



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Departamento de Medicina, Hematología
Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC-USAL)**

**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE MECANISMOS DE
RESISTENCIA A FÁRMACOS INMUNOMODULADORES
EN MIELOMA MÚLTIPLE**

Tesis doctoral presentada por

Pedro Mogollón Arroyo

Directores

Enrique M Ocio San Miguel, MD, PhD

Mercedes Garayoa Berrueta, PhD

Co-director

Teresa Paíno Gómez, PhD

Tutor

Marcos González Díaz, MD, PhD

Septiembre, 2021

Los directores de esta tesis,

D. Enrique M. Ocio San Miguel, M.D., Ph.D., Profesor Titular de Medicina de la Universidad de Cantabria y Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla,

Dña. Mercedes Garayoa Berrueta, Ph.D., Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) y del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca,

Dña. Teresa Paíno Gómez, Ph.D., Profesora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca e Investigadora del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca,

Y como tutor, **D. Marcos González Díaz**, M.D., Ph.D., Investigador Principal del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca y del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca y Catedrático del Departamento de Enfermería y Fisioterapia de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección y tutoría por **D. Pedro Mogollón Arroyo**: “Evaluación preclínica de mecanismos de resistencia a fármacos inmunomoduladores en mieloma múltiple” reúne las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 30 de Septiembre de 2021,

Dr. Enrique M. Ocio

Dra. Mercedes Garayoa

Dra. Teresa Paíno

Dr. Marcos González-Díaz

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a las siguientes ayudas:

- Proyecto PROYE20047GUTI financiado por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Título: "Towards precision medicine in myeloma: search for predictive biomarkers, overcoming resistance and finding new therapeutic targets oriented to molecular subtypes".
- Proyecto PI19/01384 financiado por el Instituto de Salud Carlos III. Título: "Evaluación de resistencia intrínseca o mediada por microambiente a fármacos antimieloma".
- Proyecto PI18/01600 financiado por el Instituto de Salud Carlos III. Título: "Evaluación de estrategias de sensibilización a tratamientos inmunoterápicos en Mieloma Múltiple".
- Proyecto 1880/A/18 financiado por la Gerencia Regional de Salud. Título: "Evaluación génica y proteómica de mecanismos clave en el desarrollo de Resistencia a fármacos Inmunomoduladores en Mieloma Múltiple".
- Proyecto PI15/067 financiado por el Instituto de Salud Carlos III. Título: "Evaluación preclínica de mecanismos de resistencia a fármacos antimieloma (Inhibidores del Proteasoma e Inmunomoduladores) y desarrollo de estrategias destinadas a vencerla".
- Programa de ayudas predoctorales del IBSAL para la realización de tesis doctorales en los grupos de investigación del IBSAL (2017-2021).
- Ayudas del IBSAL para la matriculación en el programa de doctorado (2016).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.1.1. <i>DIAGNÓSTICO DEL MM</i>	4
1.1.2. <i>ESTADIAJE Y FACTORES PRONÓSTICOS DEL MM</i>	7
1.2. PATOGENIA DEL MM.....	10
1.2.1. <i>DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA (CP)</i>	10
1.2.2. <i>EVENTOS GENÉTICOS DE LAS GAMMAPATÍAS</i>	15
1.2.3. <i>INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS Y SU MICROAMBIENTE</i>	27
1.3. MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL.....	34
1.3.1. <i>EVASIÓN DE LA APOPTOSIS</i>	34
1.3.2. <i>DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR</i>	39
1.4. TRATAMIENTO DEL MM.....	44
1.4.1. <i>AGENTES ALQUILANTES Y CORTICOESTEROIDES</i>	45
1.4.2. <i>TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE AUTÓLOGAS</i>	46
1.4.3. <i>AGENTES INMUNOMODULADORES (IMiDs)</i>	47
1.5. CRISPR-Cas9.....	56
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
3.1. FÁRMACOS.....	69
3.2. CULTIVOS CELULARES.....	69
3.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD, APOPTOSIS Y CICLO CELULAR.....	69
3.4. WESTERN BLOT.....	70
3.5. INMUNOFLUORESCENCIA.....	71
3.6. <i>MICROARRAYS DE PROTEÍNAS</i>	72
3.7. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	72
3.8. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL ADN POR EL MÉTODO DE SECUENCIACIÓN CAPILAR O <i>SANGER</i>	73
3.9. ANÁLISIS CITOGENÉTICO MEDIANTE <i>CGH-ARRAYS</i>	73
3.10. <i>FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)</i>	74

3.11.	ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE MARCADORES DE MEMBRANA Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO CELULAR	75
3.12.	ANÁLISIS DEL ESTADO DE METILACIÓN DE CPGs: PIROSECUENCIACIÓN	75
3.13.	ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICROARNs (MIARNs).....	77
3.14.	INHIBICIÓN Y SOBREENPRESIÓN DE MIARNs.....	78
3.15.	SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE PROTEÍNAS.....	78
3.16.	LIBRERÍAS DE CRISPR-Cas9.....	79
3.16.1.	AMPLIFICACIÓN DE LA LIBRERÍA	79
3.16.2.	GENERACIÓN DE LENTIVIRUS.....	79
3.16.3.	TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DE MIELOMA.....	80
3.16.4.	SELECCIÓN POSITIVA	81
3.16.5.	SELECCIÓN NEGATIVA	81
3.16.6.	SECUENCIACIÓN DEL ADN.....	81
3.16.7.	ANÁLISIS DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN	82
3.17.	GENERACIÓN DE <i>KNOCKOUTS</i> INDIVIDUALES MEDIANTE CRISPR-Cas9.....	83
4.	RESULTADOS.....	87
	CAPÍTULO I: IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A LENALIDOMIDA - DEXAMETASONA Y POMALIDOMIDA - DEXAMETASONA.....	89
	CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS RESPONSABLES DE LA DESREGULACIÓN DE CRBN EN LOS MODELOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA A Ld Y Pd	133
	CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A IMiDs MEDIANTE CRIBADOS DE LIBRERÍAS DE CRISPR-Cas9 DE GENOMA COMPLETO	159
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	201
6.	CONCLUSIONES.....	211
7.	ANEXOS	217
7.1.	ANEXO I	219
8.	BIBLIOGRAFÍA	237

ABREVIATURAS

ACTG1	Actin gamma 1
ADC	Antibody-drug conjugate
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AID	Activation-induced deaminase
AIF	Apoptotic inducing factor
AKT	Akt murine thymoma viral oncogene
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and rad3-related
BAFF	B-cell activating factor
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	Receptor de células B
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1
CAM-DR	Cell adhesion-mediated drug resistance
CAR	Receptor antigénico quimérico
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CGH	Comparative genomic hybridization
Chk2	Ccheckpoint kinase 2
CKIs	Cyclin-dependent kinase inhibitors
CKS1B	Cdc28 protein kinase regulatory subunit 1b
CME	Célula mesenquimal estromal
CNV	Variación en el número de copias
CP	Célula plasmática
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type
CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
d	Dexametasona

DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DIA	Desaminasa inducida por activación
DIS3	DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease
dPCR	PCR digital
DR	Receptores de muerte
DSB	Double-strand breaks
dT	Desoxitimidina
dU	Desoxiuracilo
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FADD	Fas-associated death domain
FAM46C	Family with sequence similarity 46 member c
Fc	Fragmento cristalizable
FC	Fold change
FDA	Food and drug administration
FGF2	Fibroblast growth factor-2
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor-3
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GCs	Glucocorticoides
GEP	Perfil de expresión génica
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
HAS1	Hyaluronan synthase 1
HD	Hiperdiploide
HDR	Homology directed repair
HRP	Horseshoe peroxidase
IAP	Inhibitors of apoptosis
IDO	Indoleamino 2, 3-dioxigenasa
Ig	Inmunoglobulina
IGF1	Insulin like growth factor 1
IGHD	Región de diversidad de IGH
IGHJ	Región joining de IGH
IGHV	Región de variabilidad de IGH

IgH	Cadena pesada de las Igs
IGL	Cadena ligera lambda de Igs
IgL	Cadena ligera de las Igs
IGLJ	Región joining de IgL
IGLV	Región de variabilidad de IgL
IL	Interleucina
IMiDs	Inmunomoduladores
IMWG	International myeloma working group
Ips	Inhibidores del proteasoma
ISS	International staging system
KO	Knock out
KRAS	V-ki-RAS2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Lenalidomida
Ld	Lenalidomida + dexametasona
LDH	Lactato deshidrogenasa
lncRNAs	Long non coding RNAs
MAGeCK	Model-based analysis of genome-wide CRISPR-Cas9 knockout
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mb	Megabase
MCC	Mitotic checkpoint complex
mDCs	Células dendríticas mieloides
MDSC	Células mieloides supresoras
MEC	Matriz extracelular
miARN	microARN
MLE	Maximum-likelihood estimation
MM	Mieloma múltiple
MM.1S-Cas9	Células MM.1S que expresan una endonucleasa Cas9 funcional
MMPs	Matrix metalloproteinases
MO	Médula ósea
mSMART	Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide

NF-kB	Factor nuclear kappa-B
NHEJ	Non-homologous end joining
NO	Óxido nítrico
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-RAS) oncogene homolog
OB	Osteoblasto
OC	Osteoclasto
P	Pomalidomida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de tampón fosfato
Pd	Pomalidomida + dexametasona
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
piARN	Piwi interacting ARN
Plks	Polo-like kinases
PRDM1	PR/set domain 1
Proteína M	Proteína o componente monoclonal
Rb	Retinoblastoma
RCC	Recombinación de cambio de clase
R-ISS	Revised international staging system
RLD	Células MM.1S resistentes a lenalidomida + dexametasona
RPD	Células MM.1S resistentes a pomalidomida + dexametasona
RPD-Cas9	Células RPD que expresan una endonucleasa Cas9 funcional
RRA	Robust rank aggregation
RSS	Recombination signal sequences
RT-qPCR	Reverse-transcription quantitative polymerase-chain reaction
SAC	Spindle assembly checkpoint
SBF	Suero bobino fetal
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SG	Supervivencia global
sgRNA	Single-guide RNA
SLP	Supervivencia libre de progresión

SMM	Multiple myeloma smoldering
SNPs	Single-nucleotide polymorphisms
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
Th	Células T helper
TNF-α	Tumour necrosis factor alpha
TP53	Tumor protein p53
TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3/6
Tregs	Células T reguladoras
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wild type
XBP1	X-box-binding protein 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por la acumulación de células plasmáticas clonales en la médula ósea (MO). En esta enfermedad la proliferación de células plasmáticas ocasiona comúnmente lesiones osteolíticas, anemia, hipercalcemia y/o plasmocitomas en los tejidos blandos. Las células plasmáticas del MM son linfocitos B en su último estadio madurativo que han sufrido una transformación neoplásica y que producen, generalmente, un solo tipo de anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) conocida como proteína monoclonal (proteína M), característica de la enfermedad [1,2].

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en dos pacientes por el Dr. Solly S. quien le asignó el nombre de *mollities ossium* [3]. Fue Rustizky J. V. quien utilizó en 1873 por primera vez el término mieloma múltiple para resaltar tumores en la MO característicos de los pacientes [4]. Tras el descubrimiento de la célula plasmática por Ramón y Cajal en el 1890 [5], Wright J. H. demostró por primera vez que estas células plasmáticas eran las células causantes del MM [6]. Con una incidencia de 4 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, esta neoplasia supone el 15% de todas las neoplasias hematológicas, el 1% de todas las neoplasias y es la quinta más frecuente en España. La edad media al diagnóstico es de 65-70 años, con sólo un 15% de pacientes menores de 50 años [7,8].

El MM es una enfermedad de causa desconocida que está precedida de una fase denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI o MGUS por sus siglas en inglés de *Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance*). En ambas enfermedades ha sido descrita una cierta asociación familiar. Además, la exposición a radiación y bencenos o solventes orgánicos han sido propuestos como factores de riesgo en el MM [9].

1.1.1. DIAGNÓSTICO DEL MM

GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO (GMSI)

La GMSI tiene una alta prevalencia (3,2% y 5,8% en individuos de más de 50 y 70 años, respectivamente) y se caracteriza por la presencia de proteína M sérica (< 3 g/dL), menos del 10% de células plasmáticas en la MO, y ausencia de síntomas o alteraciones del funcionamiento de órganos o tejidos debido a la gammapatía monoclonal.

La probabilidad de progresión de GMSI a MM es, aproximadamente, de un 1% a un año y de un 30% a 25 años. Los principales factores asociados con la progresión a MM son: la presencia de más del 5% de células plasmáticas aberrantes en la MO, el incremento de la concentración de proteína M sérica, el tipo de proteína M (pacientes con isotipo IgA e IgM muestran un riesgo de progresión mayor que aquellos con isotipo IgG), y la proporción anormal de cadenas ligeras *kappa-lambda* libres en suero [10–13].

MIELOMA SMOLDERING (SMM)

El término *Smoldering* fue definido por Kyle y Greipp como la presencia de proteína M (> 3 g/dL) y/o $\geq 10\%$ -60% de células plasmáticas en la MO en ausencia de lesiones líticas o manifestaciones originadas por la gammapatía monoclonal [14].

Más recientemente, el IMWG (*International Myeloma Working Group*) consideró más apropiado el término “mieloma asintomático”, quedando finalmente esta condición definida por la presencia de proteína M (≥ 3 g/dL) y/o $\geq 10\%$ de células plasmáticas en la MO en ausencia de síntomas u órganos o tejidos afectados debido a la gammapatía monoclonal. Esta situación es clínica y biológicamente muy similar a la observada en la GMSI, sin embargo, en el MM asintomático la masa de células plasmáticas es mucho mayor y el riesgo de progresión a MM sintomático es mayor que el mencionado para la GMSI [15].

Este riesgo de progresión desde el mieloma asintomático no es constante a lo largo de la evolución de la enfermedad, siendo del 10% por año durante los 5 primeros años,

reduciéndose al 3% por año en los sucesivos 5 años. La probabilidad de progresión acumulativa a los 15 años es del 73%. Los factores de riesgo para la progresión incluyen, entre otros: alto componente M, isotipo IgA, elevada infiltración por células plasmáticas en la MO, una proporción elevada de cadenas ligeras en suero, inmunoparesia o la presencia de más del 95% de células plasmáticas aberrantes dentro del compartimento de células plasmáticas en la MO [15].

MIELOMA SINTOMÁTICO

Se caracteriza por la presencia de proteína M en suero y/o orina, un incremento de células plasmáticas en la MO (generalmente > 10%) o plasmocitomas, así como por la afectación en órganos o tejidos (incluyendo lesiones óseas). Algunos pacientes podrían no tener síntomas, aunque sí afectación en órganos o tejidos. Entre las manifestaciones clínicas del MM sintomático se incluyen anemia, afectación ósea (lesiones líticas y/o osteoporosis avanzada), insuficiencia renal, hipercalcemia, infecciones bacterianas recurrentes, plasmocitomas extramedulares o amiloidosis asociada (**Figura 1**).

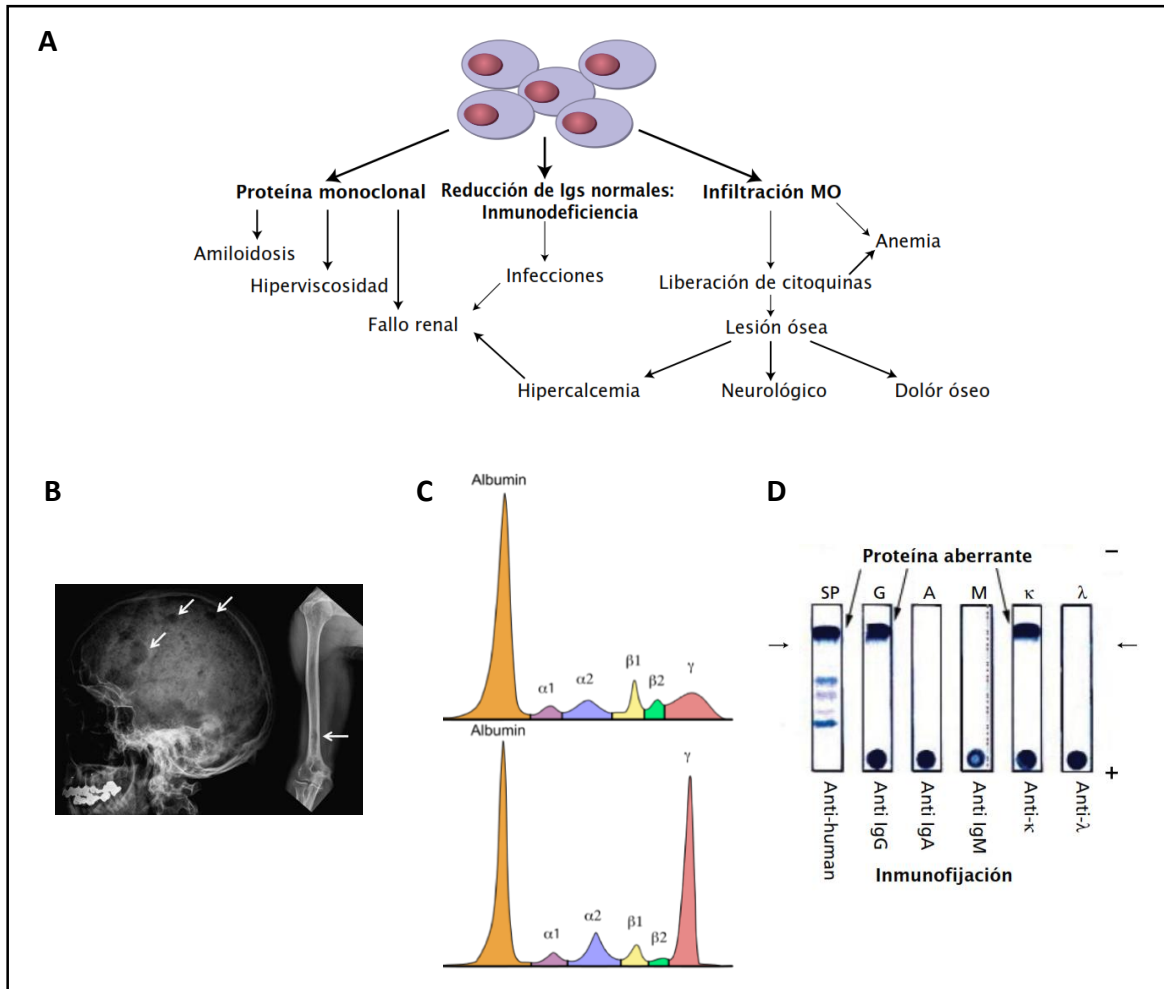


Figura 1. A Manifestaciones clínicas del MM. B Lesiones osteolíticas. C Electroforesis de proteínas séricas normal (arriba) y aberrante (abajo). D Inmunofijación para la caracterización del componente monoclonal. Adaptado de Hoffbrand A., et al. [16].

1.1.2. ESTADIAJE Y FACTORES PRONÓSTICOS DEL MM

Numerosos grupos de investigación han trabajado en la búsqueda de marcadores en el momento del diagnóstico de la GMSI que permitan predecir el riesgo de progresión a MM sintomático o su respuesta al tratamiento. Entre los factores pronósticos más relevantes publicados hasta la fecha destacan: la edad, el perfil citogenético, los marcadores de imagen y la respuesta al tratamiento tras la exposición a fármacos [15,17–19].

El primer sistema de estratificación de la enfermedad fue publicado por Durie y Salmon [20] y fue adoptado como estándar hasta el año 2005, cuando el IMWG publicó un estudio [21] que introdujo dos marcadores con valor pronóstico independiente, la β_2 Microglobulina y la albúmina sérica, que se integraron en el sistema de estadiaje ISS (*International staging system*) [21]. Actualmente, el consenso del IMWG es clasificar como pacientes de alto riesgo citogenético a aquellos con la delección del 17p (que incluye al gen supresor de tumores *TP53*) y las translocaciones del gen *IGH* con los genes *MMSET/FGFR3* o *MAF* en la t(4;14) y la t(14;16), respectivamente. Los pacientes que no presentan ninguna de estas alteraciones se agrupan en la categoría de riesgo estándar [22,23] (**Tabla 1**). En el año 2015, el IMWG estableció el modelo definitivo que incorpora la ISS, la citogenética y los niveles séricos de LDH, y se denominó ISS revisado o R-ISS (**Tabla 2**) [23].

Tabla 1. Consenso del IMWG para la estratificación del riesgo del MM [23].

Alto riesgo
ISS II/III y t(4;14) o delección 17p13 o t(14;16)
Riesgo Intermedio
Otros
Riesgo estándar
ISS I/II, edad < 55años y ausencia de: t(4; 14), del 17p13 y +1q21.

Tabla 2. Clasificación del MM por el Sistema Internacional de Estadaje (ISS, International Staging System) [24].

FACTORES PRONÓSTICOS	CRITERIOS
ESTADIAJE ISS - I - II - III	β_2 Microglobulina en suero < 3.5 mg/L, albúmina en suero \geq 3.5 g/dL No entra dentro del estadio I ni el III β_2 Microglobulina sérica \geq 5.5 mg/L
NUEVO MODELO DE ESTRATIFICACIÓN DE ESTADIAJE (R-ISS) - I - II - III	ISS I, no AC y LDH normal No entra dentro del estadio I ni el III ISS III, bien AC de alto riesgo o LDH elevada

Abreviaturas: AC, aberraciones cromosómicas; LDH, lactato deshidrogenasa. Citogenética de alto riesgo: del(17p) y/o t(4;14) y/o t(14;16).

En el MM, la monitorización de la respuesta es crucial para el manejo de la enfermedad. Esta se basa en la medición de las cadenas pesada y ligera en suero y orina, así como en la detección de células tumorales en la MO; y el uso de técnicas de imagen avanzadas de evaluación de la lesión ósea o la masa tumoral considerándose el TAC como técnica estándar, aunque puede recurrirse al PET-TAC, radiología o resonancia magnética en casos de evaluación inicial de plasmocitoma solitario y SMM.

Por otro lado, el análisis de la enfermedad mínima residual (EMR) permite medir en profundidad la respuesta al tratamiento y predecir la duración de la misma, ya que una EMR negativa se traduce en una mejor SLP (Supervivencia Libre de Progresión) y una EMR positiva se asocia con un mayor riesgo de recaída. Las técnicas de análisis de la EMR incluyen la detección de células plasmáticas en MO mediante citometría de flujo multiparamétrica, así como la detección alelo-específica de Ig mediante PCR cuantitativa (ASO-PCR, *Allele-Specific Oligonucleotide-Based Quantitative PCR*). Además, la utilización de tecnologías para la secuenciación (NGS) de los genes de las Igs supone actualmente una herramienta muy sensible para estudiar la EMR [25].

Diversos estudios han analizado y evaluado nuevos marcadores pronósticos (**Tabla 3**), entre los que se incluyen marcadores inmunofenotípicos, genéticos, de señalización inmune, biomarcadores, características del entorno de la MO y otras técnicas de imagen.

Tabla 3. Potenciales nuevos marcadores pronósticos en el MM.

Autores	Potencial marcador pronóstico	Conclusión
<i>Li et al. 2015 [26]</i>	miR-15a	Relacionado con progresión de la enfermedad y mal pronóstico
<i>Wang et al. 2015 [27]</i>	<i>Immune checkpoint signaling</i>	La respuesta al tratamiento es mejor en pacientes que expresan poco sPD-L1
<i>Jung et al. 2016 [28]</i>	iPLR	Aporta valor predictivo en la SLP y SG
<i>Zhou et al. 2015 [29]</i>	lncRNAs	La expresión de 4 lncRNAs se asocia con la SG: RP4-803 J11.2, RP1-43E13.2, RP11-553 L6.5 y ZFY-AS1
<i>Lee et al. 2015 [30]</i>	Densidad de MV en la MO	Una densidad alta de MV se asocia con peor SLP
<i>Ma et al. 2015 [31]</i>	N-Cadherin	Su expresión elevada se asocia con menor OS
<i>Lullo et al. 2015 [32]</i>	Células Th22	La frecuencia alta de células T IL-22(+)/IL-17(-)/IL-13(+) se correlaciona con mal pronóstico
<i>Li et al. 2015 [33]</i>	miR-33b	Su infraexpresión se relaciona con menores PFS y OS
<i>Bolomsky et al. 2015 [34]</i>	IGFBP7	Su expresión se asocia a la translocación t(4;14) y mal pronóstico
<i>Jung et al. 2015 [35]</i>	Beclina 1 y LC3	Expresión asociada a una mejor supervivencia
<i>Trotter et al. 2015 [36]</i>	Runx2	La expresión de este gen en las células de mieloma se relaciona con la progresión en hueso

Abreviaturas: sPD-L1, Soluble Programmed Death-Ligand 1; iPLR, Inverse Platelet to Lymphocyte Ratio; SLP, Supervivencia Libre de Progresión; SG, Supervivencia Global; lncRNAs, Long Noncoding RNAs; MV, Microvesículas; IGFBP7, Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7.

1.2. PATOGENIA DEL MM

Para entender la patogénesis del MM, además de estudiar los cambios moleculares involucrados en el desarrollo del clon de células plasmáticas malignas, es importante tener en cuenta la interacción de estas células plasmáticas con el medioambiente medular, dado el papel de esta interacción en la aparición de resistencias, supervivencia y proliferación tumoral, lesión ósea, así como en la migración y metástasis [37].

1.2.1. DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA (CP)

Las células B derivan de las células madre hematopoyéticas que se desarrollan en la MO o el hígado fetal. Para dar lugar a las células plasmáticas, estas células madre hematopoyéticas se diferencian sucesivamente a células progenitoras pluripotentes, progenitores linfoides comunes y finalmente progenitores B maduros a lo largo de los estadios proB, preB, células B inmaduras y células B de transición. Este proceso está gobernado en humanos por los factores de transcripción PU.1, Ikaros, E2A, EBF y PAX5. La expresión de los factores Ikaros y E2A origina un cambio en el patrón de expresión transcripcional de las células madre hematopoyéticas que favorece la acción de factores específicos de células B, entre los que se incluyen PAX5 y EBF1, los cuales activan el programa de diferenciación hacia células B maduras (**Figura 2**).

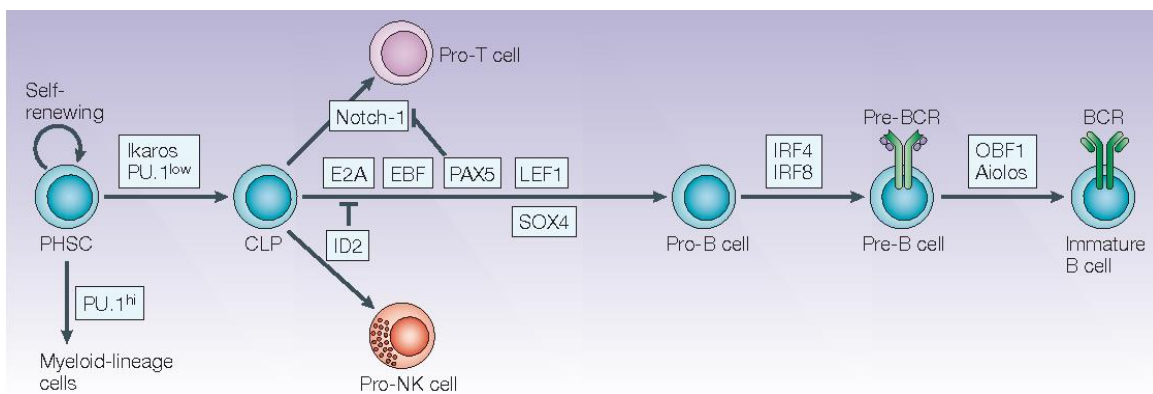


Figura 2. Mecanismo de regulación de la diferenciación temprana de las células B. Obtenido de Mathias P., et al. [38].

En la diferenciación a célula plasmática se suceden tres mecanismos fundamentales: reordenamiento VDJ, hipermutación somática y recombinación de cambio de clase (RCC) de las Igs. Los reordenamientos en los genes de las Igs de los precursores de células B tienen lugar en la MO. Posteriormente, estas células precursoras maduran en los órganos linfoides secundarios, lugar donde ocurre el reconocimiento antigénico, la hipermutación somática y la RCC de las Igs.

Las Igs están formadas por un tetrámero compuesto por dos cadenas ligeras idénticas (L, del inglés *Light*) y dos cadenas pesadas idénticas (H, *Heavy*). Los genes que codifican para las Igs están segmentados en cuatro regiones: V (del inglés, *Variable*), D (*Diverse*), J (*Joining*) y C (*Constant*). Del reordenamiento de estos segmentos resultan los genes funcionales, responsables directos de la codificación de cada una de las cadenas de Igs. En la primera fase de diferenciación a linfocito B, el precursor más inmaduro (célula pro-B) inicia el reordenamiento en la cadena pesada de las Igs (IgH). La recombinación genética es iniciada por la enzima deoxinucleotil transferasa terminal (TdT) y las proteínas activadoras de recombinasas RAG1 y RAG2, que tienen la capacidad de cortar y unir el ADN en puntos específicos de recombinación llamados RSSs (del inglés, *Recombination Signal Sequences*). Estas RSSs se encuentran en ambos extremos de cada segmento génico V, D y J. En primera instancia ocurre el reordenamiento del segmento D con el J (linfocitos pre-pro-B), seguido del segmento V con el DJ. Tras el reordenamiento, el gen IgH se transcribe, traduce y expresa en la superficie como una pseudo-cadena ligera (compuesta de VPRED e IGLL1), que desencadena la recombinación de la cadena ligera de las Igs (IgL) en los segmentos V y J (ya que las cadenas ligeras no contienen segmentos de diversidad), marcando la etapa de diferenciación preB. Esto ocurre primero en los alelos del gen de la cadena ligera *Kappa* (κ) y, si no se produce un alelo productivo, se sucede posteriormente en los de la cadena ligera *Lambda* (λ) [39].

El objetivo final del reordenamiento de los segmentos génicos de las cadenas de las Igs es el de generar un repertorio de Igs con un amplio rango de especificidad. Para las cadenas ligeras κ humanas, hay aproximadamente 40 segmentos del gen $V\kappa$ funcionales y 5 segmentos del gen $J\kappa$, lo que supone 200 posibles combinaciones de regiones $V\kappa$ diferentes. Para las cadenas ligeras λ hay aproximadamente 30 segmentos del gen $V\lambda$

funcionales y 4 segmentos del gen $J\lambda$, produciendo 120 posibles regiones $V\lambda$. Esto significa que pueden producirse 320 cadenas ligeras diferentes como resultado de la combinación de diferentes segmentos génicos de cadenas ligeras de las Igs. En cuanto a las cadenas pesadas, en humanos, hay 65 segmentos del gen VH funcionales, aproximadamente 27 segmentos del gen DH y 6 segmentos del gen JH lo que supone alrededor de 11.000 posibles combinaciones de regiones VH diferentes ($65 \times 27 \times 6 \approx 11.000$). Teniendo en cuenta que la combinación específica de segmentos de la cadena pesada no implica una restricción en los segmentos de la cadena ligera que pueden recombinar, un linfocito B podría producir cualquier cadena pesada y ligera, lo que genera una especificidad de anticuerpo teórica del orden de 3.5×10^6 posibles combinaciones (11.000×320).

La expresión superficial de las cadenas pesadas y ligeras ya emparejadas, denominadas receptor de células B (BCR) o receptor de antígenos IgM, marca la etapa de células B inmaduras. En caso de reaccionar con antígenos propios presentes en la MO, las células B pueden ser eliminadas (selección clonal) o pueden volver a intentar reordenar la cadena ligera (edición del receptor) con el fin de no reaccionar contra elementos propios. Los linfocitos que han superado la selección, denominados linfocitos B *naive*, comienzan a co-expresar IgM e inmunoglobulina D (IgD) en su membrana y migran hacia los órganos linfoides secundarios a través de la sangre. Estos linfocitos B quiescentes o *naive* colonizan el folículo linfoide, lugar donde ocurre el reconocimiento antigénico. Este reconocimiento da lugar a una potente activación de la proliferación de las células B que forman una estructura linfoide dinámica llamada centro germinal, con una zona más densa donde a los linfocitos B se les conoce como centroblastos, que experimentan división celular rápida e hipermutación somática. Cuando han dejado de proliferar, migran a la zona clara del centro germinal donde son conocidos como centrocitos, y son estimulados por antígenos presentados por las células dendríticas y células T foliculares, experimentando una serie de cambios que finalmente conducen por un lado a la generación de linfocitos B de memoria, y por otro a su maduración hasta CP secretoras de anticuerpos.

En los centros germinales los linfocitos llevan a cabo el proceso de hipermutación somática, que permite una gran diversificación de las Igs. Este proceso se produce gracias a la acción de una enzima denominada Desaminasa Inducida por Activación (DIA), que cataliza la desaminación selectiva de residuos de desoxicitidina en el ADN transformándolos en residuos de uracilo. El uracilo es mutagénico cuando se combina con guanina en el ADN, ya que el desoxiuracilo (dU) imita a desoxitimidina (dT) durante la replicación, y el desajuste uracilo:guanina (U:G) activa los mecanismos de reparación del ADN que introducen errores y que en última instancia originan una gran variedad de sustituciones de bases en el ADN de las regiones VH.

Por último, la región constante de las Igs puede sufrir una Recombinación de Cambio de Clase (RCC) de las Igs (**Figura 3**). La clase de anticuerpo, o isotipo, está determinada por la región constante de la cadena pesada y tiene un papel muy importante en la función efectora del anticuerpo. A esta región se unen receptores de superficie celular como por ejemplo receptores Fc y el complemento. Además, participa en la estabilidad del anticuerpo y determina la activación celular tras el reconocimiento antigénico. La RCC se produce cuando la IgH recombina somáticamente la región constante μ y su región δ con una de las regiones constantes alternativas $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, ϵ o $\alpha 2$. Por lo tanto, a través de este proceso de recombinación, linfocitos que originariamente expresan en su membrana IgM o IgD, sintetizan IgG, IgA o IgE. En él participa de nuevo la enzima DIA y otras proteínas como DNA-PK, ATM, Mre11-Rad50-Nbs1, γ H2AX, 53BP1, Mdc1 y la ligasa XRCC4 IV. Este proceso requiere de mecanismos de reparación de daño y puede resultar en una recombinación aberrante con otras regiones genómicas dando lugar a translocaciones. De hecho, diversos estudios sugieren que las alteraciones que inician el mieloma son el resultado de errores en la RCC [40,41].

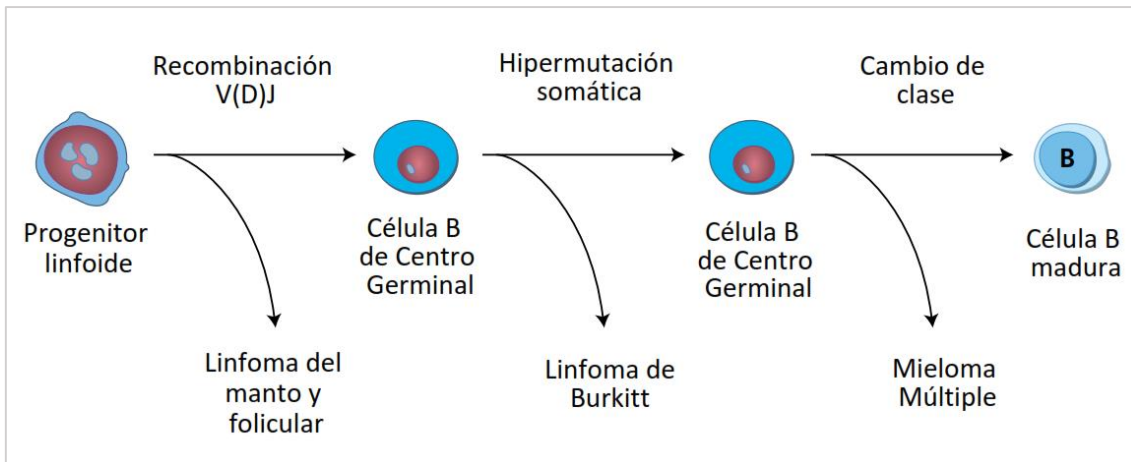


Figura 3. Origen de las neoplasias de células B. La maduración normal de células B incluye los procesos de reordenamiento de los segmentos VDJ y RCC. Errores en estos procesos pueden dar lugar a translocaciones. Analizando las secuencias anejas a sus puntos de ruptura, es posible identificar en qué estadio madurativo de célula B se produjo la translocación. Adaptado de Hoffbrand A., et al. [16].

1.2.2. EVENTOS GENÉTICOS DE LAS GAMMAPATÍAS

Los estudios de investigación citogenética han demostrado que prácticamente todos los pacientes con MM poseen alteraciones citogenéticas, lo que sugiere la elevada inestabilidad genómica que caracteriza al MM.

ANEUPLOIDÍAS

Aproximadamente la mitad de los casos de mieloma poseen una aneuploidía de varios cromosomas impares, que puede incluir los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21. El MM puede ser dividido en hiperdiploide (48-74 cromosomas) o no hiperdiploide, que a su vez se subdivide en los tipos hipodiploide (menos de 44/45 cromosomas), pseudodiploide (de 44/45 a 46/47) y tetradiploide (más de 74).

La hiperdiploidía en MM es prácticamente excluyente con el desarrollo de translocaciones del gen *IGH*. Del mismo modo, tanto la monosomía del cromosoma 13 como la ganancia del 1q ocurren predominantemente en el MM no hiperdiploide.

TRANSLOCACIONES DEL GEN *IGH*

El segundo tipo de evento genético más frecuente son las translocaciones del gen *IGH* (y en mucha menor medida afectando el locus de IgL -κ 2p11 o λ 22q11-). En estas translocaciones se yuxtaponen las regiones *enhancer* del gen *IGH* con determinados oncogenes, ocasionando su desregulación (**Figura 4**). Entre estos oncogenes destacan los genes de las ciclinas D1 y D3 (11q13 y 6p21, respectivamente) y los factores de transcripción de la ciclina D2 (12p13): *MAF* (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog*; 16q23) o *MAFB* (20q11), así como *MMSET* (*Multiple Myeloma SET Domain Protein Containing Protein Type III*; 4p16), también conocido como *NSD2*.

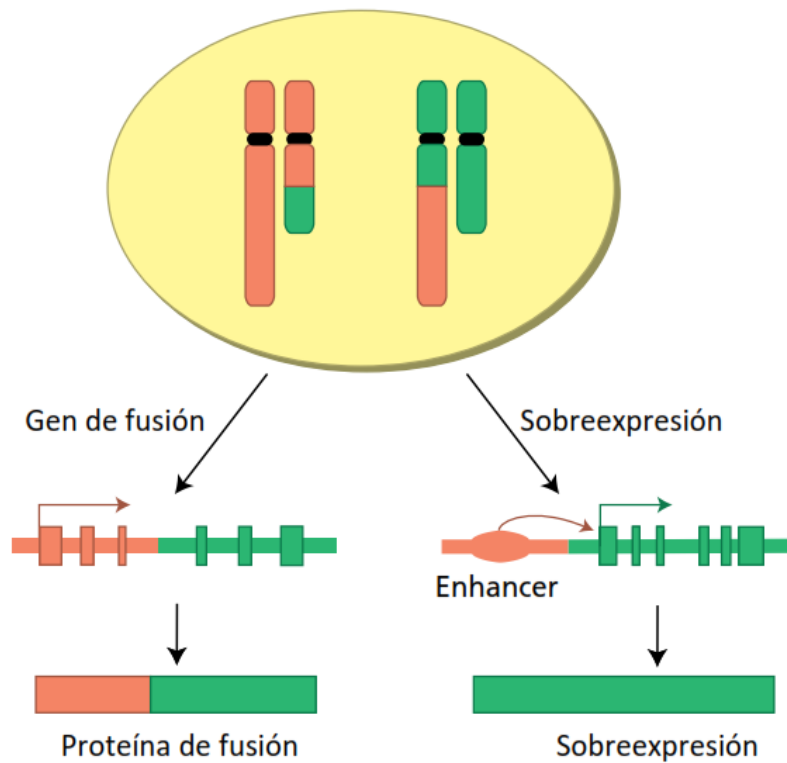


Figura 4. Mecanismos comunes de activación génica por translocaciones. Izquierda: formación de genes quimera resultado de la fusión de dos genes localizados en los puntos de ruptura del cromosoma; derecha: sobreexpresión de un gen intacto gracias a la acción de un potente enhancer o activador de la transcripción. Adaptado de Hoffbrand A., et al. [16].

Las translocaciones pueden clasificarse en primarias o secundarias. Las primarias ocurren como eventos iniciales en la patogénesis del MM y provienen generalmente de errores en la RCC que ocurrieron durante la activación de las células B en el centro germinal. Ejemplo de ello son aquellas que involucran los genes anteriormente mencionados. Diversos estudios han demostrado que la prevalencia de las translocaciones del gen *IGH* es similar en GMSI y en MM, lo cual apoya la idea de que dichas translocaciones son eventos tempranos en el proceso de desarrollo del MM [42–44]. Por el contrario, las secundarias están relacionadas con la progresión del MM y son resultado de errores en otros procesos de recombinación [42–45].

La prevalencia de la translocación t(11;14) en MM analizada por hibridación in situ de fluorescencia (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) es de un 15-20%. A través de esta translocación el gen de la ciclina D1 se yuxtapone al *enhancer 3'* del gen *IGH* en der(14), viendo así desregulada su expresión, hecho que ha sido confirmado por RT-PCR en el 100% de los casos de MM con t(11;14) [46–48].

Por otro lado, la translocación t(4;14) está presente aproximadamente en el 15% de los casos de mieloma. Esta translocación da lugar a la sobreexpresión del gen *FGFR3* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3*, un receptor tirosín quinasa oncogénico) y del gen *MMSET*, resultado de la formación del gen de fusión *IGH-MMSET* [49–51] (**Figura 5**). Sin embargo, estudios de expresión génica han determinado que sólo el 75% de los mielomas con esta translocación sobreexpresan ambos genes de forma simultánea. En el 25% restante de casos se sobreexpresa *MMSET* y no *FGFR3* [52] (generalmente asociado a la pérdida de este último gen), lo que sugiere que *MMSET* podría tener mayor relevancia patogénica en el desarrollo del MM con t(4;14) que *FGFR3*. De hecho, la sobreexpresión del gen *MMSET* está presente en todos los MM con t(4;14) y conduce a cambios globales en la metilación de histonas que promueven la supervivencia de la célula mielomatosa, apoyando su papel central en la patogénesis de este subtipo de mieloma [53]. También se ha descrito que, en ocasiones, el gen *FGFR3* translocado contiene mutaciones activadoras asociadas con la progresión tumoral [54,55]. En estos casos la sobreexpresión de *FGFR3* provoca la activación de proteínas que forman parte de vías de señalización proliferativas, como la vía de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), y anti-apoptóticas, como la vía de PI3K (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*)/AKT (*v-AKT Murine Thymoma Viral Oncogene*) [56].

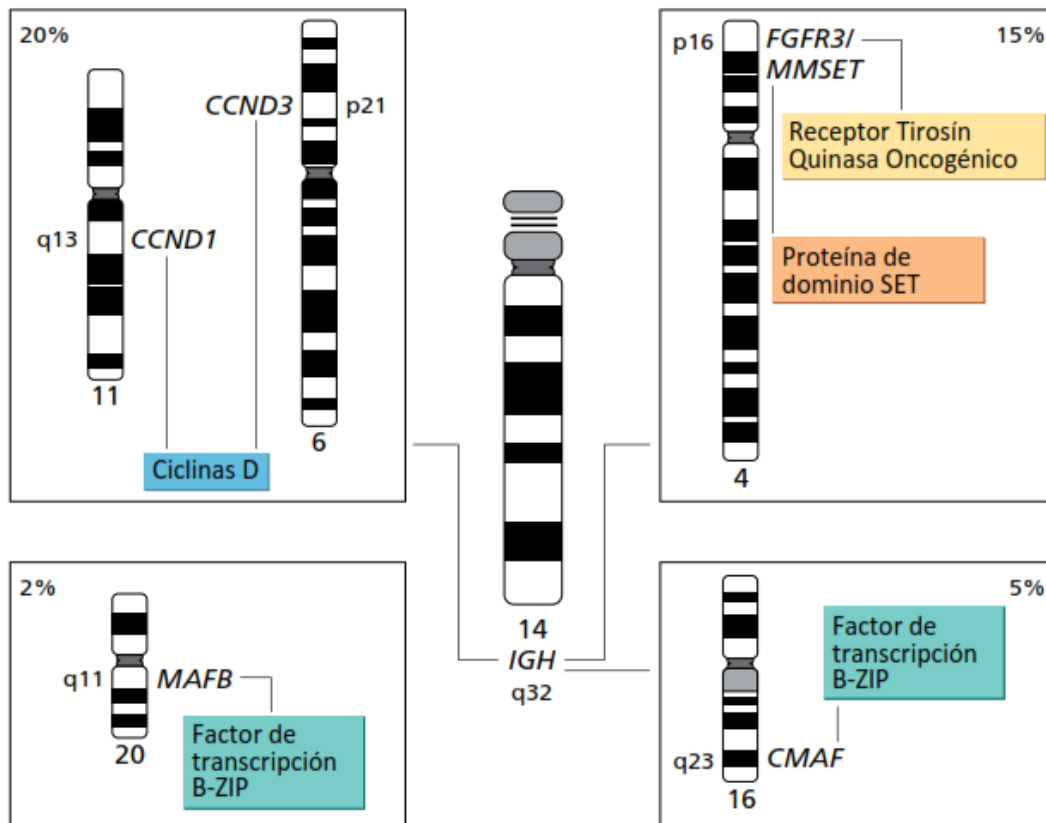


Figura 5. Translocaciones del gen IGH en MM. Adaptado de Hoffbrand A., et al. [16].

La incidencia de la translocación t(14;16) ronda el 5-10% de los MM. El punto de ruptura del 16q23 en esta translocación sucede en una región centromérica a 550–1350 kb del gen *MAFC*. Teniendo en cuenta esta gran distancia, no está claro si los *enhancers* de *IGH* podrían actuar potenciando la expresión de C-Maf en esta translocación. Además, esta proteína se encuentra sobreexpresada en la mitad de los mielomas, mientras que la incidencia de esta translocación es baja. En cualquier caso, la sobreexpresión de C-Maf estimula la progresión en el ciclo celular mediante la sobreexpresión de ciclina D2 y promueve la interacción con el microambiente de la MO vía sobreexpresión de la integrina 87, interacción que aumenta significativamente la secreción de VEGF, procesos clave para la supervivencia de la célula de MM. Otras translocaciones que ocurren con menor frecuencia son la t(6;14), que sobreexpresa ciclina D3; así como la t(14;20), que desregula *MAFB*. Las translocaciones t(14;16) y t(14;20) son consideradas de alto riesgo según la clasificación mSMART (*Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy*) del MM, mientras que la t(4;14) es de riesgo intermedio (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación mSMART del MM y supervivencia global asociadas [57].

Alto riesgo	Supervivencia global
del 17p t(14;16) t(14;20) Firma de alto riesgo determinada por el perfil de expresión génica	3 años
Riesgo Intermedio	
t(4;14) Monosomía del cromosoma 13 Hipodiploidía Índice proliferativo > 3%	4,5 años
Riesgo estándar	
t(11;14) t(6;14) Otras alteraciones citogenéticas	10 años

Algunos de estos eventos moleculares representan dianas terapéuticas potenciales. Este es el ejemplo de la translocación t(4;14), que da lugar a la activación constitutiva del receptor tirosín quinasa FGFR3, que a su vez fosforila y activa la vía antiapoptótica de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Por lo tanto, el uso de inhibidores de la tirosín quinasa FGFR3, así como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y de C-Maf, suponen potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento del MM.

GANANCIAS O PÉRDIDAS CROMOSÓMICAS

Entre las ganancias o pérdidas cromosómicas destacan la monosomía/delección del cromosoma 13 [58,59], la delección del brazo corto del cromosoma 17 (17p) [60] y la amplificación del brazo largo del cromosoma 1 (1q) [61]. La pérdida del cromosoma 13 es la monosomía más común en MM (presente en el 40-50% de los pacientes con MM al diagnóstico) [62]. Además, muestra una elevada co-ocurrencia con las translocaciones t(4;14) y t(14;16), y parcialmente con la delección del 17p y ganancia del 1q [40,58,59]. La delección del 17p, que incluye la pérdida del gen *TP53* (*Tumor Protein p53*), ocurre en menor frecuencia (5-10% de nuevos diagnósticos) pero su valor pronóstico es muy importante dado que está asociada a estadios avanzados y progresión de la enfermedad, así como con invasión extramedular suponiendo así una alteración de alto riesgo (**Tabla 4**) [60]. La ganancia del 1q es uno de los eventos más comunes en el MM y se caracteriza por una elevada proliferación, generalmente asociada a la sobreexpresión de *CKS1B* (*CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 1B*, 1q21) [61]. Diversos estudios han confirmado el mal pronóstico de esta traslocación [63], aunque aún no ha sido incluida por el IMWG en el grupo de alto riesgo.

DESREGULACIÓN DE MYC

La presencia de alteraciones de *MYC* en las neoplasias de células B es un evento frecuente. Están presentes en baja frecuencia en GMSI, en torno al 15-35% de pacientes con MM de nuevo diagnóstico y alrededor del 50% de pacientes con MM refractario o en recaída, lo cual sugiere el papel de estas alteraciones en la progresión de la enfermedad [64–66]. A diferencia de otras neoplasias de células B como el linfoma de Burkitt, en el que la translocación *IGH-MYC* [t(8;14)] es un evento primario, en el MM solo se ha identificado en niveles subclonales en pacientes de nuevo diagnóstico. En MM estas translocaciones de *MYC* dan lugar a la amplificación o transposición de *enhancers* que de un modo u otro conducen a la sobreexpresión de *MYC* [67,68].

MUTACIONES

El desarrollo de las tecnologías de NGS ha permitido la detección e identificación de alrededor de 35 mutaciones no silenciosas en el genoma del MM. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con MM portan mutaciones en uno o más de uno de los genes siguientes: *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) Oncogene Homolog*), *KRAS* (*v-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), *ACTG1* (*Actin Gamma 1*), *RB1* (*Retinoblastoma 1*), *CYLD* (*Cylindromatosis (Turban Tumor Syndrome)*), *PRDM1* (*PR/SET Domain 1*), *TRAF3* (*TNF Receptor-Associated Factor 3/6*), *BRAF* (*v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*), *FAM46C* (*Family with sequence similarity 46 member C*), *DIS3* (*DIS3 Homolog, Exosome Endoribonuclease and 3'-5' Exoribonuclease*), o *TP53*. Estas mutaciones muestran una elevada heterogeneidad intraclonal y tienen un papel muy importante en la progresión de la enfermedad, así como en el desarrollo de resistencias [69–71].

Las alteraciones en la vía de Ras son comunes en MM, pero raras en GMSI. *KRAS* y *NRAS* son los dos genes más frecuentemente mutados en MM, estando presentes en el 40% de los MM de nuevo diagnóstico y en torno al 75% de los refractarios o en recaída. En contra de lo que se podría pensar, el 15% de pacientes con mutaciones en *KRAS* posee también alteraciones en *NRAS*. Sin embargo, esto podría explicarse teniendo en cuenta que pueden ocurrir en distintos subclones. Además, no todas las mutaciones de la vía de Ras activan de la misma forma la señalización MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*).

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

Durante la diferenciación de la célula plasmática y la formación del centro germinal, la metil transferasa de histonas EZH2 reprime la transcripción de genes de diferenciación como *PRDM1* e *IRF4* mediante la transferencia de 3 grupos metilo a la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), prolongando de este modo la permanencia en el centro germinal y por consiguiente la maduración de las células B hasta CP secretoras de anticuerpos. La rápida proliferación celular en el centro germinal resulta en una gran hipometilación del

ADN, lo que facilita la activación de los *enhancers* de las células plasmáticas que permiten su diferenciación. Determinar aquellos factores activadores de los *enhancers* que permiten la distinción de la célula plasmática de la célula mielomatosa podría proveer de dianas terapéuticas para tratar el MM. Así, se han descrito diferentes enzimas y marcas epigenéticas asociadas a la represión o activación de la expresión génica en el MM (**Figura 6**).

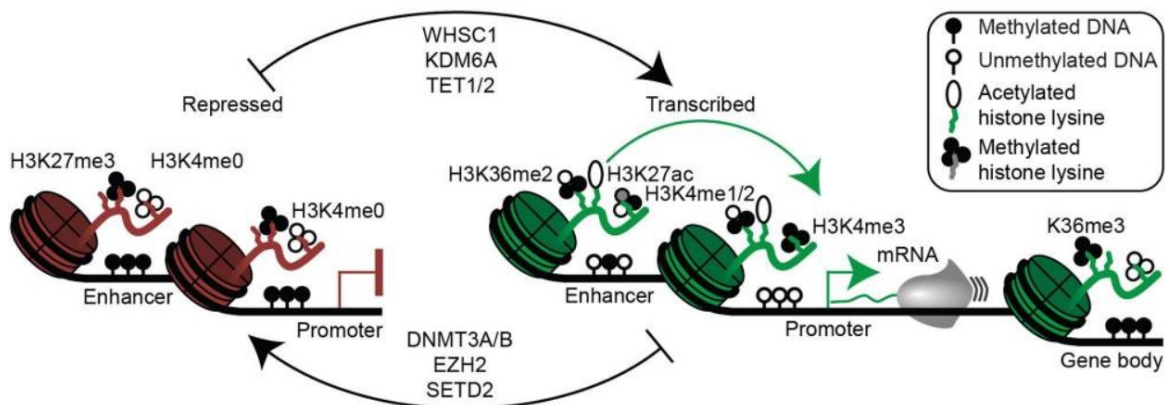


Figura 6. Mecanismos epigenéticos de regulación génica en células plasmáticas y mieloma múltiple. Las modificaciones epigenéticas asociadas con la represión génica se muestran en la parte izquierda (en rojo) e incluyen la trimetilación de lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), la falta de metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me0), así como la metilación del enhancer o promotor en el ADN. Las modificaciones epigenéticas activadoras de la transcripción de genes se muestran a la derecha (en verde) e incluyen H3K36me2 (mediada por MMSET), acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac), mono/bi-metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1/2) en la región de los enhancers y H3K4me3 en la región de los promotores, y ausencia de metilación del ADN en enhancers y promotores. El cuerpo de los genes transcripcionalmente activos, a menudo contiene marcas H3K36me3 y de metilación en el mismo ADN. En el centro se muestran enzimas que median en las modificaciones epigenéticas activantes (arriba) y represivas (abajo) relevantes en el MM. Adaptado de Barwick G., et al. [40].

Tal y como se mencionó anteriormente, uno de los genes más comúnmente translocados en el MM es *MMSET* [t(4;14)]. Este gen codifica para una metiltransferasa H3K36, por lo que la translocación de este gen junto al *enhancer* de *IGH* da lugar a un incremento de H3K36me2 y por consiguiente un incremento en la accesibilidad de la cromatina [53,72]. No obstante, el papel oncogénico específico que esta enzima pueda desempeñar aún está por determinar.

Además de la t(4;14), se han identificado mutaciones en diversos genes con un papel relevante en la regulación epigenética y que confieren ventaja proliferativa o de supervivencia a las células del MM. Entre ellos, se incluyen la desmetilasa de H3K27me3 KDM6A (o UTX), cuya pérdida de función se asocia con una mayor proliferación y adhesión de las células de mieloma [73]. Recientemente también se han descrito mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* [74]. Estos genes codifican isocitrato-deshidrogenasas que normalmente producen α -cetoglutarato, pero cuando mutan dan lugar a la acumulación de un sustrato que inhibe a la desmetilasa de histonas Jumonji-C y a la familia de metil hidroxilasas TET, puesto que ambas utilizan α -cetoglutarato como cofactor. Por lo tanto, como consecuencia de la mutación de estos genes se produce una alteración en las modificaciones de histonas, así como de la hipermetilación del ADN [75]. Esto ha sido relacionado con una alteración en la función de factores de transcripción como c-Myc y MAX, que son sensibles al estado de metilación del ADN [76,77]. Además, la presencia de mutaciones de pérdida de función en *MAX* ocurre en el 3% de los mielomas y alteran su afinidad para unirse a regiones de unión de factores de transcripción metiladas o hidroximetiladas [74,78].

Otra vía de metilación del ADN afectada por mutaciones en MM incluye el gen *TET2* [74], cuya función es la de oxidar metilaciones en el ADN permitiendo su eliminación mediante el mecanismo de reparación por excisión de bases. También se han identificado mutaciones en *DNMT3A*, que cataliza la metilación del ADN en islas CpG [79] (regiones de ADN de 300 a 3000 pares de bases con alta frecuencia de residuos de C-G, que a menudo aparecen asociadas al inicio del gen o a la región promotora).

Además de las mutaciones en enzimas que regulan la metilación del ADN o de histonas, las células mielomatosas presentan frecuentemente hipermetilado el promotor de los genes inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas *CDKN2B* (P15)

y *CDKN2A* (P16), dando lugar a un silenciamiento transcripcional de estos genes y por tanto a la progresión de ciclo celular [80]. Esto mismo ocurre con el gen *SOCS1*, un supresor de la señalización de citoquinas clave como es la interleucina 6 (IL6) [81,82]. Sin embargo, y a pesar de estos eventos puntuales de hipermetilación, los estudios globales de metilación del genoma han demostrado que el MM se caracteriza por una hipometilación global [83,84], que parece estar asociada a la progresión de la enfermedad [85].

ALTERACIONES TRANSCRIPTÓMICAS

El análisis del perfil de expresión génica del MM ha confirmado su enorme diversidad y heterogeneidad molecular [23,86,87]. Se han propuesto al menos 10 grupos moleculares en el que cada uno muestra una firma genética específica (**Tabla 5**). Algunos de ellos están asociados con una translocación de *IGH* particular o bien a un estado de ploidía, así como a un comportamiento clínico característico. Cabe destacar que los subtipos moleculares PR, MS, MF y CTA están asociados a alto riesgo.

