel, Isabel Marzo, and Javier Naval. 2007. "Membrane Expression of DR4, DR5 and Caspase-8 Levels, but Not Mcl-1, Determine Sensitivity of Human Myeloma Cells to Apo2L/TRAIL." *Experimental Cell Research*.
- Gong, Hongyan, Weicai Cheng, and Yong Wang. 2018. "Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Inhibits the Growth and Aggressiveness of Colon Carcinoma via the Exogenous Apoptosis Signaling Pathway." *Experimental and Therapeutic Medicine*.
- Gottesman, Michael M. 2002. "Mechanisms of Cancer Drug Resistance." *Annual Review of Medicine*.
- Greenstein, Stephanie, Nancy L. Krett, Yoshihiro Kurosawa, Chunguang Ma, Dharminder Chauhan, Teru Hideshima, Kenneth C. Anderson, and Steven T. Rosen. 2003. "Characterization of the MM.1 Human Multiple Myeloma (MM) Cell Lines: A Model System to Elucidate the Characteristics, Behavior, and Signaling of Steroid-Sensitive and -Resistant MM Cells." *Experimental Hematology*.
- Grell, Matthias, Gudrun Zimmermann, Eva Gottfried, Chun Ming Chen, Uli Grünwald, David C. S. Huang, Yan Hwa Wu Lee, Horst Dürkop, Hartmut Engelmann, Peter Scheurich, Harald Wajant, and Andreas Strasser. 1999. "Induction of Cell Death by Tumour Necrosis Factor (TNF) Receptor 2, CD40 and CD30: A Role for TNF-R1 Activation by Endogenous Membrane-Anchored TNF." *EMBO Journal*.
- Gutiérrez, N. C., M. V. Castellanos, M. L. Martín, M. V. Mateos, J. M. Hernández, M. Fernández, D. Carrera, L. Rosiñol, J. M. Ribera, J. M. Ojanguren, L. Palomera, S. Gardella, L. Escoda, J. C. Hernández-Boluda, J. L. Bello, J. de la Rubia, J. J. Lahuerta, and J. F. San Miguel. 2007. "Prognostic and Biological Implications of Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation: T(4;14) Is the Most Relevant Adverse Prognostic Factor, Whereas RB Deletion as a Unique Abnormality Is Not Associated With." *Leukemia*.

- Gutiérrez, N. C., M. E. Sarasquete, I. Misiewicz-Krzeminska, M. Delgado, J. De Las Rivas, F. V. Ticona, E. Fermián, P. Martín-Jiménez, C. Chillón, A. Risuño, J. M. Hernández, R. García-Sanz, M. González, and J. F. San Miguel. 2010. "Deregulation of MicroRNA Expression in the Different Genetic Subtypes of Multiple Myeloma and Correlation with Gene Expression Profiling." *Leukemia*.
- Hallek, M., P. L. Bergsagel, K. C. Anderson, Mindaugas Andrusis, Ute Ungethüm, Ralf-Jürgen Kuban, Heike Lorentz, Kurt Bommert, Max Topp, Doris Krämer, Hans Konrad Müller-Hermelink, Hermann Einsele, Axel Greiner, and Ralf C. Bargou. 1998. "Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process." *Blood*.
- Hammond, Scott M. 2015. "An Overview of MicroRNAs." *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Han, Jinju, Yoontae Lee, Kyu Hyeon Yeom, Jin Wu Nam, Inha Heo, Je Keun Rhee, Sun Young Sohn, Yunje Cho, Byoung Tak Zhang, and V. Narry Kim. 2006. "Molecular Basis for the Recognition of Primary MicroRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex." *Cell*.
- Hanamura, Ichiro, James P. Stewart, Yongsheng Huang, Fenghuang Zhan, Madhumita e, and John D. Shaughnessy. 2006. "Frequent Gain of Chromosome Band 1q21 in Plasma-Cell Dyscrasias Detected by Fluorescence in Situ Hybridization: Incidence Increases from MGUS to Relapsed Myeloma and Is Related to Prognosis and Disease Progression Following Tandem Stem-Cell Transplantation." *Blood*.
- Harada, Takeshi, Teru Hideshima, and Kenneth C. Anderson. 2016. "Histone Deacetylase Inhibitors in Multiple Myeloma: From Bench to Bedside." *International Journal of Hematology*.
- Hatada, Izuho. 2010. "The Epigenomics of Cancer." in *An Omics Perspective on Cancer Research*.
- Hayes, Josie, Pier Paolo Peruzzi, and Sean Lawler. 2014. "MicroRNAs in Cancer: Biomarkers, Functions and Therapy." *Trends in Molecular Medicine*.
- Hideshima, Teru, Constantine Mitsiades, Giovanni Tonon, Paul G. Richardson, and Kenneth C. Anderson. 2007. "Understanding Multiple Myeloma Pathogenesis in the Bone Marrow to Identify New Therapeutic Targets." *Nature Reviews Cancer*.
- Ho, Tsing Fen and Chia Che Chang. 2015. "A Promising 'TRAIL' of Tanshinones for Cancer Therapy." *BioMedicine (Netherlands)*.
- Hou J, Qiu L, Zhao Y, Zhang X, Liu Y, Wang Z, Zhou F, Leng Y, Yang S, Xi H, Wang F, Zhu B, Chen W, Wei P, Zheng X. 2018. "A Phase 1b Dose Escalation Study of Recombinant Circularly Permuted TRAIL in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma." *American Journal of Clinical Oncology* 41(10):1008–14.
- Hunter, Shaun, Katlin Massirer, Janette Holtz, Rachel Eachus, Amy E. Pasquinelli, John Bracht, and Shveta Bagga. 2005. "Regulation by Let-7 and Lin-4 MiRNAs Results in Target mRNA Degradation." *Cell*.
- Igney, Frederik H. and Peter H. Krammer. 2002. "DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS." *Nature Reviews Cancer*.
- Jin, Bilian, Yajun Li, and Keith D. Robertson. 2011. "DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?" *Genes and Cancer*.
- Johnson, W. Evan, Cheng Li, and Ariel Rabinovic. 2007. "Adjusting Batch Effects in Microarray Expression Data Using Empirical Bayes Methods." *Biostatistics*.
- Kagawa, Kumiko, Ayako Nakano, Hirokazu Miki, Asuka Oda, Hiroe Amou, Kyoko Takeuchi, Shingen Nakamura, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kenichiro Yata, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, and Masahiro Abe. 2012. "Inhibition of Tace Activity Enhances the Susceptibility of Myeloma Cells to TRAIL." *PLoS ONE*.
- Kalushkova, Antonia, Märten Fryknäs, Miguel Lemaire, Charlotte Fristedt, Prasoon Agarwal, Maria Eriksson, Sarah Deleu, Peter Atadja, Anders Österborg, Kenneth Nilsson, Karin Vanderkerken, Fredrik Öberg, and Helena Jernberg-Wiklund. 2010. "Polycomb Target Genes Are Silenced in Multiple Myeloma." *PLoS ONE*.
- Kane, R. C. 2003. "Velcade(R): U.S. FDA Approval for the Treatment of Multiple Myeloma Progressing on Prior Therapy." *The Oncologist*.
- Kane, Robert C., Ann T. Farrell, Rajeshwari Sridhara, and Richard Pazdur. 2006. "United States Food and Drug Administration Approval Summary: Bortezomib for the Treatment