Para analizar el papel de estas alteraciones transcripómicas en el desarrollo de la enfermedad, diversos estudios han comparado el perfil de expresión génica de células de GMSI y MM, así como de mielomas de nuevo diagnóstico y en recaída. Así, se ha definido el perfil de expresión génica compartido por los distintos estadios, y se han identificado aquellos genes o vías que se activan durante la progresión del MM. Entre estos últimos se incluyen *MYC* y *E2F*, así como genes antiapoptóticos, de reparación del ADN, y los relacionados con la señalización por citoquinas y NF- κ B.

Tabla 5. Subgrupos moleculares de MM y sus principales características asociadas: alteración citogenética, tipo de ciclina, genes desregulados e implicación clínica.

SUBGRUPO	CD1	CD2	MF	MS	LB	PR	HY	CTA	NF-KB	PRL3
CITO-GENÉTICA	t(11;14)	t(11;14) t(6;14)	t(14;16) t(14;20)	t(4;14) 1q(g)		1q(g)	HD	1q(g)	HD	HD
EXPRESIÓN CCND	CCND1	CCND1 CCND3	CCND2	CCND2	CCND1 CCND2	CCND2 CCND1	CCND1	CCND1 CCND2	CCND1 CCND2	CCND2
GENES SOBREENPRE-SADOS	INHBE ETV1 MACROD	cd79a cd20	IL6R c-MAF MAFB	MMSET FGFR3 PBX1	EDN1 IL6R SMAD1	CCNB1 MCM2 CDC2 BIRC5 CCNB2 AURKA	TRAIL DKK1 CCR5	CTA AURKA	CD40 BCL10 IL8	SOX3 PTP4A3 PTPRZ1
GENES INFRAEXPRESADOS	CD9 NOTCH2	CCND2	DKK1 CCND1	CCND1 DUSP2 SYK PAX5	DKK1 STAT1 STAT2	CXCR4 CD27	CCND2 CD52 TAGLN CKS1B OPN3	MALAT1	TRAF3 CCR2 MAT2A	CD44 DUSP6
ALTO/BAJO RIESGO	LR	LR	HR	HR	LR	HR	LR	HR	LR	LR
FRECUENCIA	4-9%	11-17%	6-10%	15-17%	12-17%	11%	26-32%	7%	11%	2-3%

Abreviaturas: CD-1 y CD-2, con translocaciones en IGH con CCND1 o CCND3 (t(11;14) y t(6;14)). MF, con translocaciones de IGH en MAF (t(14;16)). MS, con translocaciones de IGH con MMSET (t(4;14)). LB, Low Incidence of Bone lesions. PR, Cell Cycle Progression and Proliferation. HY, Hyperdiploid. CTA, Cancer Testis Antigens. PRL3, Phosphatase of Regenerating Liver 3. (g), ganancia cromosómica. HD: Hiperdiploidía.

La tecnología de RNA-seq (secuenciación del ARN), que está reemplazando poco a poco las técnicas basadas en *microarrays* de expresión, permite no sólo detectar distintos transcritos y sus isoformas, sino también una gran cantidad de mutaciones y modificadores transcripcionales, que son moléculas intermedias que actúan en la

transcripción del ARN pudiendo modificar su nivel de expresión, secuencia o características, afectando así a la proteína que se está produciendo. Estos modificadores del transcriptoma juegan un papel importante en el desarrollo de neoplasias malignas, incluido el MM, y pueden participar en la tumorigénesis inicial o en estadios más avanzados de enfermedad. Los más estudiados de entre ellos en MM son los microARNs (miARNs), que participan en la mielomagénesis y sirven como predictores de respuesta. Se calcula que los miARNs podrían regular la expresión del 30% de los genes. Además, se ha identificado el papel de diferentes miARNs en el MM y su valor para caracterizar distintos subgrupos. Ejemplo de ello es el miR-126, que actúa inhibiendo la expresión de c-Myc. La sobreexpresión de *MMSET* que tiene lugar con la t(4;14) reduce la expresión del miR-126 que, en última instancia, favorece la expresión de c-Myc [88]. Además, determinados estudios también han sugerido que la expresión de miARNs circulantes podría tener valor pronóstico en el MM [89]. Por otro lado, se están desarrollando tratamientos que permiten restaurar la expresión de miARNs supresores tumorales o inhibir miARNs oncogénicos que podrían constituir una opción terapéutica importante en el futuro. Más recientemente, diversos estudios han analizado el papel de los lncRNAs (*long non coding RNAs*) en el MM y han identificado lncRNAs desregulados con valor pronóstico que podrían tener un impacto en el sistema inmune y la progresión tumoral [90].

El *splicing* alternativo es un mecanismo post-transcripcional que permite incrementar enormemente el repertorio de transcritos celulares. Este mecanismo está involucrado en diversos procesos celulares entre los que se encuentran el crecimiento y supervivencia celular. Algunos eventos de *splicing* alternativo identificados comúnmente en MM afectan a los genes *XBP1* (*X-Box-Binding Protein 1*), que sensibiliza las células a inhibidores del proteasoma [91], *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) [92] y *HAS1* (*Hyaluronan Synthase 1*) [93]. Al igual que con el resto de modificaciones post-transcripcionales, estudios recientes han identificado eventos de *splicing* que ocurren diferencialmente en células plasmáticas y de MM, y se han determinado sus características funcionales e implicaciones clínicas [94].

1.2.3. INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS Y SU MICROAMBIENTE

Como se ha mencionado, la interacción entre las células plasmáticas y su microambiente puede ser tan importante en la patogénesis del MM como las propias alteraciones genéticas presentes en la célula tumoral. En la MO, las células mielomatosas interactúan con proteínas de la matriz extracelular (MEC) (ej. fibronectina, laminina, colágeno), así como con una población no maligna de células mesenquimales estromales (CMEs) y otros tipos celulares a través de un conjunto de moléculas de adhesión, entre las que destacan la familia de las integrinas $\beta 1$ (VLA-4, VLA-5 y VLA-6), la molécula de adhesión intracelular ICAM-1, así como la molécula de adhesión celular vascular VCAM-1 (**Figura 7**). Además, las CMEs producen factores como SDF-1 (*Stromal Cell-Derived Factor 1*), el cual se une al receptor CXCR4 (*C-X-C Chemokine Receptor Type 4*) de las células de MM induciendo una mayor expresión de moléculas de adhesión [95]. Otras moléculas que expresan las células de MM y que facilitan esta adhesión celular son CD138, CD38, CD44 y CD106 [96,97].

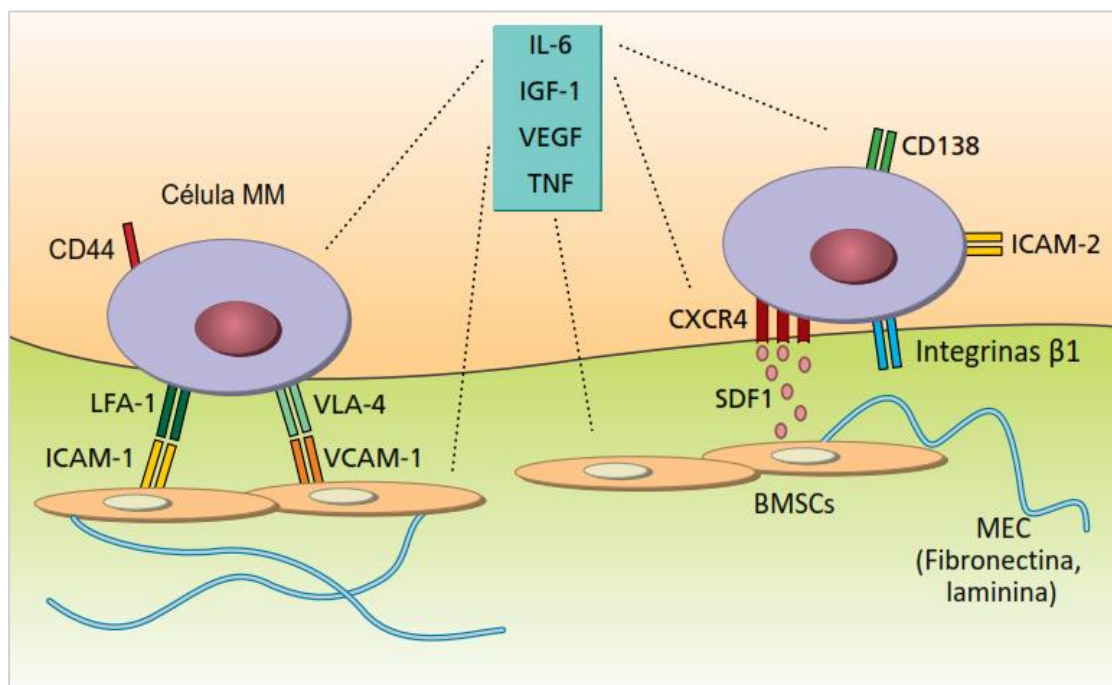


Figura 7. Interacciones entre la célula de MM y su microambiente. Adaptado de Hoffbrand A., et al [16].

La adhesión de las células de MM con el microambiente de la MO induce la producción y secreción de citoquinas por parte de las células del microambiente y las propias células de mieloma, entre las que destacan TNF- α (*Tumour Necrosis Factor Alpha*), IL6 e IL21, IGF1 (*Insulin Like Growth Factor 1*), SDF-1 α y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Esto activa vías de señalización, entre las que se encuentran las vías de MAPKs, PI3K/AKT y JAK/STAT, que inducen la inhibición de la apoptosis, la supervivencia y la proliferación celular (**Figura 8**). Estas vías conforman potenciales dianas terapéuticas y, en concreto, la inhibición farmacológica de la vía de MAPKs ha sido evaluada en esta tesis doctoral en el contexto de la resistencia a fármacos, y será posteriormente desarrollada en los sucesivos capítulos.

Por otro lado, esta adhesión de las células de MM con los componentes de la MEC también favorece la aparición de resistencias (*CAM-DR, Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance*) mediante tres mecanismos principales: (1) la parada del ciclo celular en fase G1 debido a la sobreexpresión de p27 (un inhibidor de CDKs) y a la reducción de la actividad enzimática de las ciclinas A y E, además de la sobreexpresión de p21 y la infraexpresión de la proteína proapoptótica Bim; (2) el bloqueo de la apoptosis mediante la sobreexpresión de FLIP-L, un inhibidor de la molécula apoptótica FAS (CD95); y (3) la protección de la célula de MM a fármacos que inducen daño en el ADN reduciendo la actividad de la topoisomerasa 2 [97,98].

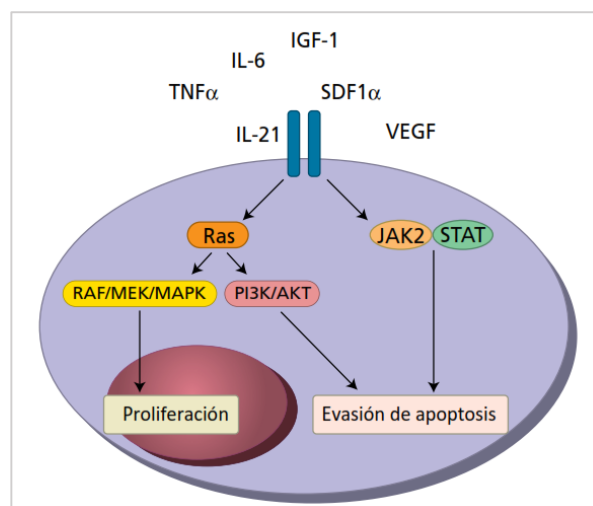


Figura 8. Esquema simplificado de las principales vías de señalización potenciadas por el microambiente involucradas en la patogénesis del MM [99].

Además, las células de MM también interactúan en la MO con osteoclastos (OC), osteoblastos (OB), células endoteliales y células del sistema inmune a través de moléculas de adhesión (revisado en [96], **Figura 9**).

Como consecuencia de la interacción de la célula de MM con los OC y OB, se induce una reducción en la capacidad formadora de hueso de los OB y en su diferenciación [100–104], mientras que se favorece la actividad resortiva y la diferenciación de los osteoclastos [105–108], lo cual explica las lesiones osteolíticas características del MM [109]. Además de los factores proangiogénicos producidos por la célula tumoral resultado de la activación oncogénica o de las mutaciones, la adhesión de las células de mieloma con las células endoteliales también induce la producción de citoquinas proangiogénicas. Estas citoquinas, entre las que destacan IL-8 y VEGF, permiten el reclutamiento de vasos sanguíneos a la MO. A su vez, las células endoteliales secretan factores de crecimiento que promueven el crecimiento de la célula de mieloma (VEGF, IL6 e IGF1) [110].

Los estudios de perfil de expresión génica también han analizado el impacto del microambiente sobre la célula de mieloma y han identificado vías y genes que se activan como resultado de esta interacción, como son las vías de NF- κ B, Notch y Ras, así como genes que afectan a la proliferación, supervivencia y ciclo celular [97,111,112].

Más recientemente, García-Gómez A., *et al.* analizaron el papel de las CME en la desregulación epigenética y su relación con la lesión ósea asociada al mieloma. En este trabajo se identificaron patrones de metilación del ADN de CME asociados a los distintos estadios de la enfermedad. Además, el estudio sugiere que la inhibición farmacológica de las metiltransferasas del ADN e histonas previene la lesión ósea y reduce el tamaño tumoral [113].

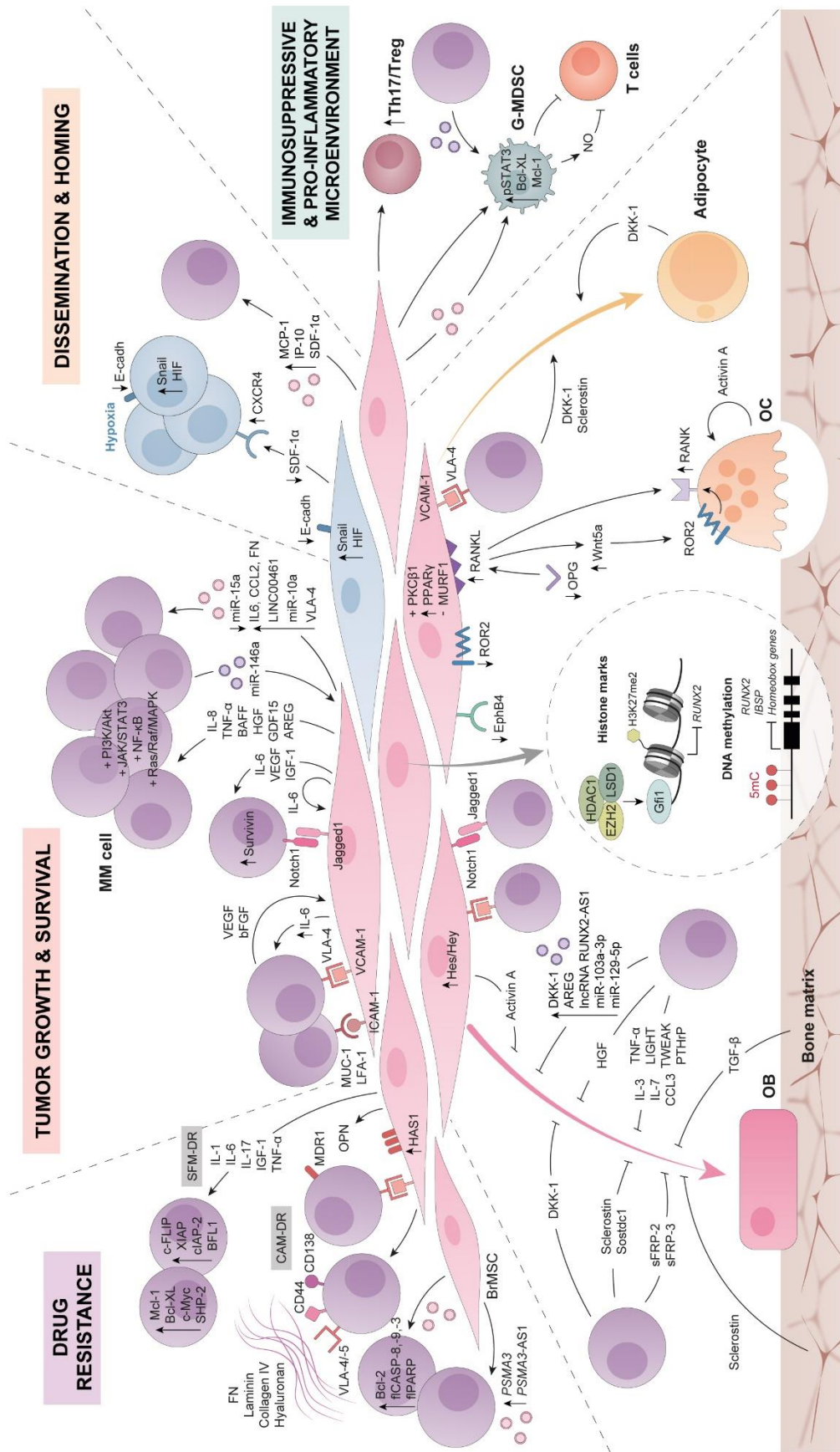


Figura 9. Actividad biológica mediada por las CME en el microambiente del MM.

La interacción entre CMEs y células de mieloma (a través de moléculas de adhesión, a través de factores solubles o por vesículas extracelulares derivadas de células MM o MSC) contribuye activamente a la patología de la enfermedad: aumenta el crecimiento y la supervivencia de MM, inducen, promueven la diseminación y la localización del mieloma, apoyan la enfermedad ósea a través de una OB alterada, mientras favorecen la diferenciación de adipocitos y promueven la OC. Además, contribuyen a un microambiente proinflamatorio e inmunosupresor. Obtenido de Maiso P., et al.⁹⁶.

Las células de MM también se ven influenciadas por células del sistema inmune con actividad antitumoral como las células T y células NK, así como otras con actividad protumoral entre las que se incluyen los macrófagos asociados a tumores (TAMs del inglés *Tumor-Associated Macrophages*), las células T reguladoras (Treg), T-helper 2 (Th2) y Th17, los mastocitos, las células dendríticas mieloides (mDCs del inglés *Myeloid Dendritic Cells*) y las células mieloides supresoras (MDSC del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), entre otras (**Figura 10**). Los macrófagos se clasifican en dos subgrupos, M1 y M2 atendiendo a su función. Los macrófagos M1 actúan como agentes antitumorales produciendo citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*), y expresando altos niveles de MHC de clase II. Los macrófagos M2 tienen un rol inmunosupresor que facilita la progresión tumoral gracias a su producción de IL-10, VEGF, FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*), MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) y arginasa-1, y a la expresión de los receptores CD163 y CD206. De forma característica se ha observado que los TAMs presentan fenotipo M2. La mayor o menor cantidad de macrófagos M1 ó M2 y la relación M1/M2 viene determinada por la presencia de factores de activación en el microambiente [114]. Las células Th1 producen citoquinas como IFN- γ (Interferon- γ) y LPS (Lipopolisacáridos) que promueven la diferenciación de macrófagos M1, mientras que las citoquinas producidas por células Th2 como IL-10 y hormonas GC (Glucocorticoides) conducen a la diferenciación a macrófagos M2 [115]. Además, tanto las células de MM como las CME producen citoquinas como CXCL12, CCL2, CCL3 y CCL14 que favorecen la diferenciación de macrófagos con fenotipo M2 [116].

Los mastocitos, que en un primer momento contribuyen a la muerte de células tumorales, secretan IL-6 lo cual promueve el crecimiento de las células de MM. Las mDCs contribuyen a la proliferación y supervivencia gracias a la interacción de sus moléculas de CD80/CD86 con el receptor CD28 de las células de MM, y a la producción de IL-3. Las MDSCs inducen la producción de citoquinas por las células de MM como CCL5, MIP-1 α e IL-6, e inhiben la respuesta citotóxica de las células T efectoras a través de la activación de los Treg (que producen IL-10 y TGF- β , entre otros factores). Por otro lado, los Treg también son promovidos por factores como IFN-I [117], producido por las células de MM, así como la enzima IDO (Indoleamino 2, 3-Dioxigenasa) [118], que a su vez tienen

un efecto inhibitorio sobre los linfocitos T efectores. Además, las células Th17 de la MO también promueven el crecimiento y proliferación tumoral a través de la secreción de IL-17 [119]. Estos complejos efectos inmunosupresores no sólo afectan a los linfocitos T efectores, sino también a la actividad citotóxica de las células NK mediante citoquinas y factores solubles que son secretados por las células de MM (ej. MICA) y que inducen una reducción de los receptores activadores de las células NK y un incremento de los receptores inhibidores.

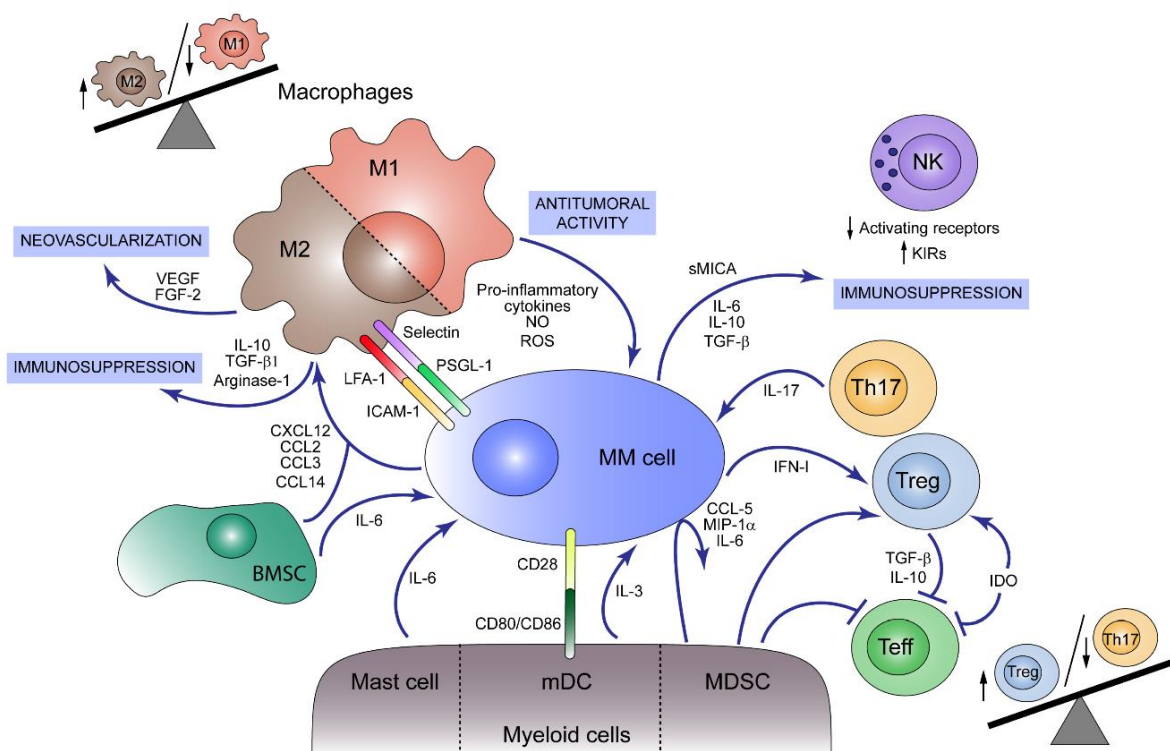


Figura 10. Inmunosupresión mediada por el microambiente en el MM. Obtenido de García-Ortiz A., et al. [37].

Algunos de los factores solubles de la MO también son necesarios para la proliferación y supervivencia de las células de MM. Entre ellos destacan APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*) y BAFF (*B-Cell Activating Factor*), ambos ligandos de BCMA (*B-Cell Maturation Antigen*). Diversos estudios han señalado la capacidad de los eosinófilos y megacariocitos para producir estos factores, sugiriendo su papel en la supervivencia de las células de MM. Además, la mayoría de estas moléculas se han convertido en dianas de diferentes estrategias terapéuticas, por ejemplo, recientemente se han desarrollado tratamientos antimieloma muy prometedores basados en anticuerpos conjugados a fármacos (ADC, del inglés *Antibody-Drug Conjugate*), anticuerpos biespecíficos o terapia con células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T Cells*) dirigidos frente a BCMA [120].

Los exosomas son vesículas formadas por invaginación de membranas endosomales tardías de pequeño tamaño (30-150 nm) que permiten la transferencia de información molecular entre componentes del microambiente de la MO. Estas vesículas son liberadas por todas las células anteriormente mencionadas y pueden portar moléculas de ADN, ARNm (ARN mensajero), miARNs, integrinas, factores de crecimiento y enzimas metabólicas, entre otros. Diversos estudios han demostrado que las células de MM inducen la secreción de exosomas de las células de la MO que ayudan a generar las condiciones de crecimiento, estimulación y migración idóneas para ellas [121,122]. Además, los exosomas alteran la composición de la MEC, participan en la angiogénesis, en la supresión de la respuesta inmune y favorecen la migración y diferenciación osteoclástica [123–125]. Por último, diversos estudios han demostrado que los exosomas de las CME en cocultivo con células de MM presentan una composición diferente de miARNs, así como un mayor contenido en proteínas oncogénicas, citoquinas y moléculas de adhesión [125–127].

1.3. MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL

Existen dos conceptos ampliamente aceptados en el campo de la tumorigénesis. En primer lugar, que el cáncer es resultado de cambios genéticos secuenciales que, finalmente, transforman células normales en malignas. En segundo lugar, que para mantener el proceso de la tumorigénesis es necesario que procesos biológicos específicos sean desregulados a lo largo de la evolución tumoral. Estos procesos desregulados fueron definidos como *hallmarks of cancer* por Hanahan y Weinberg [128,129]. Entre ellos, la evasión de la muerte celular y la desregulación del ciclo celular son considerados procesos fundamentales en la transformación y el mantenimiento tumoral.

1.3.1. EVASIÓN DE LA APOPTOSIS

El MM se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas en la MO que proliferan lentamente, lo cual sugiere que la resistencia a la apoptosis (**Figura 11**) podría tener un papel muy importante tanto en la patogénesis como en la resistencia al tratamiento.

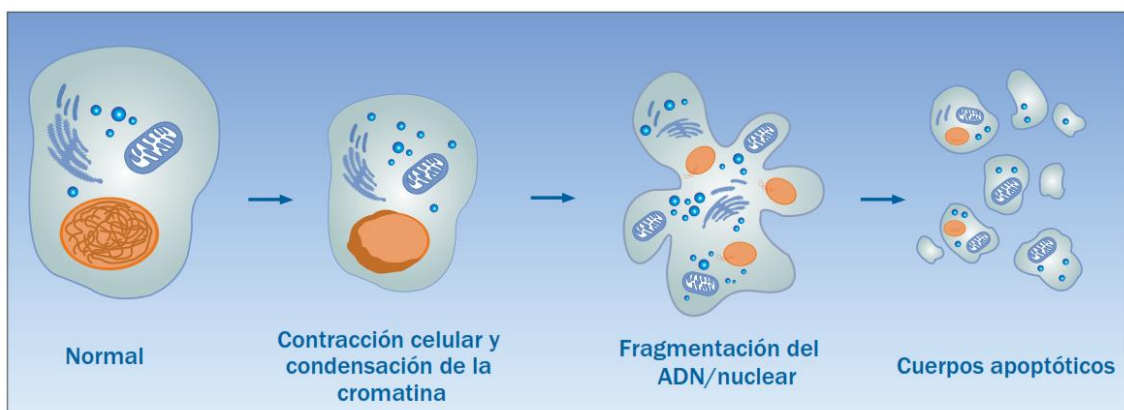


Figura 11. Proceso apoptótico en células de mamífero.

La apoptosis es un proceso de muerte celular que puede iniciarse por una gran variedad de señales, entre las que se encuentran el daño al ADN, la privación de factores de crecimiento, así como tratamientos antitumorales [130]. Este proceso tiene lugar mediante dos vías principales que llevan a la activación de las caspasas: la vía de los receptores de muerte (DR, *Death Receptors*) o vía extrínseca y la vía mitocondrial o vía intrínseca (**Figura 12**) [131].

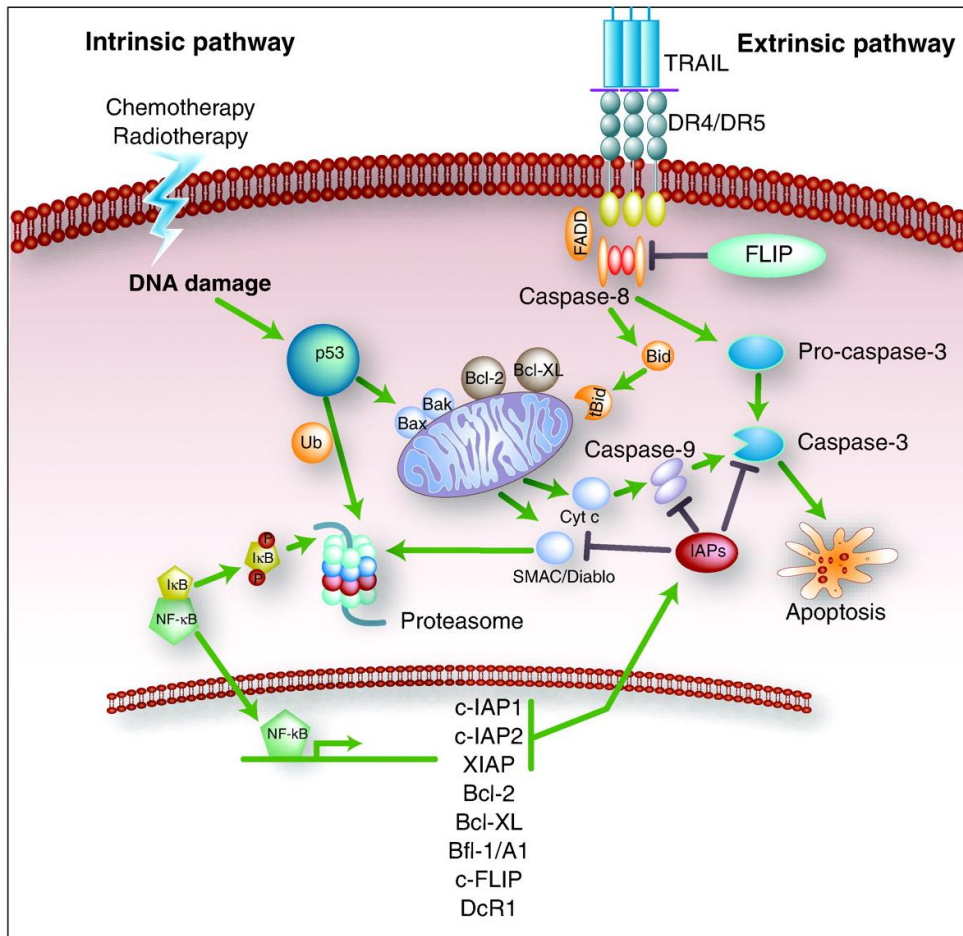


Figura 12. Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. Obtenido de Vries E., et al. [132].

Las caspasas son miembros de una familia de cisteín proteasas inicialmente inactivas que son responsables de la activación de varios procesos celulares y endonucleasas. Resultado de su activación, se produce el procesado de proteínas celulares con función reguladora o estructural que conduce a cambios morfológicos y bioquímicos en la célula característicos del proceso apoptótico.

APOPTOSIS EXTRÍNSECA

La vía extrínseca se activa a través de miembros de la familia del factor de necrosis tumoral TNF como FASL, TNF- α , o Apo2L (también conocido como TRAIL), mediante su unión a un receptor de muerte de la membrana plasmática (Fas, TNFR1 –*TNF Receptor 1*- y DR4/DR5 o TRAIL-R). La unión de los DRs con sus respectivos ligandos recluta a la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated Death Domain*) y/o TRADD (*TNFR1-associated Death Domain*), así como a la caspasa 8, desencadenando la activación proteolítica de esta caspasa (**Figura 13**). Entonces la caspasa 8 activa las caspasas efectoras 3 y 7 [133], lo que desencadena la proteólisis dirigida de proteínas antiapoptóticas o proteínas reguladoras de ciclo celular, entre las que destacan Bcl-2 [134] y la ciclina E [135], respectivamente. La vía del receptor TNFR1, además de conducir a la apoptosis extrínseca, también puede tener un efecto opuesto, activando la vía del NF- κ B favoreciendo así la supervivencia celular. Esta proteína se encuentra inactiva de forma basal, unida a la proteína inhibidora I κ -B. En condiciones de activación de TNFR1, se produce la fosforilación y degradación de I κ -B, ocasionando la liberación de NF- κ B, que se transloca al núcleo para transactivar genes entre los que se incluyen inhibidores de caspasas, genes de supervivencia y proliferación (revisado en [136]).

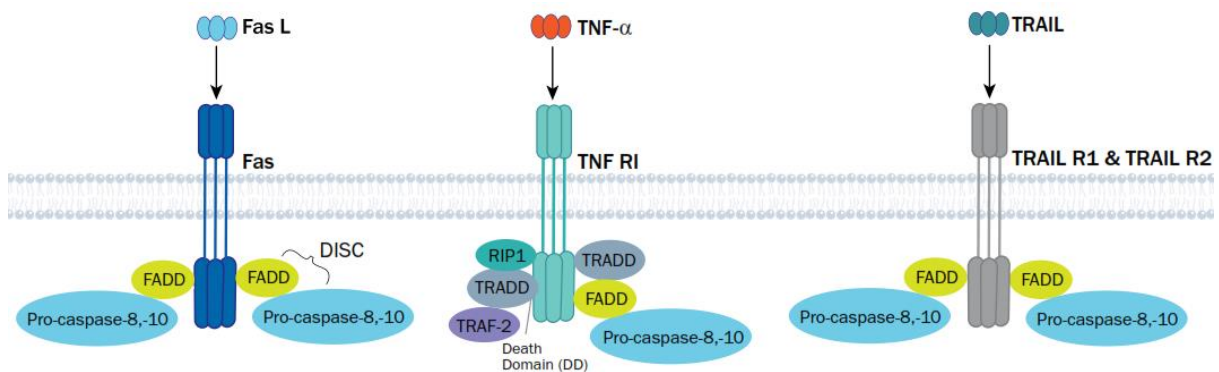


Figura 13. Receptores de muerte involucrados en el proceso de apoptosis extrínseca.

Obtenido de Kumar R., et al. [136].

APOPTOSIS INTRÍNSECA

La vía intrínseca está regulada por miembros de la familia de Bcl-2, entre los que se encuentran proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (**Figura 14**). La ratio de ambas determina la susceptibilidad de la célula a determinadas señales de muerte celular [131]. Los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 incluyen a Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1/A1. Estas proteínas evitan la muerte celular mediante la unión y secuestro de las proteínas proapoptóticas, entre las que se encuentran Bax, Bak, Bik, Bid, Bim, Puma/BBC3 y Noxa/APR. Los diferentes estímulos que activan la vía mitocondrial resultan en la activación y oligomerización de Bax y Bak, los cuales contribuyen a la formación de poros en la membrana mitocondrial y a la liberación de Citocromo C y otros factores proapoptóticos de la mitocondria. El Citocromo C se une a la proteína adaptadora APAF-1 y la caspasa 9 dando lugar a un complejo macromolecular denominado apoptosoma. En este proceso la caspasa 9 es activada, la cual corta y activa la caspasa 3, activando otras caspasas efectoras como la 6 y 7. En este proceso, también son liberados otros factores proapoptóticos como AIF (*Apoptotic Inducing Factor*) y la endonucleasa G. Además, Smac/Diablo y Omi/HtrA2 facilitan la activación de las caspasas antagonizando moléculas que pertenecen a la familia de las IAP (*Inhibitors Of Apoptosis*). Algunos agentes que causan daño al ADN, como la radiación ionizante, inducen la activación de p53 el cual promueve la transcripción de proteínas proapoptóticas como Bax, Puma, Noxa y Bik.

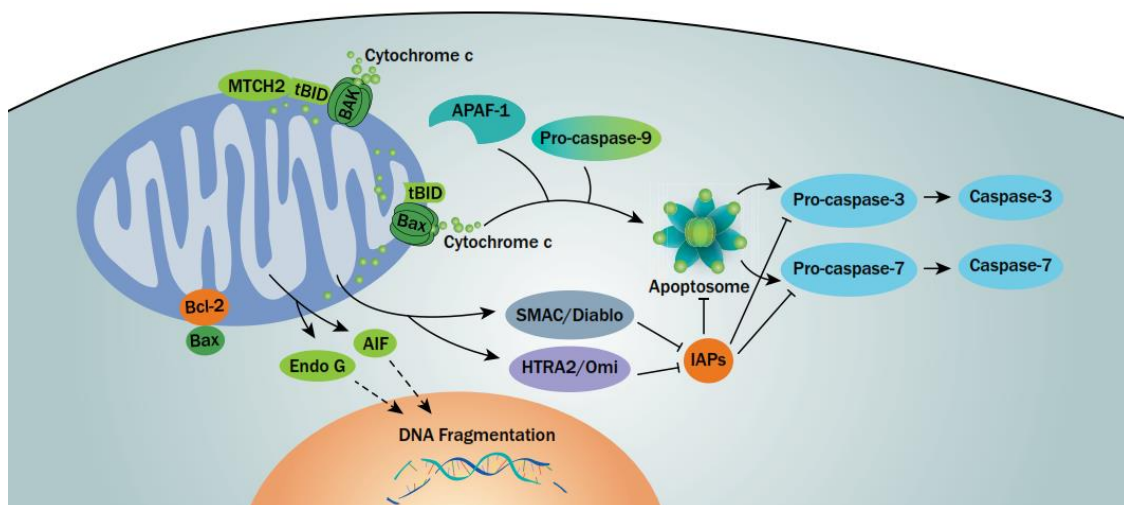


Figura 14. Liberación de proteínas proapoptóticas de la mitocondria (apoptosis intrínseca). Adaptado de Salvesen G., et al. [137].

La radiación ionizante y los agentes quimioterápicos actúan a través de la vía intrínseca de apoptosis. Los agentes que originan daño al ADN alteran el potencial de membrana mitocondrial, activando miembros de la familia de Bcl-2 y por tanto la vía apoptótica intrínseca. Bcl-2 se expresa en el linfoma folicular (LF) con t(14;18), aunque también se expresa en otras neoplasias de células B y T sin que involucren un reordenamiento de Bcl-2 [138]. Desajustes en los niveles de expresión de miembros de la familia de Bcl-2 resultan en defectos de la muerte celular programada que se asocian con resistencia a fármacos y progresión tumoral. En MM, niveles altos de Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 se relacionan directamente con la supervivencia de la célula tumoral y la resistencia a fármacos. Además, el patrón de expresión de miembros de esta familia diferencia las células plasmáticas malignas de las normales: alta expresión de Bcl-2 y Mcl-1 y baja de Bax en las células de mieloma [139,140]. Por otro lado, la expresión de Bcl-xL también se asocia con resistencia a fármacos en pacientes de MM [141,142].

TP53

El gen supresor tumoral *TP53* está frecuentemente mutado en cáncer y como se ha comentado anteriormente está relacionado con la apoptosis intrínseca. Una vez es activado por daño al ADN, hipoxia o activación oncogénica, p53 inicia los procesos de parada del ciclo celular y reparación del ADN, o los procesos de apoptosis o senescencia en células irreversiblemente dañadas. Las mutaciones de pérdida de función en *TP53* resultan en una evasión de la apoptosis y está frecuentemente asociada a estadios avanzados de enfermedad y a mal pronóstico [143]. Además de p53, otros componentes de los mecanismos de control del daño al ADN también están frecuentemente inactivados en cáncer (MDM2, ARF, RB1, entre otros) [62,144–146].

ONCOGENES

Las mutaciones de diferentes oncogenes pueden ocasionar su activación, favoreciendo la evasión apoptótica. En MM, son frecuentes las alteraciones en la vía de señalización de Ras, con mutaciones en *HRAS*, *NRAS* o *KRAS*; o en componentes de la vía por encima o por debajo como *FLT3*, *CKIT*, *EGFR*, *CBL* o *NF1*. Además, las proteínas proapoptóticas PUMA, Bad y Bim, pueden encontrarse inactivadas por la activación de la señalización de AKT [70,99,147]. Por su parte, el oncogén *MYC* contribuye a la

aparición de tumores en su forma WT (*Wild Type*) en la mayoría de cánceres. Sin embargo, niveles altos de esta proteína promueven la apoptosis a través de las proteínas de la familia de Bcl-2 [148]. Además de estos ejemplos, se han descrito mutaciones en otros muchos oncogenes y supresores tumorales que desregulan la señalización de la apoptosis proporcionando una ventaja para la supervivencia de la célula de MM.

1.3.2. DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Defectos en el ciclo celular pueden dar lugar a una proliferación descontrolada, inestabilidad genómica e inestabilidad cromosómica, favoreciendo así la transformación tumoral. La desregulación de los genes de las ciclinas D es un evento prácticamente constante en los pacientes con MM y resulta en una división celular aberrante, sugiriendo la potencial relevancia del ciclo celular como diana terapéutica [149].

El ciclo celular es el conjunto de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Se subdivide en una interfase y mitosis, caracterizadas por una replicación del ADN y división nuclear, respectivamente. La interfase incluye las fases de G1, S y G2, en las cuales las células crecen en tamaño. En la fase G1 las células se preparan para la replicación del ADN, que ocurre en la fase S. Previo a la replicación del ADN, las células pueden salir del ciclo y permanecer de forma quiescente en la fase G0. Tras la síntesis del ADN, tiene lugar la fase G2, en la cual las células se preparan para la mitosis. Durante la mitosis, en la profase, las células condensan la cromatina y, posteriormente, tiene lugar de forma sucesiva la formación del huso mitótico en la prometafase, la organización y unión de los cromosomas al huso mitótico durante la metafase, la segregación cromosómica en la anafase, así como la formación de dos núcleos funcionales durante la telofase. Finalmente, se producen dos células hijas mediante citoquinesis.

Estos procesos están regulados y coordinados de forma muy precisa por enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk, *Cyclin-dependent kinases*) y varias vías de control, que aseguran la transmisión correcta del genoma a las células hijas (**Figura 15**). La función de las Cdk a su vez está regulada por ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs, *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*) [150]. La interacción

de ciclinas y Cdk's resulta en la fosforilación y activación de las Cdk's. Además, las ciclinas son sintetizadas y destruidas en determinados momentos del ciclo celular, por lo que regulan la actividad quinasa de forma periódica a lo largo del ciclo. Por otro lado, los CKI bloquean la función de las Cdk's. Existen dos familias de CKIs: la familia INK4, que se unen a Cdk4 y Cdk6 para prevenir su interacción con la ciclina D; y la familia Cip/Kit (p21, p27 y p57), que se une a casi todos los complejos ciclina-Cdk.

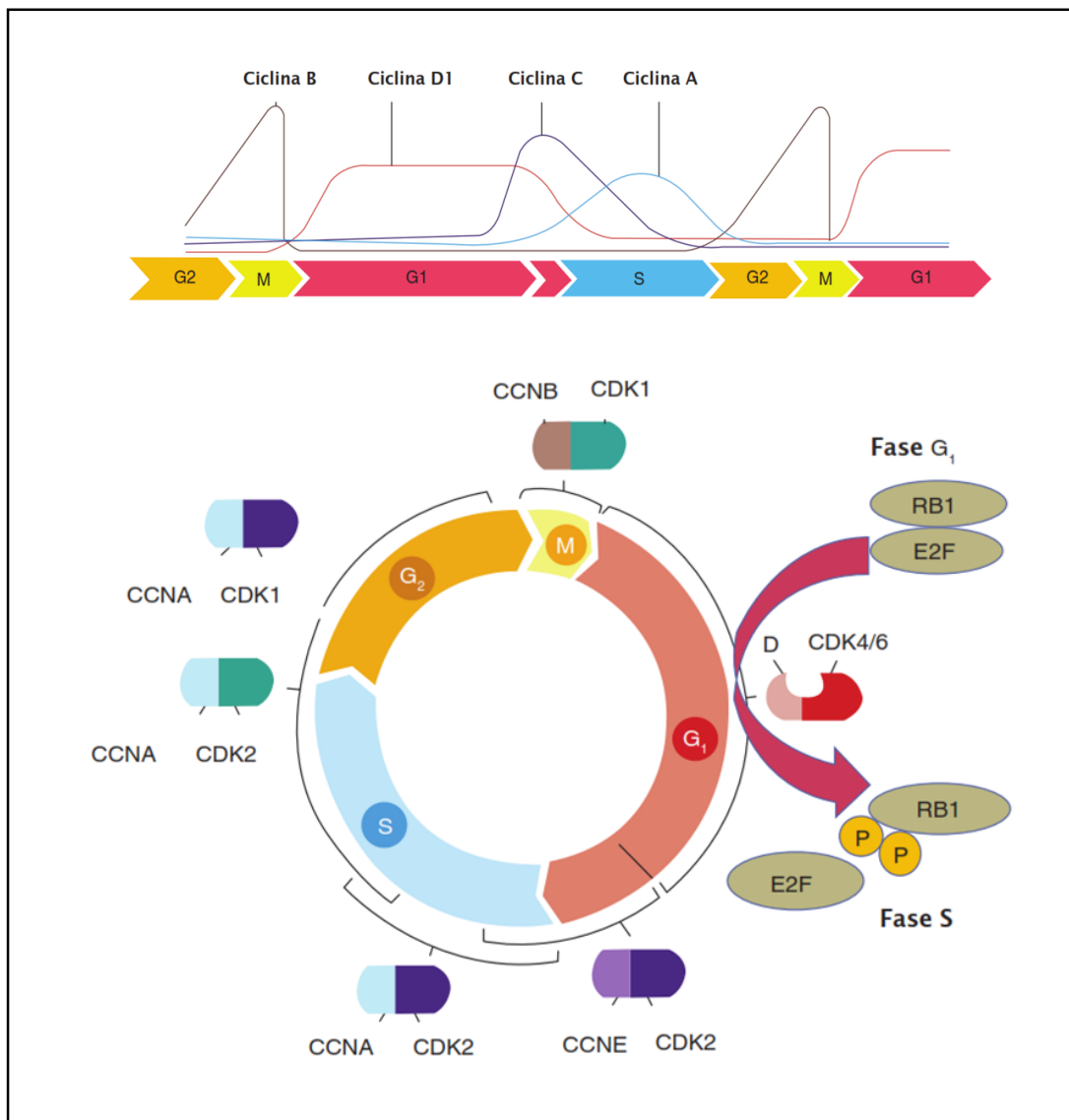


Figura 15. Principales componentes de la regulación del ciclo celular. Adaptado de Vermeulen K., et al. [150].

La progresión del ciclo durante la interfase viene determinada por tres Cdks: Cdk4, Cdk6 y Cdk2, que se unen a las ciclinas D, E y A. En la fase G1, la ciclina D interactúa con Cdk4 y Cdk6. Estos complejos (activos) fosforilan el retinoblastoma (Rb), que libera al factor E2F permitiendo la expresión de sus genes diana como ciclina E y A. La ciclina E activa a Cdk2, que completa la fosforilación del Rb y la transcripción completa de los genes que activa E2F para que suceda correctamente la transición G1/S. A su vez, la ciclina A activa a Cdk2 durante la fase S. Este complejo fosforila y activa proteínas esenciales en la replicación del ADN como la ADN polimerasa alfa. Por otro lado, la ciclina A también activa a Cdk1 para iniciar la profase, y una vez se rompe la envoltura nuclear, la ciclina A se degrada permitiendo así la formación de los complejos ciclina B-Cdk1. Este complejo ciclina B-Cdk1 es responsable de la progresión durante la mitosis. Una vez alineados los cromosomas en la metafase, la actividad Cdk1 se bloquea a través de la degradación por el proteasoma de la ciclina B, que es ubiquitinada y marcada para degradación por el complejo con actividad E3 ubiquitín quinasa APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*). APC/C es activado por Cdc20 cuando los cromosomas están correctamente unidos a los microtúbulos, y este mismo complejo Cdc20-APC/C media la degradación de proteínas involucradas en la replicación del ADN y la mitosis. En etapas finales de la mitosis, la inactivación de Cdk1 da lugar a la descompactación cromosómica, formación de nuevo de la envoltura nuclear y citoquinesis. En este proceso, además de las Cdks, otras quinasas mitóticas ayudan a controlar la división celular, como son las Plks (*Polo-like kinases*) y aurora quinasas [150].

A lo largo del ciclo celular hay diversos puntos de control. Como se ha comentado previamente, la vía de respuesta al daño del ADN previene la proliferación durante la interfase hasta que el ADN es reparado, y las vías de control durante la mitosis permiten asegurar la correcta segregación de los cromosomas.

El daño al ADN durante G1/S es detectado mediante la quinasa ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), que fosforila p53, lo estabiliza y permite su acumulación y la inducción de p21. Por su parte, p21 inhibe los complejos ciclina E-Cdk2 y D-Cdk4, ocasionando una parada del ciclo en G1 [151]. Además, existe un mecanismo de control independiente a p53 en este punto, en el que participa la ATM quinasa, que puede fosforilar Chk2 (*Checkpoint Kinase 2*) y que en última instancia conlleva a la inhibición de

los complejos ciclina E-Cdk2. Tras la reparación correcta del ADN, esta maquinaria se inactiva y las células entran en la fase S. El daño ocurrido durante esta fase y la transición G2/M activa la quinasa ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) y Chk1. Chk1 media la degradación de Cdc25A y C, lo que permite la inhibición de los complejos ciclina A-Cdk2 en la fase S, y ciclina A-Cdk1 en la transición M/G1, respectivamente.

Durante la mitosis, la vía de SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) permite asegurar la unión correcta de los cromosomas al huso mitótico, en el cual participa el complejo mitótico MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*). Este complejo se une a los cinetocoros incorrectamente unidos a cromosomas e inhibe Cdc20 y la actividad APC/C, lo que hace que las proteínas diana de APC/C-Cdc20 (securina y ciclina B) no sean degradadas y las células permanezcan en metafase. Por el contrario, el sistema SAC se inactiva con el correcto posicionamiento de los cromosomas, resultando en la transición metafase-anafase.

La proliferación descontrolada de las células de mieloma puede tener como causa la desregulación de la ciclina D y de la familia de inhibidores INK4. Tal y como se ha descrito previamente, la desregulación de la ciclina D generalmente está originada por translocaciones en el gen *IGH*. La translocación más frecuente, t(11;14), da lugar a la sobreexpresión de ciclina D1. Las translocaciones t(14;16) y t(14;20) sobreexpresan MAF, y la t(4;14) sobreexpresa MMSET, siendo ambos factores clave en la sobreexpresión de la ciclina D2. Por otro lado, la t(6;14) está asociada a la sobreexpresión de la ciclina D3. Es de especial relevancia resaltar que las translocaciones que sobreexpresan la ciclina D2 t(4;14), t(14;16) y t(14;20), se asocian con mal pronóstico en MM, mientras que las que sobreexpresan las ciclinas D1 y D3 tienen un pronóstico más favorable [152]. La desregulación de los miARNs 425, 152 y 24 también está asociada a la sobreexpresión de las ciclinas D1, D2 y D3 [153]. Además, el miR-34 y miR-29b (que regulan los niveles de Cdk4/6) se encuentran infraexpresados en MM [154]. Cabe añadir como regulador del ciclo celular el oncogén *MYC*, que induce la expresión de las ciclinas D y E, así como de las Cdk2, 4 y 6 [155]. La sobreexpresión de c-Myc se ha observado en el 15% de nuevos diagnósticos y en el 50% de los pacientes con MM avanzado y, además, se asocia a mal pronóstico [152,156].

La desregulación de inhibidores de la familia de INK4 como p15 y p16 es un evento frecuente en MM y generalmente tiene como origen la hipermetilación de sus promotores y/o deleciones [157].

Aquellas alteraciones en genes de respuesta al daño al ADN (*ATM*, *ATR*, *CHK1/2* y *TP53*) permiten la progresión del ciclo en presencia de daño al ADN y, por consiguiente, favorecen la inestabilidad genómica. Se han descrito mutaciones y deleciones en los genes *ATM*, *ATR* y *TP53* [152]. De hecho, el 14,5% de los pacientes con mieloma tienen alteraciones simultáneas en los 3 genes, hecho que está asociado a mal pronóstico [158].

Por último, en el MM también se han descrito alteraciones en componentes del cinetocoro y la vía SAC que incrementan la inestabilidad cromosómica. Estas alteraciones están relacionadas con el incremento en la actividad proliferativa de las células mielomatosas y están asociadas a mal pronóstico. Ejemplo de ello son alteraciones en las proteínas Bub1 β , Cdc20, aurora quinasa, Plk1 y Nek2, entre otros [159].

1.4. TRATAMIENTO DEL MM

El primer tratamiento administrado a un paciente con MM debidamente documentado fue llevado a cabo por Solly S. en 1844 [3] (**Figura 16**), y estaba basado en infusiones de cáscara de naranja, ruibarbo y opiáceos. No fue hasta 1947 cuando el sueco Alwall N. trató por primera vez a un paciente con MM con uretano, reportando un incremento en los valores de hemoglobina, una reducción de proteinuria y concentración de globulina sérica, así como en la cantidad de células plasmáticas en la MO [163]. Desde estos primeros tratamientos hasta los actuales, entre los que se incluyen terapias tan innovadoras como las células CAR-T, hemos asistido a grandes avances tanto en el conocimiento como en el tratamiento del MM, lo que ha resultado en una importante mejoría en su pronóstico [160].

Figura 16. Primer paciente documentado con MM (Sarah Newbury), mostrando fracturas en fémur, clavículas, húmero y radio [3].



Esta mejora se inició fundamentalmente con la introducción de fármacos como el inhibidor del proteasoma bortezomib o agentes inmunomoduladores (IMiDs) como talidomida y lenalidomida [160], aprobados para el tratamiento de estos pacientes en 2003 y 2005, respectivamente. Posteriormente han aparecido y se han desarrollado agentes de segunda generación de estas mismas familias terapéuticas como carfilzomib o ixazomib dentro de los inhibidores del proteasoma o la pomalidomida dentro de los IMiDs, que han demostrado ser útiles en pacientes refractarios a la primera generación de fármacos [161–163]. Posteriormente se han desarrollado y aprobado fármacos con otros mecanismos de actuación como los anticuerpos monoclonales antiCD38 o antiSLAMF; o frente a dianas específicas como selinexor, panobinostat, belantamab mafodotin y abecma (**Figura 17**).

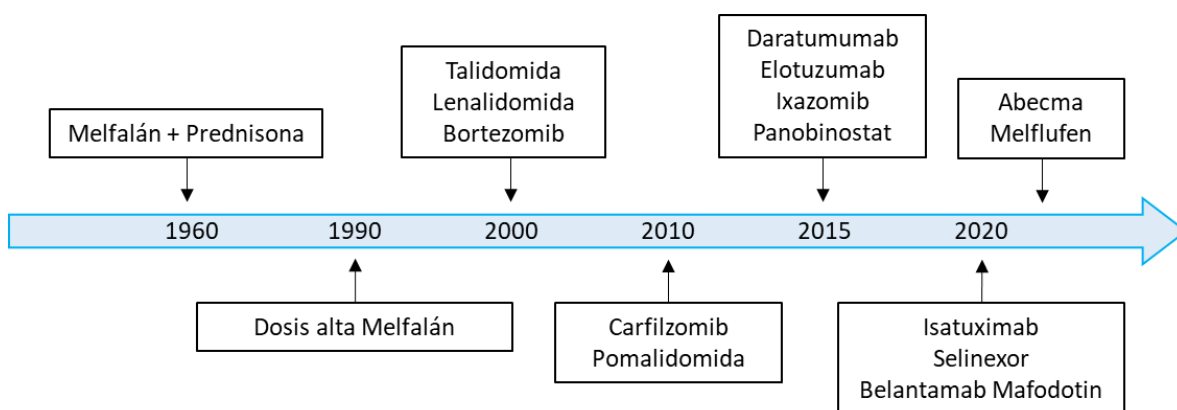


Figura 17. Esquema temporal de la introducción de nuevas terapias en el tratamiento del MM.

1.4.1. AGENTES ALQUILANTES Y CORTICOESTEROIDES

A pesar de que el uretano fue el tratamiento estándar del MM durante 15 años, un ensayo clínico aleatorizado demostró que este compuesto no era eficaz [164], momento en el cual comenzaron a introducirse los agentes alquilantes y corticoesteroides en el tratamiento del MM.

MELFALÁN

Este fármaco es un agente citostático que ejerce su efecto mediante alquilación. A través de este proceso se establecen enlaces con el ADN ocasionando daño e impidiendo una correcta replicación, lo cual en última instancia conlleva a la muerte celular.

Fue en 1958 cuando el ruso Nikolaevich N. describió que 3 de 6 pacientes con mieloma respondieron a un tratamiento con melfalán [164]. En 1962, Bergsagel D. (MD Anderson, EEUU) confirmó que 8/24 pacientes mejoraron significativamente debido al tratamiento con este mismo agente [165]. Finalmente, en 1967, Hoogstraten obtuvo un 78% de respuestas en 64 pacientes con MM gracias al tratamiento con melfalán durante una semana, seguido de un período de descanso que permitiera la recuperación de la MO, y un mantenimiento con una dosis baja de melfalán [166].

PREDNISONA Y DEXAMETASONA

Los glucocorticoides (GCs) como prednisona y dexametasona son esteroides con efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor. Estos fármacos se unen a receptores de GCs, los cuales son translocados al núcleo para modificar la expresión génica. Además, los GCs inhiben de forma indirecta la acción de factores de transcripción como NF- κ B, y AP1 (*Activator Protein-1*), factores relevantes en la patogenia del MM.

En 1962 la prednisona mostró eficacia como agente único [167], aunque fue en 1969 cuando se estableció el estándar melfalán + prednisona (MP), mostrando un incremento en la supervivencia de 6 meses en comparación con el tratamiento con melfalán únicamente [168]. Más tarde, la dexametasona mostró ciertas ventajas (mejores tasas de respuesta y menores efectos adversos) con respecto a la prednisona [169].

En relación con la dexametasona, este fármaco se utiliza actualmente en clínica [3] como estándar de tratamiento en regímenes de combinación. La combinación de una dosis baja de dexametasona con lenalidomida o pomalidomida inhibe el crecimiento de las células de mieloma de forma muy sinérgica, induciendo la sobreexpresión de genes supresores tumorales, lo que favorece la parada del ciclo celular; así como la activación de las caspasas 8 y 9, favoreciendo el proceso apoptótico [170]. Además, la combinación de pomalidomida con una dosis baja de dexametasona (Pd) ha demostrado un beneficio clínico mayor que la utilización de dosis altas de dexametasona en pacientes con mieloma refractario [161,171].