- of Progressive Multiple Myeloma after One Prior Therapy.” *Clinical Cancer Research*. Kanehisa, Minoru, Yoko Sato, Miho Furumichi, Kanae Morishima, and Mao Tanabe. 2018. “New Approach for Understanding Genome Variations in KEGG.” *Nucleic Acids Research*.
- Von Karstedt, Silvia, Antonella Montinaro, and Henning Walczak. 2017. “Exploring the TRAILs Less Travelled: TRAIL in Cancer Biology and Therapy.” *Nature Reviews Cancer*.
- Kehlenbach, Ralph H., Achim Dickmanns, Angelika Kehlenbach, Tinglu Guan, and Larry Gerace. 1999. “A Role for RanBP1 in the Release of CRM1 from the Nuclear Pore Complex in a Terminal Step of Nuclear Export.” *Journal of Cell Biology*.
- Kim, Sung Hyun, Myoung Ok Kim, Hyo Jeong Kim, Sanjiv Neupane, Hyung Joon Kim, Ji Hye Lee, Hong Hee Kim, Jae Young Kim, and Youngkyun Lee. 2018. “Bortezomib Prevents Ovariectomy-Induced Osteoporosis in Mice by Inhibiting Osteoclast Differentiation.” *Journal of Bone and Mineral Metabolism*.
- Kim, V. Narry and Jin Wu Nam. 2006. “Genomics of MicroRNA.” *Trends in Genetics*.
- Kimberley, Fiona C. and Gavin R. Screaton. 2004. “Following a TRAIL: Update on a Ligand and Its Five Receptors.” *Cell Research*.
- Kisselev, A. F. and A. L. Goldberg. 2001. “Proteasome Inhibitors: From Research Tools to Drug Candidates.” *Chemistry and Biology*.
- Korde, Neha, Sigurdur Y. Kristinsson, and Ola Landgren. 2011. “Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Smoldering Multiple Myeloma (SMM): Novel Biological Insights and Development of Early Treatment Strategies.” *Blood*.
- Kozomara, Ana and Sam Griffiths-Jones. 2014. “MiRBase: Annotating High Confidence MicroRNAs Using Deep Sequencing Data.” *Nucleic Acids Research*.
- Kuehl, W. Michael and P. Leif Bergsagel. 2012. “Molecular Pathogenesis of Multiple Myeloma and Its Premalignant Precursor.” *Journal of Clinical Investigation*.
- Kumar, Shaji K., S. Vincent Rajkumar, Angela Dispenzieri, Martha Q. Lacy, Suzanne R. Hayman, Francis K. Buadi, Steven R. Zeldenrust, David Dingli, Stephen J. Russell, John A. Lust, Philip R. Greipp, Robert A. Kyle, and Morie A. Gertz. 2008. “Improved Survival in Multiple Myeloma and the Impact of Novel Therapies.” *Blood*.
- Kyle, Robert A. and S. Vincent Rajkumar. 2008. “Multiple Myeloma ASH 50th Anniversary Review Multiple Myeloma.” *Blood* 111(6):2962–72.
- Lau, Pick Wei, Keelan Z. Guiley, Nabanita De, Clinton S. Potter, Bridget Carragher, and Ian J. MacRae. 2012. “The Molecular Architecture of Human Dicer.” *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Laubach, Jacob P., Philippe Moreau, Jesús F. San-Miguel, and Paul G. Richardson. 2015. “Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma.” *Clinical Cancer Research*.
- Lawrie, Charles H. 2007. “MicroRNA Expression in Lymphoma.” *Expert Opinion on Biological Therapy*.
- LeBlanc, Richard, Laurence P. Catley, Teru Hideshima, Suzanne Lentzsch, Constantine S. Mitsiades, Nicholas Mitsiades, Donna Neuberg, Olga Goloubeva, Christine S. Pien, Julian Adams, Deepak Gupta, Paul G. Richardson, Nikhil C. Munshi, and Kenneth C. Anderson. 2002. “Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Human Myeloma Cell Growth in Vivo and Prolongs Survival in a Murine Model.” *Cancer Research*.
- Leng, Yun, Jian Hou, Jie Jin, Mei Zhang, Xiaoyan Ke, Bin Jiang, Ling Pan, Linhua Yang, Fang Zhou, Jianmin Wang, Zhao Wang, Li Liu, Wei Li, Zhixiang Shen, Lugui Qiu, Naibai Chang, Jianyong Li, Jing Liu, Hongyan Pang, Haitao Meng, Peng Wei, Hua Jiang, Yan Liu, Xiangjun Zheng, Shifang Yang, and Wenming Chen. 2017. “Circularly Permuted TRAIL plus Thalidomide and Dexamethasone versus Thalidomide and Dexamethasone for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: A Phase 2 Study.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.
- Leo, R., M. Boeker, D. Peest, R. Hein, R. Bartl, J. E. Gessner, J. Seibach, G. Wacker, and H. Deicher. 1992. “Multiparameter Analyses of Normal and Malignant Human Plasma Cells: CD38<sup>++</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, Clg<sup>+</sup> Is the Common Phenotype of Myeloma Cells.” *Annals of Hematology*.

- Di Leva, Gianpiero and Carlo M. Croce. 2015. "The Role of MicroRNAs in Cancer." in *Targeted Therapy in Translational Cancer Research*.
- Li, Yanjie, Bingyun Zhang, Wenjing Li, Lijin Wang, Zhiling Yan, Hujun Li, Yao Yao, Ruosi Yao, Kailin Xu, and Zhenyu Li. 2016. "MiR-15a/16 Regulates the Growth of Myeloma Cells, Angiogenesis and Antitumor Immunity by Inhibiting Bcl-2, VEGF-A and IL-17 Expression in Multiple Myeloma." *Leukemia Research*.
- Lian X, Huang Z. 2018. "Mechanisms Underlying the Increased Chemosensitivity of Bortezomib-Resistant Multiple Myeloma by Silencing Nuclear Transcription Factor Snail1." *Oncology Report* 41(1):415–26.
- Ling, Hui, Muller Fabbri, and George A. Calin. 2013. "MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs as Targets for Anticancer Drug Development." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Lionetti, Marta, Marta Biasiolo, Luca Agnelli, Katia Todoerti, Laura Mosca, Sonia Fabris, Bortoluzzi, and Antonino Neri. 2009. "Identification of MicroRNA Expression Patterns and Definition of a MicroRNA/MRNA Regulatory Network in Distinct Molecular Groups of Multiple Myeloma." *Blood*.
- Liu, Feng Ting, Samir G. Agrawal, John G. Gribben, Hongtao Ye, Ming Qing Du, Adrian C. Newland, and Li Jia. 2008. "Bortezomib Blocks Bax Degradation in Malignant B Cells during Treatment with TRAIL." *Blood*.
- Liu, Shuzhen, Wanda Kwan, Joanna M. Lubieniecka, Torsten O. Nielsen, and Hongwei Cheng. 2008. "Histone Deacetylase Inhibitors Induce Growth Arrest, Apoptosis, and Differentiation in Clear Cell Sarcoma Models." *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Lokhorst, Henk M., Torben Plesner, Jacob P. Laubach, Hareth Nahi, Peter Gimsing, Markus Hansson, Monique C. Minnema, Ulrik Lassen, Jakub Krejci, Antonio Palumbo, Niels W. C. J. van de Donk, Tahamtan Ahmadi, Imran Khan, Clarissa M. Uhlir, Jianping Wang, A. Kate Sasser, Nedjad Losic, Steen Lisby, Linda Basse, Nikolai Brun, and Paul G. Richardson. 2015. "Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Longley, D. B., T. R. Wilson, M. McEwan, W. L. Allen, U. McDermott, L. Galligan, and P. G. Johnston. 2006. "C-FLIP Inhibits Chemotherapy-Induced Colorectal Cancer Cell Death." *Oncogene*.
- Van Loo, G., X. Saelens, M. Van Gurp, M. MacFarlane, S. J. Martin, and P. Vandenabeele. 2002. "The Role of Mitochondrial Factors in Apoptosis: A Russian Roulette with More than One Bullet." *Cell Death and Differentiation*.
- López-Camarillo, César and Laurence A. Marchat. 2013. *MicroRNAs in Cancer*.
- López-Corral, Lucía, Norma C. Gutiérrez, María Belén Vidriales, María Victoria Mateos, Ana Rasillo, Ramón García-Sanz, Bruno Paiva, and Jesús F. San Miguel. 2011. "The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells." *Clin Cancer Res*.
- Lu, Jun, Gad Getz, Eric A. Miska, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Justin Lamb, David Peck, Alejandro Sweet-Cordero, Benjamin L. Ebert, Raymond H. Mak, Adolfo A. Ferrando, James R. Downing, Tyler Jacks, H. Robert Horvitz, and Todd R. Golub. 2005. "MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers." *Nature*.
- LY, Dimberg, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, and Ford HL. 2012. "On the TRAIL to Successful Cancer Therapy? Predicting and Counteracting Resistance against TRAIL-Based Therapeutics." *Oncogene*.
- Ma, Li, Julie Teruya-Feldstein, and Robert A. Weinberg. 2007. "Tumour Invasion and Metastasis Initiated by MicroRNA-10b in Breast Cancer." *Nature*.
- Madeo, Frank, Didac Carmona-Gutierrez, Julia Ring, Sabrina Büttner, Tobias Eisenberg, and Guido Kroemer. 2009. "Caspase-Dependent and Caspase-Independent Cell Death Pathways in Yeast." *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Magen, Hila and Eli Muchtar. 2016. "Elotuzumab: The First Approved Monoclonal Antibody for Multiple Myeloma Treatment." *Therapeutic Advances in Hematology*.
- Magill, Laura, John Lynas, Trenn C. M. Morris, Brian Walker, and Alexandra E. Irvine. 2004. "Proteasome Proteolytic Activity in Hematopoietic Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma." *Haematologica*.

- Maiso, Patricia, Xonia Carvajal-Vergara, Enrique M. Ocio, Ricardo López-Pérez, Gema Mateo, Norma Gutiérrez, Peter Atadja, Atanasio Pandiella, and Jesus F. San Miguel. 2006. "The Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Is a Potent Antimyeloma Agent That Overcomes Drug Resistance." *Cancer Research*.
- Manasanch, Elisabet E. and Robert Z. Orlowski. 2017. "Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy." *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Di Marzo, Lucia, Vanessa Desantis, Antonio Giovanni Solimando, Simona Ruggieri, Tiziana Annese, Beatrice Nico, Ruggiero Fumarulo, Angelo Vacca, and Maria Antonia Frassanito. 2016. "Microenvironment Drug Resistance in Multiple Myeloma: Emerging New Players." *Oncotarget*.
- Mateos, María-Victoria, Meletios A. Dimopoulos, Michele Cavo, Kenshi Suzuki, Andrzej Jakubowiak, Stefan Knop, Chantal Doyen, Paulo Lucio, Zsolt Nagy, Polina Kaplan, Ludek Pour, Mark Cook, Sebastian Grosicki, Andre Crepaldi, Anna M. Liberati, Philip Campbell, Tatiana Shelekhova, Sung-Soo Yoon, Genadi Iosava, Tomoaki Fujisaki, Mamta Garg, Christopher Chiu, Jianping Wang, Robin Carson, Wendy Crist, William Deraedt, Huong Nguyen, Ming Qi, and Jesus San-Miguel. 2017. "Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Mateos, María Victoria, Enrique M. Ocio, and Jesús F. San Miguel. 2013. "Novel Generation of Agents with Proven Clinical Activity in Multiple Myeloma." *Seminars in Oncology*.
- Matranga, Christian, Yukihide Tomari, Chanseok Shin, David P. Bartel, and Phillip D. Zamore. 2005. "Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes." *Cell*.
- Maus, Marcela V. and Carl H. June. 2014. "Carts on the Road for Myeloma." *Clinical Cancer Research*.
- McCarthy, Philip L. and Antonio Palumbo. 2014. "Maintenance Therapy for Multiple Myeloma." *Hematology/Oncology Clinics of North America*.
- Menoret, Emmanuelle, Patricia Gomez-Bougie, Alexandrine Geffroy-Luseau, Sylvanne Daniels, Philippe Moreau, Steven Le Gouill, Jean Luc Harousseau, Regis Bataille, Martine Amiot, and Catherine Pellat-Deceunynck. 2006. "Mcl-1L Cleavage Is Involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-Mediated Apoptosis Induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 Human MAbs in Myeloma Cells." *Blood*.
- Miguel, Jesus San. 2014. "Multiple Myeloma: A Model for Scientific and Clinical Progress." *Hematology*.
- Minucci, Saverio and Pier Giuseppe Pelicci. 2006. "Histone Deacetylase Inhibitors and the Promise of Epigenetic (and More) Treatments for Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Misiewicz-Krzeminska, Irena, María E. Sarasquete, Dalia Quwaider, Patryk Krzeminski, Fany V. Ticona, Teresa Paíno, Manuel Delgado, Andreia Aires, Enrique M. Ocio, Ramón García-Sanz, Jesús F. San Miguel, and Norma C. Gutiérrez. 2013. "Restoration of MicroRNA-214 Expression Reduces Growth of Myeloma Cells through Positive Regulation of P53 and Inhibition of DNA Replication." *Haematologica*.
- Mitsiades, Constantine S., Steven P. Treon, Nicholas Mitsiades, Yoshihito Shima, Paul Richardson, Robert Schlossman, Teru Hideshima, and Kenneth C. Anderson. 2001. "TRAIL/Apo2L Ligand Selectively Induces Apoptosis and Overcomes Drug Resistance in Multiple Myeloma: Therapeutic Applications." *Blood*.
- Mitsiades, Nicholas, Constantine S. Mitsiades, Paul G. Richardson, Ciaran McMullan, Vassiliki Poulaki, Galinos Fanourakis, Robert Schlossman, Dharminder Chauhan, Nikhil C. Munshi, Teru Hideshima, Victoria M. Richon, Paul A. Marks, and Kenneth C. Anderson. 2003. "Molecular Sequelae of Histone Deacetylase Inhibition in Human Malignant B Cells." *Blood*.
- MO, Hengartner. 2001. "Apoptosis: DNA Destroyers." *Nature*.
- Moreau, P., I. I. Karamanesht, N. Domnikova, My Kyselyova, K. Vilchevska, Va Doronin, A. Schmidt, C. Hulin, X. Leleu, D. L. Esseltine, K. Venkatakrisnan, Dm Skee, H. Feng, S. Girgis, Az Cakana, Wm Deraedt, and T. Facon. 2011. "Pharmacokinetics (PK) and Pharmacodynamics (PD) of Subcutaneous versus Intravenous Administration of

- Bortezomib in Patients with Relapsed Multiple Myeloma: Effects of Subcutaneous Injection Site and Concentration, and Patient Characteristics." *Blood*.
- Moreau, Philippe, Georgi G. Mihaylov, Vladimír Maisnar, William I. Bensinger, A. Keith Vesselina Goranova-Marinova, Margaret E. Tonda, Ruben Niesvizky, S. Vincent Rajkumar, and Vishal Kukreti. 2014. "Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Moreau, Philippe and Cyrille Touzeau. 2014. "Elotuzumab for the Treatment of Multiple Myeloma." *Future Oncology*.
- Morgan, Gareth J., Brian A. Walker, and Faith E. Davies. 2012. "The Genetic Architecture of Multiple Myeloma." *Nature Reviews Cancer*.
- Müller-Sienerth, Nicole, Lena Dietz, Philipp Holtz, Markus Kapp, Götz Ulrich Grigoleit, Carsten Schmuck, Harald Wajant, and Daniela Siegmund. 2011. "SMAC Mimetic BV6 Induces Cell Death in Monocytes and Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells." *PLoS ONE*.
- Musolino, Caterina, Giacomo Oteri, Alessandro Allegra, Manuela Mania, Angela D'Ascola, Angela Avenoso, Vanessa Innao, Andrea Gaetano Allegra, and Salvatore Campo. 2018. "Altered MicroRNA Expression Profile in the Peripheral Lymphoid Compartment of Multiple Myeloma Patients with Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw." *Annals of Hematology*.
- Nasrin, Rastgoo, Pourabdilloah Maryam. 2018. "Dysregulation of EZH2/MiR-138 Axis Contributes to Drug Resistance in Multiple Myeloma by Downregulating RBPMS." *Leukemia* 32:2471–82.
- Ocio, E. M., D. Fernández-Lázaro, L. San-Segundo, L. López-Corral, L. A. Corchete, N. C. Gutiérrez, M. Garayoa, T. Paíno, A. García-Gómez, M. Delgado, J. C. Montero, E. Díaz-Rodríguez, M. V. Mateos, A. Pandiella, S. Couto, M. Wang, C. C. Bjorklund, and J. F. San-Miguel. 2015. "In Vivo Murine Model of Acquired Resistance in Myeloma Reveals Differential Mechanisms for Lenalidomide and Pomalidomide in Combination with Dexamethasone." *Leukemia*.
- Ocio, E. M., P. G. Richardson, S. V. Rajkumar, A. Palumbo, M. V. Mateos, R. Orłowski, S. Kumar, S. Usmani, D. Roodman, R. Niesvizky, H. Einsele, K. C. Anderson, M. A. Dimopoulos, H. Avet-Loiseau, U. H. Mellqvist, I. Turesson, G. Merlini, R. Schots, P. McCarthy, L. Bergsagel, C. S. Chim, J. J. Lahuerta, J. Shah, A. Reiman, J. Mikhael, S. Zweegman, S. Lonial, R. Comenzo, W. J. Chng, P. Moreau, P. Sonneveld, H. Ludwig, B. G. M. Durie, and J. F. S. Miguel. 2014. "New Drugs and Novel Mechanisms of Action in Multiple Myeloma in 2013: A Report from the International Myeloma Working Group (IMWG)." *Leukemia*.
- Ocio, Enrique M. and Jesús F. San Miguel. 2010. "The DAC System and Associations with Multiple Myeloma." *Investigational New Drugs*.
- Ormerod, Michael G., Xiao Ming Sun, David Brown, Roger T. Snowden, and Gerald M. Cohen. 1993. "Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry." *Acta Oncologica*.
- Palumbo, Antonio, Federica Cavallo, Francesca Gay, Francesco Di Raimondo, Dina Ben ino Musto, Andrea Evangelista, Giovannino Ciccone, Paola Omedé, Claudia Crippa, Paolo Corradini, Arnon Nagler, Mario Boccadoro, and Michele Cavo. 2014. "Autologous Transplantation and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Palumbo, Antonio, Asher Chanan-Khan, Katja Weisel, Ajay K. Nooka, Tamas Masszi, Meral Beksac, Ivan Spicka, Vania Hungria, Markus Munder, Maria V. Mateos, Tomer M. Mark, Ming Qi, Jordan Schecter, Himal Amin, Xiang Qin, William Deraedt, Tahamtan Ahmadi, Andrew Spencer, and Pieter Sonneveld. 2016. "Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Pennarun, Bodvaël, Annemieke Meijer, Elisabeth G. E. de Vries, Jan H. Kleibeuker, Frank Kruyt, and Steven de Jong. 2010. "Playing the DISC: Turning on TRAIL Death Receptor-Mediated Apoptosis in Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.