1.4.2. TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE AUTÓLOGAS

Donnall E. fue uno de los pioneros en el trasplante de células *stem* o células madre autólogas. Trabajando en este campo desde 1957, no fue hasta 1982 cuando publicó el primer trasplante con éxito en un paciente con mieloma [172]. Estos estudios, que le valieron el Premio Nobel en 1990, indicaban altos porcentajes de respuestas parciales y completas con una mediana de duración de la respuesta de unos 19 meses. Además, Barlogie B. describió el uso de una dosis alta de melfalán e irradiación corpórea seguida

del trasplante de médula, lo que denominó “terapia total” [173], un término que sentó las bases de algunos de los procedimientos actuales en el tratamiento del MM.

1.4.3. AGENTES INMUNOMODULADORES (IMiDs)

El fármaco talidomida fue introducido al mercado en 1957 como tratamiento sedante y contra las náuseas del embarazo. Cuatro años después, el genetista alemán Lenz W. publicó por primera vez los efectos teratogénicos de este fármaco [174]. La exposición al fármaco durante el primer trimestre del embarazo producía malformaciones en el feto, por lo que la talidomida se retiró del mercado a finales del 1962. Sin embargo, a comienzos de los 80, este fármaco mostró efectividad contra úlceras orales causadas por el VIH y la enfermedad de Behçet, y posteriormente fue aprobado como tratamiento para el eritema *nodosum leprosum*.

En la década de 1990, diversos grupos identificaron el papel de la angiogénesis en la patogénesis del cáncer y del MM. El grupo de D’Amato R., en Boston, describió en 1994 por primera vez las propiedades anti-angiogénicas de la talidomida [175], lo que llevó a Singhal *et al.* a iniciar un ensayo con pacientes de MM en los que el tratamiento de MP había fracasado [176]. El 32% de estos pacientes respondieron a la talidomida, convirtiéndose así en el primer fármaco en más de 30 años que, administrado en monoterapia, mostraba actividad antimieloma.

El primer agente inmunomodulador, talidomida, y sus derivados lenalidomida (CC-5013) y pomalidomida (CC-4047), ejercen su efecto inhibiendo la proliferación y la angiogénesis, así como a través de la modulación inmune [161,176,177].

A pesar de su similitud química, que muestra tan sólo diferencias dentro de la porción glutarimídica (**Figura 18**), los IMiDs difieren en varias propiedades clínicas y farmacológicas, como los efectos adversos, la vida media y el metabolismo [178–180].

En un esfuerzo por ampliar el repositorio de agentes inmunomoduladores disponibles clínicamente, se han desarrollado nuevos IMiDs. La avadomida (CC-122), estrechamente relacionada con la pomalidomida, ha mostrado una seguridad y tolerabilidad aceptables, junto con una farmacocinética favorable [181]. Resultados

preliminares que evalúan el nuevo compuesto iberdomida (CC-220) han demostrado una eficacia y seguridad favorables en pacientes refractarios, para quienes habían fracasado terapias anteriores, incluidas lenalidomida y pomalidomida [182].

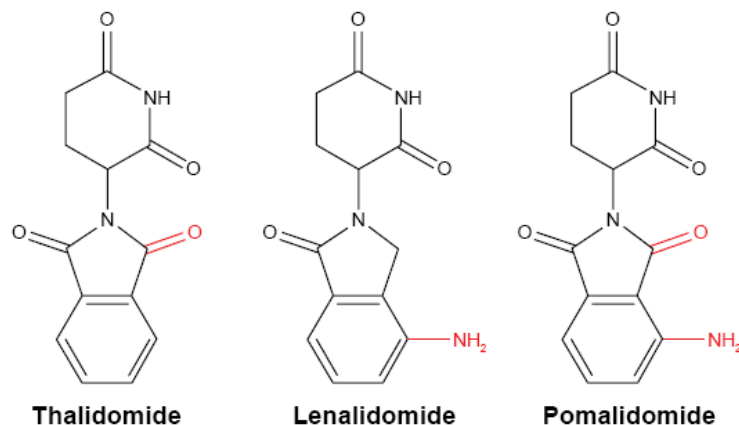


Figura 18. Estructura química de los IMiDs talidomida, lenalidomida y pomalidomida.
Adaptado de Kotla V., et al. [183].

MECANISMO DE ACCIÓN

Cereblon (CRBN), la primera diana descrita y común para los IMiDs, es un receptor de sustratos componente de un complejo proteico E3 ligasa de DCX (DDB1-CUL4-X-box). Este complejo E3 ligasa media la ubiquitinación y la consiguiente degradación a través del proteasoma de proteínas diana [184]. Tras su unión con el IMiD, la especificidad de sustrato de CRBN cambia, de modo que el complejo E3 ligasa deja de unir sus sustratos habituales para ubiquitinar otras proteínas que luego se degradarán en el proteasoma. Entre estos neosustratos destacan IKF1 (IKAROS), IKZF3 (AIOLOS) y CK1 α (caseína quinasa 1 α), aunque recientemente se han descrito otros como GSPT1 [185], ZFP91 [186], GSPT2 [187], SALL4 [188], ZNF692 [187] y RNF166 [187]. Entre los nuevos sustratos que se unen a CRBN en presencia de los IMiDs, destacan los factores de transcripción IKZF1 e IKZF3, por ser las proteínas que más ven reducida su expresión en las células de mieloma [189]. Tanto la expresión de CRBN como la degradación de IKZF1 e IKZF3 son necesarios para el efecto citotóxico de los IMiDs [190].

La reducción en la expresión de IKZF1 e IKZF3 da lugar a una disminución en la producción del factor regulador de interferón IRF4 y sus genes diana *MYC*, *CDK4* y *CASP*, lo que disminuye la supervivencia de las células de mieloma. Otros efectos observados son la regulación negativa de C/EBP β , la inducción de parada del ciclo celular por la regulación positiva del inhibidor de CDKs p21WAF-15, la inducción de los factores proapoptóticos caspasa-8 y FAS, así como la inhibición de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y eIF4E, que contribuyen a la muerte celular [190–193] (**Figura 19**).

Curiosamente, la degradación de IKZF1 e IKZF3 ocurre pocas horas después del tratamiento con IMiDs, pero se necesitan otras 24-72h para inducir la desregulación de IRF4 y c-Myc [189], lo que sugiere que están involucrados mecanismos adicionales para lograr una respuesta farmacológica completa. Su efecto citotóxico también se ha asociado con una inhibición de las vías de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K-AKT) y NF- κ B [194,195].

Estudios estructurales han determinado la relación física entre los IMiDs y CRBN, así como la interacción entre CRBN y sus sustratos. Mediante cristalografía de rayos X se demostró que los IMiDs se unen a CRBN a través de su anillo de glutarimida, el cual interactúa con un bolsillo hidrófobo formado por tres residuos de triptófano en la superficie de CRBN. Aunque la talidomida muestra un modo de unión y afinidad por CRBN similar al de lenalidomida y pomalidomida, es menos eficaz para la degradación de IKZF1 e IKZF3 [196]. La principal diferencia estructural entre la talidomida y sus derivados lenalidomida y pomalidomida radica en la presencia de una anilina C4 compartida por los dos últimos, que aumenta su capacidad para degradar los sustratos. Los grupos metilo en C4 también mejoran la capacidad de degradación de sustratos, lo cual sugiere posibles modificaciones para el desarrollo de nuevas moléculas inmunomoduladoras [197].

Además, CRBN no sólo actúa como un receptor del complejo E3 ubiquitín ligasa, sino que también se ha descrito su función como chaperona promoviendo la maduración de la proteína basigina (BSG). BSG forma un complejo con el transportador MCT1 (BSG-MCT1) que promueve la proliferación, angiogénesis y la invasión y metástasis. Los IMiDs compiten con BSG por la unión de CRBN, actuando por tanto como agentes antitumorales [198].

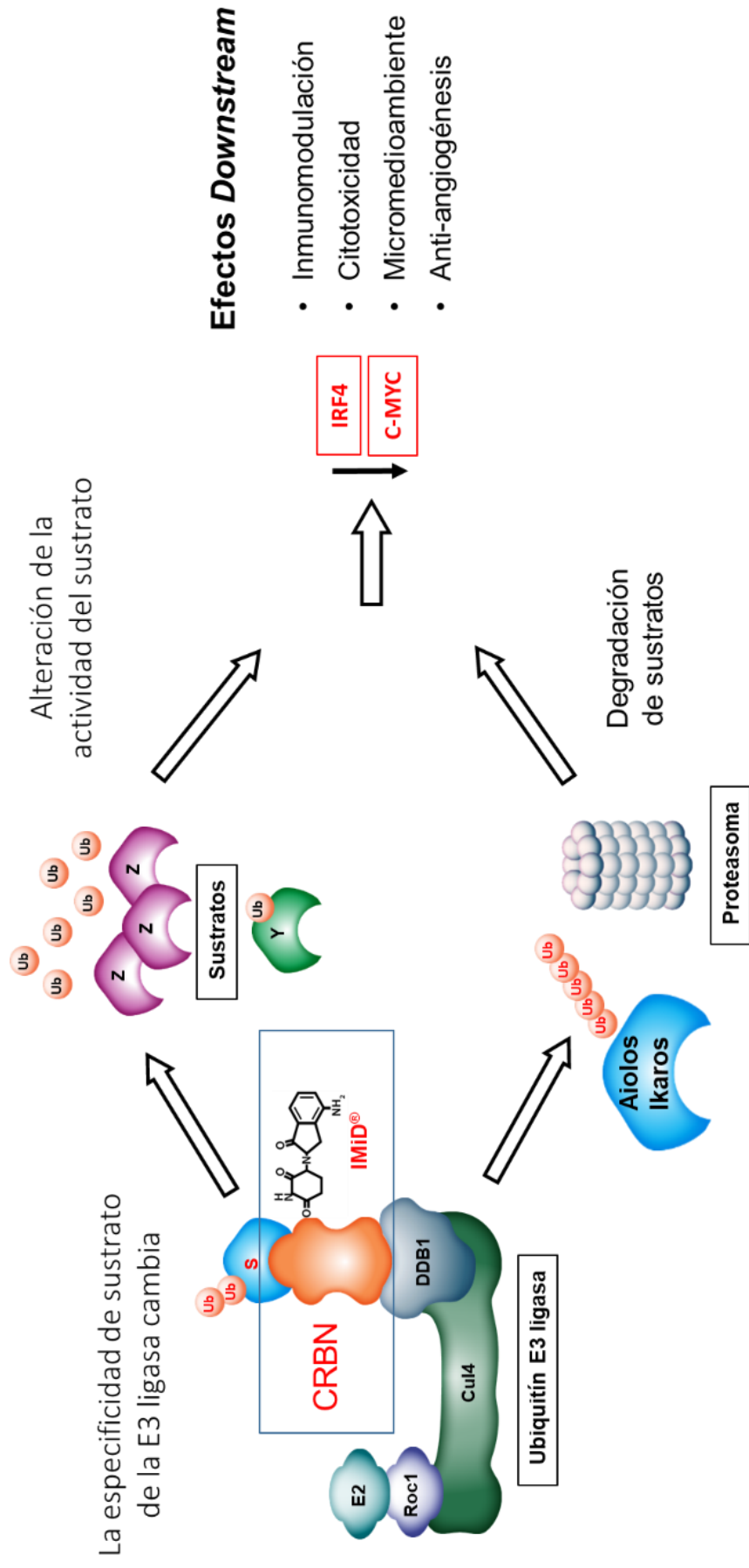


Figura 19. Mecanismo de acción los IMiDs ¹⁷⁵⁻¹⁹⁵.

Se ha descrito una sinergia muy importante entre los fármacos inhibidores del proteasoma (IPs), IMiDs y dexametasona, que ha dado lugar a una de las combinaciones más ampliamente utilizadas en el tratamiento del MM: bortezomib, lenalidomida y dexametasona (**Figura 20**).

La sinergia entre los IPs y los IMiDs resulta una paradoja, ya que se esperaría que ambos grupos de fármacos actuaran de forma antagónica entre sí. Por un lado, los IPs bortezomib y carfilzomib ejercen su acción inhibiendo de forma reversible o irreversible el proteasoma; mientras que los IMiDs inducen la interacción de CRBN con sus neosustratos, resultando en su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Sin embargo, se han postulado diversas causas que podrían explicar esta paradoja. Por un lado, se ha sugerido que la inhibición del proteasoma que tiene lugar por acción de la dosis terapéutica de bortezomib no es completa y que, además, es suficiente para permitir la degradación de los neosustratos de CRBN [199,200]. Por otro lado, un estudio reciente ha descrito un mecanismo alternativo de degradación de IKZF1 basado en la activación de calpaína y caspasas [201]. Además, otros grupos de investigación han sugerido mecanismos de acción de los IMiDs independientes de la ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Ejemplo de ello es el estudio de Eichner *et al.* [198] que sugiere, tal y como se ha comentado anteriormente, que CRBN no sólo actúa como un receptor del complejo E3 ubiquitin ligasa, sino que también actúa como chaperona estabilizando el complejo con funciones protumorales BSG-MCT1. Así, los IMiDs actúan como agentes antitumorales al competir por su unión con este complejo [198]. Otros ejemplos son los estudios que han identificado nuevas dianas de los IMiDs como ZAP-70 (Zeta-Chain-Associated Protein Kinase-70) y TP53-RK (p53-Related Protein Kinase) [202,203].

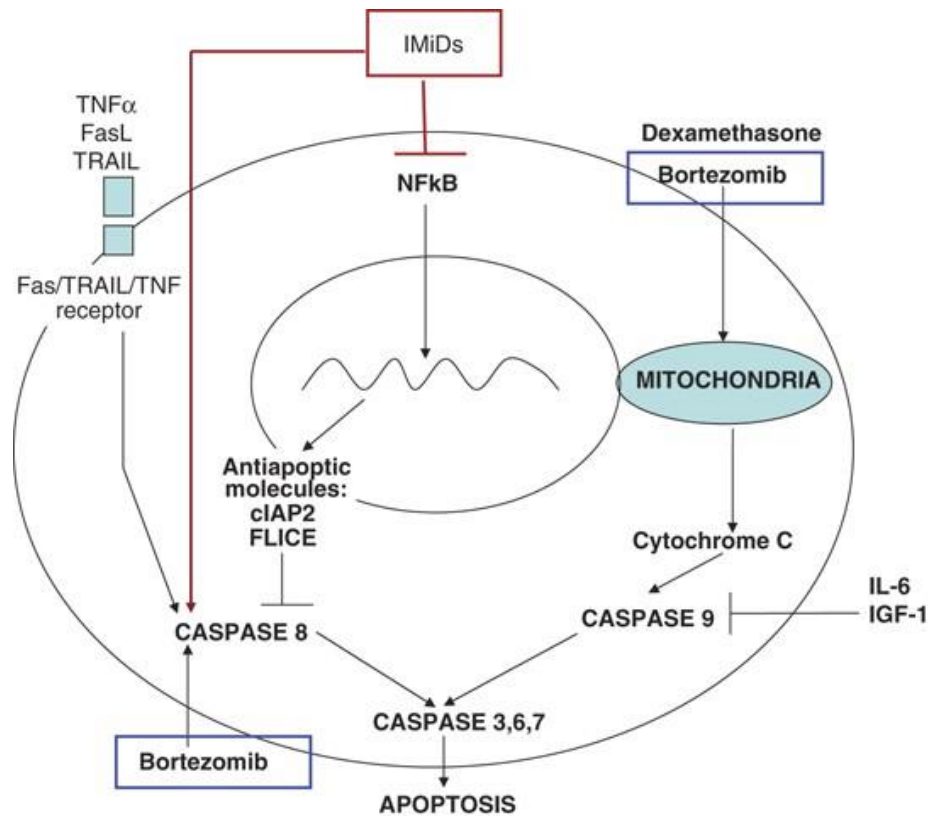


Figura 20. Activación de la apoptosis mediada por los IMiDs, bortezomib y dexametasona. Obtenido de Quach H., et al. [204].

Además, se han descrito efectos promovidos por los IMiDs sobre la activación inmunitaria, entre los que se incluyen la estimulación de células NK, NKT y de linfocitos T, así como el incremento en la producción de IL-2 e IFN- γ por los linfocitos T [205–208].

Los mecanismos específicos a través de los cuales los IMiDs inducen la proliferación y activación de las células T aún no han sido descritos por completo. El mecanismo de coestimulación de las células T por los IMiDs implica una mayor actividad transcripcional de la proteína AP-1, un factor clave para la producción de IL-2 [208]. Estudios sugieren que pomalidomida potencia la capacidad de unión al ADN de AP-1, pero no de NF- κ B, OCT-1 (Octómero 1) o NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) [209]. Por otro lado, el tratamiento con lenalidomida induce la fosforilación de CD28 en células T, la activación de la vía de PI3K, así como la translocación nuclear de NFAT [206,210,211]. Además, el aumento de la transcripción y producción de IL-2 promueve la proliferación y función de

las células NK, potenciando la actividad del sistema inmunológico innato. Las células NK a su vez liberan citoquinas como MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein*) y GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) que atraen células T y células dendríticas, favoreciendo la respuesta inmune. Curiosamente, a pesar del aumento de IL-2, estudios sugieren que tanto lenalidomida como pomalidomida inhiben la producción de linfocitos T reguladores (Tregs) a través de la infraexpresión del factor de transcripción de Tregs, FOXP3 [212] (**Figura 21**).

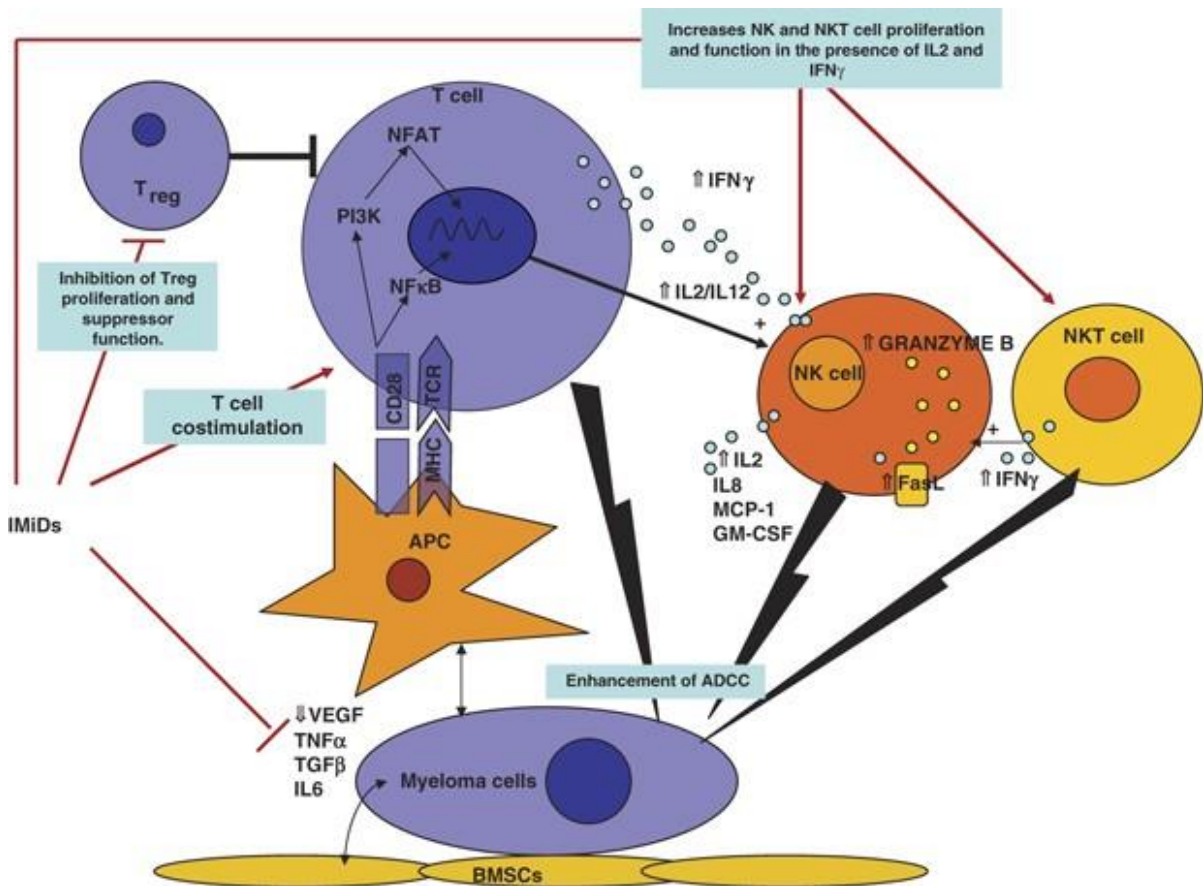


Figura 21. Efecto de los IMiDs en la activación inmune. Obtenido de Quach H., et al. [204].

RESISTENCIA A IMiDs

Desde la introducción de los IMiDs en el tratamiento del MM y el descubrimiento de su diana CRBN [213], diversas investigaciones han puesto de manifiesto la relevancia de la expresión de esta proteína en la resistencia a IMiDs [213]. Pese a que estudios recientes han identificado nuevas dianas de los IMiDs como TP53-RK, p53 [203] y ZAP-70 [202], aún se considera que el mecanismo principal de acción de los IMiDs es a través de su diana CRBN.

La desregulación de CRBN fue la primera causa descrita de resistencia a IMiDs [214]. Diversos estudios han demostrado que este evento es común en los modelos de resistencia [191,215]. Sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión de CRBN. El hecho de que mutaciones en CRBN sean la causa de un tipo heredable de discapacidad mental, hizo que los primeros estudios orientados a analizar la regulación de CRBN se llevaran a cabo en neuronas. Se sugirió que la expresión de CRBN podría estar regulada por la E3 ubiquitín ligasa SCF^{Fbxo7} [216,217], y que la inhibición del proteasoma podría recuperar su expresión [217]. En un estudio basado en librerías de CRISPR-Cas9 se demostró que el complejo del signalosoma COP9 (CSN9) inactiva a la ubiquitín E3 ligasa SCF^{Fbxo7}, impidiendo así la ubiquitinación y posterior degradación de CRBN [218].

Por otro lado, también se han descrito mutaciones en el gen de *CRBN* en el momento de la recaída tras el tratamiento con regímenes que incluyen lenalidomida o pomalidomida, e incluso antes de la exposición a estos agentes, asociándose con resistencias secundarias y primarias, respectivamente. Sin embargo, estas mutaciones son un evento poco frecuente tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares [147,219].

La expresión de los neosustratos de CRBN en sí misma también puede afectar la actividad de los IMiDs. En un estudio basado en espectrometría de masas dirigida se describió que estos fármacos inducen una degradación ordenada de dichos neosustratos (IKZF1, IKZF3, CK1 α , ZFP91, RNF166, ZNF692, GSPT1 y GSPT2). Así, la sobreexpresión de uno de ellos que debería ser degradado en un momento posterior compite por su unión a CRBN y disminuye así la degradación de los sustratos iniciales

IKZF1 e IKZF3, que son críticos para el efecto antimieloma de los IMiDs [187]. En línea con estos resultados, el *knockdown* de los genes de sustratos como ZNF692 y RNF166 sensibiliza las células a la acción de los IMiDs [220]. Recientemente también se ha descrito que RUNX1 y RUNX3 son capaces de interactuar con IKZF1 e IKZF3, protegiéndolos de su ubiquitinación y degradación dependiente de CRBN que induce lenalidomida [221]. Además, la sobreexpresión de BSG contrarresta la citotoxicidad mediada por lenalidomida al evitar su unión a CRBN [198].

Por otro lado, se ha asociado la activación de diversas vías de señalización con la resistencia a IMiDs. Tal es el caso de las vías Wnt/ β -catenina [222], MAPK [215] o STAT3 [191]. Por último, el incremento en la capacidad antioxidante de las células de MM también ha sido relacionado con la resistencia a la lenalidomida. Las células con menor capacidad de descomposición de H₂O₂ son más vulnerables a la acumulación de H₂O₂ inducida por lenalidomida y a su citotoxicidad asociada [223].

1.5. CRISPR-Cas9

Una de las técnicas más novedosas para el estudio de resistencia farmacológica consiste en el cribado de genoma completo mediante librerías CRISPR-Cas9. En la presente tesis doctoral se van a utilizar estos cribados con el objetivo de la detección de genes implicados en la resistencia y/o sensibilidad a los IMiDs. Por todo ello y teniendo en cuenta la novedad de la técnica, se incluye en este apartado una breve explicación del fundamento del sistema CRISPR-Cas9.

Las regiones CRISPR, son repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas en bacterias [224,225]. Estos fragmentos son utilizados por las bacterias para detectar y destruir el ADN de virus con secuencias similares a otros a los que previamente se expuso y así poder defenderse eficazmente de ellos. Estas secuencias forman la base de la tecnología CRISPR-Cas9 para editar el genoma [226,227], que aprovecha la característica de la endonucleasa Cas9 para ser guiada a un punto del genoma mediante pequeños ARNs llamados sgRNAs (*single-guide RNAs*) [227,228]. La endonucleasa Cas9 genera cortes de doble cadena en el *loci* diana, los cuales son reparados por la maquinaria de reparación homóloga (HDR) o, más frecuentemente, por la no homóloga (NHEJ). La maquinaria HDR repara de forma precisa el corte, mientras que la NHEJ comete errores que resultan en la pérdida de función del gen que codifica ese fragmento [229,230] (**Figura 22**). Desde el año 2013, este sistema se ha perfeccionado y modificado no sólo para interrumpir, sino también para agregar y cambiar secuencias específicas en el genoma, e incluso regular la expresión génica [231–236].

Aprovechando la versatilidad en las aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas9, este sistema se ha empleado como base para el desarrollo de metodologías de análisis de alto rendimiento. De este modo, se han desarrollado librerías de sgRNAs que guían la endonucleasa Cas9 a cada uno de los genes del genoma para que, aplicando estas librerías sobre células que expresan Cas9, podamos bloquear la expresión génica y posteriormente analizar cómo afecta la alteración de cada gen a un determinado fenotipo [236–239].

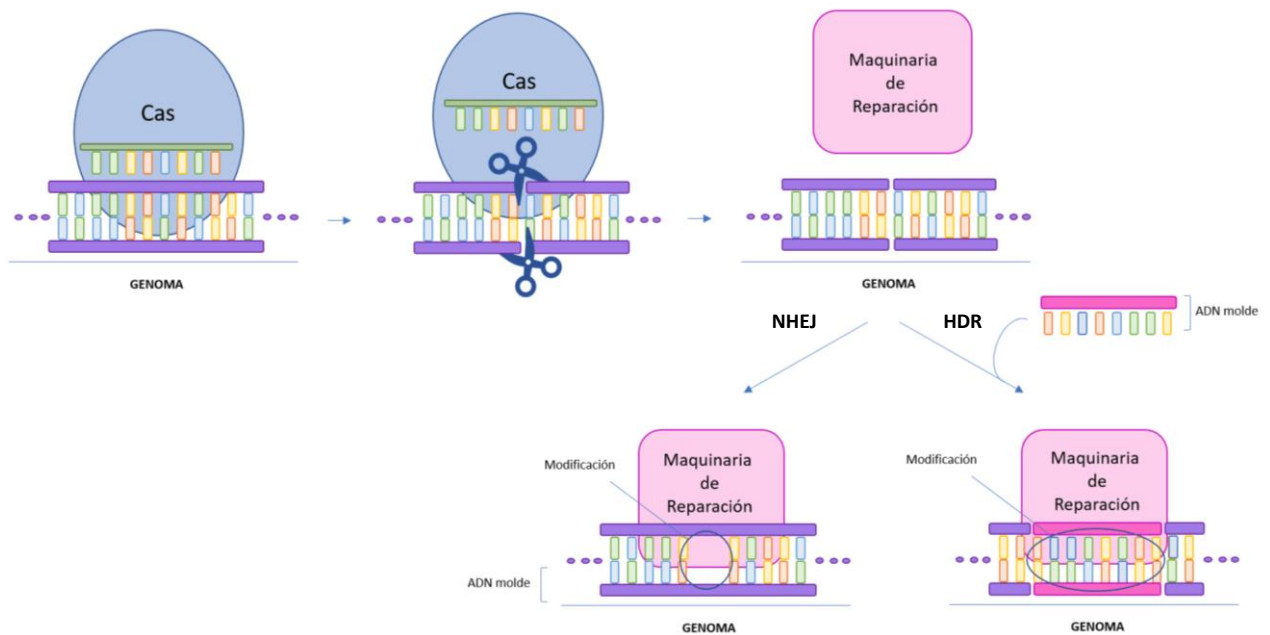


Figura 22. Fundamento para la aplicación del sistema CRISPR-Cas9 para la edición génica. La endonucleasa Cas9 genera cortes en el loci diana que son reparados por la maquinaria de reparación homóloga (HDR) o, más frecuentemente, por la no homóloga (NHEJ). Es posible modificar la secuencia del gen diana utilizando un ADN molde que utilizará la maquinaria HDR (derecha) para insertar esta secuencia en el punto de ruptura mediante recombinación homóloga. Por otro lado, la maquinaria de reparación NHEJ (izquierda) comete errores que resultan en la pérdida de función del gen. Adaptado de Mao Z., et al [229].

Los cribados de selección de librerías de CRISPR-Cas9 han mostrado ser una herramienta muy robusta para interrogar la función génica. Los cribados de pérdida de función a escala de todo el genoma basados en la tecnología de CRISPR-Cas9 (GeCKO, *Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout*) presentan ventajas con respecto a otros tipos de metodologías como son las librerías de ARN de interferencia (ARNi). A pesar de la contribución de los cribados de ARNi a muchos avances biológicos [240–244], este tipo de cribados presentan limitaciones, ya que están dirigidos a transcritos, dando lugar a una eliminación incompleta de la expresión génica y presentan un número elevado de *off-targets* o dianas inespecíficas, lo que resulta en una baja relación señal:ruido que conduce a una interpretación limitada o a la identificación de falsos positivos [245–247].

Estudios utilizando tecnologías de cribado de CRISPR-Cas9 de genoma completo han llevado a la identificación de nuevas dianas farmacológicas [248–254], genes esenciales [236,255] y moléculas involucradas en mecanismos de acción y de resistencia a fármacos [218,250,254,256–262] en multitud de tipos de cáncer. Algunos estudios también han evaluado estrategias farmacológicas dirigidas contra moléculas involucradas en la resistencia a fármacos [218,261].

Avances recientes en las tecnologías de cribados de CRISPR-Cas9 incluyen modificaciones en la metodología que han permitido aplicaciones tales como la activación [263] o inhibición [264] transcripcional dirigida, así como la metilación [265] o desmetilación [266] dirigida del ADN. En un estudio, Pauli C. utilizó una librería dirigida al ARN nucleolar (snRNAs, *small nucleolar RNAs*), y encontró un snRNA esencial para el crecimiento y supervivencia de las células leucémicas [267]. Otros grupos han llevado a cabo nuevas aproximaciones más precisas para la identificación de *drivers* tumorales. Ejemplo de ello es el estudio de Han K., *et al.*, donde analizaron las vulnerabilidades de cáncer de pulmón mediante la utilización de cribados de CRISPR-Cas9 en esferoides 3D, lo que les llevó a la identificación de la molécula CPD (Carboxypeptidasa D) como una nueva diana [268]. La gran versatilidad y aplicabilidad de estos ensayos ha llevado a su utilización incluso para identificar los factores que regulan la entrada del SARS-CoV-2 [269] en las células.

Actualmente se han llevado a cabo cribados de CRISPR en cientos de líneas celulares de cáncer. Determinados centros e institutos de investigación como el *Wellcome Sanger Institute* han desarrollado plataformas como *DepMap* para identificar vulnerabilidades tumorales y han realizado estudios muy amplios, como es el estudio de Behan FM., *et al.*, donde llevaron a cabo cribados de CRISPR-Cas9 de genoma completo en 324 líneas celulares de 30 tipos de cáncer. Con los datos generados, desarrollaron un algoritmo de análisis cuyo resultado arroja información sobre dianas farmacológicas prioritarias, y además sugiere nuevas dianas antitumorales [270]. En el contexto del mieloma múltiple, la aplicación de esta tecnología es especialmente relevante y atractiva, teniendo en cuenta que pese a la introducción de agentes farmacológicos como los IMiDs, los inhibidores del proteasoma (IPs), los anticuerpos monoclonales (mAbs) y la recientemente implementada en la clínica terapia de células CAR-T (*Chimeric Antigen*

Receptor), el mieloma es una neoplasia incurable en la gran mayoría de los casos sobre todo por el desarrollo de resistencias.

Varios estudios han analizado los genes de resistencia y sensibilidad a IMiDs e IPs mediante cribados de selección positiva basados en librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo en células de MM. En el primero de ellos, el grupo de Stewart K. utilizó la línea celular RPMI8226 para analizar aquellos genes cuya inactivación contribuye a la resistencia a bortezomib, identificando así los genes *PSMC1-6* [271]. Posteriormente el grupo de Ebert L. del *Dana Farber Cancer Institute*, utilizando como modelo la línea celular MM.1S, analizó los genes cuya inactivación induce resistencia a lenalidomida. Este estudio demostró que la pérdida de las enzimas UBE (*Ubiquitin-Conjugating Enzymes*) UBE2D3 y UBE2G1, de la subunidad del complejo ubiquitín ligasa CRL4^{CRBN} DDB1, así como de los reguladores de culinas UBE2M y los 9 miembros del signalosoma COP9 (*Photomorphogenesis 9*), da lugar a una neddilación alterada de culinas A4 que tiene como resultado la pérdida de actividad CRL4^{CRBN} dependiente de lenalidomida y, por consiguiente, la aparición de resistencia a este IMiD [272]. Por otro lado, el grupo de Anderson K. también llevó a cabo un cribado de genoma completo de CRISPR-Cas9 en la línea MM.1S y de nuevo identificó genes del signalosoma COP9 (*CSN2, CSN4, CSN5, CSN6, CSN7A, CSN7B, CSN8*) que, cuando son inactivados, inducen resistencia a lenalidomida. Además, demostró que el signalosoma COP9 protege a CRBN de ser degradado por otra E3 ubiquitín ligasa (SCF^{Fbxo7}), de modo que la inactivación del signalosoma COP9 induce parcialmente una infraexpresión de CRBN y por consiguiente una pérdida parcial de sensibilidad a lenalidomida [218].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El MM es considerado una enfermedad incurable en la gran mayoría de los casos, debido, entre otros factores, a la aparición de resistencias (primarias o adquiridas) a los tratamientos actualmente disponibles. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos responsables de estas resistencias y la búsqueda de estrategias encaminadas a evitarlas, constituye un campo de investigación clave en el escenario terapéutico actual.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el de identificar genes y/o vías de señalización claves en la resistencia adquirida por la célula de mieloma múltiple a fármacos inmunomoduladores y actuar sobre ellos para evitar o revertir resistencias.

Primer objetivo

Identificar genes y/o vías de señalización claves en la resistencia a fármacos inmunomoduladores, tomando como principales exponentes las combinaciones de lenalidomida + dexametasona y pomalidomida + dexametasona y actuar sobre ellos.

- 1.1. Establecer modelos *in vitro* de resistencia adquirida a las combinaciones de lenalidomida y dexametasona, así como a pomalidomida y dexametasona; y posteriormente caracterizarlos a nivel morfológico, inmunofenotípico, genómico, epigenético, transcriptómico y proteómico.
- 1.2. Evaluar terapias dirigidas, basadas en los estudios anteriores, que reviertan la condición de resistencia.

Segundo objetivo

Evaluar los mecanismos de desregulación de CRBN, principal diana de los fármacos inmunomoduladores, utilizando los modelos *in vitro* de resistencia a lenalidomida o pomalidomida en combinación con dexametasona e identificar la manera de revertirlos.

- 2.1. Identificar factores genómicos involucrados en la desregulación de CRBN mediante el estudio de posibles alteraciones cromosómicas y el análisis del estado mutacional del gen *CRBN*.
- 2.2. Evaluar si determinados factores epigenéticos son responsables de la desregulación de CRBN, en concreto, la metilación de *CRBN*, las marcas de histonas y los miARNs.
- 2.3. Analizar estrategias terapéuticas, basadas en los estudios anteriores, que reviertan la infraexpresión de CRBN.

Tercer objetivo

Identificar genes implicados en la resistencia a la combinación de pomalidomida y dexametasona, así como posibles vulnerabilidades de la célula resistente, mediante la aplicación de cribados de librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo.

- 3.1.** Identificar genes implicados en la sensibilidad y resistencia a la combinación de pomalidomida y dexametasona mediante cribados de selección positiva.
- 3.2.** Determinar, mediante la utilización de cribados de selección negativa, genes cuya inactivación revierta la resistencia adquirida a pomalidomida y dexametasona en células de MM.
- 3.3.** Analizar vulnerabilidades de la célula resistente mediante la identificación de genes de dependencia para la supervivencia de la línea celular resistente a pomalidomida y dexametasona.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. FÁRMACOS

Se adquirió lenalidomida (#CC5013), pomalidomida (#CC4047), tazemetostat (#EPZ6438) y selumetinib (#AZD6244) en Selleckchem, dexametasona (#D4092) en Sigma-Aldrich, S63845 (#HY100741) y venetoclax (#HY15531) por MedChemExpress, y bortezomib (#B1408) en LC Laboratories. PIM-447 fue cedido por Novartis Pharmaceuticals, Inc.

3.2. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares HEK293T y MM.1S se compraron en ATCC (#CRL3216 y # CRL2974, respectivamente), mientras que la línea OPM-2 se obtuvo de DSMZ (#ACC50). Las líneas resistentes MM.1S-RPD y MM.1S-RLD (en adelante RPD y RLD) fueron generadas a través del cultivo de la línea parental MM.1S con dosis crecientes de pomalidomida o lenalidomida (respectivamente) y una dosis fija de 2,5 nM de dexametasona durante 6-8 meses.

Los medios de cultivo, así como el suero bovino fetal (SBF), los suplementos de penicilina-estreptomicina y L-glutamina y la tripsina fueron obtenidos en Gibco, Thermofisher Scientific.

3.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD, APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

Los estudios de viabilidad celular se basaron en ensayos de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide*), que es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Las células metabólicamente activas reducen la sal de MTT a un compuesto insoluble en agua (formazán), de color azul oscuro. Este compuesto es solubilizado con una solución de 10% SDS y HCl 0.01 M, y posteriormente cuantificada su absorbancia, que es directamente proporcional al número de células viables. La absorbancia se midió en un lector de placas TECAN, con una longitud de onda de lectura de 570 nm y de referencia de 630 nm. Para cada ensayo concreto con cada fármaco y línea celular, se analizaron 3

experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (SD). La concentración inhibitoria (IC_{50}) del fármaco se calculó usando el software de gráficos SigmaPlot (Systat Software Inc.).

El perfil del ciclo celular, así como la inducción de apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). El análisis del ciclo celular se realizó fijando las células en etanol al 70% y posteriormente llevando a cabo una tinción con yoduro de propidio (PI de *propidium iodide*), un agente intercalante gracias al cual podemos cuantificar el contenido del ADN, y por tanto, identificar las fases del ciclo celular. El análisis de la apoptosis se realizó mediante el marcaje con Anexina-V y PI (Immunostep) y se basa en la redistribución del fosfolípido fosfatidil serina en la membrana celular, que pasa a estar orientado al exterior celular en las etapas iniciales de la muerte por apoptosis en vez de hacia el citosol. La anexina-V, que está a su vez marcada con un fluorocromo, interacciona con el fosfolípido y el PI marca el núcleo al interactuar con el ADN en células permeabilizadas por necrosis o en etapas finales de la apoptosis. Los resultados fueron posteriormente analizados con el software Infinicyt (Cytognos).

3.4. WESTERN BLOT

El protocolo de determinación proteica mediante Western Blot [273] consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar proteínas obtenidas de extractos celulares u otros productos celulares. Posteriormente las proteínas son trasferidas mediante la aplicación de un campo eléctrico desde el gel hacia una membrana de PVDF, donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para uno o varios epítomos de la proteína.

Las células se recogieron, se lavaron con una solución salina de tampón fosfato (PBS) y se lisaron en tampón de lisis frío (NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 1%, Tris HCl 20 mM, pH 7) con inhibidores de proteasas (sc29130) y fosfatasa (sc45045, Santa Cruz Biotechnology). Los extractos proteicos se calentaron en tampón de carga con β -mercaptoetanol para mantener condiciones reductoras, y se sometieron a electroforesis en gels SDS-PAGE a una concentración de entre 8 y 12%. Después de la

electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF-Immobilon (Merck Millipore), que posteriormente se bloquearon durante 1 h con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en TBST (solución salina tamponada con Tris-HCl y Tween-20 al 0,1 %, BSA-TBST). Las membranas se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario, y al día siguiente tras los lavados con TBST, se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa (HRP, *Horseradish Peroxidase*). Las bandas se visualizaron mediante un sistema de detección basado en luminol usando *Clarity Western Peroxide* y *Luminol Enhancer Reagents* (Bio-Rad).

Los anticuerpos anti-IRF4 y anti-ERK2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, anti-CRBN de Novus Biologicals, Alexa fluor 488 Goat anti-Mouse IgG de Thermo Fisher Scientific y anti- α -tubulina de Calbiochem. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP y otros anticuerpos, como anti-MEK, anti-phospho-MEK1/2 (p-MEK 1/2 Ser217/221), anti-phospho-p44/42 MAPK (p-ERK1/2 Thr202/Tyr204), anti-c-Myc, anti-phospho-c-Myc (p-c-Myc Ser62), anti-PIM1, anti-IKAROS, anti-AIOLOS, anti-Mcl-1, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL y anti-Bim se adquirieron de Cell Signaling Technology.

3.5. INMUNOFLUORESCENCIA

La detección proteica por inmunofluorescencia se llevó a cabo sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich), en los que se fijaron las células con una solución al 4% de formaldehído en PBS (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, se llevó a cabo un bloqueo y permeabilización de 1 h con una solución al 0,3% de Triton X-100 (Thermo Fisher) y 5% de BSA en PBS 1X, y después una incubación con anticuerpo primario en PBS con 1% de BSA durante una noche. Tras realizar 3 lavados con PBS durante 5 min, los portaobjetos se incubaron con una solución con anticuerpo secundario durante 1 h en oscuridad. Finalmente tras lavar de nuevo con PBS, los núcleos celulares se tiñeron con el marcador del ADN DAPI (Cell Signaling), se montaron con un cubreobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y se visualizaron en un microscopio confocal (Laser Scan Confocal Microscope Leica SP5).

3.6. MICROARRAYS DE PROTEÍNAS

Se imprimieron de 360 anticuerpos utilizando un interespaciado de 375 μm sobre portaobjetos con poli-L-Lisina . Se diluyeron los extractos proteicos en tampón de lisis (140 mM NaCl, 10 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*), 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 8, 1 mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*), 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina y 1 mM sodio ortovanadato). Un total de 1 μg de proteína fue semidesnaturalizada por calor e incubada con una mezcla de biotina, sobre la que posteriormente se añadió una mezcla de estreptavidina-Cy5, lo que permitió la detección de la intensidad de fluorescencia de cada punto, siendo directamente proporcional a la cantidad de proteína unida al anticuerpo del *microarray*.

3.7. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo en el Servicio de Genómica del CIC-IBMCC mediante la utilización de *microarrays* de ARN de Affymetrix® Human Gene 2.0 ST (Affymetrix). Para ello, se congelaron 1×10^7 células en RLT plus (Qiagen) a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y, más tarde, el ARN se extrajo mediante columnas RNeasy® Mini (Qiagen). Posteriormente se analizó la calidad del ARN en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent). El marcado y las hibridaciones se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones de Affymetrix. Esencialmente, se amplificaron y marcaron 100 ng de ARN total (WT Plus Reagent Kit, Affymetrix) que se hibridaron a los *microarrays* Affymetrix® Human Gene 2.0 ST. El lavado y escaneo se llevó a cabo usando el sistema de GeneChip de Affimetrix (GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 y GeneChip Scanner 7G).

Los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos de los *microarrays* se normalizaron mediante el método RMA (Robust Multichip Average) implementado en el paquete oligo (v.1.44.0) en R (v.3.5.0), utilizando una referencia genética personalizada BrainArray (Custom CDF, Ensembl versión 22). El análisis no supervisado se realizó en el software estadístico SIMFIT (v.7.4.1), utilizando la distancia euclidiana como medida de distancia y el promedio del grupo como método de agrupación. Los genes diferencialmente expresados se identificaron utilizando el método SAM a través

de Shiny (v. 1.1.0) en R. Las listas de genes estadísticamente significativos ($FDR < 0,05$) fueron cruzadas mediante la herramienta en línea DrawVenn. (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). El análisis de enriquecimiento y sobrerrepresentación de vías Reactome se realizó con la herramienta online Webgestalt [274].

Algunos de los genes diferencialmente expresados fueron validados mediante RT-qPCR (*Reverse-Transcription Quantitative Polymerase-Chain Reaction*). Para ello, se utilizó el kit de transcripción reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) y sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.8. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL ADN POR EL MÉTODO DE SECUENCIACIÓN CAPILAR O SANGER

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar mediante PCR las regiones más frecuentemente mutadas en el gen *CRBN*, así como su región 3'UTR. Para ello, se utilizó el software Primer3Plus del *Whitehead Institute for Biomedical Research*, así como la herramienta online Primer-Blast del *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. Para la amplificación se utilizó una polimerasa de alta fidelidad *Pfu* de Biotools. El producto de PCR resultante fue purificado con columnas GeneJet (Thermo Fisher Scientific) y secuenciado en un ABI3500 XL de Applied Biosystems. Las secuencias resultantes fueron analizadas y alineadas con el software SnapGene de GLS Biotech LLC.

3.9. ANÁLISIS CITOGENÉTICO MEDIANTE CGH-ARRAYS

El análisis de las alteraciones genómicas se realizó en el Servicio de Genómica del CIC-IBMCC mediante *CGH Arrays (Comparative Genomic Hybridization Arrays)* utilizando la matriz de Affymetrix CytoScan-HD (Affymetrix) siguiendo el protocolo del fabricante. La matriz consiste en 2.696.550 sondas que incluyen 743.304 SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) y 1.953.246 sondas no polimórficas. Esto se traduce en una sonda cada

880 pb del genoma y posibilita una representación del 96% de los genes. En resumen, 500 ng de ADN genómico se digirieron con Nsp1 durante 2 h a 37 °C. El ADN digerido se purificó y se ligó con oligos adaptadores a 16 °C durante 12-16 h. Posteriormente sobre los productos de la ligación se generaron amplicones de ADN mediante PCR utilizando cebadores proporcionados por el fabricante (Affymetrix). El programa utilizado es el siguiente: 94 °C 3 min; 35 X 94 °C 30 s, 60 °C 45 s, 65 °C 1 min; 68 °C 7 min. Los productos de PCR se purificaron y digirieron con DNaseI durante 35 min a 37 °C. El ADN fragmentado fue entonces marcado con nucleótidos biotinilados con una enzima desoxinucleótido terminal transferasa durante 4 h a 37 °C. A continuación, 250 µg de ADN fragmentado se hibridaron con el Chip Affymetrix Cytoscan HD preequilibrado a 50 °C durante 18 horas. Los *arrays* se lavaron y se tiñeron en la GeneChip® Fluidics Station 450 y las imágenes DAT fueron adquiridas con el GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix). Los archivos “.cel” se generaron a partir del software (AGCC) Affymetrix GeneChip™ Command Console Software, y el análisis de los datos se realizó utilizando el programa de análisis Affymetrix Chromosome Analysis Suite (CHAS).

3.10. *FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)*

Se utilizó la técnica FISH para determinar la presencia de alteraciones en el número de copias de la región del gen *CRBN*. Las líneas celulares se fijaron en 3:1 de metanol y acético (v/v) y se llevó a cabo iFISH para detectar la presencia de alteraciones cromosómicas en 3p26 con las sondas RP11-10H6, que contiene el gen *CRBN*; y el BAC RP11-183N22, utilizado como control (CytoTest). Se utilizó un microscopio de fluorescencia BX60 (Olympus) equipado con un objetivo X100 para la enumeración de puntos de hibridación por núcleo. Se analizaron un mínimo de 100 núcleos en interfase. Solo se contaron aquellos puntos con un tamaño, intensidad y forma similares en áreas con menos de un 1% de células no hibridadas.

3.11. ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE MARCADORES DE MEMBRANA Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO CELULAR

El análisis de marcadores de superficie se llevó a cabo mediante citometría de flujo partiendo de 2×10^6 células, que se lavaron 2 veces con 2 ml de GIBCO™ DPBS (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se centrifugaron las células a 300 g durante 5 minutos, y se resuspendieron en 100 μ l de DPBS con 5 μ l de cada anticuerpo específico. Tras una incubación de 20 minutos a 4 °C y dos lavados con PBS, se procedió a la adquisición de las muestras en un citómetro FACSCanto (Becton Dickinson). El análisis inmunofenotípico se realizó con el software Infinicyt (Cytognos). Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD38 y anti-CD56 (Cytognos); anti-CD45 (Immunostep); anti-CD19 (Beckman Coulter); anti-CD117, anti-CD81, anti-CD27 y anti-CD138 (BD Biosciences).

Para analizar la morfología celular, las células fueron fijadas sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-Lisina, teñidas con hematoxilina-eosina [275] y visualizadas con microscopio de campo claro.

3.12. ANÁLISIS DEL ESTADO DE METILACIÓN DE CPGS: PIROSECUENCIACIÓN

El análisis del estado de metilación génica se llevó a cabo mediante el método de pirosecuenciación. En primer lugar, se extrajo el ADN genómico con el kit NZY Tissue gDNA Isolation kit de NZYTech, Lda y se trató con bisulfito sódico, que transforma las citosinas (C) no metiladas en uracilos (U). Tras una amplificación por PCR, los (U) son sustituidos por timinas (T), lo que permite distinguir las C metiladas y no metiladas en el ADN original (**Figura 23**). Se diseñaron oligos de pirosecuenciación para amplificar una región que incluyera las islas CpG del promotor de *CRBN* y otras cercanas, utilizando el software UCSC Genome Browser (UCSC Genomics Institute). El producto de PCR resultante fue purificado con columnas GeneJet (Thermo Fisher Scientific) y clonado en

el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) utilizando las enzimas NotI y EcoRI. Posteriormente se transformaron bacterias competentes DH5 α con 50 ng de plásmido; se cultivaron en medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina, 0,5 mM IPTG (*Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside*) y 80 μ g/ml X-Gal (β -D-galactopiranosido) de Sigma Aldrich; y se secuenciaron 10 colonias aisladas de cada muestra. Las secuencias fueron analizadas con el software BiQ Analyzer v2.0 (*Max Planck Institute for Informatics*).

El análisis de metilación global de todo el genoma se llevó a cabo mediante la realización de *arrays* de metilación Infinium Methylation EPIC de Illumina con el ADN tratado con bisulfito. La metilación en cada CpG se representó como “valores β ” (que van de 0 a 1), donde 0,0 es equivalente a 0% de metilación y 1.0 es equivalente a 100% de metilación en una CpG dada [276]. Los análisis estadísticos se realizaron sobre los valores β . Se calcularon los valores medios β para las diferentes condiciones, y el $\Delta\beta$ medio se calculó restando el valor β medio de los controles del de los casos. Por lo tanto, un valor $\Delta\beta$ positivo denota hipermetilación y un valor $\Delta\beta$ negativo indica hipometilación. El análisis de metilación diferencial se llevó a cabo utilizando el paquete limma (3.46.0). Las posiciones, más comúnmente denominadas sondas diferencialmente metiladas (SDM), se identificaron comparando los valores β medios en el grupo experimental con los valores β medios en el grupo control para un sitio CpG particular. Posteriormente se establecieron los criterios para las SDM: un p-valor ajustado (FDR) < 0,05 y una diferencia en el valor β entre grupos mayor a 0,3 (es decir, $|\Delta\beta| > 0,3$). El procesamiento de los datos de la matriz y los análisis se realizaron en RStudio (versión 1.2.1335) utilizando un entorno R (versión 3.6.0). Para el análisis de enriquecimiento y visualización de los datos se utilizó la herramienta online <http://great.stanford.edu>, desarrollada por el laboratorio de G. Bejerano (*Stanford Cancer Institute*).

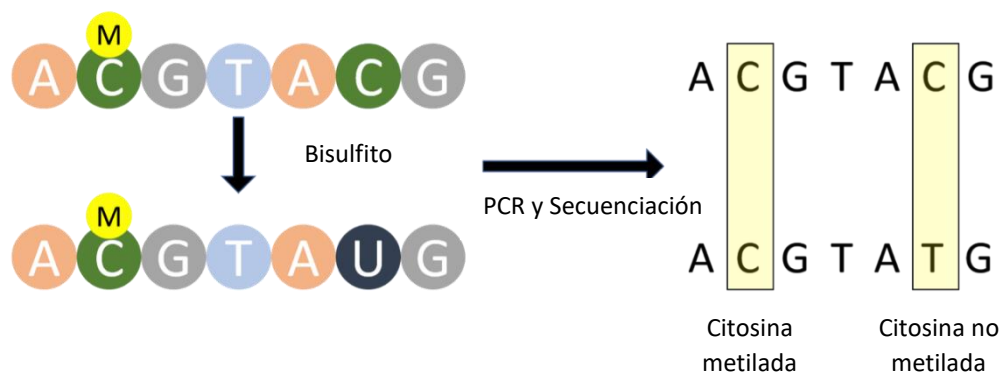


Figura 23. Análisis del estado de metilación por el método del bisulfito.

3.13. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE microARNs (miARNs)

El ARN total se extrajo de las células de MM utilizando el kit miRVana de Applied Biosystems de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y su integridad se evaluó mediante el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent). Se marcaron 1000 ng de ARN total usando el kit Flash Tag Biotin HSR Labeling (Genisphere) y las hibridaciones se realizaron de acuerdo con los protocolos de Affymetrix usando una matriz de miARNs (GeneChip miRNA 4.0 Array). El lavado y el escaneo se llevaron a cabo utilizando el sistema GeneChip de Affymetrix (GeneChip Hybridization Oven 640, GeneChip Fluidics Station 450 y GeneChip Scanner 7G). Este proceso fue llevado a cabo en el Servicio de Genómica del CIC-IBMCC.

La confirmación de los cambios en la expresión de miARNs se llevó a cabo mediante RT-qPCR. Para ello, se realizó la RT-PCR del ARN extraído enriquecido en miARNs para sintetizar el cDNA mediante un protocolo que favorece la estabilidad de los miARNs (TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher). Posteriormente, se emplearon sondas TaqMan™ (Advanced miRNA Assay, Thermo Fisher) para la cuantificación de la expresión de cada miARN, utilizando como control endógeno de expresión de hsa-miR-423-5p. Los datos de expresión se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.14. INHIBICIÓN Y SOBREENPRESIÓN DE miARNs

Las células de MM fueron transfectadas usando el sistema Nucleofector II de Lonza con el programa C-16 (Figura 24). Se utilizaron los miméticos de miARNs miRIDIAN hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-183, hsa-miR-2278, hsa-miR-454, hsa-miR-34a-5p y el control negativo Non-Targeting Control #1 de Dharmacon. Los inhibidores de miARNs usados fueron miRCURY LNA™ miRNA inhibitor hsa-miR-30a-5p y hsa-let-7f-5p, utilizando como control negativo miRCURY LNA™ microRNA Power inhibitor Negative Control (Qiagen). La concentración de miméticos e inhibidores usada en las transfecciones fue de 25 nM.

3.15. SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE PROTEÍNAS

De forma similar a la sobreexpresión de miARNs, la sobreexpresión transitoria de la proteína MEK1 se realizó transfectando con el sistema Nucleofector el plásmido pCScherryActMEK (Addgene, #31880), que incluye la secuencia codificante de una forma activa de MEK1 [277] a la vez que la proteína mCherry para observar la eficacia de la transfección.

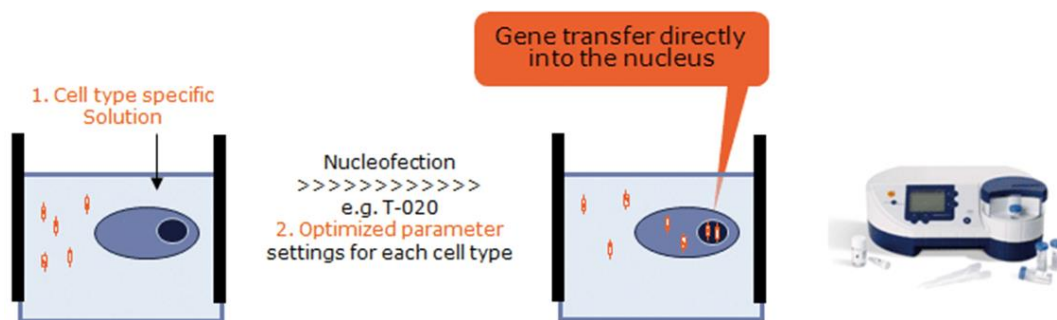


Figura 24. Sistema de transfección por nucleofección (Lonza).

3.16. LIBRERÍAS DE CRISPR-Cas9

Los cribados de genoma completo basados en la tecnología de CRISPR-Cas9 han supuesto una alternativa a los cribados de ARN de interferencia (ARNi) y han sido utilizados en diferentes sistemas biológicos para evaluar los mecanismos moleculares de diversas enfermedades [237–239,278]. En el presente trabajo, se llevaron a cabo cribados en diferentes modelos celulares utilizando librerías de genoma completo basadas en la tecnología de CRISPR-Cas9.

3.16.1. AMPLIFICACIÓN DE LA LIBRERÍA

Se amplificó la librería de sgRNAs *Human CRISPR Knockout Pooled Library* (GeCKO v2, Addgene, #1000000049) siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio del Dr. Zhang F. [279]. Esta librería consta de 122.411 sgRNAs que tienen como diana 19.050 genes (6 sgRNAs por cada gen) y 1.864 miARNs (4 sgRNAs por cada miARN). Además, incluye 1.000 sgRNAs control que no tienen como diana ningún gen o miARN.

De forma resumida, se realizaron 6 electroporaciones de cada sub-biblioteca de sgRNAs A y B a 50 ng/ul usando bacterias Endura ElectroCompetentes (Lucigen). Las células electroporadas se sembraron en placas de 245 mm² con LB + 100 µg/ml de ampicilina y se mantuvieron durante una noche a 32 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico de la librería de sgRNAs mediante *maxipreps* utilizando el kit NucleoBond Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel).

3.16.2. GENERACIÓN DE LENTIVIRUS

Brevemente, se transfectaron $5,4 \times 10^7$ células HEK293T en seis frascos de cultivo de 175 cm² en medio DMEM con 10% de SBF libre de antibióticos. Para cada frasco de cultivo se combinaron 168 µl de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) diluidos en 2,8 ml de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), con 91 µg de las sub-librerías A o B GeCKO v2, además de 27,3 µg de psPAX2 (Addgene, #12260), 7,2 µg pMD2.G (Addgene, #12259) y 56 µl de reactivo PLUS (Thermo Fisher Scientific) diluidos en otros 2,8 ml de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). La mezcla lentiviral se incubó durante 30 minutos

y fue posteriormente dispensada gota a gota sobre las células HEK293-T. El sobrenadante lentiviral se recogió y filtró utilizando membranas de 0,45 μm (Millipore) a las 48 y 72 h después de la transfección. La cuantificación lentiviral se llevó a cabo mediante un ensayo de titulación basado en RT-qPCR utilizando cebadores que abarcan la región lentiviral 5'-LTR (MoBiTec).

3.16.3. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DE MIELOMA

Se transdujeron un total de $5,4 \times 10^8$ células MM.1S y $5,4 \times 10^8$ RPD que habían sido previamente modificadas para expresar una endonucleasa Cas9 funcionalmente activa (MM.1S-Cas9 y RPD-Cas9), en 10 flasks de 225 cm^2 por cada línea celular, utilizando el sobrenadante viral obtenido previamente a un MOI (*Multiplicity Of Infection* o proporción célula-partícula viral) de 0,3 y agregando polibreno (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tras esto, se midió la eficiencia de la transducción ya que, para asegurar la correcta representación de las sgRNAs en la población celular de ambas líneas de mieloma, se recomienda que cada sgRNA esté presente en al menos 500 células [279].

Teniendo en cuenta que el plásmido que contiene las sgRNAs codifica un *cassette* de resistencia a puromicina, se midió la eficiencia de transducción llevando a cabo ensayos de viabilidad celular por MTT y de muerte celular mediante citometría de flujo, tratando a las células transducidas con una dosis letal de 1,5 μM de puromicina (Thermo Fisher Scientific). La eficiencia obtenida en la transducción de la librería fue de $\sim 25\%$. Teniendo en cuenta que la librería consta de 122.411 sgRNAs, la eficiencia obtenida aseguró que cada sgRNA se expresase en más de 1.100 células.

Las células MM.1S-Cas9 y RPD-Cas9 transducidas con la librería se seleccionaron con 1,5 μM de puromicina desde las 72 h de la transducción y durante 10 días consecutivos. Posteriormente, las células se mantuvieron durante 2 pases (7 días) en medio sin puromicina y se procedió a realizar la selección con los fármacos.

3.16.4. SELECCIÓN POSITIVA

Las células MM.1S-Cas9 que expresaban la librería de sgRNAs se sembraron a una densidad de 3×10^7 células por flask de 175 cm² y se trataron con una combinación de pomalidomida 15 nM + dexametasona 2,5 nM (IC30 a 3 días) o con el vehículo (DMSO y etanol 100%) durante 21 días, realizando 3 réplicas biológicas por cada condición. Se recolectaron 3×10^7 células por cada condición a 0 y 21 días.

3.16.5. SELECCIÓN NEGATIVA

Las células RPD-Cas9 transducidas con la librería de sgRNA se sembraron a una densidad de 3×10^7 células por flask de 175 cm², y se trataron con una combinación de pomalidomida 50 nM + dexametasona 2,5 nM (IC75 a 3 días en células MM.1S) o con el vehículo (DMSO y etanol 100%) durante 5 días, realizando 3 réplicas biológicas por condición. Se recolectaron 3×10^7 células por cada condición en los días 0 y 5.

3.16.6. SECUENCIACIÓN DEL ADN

El ADN genómico de las células recolectadas se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante (Zymo Research) y se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies). El ADN se amplificó en una PCR de dos pasos con la ADN polimerasa de fusión Herculase II (Agilent Technologies). Se realizaron al menos 40 PCR1 con 5 µg de ADN genómico en cada reacción, y 13 PCR2 usando 10 µl del producto de las PCR1 (una PCR2 por cada 10.000 sgRNAs de la librería GeCKO) para cada condición experimental, tiempo y réplica biológica. Se realizó una segunda PCR para unir adaptadores de Illumina, etiquetas para identificar las muestras y una secuencia espaciadora o *stagger* de longitud variable (1-9 pares de bases) para multiplicar la diversidad en las secuencias.

Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes:

- 2 min a 95 °C, seguido de 10 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 35 s a 82 °C, 18 ciclos; y una extensión final de 3 min a 72 °C.

La PCR1 se realizó con los siguientes *primers*:

- *Forward*: 5 'AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCCG 3'
- *Reverse*: 5 'CTTTAGTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTACTATTCTTTCC 3'

La PCR2 se realizó con los siguientes *primers*:

- *Forward*:
5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC
T + *stagger* + etiqueta + TCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG 3 '
- *Reverse*: 5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT + etiqueta +
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT + *stagger* +
TCTACTATTCTTCCCTGCACTGT 3 '

Los productos de PCR2 se seleccionaron por tamaño utilizando una concentración 0,9 X de bolas magnéticas Ampure XP (Beckman Coulter), que se purificaron mediante el lavado con etanol al 80% y se analizaron con el kit D1000 y el equipo TapeStation de Agilent Technologies. Los amplicones se cuantificaron por Qubit con el kit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se normalizaron mediante cuantificación KAPA con el kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Sigma Aldrich). Finalmente, el *pool* de amplicones se secuenció a una concentración final de 1,8 pM en un NextSeq 500/550 de Illumina utilizando High Output Kit v2.5 (75 ciclos) con un 10 % de control de ADN de fago-PhiX (Illumina).

3.16.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN

Los datos de secuenciación se analizaron para comprobar la representación de las sgRNAs utilizando como partida el *script* de *python count_spacers.py* proporcionado por Zhang [279]. En primer lugar, se preparó un archivo CSV que contenía todas las sgRNAs de la librería y después se analizaron los resultados de la secuenciación. Utilizamos el algoritmo de análisis MAGeCK (*Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockout*) desarrollado por el Dana-Farber Cancer Institute, que permite identificar genes de sensibilidad y resistencia e incluso genes esenciales de forma más robusta que otros métodos de análisis [280]. Dentro de este sistema de análisis, se han desarrollado

dos funciones que pueden utilizarse para identificar los *hits* o genes cuyas guías se encuentran diferencialmente representadas: MAGeCK RRA (*Robust Rank Aggregation*), que se basa en la asignación de un “rango” o puntuación agregada a cada gen; y MAGeCK MLE (*Maximum-Likelihood Estimation*), conocido como modelo de máxima verosimilitud, que está basado en un modelo estadístico que estima los parámetros de una distribución maximizando una función de probabilidad, es decir, los valores de los parámetros se asignan maximizando la probabilidad de que el proceso descrito por el modelo reproduzca los datos que realmente se observaron. El *pipeline* o conjunto de pasos a llevar a cabo durante el análisis (contaje de sgRNAs, normalización de medianas, agrupación, muestra de resultados, etc) fue nombrado por los autores como MAGeCK “FLUTE”, como referencia metafórica a la finalización con éxito de una serie de pruebas en la popular ópera homónima de Mozart “*Flute*”. Este método permite la identificación de aquellos genes cuyas sgRNAs son seleccionadas tanto positiva como negativamente en los cribados [281]. Los análisis de enriquecimiento de genes se realizaron con las plataformas anteriormente mencionadas en el apartado “Análisis del perfil de expresión génica”.

3.17. GENERACIÓN DE *KNOCKOUTS* INDIVIDUALES MEDIANTE CRISPR-Cas9

La validación de los resultados de los cribados anteriores se llevó a cabo generando *knockouts* (KO) de genes de forma individual. Para ello, se diseñaron sgRNAs para los genes teniendo en cuenta la expresión de las isoformas del gen, su especificidad y eficiencia mediante herramientas bioinformáticas; alternatively, para algunos genes se utilizaron las mismas sgRNAs de la librería GeCKO. Las sgRNAs utilizadas se detallan en la **Tabla 6**.

Los oligonucleótidos seleccionados se fosforilaron, hibridaron y clonaron en plásmidos lenti-CRISPR v2 (Addgene, #52962). Posteriormente, se generaron partículas lentivirales en la línea productora HEK293T (tal y como se ha descrito anteriormente para las librerías), y se concentraron con LentiXConcentrator (Clontech Laboratories) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se transdujeron células MM.1S-Cas9 y

OPM2-Cas9 con los concentrados lentivirales mediante centrifugación (2 horas a 300 g en presencia de 8 µg/ml de polibreno. La separación célula a célula se realizó mediante citometría de flujo 72 h después de la transducción. Una vez crecieron los clones resultantes se caracterizaron mediante PCR y secuenciación Sanger, y se llevaron a cabo estudios funcionales basados en ensayos de viabilidad celular por MTT.

Tabla 6. sgRNAs utilizadas para la generación de knockouts de los genes seleccionados.

GEN	SGRNA
CRBN	AAAATCCTGTTCTTCTCGAT
SPOP	GTCATCAGGGAGAAGCCCGT
MIB2	CTCGACACCCGACCGCACAG
KLHL9	TTCCAACCTTAGCCAGCGAC
FBXO33	GCCGAGAACTATCTGAGCGG
FBXO21	GACTATGAGTCGTATCTTGA
PTEN	ACCGCAAATTTAATTGCAG
PLAA	GTCAACATTAAGCCCTGTTC
NCOR1	TCCCAACACCCGCCACCAGC
EDC4	GATGATAGCTCCACCTGCAT
THOC2	CATGATAGTTCAACATACAG

4. RESULTADOS

**CAPÍTULO I:
IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS
IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A
LENALIDOMIDA - DEXAMETASONA Y
POMALIDOMIDA - DEXAMETASONA**

En este primer capítulo, se generaron modelos *in vitro* de resistencia a las combinaciones estándares de tratamiento lenalidomida + dexametasona (Ld) y pomalidomida + dexametasona (Pd). Estos modelos se caracterizaron a nivel genómico, epigenético (metilación y de expresión de miARNs), transcriptómico y proteómico para identificar los mecanismos moleculares de resistencia a estas combinaciones y desarrollar estrategias para evitar o revertir dichas resistencias.

GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A IMiDs

El desarrollo de modelos celulares de resistencia se realizó a través de la exposición continua de la línea celular sensible MM.1S a dosis crecientes de lenalidomida o pomalidomida en combinación con una dosis baja constante de dexametasona (2,5 nM) durante aproximadamente 6-8 meses (**Figura 4.1**), hasta que las células desarrollaron resistencia (células RLD y RPD, respectivamente). Previo a la realización de los estudios posteriores, las células se mantuvieron sin fármaco durante 2 semanas y se comprobó de nuevo la resistencia.

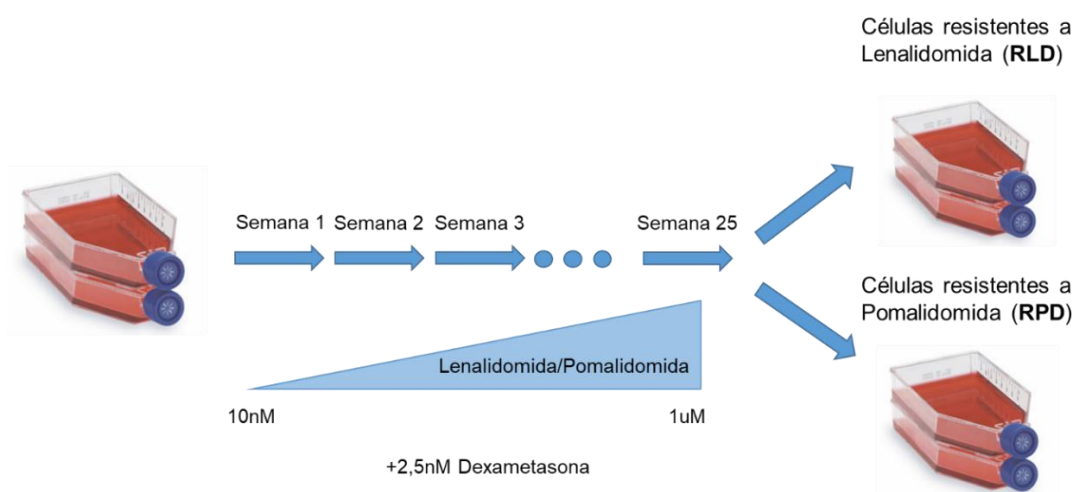


Figura 4.1. Proceso de generación de células resistentes a las combinaciones de lenalidomida o pomalidomida y dexametasona. Las células fueron tratadas con combinaciones de lenalidomida o pomalidomida y dexametasona de forma constante durante 6-8 meses. Las dosis de lenalidomida o pomalidomida se incrementaron gradualmente de 10 nM a 1 µM a medida que las células mostraban resistencia, que se midió por el ensayos de MTT y citometría de flujo. La dosis de dexametasona se mantuvo en 2,5 nM a lo largo de todo el proceso.

El IC50 (o concentración necesaria para disminuir la viabilidad celular en un 50%) de lenalidomida y pomalidomida tras 5 días de tratamiento, fue de $< 0,1$ y $> 2,5$ μM para las líneas sensibles y las resistentes, respectivamente. Las células resistentes RLD y RPD que se han obtenido, requieren una dosis aproximadamente 25 veces superior de lenalidomida y pomalidomida para que se produzca la misma muerte celular que sobre las células MM.1S. La viabilidad celular se observó mediante ensayos de MTT (**Figura 4.2 A**) y también se evaluó la apoptosis mediante ensayos de Anexina V/IP por citometría de flujo (**Figura 4.2 B**).

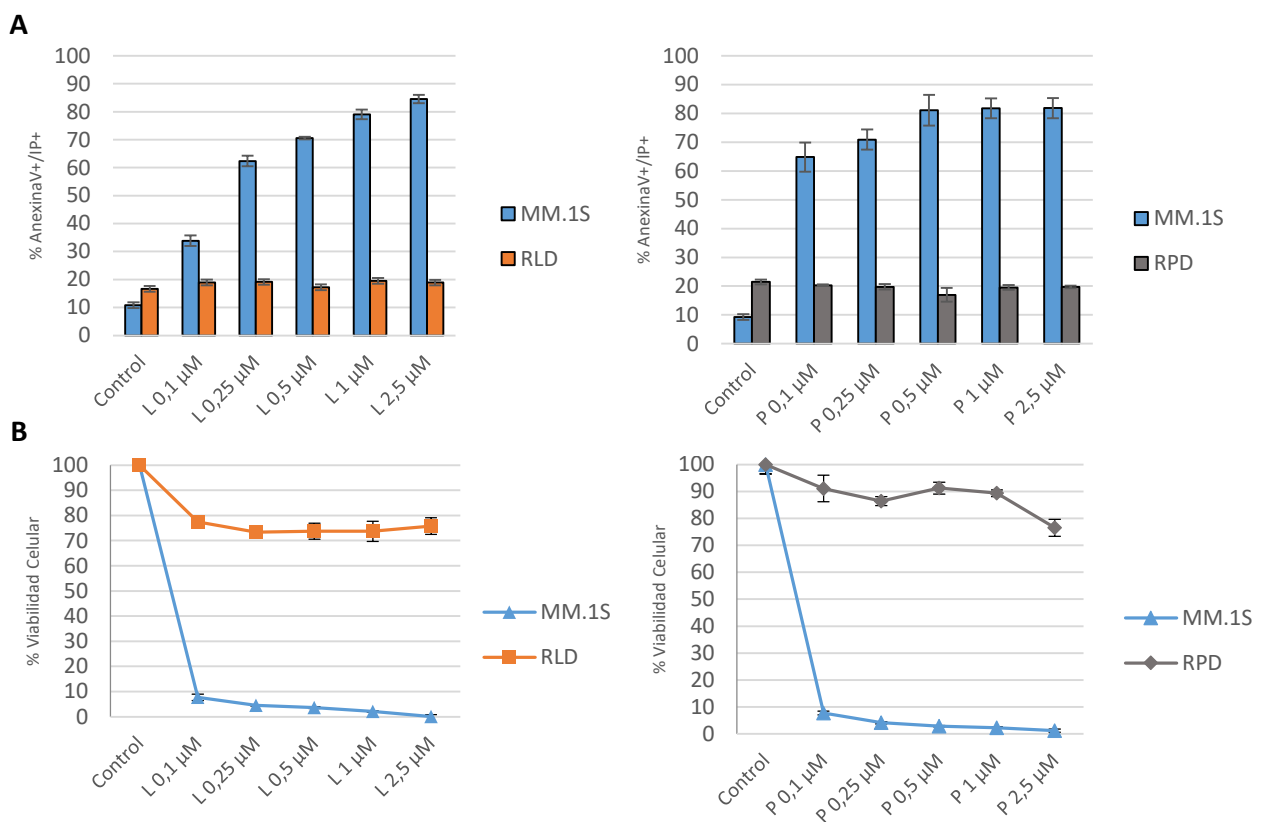


Figura 4.2. Análisis de la apoptosis y de viabilidad celular en células MM.1S, RLD y RPD en presencia de concentraciones crecientes de lenalidomida o pomalidomida y una dosis baja constante de dexametasona (2,5 nM) durante 5 días. A: análisis de apoptosis por citometría de flujo. B: estudios de viabilidad celular por ensayos de MTT. L: lenalidomida. P: pomalidomida.

Dado que los agentes inmunomoduladores inducen una parada del ciclo celular en las células de MM [282], se evaluó el ciclo celular en los modelos celulares de resistencia RLD y RPD en presencia y ausencia de fármaco, y se comparó con el de las células MM.1S en las mismas condiciones (**Figura 4.3**). Se observó que en la línea celular sensible MM.1S las combinaciones Ld y Pd inducen una parada de ciclo en G0-G1 tras 3 días de tratamiento, que aún es más pronunciada tras 5 días. Sin embargo, esta parada en el ciclo celular no se produce en las líneas resistentes RLD o RPD tratadas con Ld o Pd, respectivamente.

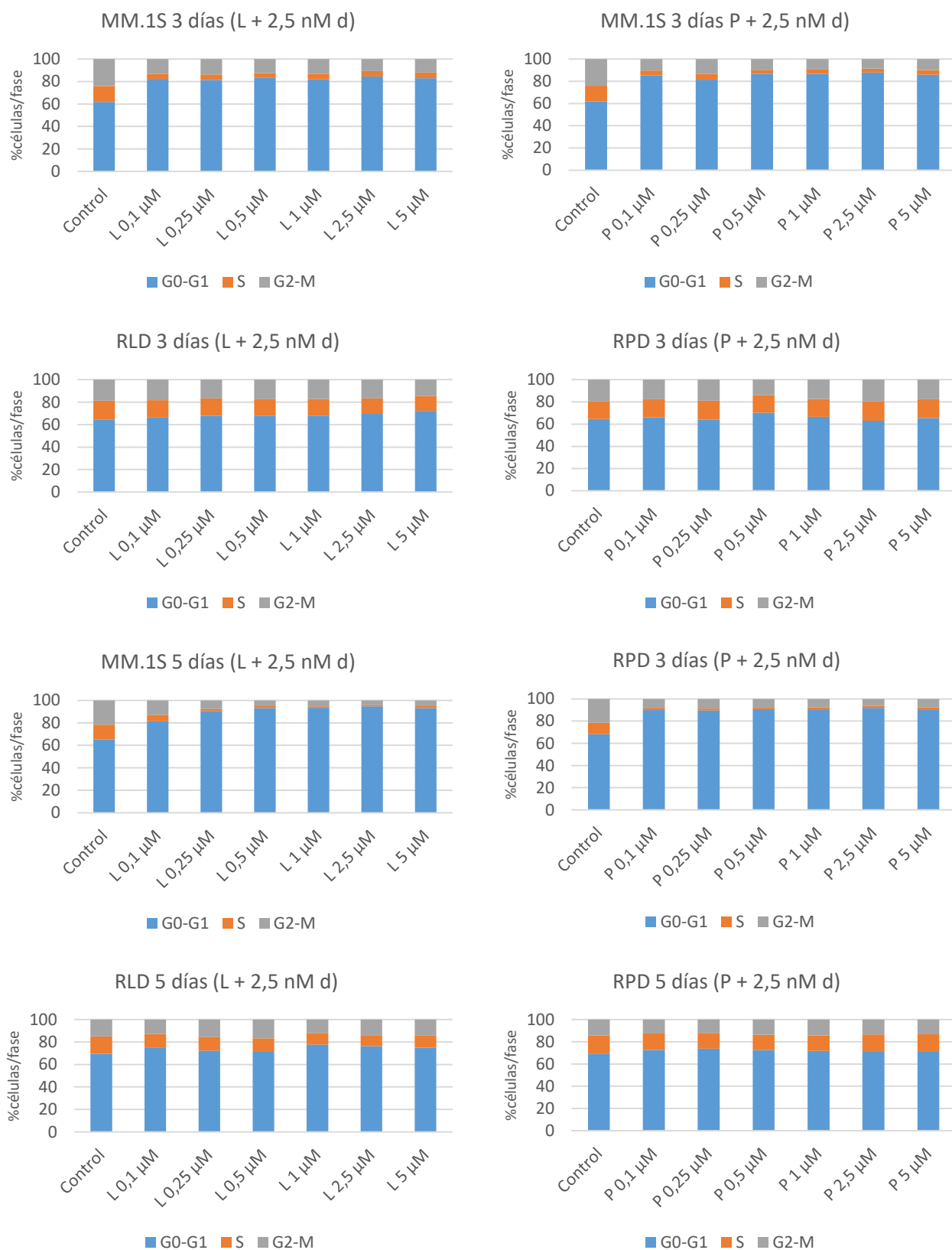


Figura 4.3. Determinación de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en células MM.1S, RLD y RPD, en presencia de concentraciones crecientes de lenalidomida o pomalidomida y una dosis baja constante de dexametasona (2,5 nM).

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOTÍPICA DE LOS MODELOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA A IMiDs

Se llevó a cabo un análisis morfológico comparativo de las líneas celulares MM.1S, RLD y RPD (**Figura 4.4**). En todas ellas se apreciaron células con características típicas de célula plasmática, como son un núcleo grande rodeado de un citoplasma basófilo dado su desarrollado retículo endoplasmático rugoso para responder a la elevada demanda de síntesis proteica; y la presencia de arcoplasma, una región más clara circundante al núcleo conocida como “halo perinuclear” que corresponde al aparato de Golgi. Por norma general encontramos células plasmáticas de tamaño normal. Las células MM.1S presentaron un diámetro aproximado de 15 μm , siendo ligeramente más pequeñas las células RLD y RPD ($\sim 13 \mu\text{m}$). En las tres líneas celulares, aproximadamente el 1% células presentan una morfología aberrante con núcleos en forma de flor, así como células con formas irregulares y en ocasiones multinucleadas.

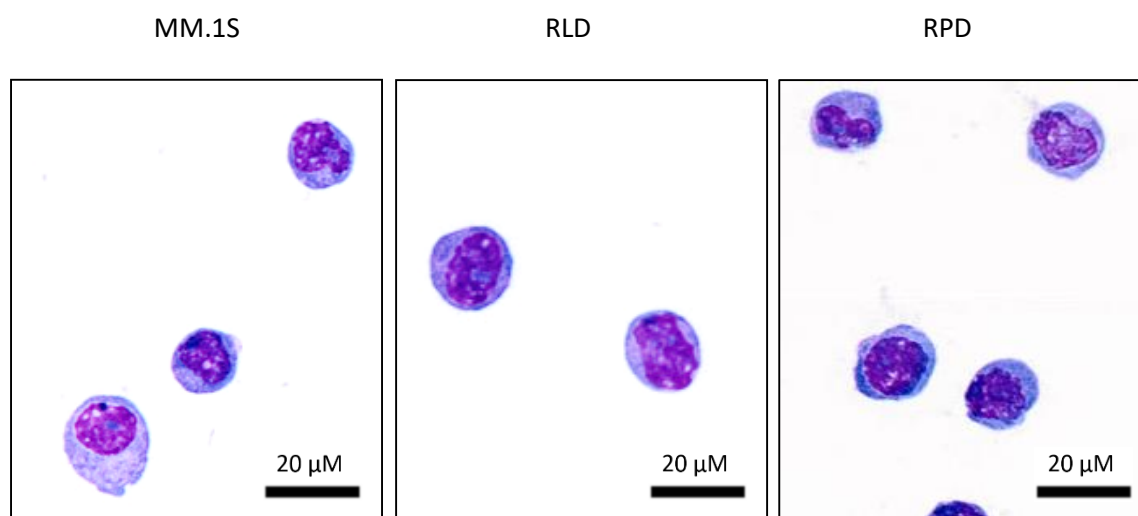


Figura 4.4. *Morfología de las células MM.1S, RLD y RPD realizado tras tinción con hematoxilina-eosina.*

Además, se llevó a cabo un análisis inmunofenotípico de marcadores de superficie celular (**Figura 4.5**). Las tres líneas celulares fueron positivas para CD38, CD56 y CD138, marcadores típicos de la célula de MM, aunque se encontraron diferencias en el marcaje de CD38. En concreto, líneas RLD y RPD presentan una población homogénea para CD38 con una expresión intermedia respecto a la de las dos poblaciones encontradas en la línea parental MM.1S.

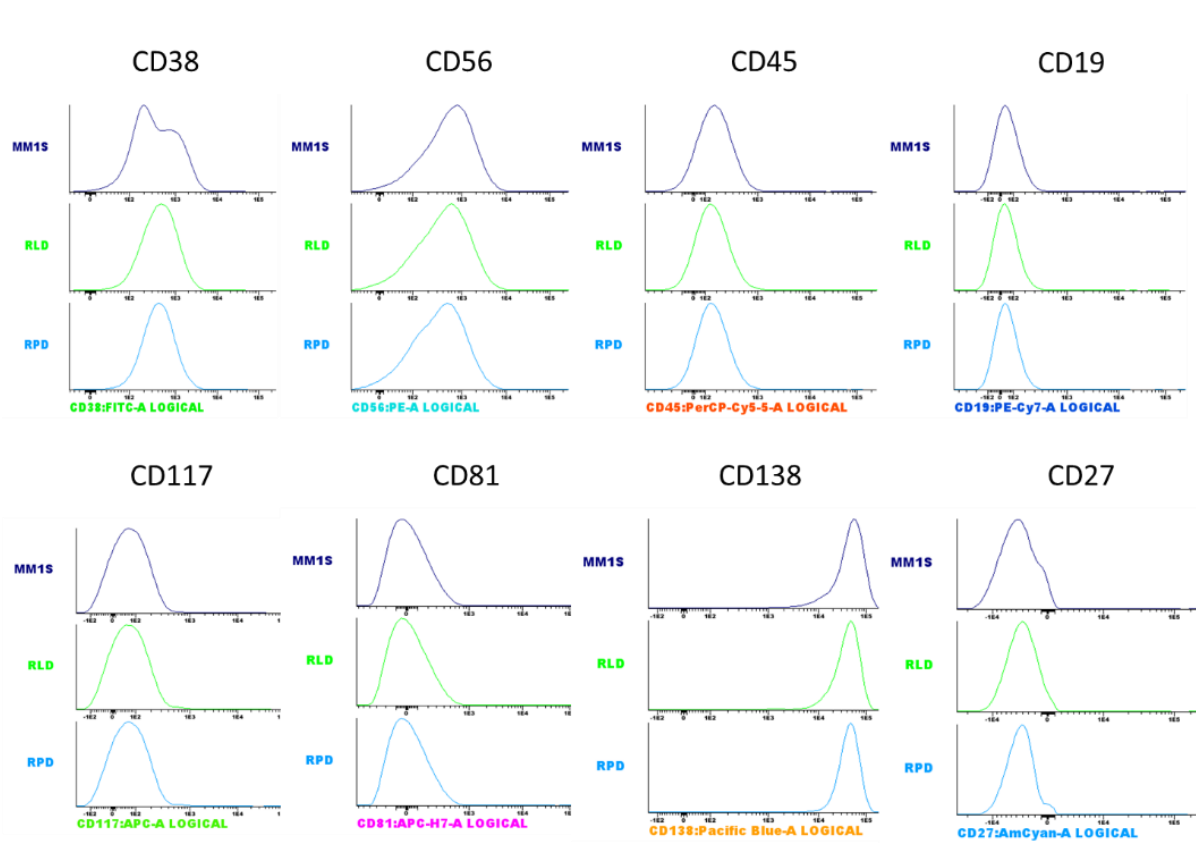


Figura 4.5. Análisis de marcadores inmunofenotípicos en las líneas MM.1S, RLD y RPD mediante citometría de flujo.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE ALTO RENDIMIENTO O *HIGH-THROUGHPUT*

1. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

Inicialmente se evaluaron mediante *CGH arrays* de Affymetrix (CytoScan-HD) las posibles variaciones en el número de copias del ADN y potenciales alteraciones genómicas entre la línea celular MM.1S y sus contrapartidas resistentes, RLD y RPD (Figura 4.6).

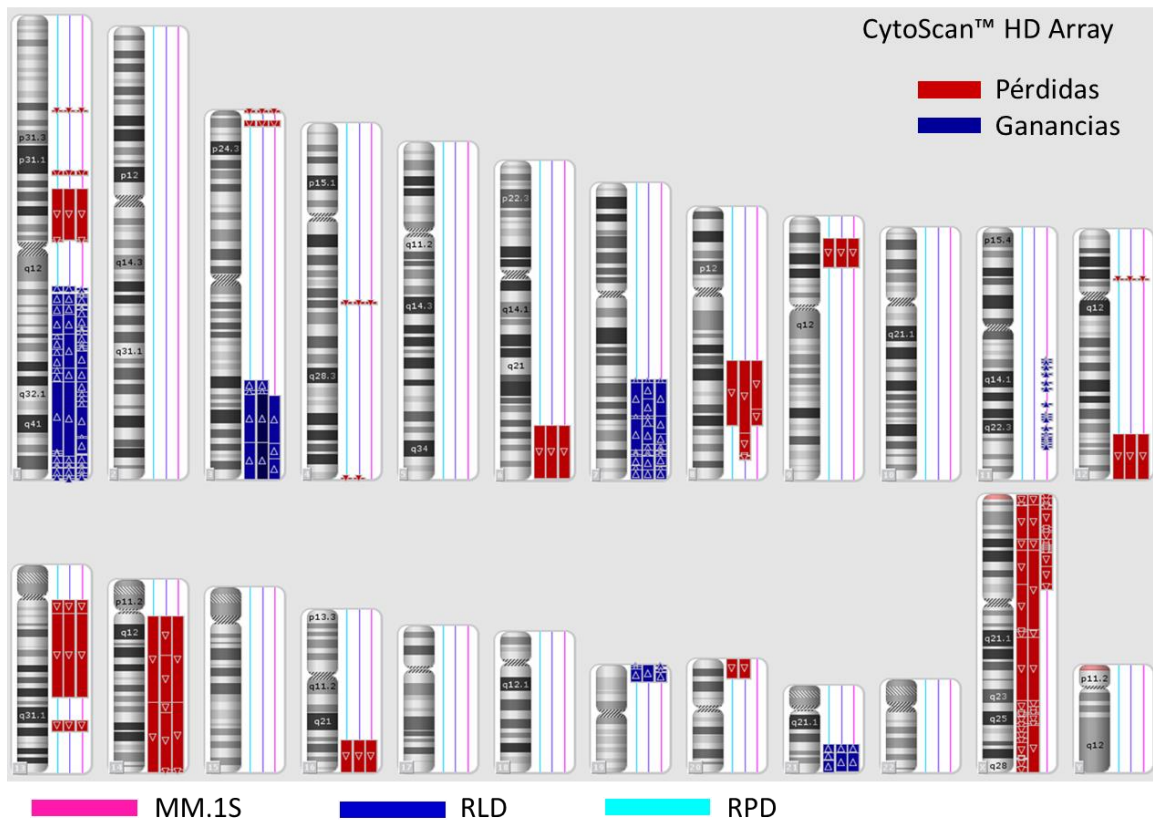


Figura 4.6. Análisis del número de copias mediante arrays genómicos (CGH-arrays).

El análisis identificó ganancias y pérdidas comunes entre las 3 líneas celulares (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Ganancias y pérdidas comunes identificadas entre las líneas MM.1S, RLD y RPD.

Ganancias comunes	Pérdidas comunes
1q21-1q44, 3q24-q29, 5q35.3, 7q22.3-7q36.3, 19p13.3, 21q22.11-q22.3	1p33, 1p21.1-p12, 2p22.2, 3p26.1, 4q21.3, 4q35.2, 5q14.3, 6p22.1, 6q24.1-q27, 8q21.13-q23.3, 9p23-p21.2, 9q33.3, 12p11.23, 12q24.11-q24.33, 13q12.21-q21.33, 13q31.3, 14q11.2-q32.3, 16p13.13, 16q22.3-q24.3, 20p11.21, 22q11.22, Xp22.33-p11.22.

Se identificaron también pérdidas comunes entre las líneas RLD y RPD que no estaban presentes en la línea MM.1S, en las regiones: 6q21, 8q24.12, 10p14, 11q13.1, 12q15, 18p11.22 y Xq11.22-q28.

Por otro lado, también encontramos alteraciones específicas de cada línea celular:

1. MM.1S

Ganancias en: 1q21.1, 11p11.12, 11q13.1-q23.3, 19p13.3.

Pérdidas en: 1p12-p11.2, 2p16.2, 2q21.1, 8q24.21.

2. RLD

Pérdidas en: 5q31.2, 9q34.3, 10p11.21, 11p13, 16q22.2, 20q11.33, Xq11.2-Xq28.

3. RPD

Pérdidas en: 1p36.21, 2q36.3-q37.3, 8q24.13, 8q24.21, 8q4.22.

2. CARACTERIZACIÓN DEL METILOMA

Se llevó a cabo una caracterización del perfil de metilación del ADN de las líneas MM.1S, RLD y RPD mediante arrays de metilación de Illumina (Infinium Methylation EPIC). El *heatmap* supervisado de las 2.794 CpGs diferencialmente metiladas ($FDR < 0,05$; $|\Delta\beta| > 0,3$) diferenció claramente 2 grupos en función de su perfil de metilación: por un lado la línea celular MM.1S y por otro las líneas resistentes RLD y RPD, que mostraron un perfil de metilación similar entre sí (**Figura 4.7**).

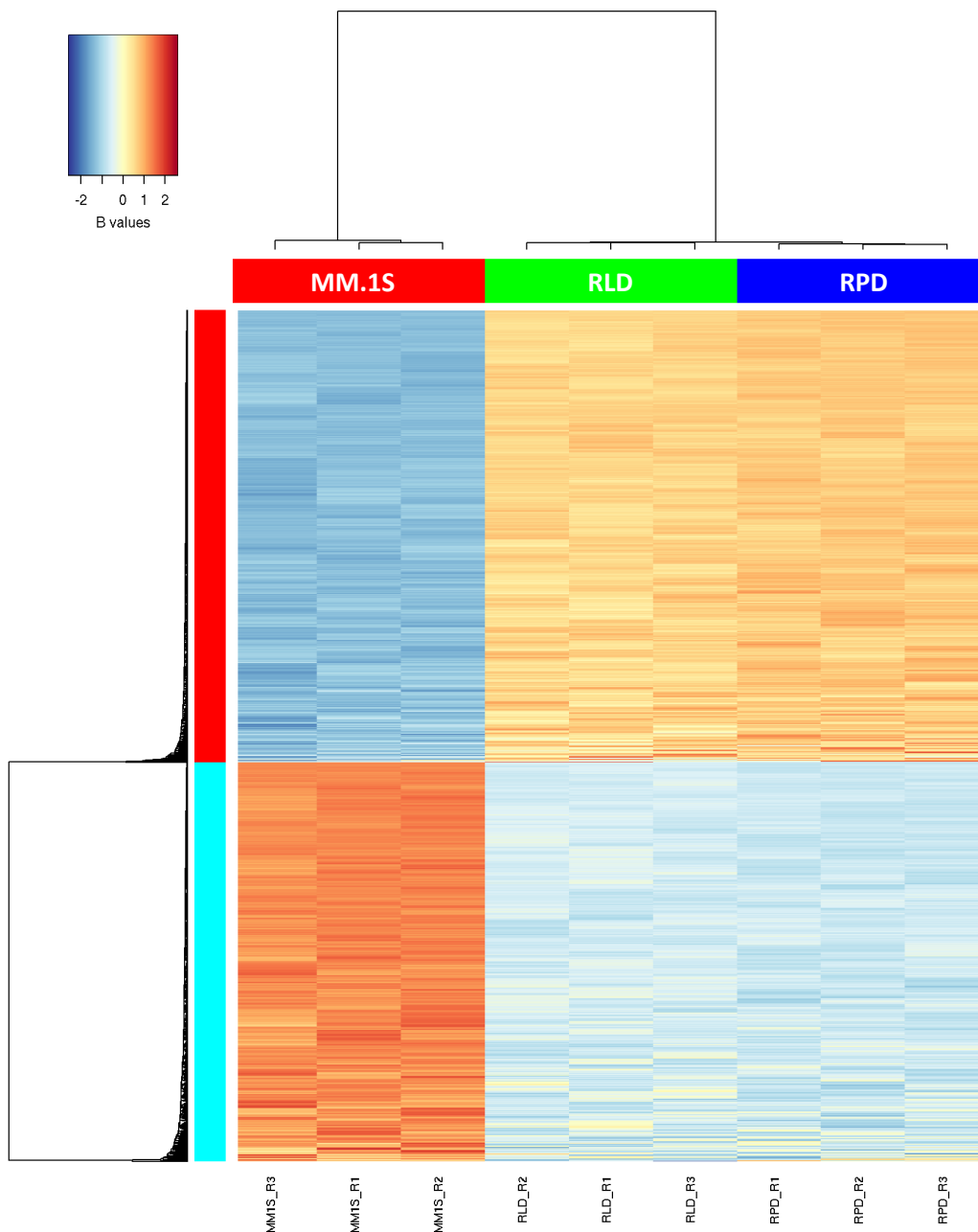


Figura 4.7. Heatmap del estado de metilación del ADN en las líneas MM.1S, RLD y RPD.

De un total de 850.000 CpGs interrogadas, el análisis estadístico reveló 1.034 y 1.415 CpGs significativamente hipermetiladas en RLD y RPD, respectivamente, con respecto a su contrapartida sensible MM.1S. Además, se identificaron 905 y 1.171 CpGs significativamente hipometiladas en RLD y RPD, respectivamente, con respecto a MM.1S. De forma interesante, se encontró un número mayor de cambios en la metilación del ADN en la línea celular RPD que en la línea RLD en comparación con la línea MM.1S, ya que se observaron 2.586 vs 1.939 CpGs con cambios en su metilación. Estas diferencias se observaron al considerar tanto la hiper como la hipometilación. Sin embargo, con los criterios estadísticos y de filtrado aplicados ($FDR < 0,05$; $|\Delta\beta| > 0,3$), no se identificaron CpGs diferencialmente metiladas al comparar las líneas RLD y RPD (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Comparativa entre RLD, RPD y MM.1S del número de CpGs significativamente hipometiladas o hipermetiladas.

Contraste	Hipermetiladas	Hipometiladas	total
MM1S-RLD	1.034	905	1.939
MM1S-RPD	1.415	1.171	2.586
RLD-RPD	0	0	0

El *array* de metilación Infinium Methylation EPIC permite identificar el estado de metilación de CpGs localizadas en el cuerpo génico y en regiones promotoras de genes a lo largo de todo el genoma. De este modo, a partir de los datos explicados anteriormente, se pudieron identificar aquellos genes diferencialmente metilados entre las líneas celulares RLD, RPD y MM.1S. Se identificaron genes significativamente hipo e hipermetilados comúnmente en las líneas RLD y RPD en comparación con la línea MM.1S. Los 3 genes de mayor *fold change* hipermetilados en las células resistentes fueron *PIWIL1*, *RIMBP2* y *STX2* (Figura 4.8). *PIWIL1* pertenece a la familia de proteínas PIWI, que juegan un papel importante en la autorenovación de células *stem* [283]. Además, estudios sugieren que determinados ARNs que interaccionan con proteínas PIWI (piARNs) están relacionados con el silenciamiento génico y la regulación de la traducción proteica [284]. Ejemplo de ello es el piARN-23, que ha sido recientemente

relacionado con la tumorigénesis en MM regulando la metilación *de novo* del ADN y la angiogénesis [285]. RIMBP2 es un regulador negativo de la actividad de fosfatasa con funciones relevantes en la transmisión sináptica [286,287] y STX2 es una proteína importante en el transporte intracelular de vesículas que ha sido relacionada con la tumorigénesis de adenocarcinoma mamario [288], hepatocarcinoma [289] y la metástasis de cáncer colorectal [290]. Además, se ha descrito que la proteína TBX5 es un ligando directo de la talidomida [291].

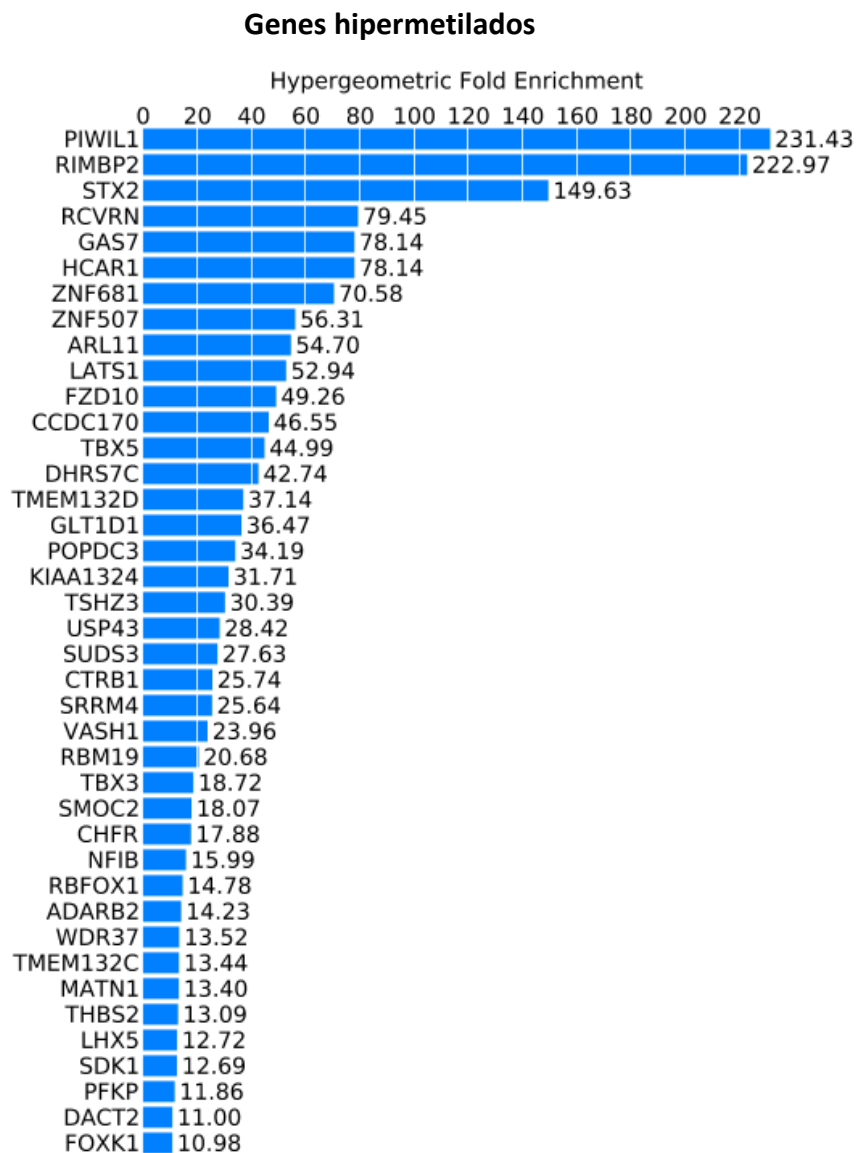


Figura 4.8. Top-40 genes hipermetilados en las células resistentes RLD y RPD en comparación con su contrapartida sensible ordenados por fold change.

A su vez, los 3 genes hipometilados con mayor *fold change* identificados en las células resistentes frente a las MM.1S fueron *SERAC1*, *SYNJ2* y *HAO1* (**Figura 4.9**). *SERAC1* juega un papel importante en el tráfico de colesterol y la función mitocondrial [292]; *SYNJ2* es una inositol-5-fosfatasa involucrada en el tráfico de membranas y en cascadas de señalización celular [293] cuya sobreexpresión se ha relacionado con la invasión celular [294,295]; y *HAO1* es una proteína con actividad oxidasa [296]. También se identificaron genes relevantes como *TNFRSF11B*, que codifica RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand*), una proteína que ejerce un rol central en la activación y desarrollo osteoclástico [297]; y *ETX1*, cuya proteína es una enzima crítica en la polimerización de Syndecan-1, el cual participa en la activación de la vía de Wnt [298].

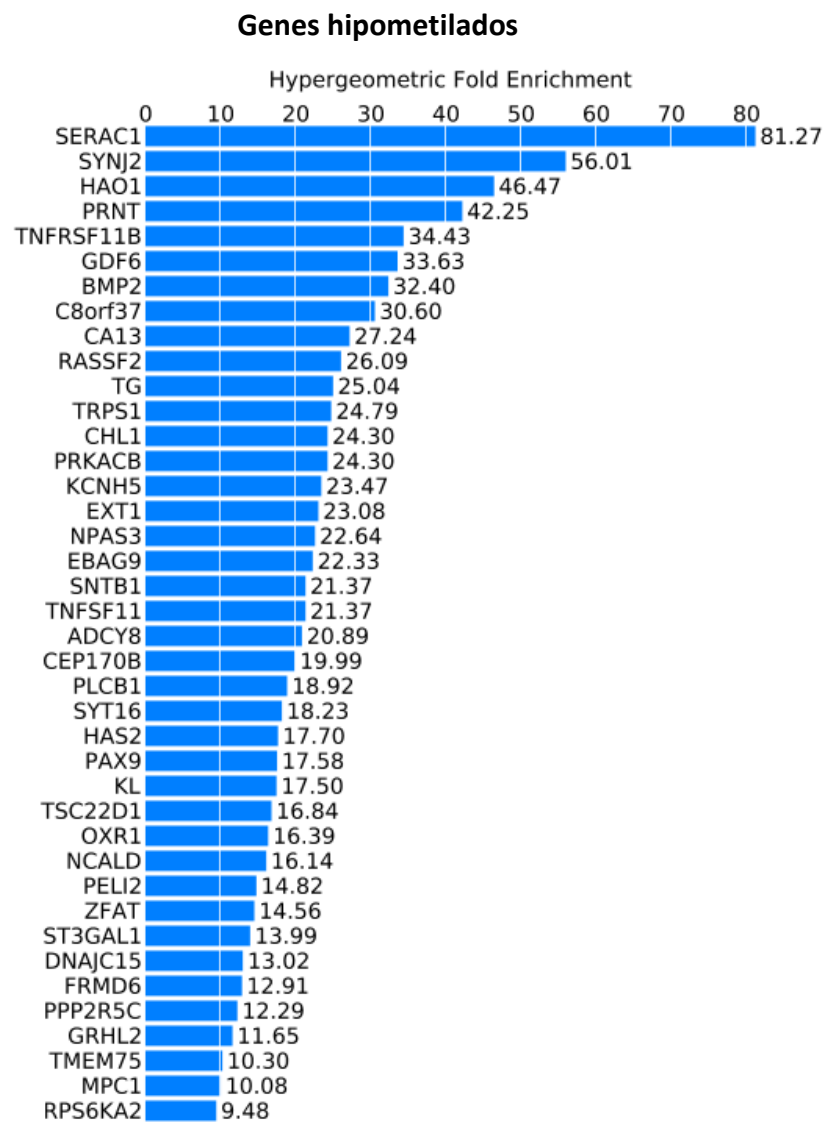


Figura 4.9. Top-40 genes hipometilados en las células resistentes ordenados por *fold change*.

Con los genes diferencialmente metilados entre las células RPD-RLD y MM.1S, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento para determinar rutas, procesos biológicos o funciones moleculares en las que pudieran estar involucrados estos genes.

Entre los procesos biológicos en los que intervendrían los genes diferencialmente hipermetilados en las células resistentes destacan procesos relacionados con el reordenamiento de la cromatina y la organización nucleosomal, procesos de silenciamiento génico, así como de regulación negativa de la actividad fosfatasa (**Figura 4.10**).

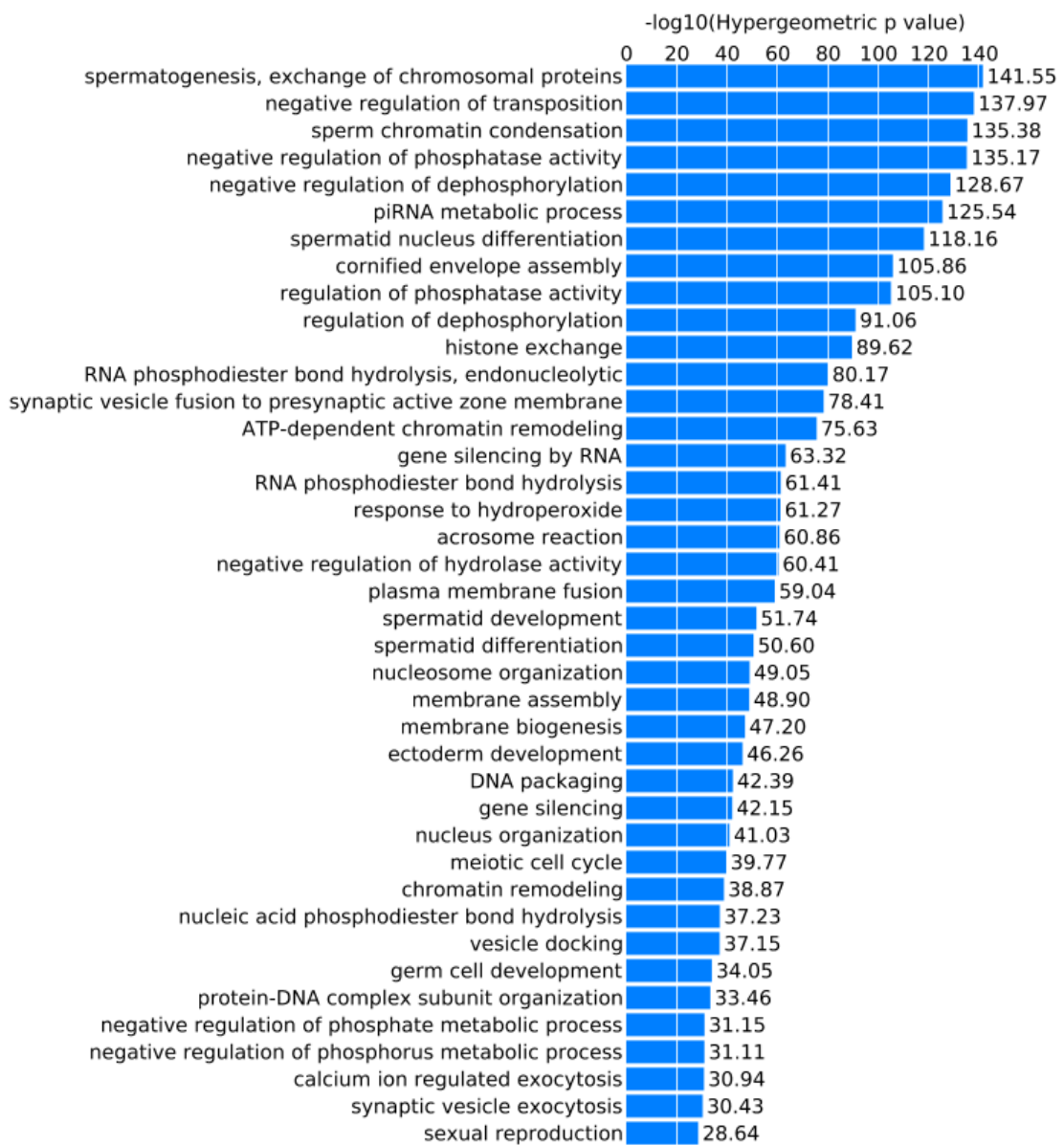


Figura 4.10. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos correspondiente a los genes identificados como hipermetilados en las células resistentes.

Entre los procesos biológicos enriquecidos en los genes identificados como diferencialmente hipometilados en las células resistentes, se encuentran los procesos de regulación de la resorción y remodelación ósea y el desarrollo osteoclástico, las vías de Wnt y MAPK, así como de la biosíntesis de glucocorticoides (**Figura 4.11**).

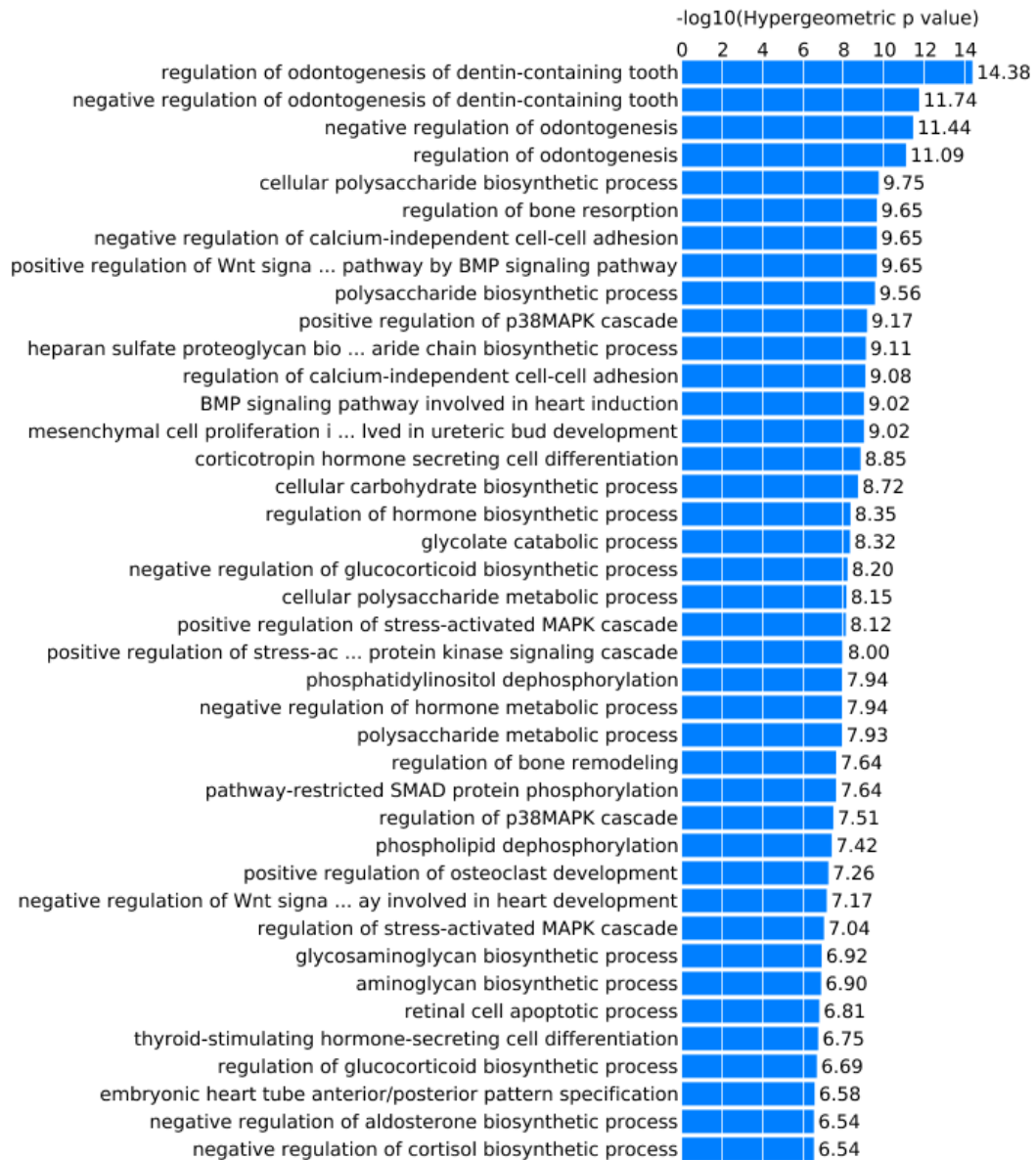


Figura 4.11. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos correspondiente a los genes identificados como hipometilados en las células resistentes.

3. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA

A continuación se evaluaron las diferencias de expresión génica entre las líneas MM.1S, RLD y RPD tanto en presencia como en ausencia de tratamiento con las combinaciones Ld o Pd mediante la utilización de *microarrays* de ARN Human Gene 2.0 ST (Affymetrix). Para las condiciones de tratamiento, la dosis utilizada de lenalidomida y pomalidomida fue de 100 nM y la dosis de dexametasona 2,5 nM, y el tiempo de tratamiento fue de 3 días. Tras aplicar los valores de filtrado (valor p-ajustado o q-valor < 0,05), únicamente se identificaron 5 genes significativamente desregulados a nivel basal (en ausencia de tratamiento) al comparar las líneas RLD y MM.1S, y 18 desregulados entre RPD y MM.1S (Tablas 4.3 y 4.4).

Tabla 4.3. Genes significativamente desregulados en RLD vs MM.1S. En rojo: genes sobreexpresados.