- Peters, Jan M., Zdenka Cejka, J. Robin Harris, Jürgen A. Kleinschmidt, and Wolfgang Baumeister. 1993. "Structural Features of the 26 S Proteasome Complex." *Journal of Molecular Biology*.
- Petrocca, Fabio, Rosa Visone, Mariadele Rapazzotti Onelli, Manisha H. Shah, Milena S. Nicoloso, Ivana de Martino, Dimitrios Iliopoulos, Emanuela Pillozzi, Chang Gong Liu, Massimo Negrini, Luigi Cavazzini, Stefano Volinia, Hansjuerg Alder, Luigi P. Ruco, Gustavo Baldassarre, Carlo M. Croce, and Andrea Vecchione. 2008. "E2F1-Regulated MicroRNAs Impair TGF $\beta$ -Dependent Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Gastric Cancer." *Cancer Cell*.
- Pichiorri, F., S. S. Suh, M. Ladetto, M. Kuehl, T. Palumbo, D. Drandi, C. Taccioli, N. Zanesi, H. Alder, J. P. Hagan, R. Munker, S. Volinia, M. Boccadoro, R. Garzon, A. Palumbo, R. I. Aqeilan, and C. M. Croce. 2008. "MicroRNAs Regulate Critical Genes Associated with Multiple Myeloma Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Pratt, Dexter, Jing Chen, David Welker, Ricardo Rivas, Rudolf Pillich, Vladimir Rynkov, Keiichiro Ono, Carol Miello, Lyndon Hicks, Sandor Szalma, Aleksandar Stojmirovic, Radu Dobrin, Michael Braxenthaler, Jan Kuentzer, Barry Demchak, and Trey Ideker. 2015. "NDEx, the Network Data Exchange." *Cell Systems*.
- Rafael Fonseca, Richard J. Bailey, Gregory J. Ahmann et al. 2001. "Genomic Abnormalities in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance." *Blood*.
- Rajkumar, S. Vincent. 2016. "Myeloma Today: Disease Definitions and Treatment Advances." *American Journal of Hematology*.
- Rajkumar, S. Vincent, Meletios A. Dimopoulos, Antonio Palumbo, Joan Blade, Giampaolo Merlini, María Victoria Mateos, Shaji Kumar, Jens Hillengass, Efsthios Kastritis, Paul Richardson, Ola Landgren, Bruno Paiva, Angela Dispenzieri, Brendan Weiss, Xavier Robert A. Kyle, Kenneth C. Anderson, Brian G. M. Durie, and Jesus F. Sa. Miguel. 2014. "International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma." *The Lancet Oncology*.
- Rajkumar, S. Vincent, Angela Dispenzieri, and Robert A. Kyle. 2006. "Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Waldenström Macroglobulinemia, AL Amyloidosis, and Related Plasma Cell Disorders: Diagnosis and Treatment." in *Mayo Clinic Proceedings*.
- Ren, Yuyue, Xiaoyun Li, Wei Wang, Wanting He, Jinghua Wang, and Ying Wang. 2017. "Expression of Peripheral Blood MiRNA-720 and MiRNA-1246 Can Be Used as a Predictor for Outcome in Multiple Myeloma Patients." *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*.
- Richardson, Paul G., Constantine S. Mitsiades, Jacob P. Laubach, Roman Hajek, Ivan Spicka, Meletios A. Dimopoulos, Philippe Moreau, David S. Siegel, Sundar Jagannath, and Kenneth C. Anderson. 2013. "Preclinical Data and Early Clinical Experience Supporting the Use of Histone Deacetylase Inhibitors in Multiple Myeloma." *Leukemia Research*.
- Richardson, Paul G., Pieter Sonneveld, Michael W. Schuster, David Irwin, Edward A. Stadtmauer, Thierry Facon, Jean-Luc Harousseau, Dina Ben-Yehuda, Sagar Lonial, Hartmut Goldschmidt, Donna Reece, Jesus F. San-Miguel, Joan Bladé, Mario Boccadoro, Jamie Cavenagh, William S. Dalton, Anthony L. Boral, Dixie L. Esseltine, Jane B. Porter, David Schenkein, and Kenneth C. Anderson. 2005. "Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Ritchie, David S., Hang Quach, Kate Fielding, and Paul Neeson. 2010. "Drug-Mediated and Cellular Immunotherapy in Multiple Myeloma." *Immunotherapy*.
- Robak, Pawel, Izabela Drozd, Janusz Szemraj, and Tadeusz Robak. 2018. "Drug Resistance in Multiple Myeloma." *Cancer Treatment Reviews*.
- Roccaro, Aldo M., Antonio Sacco, Patricia Maiso, Abdel Kareem Azab, Yu Tzu Tai, Michaela Reagan, Feda Azab, Ludmila M. Flores, Federico Campigotto, Edie Weller, Kenneth C. Anderson, David T. Scadden, and Irene M. Ghobrial. 2013. "BM Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Facilitate Multiple Myeloma Progression." *Journal of Clinical*

*Investigation.*

- Roccaro, Aldo M., Antonio Sacco, Brian Thompson, Xavier Leleu, Abdel Kareem Azab, Feda Azab, Judith Runnels, Xiaoying Jia, Hai T. Ngo, Molly R. Melhem, Charles P. Lin, Domenico Ribatti, Barrett J. Rollins, Thomas E. Witzig, Kenneth C. Anderson, and Irene M. Ghobrial. 2009. "MicroRNAs 15a and 16 Regulate Tumor Proliferation in Multiple Myeloma." *Blood*.
- Rodríguez-Otero, Paula, Bruno Paiva, Monika Engelhardt, Felipe Prósper, and Jesús F. San Miguel. 2017. "Is Immunotherapy Here to Stay in Multiple Myeloma?" *Haematologica*.
- Rossi, Davide and Gianluca Gaidano. 2003. "Messengers of Cell Death: Apoptotic Signaling in Health and Disease." *Haematologica*.
- Rowan, S. and D. E. Fisher. 1997. "Mechanisms of Apoptotic Cell Death." *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*
- Rupaimoole, Rajesha, George A. Calin, Gabriel Lopez-Berestein, and Anil K. Sood. 2016. "MiRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment." *Cancer Discovery*.
- Safa, A. R. 2012. "C-FLIP, a Master Anti-Apoptotic Regulator." *Experimental Oncology*.
- Sampath, Deepa, Chaomei Liu, Karthik Vasana, Melanie Sulda, Vinay K. Puduvali, William G. Wierda, and Michael J. Keating. 2012. "Histone Deacetylases Mediate the Silencing of MiR-15a, MiR-16, and MiR-29b in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Blood*.
- San-Miguel, Jesús F., Vânia T. M. Hungria, Sung Soo Yoon, Meral Beksac, Meletios Athanasios Dimopoulos, Ashraf Elghandour, Wieslaw Wiktor Jedrzejczak, Andreas Bourras Rezki Bengoudifa, Florence Binlich, and Paul G. Richardson. 2014. "Panobinostat plus Bortezomib and Dexamethasone versus Placebo plus Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A Multicentre, Randomised, Double-Blind Phase 3 Trial." *The Lancet Oncology*.
- San Miguel, Jesus F. JF, Schlag R., Khuageva N.K., Dimopoulos M.A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M.T., Palumbo A., Samoilova O.S., Dmoszynska A., Anderson, Dixie-Lee Esseltine, Kevin Liu, William Deraedt, Andrew Cakana, Helgi van de Velde, and Paul G. Richardson. 2013. "Persistent Overall Survival Benefit and No Increased Risk of Second Malignancies with Bortezomib-Melphalan-Prednisone versus Melphalan-Prednisone in Patients with Previously Untreated Multiple Myeloma." *Journal of Clinical Oncology*.
- Sarvothaman, Shilpa, Ram Babu Undi, Satya Ratan Pasupuleti, Usha Gutti, and Ravi Kumar Gutti. 2015. "Apoptosis: Role in Myeloid Cell Development." *Blood Research*.
- Scaffidi, Garsten, Ingo Schmitz, Jiping Zha, Stanley J. Korsmeyer, Peter H. Krammer, and Marcus E. Peter. 1999. "Differential Modulation of Apoptosis Sensitivity in CD95 Type I and Type II Cells." *Journal of Biological Chemistry*.
- Schaefer, Carl F., Kira Anthony, Shiva Krupa, Jeffrey Buchoff, Matthew Day, Timo Hannay, and Kenneth H. Buetow. 2009. "PID: The Pathway Interaction Database." *Nucleic Acids Research*.
- Schirle, Nicole T. and Ian J. MacRae. 2012. "Structure and Mechanism of Argonaute Proteins." *Enzymes*.
- Siegel, David, Paul Eddlemon, Madhav Dhodapkar, John Crowley, Jerome Zeldis, Elias Anaissie, Bart Barlogie, Nikhil Munshi, Raman Desikan, Dan Ayers, Paula Roberson, Carla Wilson, Seema Singhal, and Jayesh Mehta. 2002. "Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Singhal, Seema, Jayesh Mehta, Raman Desikan, Dan Ayers, Paula Roberson, Paul Eddlemon, Nikhil Munshi, Elias Anaissie, Carla Wilson, Madhav Dhodapkar, Jerome Zeldis, David Siegel, John Crowley, and Bart Barlogie. 1999. "Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine*.
- Sirohi, Bhawna and Ray Powles. 2004. "Multiple Myeloma. TL - 363." *Lancet (London, England)*.
- Sjöström, Johanna and Tomi Mäkelä. 2006. "Apoptosis and the Cell Cycle in Human Disease." *Encyclopedia of Life Sciences*.

- Strasser, Andreas, Liam O'Connor, and Vishva M. Dixit. 2000. "Apoptosis Signaling." *Annual Review of Biochemistry*.
- Strubberg, Ashlee M. and Blair B. Madison. 2017. "MicroRNAs in the Etiology of Colorectal Cancer: Pathways and Clinical Implications." *Disease Models & Mechanisms*.
- Sun, Xiao Ming, Shawn B. Bratton, Michael Butterworth, Marion MacFarlane, and Gerald M. Cohen. 2002. "Bcl-2 and Bcl-XL Inhibit CD95-Mediated Apoptosis by Preventing Mitochondrial Release of Smac/DIABLO and Subsequent Inactivation of X-Linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein." *Journal of Biological Chemistry*.
- Surget, Sylvanie, David Chiron, Patricia Gomez-Bougie, Géraldine Descamps, Emmanuelle Ménoret, Régis Bataille, Philippe Moreau, Steven Le Gouill, Martine Amiot, and Catherine Pellat-Deceunynck. 2012. "Cell Death via DR5, but Not DR4, Is Regulated by P53 in Myeloma Cells." *Cancer Research*.
- T.J., Dunn, Dinner S.N., Berube C., Gotlib J., Coutre S.E., Medeiros B.C., and Liedtke M. 2012. "A Phase I/II Study of Bortezomib (VELCADE) in Combination with Pralatrexate in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma." *Blood*.
- Tatekawa, Shotaro, Yoshiaki Chinen, Masaki Ri, Tomoko Narita, Yuji Shimura, Yayoi Matsumura-Kimoto, Taku Tsukamoto, Tsutomu Kobayashi, Eri Kawata, Nobuhiko Uoshima, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Hiroshi Handa, Shinsuke Iida, and Junya Kuroda. 2017. "Epigenetic Repression of MiR-375 Is the Dominant Mechanism for Constitutive Activation of the PDPK1/RPS6KA3 Signalling Axis in Multiple Myeloma." *British Journal of Haematology*.
- Thornberry, Nancy A. and Yuri Lazebnik. 1998. "Caspases: Enemies Within." *Science*.
- Tomari, Yukihide, Klaus Förstemann, Phillip D. Zamore, LiangMeng Wee, and Michael D. Horwich. 2007. "Drosophila MicroRNAs Are Sorted into Functionally Distinct Argonaute Complexes after Production by Dicer-1." *Cell*.
- Tomatir, AG, T. Sever, M. Pehlivan, S. Pehlivan, V. Okan, S. Oguzkan-Balci, C. Basmaci, and M. Yilmaz. 2016. "Effects of TNFalpha, NOS3, MDR1 Gene Polymorphisms on Clinical Parameters, Prognosis and Survival of Multiple Myeloma Cases." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.
- Tracker, BioMed, Whither Domestic Terrorists, Yvonne M. Saenger, Jedd D. Wolchok, R. T. Sylvia Lee, Kim Margolin, U. S. Food, Genetic Changes, May Help, Predict Who, Will Benefit, Immunotherapy Printed November, Asco Annual, Meeting May, This Dna, Because Pd-, and American Cancer Society. 2014. "Tumor Immunology and Cancer Immunotherapy: Summary of the 2013 SITC Primer." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*.
- Trauzold, A., D. Siegmund, B. Schniewind, B. Sipos, J. Egberts, D. Zorenkov, D. Emme, C. Röder, H. Kalthoff, and H. Wajant. 2006. "TRAIL Promotes Metastasis of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Oncogene*.
- Troppan, Katharina, Sybille Hofer, Kerstin Wenzl, Markus Lassnig, Beata Pursche, Elisabeth Steinbauer, Marco Wiltgen, Barbara Zulus, Wilfried Renner, Christine Beham-Schmid, Alexander Deutsch, and Peter Neumeister. 2015. "Frequent down Regulation of the Tumor Suppressor Gene A20 in Multiple Myeloma." *PLoS ONE*.
- Tuschl, Thomas. 2002. "Mammalian RNA Interference." *RNAi: A Guide to Gene Silencing*.
- Vescio, R. A., Jin Cao, C. H. Hong, J. C. Lee, C. H. Wu, M. Der Danielian, Vincent Wu, Roland Newman, A. K. Lichtenstein, and J. R. Berenson. 1995. "Myeloma Ig Heavy Chain V Region Sequences Reveal Prior Antigenic Selection and Marked Somatic Mutation but No Intracлонаl Diversity." *The Journal of Immunology*.
- Vicente Planells-Palop, Ali Hazazi, Julia Feichtinger, Jana Jezkova<sup>1</sup>, Gerhard Thallinger, Naif O. Alsiwiehri, Mikhliid Almutairi, Lee Parry, Jane A. Wakeman<sup>1</sup> and Ramsay J. McFarlane<sup>1</sup>. 2017. "Human Germ/Stem Cell-Specific Gene TEX19 Influences Cancer Cell Proliferation and Cancer Prognosis." *Molecular Cancer* 16(84).
- Vlachos, Ioannis S., Konstantinos Zagganas, Maria D. Paraskevopoulou, Georgios Georgakilas, Dimitra Karagkouni, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou. 2015. "DIANA-MiRPath v3.0: Deciphering MicroRNA Function with Experimental Support." *Nucleic Acids Research*.