Gen	Score	Fold Change	q-valor(%)
CDR1	4,665	2,216	0
GAS7	4,235	2,269	0
PLOD2	4,131	1,564	0
RND3	3,785	1,528	0
AFAP1-AS1	3,781	2,211	0

Tabla 4.4. Genes significativamente desregulados entre RPD y MM.1S. En rojo: genes sobreexpresados. En verde: genes infraexpresados.

Gen	Score	Fold Change	q-valor(%)
Y_RNA	16,214	13,746	0
LOC105377324	8,789	17,91	0
GAS7	6,713	2,676	0
TMEM52	5,5	1,979	0
AFAP1-AS1	5,244	3,074	0
CDR1	4,644	2,946	3,952

Gen	Score	Fold Change	q-valor(%)
<i>XIST</i>	-13,108	0,024	0
<i>LAMP5</i>	-6,65	0,356	0
<i>SLX4IP</i>	-6,11	0,409	0
<i>HSA-miR-3622B</i>	-5,941	0,386	0
<i>DDIT4</i>	-5,702	0,386	0
<i>IL2RG</i>	-5,514	0,348	0
<i>NAXD</i>	-5,227	0,499	0
<i>TCN2</i>	-5,174	0,614	0
<i>RNU6-1227P</i>	-4,839	0,409	0
<i>ASS1</i>	-4,65	0,468	2,906
<i>TBC1D20</i>	-4,546	0,471	2,906
<i>ERI2</i>	-4,484	0,526	2,906

Además, identificamos 1.876 genes desregulados en MM.1S por acción de Pd y 1.016 genes desregulados por Ld, siendo 873 comunes entre ellos (q-valor < 0,05). De los 1.876 genes desregulados por Pd, 1.017 se encontraban infraexpresados y 923 sobreexpresados. De los 1.016 genes desregulados por Ld, 682 estaban infraexpresados y 357 sobreexpresados. Sin embargo, tan sólo encontramos 25 genes desregulados en RLD por acción de Ld, y 7 desregulados en RPD bajo tratamiento con Pd, ninguno de ellos en común (**Figura 4.12**).

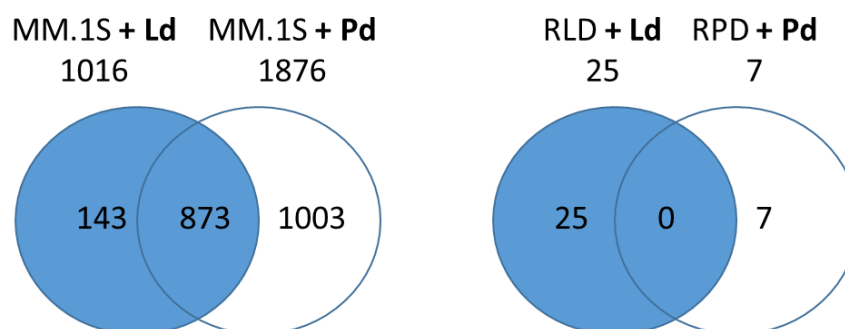


Figura 4.12. Número de genes significativamente desregulados en MM.1S, RLD y RPD por acción de las combinaciones de lenalidomida y dexametasona (Ld) o pomalidomida y dexametasona (Pd).

El análisis de enriquecimiento de rutas de los genes desregulados tras el tratamiento de la línea MM.1S con Ld (Figura 4.13 A) o Pd (Figura 4.13 B) identificó prácticamente los mismos procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares en ambos casos.

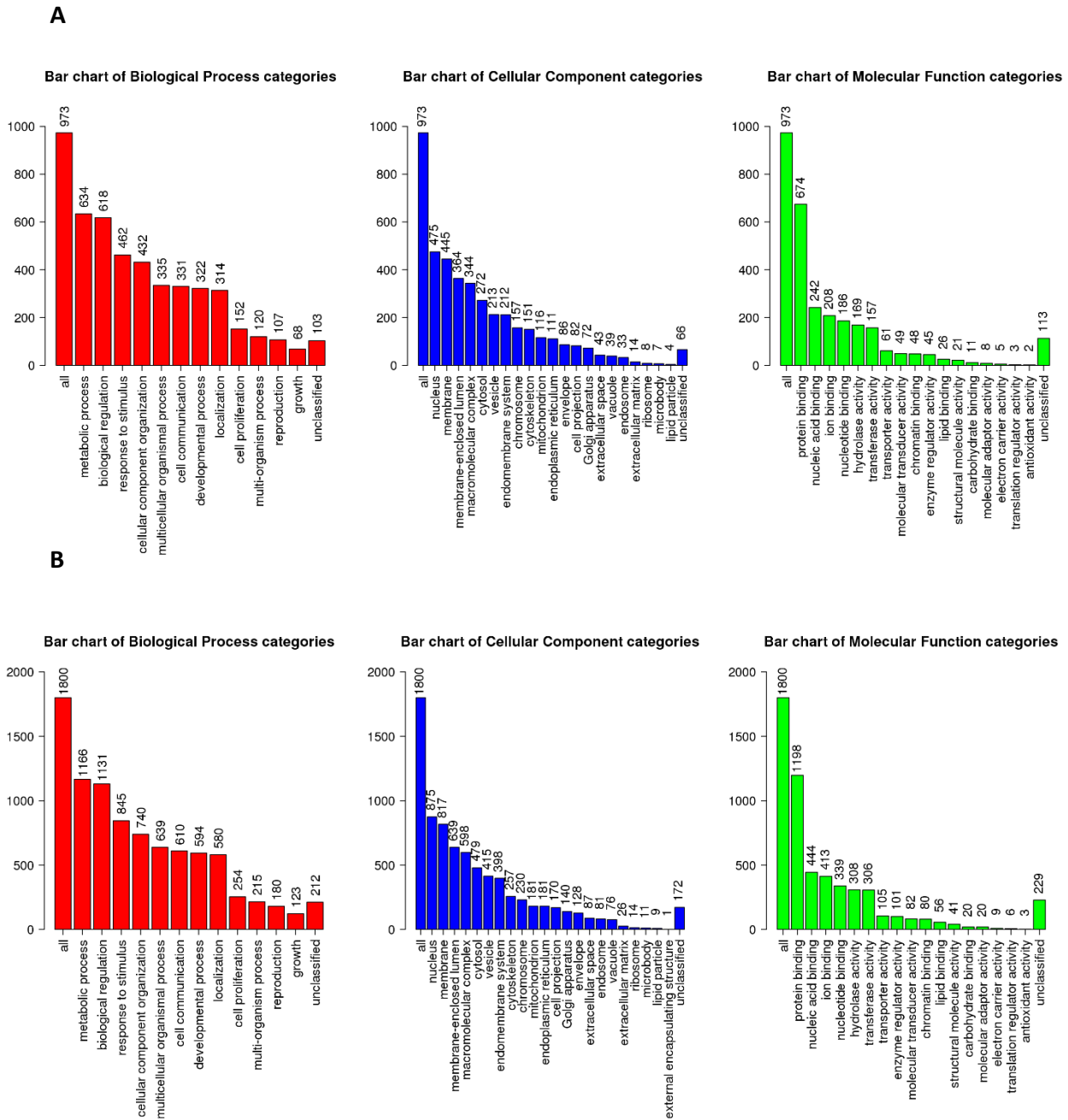


Figura 4.13. Análisis de enriquecimiento de rutas mostrando los procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares desreguladas por acción de Ld (A) y Pd (B) en la línea celular sensible MM.1S.

Para identificar aquellos genes que podrían desregularse en presencia del fármaco para inducir resistencias, se analizaron aquellos genes desregulados en las células resistentes en presencia de fármaco, que no se desregulaban en las células sensibles. Tan sólo se encontró un gen, *CRYGEP* (*Crystallin, Gamma E, Pseudogene*), con función desconocida, desregulado en RPD+Pd y no en MM.1S+Pd. Sin embargo, identificamos 13 genes desregulados en RLD+Ld y no en MM.1S+Ld, todos ellos infraexpresados (**Tabla 4.5**).

Tabla 4.5. Genes desregulados por Ld en RLD y no en MM.1S.

GEN	FUNCIÓN
<i>USP3</i>	Ubiquitinasa de H2A y H2B. Respuesta al daño al ADN
<i>TMTC1</i>	Proteína involucrada en la homeostasis de calcio
<i>TMEM154</i>	Proteína transmembrana
<i>SERPINE2</i>	Inhibidor de serina proteasas, e inhibidor de proteólisis
<i>POLR3C</i>	Polimerasa, cataliza la transcripción de ADN a ARN
<i>MORC4</i>	Antígeno tumoral en MM y cáncer de testis
<i>LRP12</i>	Receptor de LDL. Hipermetilado en MM alto riesgo
<i>LIPH</i>	Cataliza la producción de ácido 2-acil lisofosfatídico. Estimula la progresión de ciclo celular
<i>FUT10</i>	Fucosiltransferasa, importante en procesos de glucosilación
<i>FCHO1</i>	Participa en procesos como la endocitosis mediada por clatrina y señalización por BMP
<i>CDS1</i>	Diacilglicerol sintasa. Respuesta a citoquinas
<i>CDR1</i>	Proteína asociada a la resistencia a fármacos
<i>AOC3</i>	Amina oxidasa 3. Interacciona con fucosil transferasas y participa en procesos de adhesión

4. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE miARNs EN LAS LÍNEAS RLD Y RPD

Siguiendo con la caracterización de los modelos de resistencia, nos propusimos identificar aquellos miARNs que pudieran estar desregulados en las células resistentes frente a la línea parental, utilizando los *arrays* de miARNs *GeneChip miARN 4.0* de Affymetrix. Un análisis no supervisado basado en MDS (*Multidimensional Scaling*) de los perfiles de miARNs reveló que existía una agrupación clara de cada tipo celular atendiendo a su expresión de miARNs (**Figura 4.14**).

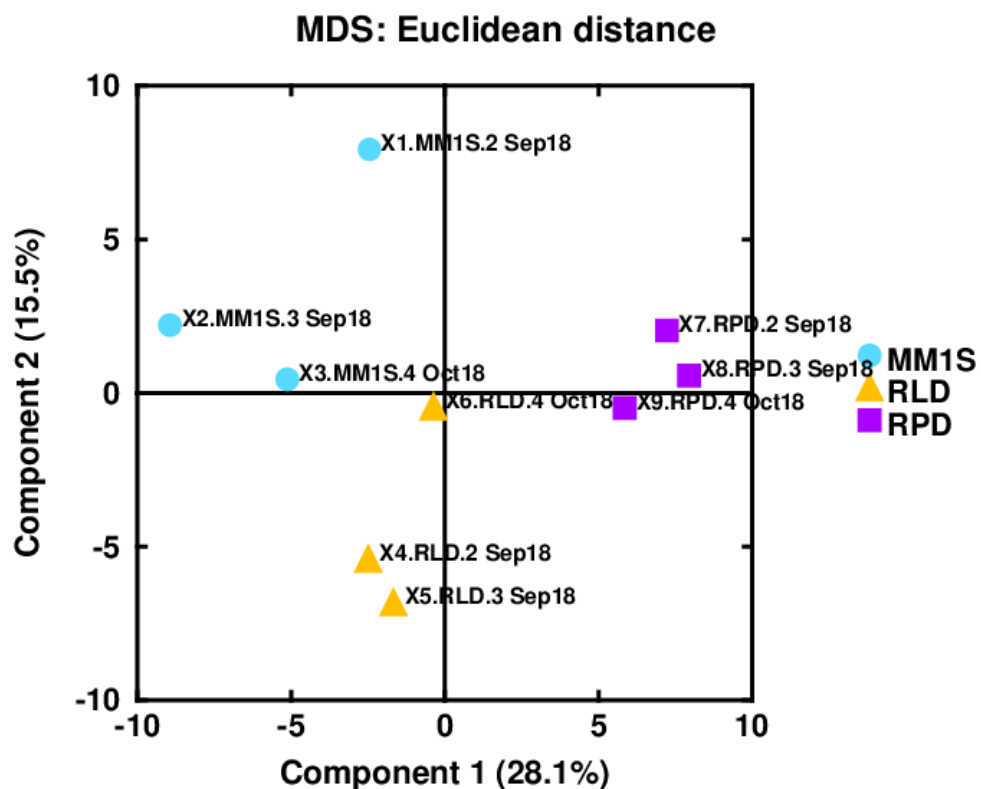


Figura 4.14. Distancia euclidiana de los triplicados de las muestras MM.1S, RLD y RPD en función de su expresión de miARNs, para los dos principales componentes de variabilidad en las muestras.

La identificación de aquellos miARN desregulados se llevó a cabo utilizando el método SAM (*Significance Analysis of Microarray*) y un q-valor o p-valor ajustado $< 0,05$.

Tomando como referencia la línea celular MM.1S, se encontraron 4 miARNs desregulados en RLD y 31 en RPD (Figura 4.15, tablas 4.6 y 4.7), siendo 2 de ellos comunes (miR-34a-5p y miR-30a-5p).

miRNAs desregulados en RLD y RPD vs MM.1S



Figura 4.15. Número de miARNs desregulados en RLD y RPD frente a la línea celular sensible MM.1S.

Tabla 4.6. miARNs significativamente desregulados en RLD vs MM.1S. En rojo: miARNs sobreexpresados.

miARN	Fold Change	q-valor (%)
hsa-miR-34a-5p	2,406060635	0
hsa-miR-200c-3p	1,960592895	0
hsa-miR-30a-5p	1,56871398	0
hsa-miR-551b-3p	2,980996469	0

Tabla 4.7. miARNs significativamente desregulados en RPD vs MM.1S. En rojo: miARNs sobreexpresados. En verde: miARNs infraexpresados.

miARN	Fold Change	q-valor (%)
hsa-miR-148b-3p	2,13292849	0
hsa-miR-34a-5p	2,42657262	0
hsa-miR-1246	5,11464733	0
hsa-miR-29b-3p	3,22345163	0
hsa-miR-4492	2,24275739	0
hsa-miR-551b-3p	4,18900866	0
hsa-miR-1908-5p	1,69925716	0
hsa-miR-6816-5p	1,82357466	0
hsa-miR-1231	1,9760839	0
hsa-miR-6126	1,68977036	0
hsa-miR-29c-3p	2,62680905	0
hsa-miR-454-3p	2,48825544	0
hsa-miR-301a-3p	2,37154208	0

miARN	Fold Change	q-valor (%)
hsa-miR-8072	1,77390277	0
hsa-miR-3189-5p	1,29175536	0
hsa-miR-210-3p	0,13796219	0
hsa-miR-331-3p	2,26797379	2,05197828
hsa-miR-6511a-3p	1,30785494	2,05197828
hsa-miR-1237-5p	1,67223897	2,05197828
hsa-miR-361-5p	0,65607285	2,05197828
hsa-miR-3121-3p	1,34383986	3,15688966
hsa-miR-128-3p	1,59018641	3,15688966
hsa-miR-183-5p	1,4139711	3,15688966
hsa-miR-29b-1-5p	1,91533361	3,15688966
hsa-miR-628-3p	1,82561097	3,15688966
hsa-miR-5787	1,39942542	3,15688966
hsa-let-7f-5p	1,73321925	3,15688966
hsa-miR-3135b	1,89834122	3,15688966
hsa-miR-1973	1,80738209	3,15688966
hsa-miR-4488	1,61518032	3,15688966
hsa-miR-3198	1,25379383	3,15688966

Posteriormente, se confirmó mediante RT-qPCR la sobreexpresión de los dos miARNs comúnmente sobreexpresados en las líneas resistentes respecto de MM.1S (**Figura 4.16**). Entre las dianas predichas del miR-34a-5p se encuentran reguladores de la proliferación, supervivencia y resistencia celular. Diversos estudios han señalado a este miARN como un posible supresor tumoral, ya que su expresión es menor en tejidos tumorales que en tejidos sanos y, además, la expresión ectópica de este miARN en células que expresan una versión alterada de la proteína p53 ha mostrado efectos antitumorales [299–301]. En MM también se ha sugerido su posible papel como supresor tumoral controlando el ciclo celular, la diferenciación y apoptosis [302]. Sin embargo, otros estudios también señalan que la expresión de miR-34a-5p podría inducir la expresión de STAT3 [303] e incluso sugieren que su papel pro o antitumoral podría depender del contexto [304]. Por otro lado, se ha determinado que la expresión del miR-30a-5p está desregulada en distintos tipos de cáncer, y ha sido descrito como un supresor tumoral que modula la transición epitelio-mesénquima en tumores del pulmón, colorectal y gástrico [305].

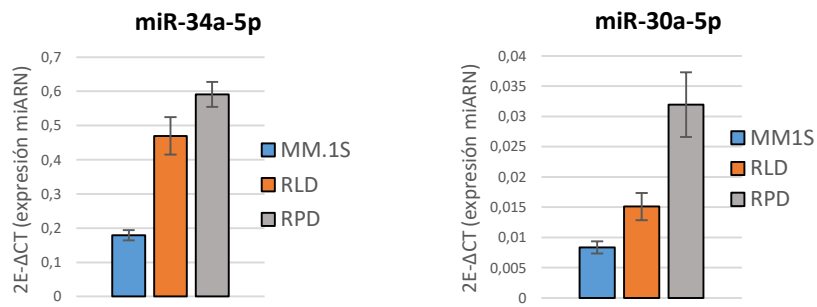


Figura 4.16. Confirmación de la sobreexpresión del miR-34a-5p y miR-30a-5p en células resistentes a Ld y Pd mediante RT-qPCR.

5. CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA

Posteriormente quisimos identificar qué proteínas podrían estar desreguladas tanto a nivel basal como por acción de Ld o Pd en las líneas MM.1S, RLD y RPD. Esta caracterización proteómica se realizó mediante *arrays* de anticuerpos (**Figura 4.17**) producidos internamente, y permitió la identificación de 39 proteínas infraexpresadas en RLD y 27 infraexpresadas en RPD respecto a MM.1S, siendo 14 de ellas comunes entre sí (**Tabla 4.8**). Entre las proteínas comúnmente infraexpresadas en RLD y RPD destacan CRBN, principal ligando de los IMiDs; las oncoproteínas Jun/Fos; el factor de transcripción E2F1; los reguladores del ciclo celular P-ATR/P-CHK2; y el supresor tumoral p27.

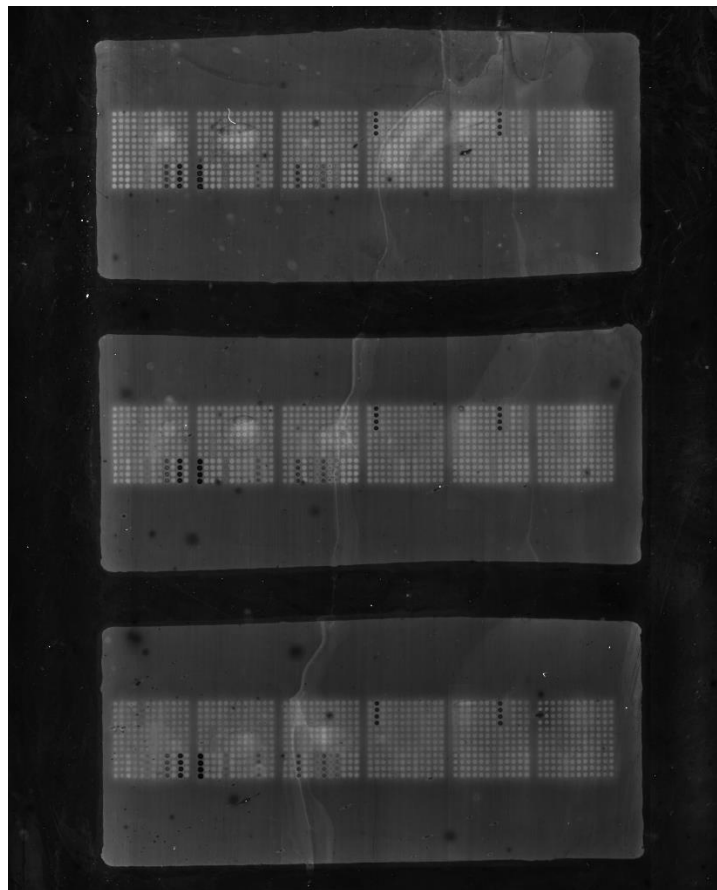


Figura 4.17. *Array de anticuerpos. Cada punto corresponde a la expresión de una proteína.*

Tabla 4.8. Proteínas significativa y comúnmente infraexpresadas en las líneas RLD y RPD frente a la línea celular MM.1S (p-valor < 0,05).

PROTEÍNAS INFRAEXPRESADAS
ABCR
C-EBP α
C-JUN
CRBN
CXCR4
E2F1
FOSB
JUNB
P27KIP1
P-ATR (S428)
P-CHK2 (T68)
PIM1
P-S6 (S235/236)
SOD2

En cuanto a las proteínas infraexpresadas de forma exclusiva en RLD, identificamos la proteína antiapoptótica Mcl-1 y la proapoptótica Bax, y otras como IKAROS y NF κ B p50/p52. Respecto a las proteínas infraexpresadas exclusivamente en RPD, también encontramos desregulada una proteína antiapoptótica, en este caso Bcl-2, y la proapoptótica NOXA (**Tabla 4.9**).

Tabla 4.9. Proteínas infraexpresadas de forma exclusiva en RLD o RPD con respecto a la línea celular MM.1S.

RLD vs MM.1S	RPD vs MM.1S
4EBP1	HALO
ABL	Bcl-2
Jun	Caspasa 12
HLA-DR	CD19
Bax	p-CHK1 (S345)
BIP	p-P53 (S15)
Caspasa 2	PU1
Caspasa 9	IL-8
CDC2	AMPKa
HSP40	CyclinD3
HSP70	Citocromo C
IKAROS	NOXA
Mcl1	Rb
NFKB1 P105/P50	
NFKB2 P100/P52	
NUCLEOLIN	
p-4EBP1	
p-AKT (T308)	
p-B-CATENIN (T41/S45)	
p-CDC2	
p-CKIT	
p-IKAPPA-B(S32)	
p-P38	
p-RB (S807/811)	
S6	

6. CARACTERIZACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA APARICIÓN DE RESISTENCIAS Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DESTINADAS A VENCERLAS

Se evaluó la expresión individualizada de proteínas pertenecientes a determinadas vías de señalización dado su relevancia en la proliferación o supervivencia de la célula mielomatososa y en los procesos apoptóticos o de muerte celular, así como de proteínas pertenecientes a otras vías para las que existen inhibidores específicos que se han evaluado en MM.

A) VÍA MAPK

La vía de las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) es una ruta de señalización con un papel crucial en la regulación de la expresión génica, el crecimiento celular y la supervivencia. Alteraciones en esta vía han sido relacionadas con la proliferación celular descontrolada, así como la resistencia a la apoptosis [306] e incluso la resistencia a fármacos en MM [215].

En primer lugar, se evaluó mediante Western blot el nivel de expresión de proteínas de la vía de las MAPKs. Se observó una mayor activación de esta vía en condiciones basales en las células resistentes RLD y RPD, reflejada por un aumento de p-ERK 1/2. Asimismo, se observó un aumento de la forma fosforilada de MEK 1/2 (p-MEK 1/2), fundamentalmente en las células RLD, mientras que no hubo cambios significativos en p-c-Raf. Además, mientras que el tratamiento con Ld y Pd indujo una evidente inhibición de esta vía en la línea celular sensible MM.1S, este efecto fue mucho menor en las células resistentes tratadas con las respectivas combinaciones (**Figura 4.18**).

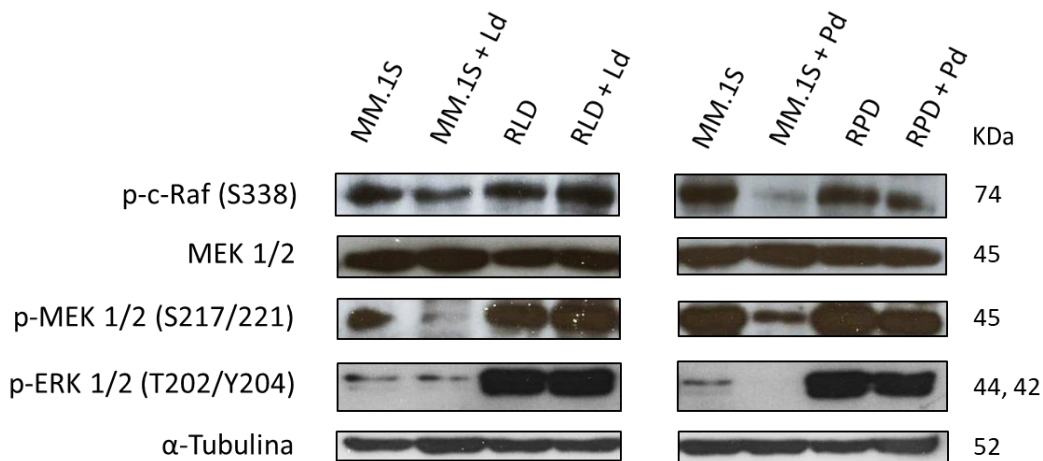


Figura 4.18. Análisis de expresión proteica de moléculas de la vía MAPK por Western blot. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en cuanto a la expresión de estas proteínas entre los modelos de resistencia a IMiDs y las células sensibles, quisimos comprobar si la inhibición de la vía MAPK podría revertir la resistencia de las células RLD y RPD.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la adición de selumetinib (Selleckchem), un inhibidor de MEK 1/2, a las combinaciones de Ld y Pd (**Figura 4.19**). Se observó una reducción en la viabilidad celular de la línea MM.1S de aproximadamente un 50% bajo tratamiento con selumetinib en monoterapia. La viabilidad de la línea celular RLD bajo tratamiento con 10 nM de selumetinib fue de 64,9%, mientras que combinado con Ld la viabilidad se redujo a un 20,49%.

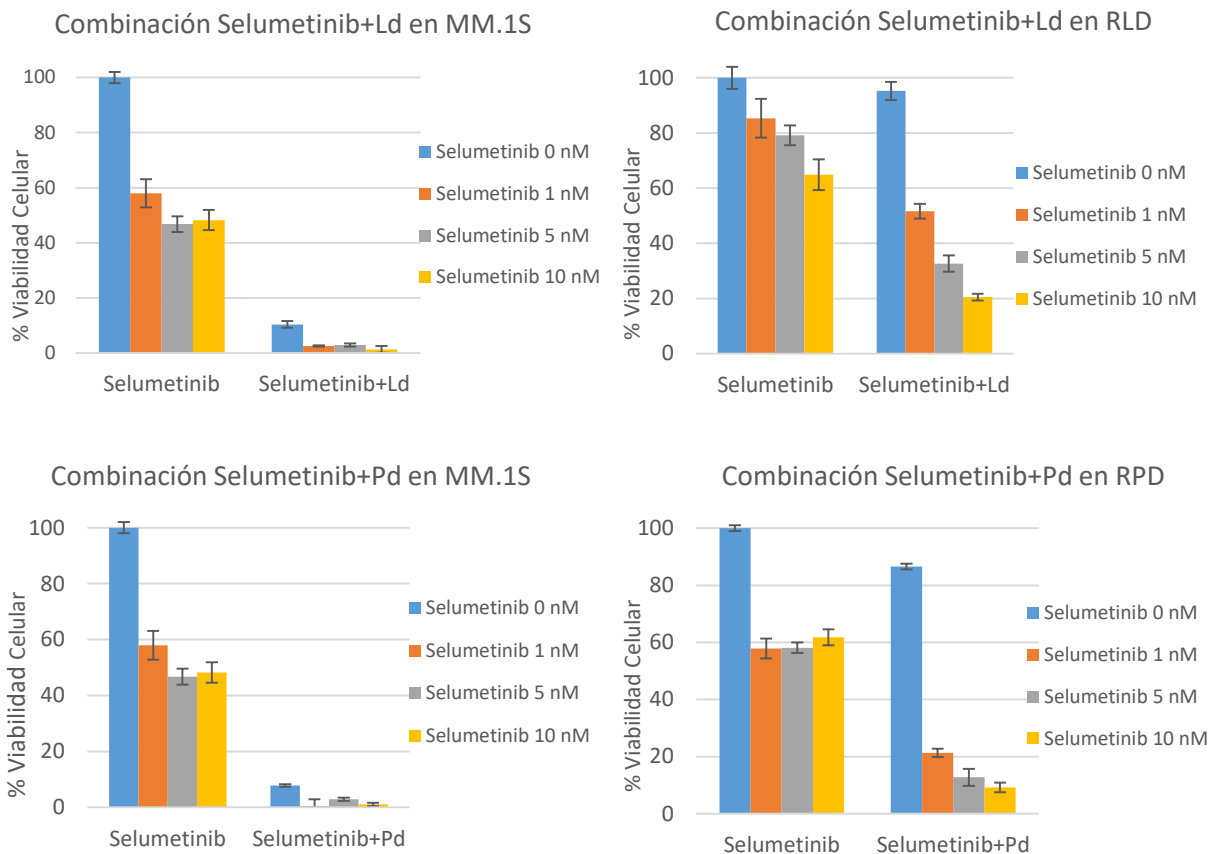


Figura 4.19. Análisis de viabilidad celular mediante ensayo MTT utilizando el inhibidor de MEK 1/2 selumetinib sólo y en combinación con Ld o Pd. L: lenalidomida. d: dexametasona. P: pomalidomida. Dosis de L y P: 1 μ M. Dosis de d: 5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

De forma similar, la viabilidad de la línea celular RPD se redujo de un 61,8% a un 9,2% bajo la condición de tratamiento con 10 nM de selumetinib en monoterapia o combinado con Pd, respectivamente.

Considerando estos resultados, se evaluó el efecto de la sobreexpresión transitoria de MEK1 en la sensibilidad de la línea celular MM.1S a las combinaciones de Ld y Pd. Para ello, se transfectaron las células MM.1S con un plásmido que codifica una versión de MEK1 activa (pCScherryActMEK) gracias a las mutaciones Ser217Glu y Ser221Asp, que inducen un incremento de 20X en la activación de ERK1/2 [307]. Se obtuvo una eficiencia de transfección elevada (**Figura 4.20 A**). Además, las células transfectadas con la variante activa de MEK1 mostraron mayor expresión de p-MEK 1/2 y p-ERK 1/2 (**Figura 4.20 B**), y mayor resistencia a las combinaciones Ld y Pd (**Figura 4.20 C**).

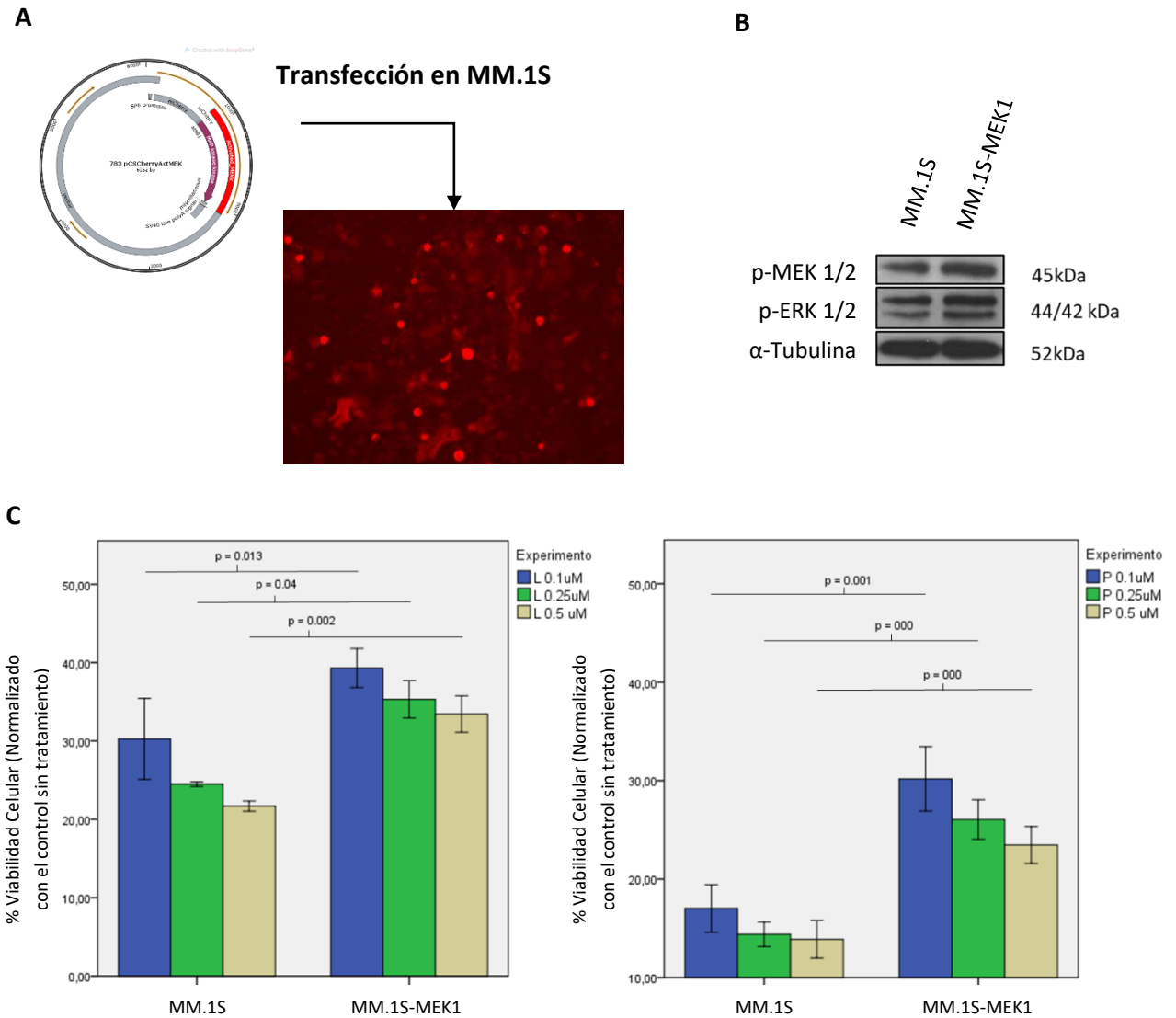


Figura 4.20. Efecto de la sobreexpresión transitoria de MEK1 en la sensibilidad de la línea celular MM.1S a las combinaciones de Ld y Pd. A: ensayo de sobreexpresión transitoria mediante nucleofección. Se muestra en rojo la expresión de la proteína Cherry, reflejo de la eficiencia obtenida en la transfección. B: análisis de la expresión p-MEK 1/2 y p-ERK 1/2 en células control y células MM.1S-MEK1. C: análisis comparativo de sensibilidad a las combinaciones Ld y Pd en células control y células MM.1S-MEK1 por ensayos de MTT. Se muestra el resultado del porcentaje de viabilidad celular normalizado con respecto al control sin tratamiento (100%). MM.1S-MEK1: células nucleofectadas con un plásmido codificante de MEK1 activado (pCScherryActMEK). Tiempo de tratamiento: 5 días. Dosis de dexametasona: 2,5 nM.

B) PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2

La familia de proteínas de Bcl-2 tiene un papel importante en la regulación de la apoptosis vía intrínseca. Los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 incluyen a Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1/A1. Estas proteínas evitan la muerte celular mediante la unión y secuestro de las proteínas proapoptóticas, entre las que se encuentran Bax, Bak, Bik, Bid, Bim, Puma/BBC3 y Noxa/APR. La ratio de ambas determina la susceptibilidad de la célula a determinadas señales de muerte celular [131]. Estudios previos han relacionado la expresión de Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 directamente con la supervivencia de la célula de MM y la resistencia a fármacos [139,140]. Además, la expresión de Bcl-xL también se asocia con resistencia a fármacos en pacientes de MM [141,142].

Considerando la relevancia de la expresión de proteínas de la familia de Bcl-2, se analizó mediante Western blot la expresión de diferentes proteínas pro/antiapoptóticas de esta familia. Así se observó que las células MM.1S tratadas con Ld o Pd expresan menos Bid y más Bim (**Figura 4.21**). En segundo lugar, las células resistentes expresan mayor cantidad de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Mcl-1 o Bcl-xL). Además, la expresión de Bcl-2 y Mcl-1 es más alta en células RPD tratadas con Pd (**Figura 4.22**).

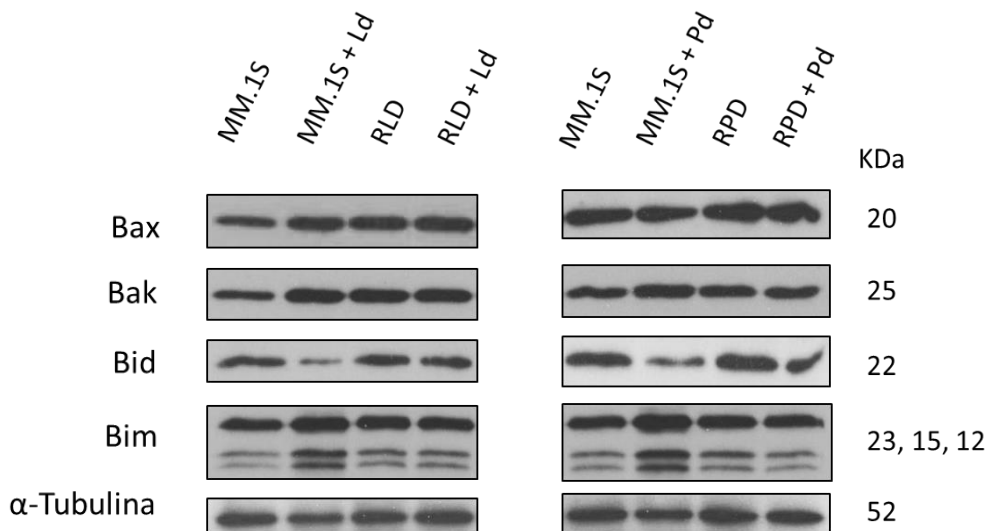


Figura 4.21. Expresión de las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

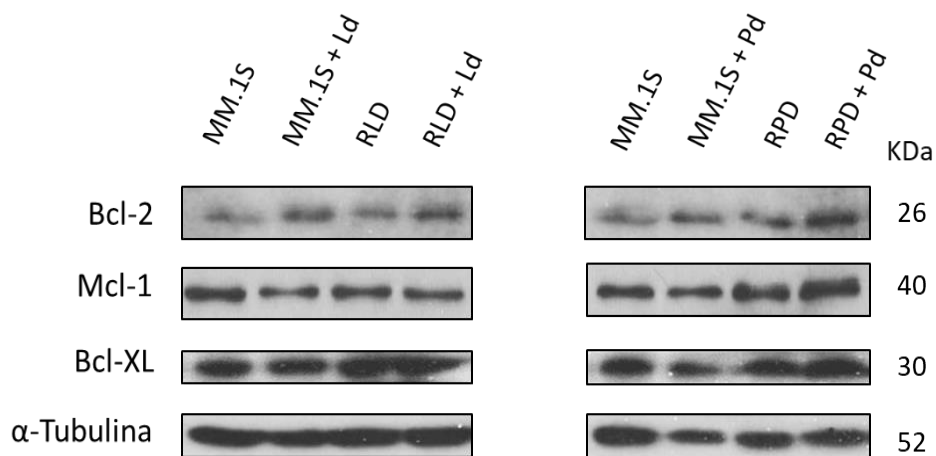


Figura 4.22. Expresión de las proteínas antiapoptóticas de la familia de BCL-2. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

Dadas las diferencias de expresión de proteínas de la familia de Bcl-2 entre las células resistentes RLD y RPD y su contrapartida sensible MM.1S, nos propusimos evaluar el efecto del inhibidor de Mcl-1 S63845 y de Bcl-2 venetoclax en las tres líneas celulares. Los estudios de viabilidad celular mostraron que las líneas resistentes son ligeramente más sensibles a S63845 (**Figura 4.23 A**) y venetoclax (**Figura 4.23 B**), lo que podría indicar una mayor dependencia de las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2.

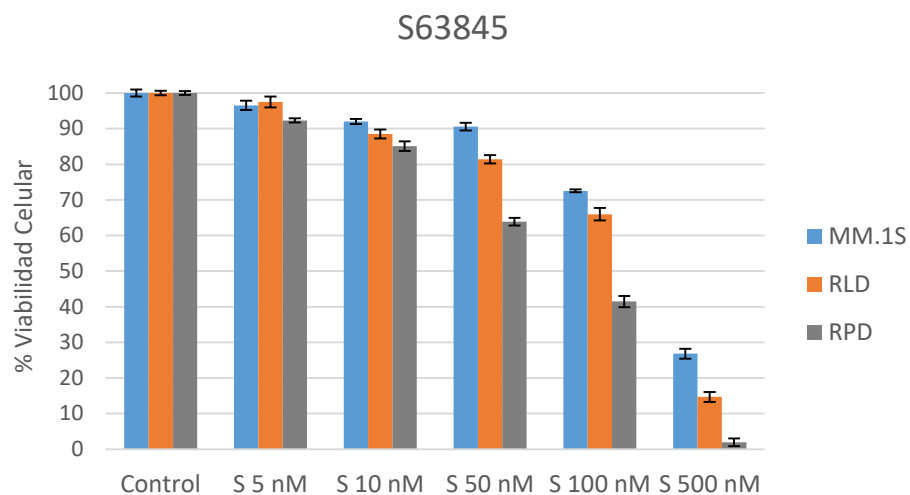
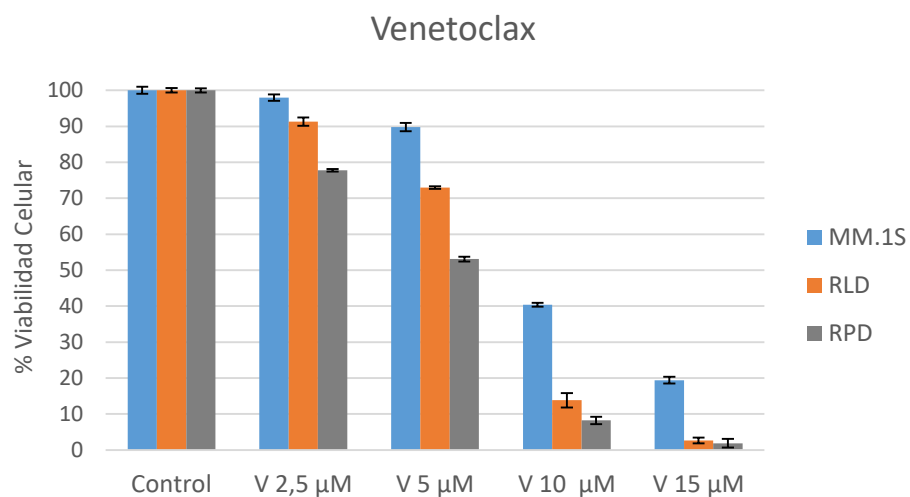
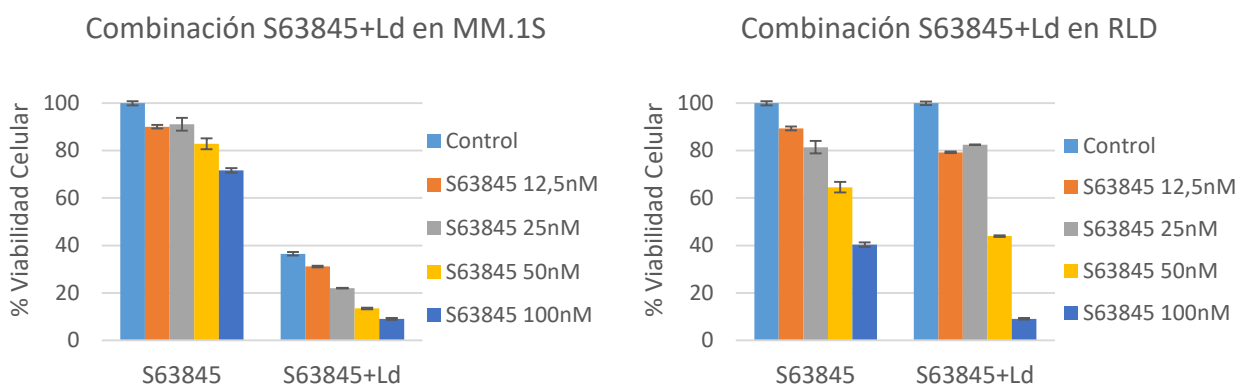
A**B**

Figura 4.23. Análisis de viabilidad de las líneas MM.1S, RLD y RPD en presencia de S63845 (A) y venetoclax (B). S: S63845. V: venetoclax. Tiempo de tratamiento: 3 días.

Se evaluó también el efecto de la adición de S63845 al tratamiento con Ld o Pd en las tres líneas celulares y se observó una reversión parcial de la resistencia a Ld (**Figura 4.24 A**) y Pd (**Figura 4.24 B**) con las concentraciones de 50 y 100 nM de S63845. Sin embargo, esta reversión parcial de la resistencia no se observó al adicionar venetoclax al tratamiento con Ld o Pd.

A



B

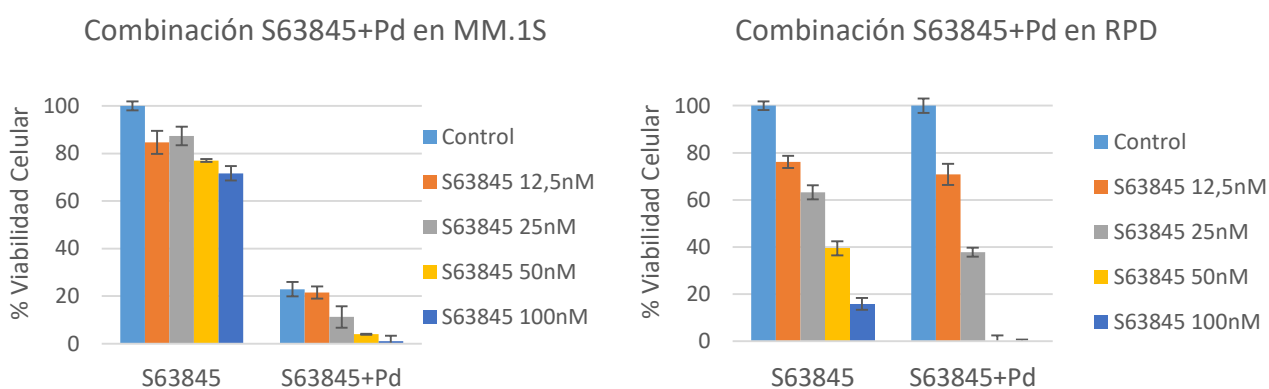


Figura 4.24. Análisis de viabilidad de las líneas MM.1S, RLD y RPD en presencia de S63845 y Ld (A) o Pd (B). P: pomalidomida L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de Lenalidomida y Pomalidomida: 1 μ M. Dosis de Dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

C) PIM QUINASAS

Las PIM quinasas una familia de serina/treonina quinasas que consta de 3 miembros (PIM1, PIM2 y PIM3) y regula procesos como la oncogénesis, la supervivencia y migración celular, así como la resistencia a fármacos, entre otros [308]. Varias características hacen que la inhibición de PIM sea una estrategia terapéutica particularmente atractiva contra las células de MM. En primer lugar, PIM2 se encuentra entre los genes más sobreexpresados en las células de mieloma múltiple [309]. En segundo lugar, esta proteína es necesaria para mantener el crecimiento de las células de mieloma múltiple [310]. Y en tercer lugar, la expresión de PIM2 en células de MM se ve reforzada por las CME y los osteoclastos como mecanismo de supervivencia y resistencia a los fármacos [311].

Se analizó la expresión de las PIM quinasas en las líneas celulares MM.1S, RLD y RPD mediante Western Blot. De las 3 PIM quinasas, en la línea celular MM.1S tan sólo detectamos expresión de PIM-2. El tratamiento con Ld o Pd redujo de forma significativa los niveles de PIM2 en la línea sensible. Sin embargo, esta reducción en los niveles de PIM2 tan sólo se observó parcialmente en células RPD tratadas con Pd, y no se observó las células RLD tratadas con Ld (**Figura 4.25**).

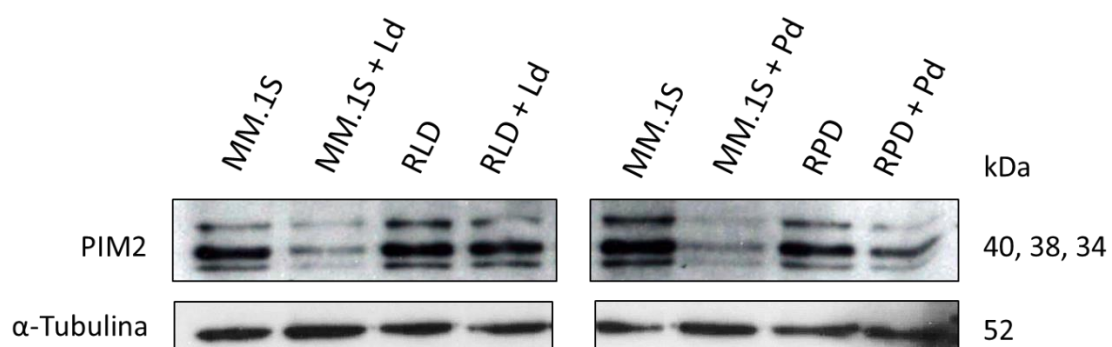


Figura 4.25. Expresión proteica de PIM-2, componente de la familia de las PIM quinasas. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona.. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

Se evaluó la combinación del inhibidor de pan-PIM quinasas PIM-447 con Ld y Pd en las líneas MM.1S, RLD y RPD. Se observó que las tres líneas celulares muestran una sensibilidad semejante a PIM-447, e incluso la línea RLD muestra una sensibilidad ligeramente mayor. Por otro lado, la combinación de PIM-447 a 0,1 μM con Ld o Pd recupera en aproximadamente un 15% la sensibilidad a Ld y Pd de las líneas celulares RLD y RPD (**Figura 4.26**).

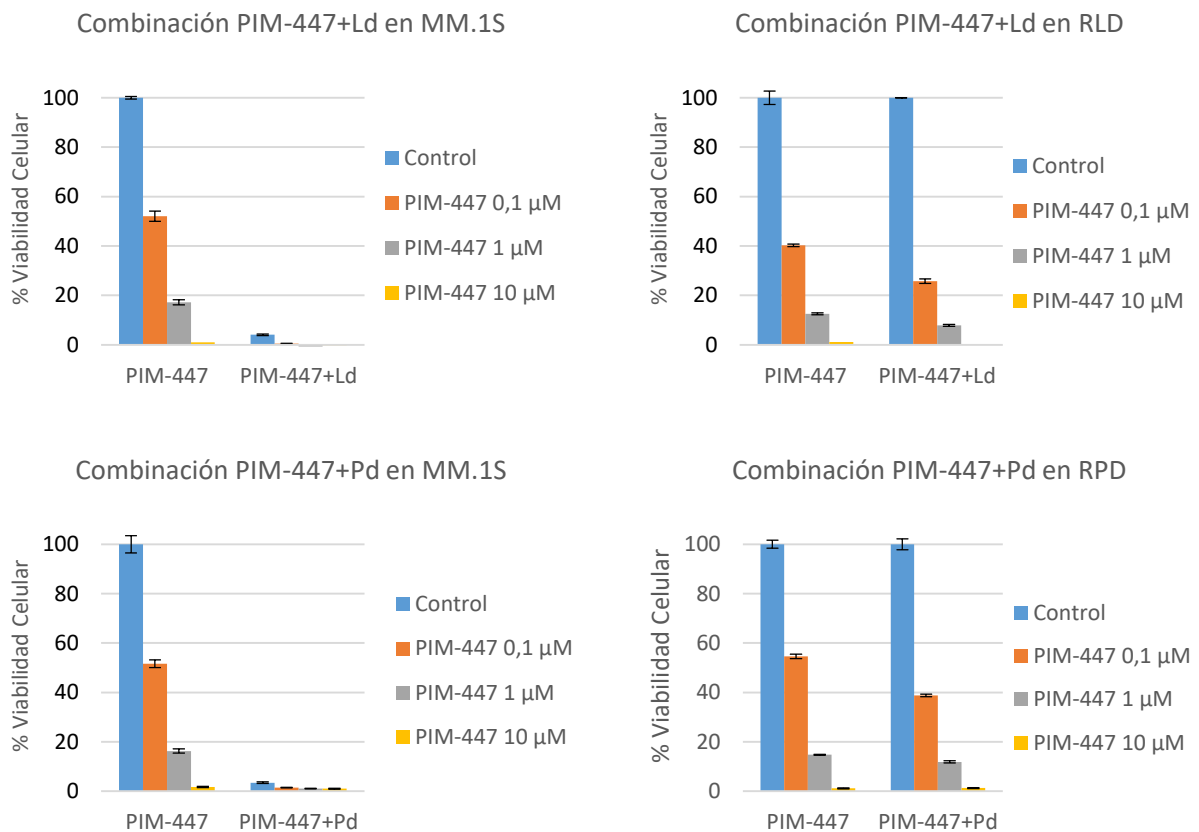


Figura 4.26. Análisis de viabilidad de las líneas MM.1S, RLD y RPD en presencia de PIM-447 y Ld o Pd evaluada por ensayos de MTT. P: pomalidomida. L: lenalidomida. D: dexametasona. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μM . Dosis de dexametasona: 5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

D) KINESIN SPINDLE PROTEIN (KSP)

KSP, también conocido como EG-5 o KIF11, es un miembro de la familia de proteínas quinesina-5 que juega un papel crítico en la separación de ambos polos del huso mitótico, siendo por tanto una proteína esencial para la supervivencia de células en división. De acuerdo con su función, esta proteína muestra una expresión elevada en tejidos con altas tasas de proliferación como son los tejidos embrionarios o la MO, mientras que su expresión permanece baja o indetectable en células adultas no proliferativas. La inhibición de KSP tiene como resultado la formación de husos monopolares que conducen a una catástrofe mitótica y a la activación de la apoptosis. En MM, el inhibidor de KSP filanesib ha mostrado eficacia preclínica y clínica, tanto en monoterapia [312,313] como combinado con agentes inmunomoduladores como pomalidomida [314,315] e inhibidores del proteasoma como bortezomib [316] y carfilzomib [317].

Por todo ello, se analizó la expresión KSP en células MM.1S, RLD y RPD mediante Western blot. Los niveles basales de esta proteína fueron similares en las tres líneas celulares, sin embargo, mientras que el tratamiento con Ld o Pd disminuyó los niveles de KSP en las células sensibles, este efecto no se produjo en las células resistentes (Figura 4.27).

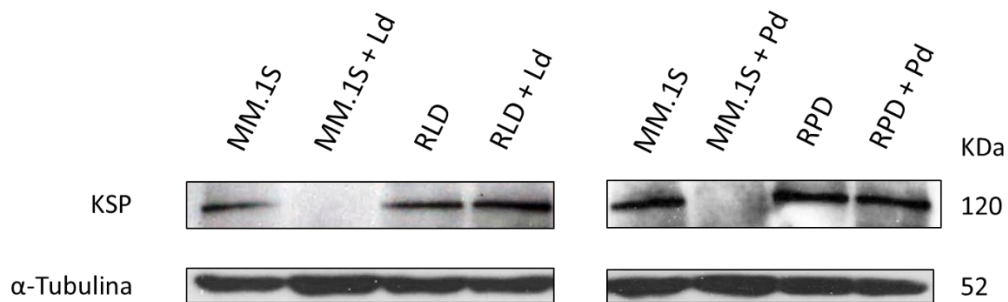


Figura 4.27. Caracterización de la expresión de KSP. L: lenalidomida. D: dexametasona. P: pomalidomida. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 3 días.

Se evaluó también el efecto de la adición del inhibidor de KSP filanesib en la resistencia a las combinaciones de Ld y Pd e identificamos que, tanto las líneas celulares RLD y RPD, como MM.1S, son sensibles a filanesib de forma equiparable. Además, encontramos una reducción de la viabilidad celular de un 89,9% a un 62,6% de la línea celular RLD tratada con 0,1 nM de filanesib o con filanesib+Ld, respectivamente (**Figura 4.28 A**); y de forma similar, una reducción de la viabilidad de un 97% a un 79,5% en la línea celular RPD tratada con 0,1 nM de filanesib o con filanesib+Pd, respectivamente (**Figura 4.28 B**).