- de Weers, M., Y. T. Tai, M. S. van der Veer, J. M. Bakker, T. Vink, D. C. H. Jacobs, L. A. Oomen, M. Peipp, T. Valerius, J. W. Slootstra, T. Mutis, W. K. Bleeker, K. C. Anderson, H. M. Lokhorst, J. G. J. van de Winkel, and P. W. H. I. Parren. 2011. "Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors." *The Journal of Immunology*.
- Wong, Kwan Yeung, Xiaojun Huang, and Chor Sang Chim. 2012. "DNA Methylation of MicroRNA Genes in Multiple Myeloma." *Carcinogenesis*.
- Xu, Wei and Jian Yong Li. 2007. "MicroRNA Gene Expression in Malignant Lymphoproliferative Disorders." *Chinese Medical Journal*.
- Yan, Zhiling, Zhenyu Li, Kailin Xu, Yanjie Li, Guoqin Fan, Lili Chen, Hujun Li, Zhiyao Zhang, and Ning Li. 2015. "Dysregulation of the NLRP3 Inflammasome Complex and Related Cytokines in Patients with Multiple Myeloma." *Hematology*.
- Yang, Yijun, Fei Li, Manujendra N. Saha, Jahangir Abdi, Luguí Qiu, and Hong Chang. 2015. "MiR-137 and MiR-197 Induce Apoptosis and Suppress Tumorigenicity by Targeting MCL-1 in Multiple Myeloma." *Clinical Cancer Research*.
- Yerbes, R., A. López-Rivas, M. J. Reginato, and C. Palacios. 2012. "Control of FLIPL Expression and TRAIL Resistance by the Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2 Pathway in Breast Epithelial Cells." *Cell Death and Differentiation*.
- Yun Leng, Luguí Qiu, Jian Hou, Yaozhong Zhao, Xuejun Zhang, Shifang Yang, Hao Xi, Zhongxia Huang, Ling Pan, and Wenming Chen. 2016. "Phase II Open-Label Study of Recombinant Circularly Permuted TRAIL as a Single-Agent Treatment for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma." *Chinese Journal of Cancer Journal of Cancer* 35:35–86.
- Zhang, L., D. Cao, L. Tang, C. Sun, and Y. Hu. 2016. "A Panel of Circulating MiRNAs as Diagnostic Biomarkers for Screening Multiple Myeloma: A Systematic Review and Meta-Analysis." *International Journal of Laboratory Hematology*.
- Zhang, Y. and B. Zhang. 2008. "TRAIL Resistance of Breast Cancer Cells Is Associated with Constitutive Endocytosis of Death Receptors 4 and 5." *Molecular Cancer Research*.
- Zhao, Xueyun, Mingqiang Hua, Shuxin Yan, Jie Yu, Fengjiao Han, Chaoqin Zhong, Ruiqing Wang, Chen Zhang, Ming Hou, and Daoxin Ma. 2018. "The Genetic Polymorphisms of NLRP3 Inflammasome Associated with T Helper Cells in Patients with Multiple Myeloma." *Journal of Immunology Research*.
- Zheng, Zhihong, Tingbo Liu, Jing Zheng, and Jianda Hu. 2017. "Clarifying the Molecular Mechanism Associated with Carfilzomib Resistance in Human Multiple Myeloma Using Microarray Gene Expression Profile and Genetic Interaction Network." *OncoTargets and Therapy*.



## *Financiación*



La presente tesis doctoral “ Dianas terapéuticas en mieloma múltiple: desregulación de miRNAs y TRAIL, ha sido realizado por Fany Verónica, Ticona Pérez en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Salamanca (USAL).

La autora de la tesis, ha sido becaria de movilidad para realizar estudios de Doctorado en la Universidad de Salamanca destinada a estudiantes latinoamericanos.

Periodo 2008-2010



## *Agradecimientos*



Después de días de agonía escribiendo, revisando, reescribiendo, revisando, reestructurando, etc etc, etc...por fin un apartado libre para mis desahogos emocionales. Ha sido un camino largo, angustioso y en muchas ocasiones amargo el que he recorrido para completar esta tesis, y desde luego no lo hubiera podido hacer sin la ayuda y apoyo de muchas personas que han estado presente a lo largo de toda, o parte, de este camino.

Sin lugar a dudas voy a empezar con el Dr. Atanasio Pandiella, quien me dio la oportunidad de incorporarme a su grupo, donde con su profesionalismo y rigor científico, fue transmitiéndome su experiencia, que a pesar de contar con tan poco tiempo ha sabido resolver cada una de mis dudas, y ha dirigido, corregido y perfeccionado mi trabajo con paciencia.

A la Dra. Elena Díaz Rodríguez, por compartir sus conocimientos, su rigor científico en la elaboración de cada uno de los experimentos y técnicas, se notaron mis 10 años de ausencia del mundo de la investigación vanguardista.

A Azucena por su empatía y su gran disposición en ayudarme en cada uno de mis momentos.

Gracias a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio 15: Lucia, Javi y Carmen por ser mis cómplices y grandes amigos que Dios puso en mi camino para no dejarme sola en mis días buenos, otros no tan buenos y algunos regulares. A Laurita, Ariana, Juan Carlos, Adrián, Yolanda, Sofía y Cristina por crear un ambiente agradable, por compartir momentos y hacer que no se extrañe muchísimo a la familia porque ustedes se convirtieron en mi familia salmantina.

Gracias al Dr. Jesús San Miguel que junto con la Dra. Norma Gutiérrez, me incursionaron en el fascinante mundo del mieloma múltiple, en mi primera etapa de este doctorado. Gracias al grupo del laboratorio 12: Irena que con una sonrisa y tu gran asertividad fuiste guiando muchos de los experimentos además de ser amiga incondicional. A Dalia, Ana, Eva, Montse, Laura, Irene y Sara, gracias por su compañerismo y disposición. Gracias a Luis Corchete por su profesionalismo en el análisis bioinformático de los miRNAs.

Gracias a las Dras. Mercedes Garayoa y Teresa Paino, por su confianza y su gentileza en todo lo solicitado.

A mi familia, a mis padres Zacarias y Fidelita son maravillosos, a mi hermano y mis dos sobrinos hermosos. A René por su compañía incondicional, su amor y por ayudarme en cumplir cada uno de mis sueños.

Y sin duda a mi motor y motivo que todos ustedes conocen FIORELITA, que desde la primera vez que se lo pregunté, si quería conocer una ciudad pequeña y maravillosa que está al lado del río Tormes, que tiene como insignia una rana, ella se quedó fascinada y me dijo “Vamos mami vamos a Salamanca la ciudad de la ranita”, y así con nuestros sueños y miedos decidimos emprender esta aventura, que esta pronta a terminar. Ahora de vuelta al lado de nuestra familia peruana, llevando en el corazón y la mente a gente extraordinaria que Dios todo poderoso nos puso en nuestro camino. Muchas gracias por todo.