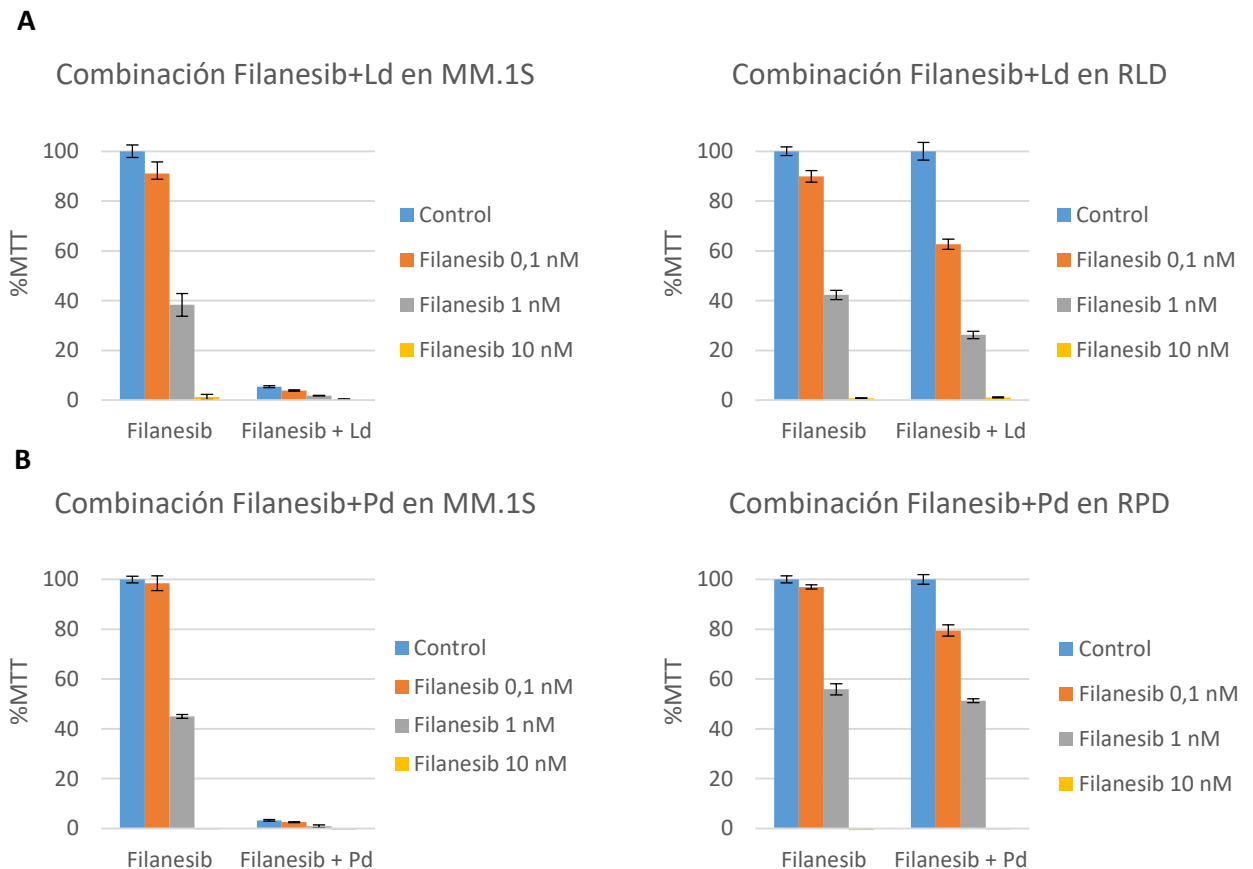


Figura 4.28. Análisis de viabilidad de las líneas MM.1S, RLD y RPD en presencia de Filanesib y Ld (A) o Pd (B) evaluada por ensayos de MTT. L: lenalidomida. D: dexametasona. P: pomalidomida. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este capítulo hemos generado dos modelos de resistencia celular adquirida, células RLD y RPD, mediante la exposición de la línea celular sensible MM.1S de forma continua y dosis-ascendente a lenalidomida y pomalidomida, respectivamente; cada IMiD se combinó con una dosis constante de dexametasona 2,5 nM. Este proceso se prolongó durante más de 6 meses, lo que aumenta la posibilidad de contaminaciones en los cultivos. En nuestro caso, realizamos este proceso en varias réplicas en paralelo y analizamos periódicamente la presencia de micoplasma. Una vez generados los modelos de resistencia, las células fueron cultivadas sin fármaco durante dos semanas y previo a la realización de los experimentos se comprobó que mantenían la resistencia.

En relación a la caracterización genómica y molecular de estos modelos, encontramos que las células con resistencia adquirida a Ld y Pd muestran similares características morfológicas e inmunofenotípicas, e incluso no hay muchas diferencias transcriptómicas en comparación con su contrapartida sensible. Sin embargo, los análisis genómico, proteómico, epigenéticos (de metilación y de expresión de miARNs) mostraron diferencias más notables. Identificamos un número de miARNs cuya expresión está significativamente desregulada en las células resistentes, que contrasta con los pocos genes identificados con expresión desregulada a nivel transcriptómico. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad molecular en la adquisición de resistencia y la importancia de analizar los diferentes niveles de regulación de la expresión génica.

Con respecto a los cambios genómicos, curiosamente sólo encontramos, como alteraciones comunes entre RLD y RPD con respecto a MM.1S, pérdidas cromosómicas y, además, las alteraciones identificadas en las líneas RLD y RPD de forma individual también fueron deleciones. El perfil de metilación de ADN por *arrays* determinó que las líneas RLD y RPD son similares entre sí y diferentes de MM.1S. Este patrón lo hemos identificado en este y otros estudios, como es el caso del análisis transcriptómico, lo cual puede deberse a que los fármacos lenalidomida y pomalidomida comparten un alto grado de similitud tanto química como funcionalmente. Es de interés resaltar que identificamos aproximadamente 2.000 CpGs diferencialmente metiladas en las células resistentes respecto de las células sensibles, lo que pone de manifiesto el cambio global

en el patrón de metilación de las células resistentes. Entre las vías más afectadas por estos cambios de metilación se encuentra la vía de señalización por BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), que encontramos hipometilada y que tiene funciones muy importantes en la patogénesis del MM como son el crecimiento, proliferación tumoral y la homeostasis del hueso. Además, encontramos otras vías hipometiladas como la vía de las MAPKs; y algunas vías hipermetiladas con funciones relacionadas con la reorganización de la cromatina, la regulación nucleosomal y procesos de regulación génica y epigenética. Tal y como se ha mencionado en la introducción, el MM se caracteriza por una hipometilación global [82,83] que parece estar asociada a la progresión de la enfermedad [84]. Esta hipometilación se ha detectado en etapas premalignas como es la GMSI y se incrementa a medida que progresa la enfermedad a MM, en la que también son frecuentes las alteraciones en la estructura de la cromatina y en la actividad de las enzimas metil-transferasas. Además, esta hipometilación global del ADN viene acompañada con la hipermetilación de genes específicos. Entre estos genes hipermetilados se encuentran reguladores de la vía de Wnt, miARNs y factores proapoptóticos, entre otros [318–322]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren, en línea con la bibliografía, una elevada ocurrencia de cambios específicos en la metilación del ADN que podrían estar asociados con la resistencia a fármacos, en este caso a Ld y Pd. De forma interesante, encontramos hipermetilado el gen *TBX5*, que codifica una proteína que ha sido descrita como un ligando directo de la talidomida. De hecho, varios autores consideran que el efecto teratogénico de la talidomida no se explica completamente a través de la diana de los IMiDs CRBN [291,323], y han sugerido que también podría deberse a su interacción con *TBX5* [291]. Atendiendo a estos resultados, podría ser interesante evaluar la expresión de esta proteína en las células sensibles y resistentes, su posible interacción con lenalidomida y pomalidomida en ambos modelos, así como su mecanismo de acción.

El análisis proteómico identificó algunas proteínas diferencialmente infraexpresadas tanto en RLD como en RPD en comparación con la línea MM.1S, como CRBN, p-ATR, PIM1 y E2F1. Se encontraron también algunas proteínas desreguladas exclusivamente en RLD como Mcl-1, Caspasa-2 y Caspasa-9, y otras exclusivas de RPD como Bcl-2 y la Caspasa-12. Sin embargo, no identificamos una expresión alterada del ARNm codificante

de estas proteínas en el análisis transcriptómico. Esto podría deberse a las diferentes formas de regulación (transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional) a las que están sujetos el ARNm y las proteínas. Estudios basados en Western blot analizando la expresión proteica de forma individualizada confirmaron la infraexpresión de la proteína CRBN, tal y como se discute en el siguiente capítulo.

Por otro lado, el análisis de expresión de proteínas implicadas en procesos de supervivencia o proliferación celular importantes en MM como la vía de las MAPKs, la proteína KSP, las PIM quinasas, así como de proteínas antiapoptóticas, en líneas generales indicó que las combinaciones Ld y Pd son capaces de disminuir los niveles de estas proteínas en las células sensibles. Sin embargo, las células resistentes tratadas con los mismos fármacos no muestran cambios en la expresión de estas proteínas con respecto al nivel de expresión sin fármaco, indicando que las células RLD y RPD han desarrollado mecanismos para evitar la apoptosis y la inhibición de la proliferación. Teniendo en cuenta la mayor expresión de la formas activa de ERK1/2 de las células RLD y RPD, nos propusimos evaluar el fármaco inhibidor de MEK1/2 selumetinib, ya que ERK1/2 se encuentra por debajo de MEK1/2 en la señalización intracelular. Identificamos que la adición de selumetinib a las combinaciones de Ld o Pd revierte la resistencia de las células RLD y RPD. Además, la sobreexpresión ectópica de MEK1 indujo un incremento en la resistencia a ambas combinaciones, lo cual es indicativo de la relevancia de la vía de las MAPK en la resistencia a IMiDs. Sin embargo, la adición del fármaco inhibidor de KSP, filanesib, y del inhibidor de PIM quinasas, PIM-447, a las combinaciones Ld y Pd sólo indujo una reversión parcial de la resistencia. Esto era, quizás, esperable teniendo en cuenta que los niveles de expresión de KSP y PIM2 son similares en MM.1S, RLD y RPD. Por otro lado, comprobamos que la línea celular RPD tenía una mayor expresión de Bcl-2 y Mcl-1 en comparación con la línea MM.1S, por lo que se evaluó el efecto del inhibidor de BCL-2, venetoclax, y del inhibidor de MCL-1, S63845. Encontramos que las células RPD (y en menor medida las células RLD) son más sensibles a venetoclax, a S63845 y a la combinación de venetoclax + S63845 en comparación con la línea MM.1S. Además, constatamos una reversión parcial de la sensibilidad al combinar S63845 con Ld o Pd en las líneas RLD y RPD, siendo más evidente en la línea celular RPD.

Los resultados de este capítulo suponen un análisis amplio de las diferencias existentes entre una línea celular y la misma línea celular tras la adquisición de un fenotipo resistente a los IMiDs. Hemos analizado las diferencias en 3 niveles de regulación (ADN, ARN y proteína), identificando características diferenciales entre ambos tipos celulares como son el perfil de metilación o la expresión de miARNs. Finalmente, hemos evaluado e identificado estrategias basadas en los resultados anteriores, para abordar farmacológicamente la resistencia a IMiDs.

**CAPÍTULO II:
ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
RESPONSABLES DE LA DESREGULACIÓN
DE CRBN EN LOS MODELOS DE
RESISTENCIA ADQUIRIDA A Ld Y Pd**

En primer lugar, se utilizaron los datos de los *arrays* de expresión génica mencionados en el capítulo I para analizar la expresión del gen diana de los IMiDs, *CRBN*. En relación con la línea celular parental MM.1S, la expresión de *CRBN* está claramente disminuida en RLD y, de forma más relevante en RPD. Además, las combinaciones de Ld y Pd inducen un incremento en la expresión génica de *CRBN* en la línea celular sensible MM.1S, algo que no ocurre en las líneas resistentes, al menos a dosis bajas (**Figura 4.29**). Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante RT-qPCR (**Figura 4.30**).

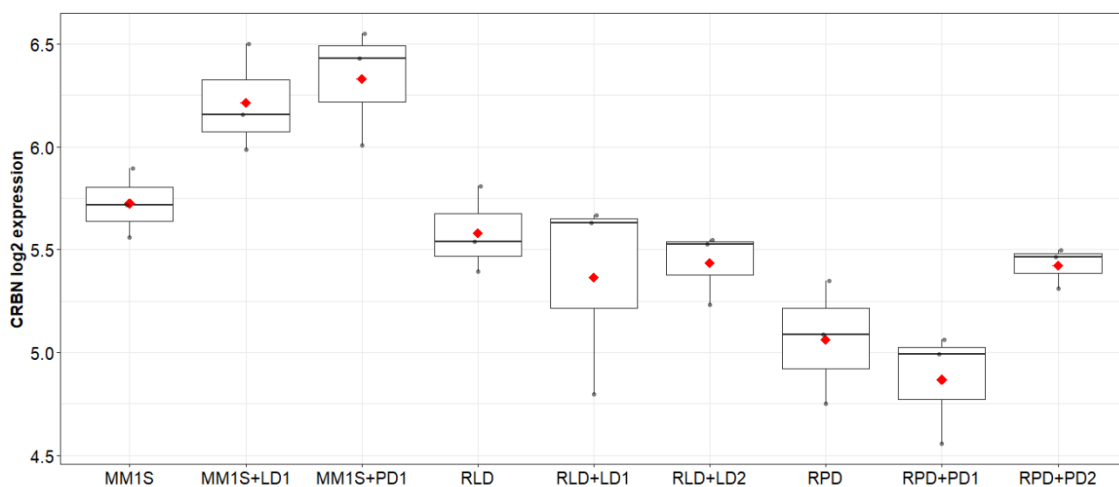


Figura 4.29. Análisis de expresión de *CRBN* (ARNm) mediante arrays Human Gene 2.0 ST. Se utilizó una dosis constante de dexametasona de 2,5 nM en todas las combinaciones. LD1/PD1, LD2/PD2: dosis baja y alta, respectivamente, de las combinaciones de lenalidomida y dexametasona o pomalidomida y dexametasona. La dosis baja de lenalidomida y pomalidomida fue de 100 nM y la dosis alta de 1 μ M. El tiempo de tratamiento fue de 3 días.

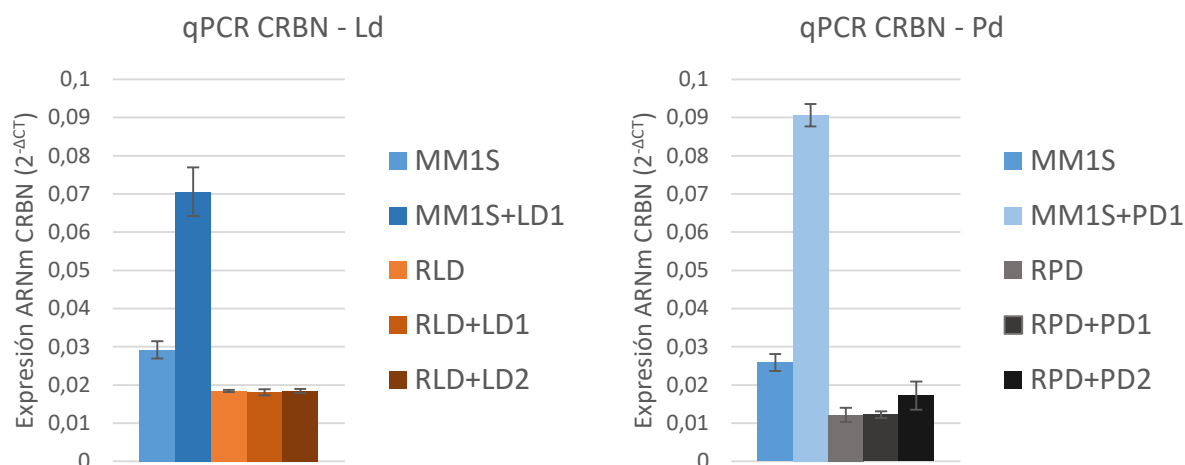


Figura 4.30. Confirmación de la expresión de CRBN (ARNm) por RT-qPCR. Se utilizó una dosis constante de dexametasona de 2,5 nM en todas las combinaciones. LD1/PD1, LD2/PD2: dosis baja y alta, respectivamente, de las combinaciones de lenalidomida y dexametasona o pomalidomida y dexametasona. La dosis baja de lenalidomida y pomalidomida fue de 100 nM y la dosis alta de 1 μ M. El tiempo de tratamiento fue de 3 días.

Teniendo en cuenta nuestros resultados de los *arrays* de expresión génica y también proteica, que sugieren una infraexpresión de CRBN en los modelos de resistencia a IMiDs, quisimos determinar la expresión de CRBN así como la de sus sustratos principales IKZF1, IKZF3 y de otras proteínas más abajo en la ruta de señalización en el mecanismo de acción de los IMiDs, como son los factores de transcripción IRF4 y c-Myc en nuestros modelos de resistencia a IMiDs. En primer lugar, se validaron, tanto a nivel de ARNm (**Figura 4.31 A**) como de proteína (**Figura 4.31 B, C**), los resultados del capítulo I indicativos de una infraexpresión de CRBN en las células RLD y RPD. En segundo lugar, se observó que el tratamiento con Ld o Pd en la línea MM.1S induce una infraexpresión de los sustratos IKZF1 e IZF3, así como de los factores IRF4, c-Myc y de su forma activa p-c-Myc (Ser62). Sin embargo, este efecto no se observó en las líneas RLD y RPD tratadas con Ld o Pd, respectivamente (**Figura 4.31 B**).

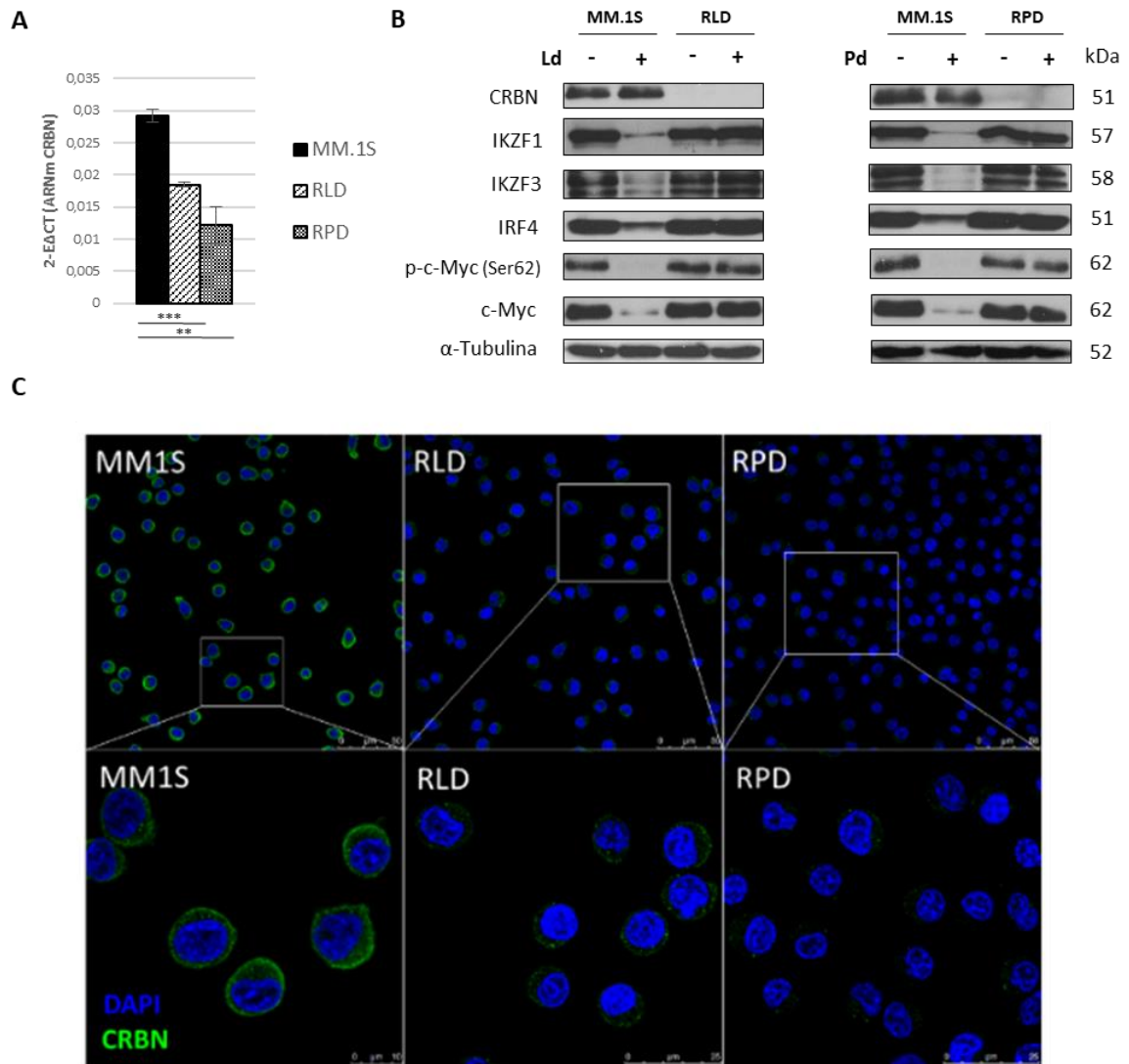


Figura 4.31. Análisis de expresión de CRBN en las líneas MM.1S, RLD y RPD. A: expresión de CRBN en forma de ARNm analizada mediante RT-qPCR. **B:** expresión proteica de CRBN, así como de sus sustratos IKAROS (IKZF1), AIOLOS (IKZF3) y los factores c-Myc e IRF4 analizada mediante Western blot. **C:** inmunofluorescencia mostrando el marcaje para CRBN (verde); contraste para ADN con DAPI (azul). Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM.

A la vista de los resultados de la expresión proteica de CRBN en las células resistentes, quisimos profundizar en el mecanismo o los mecanismos moleculares responsables de su desregulación.

1. ALTERACIONES GENÓMICAS

Aunque la presencia de mutaciones en el gen *CRBN* en el momento del diagnóstico o de la recaída es un evento raro [219], en algunos pacientes sí se han descrito mutaciones en *CRBN* que se han asociado con una menor respuesta a IMiDs [147]. Por ello, en primer lugar, se analizó la presencia de mutaciones en la secuencia de ADN de *CRBN*. No se encontró ninguna mutación o alteración en la región codificante de *CRBN*.

Se evaluó también la presencia de alteraciones en el número de copias que pudieran afectar a los niveles de expresión de *CRBN*. Se encontró una pérdida común en las 3 líneas (MM.1S, RLD y RPD) que incluye el gen *CRBN* localizado en 3p26; el análisis indicó que se trata de una delección heterocigótica (**Figura 4.32**).

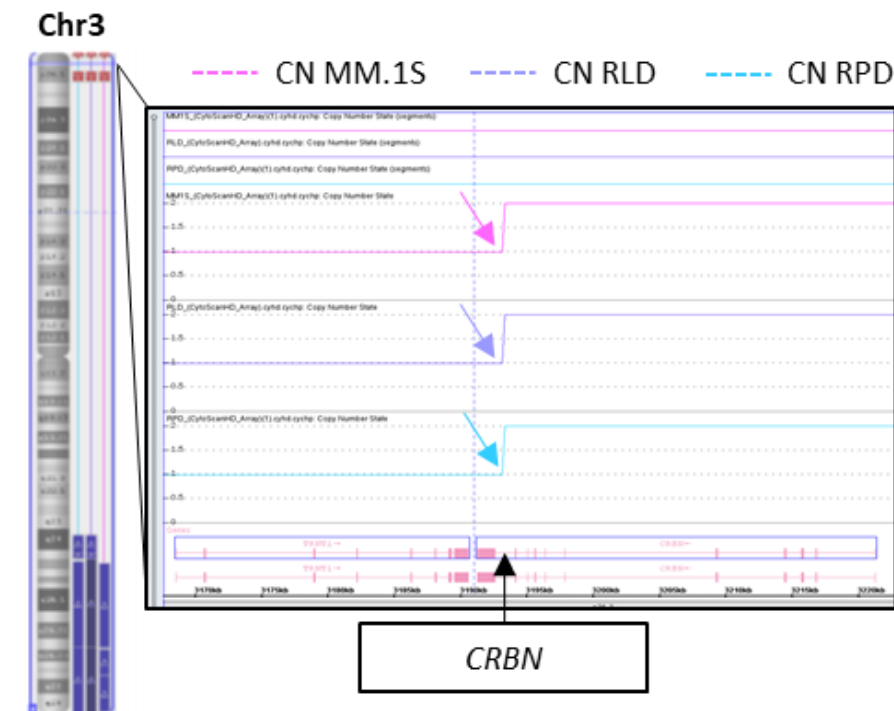


Figura 4.32. Análisis del número de copias en la región del gen *CRBN* mediante CGH-arrays.

Esta delección heterocigótica en *CRBN* fue posteriormente confirmada mediante FISH (**Figura 4.33**). Sin embargo, el hecho de que esté presente tanto en células sensibles como en resistentes, indica que no es la alteración responsable de la infraexpresión de *CRBN* ni tampoco del desarrollo de la resistencia.

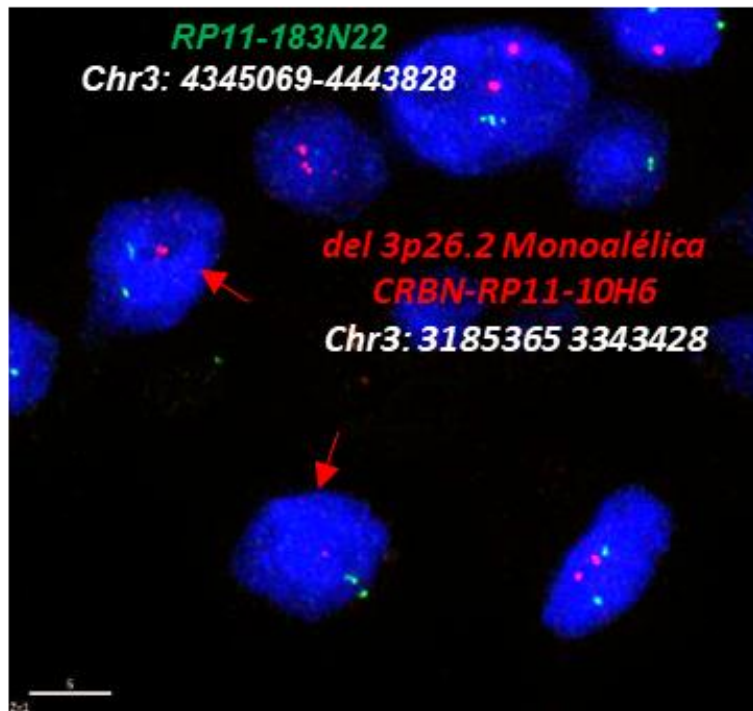


Figura 4.33. Análisis FISH en células resistentes confirmando la delección heterocigótica de 3p26.2 (región de CRBN). La sonda de color rojo, BAC RP11-10H6, contiene el gen CRBN. La sonda marcada en verde, BAC RP11-183N2, fue utilizada como control. Se observaron células con una señal de hibridación en rojo, que son células con delección heterocigótica del gen CRBN.

2. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS POR METILACIÓN DE ADN

Una vez descartada la presencia de alteraciones en la secuencia de ADN del gen *CRBN* o de su número de copias como causa de la infraexpresión de *CRBN*, nos propusimos analizar otros mecanismos de regulación génica que podrían estar afectando a su expresión, como pueden ser las alteraciones epigenéticas a nivel del ADN.

Así, se analizó el estado de metilación de CpGs localizadas en el promotor o el cuerpo génico de *CRBN* que pudieran regular su expresión génica. El análisis de las 39 CpGs evaluadas mostró que no hay diferencias en cuanto al nivel de metilación de las mismas entre las líneas MM.1S, RLD y RPD, y además, que el nivel de metilación de estas CpGs es bajo (**Figura 4.34**).

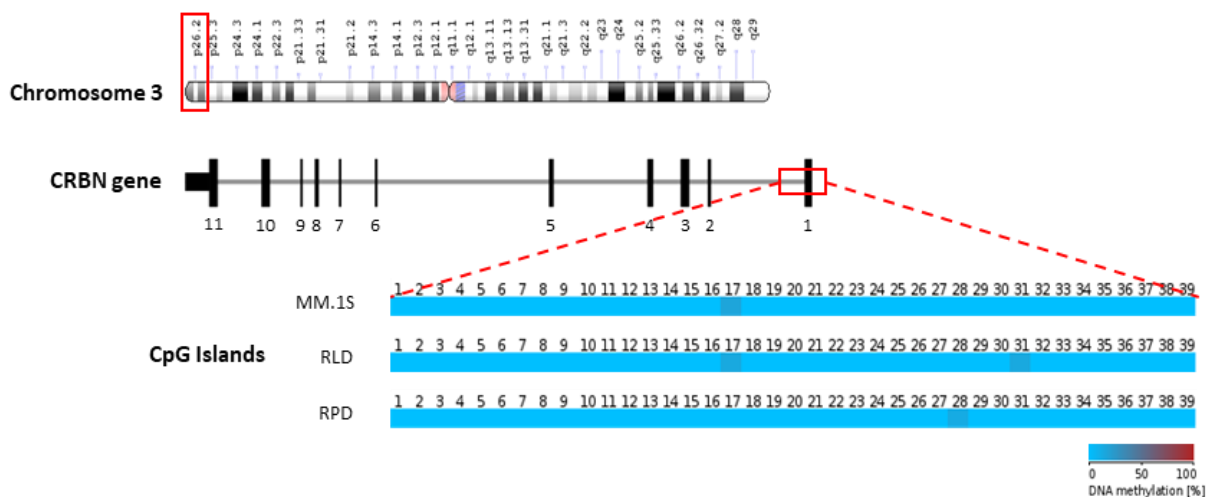


Figura 4.34. Análisis del estado de metilación de islas CpG de la región de *CRBN* mediante secuenciación y tratamiento con bisulfito.

Además, los datos del *array* de metilación EPIC que cubría 8 CpGs dentro del promotor de *CRBN* y en regiones cercanas al mismo indicaron resultados similares, de modo que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al nivel de metilación en ninguna de las CpGs analizadas entre MM.1S, RLD y RPD.

3. ALTERACIONES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS

Mediante herramientas bioinformáticas se analizaron aquellas proteínas que podrían regular la expresión de CRBN. Para ello, se utilizó la herramienta ARCHS⁴. Este software está basado en un repositorio de datos de RNA-seq, CHIP-chip y CHIP-seq llamado ChEA, con información de las interacciones entre promotores de genes y proteínas extraída de más de 100 estudios basados en CHIP [324,325]. El análisis indicó que las proteínas con mayor puntuación para unirse potencialmente a regiones reguladoras del gen *CRBN* son GBX2, TAF15, EZH2, KDM6A y POU3F2.

Llama la atención que dos de las proteínas de mayor puntuación son EZH2 y KDM6A, ambas con funciones estrechamente relacionadas. EZH2 es una metil-transferasa de histonas que induce la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), una marca epigenética inhibitoria de la transcripción [326]; y KDM6A, también conocida como histona desmetilasa UTX, que elimina grupos di/trimetilo de H3K27 [327].

Teniendo en cuenta que EZH2 es una proteína con función inhibitoria de la transcripción y dado que es posible inhibir farmacológicamente a EZH2 (EZH2i EPZ-6438, tazemetostat), se evaluó el efecto de este fármaco en la expresión de CRBN en células sensibles y resistentes, así como su eficacia en las líneas celulares MM.1S, RLD y RPD, sólo y en combinación con Ld o Pd. Esto se llevó a cabo por ensayos de Anexina V/IP mediante citometría de flujo en lugar de ensayos de MTT dadas las características técnicas del experimento. Tras dos días de pretratamiento con EZH2i, se lavó el medio para disponer de condiciones control, y se adicionó Ld/Pd, dexametasona o EZH2i. Se observó que el pretratamiento con EZH2i durante 2 días y su posterior combinación con Ld o Pd durante 5 días revierte la resistencia a ambas combinaciones (**Figura 4.35**).

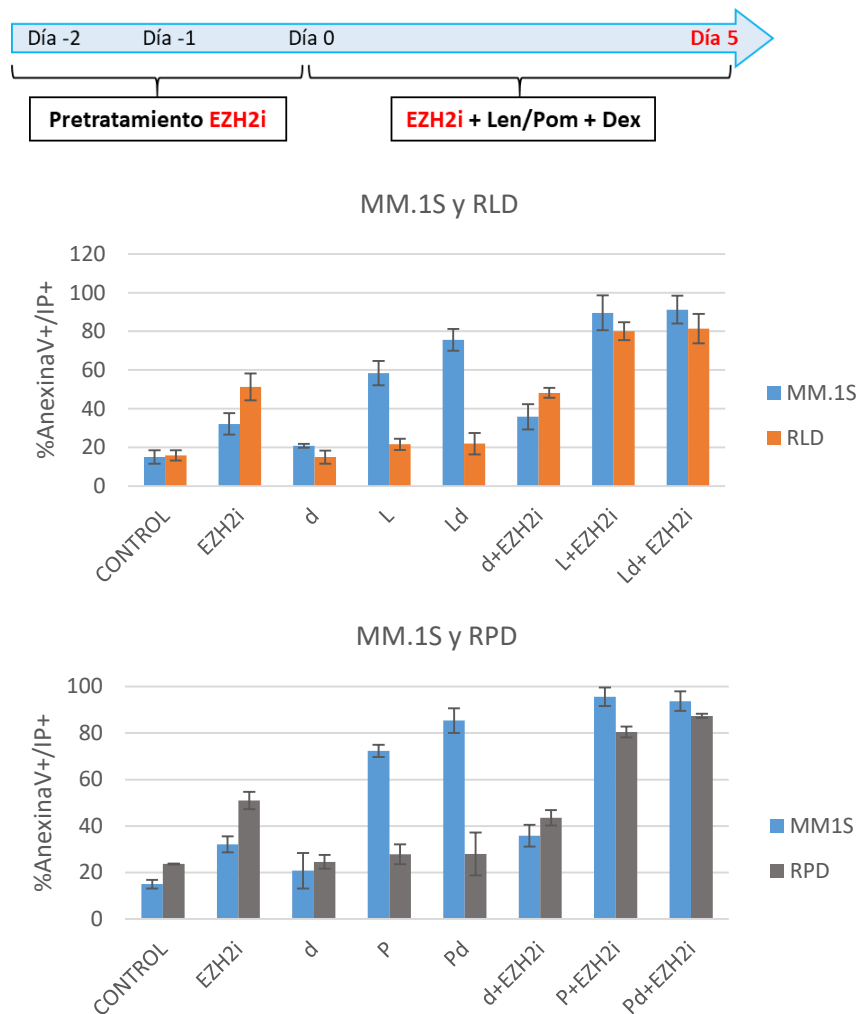


Figura 4.35. Análisis de la apoptosis celular por Anexina V/IP tras 2 días de pretratamiento con el inhibidor de EZH2 tazemetostat y posterior combinación durante 5 días con Ld/Pd en las líneas MM.1S, RLD y RPD. Dosis de tazemetostat: 10 μ M. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. EZH2i: inhibidor de EZH2. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona.

Al analizar la actividad de los IMiDs se observó que las células RLD y RPD tratadas con tazemetostat + Ld/Pd muestran menor expresión de los sustratos IKAROS y AIOLOS y de los factores IRF4, c-Myc y su forma activa p-c-Myc (Ser62). Por otro lado, las células RLD y RPD muestran basalmente mayor expresión de EZH2, e incluso, sorprendentemente, aumenta la expresión de EZH2 bajo la condición de tratamiento con tazemetostat. Además, se encontró una menor expresión de EZH2 en células MM.1S tratadas con la combinación de tazemetostat + Ld/Pd, mientras que en las mismas condiciones los niveles de EZH2 aumentan en las células RLD y RPD (**Figura 4.36**).

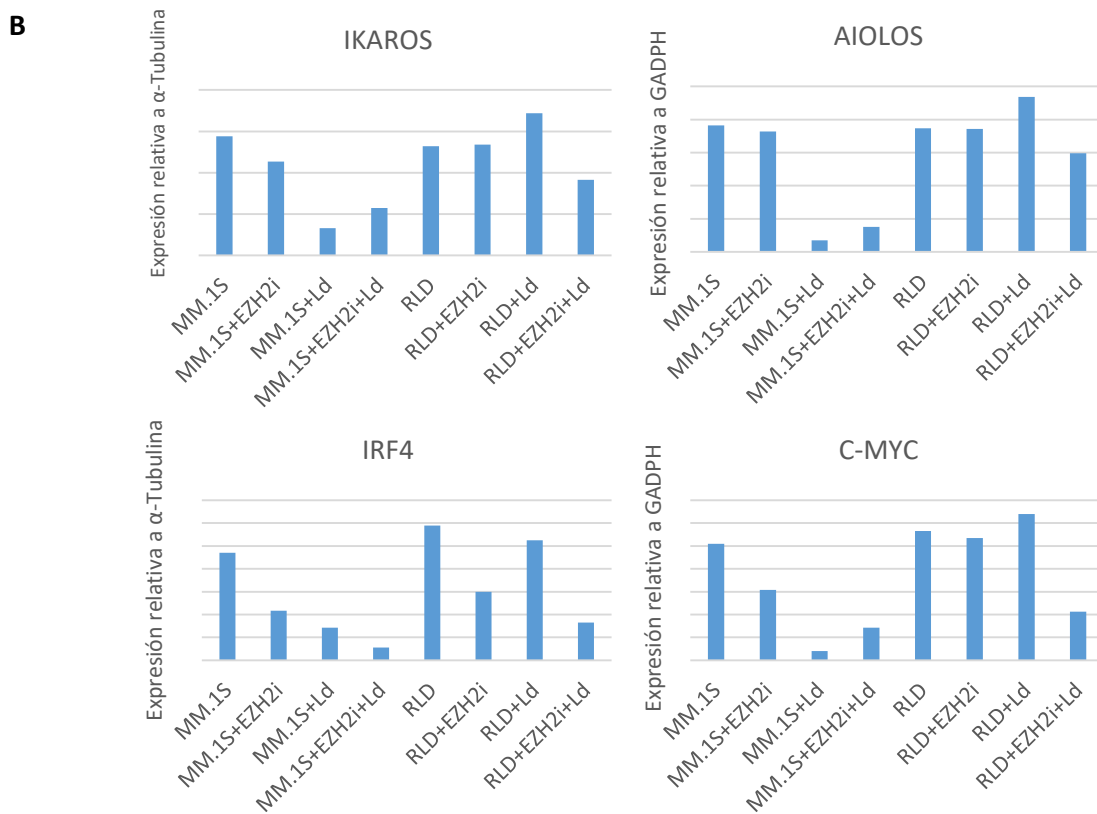
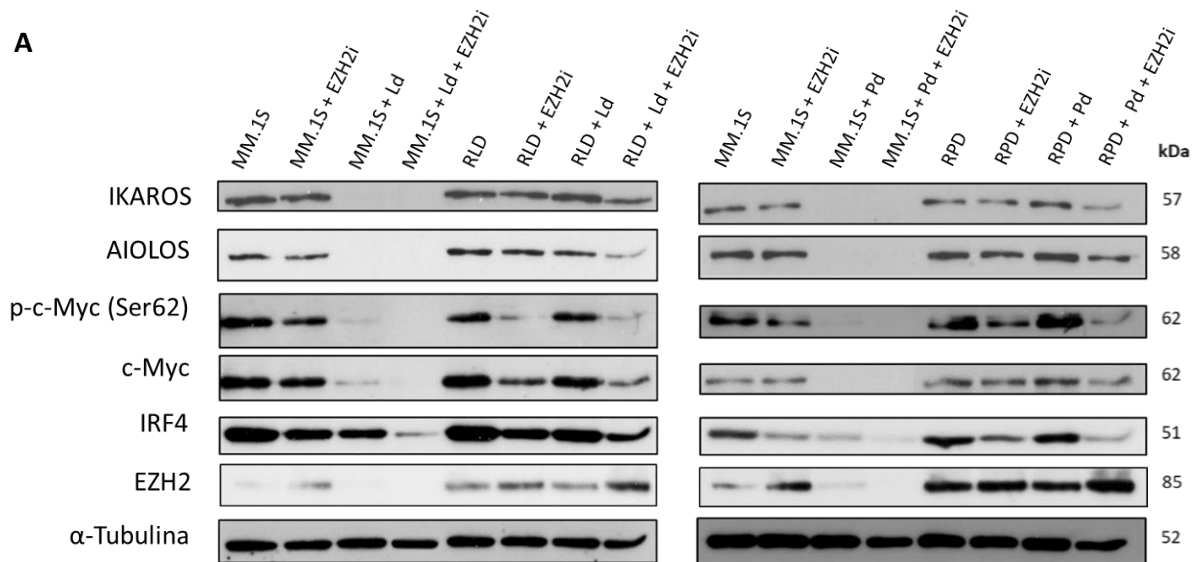


Figura 4.36. Análisis de los niveles de expresión de las proteínas IKAROS, AIOLOS, p-C-Myc (Ser62), c-Myc e IRF4 en las líneas MM.1S, RLD y RPD tratadas con tazemetostat (EZH2i) y las combinaciones Ld o Pd. A: análisis por Western blot. B: cuantificación de la señal de las bandas de Western blot (Adobe Photoshop CS5). P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de tazemetostat 10 μ M, dosis de dexametasona 2,5 nM, dosis de lenalidomida y pomalidomida 1 μ M. Tratamiento de 2 días con EZH2i y posterior combinación con Ld o Pd durante 3 días.

A pesar de revertir la resistencia a Ld y Pd, el tratamiento con EZH2i no recupera en las células RLD y RPD los niveles de expresión de CRBN de la línea celular MM.1S (**Figura 4.37**), por lo que la reversión de la resistencia a Ld y Pd parece ser independiente de CRBN.

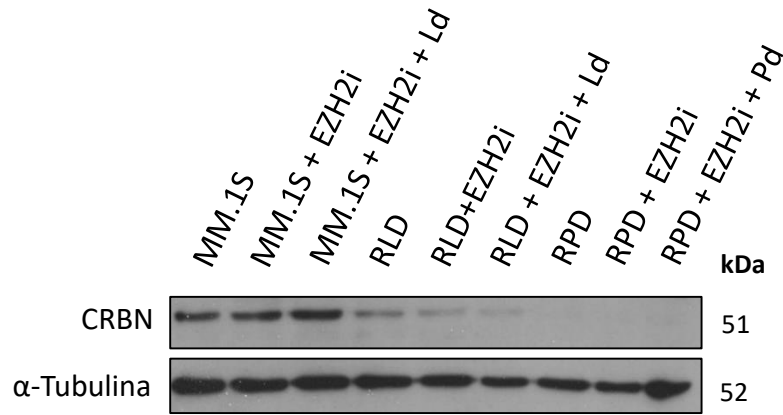


Figura 4.37. Análisis del nivel de expresión de CRBN mediante Western blot en células MM1S, RLD y RPD tratadas con tazemetostat (EZH2i) o con las combinaciones de EZH2i y Ld o Pd. P: pomalidomida. L: lenalidomida. d: dexametasona. Dosis de tazemetostat: 10 μ M, dosis de dexametasona: 2,5 nM, dosis de lenalidomida y pomalidomida: 1 μ M. Tratamiento de 2 días con EZH2i y posterior tratamiento con EZHi en monoterapia o combinado con Ld o Pd durante 3 días.

4. DESREGULACIÓN POR miARNs

Dado que habíamos encontrado diferencias entre el perfil de miARNs de las células MM.1S, RLD y RPD, quisimos explorar la posibilidad de que algunos de ellos pudieran estar modificando la expresión de CRBN en las células resistentes. En primer lugar, se realizó un análisis bioinformático predictivo utilizando la herramienta Target Scan desarrollada por Bartel D. P., *et al.* [328], para determinar potenciales miARNs que pudieran tener como diana el ARNm de CRBN y regular su expresión al unirse a su región reguladora 3'UTR (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10. Resultado del análisis predictivo de miARNs que podrían regular la expresión CRBN a través de su unión a la región 3'UTR de CRBN. Se muestran los 20 miARNs con mejores valores PCT y Context++ score. El valor PCT (“preferentially conserved targeting”) es un indicador acerca de la efectividad de un miARN para un sitio determinado y de la probabilidad de que ese sitio sea conservado en distintas especies para el miARN determinado. El valor “context score” es un valor predictivo para todos los tipos de interacciones, incluyendo así miARNs que pueden no ser altamente conservados.

miARN Family	Conserved Sites Total	Poorly Conserved Sites Total	Cumulative Weighted Context++ Score	Total Context++ Score	Aggregate PCT
let-7-5P/98-5p	1	0	-0,05	-0,28	0,55
miR-129-3p	0	1	-0,22	-0,32	0,25
miR-217	0	2	-0,26	-0,48	0,21
miR-140-3p.1	0	1	-0,3	-0,43	0,14
miR-223-3p	0	1	0	-0,34	0,14
miR-203a-3p.2	0	2	0	-0,08	0,12
miR-7-5p	0	1	0	-0,1	0,1
miR-144-3p	0	2	-0,34	-0,5	< 0.1
miR-216a-5p	0	1	-0,2	-0,29	< 0.1
miR-23-3p	0	1	-0,19	-0,26	< 0.1
miR-183-5p.1	0	1	-0,16	-0,23	< 0.1
miR-101-3p.2	0	1	-0,14	-0,19	< 0.1
miR-216b-5p	0	1	-0,12	-0,17	< 0.1
miR-182-5p	0	1	-0,1	-0,14	< 0.1

miARN Family	Conserved Sites Total	Poorly Conserved Sites Total	Cumulative Weighted Context++ Score	Total Context++ Score	Aggregate PCT
miR-101-3p.1	0	1	-0,09	-0,12	< 0.1
miR-96-5p/1271-5p	0	1	-0,08	-0,11	< 0.1
miR-30-5p	0	1	-0,04	-0,22	< 0.1
mir-130-3p/301-3p/454-3p	0	1	-0,01	-0,18	< 0.1
mir-330-3p	1	1	-0,02	-0,04	N/A
mir-2278	0	1	-0,01	-0,02	N/A

De entre los miARNs que podrían tener como diana CRBN, se identificaron aquellos que en el *array* de miARNs resultaban sobreexpresados en las líneas resistentes respecto de MM.1S: let7f-5p, miR-98-5p, miR-330-3p, miR-30a-5p, miR-2278, miR-183-5p y miR-454-3p. De ellos, se validó mediante RT-qPCR la sobreexpresión en RLD y RPD de los miARNs: miR-330-3p, miR-30a-5p, miR-2278, miR-183-5p y miR-454-3p. Además, se observó que el miARN let7f-5p se sobreexpresa en la línea RPD con respecto a MM.1S (Figura 4.38).

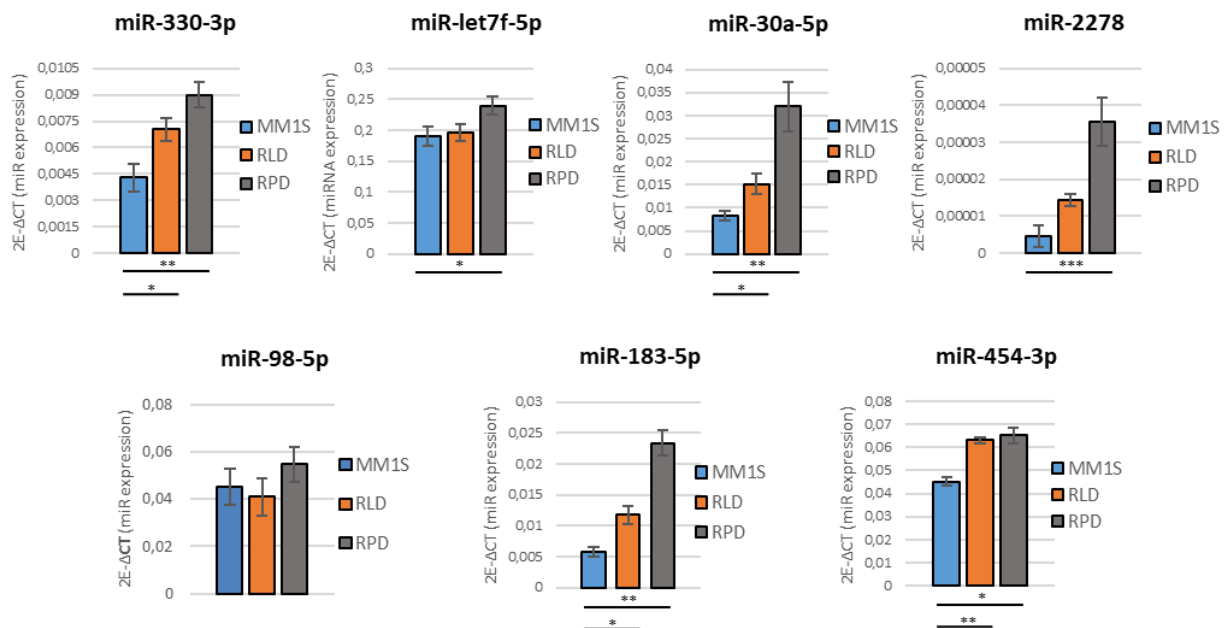


Figura 4.38. Validación por RT-qPCR de la expresión de miARNs significativamente sobreexpresados en RLD y RPD respecto a MM.1S con predicción de CRBN como diana.

Por otro lado, se secuenció la región reguladora 3'UTR de *CRBN* para descartar la presencia de mutaciones que puedan afectar a la unión de miARNs en esta región. No se encontró ninguna alteración en ninguno de los sitios de unión de los miARNs estudiados en las líneas celulares MM.1S o RPD (**Figura 4.39**). Este estudio, así como los análisis funcionales posteriores, se llevaron a cabo en las líneas MM.1S y RPD, dado el elevado número de ensayos que suponen y las escasas diferencias encontradas entre las líneas RLD y RPD en cuanto a la expresión de miARNs.

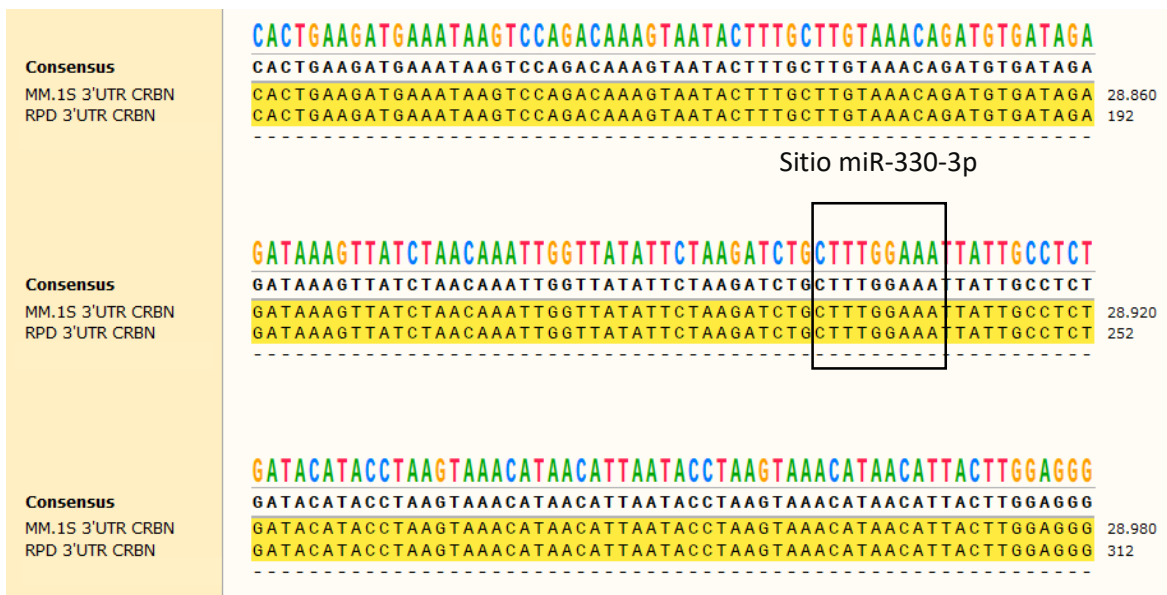


Figura 4.39. Alineamiento entre la secuencia 3'UTR de *CRBN* de MM.1S y RPD en busca de mutaciones que pudiesen afectar a la unión de miARNs (ejemplo para miR-330-3p).

Tan sólo se identificó un cambio de un nucleótido en una zona que no se corresponde con el lugar de unión de ninguno de los miARNs estudiados (**Figura 4.40**).



Figura 4.40. Alineamiento entre la secuencia 3'UTR de *CRBN* de MM.1S y RPD mostrando un único cambio observado entre las secuencias de ambas líneas celulares.

Habiendo descartado la presencia de alteraciones en la región 3'UTR de *CRBN*, se evaluó el posible papel de los miARNs anteriormente mencionados en la expresión de *CRBN*.

A) SOBREENPRESIÓN ECTÓPICA DE MIMÉTICOS DE miARNs EN MM.1S

Para estudiar esta posible función de los miARNs miR-330-3p, miR-98-5p, let7f-5p, miR-30a-5p, miR-2278, miR-454-3p y miR-183-5p como reguladores de la expresión de *CRBN* y por consiguiente de la sensibilidad a Ld o Pd, se realizaron transfecciones transitorias por nucleofección de miméticos de dichos miARNs sobre la línea celular MM.1S y analizamos la expresión de *CRBN*.

Se observó una tendencia hacia la infraexpresión de la proteína *CRBN* en aquellas células que sobreexpresaron los miARNs miR-183-5p y miR-2278 (**Figura 4.41 A**), no siendo así para la expresión del ARNm de *CRBN* (**Figura 4.41 B**).

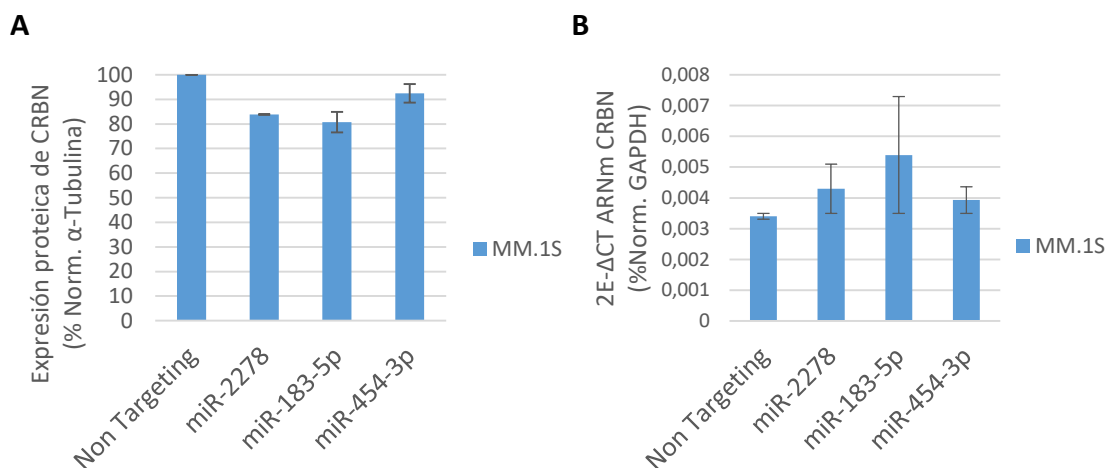


Figura 4.41. Efecto de la sobreexpresión del miR-2278, miR-183-5p y miR-454-3p en la línea MM.1S sobre la expresión de *CRBN* en sus formas proteica y ARNm. Se analizó la expresión proteica de *CRBN* por Western blot (A) y de ARNm por RT-qPCR (B) comparándola con la de células transfectadas con un mimético de miARN control que no tiene como diana ningún gen (Non Targeting Control). La concentración de miméticos usada en las transfecciones fue de 25 nM. Se realizaron dos transfecciones separadas en 24 h. Posteriormente, se cultivaron las células durante otras 24 h, momento en el cual se llevó a cabo la extracción de proteínas y ARNm.

Sin embargo, la sobreexpresión de los miARNs indicados no modificó la sensibilidad a la combinación de Pd respecto de las células control (**Figura 4.42**).

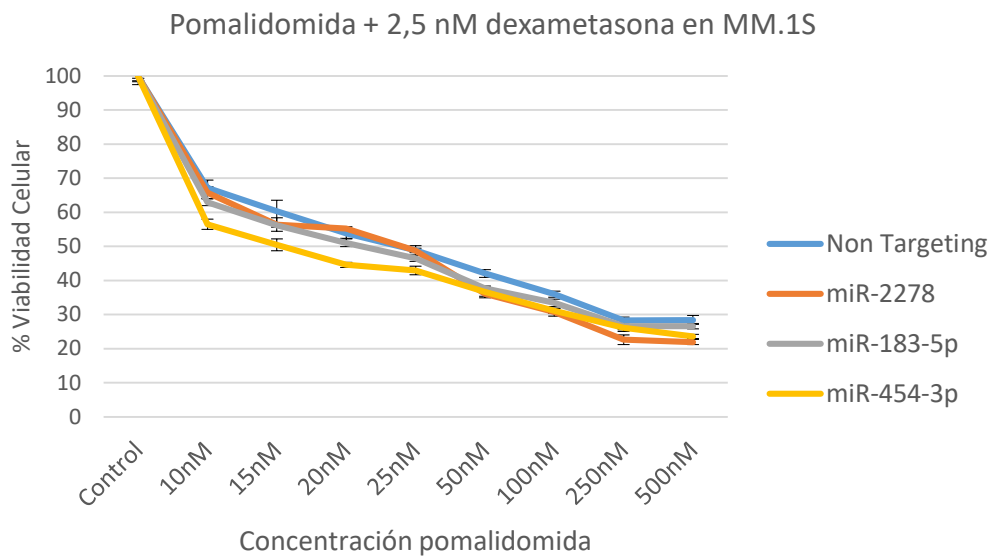


Figura 4.42. Efecto de la sobreexpresión del miR-2278, miR-183-5p y miR-454-3p en la sensibilidad a la combinación de Pd analizada mediante ensayos de MTT. P: pomalidomida. La concentración de miméticos usada en las transfecciones fue de 25 nM. Se realizaron dos transfecciones separadas en 24 h. Posteriormente, se cultivaron las células durante en presencia de concentraciones crecientes de pomalidomida en combinación con 2,5 nM de dexametasona durante 3 días.

Tampoco se observaron diferencias en la sensibilidad a los IMiDs o en la expresión de CRBN tras la sobreexpresión de miméticos de los miARNs miR-330-3p, miR-98-5p, let7f-5p, miR-30a-5p y miR-454-3p, bien sea de forma individual o de forma combinada.

B) INHIBICIÓN TRANSITORIA DE miARNs EN RPD

Se evaluó también el efecto de la inhibición de aquellos miARNs que se encuentran sobreexpresados en la línea celular RPD y se analizó la expresión de CRBN y la sensibilidad a Pd en estas condiciones, con el objetivo de determinar si la inhibición de estos miARNs podría inhibir la resistencia a Pd. Tan solo se identificó una tendencia hacia la sobreexpresión de *CRBN* bajo condición de inhibición de los miARNs let-7f-5p y miR-30a-5p, aunque no llegó a ser significativa ($p=0.123$ y $p=0.102$, respectivamente) (**Figura 4.43 A**). Sin embargo, no encontramos diferencias en cuanto a la sensibilidad a la combinación Pd (**Figura 4.43 B**).