*Anexo I*  
*Listado de genes desregulados entre OPM2 y*  
*OPM2-TRAIL*



Anexo I Listado de genes desregulados entre OPM2 y OPM2-TRAIL

ID	Gene Symbol	Description	OPM2 Avg (log2)	OPM2-TRAIL Avg	Fold Change	p -valor	FDR p -val
8122265	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7,39	10,43	-8,2	1,85E-07	0,0002
7951397	CASP1	Caspase 1	6,05	8,48	-5,41	2,09E-07	0,0002
8138466	MACC1	Metastasis associated in colon cancer 1	5,56	7,66	-4,28	1,35E-09	7,85E-06
8168524	P2RY10	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10	5,23	7,31	-4,25	2,01E-07	0,0002
8178193	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	8,11	10,1	-3,99	1,89E-06	0,0006
8117622	OR2B6	Olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6	5,29	7,13	-3,58	1,23E-07	0,0001
8179481	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	8,05	9,86	-3,53	3,68E-06	0,0008
8118548	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	7,88	9,7	-3,51	3,98E-06	0,0009
8157524	TLR4	Toll-like receptor 4	6,25	8,05	-3,48	2,46E-06	0,0006
8086344	CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	5,57	7,3	-3,33	4,28E-09	1,68E-05
8073062	APOEC3A_B	APOEC3A and APOEC3B deletion hybrid	9,54	11,19	-3,13	3,01E-06	0,0007
8173444	IL2RG	Interleukin 2 receptor, gamma	5,86	7,46	-3,04	0,0002	0,0091
8124518	HIST1H2AJ	Histone cluster 1, H2aj	8,07	9,65	-3,01	6,60E-05	0,0051
8095744	AREG	Amphiregulin	6,66	8,19	-2,9	0,0028	0,0535
8017096	*	*	6,98	8,5	-2,88	0,029	0,2168
8140971	SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9-like	9,17	10,7	-2,88	7,84E-05	0,0056
8094028	AFAP1-AS1	AFAP1 antisense RNA 1	6,86	8,36	-2,83	2,06E-06	0,0006
8100231	TEC	Tec protein tyrosine kinase	8,64	10,11	-2,76	1,29E-06	0,0005
8179819	DDAH2	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	7,88	9,31	-2,68	0,0027	0,0524
8178590	DDAH2	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	7,88	9,31	-2,68	0,0027	0,0524
8095736	AREG	Amphiregulin	7,18	8,57	-2,61	0,003	0,055
7994826	ITGAL	Integrin alpha L	8,05	9,43	-2,61	0,0003	0,0121
8100210	TXK	TXK tyrosine kinase	5,99	7,35	-2,57	5,69E-08	7,20E-05
8115734	LCP2	Lymphocyte cytosolic protein 2	6,81	8,16	-2,55	2,06E-06	0,0006
8125048	DDAH2	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	7,64	8,95	-2,47	0,0021	0,0445
8101126	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	5	6,3	-2,47	9,14E-05	0,0062
8060940	LAMP5	Lysosomal-associated membrane protein family, member 5	8,03	9,32	-2,45	2,09E-08	6,09E-05
7951133	MAML2	Mastermind-like transcriptional coactivator 2	6,31	7,59	-2,42	3,85E-05	0,0037
7919584	HIST2H2BA; HIST2H2BB	Histone cluster 2, H2ba; histone cluster 2, H2bb	8,26	9,51	-2,38	0,0009	0,026
8056860	WIPF1	WAS/WASL interacting protein family, member 1	10,21	11,46	-2,38	6,44E-08	7,50E-05
8180100	HLA-DPA1	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	6,16	7,4	-2,36	4,41E-05	0,004
7921298	FCRL2	Fc receptor-like 2	6,26	7,49	-2,35	0,0002	0,0085
8124448	HIST1H4H	Histone cluster 1, H4h	10,05	11,28	-2,34	2,92E-07	0,0002
7957673	CFAP54	Cilia and flagella associated 54	6,31	7,54	-2,34	0,0002	0,0097
8103601	DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	5,27	6,49	-2,33	7,69E-07	0,0004
8124484	HIST1H2BJ	Histone cluster 1, H2bj	8,48	9,7	-2,32	0,0009	0,0262
8125556	HLA-DPA1	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	6,03	7,22	-2,29	2,07E-05	0,0026
8178891	HLA-DPA1	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	6,03	7,22	-2,29	2,07E-05	0,0026
8121601	FAM26E	Family with sequence similarity 26, member E	7,44	8,63	-2,27	5,17E-06	0,001
8171136	P2RY8	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	9,52	10,7	-2,26	2,82E-07	0,0002
8177026	P2RY8	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	9,52	10,7	-2,26	2,82E-07	0,0002
8102135	CXXC4	CXXC finger protein 4	7,7	8,85	-2,22	2,33E-06	0,0006
8100541	IGFBP7	Insulin like growth factor binding protein 7	9,9	11,06	-2,22	1,63E-06	0,0005
8020088	*	*	7,14	8,28	-2,21	0,0002	0,0108
7919627	HIST2H4B; HIST2H4A	Histone cluster 2, H4b; histone cluster 2, H4a	10,62	11,74	-2,16	1,42E-06	0,0005
7905067	HIST2H4B; HIST2H4A	Histone cluster 2, H4b; histone cluster 2, H4a	10,62	11,74	-2,16	1,42E-06	0,0005
8124540	HIST1H2AM ; HIST1H3J	Histone cluster 1, H2am; histone cluster 1, H3j	9,19	10,29	-2,15	6,96E-05	0,0053
7961532	ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	11,42	12,51	-2,14	3,93E-05	0,0038
8113369	SLCO4C1	Solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	7,58	8,65	-2,11	1,59E-05	0,0022
7951372	CASP4	Caspase 4	7,74	8,82	-2,11	1,67E-06	0,0005
7906400	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16	8,2	9,28	-2,11	0,0002	0,0099
7927186	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	8,63	9,7	-2,1	0,0116	0,1283
8016980	MIR142	MicroRNA 142	8,69	9,76	-2,09	0,0031	0,0566
7961120	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	7,5	8,55	-2,07	2,42E-05	0,0028
7939341	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	10,22	11,27	-2,06	3,51E-07	0,0002
7968883	LACC1	laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1	7,1	8,14	-2,06	1,61E-06	0,0005

79608+F6	C3AR1	Complement component 3a receptor 1	7,84	8,87	-2,04	0,0001	0,0075
7919606	HIST2H2BF; HIST2H2BA; HIST2H2BB	Histone H2bf; histone H2ba; histone, H2bb	9,15	10,18	-2,04	0,0018	0,0404
8138668	MIR148A	microRNA-148a	5,94	6,97	-2,03	0,0164	0,1576
8179519	HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	5,92	6,94	-2,03	2,21E-05	0,0027
8135363	PIK3CG	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma	6,69	7,71	-2,03	2,92E-05	0,0032
8153959	DOCK8	Dedicator of cytokinesis 8	6,96	7,98	-2,02	4,25E-05	0,004
7920552	KCNN3	Potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 3	8,91	9,92	-2,02	2,12E-05	0,0026
8140967	SAMD9	Sterile alpha motif domain containing 9	8,03	9,03	-2,01	9,37E-05	0,0063
8041422	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	5,93	6,92	-2	0,0004	0,0152
7943413	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	5,06	6,05	-2	0,0013	0,033
7946641	GALNT18	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 18	9,4	8,4	2	0,0001	0,0066
7978718	SEC23A	Sec23 homolog A, COPII coat complex component	10,53	9,53	2	9,27E-06	0,0016
8142096	ATXN7L1	Ataxin 7-like 1	7,57	6,56	2,02	8,51E-05	0,0059
8090180	MUC13	Mucin 13, cell surface associated	10,07	9,06	2,02	0,0004	0,016
8167482	GAGE2D;12C;10;12E;12D;12B;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F	G antigen 2D;12C;10;12E;12D;12B;2C; 4; 5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F	9,51	8,5	2,02	1,10E-06	0,0005
8167562	GAGE2D;12C;10;12E;12D;12B;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F	G antigen 2D; 12C;10; 12E; 12D;12B;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F	9,51	8,5	2,02	1,10E-06	0,0005
8167584	GAGE2D;10;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F;12D	G antigen 2D;10;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F;12D	9,57	8,55	2,03	5,33E-07	0,0003
8167577	GAGE2D;10;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F;12D	G antigen 2D;10;2C;4;5;12I;8;7;2A;2E;12J;12F;12D	9,57	8,55	2,03	5,33E-07	0,0003
8144378	AGPAT5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5	10,84	9,81	2,03	7,72E-06	0,0014
7940775	RARRES3	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	7,79	6,75	2,06	7,71E-05	0,0055
8099685	LGI2	Leucine-rich repeat LGI family, member 2	7,27	6,22	2,06	4,72E-07	0,0003
7904959	*		10,76	9,71	2,07	1,12E-06	0,0005
7948612	FADS1	Fatty acid desaturase 1	10,4	9,35	2,07	1,68E-05	0,0022
8145122	SLC39A14	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	11,19	10,14	2,07	4,74E-07	0,0003
8149399	LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	9,31	8,25	2,08	5,70E-06	0,0011
8076668	KIAA1644	KIAA1644	8,78	7,72	2,08	1,64E-05	0,0022
8150002	FBXO16	F-box protein 16	8,62	7,55	2,09	5,69E-05	0,0047
8145291	SLC25A37	Solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37	9,97	8,9	2,11	6,74E-05	0,0052
7898809	EPHB2	EPH receptor B2	9,57	8,49	2,11	1,30E-05	0,002
8148280	SQLE	Squalene epoxidase	10,96	9,88	2,12	4,27E-06	0,0009
8095005	*		9,62	8,54	2,12	0,0002	0,0103
8170076	SAGE1	Sarcoma antigen 1	6,4	5,29	2,15	1,13E-06	0,0005
8099967	RBM47	RNA binding motif protein 47	9,72	8,6	2,18	1,19E-05	0,0019
8140730	TMEM243	Transmembrane protein 243, mitochondrial	8,61	7,49	2,18	6,50E-06	0,0012
8105067	PTGER4	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	8,88	7,75	2,18	3,52E-05	0,0036
7959025	RNFT2	Ring finger protein, transmembrane 2	9,25	8,13	2,18	7,80E-08	8,40E-05
8167560	GAGE10	G antigen 10	8,69	7,56	2,19	1,58E-05	0,0022
8029392	ZNF234	Zinc finger protein 234	6,87	5,73	2,19	1,47E-05	0,0021
7969677	MBNL2	Muscleblind-like splicing regulator 2	9,07	7,91	2,23	4,79E-08	6,53E-05
8151684	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	7,19	6,03	2,23	4,00E-05	0,0038
8061564	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	9	7,83	2,24	6,09E-07	0,0003
8043197	VAMP8	Vesicle associated membrane protein 8	8,16	6,98	2,27	2,44E-05	0,0028
8091354	HLTF	Helicase-like transcription factor	9,15	7,97	2,27	4,27E-06	0,0009
8045736	FMNL2	Formin like 2	8,33	7,14	2,27	1,25E-05	0,0019