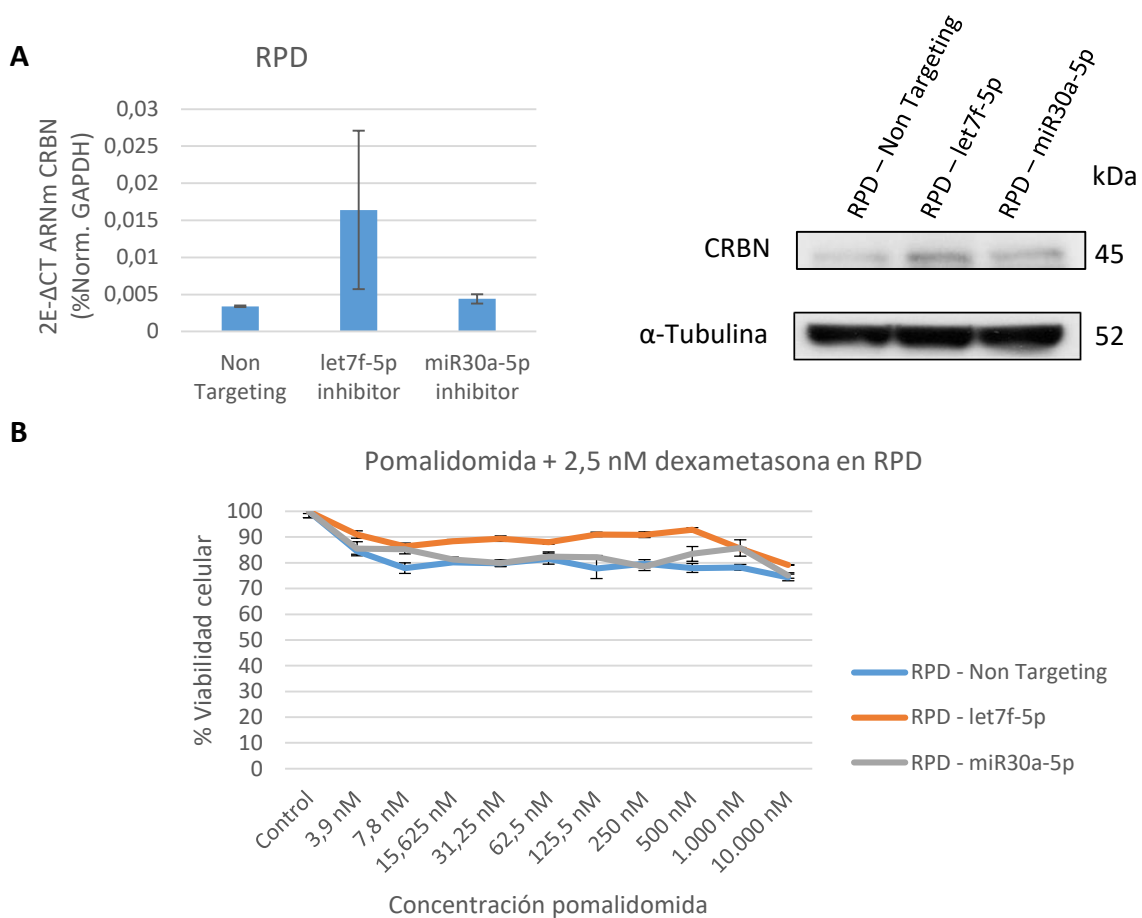


Figura 4.43. Efecto de la inhibición de los miARNs let-7f-5p y miR-30a-5p en la expresión de CRBN y la sensibilidad a la combinación Pd en la línea celular RPD. A: análisis de expresión de CRBN mediante RT-qPCR y Western Blot. **B:** análisis de la viabilidad celular por ensayo MTT. Se realizaron 2 transfecciones con los inhibidores a una concentración de 25 nM. Tiempo de tratamiento con Pd: 3 días. Dosis de dexametasona: 2,5 nM.

C) *miR-34a*

Los arrays de miARNs mostraron que el miR-551-5p y el miR-34a-5p se sobreexpresan de forma común en las líneas resistentes respecto a su contrapartida sensible MM.1S.

Teniendo en cuenta que estudios previos sugieren que el miR-34a-5p podría inducir la expresión de STAT3 [303] e incluso actuar como un agente pro o antitumoral dependiendo del contexto [304], decidimos evaluar su posible papel en la expresión de CRBN y la resistencia a Pd a pesar de no aparecer en el análisis predictivo para tener por diana el ARNm de CRBN.

En primer lugar, se validó la sobreexpresión de este miARN en las células resistentes mediante RT-qPCR (**Figura 4.44**).

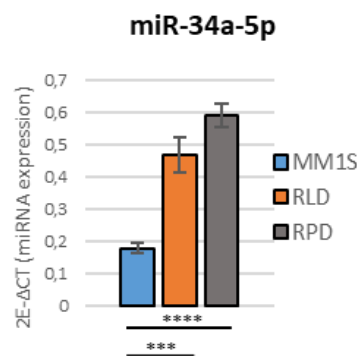


Figura 4.44. Validación por RT-qPCR de la sobreexpresión del miR-34a-5p en las células resistentes con respecto su contrapartida sensible MM.1S.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de miR-34a-5p en la expresión del gen *CRBN* y en la sensibilidad a los IMiDs. Sorprendentemente, las células MM.1S transfectadas con el miR-34a-5p mostraron mayor expresión de *CRBN* que las transfectadas con el control *Non Targeting*. Además, los ensayos de viabilidad celular mostraron que las células MM.1S transfectadas con el miR-34a-5p eran más sensibles a la combinación Pd (**Figura 4.45 A**). Se evaluó también el efecto de la sobreexpresión de este miARN en RPD, encontrando resultados similares (**Figura 4.45 B**).

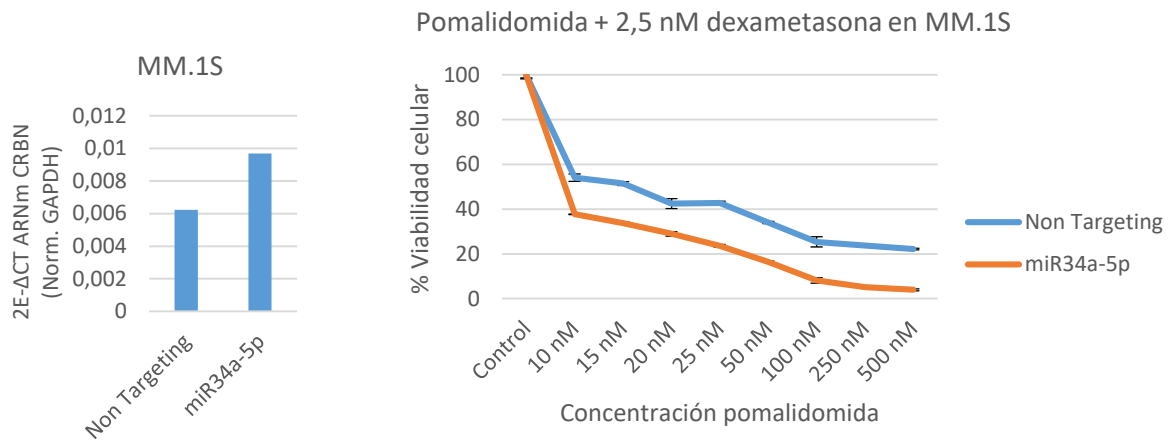
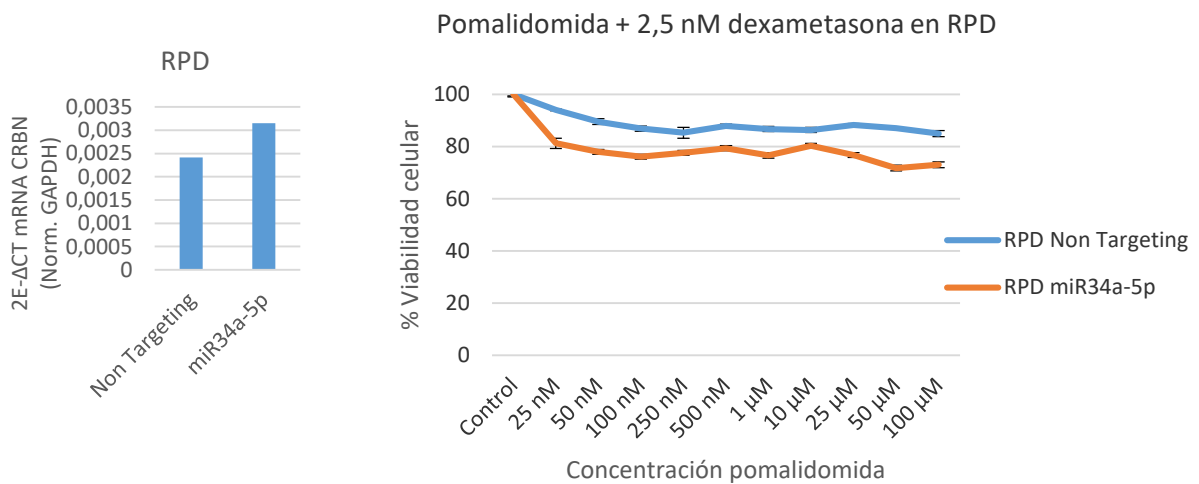
A**B**

Figura 4.45. Efecto de la sobreexpresión ectópica del miR-34a-5p sobre la expresión de CRBN y la sensibilidad a la combinación Pd en MM.1S y RPD. Análisis de expresión de CRBN mediante RT-qPCR y análisis de la viabilidad celular por ensayo MTT en células MM.1S (A) y RPD (B) transfectadas con un mimético del miR-34a-5p. Se realizaron 2 transfecciones con el mimético a una concentración de 25 nM separadas 24 h. Tiempo de tratamiento con Pd: 3 días. Dosis de dexametasona: 2,5 nM.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los modelos celulares de resistencia a IMiDs, RLD y RPD, muestran menor expresión de CRBN, tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo que concuerda con la bibliografía [197,199,213,214] y coincide con un estudio reciente basado también en la generación de líneas con resistencia adquirida a IMiDs [191].

En cuanto a los mecanismos responsables de la desregulación de CRBN, en primer lugar, los estudios de secuenciación no identificaron alteraciones específicas en el ADN. Por otro lado, el análisis de número de copias y FISH confirmaron una delección heterocigótica en la región de CRBN presente tanto en las líneas resistentes como en la sensible. Por lo tanto, no identificamos alteraciones genómicas que expliquen la desregulación de CRBN.

En relación con los estudios epigenéticos, no encontramos diferencias en cuanto al nivel de metilación de CpGs de la región promotora ni en CpGs cercanas al promotor de *CRBN* entre células sensibles y resistentes. Además, el análisis del metiloma llevado a cabo en el capítulo I incluyó 8 CpGs localizadas en la región promotora y cuerpo génico de *CRBN*, que tampoco mostraron diferencias en cuanto a su nivel de metilación. No obstante, no podemos descartar que otras CpGs diferentes a las analizadas (bien sea de la región promotora, en islas CpG próximas o en CpGs del cuerpo génico) se encuentren metiladas y puedan ejercer un papel en la infraexpresión transcripcional de *CRBN*. En cualquier caso, la represión transcripcional debida a la metilación del ADN está generalmente asociada a la metilación de islas CpG, es decir, de *sets* o conjuntos de CpGs. Por lo tanto, el hecho de no encontrar ninguna CpG diferencialmente metilada entre los distintos tipos celulares, parece sugerir que la infraexpresión de CRBN no está directamente relacionada con cambios en la metilación de su ADN o *locus*.

Por otro lado, mediante herramientas bioinformáticas y bases de datos de CHIP analizamos aquellas proteínas que podrían regular la expresión del gen *CRBN* a través de la unión a sus regiones reguladoras. Entre las 5 proteínas con mayor puntuación en el análisis, encontramos 2 enzimas con actividad metilante y desmetilante de H3K27 (EZH2 y KDM6A, respectivamente), que se localizan con elevada frecuencia en las regiones reguladoras del gen *CRBN*. Esto supone un indicador de que estas regiones

podrían estar fuertemente reguladas por mecanismos de regulación epigenética y, más concretamente, por marcas de metilación de histonas.

EZH2 es una proteína cuyas funciones han sido ampliamente estudiadas dada su relevancia en la diferenciación y la regulación del ciclo celular, así como en procesos como la autofagia, apoptosis y senescencia [329–331]. Además, la presencia de mutaciones o alteraciones en la expresión de EZH2 ha sido relacionada con la carcinogénesis, el desarrollo de metástasis y la resistencia a fármacos en varios tipos de cáncer [332–337], incluido el MM [338–340]. Numerosos estudios han demostrado que EZH2 es una proteína que forma parte de un complejo de proteínas represivas de tipo Polycomb 2 (PRC2, *Polycomb Repressive complex 2*) que silencia epigenéticamente varios genes supresores tumorales catalizando la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3, la cual sirve como punto de anclaje de ADN metiltransferasas e histona desacetilasas [341,342]. Además, estudios recientes han demostrado que EZH2 tiene funciones aparte de las conocidas como parte del complejo PRC2, de modo que puede actuar tanto como represor transcripcional como activador dependiendo de su asociación con otros miembros del complejo PRC2 y el contexto celular [343–346].

En este capítulo, se observó que el tratamiento con el EZH2i tazemetostat revierte la resistencia adquirida a Ld y Pd de forma independiente a CRBN, indicando que otros mecanismos están implicados. Esta reversión de la resistencia en condiciones de infraexpresión de CRBN es sorprendente debido a que la expresión de esta proteína es necesaria para la actividad de los IMiDs [214]. Sin embargo, recientemente se han descrito otros ligandos de los IMiDs en células de mieloma como ZAP-70 (*Zeta-Chain-Associated Protein Kinase-70*) y TP53-RK (*p53-Related Protein Kinase*) [202,203]. Los IMiDs se unen a TP53-RK, inhibiéndolo y bloqueando la fosforilación de p53, lo que desencadena la apoptosis de la célula de mieloma. Además, la alteración genética o inhibición farmacológica de TP53-RK induce una reducción de los niveles de IKAROS, AIOLOS y c-Myc [203]. Por otro lado, en el anterior capítulo se mencionó otro de los ligandos de los IMiDs, TBX5 [291]. Teniendo en cuenta que los IMiDs tienen como diana otras moléculas directamente implicadas en la citotoxicidad de las células de mieloma, es posible que, en nuestros modelos celulares de resistencia a IMiDs, la adición del EZH2i induzca un cambio global en el patrón de expresión génica que modifique la expresión

de determinadas moléculas diana de los IMiDs como las recién mencionadas, lo que explicaría la recuperación de la sensibilidad a los IMiDs de nuestros modelos de resistencia. Además, nuestros resultados sugieren que otra proteína de funciones similares a CRBN podría estar uniéndose a los IMiDs, ya que no sólo el pretratamiento y combinación de Ld/Pd con tazemetostat revirtió la resistencia, si no que los sustratos IKAROS, AIOLOS y los factores c-Myc e IRF4 vieron reducida su expresión. En este sentido, la determinación de las moléculas ligando de los IMiDs en estas condiciones podría identificar nuevas dianas terapéuticas a través de las cuales abordar la resistencia farmacológica. Por otro lado, encontramos que la expresión de EZH2 es más alta en las células resistentes y que, además, aumenta con el tratamiento con EZH2i. Este incremento puede deberse a un mecanismo de resistencia celular al propio inhibidor, ya que el EZH2i utilizado, tazemetostat, es un inhibidor competitivo de EZH2 para su unión al donador de grupos metilo denominado SAM. Este posible mecanismo es un claro indicativo de que la expresión de EZH2 está muy regulada en las células de MM. Además, el tratamiento con Ld/Pd en todas las líneas redujo la expresión de EZH2, lo cual también apoya la idea de la posible relación o dependencia en la expresión de EZH2 y la resistencia a IMiDs. No obstante, teniendo en cuenta la función dual de EZH2 como activador o silenciador transcripcional y la complejidad de los mecanismos implicados, para poder determinar esa dependencia son necesarios estudios adicionales.

Identificamos además miARNs significativamente sobreexpresados en células resistentes a IMiDs, entre los cuales encontramos varios cuyo análisis de predicción presentaba un valor elevado para unirse a la región reguladora 3'UTR del ARNm de *CRBN*, y regular así su expresión. Sin embargo y sorprendentemente, los estudios funcionales de sobreexpresión de miméticos o inhibidores de miARNs en células sensibles y resistentes, respectivamente, tan sólo mostraron cambios sutiles en la expresión de CRBN y en la resistencia. Es posible que esto sea debido a limitaciones de la técnica, ya que está basada en ensayos de transfección por nucleofección que dan lugar a una sobreexpresión o inhibición transitoria de estos miARNs. También es posible que, para que tenga lugar una infraexpresión de CRBN, sea necesaria la sobreexpresión de una determinada combinación de miARNs diferente a las evaluadas en esta tesis doctoral, e incluso la combinación de diversos modificadores epigenéticos. Son

necesarios otros estudios que evalúen el efecto de la sobreexpresión estable o prolongada de combinaciones de uno o varios de los miARNs aquí detectados para determinar el papel de éstos en la expresión de CRBN.

**CAPÍTULO III:
IDENTIFICACIÓN DE GENES DE
SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A IMiDs
MEDIANTE CRIBADOS DE LIBRERÍAS DE
CRISPR-Cas9 DE GENOMA COMPLETO**

Teniendo en cuenta las posibilidades que plantea la utilización de cribados de librerías de CRISPR-Cas9 y la relevancia de los estudios de resistencias en MM, en este tercer capítulo nos hemos basado en esta tecnología para identificar los mecanismos de sensibilidad y resistencia a Pd, que posteriormente permitirán identificar y evaluar estrategias para revertir estas resistencias.

En esta tesis doctoral se utiliza por primera vez la tecnología de cribados de librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo para analizar los mecanismos de sensibilidad y resistencia a una combinación farmacológica (pomalidomida y dexametasona) y se estudian mediante cribados de selección negativa los genes cuya inhibición podría revertir esta resistencia.

1. CRIBADO DE SELECCIÓN POSITIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SENSIBILIDAD A Pd EN MM

El cribado llevado a cabo en este apartado está basado en la selección positiva de aquellas células en las que la inactivación o ausencia de un gen les confiere resistencia farmacológica; por lo tanto, las sgRNAs de ese gen se encontrarán sobrerrepresentadas en el grupo de células tratadas con Pd respecto al grupo control. Este tipo de cribados pueden arrojar información relevante acerca de los mecanismos de acción y de resistencia farmacológica.

Para llevar a cabo este cribado *knockout* (KO) de selección positiva de genoma completo, se realizaron transducciones lentivirales para facilitar la entrega del material genético en las células de mieloma. Así, en la línea celular sensible MM.1S se indujo la expresión constitutiva de la endonucleasa Cas9 (MM.1S-Cas9) con el plásmido lentiCas9-Blast (#52962, Addgene), sobre la que posteriormente aplicamos la librería de sgRNAs de genoma completo GeCKO (#1000000049, Addgene) con el objetivo de obtener una población celular en la que cada célula sea transducida por una sola sgRNA. Es muy importante determinar la funcionalidad de la endonucleasa Cas9 tras su sobreexpresión en las células antes de la realización de los cribados de CRISPR-Cas9. Para ello, se utilizaron las células MM.1S-Cas9 y se transdujeron con un plásmido que induce la

expresión de GFP y una sgRNA que guía a la endonucleasa Cas9 sobre el ADN de GFP (#59702, Addgene). De este modo, si las células expresan una endonucleasa Cas9 funcional deberíamos observar cómo la expresión de GFP desaparece a lo largo del tiempo. En nuestro caso, las células MM.1S-Cas9 mostraron una expresión de una Cas9 funcional (**Figura 4.46**).

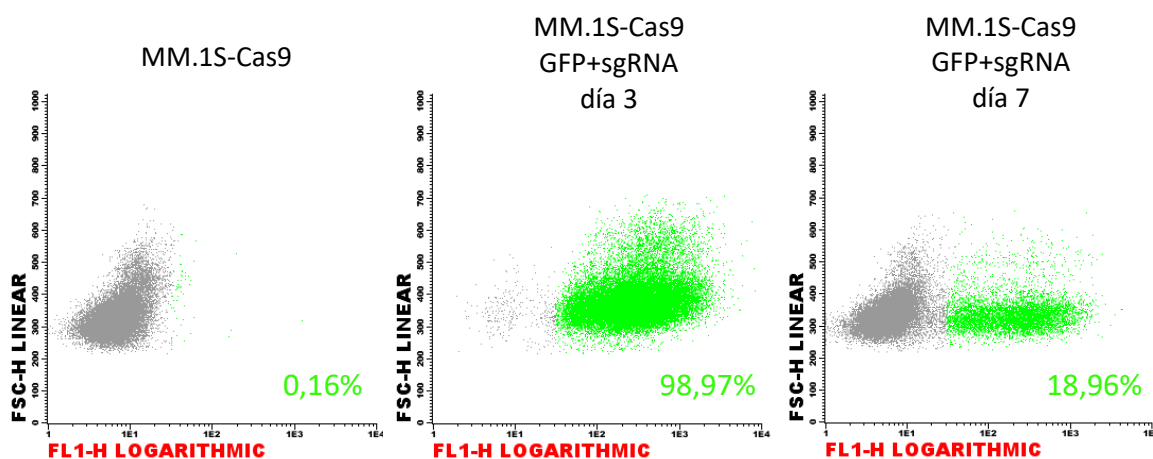


Figura 4.46. Comprobación de la funcionalidad de la endonucleasa Cas9 mediante citometría de flujo en la línea MM.1S-Cas9.

Para asegurar la correcta identificación de cada sgRNA tras la selección de la línea celular transducida con la librería, se ha de utilizar un número inicial de células de modo que se cumpla la proporción de > 500 células por sgRNA. Además, en este cribado es importante que cada célula lleve una sola alteración, de modo que para asegurar que cada célula sea infectada por una sólo partícula lentiviral (que contiene una única sgRNA), transdujimos las células en una proporción 3:1 (células de mieloma: partícula viral). Posteriormente llevamos a cabo una selección con Pd o con el vehículo control (DMSO, dimetilsulfóxido, y etanol 100%) durante 21 días utilizando 3 réplicas biológicas, de modo que recogimos las células en dos tiempos: 0 y 21 días (**Figura 4.47**). A lo largo del tratamiento con Pd, aquellas células que tengan un KO de un gen que contribuya a la sensibilidad a Pd verán enriquecida su proporción en relación al resto de la población celular, de modo que las sgRNAs que lleven estarán sobrerrepresentadas en la condición de tratamiento con respecto al control. Por el contrario, los genes cuyas sgRNAs se

encuentren infrarrepresentadas en la condición de tratamiento, son genes cuya ausencia podría sensibilizar a la combinación Pd. Por otro lado, es importante analizar la representación de las sgRNAs al comienzo del experimento ($t = 0$), dado que esta condición es utilizada en algunos algoritmos de análisis para normalizar las sgRNAs identificadas al comparar la representación entre las condiciones de tratamiento con Pd y control, y permite discriminar posibles *drivers* tumorales que hayan sido identificados en esta comparación.

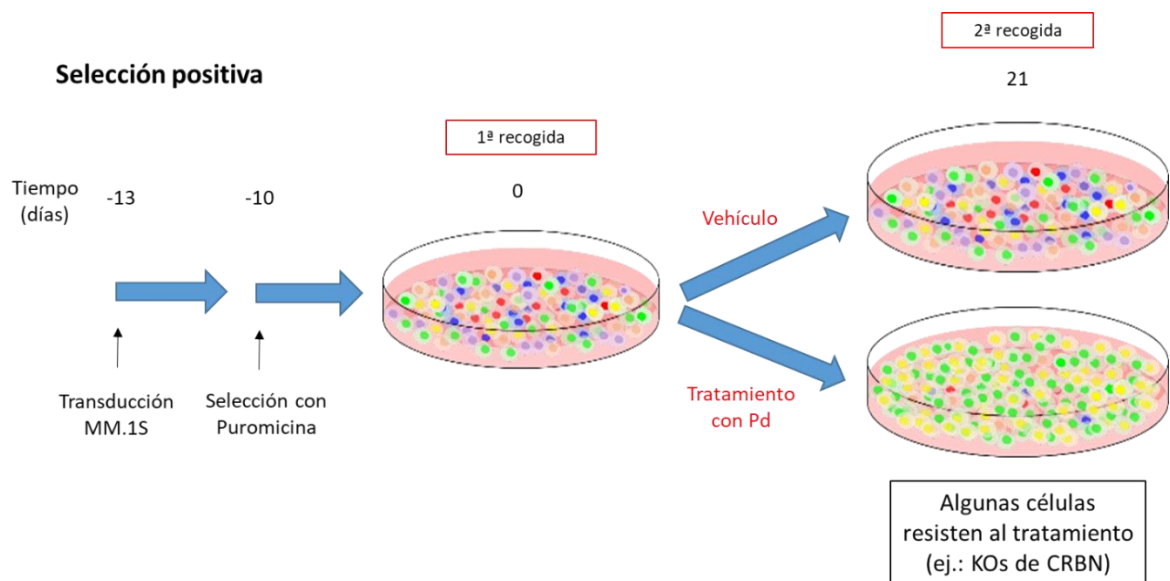


Figura 4.47. Esquema temporal del cribado por selección positiva de genoma completo mediante la tecnología de CRISPR KO - Cas9. Tras la infección lentirival, las células MM.1S-Cas9 transducidas con la librería de sgRNAs fueron seleccionadas durante 10 días con $1,5 \mu\text{M}$ de puromicina. Una vez seleccionadas, se llevó a cabo el cribado durante 21 días con la combinación Pd o con el vehículo control. P: pomalidomida. d: dexametasona. Dosis de pomalidomida: 15 nM . Dosis de dexametasona: $2,5 \text{ nM}$. Tiempo de tratamiento: 21 días.

La monitorización del experimento a lo largo del tiempo se llevó a cabo mediante conteo celular (**Figura 4.48**) y determinación de la muerte celular por citometría de flujo (**Figura 4.49**). En ambas condiciones, vehículo y tratamiento, se partió de 30 millones de MM.1S-Cas9 (por comodidad, a continuación nos referiremos a estas células como MM.1S). Las células tratadas con el vehículo proliferaron desde el comienzo del experimento y no mostraron cambios en el porcentaje de muerte celular. Por el contrario, la población de células tratadas con Pd redujo su número y mostró ~ un 50% de muerte celular a partir del día 3 de tratamiento. A día 10 y hasta el día 21 de tratamiento, las células tratadas con Pd redujeron progresivamente el porcentaje de muerte celular y aumentaron en número hasta alcanzar los valores de la población control.

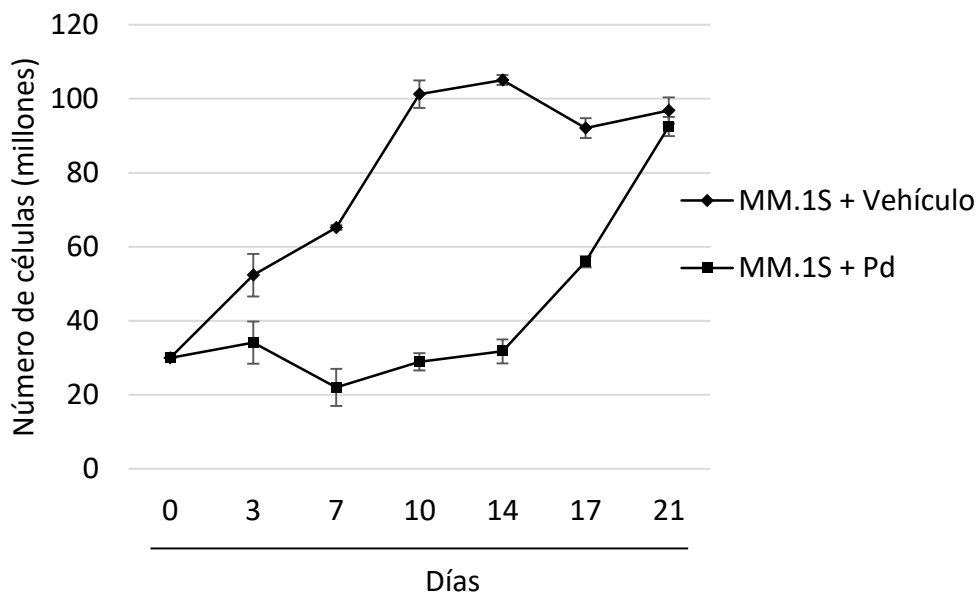


Figura 4.48. Contaje celular de MM.1S infectadas con la librería CRISPR KO a lo largo del tiempo de la selección positiva con Pd. El número máximo de células MM.1S que se mantuvo en cada frasco de cultivo fue de aproximadamente 100 millones.

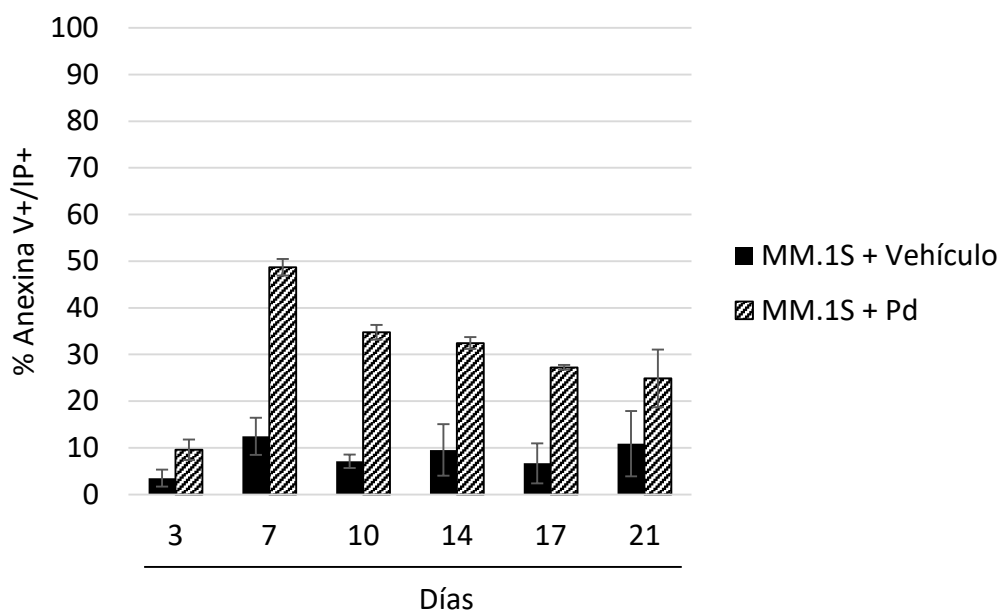
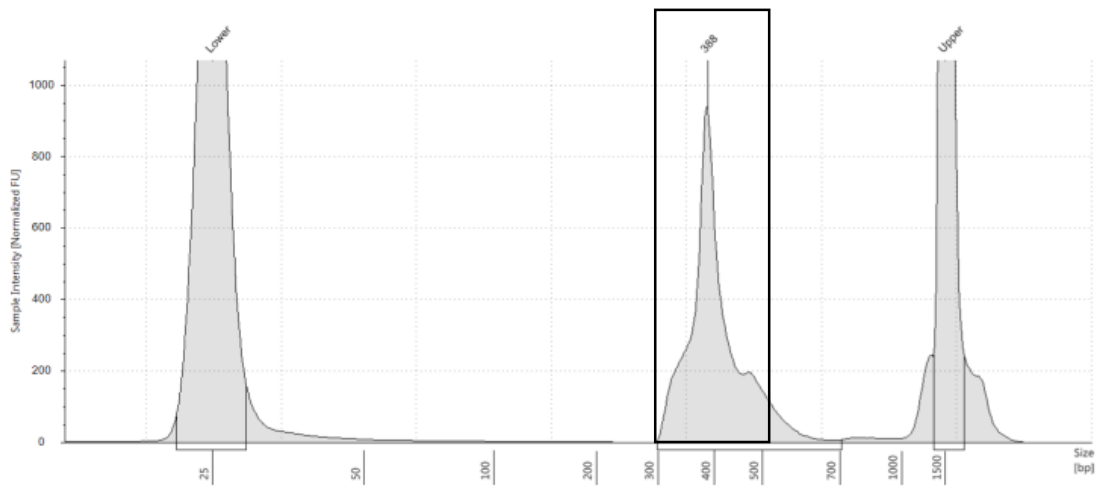


Figura 4.49. Monitorización de la muerte de MM.1S infectadas con la librería CRISPR KO mediante citometría de flujo a lo largo del tiempo de selección positiva con Pd.

Para identificar aquellos genes cuyas sgRNAs se encuentran sobrerrepresentadas o infrarrepresentadas en la condición de tratamiento con Pd, se llevó a cabo la secuenciación de estas sgRNAs mediante una metodología de NGS (*Next Generation Sequencing*) basada en amplicones. Esta metodología consta de 2 PCRs consecutivas. En la primera, se amplificó una región del plásmido que incluye todas las sgRNAs, y en la segunda, se añadieron las secuencias necesarias para poder diferenciar las lecturas de cada una de las muestras y para que sean secuenciadas correctamente en el equipo. De este modo, se obtuvieron amplicones con unos parámetros óptimos para ser secuenciados (única banda, de tamaño y concentración adecuados, **Figura 4.50**).



Sample Table

Well	Conc. [ng/μl]	Sample Description	Alert	Observations
A2	3.82	R8		

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/μl]	Assigned Conc. [ng/μl]	Peak Molarity [nmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	6.63	-	408	-		Lower Marker
388	3.82	-	15.1	100.00		
1500	6.50	6.50	6.67	-		Upper Marker

Figura 4.50. Bioanálisis mediante TapeStation del resultado de la amplificación del ADN por PCR en dos pasos. Se muestra una banda de pico único correspondiente al amplicón generado tras la PCR2, de un tamaño de 388 pb y una concentración de 3,82 ng/μl.

Una de las principales limitaciones de la secuenciación por NGS en los cribados de CRISPR-Cas9 es la escasa variabilidad entre las muestras. Los equipos de secuenciación están basados en una tecnología de detección por colores y diseñados para secuenciar muestras con elevada variabilidad (distintos tipos de muestra, genes, pacientes, etc). Sin embargo, en este caso, las muestras son iguales salvo en los 20 nucleótidos que corresponden a las sgRNAs, ya que tras la infección lentiviral se produce la integración en el genoma de las células MM.1S del fragmento comprendido entre las regiones de recombinación del plásmido que contiene las sgRNAs. De este modo, si secuenciásemos amplicones con tan poca variabilidad, en toda la superficie del soporte o *flow cell* se detectaría el mismo color y el sistema óptico de los secuenciadores (MiSeq o NextSeq, Illumina) no podría enfocar correctamente sobre esta superficie, ya que no está diseñado para esta finalidad. Esto llevaría a obtener un valor de calidad de *passing filter* muy bajo y por consiguiente a un fallo en la secuenciación.

Para evitar esta limitación, utilizamos 8 primers *forward* con una región que denominamos espaciadora y que consiste en una región variable (de 1 a 8 nucleótidos) que permite cambiar el “marco de lectura” en las secuencias y multiplicar por 8 la variabilidad global de las mismas. Así, logramos superar esta limitación y obtener unos valores de calidad adecuados (**Figura 4.51**).

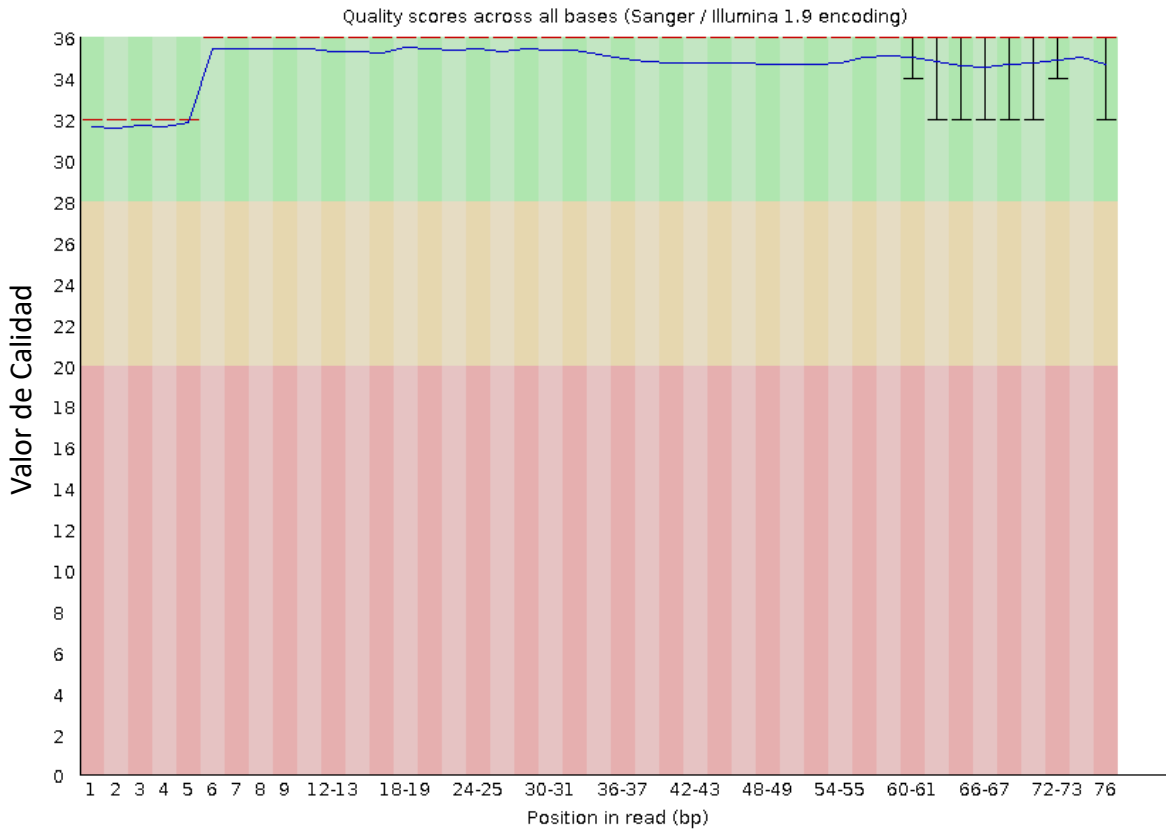


Figura 4.51. Las lecturas obtenidas en la secuenciación por NGS muestran valores óptimos de calidad. El gráfico muestra las puntuaciones de calidad de cada posición de las lecturas. La línea azul indica la puntuación de calidad media para cada base. El color de fondo delimita 3 zonas diferentes: muy buena calidad (verde), calidad razonable (naranja) y calidad baja (rojo).

El número medio de lecturas por sgRNA fue superior a 100 (**Figura 4.52**), que es la cobertura mínima recomendada para poder determinar la representación de las sgRNAs en la población celular de forma robusta [279].

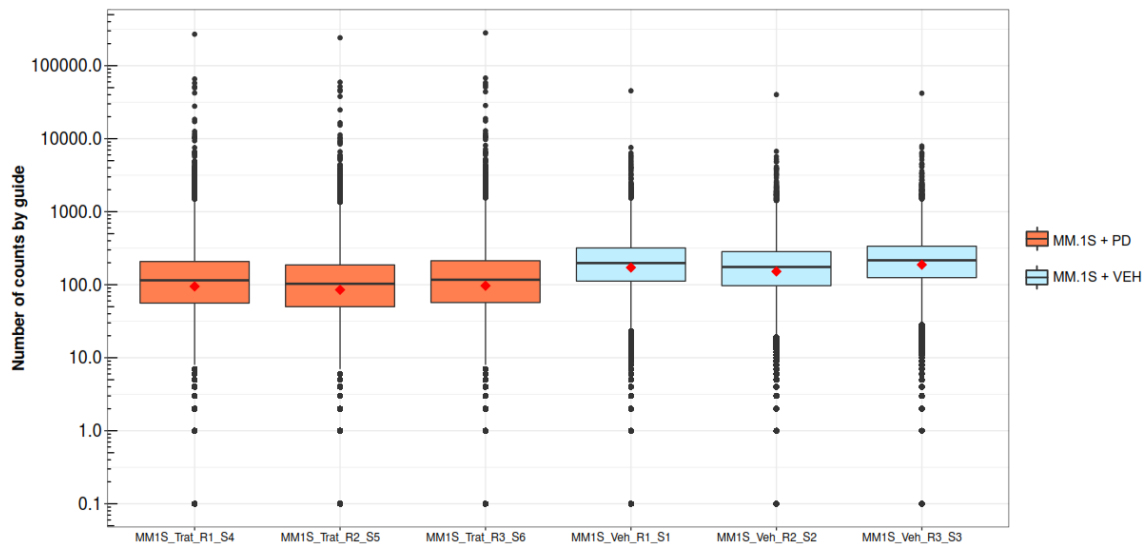


Figura 4.52. El número medio de lecturas identificadas como “perfect match” por sgRNA en las distintas muestras fue superior a 100.

Una vez secuenciadas las 3 réplicas biológicas en las condiciones tratamiento, control y tiempo 0, se analizaron aquellas sgRNAs cuya representación variaba en las células MM.1S tratadas con Pd respecto a las tratadas con el vehículo. El análisis de los datos de NGS para la detección de las sgRNAs y su representación se realizó con el algoritmo MAGeCK (*Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockout*), en concreto con sus funciones RRA (*Robust Rank Aggregation*) y MLE (*Maximum-Likelihood Estimation*) [280]. Posteriormente se llevó a cabo un filtrado de los genes identificados, considerando aquellos que tuvieran 3 o más sgRNAs significativa y diferencialmente representadas en los grupos de tratamiento y control, además de presentar un *fold change* > 2 para acotar aquellos genes que podrían contribuir más en la resistencia a Pd. De este modo, se encontraron 300 genes cuyas sgRNAs se encontraban sobrerrepresentadas en el grupo de tratamiento, sugiriendo que la inactivación de estos genes podría inducir resistencia a esta combinación (**Figura 4.53**). De especial interés, el análisis con ambos algoritmos RRA y MLE arrojó resultados muy similares, tanto en número de genes como en los genes identificados, de modo que tan sólo hemos indicado los resultados del análisis RRA (**Tabla 7.1, Anexo 1**).

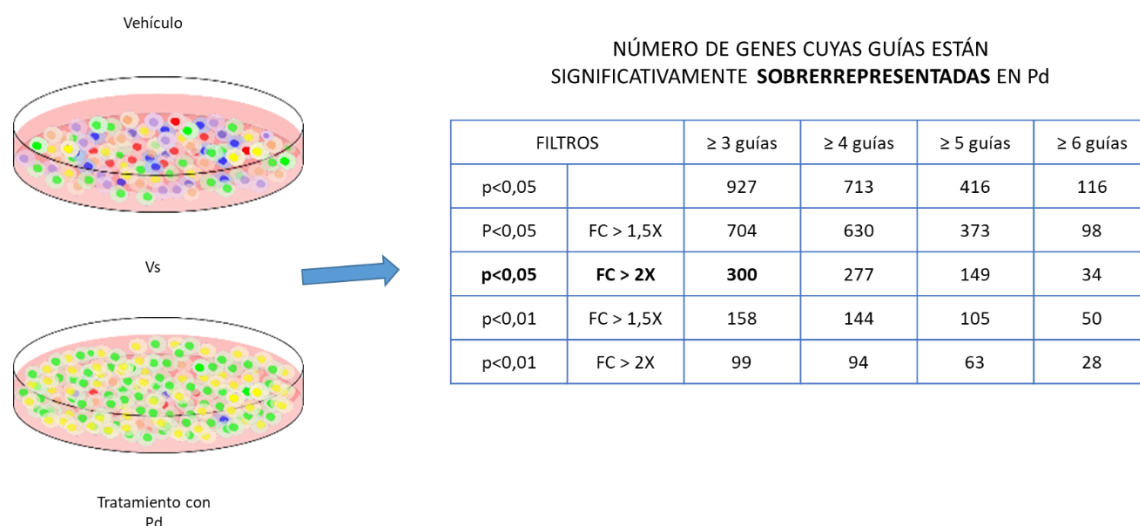


Figura 4.53. Determinación del número de genes o “hits” cuyas guías están significativamente sobrerrepresentadas tras 21 días de tratamiento con Pd respecto a la condición de tratamiento con vehículo.

Llevamos a cabo un análisis de enriquecimiento con los 272 genes codificantes de proteína de los 300 *hits* identificados. Entre las rutas y procesos enriquecidos en los genes codificantes de proteína destacan las relacionadas con el metabolismo, la proliferación y crecimiento celular, el transporte y modificaciones de proteínas, así como otras como la respuesta celular a fármacos o la agregación celular (**Figura 7.1** y **Tabla 7.2, Anexo 1**). Además, el análisis de funciones moleculares reveló un enriquecimiento de las funciones relacionadas con modificaciones de proteínas, especialmente las relacionadas con la transferencia o unión de moléculas tipo ubiquitina (**Tabla 4.11**).

Tabla 4.11. Análisis de enriquecimiento de funciones moleculares con los 272 genes resultado de la selección positiva.

Gene Set	Description: Molecular Function	P Value
GO:0070840	dynein complex binding	0.0030632
GO:0019787	<u>ubiquitin-like protein transferase activity</u>	0.010613
GO:0043028	<u>cysteine-type endopeptidase regulator activity involved in apoptotic process</u>	0.017602
GO:0044389	<u>ubiquitin-like protein ligase binding</u>	0.019574
GO:0004712	<u>protein serine/threonine/tyrosine kinase activity</u>	0.019986
GO:0051861	glycolipid binding	0.029240
GO:0043621	<u>protein self-association</u>	0.037826
GO:0140103	catalytic activity, acting on a glycoprotein	0.037928
GO:0051059	NF-kappaB binding	0.054258
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	0.061134
GO:0031491	nucleosome binding	0.063786
GO:0030594	neurotransmitter receptor activity	0.071550
GO:0001530	lipopolysaccharide binding	0.072584
GO:0051082	unfolded protein binding	0.075157
GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	0.082062
GO:0016776	phosphotransferase activity, phosphate group as acceptor	0.092578
GO:1990782	protein tyrosine kinase binding	0.095974
GO:0017069	snRNA binding	0.096750
GO:0032451	demethylase activity	0.096750

Entre los 300 genes cuyas sgRNAs se encuentran sobrerrepresentadas en la condición de tratamiento tras 21 días, el gen con mayor puntuación fue *CRBN*, con las 6 sgRNAs sobrerrepresentadas, un p-valor de 2,28E-07 y un *fold change* > 95 (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Análisis MAGeCK-RRA mostrando los Top-10 genes ordenados por p-valor cuyas guías aparecen sobrerrepresentadas en las células tratadas con Pd respecto al vehículo (p-valor < 0,05; FC > 2). sgRNAs: número de sgRNAs significativamente sobrerrepresentadas en la condición de tratamiento para cada gen. FC: Fold Change.

Gen	p-valor	sgRNAs	FC	Funciones
<i>CRBN</i>	2,28E-07	6	95,82	Receptor E3 ligasa. Diana conocida de pomalidomida
<i>SPOP</i>	2,28E-07	6	7,16	Componente E3 ligasa (BTB-CUL3-RBX1 <i>E3 ubiquitin-protein ligase complex</i>). Modula la represión transcripcional a través de DAXX, que interactúa con histona desacetilasas, histonas y otras proteínas asociadas a histonas
<i>COPS7B</i>	6,27E-05	5	3,67	Componente signalosoma COP9
<i>KRTAP23-1</i>	0,00013711	3	3,55	Proteína asociada a queratina
<i>AP3B2</i>	0,00014624	4	3,11	Papel en el transporte de proteínas en endosomas o Golgi (late/trans)
<i>DNPEP</i>	0,00015217	5	5,28	Amino-peptidasa, proteólisis
<i>TEX35</i>	0,00020282	5	3,25	Desconocido
<i>NCOR1</i>	0,00023316	4	3,60	Promueve condensación de la cromatina, inhibiendo la transcripción. Forma parte de un complejo que promueve la desacetilación de histonas y la formación de estructuras de represión que impiden el acceso de factores de transcripción
<i>ZBTB14</i>	0,00023522	5	3,84	Represor transcripcional de c-Myc y otros promotores timidín quinasa
<i>UBE2G1</i>	0,00025757	4	2,74	Ubiquitín protein ligasa

De forma interesante, el segundo gen con mayor puntuación identificado fue *SPOP* (*Speckle Type BTB/POZ Protein*), un gen codificante de una proteína componente de una E3 ligasa que tiene como sustrato la proteína c-Myc y que además participa en procesos de modificación de histonas [347]. Se encontraron también otras proteínas relacionadas con procesos de ubiquitinación como UBE2G1 y otras, que no estando en el Top-10, también resultaron significativas (UBE2A, PLAA, MIB2, PHF7, ARMC8, FBXO33, FBXO21, KLH42 y KLHL9) (**Tabla 7.1, Anexo I**). Por otro lado, se identificaron componentes del signalosoma COP9 (COPS7B, COPS2), así como proteínas implicadas en procesos de regulación transcripcional o epigenética como NCOR1, MBD2, CBX7, HIST1H1A, HDAC3, HDAC7, PHF7, GZMA, HMGN4, FGR1, ZBTB14, TNRC18, SMARCD1, CBX1, WAC, RBBP9, MBD2 y TNRC18. Además, se encontraron algunos genes que codifican proteínas relacionadas con la vía de NOTCH como JAG1, KDELC1 y MIB2 (que forma parte de una E3 ligasa que ubiquitina moléculas de esta vía marcándolas para su degradación); así como el supresor tumoral PTEN (**Tabla 7.1, Anexo I**).

Como se ha comentado anteriormente, los genes identificados mediante los análisis RRA y MLE fueron prácticamente los mismos, salvo que la puntuación asociada a cada gen varía entre ambos análisis, de modo que en el Top-10 de genes obtenido mediante el análisis MLE se encontraron otros genes como PALM2-AKAP2, NFKBIA, PCDHGA5, FAM72D, DNAJA4 y PRDM9 (**Figura 7.2, Anexo I**).

De los 300 genes cuyas sgRNAs se encontraron sobrerrepresentadas en el grupo de tratamiento, nos propusimos profundizar en el estudio y evaluar algunos de ellos atendiendo a su función, así como a su p-valor y *fold change* asociados (**Figura 4.54**).

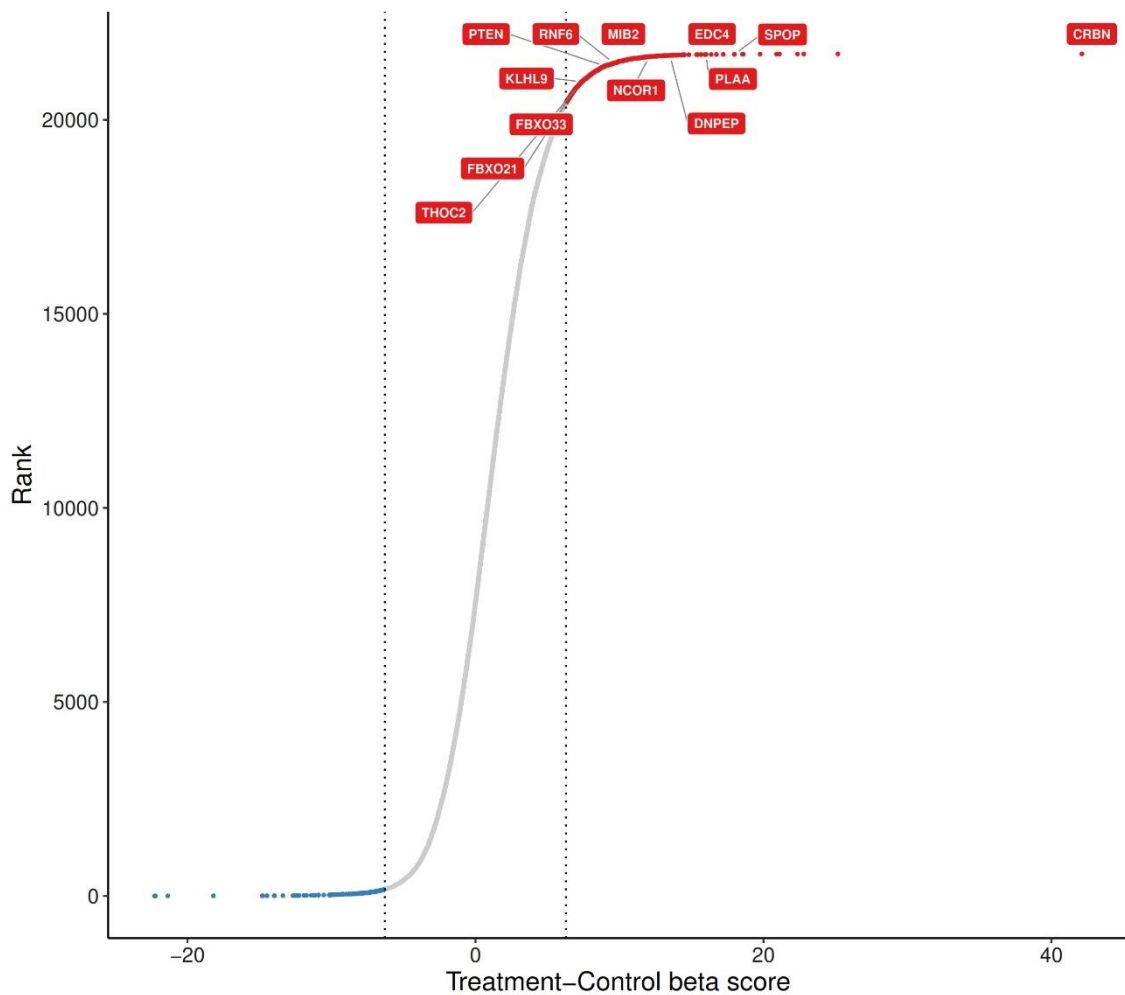


Figura 4.54. Genes identificados seleccionados atendiendo a su *p*-valor, fold change y función.

El gen *SPOP*, segundo gen identificado de mayor puntuación después de *CRBN* tanto en el análisis RRA como en el MLE, se expresa de forma elevada en líneas celulares de mieloma múltiple (**Figura 4.55**). Además y de forma interesante, a través de un análisis bioinformático con la herramienta *ARCHS*⁴, que utiliza un repositorio de matrices de co-expresión basada en datos de ARN-seq de muestras humanas [324], identificamos que *CRBN* podría ser una de las moléculas que más se co-expresa con *SPOP*. Por otro lado, *SPOP* y *CRBN* tienen funciones biológicas y moleculares similares, siendo ambas componentes de E3 ligasas que median la ubiquitinación de proteínas diana y su posterior degradación en el proteasoma.

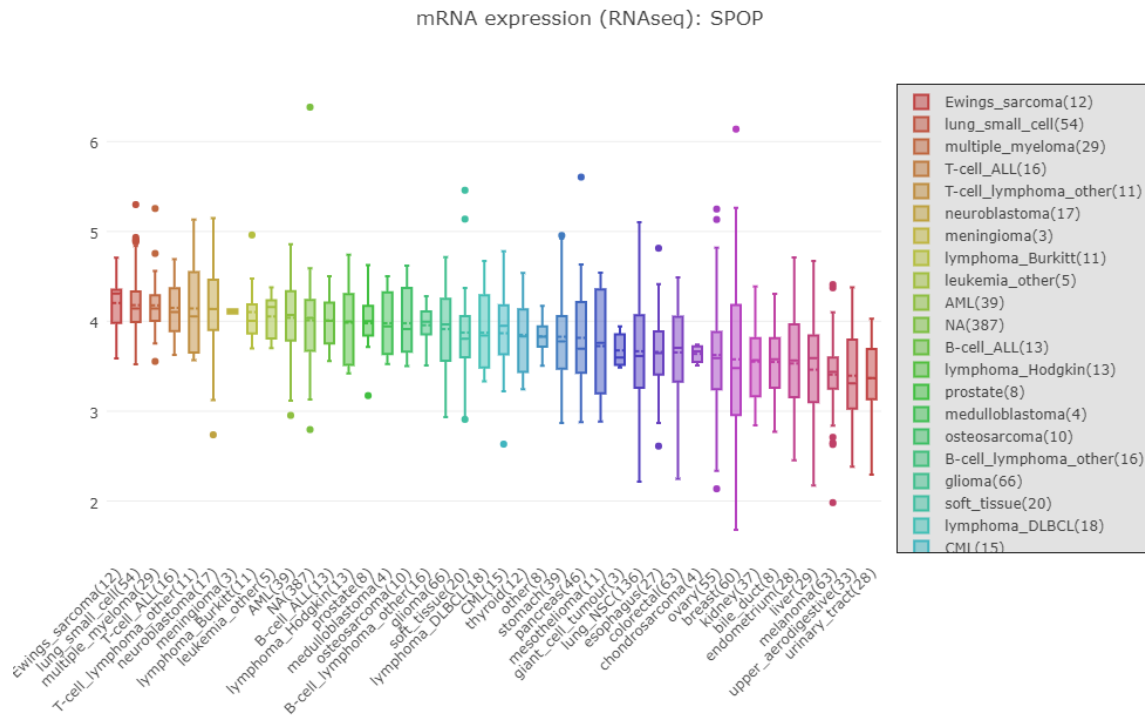


Figura 4.55. Expresión de SPOP en distintas líneas celulares. Obtenido de Berglund L., et al. [348]. Las líneas celulares hematológicas y, especialmente las líneas de MM, muestran una elevada expresión de este gen.

Realizamos también un alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* [349]) entre las proteínas CRBN y SPOP que determinó un porcentaje de identidad de en torno a un 30% (**Figura 4.56**). Parte de esta identidad se da en regiones clave para la unión de los IMiDs con CRBN, y en especial de pomalidomida con CRBN [196,197].

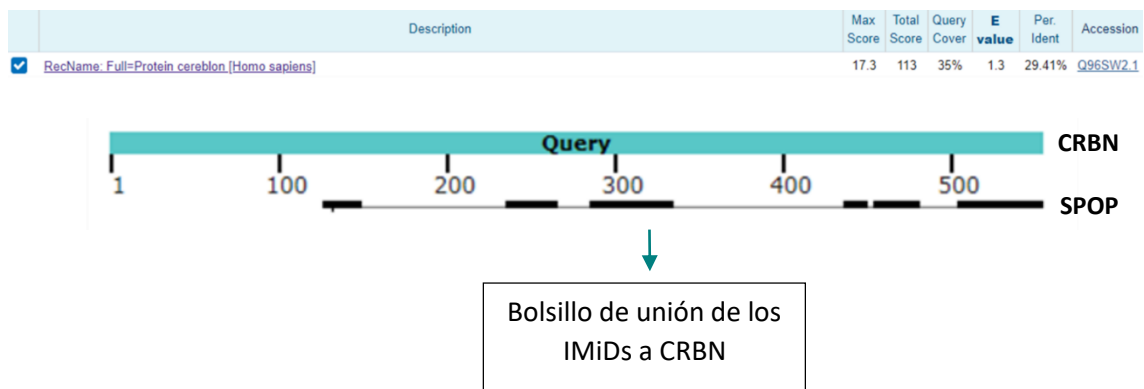


Figura 4.56. Alineamiento entre las secuencias proteicas de CRBN y SPOP.