Anexo I Listado de genes desregulados entre OPM2 y OPM2-TRAIL

7975268	ARG2	Arginase 2	8,53	7,34	2,28	9,93E-05	0,0065
7914112	FGR	FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	8,98	7,79	2,28	3,51E-08	6,37E-05
7975311	EXD2	Exonuclease 3-5 domain containing 2	7,16	5,96	2,31	4,63E-08	6,53E-05
7973826	NUBPL	Nucleotide binding protein-like	7,45	6,23	2,32	2,40E-06	0,0006
8118409	C4A;C4B;C4B_2;STK19	Complement component 4A; 4B; 4B, copy 2; serine/threonine kinase 19	9,15	7,94	2,32	0,0006	0,0196
8179399	C4A; C4B; C4B_2; STK19	Complement component 4A; 4B; 4B, copy 2; serine/threonine kinase 19	9,15	7,94	2,32	0,0006	0,0196
8118455	C4A; C4B; C4B_2; STK19	Complement component 4A; 4B; 4B, copy 2; serine/threonine kinase 19	9,15	7,94	2,32	0,0006	0,0196
8146863	SULF1	Sulfatase 1	8,98	7,76	2,33	2,69E-05	0,003
7898655	CDA	Cytidine deaminase	7,67	6,42	2,37	4,94E-08	6,53E-05
8151686	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	7,55	6,28	2,41	2,25E-07	0,0002
8122986	SNX9	Sorting nexin 9	7,74	6,47	2,43	3,47E-06	0,0008
8111915	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1	8,73	7,45	2,43	0,0009	0,0266
8162117	GOLM1	Golgi membrane protein 1	10,8	9,5	2,47	1,63E-06	0,0005
8167254	SSX1	Synovial sarcoma, X breakpoint 1	7,07	5,74	2,5	1,81E-07	0,0002
7952249	USP2	Ubiquitin specific peptidase 2	8,67	7,33	2,53	1,72E-06	0,0005
7964852	BEST3	Bestrophin 3	6,77	5,41	2,56	7,06E-05	0,0053
7966229	FAM222A-AS1	FAM222A antisense RNA 1	7,61	6,23	2,6	4,87E-05	0,0043
7956426	INHBE	Inhibin beta E	9,68	8,3	2,61	0,0003	0,013
8066822	SULF2	Sulfatase 2	9,07	7,63	2,73	6,43E-08	7,50E-05
8051298	GALNT14	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14	8,73	7,28	2,75	2,83E-08	6,32E-05
8001531	MT1G	Metallothionein 1G	8,54	7,06	2,79	1,38E-06	0,0005
8117054	CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	7,88	6,36	2,86	0,0006	0,0205
7991815	PDIA2	Protein disulfide isomerase family A, member 2	8,77	7,22	2,94	1,11E-06	0,0005
7948229	SLC43A3; PRG2	Solute carrier family 43, member 3; proteoglycan 2, bone marrow	12,05	10,49	2,96	9,97E-07	0,0005
8094778	UCHL1	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	9,12	7,51	3,06	1,11E-09	7,85E-06
8166784	TSPAN7	Tetraspanin 7	9,44	7,8	3,12	1,01E-06	0,0005
8100310	*	*	10,12	8,46	3,15	5,38E-05	0,0045
7995797	MT1E	Metallothionein 1E	8,87	7,18	3,22	1,57E-05	0,0022
8100308	*	*	8,45	6,67	3,43	1,12E-05	0,0018
8013015	CENPV	Centromere protein V	8,19	6,39	3,47	7,73E-08	8,40E-05
7946559	*	*	9,61	7,8	3,51	6,51E-07	0,0004
8026971	IFI30	Interferon, gamma-inducible protein 30	8,8	6,94	3,61	4,60E-08	6,53E-05
7948982	HRASLS2	HRAS-like suppressor 2	9,03	7,08	3,85	1,52E-07	0,0001
8144917	LPL	Lipoprotein lipase	8,31	6,31	4,01	4,72E-09	1,68E-05
8001197	NETO2	Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	10,44	8,33	4,31	2,60E-05	0,003
8147503	LAPTM4B	Lysosomal protein transmembrane 4 beta	9,26	7,06	4,58	3,76E-08	6,44E-05
8173551	PHKA1	Phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)	9,35	7,01	5,06	1,62E-09	7,85E-06
8170068	CT45A5; A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4	Cancer/testis antigen family 45, member A5; A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4	8,44	6,04	5,27	3,16E-08	6,32E-05
8175336	CT45A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	Cancer/testis antigen family 45, member A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	8,42	5,93	5,65	2,86E-08	6,32E-05
8170060	CT45A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	Cancer/testis antigen family 45, member A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	8,49	5,95	5,81	4,62E-08	6,53E-05
8170052	CT45A1; A7; A6; A5; A9; A8; A2	Cancer/testis antigen family 45, member A1; A7; A6; A5; A9; A8; A2	8,41	5,81	6,04	3,26E-08	6,32E-05
8175344	CT45A1; A10; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	Cancer/testis antigen family 45, member A1; A10; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	8,48	5,87	6,09	3,19E-08	6,32E-05
8175353	CT45A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	Cancer/testis antigen family 45, member A1; A8; A9; A2; A7; A6; A4; A5	8,67	5,75	7,52	1,07E-07	0,0001
8170488	PASD1	PAS domain containing 1	8,97	6,05	7,58	4,53E-10	4,39E-06
8010780	TEX19	Testis expressed 19	11,63	8,2	10,75	4,93E-11	7,18E-07
8144786	SLC7A2	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	10,63	6,78	14,43	5,21E-09	1,68E-05
8039545	NLRP11	NLR family, pyrin domain containing 11	9,73	5,13	24,26	1,02E-11	2,96E-07

En rojo: genes sobreexpresados y en verde genes infraexpresados. \* Genes con numero de ID en los arrays



*ANEXO II*  
*ARTICULOS PUBLICADOS*