Para validar el papel de SPOP y otros genes identificados (RNF6, NCOR, MIB2, EDC4, FBXO33, FBXO21, PLAA, PTEN, KLHL9, THOC2) cuya ausencia podría inducir resistencia a Pd, se generó por CRISPR-Cas9 una línea celular KO para cada uno de los genes seleccionados y posteriormente se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular bajo tratamiento con Pd. Para ello, seleccionamos sgRNAs para cada gen teniendo en cuenta su eficiencia de edición [350,351], su especificidad [352] y la expresión de las distintas isoformas del gen en las células de mieloma [353,354]. Priorizamos la utilización de sgRNAs de la librería GeCKO utilizada en el cribado, siempre que estuviese dirigida a una región compartida por las distintas isoformas y mostrase unos valores de eficiencia y especificidad elevados.

Durante el proceso de generación de KOs individuales para cada uno de los genes y antes de la separación célula a célula para obtener clones homogéneos, se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular con la población total de células transducidas con lentivirus que llevan las sgRNAs correspondientes (“*pools KO*”). Se analizó la eficiencia de edición de las sgRNA amplificando por PCR la región diana, secuenciando y comparando el ADN de los “*pools KO*” y el de células transducidas con el vector vacío (sin sgRNA) mediante el software *TIDE* [355]. En la validación individual de los genes elegidos, se obtuvo una eficiencia de edición de aproximadamente un 30-50% (**Figura 4.57**).

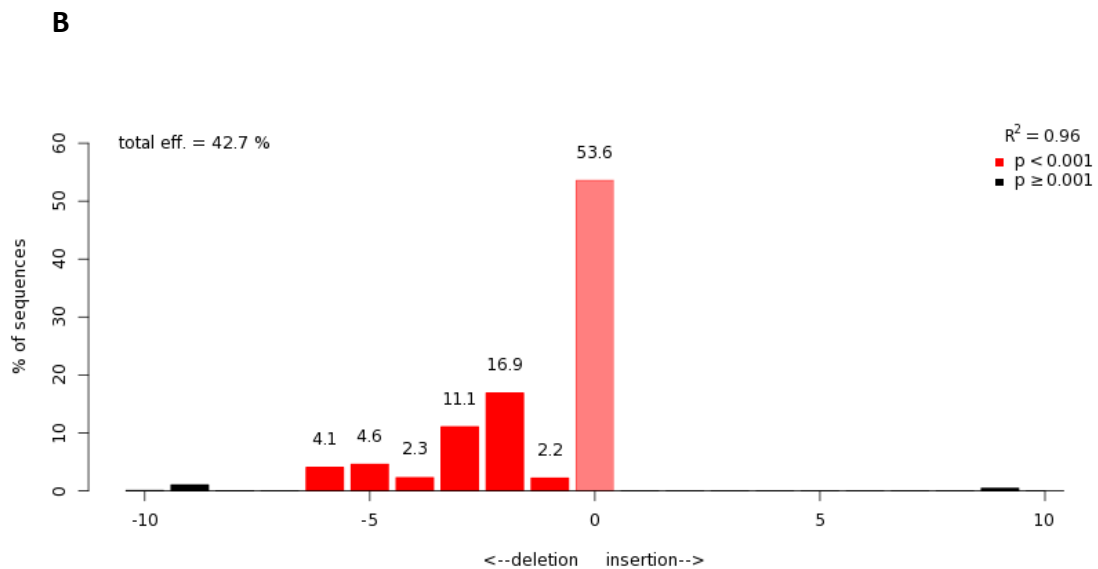
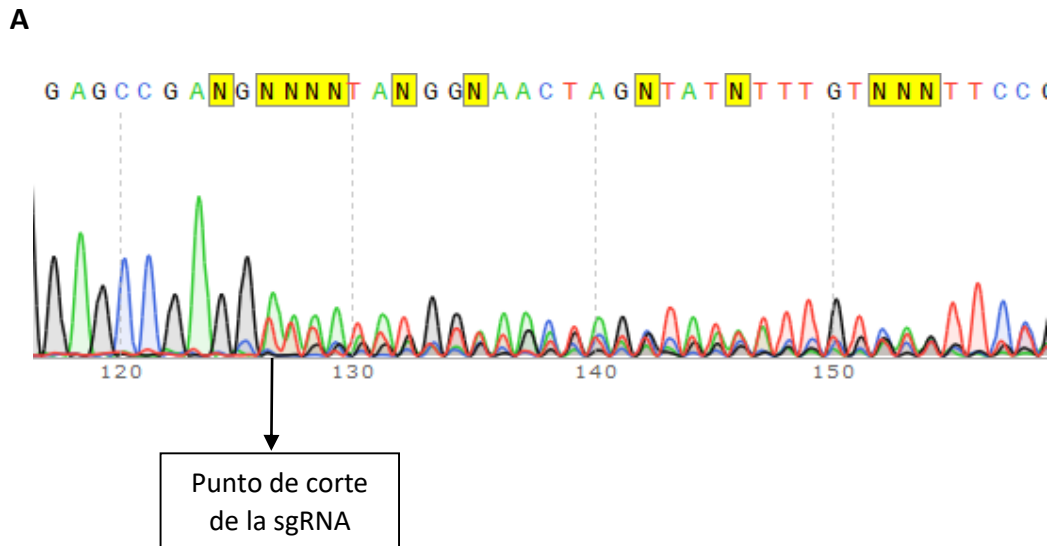


Figura 4.57. La eficiencia de edición de las sgRNA empleadas se sitúa entre un 30% y un 50%. Se muestra como ejemplo el punto de corte y la eficiencia de edición obtenida para el gen SPOP. A: punto de corte de la sgRNA del gen SPOP en el ADN. B: eficiencia de edición de la sgRNA del gen SPOP. En B, el eje de ordenadas indica la proporción de secuencias que presentan una determinada alteración. El eje de abscisas representa las alteraciones identificadas de tipo deleción (a la izquierda del 0) o inserción (a la derecha del 0) en número de pares de bases. Por ejemplo, el 16,9% de las secuencias muestran una deleción de 2 pares de bases.

Encontramos que los “*pooles KO*” para los genes CRBN, SPOP, EDC4, FBXO33, NCOR1 y PLAA muestran una menor respuesta a Pd (**Figura 4.58**).

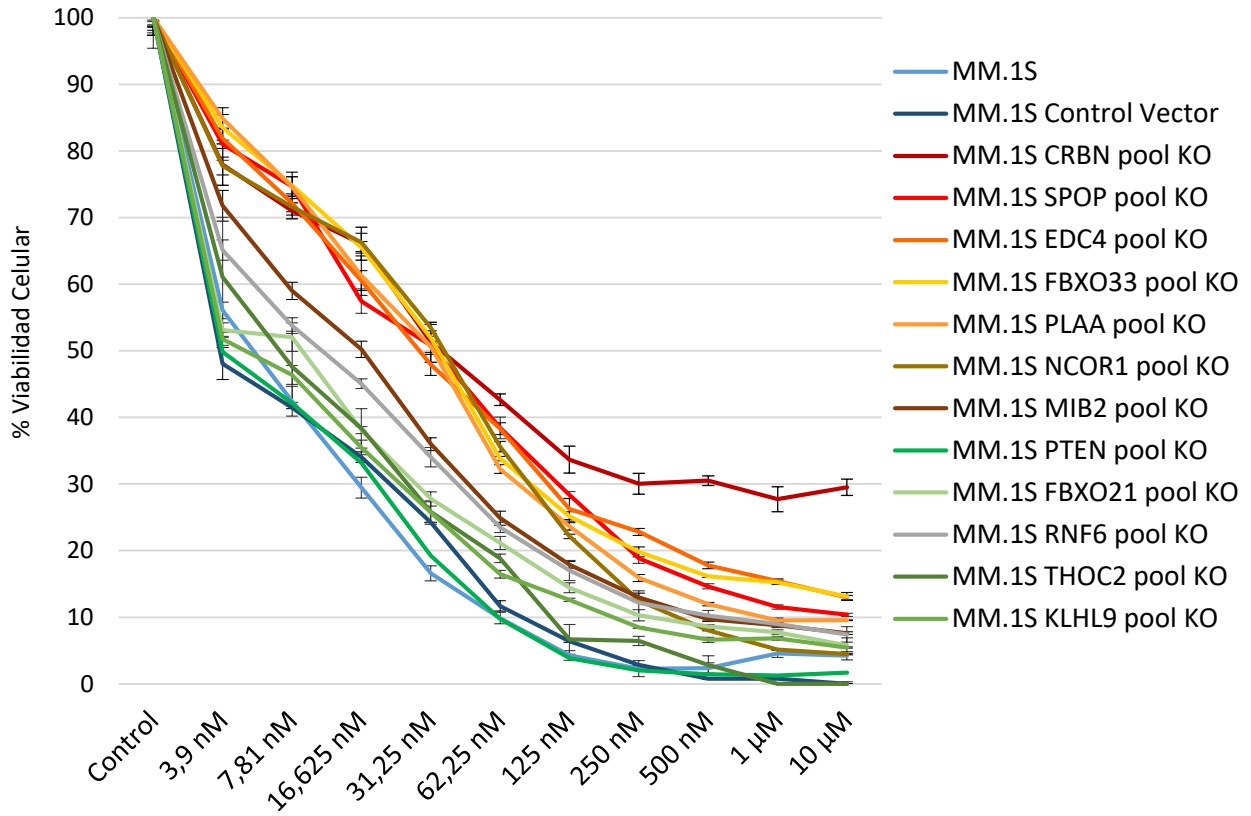


Figura 4.58. Análisis de viabilidad celular de los modelos de línea celular MM.1S “*pool KO*” tratados con la combinación Pd. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

También se trataron algunos de los “*pooles KO*” con Ld para determinar si había resistencia cruzada con los genes considerados. En los análisis que se han llevado a cabo hasta el momento, únicamente los “*pooles KO*” EDC4 y FBXO33 han mostrado una ligera menor respuesta a Ld (**Figura 4.59**).

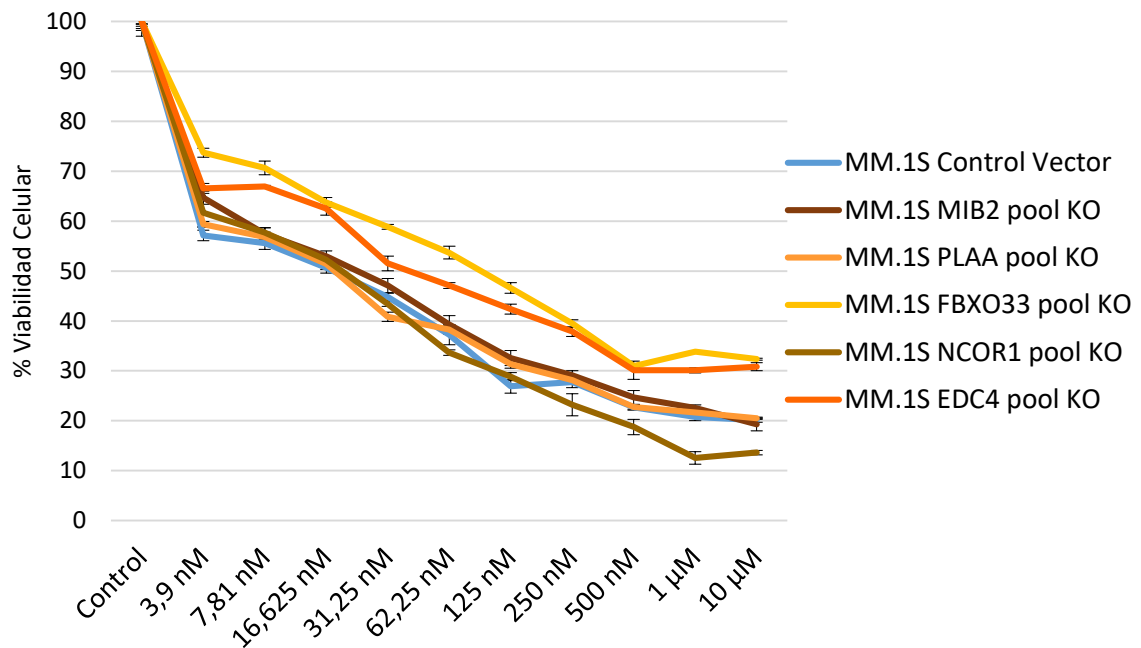


Figura 4.59. Análisis de viabilidad celular de los modelos de línea celular MM.1S “pool KO” tratados con la combinación Ld. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

Por otro lado y tras llevar a cabo una separación célula a célula para obtener clones de células KO, pudimos obtener una población homogénea de células KO para el gen *SPOP*. Encontramos que esta población celular muestra menor sensibilidad a la combinación Pd (**Figura 4.60**). El mismo proceso se llevó a cabo con la línea celular OPM-2, cuyos clones KO para el gen *SPOP* también mostraron menor sensibilidad a Pd (**Figura 4.61**). Actualmente, nos encontramos en el proceso de generación de más clones de células KO para el gen *SPOP*, así como para los genes *EDC4*, *FBXO33* y *NCOR1*, entre otros, en ambas líneas MM.1S y OPM-2 para validar los resultados del estudio de selección positiva a Pd.

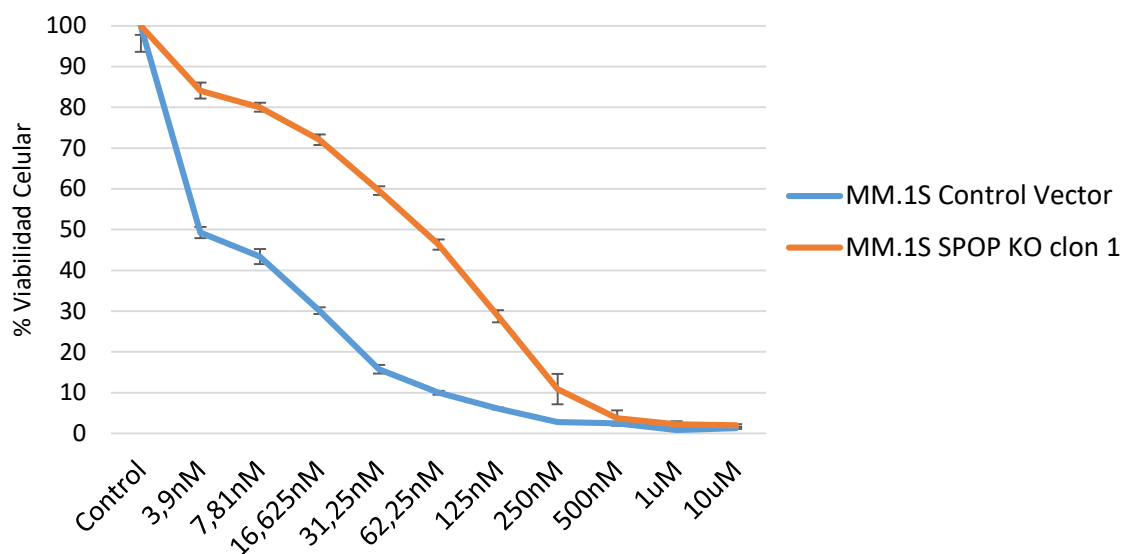


Figura 4.60. Análisis de viabilidad celular de un clon de células MM.1S KO para el gen SPOP ante la combinación Pd. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

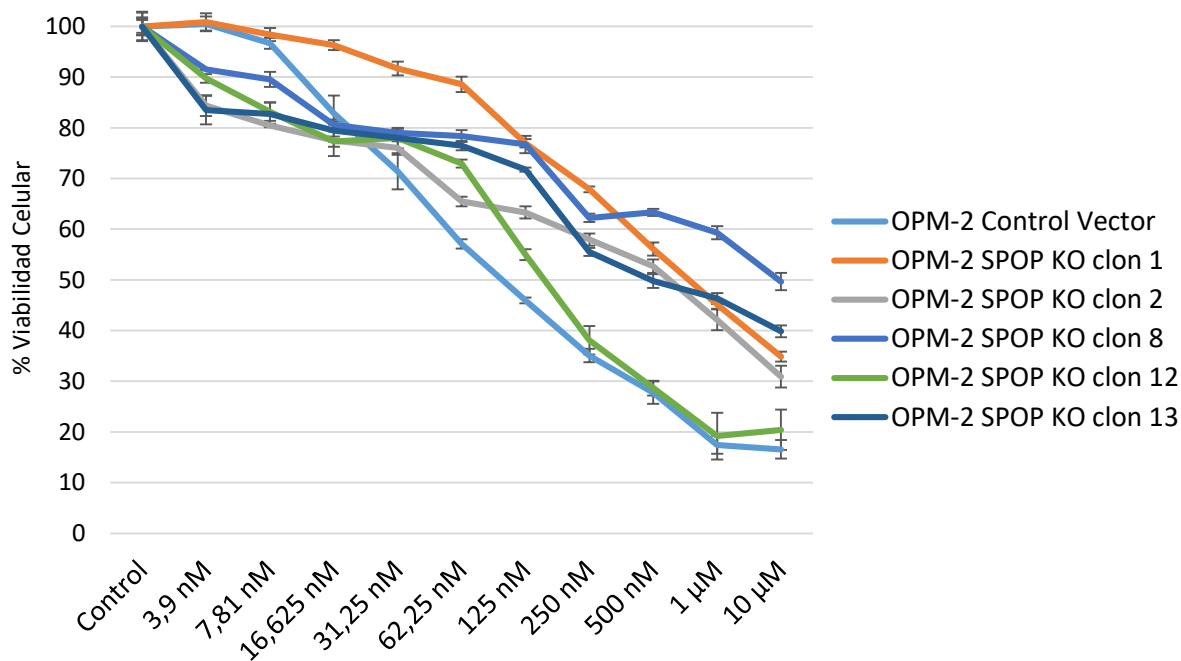


Figura 4.61. Análisis de viabilidad celular de clones células OPM-2 KO para el gen SPOP con la combinación Pd. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

Además de la información obtenida de aquellas sgRNAs sobrerrepresentadas bajo tratamiento con Pd, se analizaron los genes cuyas sgRNAs se encuentran infrarrepresentadas con respecto a la condición control, ya que estas poblaciones KO para un gen determinado han visto reducida su representación con respecto al conjunto de poblaciones, indicando que la ausencia de estos genes podría sensibilizar a la combinación Pd.

Al realizar un filtrado de los genes que mostraron al menos 3 sgRNA significativamente infrarrepresentadas con un *Fold Change* < 0,5 se identificaron 213 genes de los cuales 35 son miARNs (**Tabla 7.3, Anexo I**). Entre los genes Top-10 encontrados destacan los relacionados con la vía de Wnt *APCDD1L* y *CTNNB1*, y el receptor tirosín quinasa IGFR1 (**Tabla 4.13**).

Por otro lado, quisimos determinar si existían fármacos disponibles cuyas dianas estén entre los 213 genes identificados y que pudieran sensibilizar a Pd. Para ello, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento con bases de datos de fármacos y proteínas diana [274]. De los 213 genes, 175 codifican para proteínas y de ellas sólo 123 son dianas anotadas en las bases de datos. Pese a contar con un conjunto de tan sólo 123 dianas, el análisis sí reveló fármacos cuyas dianas conocidas están significativamente enriquecidas entre ellas (**Tabla 4.14**). De forma muy interesante, el análisis reveló fármacos inhibidores de PDCD1 (*Programmed Cell Death 1*, más conocido como PD-1) y de CD274 (*Programmed Cell Death 1 Ligand 1*, más conocido como PD-L1), como son los anticuerpos monoclonales atezolimumab, nivolumab y pembrolizumab.

Tabla 4.13. Análisis MAGeCK-RRA mostrando los genes Top-10 cuyas guías aparecen infrarrepresentadas en las células tratadas con Pd respecto al vehículo (p -valor < 0,05; FC < 0,5). sgRNAs: número de guías significativamente infrarrepresentadas en la condición de tratamiento. FC: Fold Change.

Gen	p-valor	sgRNAs	FC	Funciones
APCDD1L	1,35E-05	4	0,36	Regulador negativo de la vía de Wnt. La expresión incrementada podría estar asociada a cáncer colorectal [356]
DMAP1	4,68E-05	4	0,34	Codifica una subunidad implicada en la represión o activación de la transcripción. La proteína codificada puede inhibir la transcripción y está dirigida a puntos de inicio de la replicación a lo largo de la fase S al interactuar directamente con la ADN metiltransferasa 1. También participa en regulación y acetilación de la cromatina
BTN2A2	6,91E-05	4	0,31	Inhibe la proliferación de células T CD4 y CD8 activadas por anticuerpos anti-CD3, el metabolismo de las células T y la secreción de IL2 e IFNG
IGF1R	1,44E-04	4	0,39	Receptor tirosín quinasa involucrado en vías de crecimiento y supervivencia celular. Su fosforilación induce la activación de la vía PI3K-AKT y Ras-MAPK
GPRIN2	1,64E-04	6	0,36	Inductor de crecimiento neurítico regulado por proteínas G
CTNNB1	2,05E-04	4	0,45	Catenin Beta 1. Componente clave aguas abajo de la vía de Wnt.
SARS	1,03E-03	6	0,42	En el núcleo, se une al promotor central de VEGFA y previene la unión de c-Myc y la activación transcripcional por c-Myc
MYO3B	1,05E-03	5	0,46	Miosina III. Implicada en la organización de los filamentos de actina
HFE2	1,17E-03	5	0,36	Proteína que actúa como correceptor de proteína morfogénica ósea (BMP, <i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
USP54	1,27E-03	5	0,34	Peptidasa específica de ubiquitinas

Tabla 4.14. Análisis de enriquecimiento de moléculas diana con los 123 genes anotados en las bases de datos de dianas farmacológicas.

Gene Set	Description	Size	Expect	Ratio	P Value
PA166129523	<u>atezolizumab</u>	5	0.048888	40.910	0.00093027
PA166129522	<u>nivolumab</u>	7	0.068443	29.221	0.0019286
PA164712446	Antihypertensives And Diuretics In Combination	8	0.078221	25.569	0.0025551
PA164781042	flucloxacillin	8	0.078221	25.569	0.0025551
PA166124615	<u>pembrolizumab</u>	8	0.078221	25.569	0.0025551
PA449059	cloxacillin	9	0.087999	22.728	0.0032641
PA164712343	Alpha- and beta- adrenoreceptor agonists	35	0.34222	8.7664	0.0047530

2. CRIBADO DE SELECCIÓN NEGATIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES CUYA INACTIVACIÓN REVIERTA LA RESISTENCIA A Pd EN MM

Utilizando el modelo celular de resistencia a Pd que desarrollamos en el capítulo I, la línea celular RPD, desarrollamos una estrategia de selección negativa basada en la implementación de librerías de CRISPR KO-Cas9 de genoma completo, para identificar genes cuya inactivación rewertiera la resistencia adquirida. Este es el primer estudio de CRISPR KO de genoma completo que plantea esta hipótesis, suponiendo por tanto una prueba de concepto en el estudio de los mecanismos de resistencia y en el desarrollo de estrategias destinadas a revertirla.

Del mismo modo que con la línea celular MM.1S-Cas9, se generó la línea RPD con expresión estable de una endonucleasa Cas9 funcional (RPD-Cas 9). Por comodidad, en los estudios detallados a continuación, nos referiremos a esta línea únicamente como RPD.

Utilizamos la librería de CRISPR-Cas9 de genoma completo (librería GeCKO) para transducir la línea RPD, y siguiendo la misma metodología que la llevada a cabo en la selección positiva, se transdujeron las células manteniendo una proporción de >500 células por sgRNA y de 3 células por partícula viral para minimizar el riesgo de que una misma célula lleve más de una alteración. Una vez transducidas las células resistentes con la librería de sgRNAs y habiendo comprobado que mantenían la resistencia a Pd (**Figura 4.62**), las células RPD fueron tratadas con una combinación de 50 nM de pomalidomida y 2,5 nM de dexametasona o con un vehículo control durante 5 días, momento en el cual se recogieron las células y se secuenciaron las sgRNAs integradas en su genoma (**Figura 4.63**).

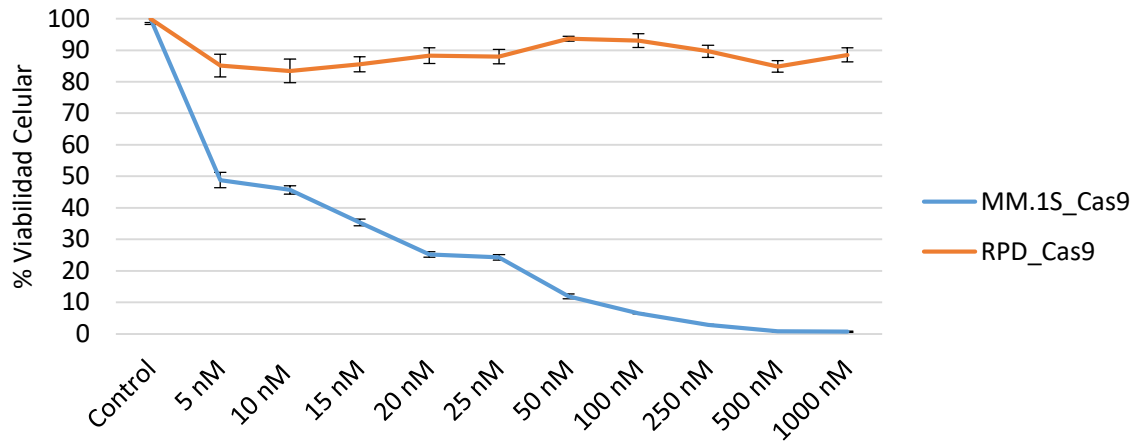


Figura 4.62. Análisis de viabilidad de las líneas MM.1S y RPD con expresión constitutiva de la endonucleasa Cas9 en respuesta a la combinación Pd. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

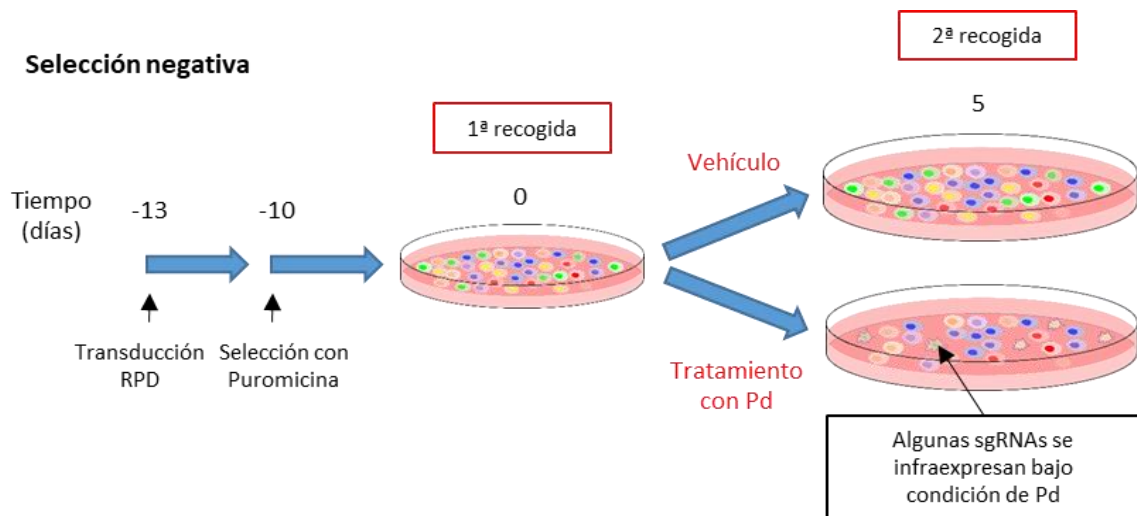


Figura 4.63. Esquema temporal del cribado de selección negativa de genoma completo mediante la tecnología de CRISPR KO-Cas9. Tras la infección lentiviral, se seleccionaron las células RPD transducidas con 1,5 μ M de puromicina durante 10 días. Una vez seleccionadas, se llevó a cabo un cribado de 5 días con la combinación de Pd o con el vehículo control. P: pomalidomida. d: dexametasona. Dosis de pomalidomida: 50 nM. Dosis de dexametasona: 2,5 nM. Tiempo de tratamiento: 5 días.

A diferencia de la selección positiva, se diseñó el experimento de selección negativa para identificar sgRNAs infrarrepresentadas en la condición de tratamiento respecto del vehículo sin fármaco. En este tipo de ensayos, la posibilidad de encontrar un *hit* o resultado significativo es más difícil, ya que la relación señal:ruido es mucho más baja. Para incrementar la posibilidad de identificar genes cuyas sgRNAs se encuentren infrarrepresentadas con respecto al resto, se modificó la metodología de secuenciación para incrementar el número de veces que cada sgRNA era leída por el secuenciador (superior a 250) (**Figura 4.64**).

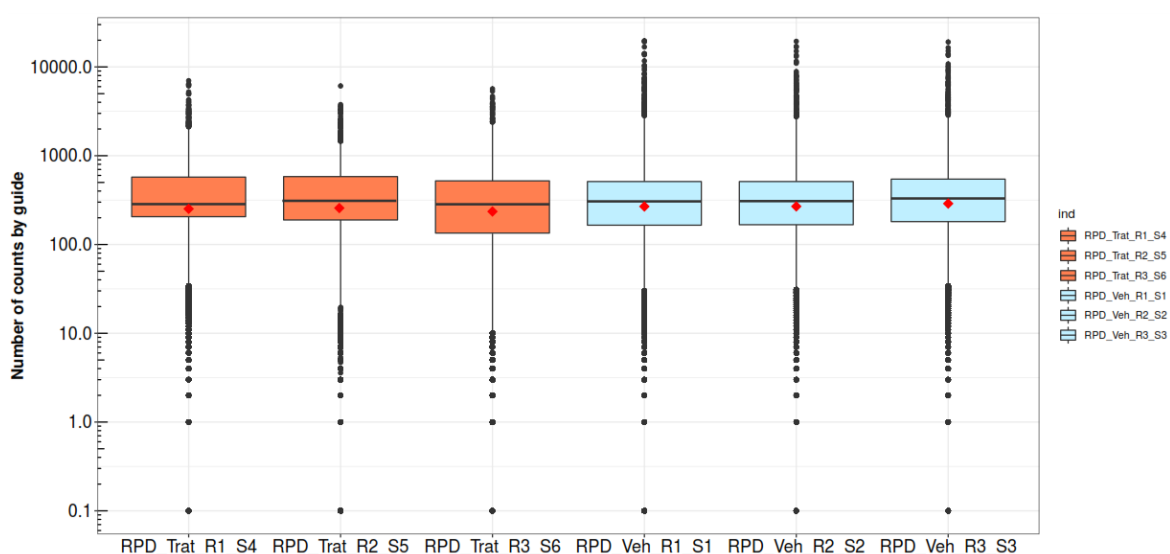


Figura 4.64. El número medio de lecturas identificadas como “perfect match” para cada sgRNA entre las distintas muestras fue superior a 250.

Identificadas las sgRNAs, se llevó a cabo un análisis de MAGeCK-RRA entre las poblaciones de RPD tratadas con Pd y con el vehículo. Se filtraron aquellos genes que mostraron 3 o más sgRNAs significativamente infrarrepresentadas en la población de RPD+Pd frente a la población tratada con el vehículo, y que además tenían un *Fold Change* < 0,75. De este modo, se encontraron 388 genes cuya ausencia o inactivación podría revertir la resistencia a Pd (**Figura 4.65**).

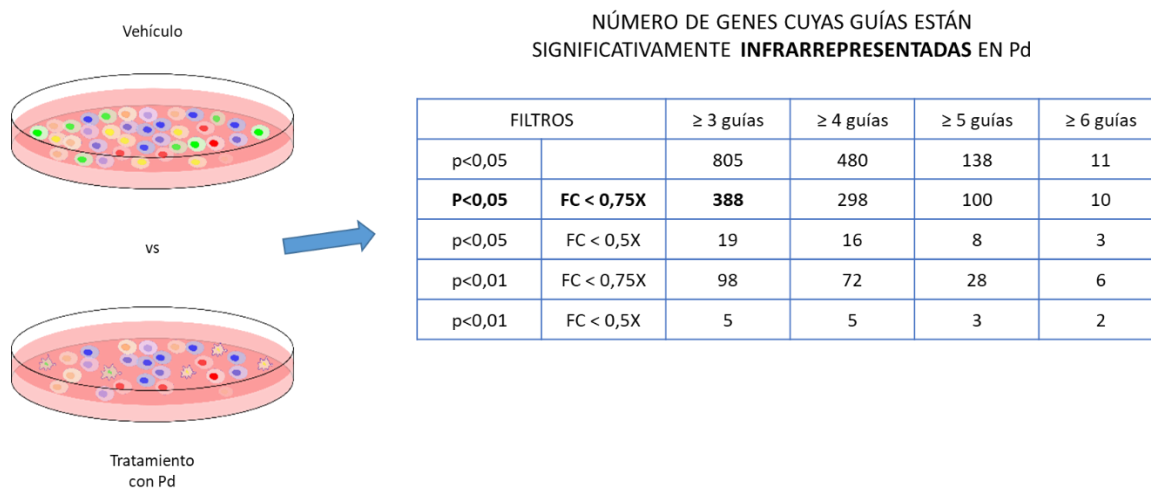


Figura 4.65. Número de genes identificados cuyas sgRNAs están significativamente infrarrepresentadas en las células RPD tras 5 días de tratamiento con Pd en comparación con las células RPD tratadas con el vehículo control.

De entre los 388 genes (ver en **Tabla 7.4, Anexo I**), destacan algunos ya conocidos en el contexto de la resistencia a IMiDs como *MAP3K1* (más conocido como *MEK*) y *MKNK2*, componentes de la vía de las MAPK; así como *MYC*, *MYCL*, *MTOR*, y los componentes de la vía de Wnt, *WNT2B* y *WNT5A*. También es relevante señalar algunas proteínas con funciones relacionadas con la regulación de la estabilidad y la homeostasis proteica. Ejemplo de ello es *TOR1A*, uno de los genes con mayor puntuación identificados, que actúa como chaperona con funciones importantes en el correcto plegamiento proteico, así como en el procesamiento, estabilidad y localización de agregados proteicos. Además, participa regulando la estabilidad de diversas proteínas junto con el signalosoma COP9.

En este caso y a diferencia de la selección positiva, en el cribado de selección negativa hemos identificado diferencias entre los análisis RRA y MLE, especialmente en los genes identificados de máxima puntuación. No obstante, los análisis de enriquecimiento con los genes identificados ambos análisis muestran vías, componentes y funciones moleculares similares.

Sin embargo, es de especial interés señalar algunos de los genes que el análisis MLE identifica a diferencia del análisis RRA. Entre los genes de mayor puntuación identificados en el análisis MLE se incluyen el recientemente descrito ligando de los

IMiDs TP53-RK [203], el factor IRF4 y el gen que codifica para la Topoisomerasa 2 *TOP2A*. Además, aparecen otros genes como *DNM2*, *RRN3* y *PRAMEF6* (Figura 4.67).

Entre los genes identificados quisimos ver cuáles podían ser dianas accionables cuya inactivación podría revertir la resistencia. Así, el análisis de enriquecimiento con las dianas farmacológicas mostró una sobrerrepresentación de dianas de agentes antimicrobianos, antibióticos y corticosteroides, y otros fármacos como el inhibidor de MEK cobimetinib, el inhibidor de PI3K idelalisib, y los inhibidores de la topoisomerasa 1 topotecan e irinotecan.

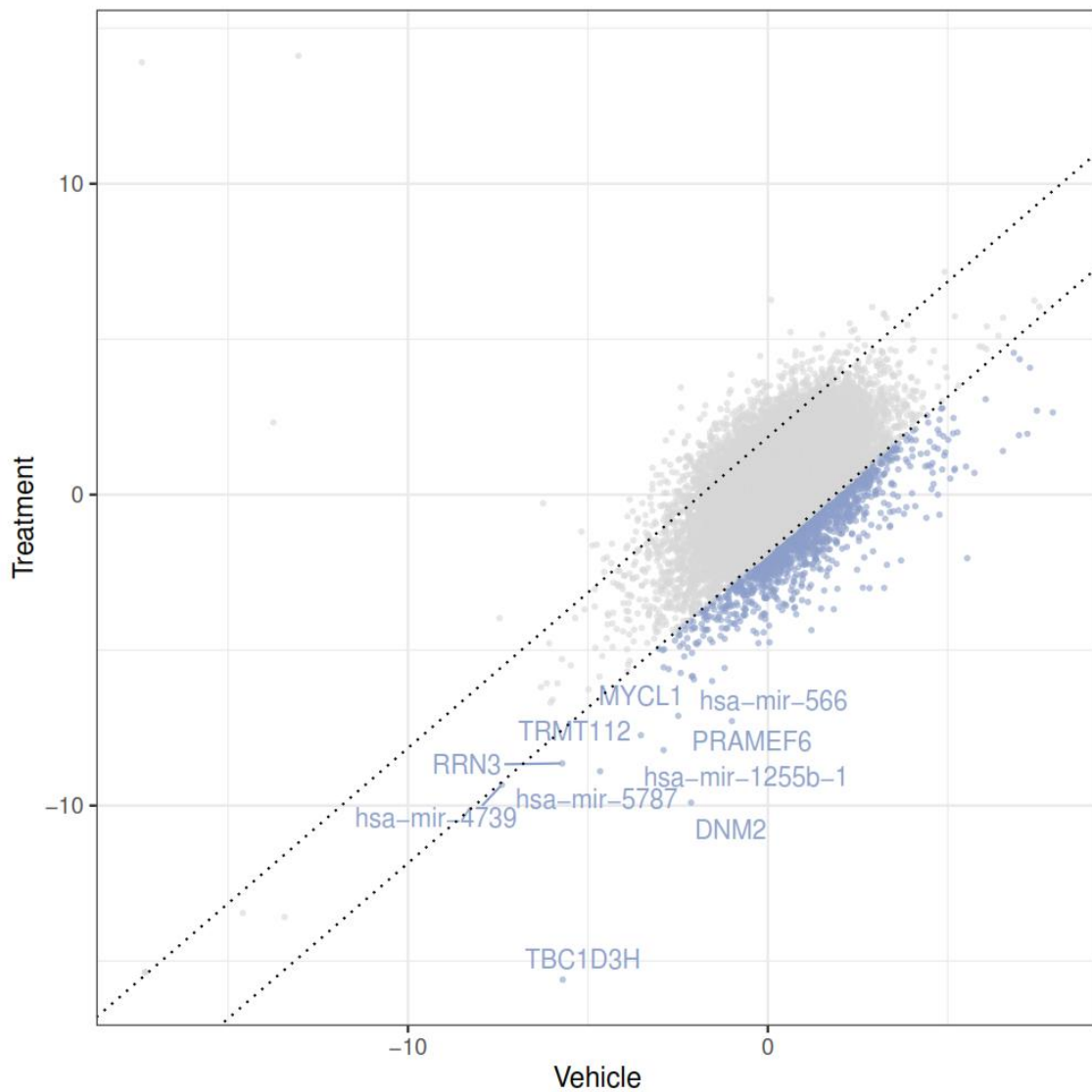


Figura 4.66. Análisis MAGeCK-MLE mostrando los genes Top- 10 con mayor puntuación para la selección negativa.

Además, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de componentes moleculares con los 388 genes identificados, que identificó proteínas presentes en eucromatina o cromatina no condensada (transcripcionalmente más activa) (**Tabla 4.15**). También se observó un enriquecimiento de las funciones moleculares relacionadas con las proteínas mal plegadas y con el transporte de membranas (**Tabla 4.16**).

Tabla 4.15. Análisis de enriquecimiento de componentes moleculares con los 388 genes identificados en el cribado de selección negativa.

Gene Set	Description: Components	Size	Expect	Ratio	P Value
GO:0000791	<u>euchromatin</u>	33	0.50754	5.9109	0.013889
GO:0098978	glutamatergic synapse	350	5.3830	2.0435	0.019146
GO:0031045	dense core granule	20	0.30760	6.5019	0.037256
GO:0019867	outer membrane	206	3.1683	2.2094	0.039728
GO:1905368	peptidase complex	89	1.3688	2.9222	0.048114
GO:0001891	phagocytic cup	23	0.35374	5.6539	0.048152
GO:0035327	<u>transcriptionally active chromatin</u>	24	0.36912	5.4183	0.052011

Tabla 4.16. Análisis de enriquecimiento de funciones moleculares con los 388 genes identificados en el cribado de selección negativa.

Gene Set	Description: Molecular Functions	Size	Expect	Ratio	P Value
GO:0051082	<u>unfolded protein binding</u>	118	1.7525	5.1356	0.000064282
GO:0005085	guanyl-nucleotide exchange factor activity	329	4.8861	2.4559	0.0037194
GO:0042887	amide transmembrane transporter activity	44	0.65347	6.1212	0.0040209
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	346	5.1386	2.1407	0.014281
GO:0005342	organic acid transmembrane transporter activity	155	2.3020	2.6065	0.028101
GO:0060589	nucleoside-triphosphatase regulator activity	348	5.1683	1.9349	0.034965
GO:0051787	<u>misfolded protein binding</u>	21	0.31188	6.4127	0.038289
GO:0001965	G-protein alpha-subunit binding	22	0.32673	6.1212	0.041715
GO:0017025	TBP-class protein binding	22	0.32673	6.1212	0.041715
GO:0022884	macromolecule transmembrane transporter activity	22	0.32673	6.1212	0.041715

Además, se llevó a cabo un análisis de tipo *STRING* para analizar las asociaciones proteicas de los genes codificantes de proteína identificados [357]. En él se encontró a *MYC* como elemento central (**Figura 4.67**).

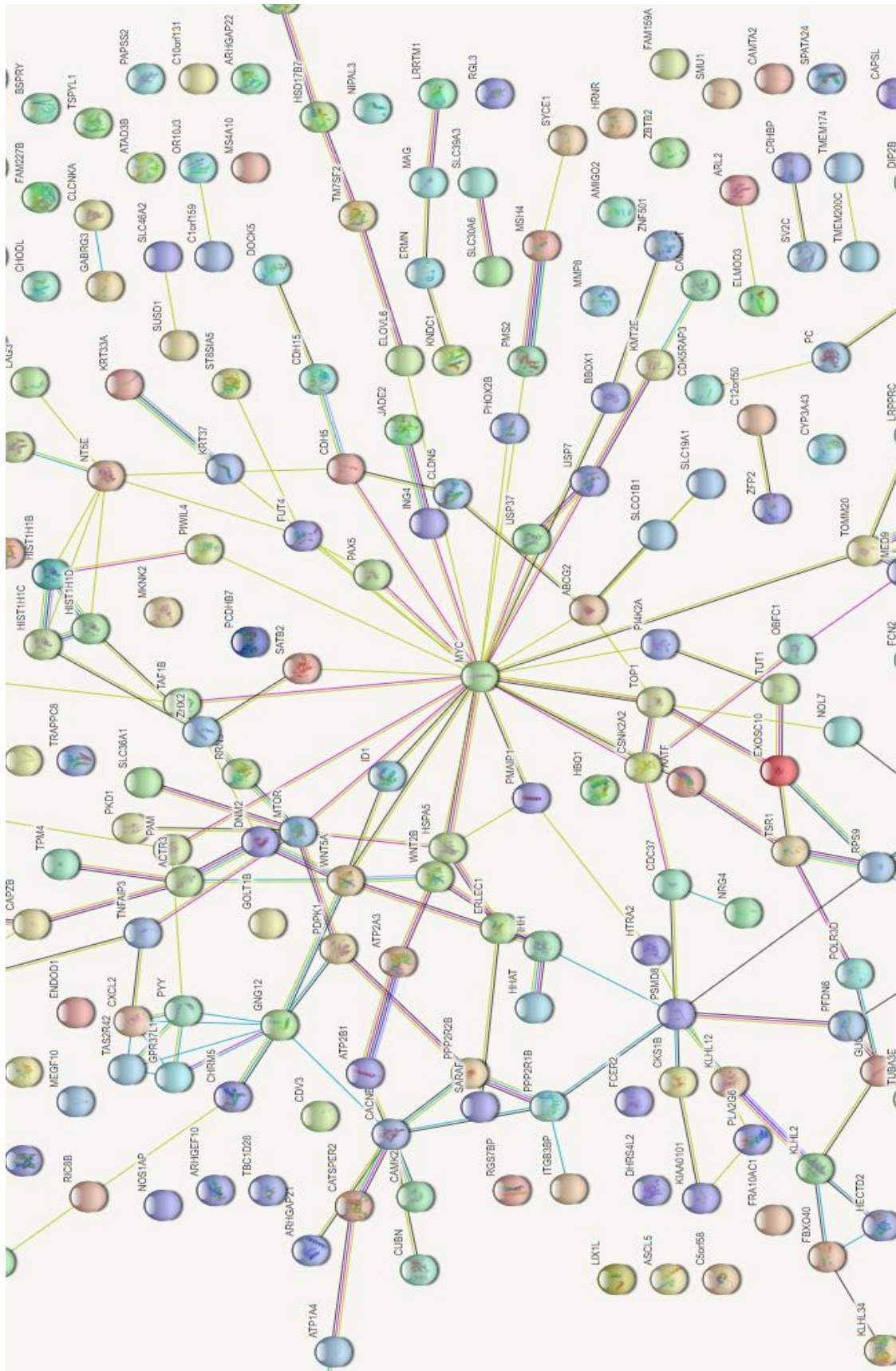


Figura 4.67. Análisis STRING mostrando las interacciones entre las proteínas que codifican los genes identificados en el cribado de selección negativa.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis *STRING*, se evaluó el efecto de la adición de un fármaco inhibidor de c-Myc, aún en desarrollo clínico, al tratamiento con Ld o Pd en las líneas MM.1S y RPD, sin observar efectos sobre una posible reversión de la resistencia a Pd.

Por otro lado y sorprendentemente, 93 de los 388 *hits* identificados fueron miARNs, aún teniendo en cuenta que la librería GeCKO sólo incluye 4 sgRNAs por cada uno de los 3.039 miARNs diana. Entre los Top-10 miARNs se encuentra el miR-30a (**Tabla 4.17**), anteriormente mencionado en los capítulos I y II.

Tabla 4.17. To-10 miARNs que muestran 3 o más sgRNAs significativamente infrarrepresentadas en las células RPD tratadas con Pd respecto a las tratadas con un vehículo control (p-valor < 0,05; FC < 0,75). Se ha señalado el miR-30a por haber sido mencionado en los capítulos I y II. sgRNAs: número de guías significativamente infrarrepresentadas en las células tratadas con Pd para un miARN concreto. FC: Fold Change.

miARN	p-valor	sgRNAs	FC
<i>hsa-miR-30a</i>	0,00063136	4	0,63193146
<i>hsa-miR-5009</i>	0,00094579	4	0,67943149
<i>hsa-miR-4295</i>	0,001027	3	0,60627742
<i>hsa-miR-378b</i>	0,0010366	4	0,69596661
<i>hsa-miR-1202</i>	0,0012283	4	0,5488105
<i>hsa-miR-3690-1</i>	0,0017663	3	0,7476267
<i>hsa-miR-548</i>	0,0022094	3	0,69045534
<i>hsa-miR-6762</i>	0,0026466	4	0,56159033
<i>hsa-miR-3926-1</i>	0,003531	4	0,72923211
<i>hsa-miR-3679</i>	0,0037487	3	0,67945975

También se realizó un análisis de enriquecimiento de tipo KEGG para determinar las vías enriquecidas entre las dianas de estos miARNs. Se identificaron 57 vías de señalización entre las que destacan las vías de: proteólisis mediada por ubiquitinas, Wnt, MAPK, MTOR, RAS, PI3K-AKT, y p53 (**Tabla 7.15, Anexo I**). Por lo tanto, los resultados del cribado de selección negativa en cuanto a genes y miARNs mostraron vías comunes cuyas sgRNAs diana están infraexpresadas en la población de células RPD tratadas.

3. COMPARACIÓN DE DEPENDENCIAS GÉNICAS DE LAS LÍNEAS MM.1S Y RPD

Una de las aplicaciones de los cribados de genoma completo basados en librerías de CRISPR-Cas9 consiste en la identificación de los genes esenciales de una determinada línea celular. Fundamentalmente, esta aplicación es considerada como un cribado de selección negativa ya que está basada en la identificación de sgRNAs que se infrarrepresentan en una población celular a lo largo del tiempo. Para ello, generalmente se compara la representación de las sgRNAs en la población celular al comienzo del experimento y en un tiempo posterior. En nuestro caso, no utilizamos esta metodología, sino que comparamos la representación de sgRNAs en las líneas celulares MM.1S y RPD tras 2 semanas desde el momento de la transducción con la librería con el objetivo de identificar aquellos genes de los que las líneas celulares son dependientes (**Figura 4.68**). El objetivo final de este estudio es la identificación de dianas que puedan ser abordadas farmacológicamente en el contexto de la resistencia a Pd, o del MM en general.

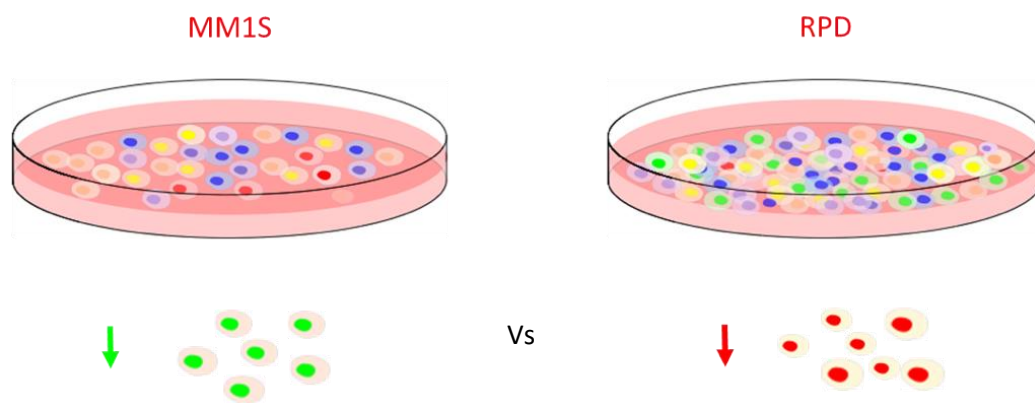


Figura 4.68. Concepto de la aplicación de cribados de CRISPR-Cas9 para la identificación de genes de dependencia, basada en la identificación y comparación de sgRNAs que se infrarrepresentan en cada una de las poblaciones celulares.

El análisis reveló que la línea celular RPD, en comparación con MM.1S, muestra una infrarrepresentación de las sgRNAs que tienen como diana los genes *IRF4*, *MYC*, *PCNA*, *HDAC1*, *MCL1*, *PSMB1*, *PSMB3*, *PSMA6*, *AKT2*, *POLR2D*, *POLR2J*, *POLR2I* y *VEGFB*, entre otros (**Tabla 4.18**). Estos datos sugieren, por lo tanto, que estos genes podrían suponer dianas interesantes a abordar farmacológicamente en el contexto de la resistencia a la combinación Pd. Del mismo modo que con los genes identificados en los cribados de selección positiva y negativa, se realizó un análisis de enriquecimiento con las dianas farmacológicas, el cual reveló una sobrerrepresentación de dianas de agentes antimicrobianos y antibióticos, los quimioterápicos paclitaxel y cisplatino, y otros fármacos como el inhibidor del proteasoma carfilzomib y el inhibidor de histona desacetilasas (HDAC) romidepsin.

Tabla 4.18. Top10 genes de dependencia en la línea celular RPD en comparación con la línea celular MM.1S. sgRNAs: número de guías significativamente infrarrepresentadas en la línea RPD en comparación con MM.1S. FC: Fold Change.

Gen	sgRNAs	FC
AGAP5	3	18,0434086
RPS10-NUDT3	3	11,9281632
POP5	5	7,84460062
IRF4	4	7,7103695
BARD1	6	7,22100679
HEATR3	5	6,86091028
EIF6	4	6,14792685
CYP2U1	4	6,04607971
PCNA	6	5,8207296
MYC	4	5,71280783

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Hoy en día, los cribados genéticos de alto rendimiento por librerías CRISPR se pueden considerar como herramientas muy robustas para estudiar una gran variedad de procesos biológicos. Los análisis llevados a cabo en el presente capítulo suponen el primer estudio que utiliza esta tecnología para la identificación de genes de sensibilidad y resistencia a una combinación farmacológica (Pd), y utiliza modelos celulares de resistencia a fármacos para la identificación de vulnerabilidades para revertir estas resistencias. Además, supone el primer estudio que pone en conjunto cribados de selección positiva y negativa para una caracterización más amplia de la resistencia a la combinación de pomalidomida y dexametasona, una combinación que actualmente es considerada como uno de los estándares de tratamiento para el paciente de mieloma refractario o en recaída [162,163,171,358–362].

El cribado de selección positiva ha mostrado como resultado genes conocidos por su relación con el mecanismo de acción de los IMiDs como son *CRBN*, la principal diana conocida de los IMiDs [197], así como otros recientemente descritos por su papel en el mecanismo de acción o de resistencia como son los componentes del signalosoma *COP9* *COPS7B* y *COPS2* [272], y otras moléculas clave en la ubiquitinación proteica como son *UBE2A* y *UBE2G1* [272]. Además, algunos de los genes identificados en este cribado coinciden con los identificados por un cribado previo al fármaco lenalidomida. Ejemplo de ello son genes con funciones 5' *ARNm decapping* (*EDC4*), ubiquitín ligasa (*PLAA*), o que participan en la señalización por receptores de hormonas en el núcleo (*NCOR1*), lo que valida nuestros resultados [272]. Además, en este estudio no se habían analizado funcionalmente estos genes, mientras que en la presente tesis doctoral se han comenzado a llevar a cabo con algunos clones KO. Por otro lado, hemos identificado un número elevado de genes y vías adicionales cuya inactivación o ausencia podría inducir resistencia a Pd. Entre estos genes, destacan los implicados en los procesos de regulación transcripcional o epigenética (*PRDM9*, *MBD2*, *CBX7*, *HIST1H1A*, *HDAC3*, *HDAC7*, entre otros) y la vía de NOTCH (*JAG1*, *KDELC1* y *MIB2*). Actualmente nos encontramos validando estos estudios mediante la generación de líneas KO para los genes de mayor puntuación a partir de las líneas sensibles a Pd MM.1S y OPM-2 y analizando posteriormente la viabilidad celular de estas líneas en presencia de esta

combinación y comparándola con la de las líneas parentales. Por el momento, hemos podido validar que las líneas KO para los genes *SPOP*, *NCOR1*, *EDC4*, *PLAA* y *FBXO33* son más resistentes a Pd que las líneas parentales. Además y de forma interesante, observamos también esta tendencia en las líneas KO para los genes *FBXO33* y *PLAA* bajo tratamiento con Ld. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la resistencia a Ld y Pd podría compartir mecanismos comunes como la desregulación de CRBN, por ejemplo, y presentar al mismo tiempo mecanismos específicos de resistencia a Ld o Pd. Entre estos genes cuya inactivación o ausencia genera resistencias, hemos observado un enriquecimiento en componentes y funciones moleculares relacionadas con la ubiquitinación y la degradación proteica. Entre los genes que hemos validado se encuentran *SPOP* y *FBXO33*, que codifican proteínas adaptadoras de complejos E3 ligasa con funciones de reconocimiento de sustratos, al igual que CRBN. Esto sugiere que, quizá, bajo condición de resistencia e infraexpresión de CRBN, otros componentes receptores de E3 ligasas puedan actuar como ligandos de los IMiDs. La infraexpresión de c-Myc en las células de MM bajo tratamiento con lenalidomida o pomalidomida es un hecho ampliamente descrito en la bibliografía [190,197,215]. Sin embargo, aunque se cree que, en MM, IKZF1 e IKZF3 actúan como reguladores positivos de IRF4 y c-Myc, y c-Myc ha sido descrita como una diana directa del factor de transcripción IRF4 [363], aún no está claro el mecanismo por el que c-Myc se infraexpresa bajo condición de tratamiento con los IMiDs [364]. Además, en el estudio que describió la estructura de unión de los IMiDs con CRBN [197], se encontró que c-Myc se ubiquitina más en las células tratadas con estos fármacos. Por todo ello y teniendo en cuenta que una de las dianas que SPOP reconoce y marca para su degradación es c-Myc, esta proteína podría actuar como ligando de pomalidomida, bajo condición de resistencia, y ejercer su actividad antimieloma vía infraexpresión de c-Myc.

Por otro lado, y en este mismo cribado, identificamos genes cuyas sgRNAs están infraexpresadas bajo condición de tratamiento con Pd y que, por lo tanto, su inactivación podría sensibilizar a esta combinación. Entre ellos destacan genes como el receptor de tirosín quinasas *IGFR1*, muy importante en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Además, analizamos las dianas accionables entre los genes identificados y realizamos un análisis de enriquecimiento con las dianas farmacológicas actualmente disponibles, que mostró una sobrerrepresentación de dianas de los

fármacos atezolimumab, nivolumab y pembrolizumab. Estos fármacos podrían por tanto combinarse con los IMiDs y estudiar su potencial sinergismo.

Por otro lado, en el cribado de selección negativa a Pd hemos identificado genes cuya inactivación podría revertir la resistencia de las células RPD. En este caso, y a diferencia de los resultados de la selección positiva, en los dos análisis llevados a cabo (RRA y MLE), los genes identificados de mayor puntuación fueron distintos. No obstante, en ambos análisis se encontraron una mayoría de genes coincidentes cuyas sgrNAs estaban infrarrepresentadas en la población de células tratadas respecto a la población control. Los genes *TP53-RK*, *IRF4* y *TOP2A* mostraron una elevada puntuación en el análisis MLE pero no aparecieron en el RRA. Precisamente, *IRF4* es uno de los factores de transcripción cuya infraexpresión es esencial en el mecanismo de acción de los IMiDs [364]. Recientemente se ha descrito el papel de *TP53-RK* como ligando de los IMiDs independiente a *CRBN*, que también ha sido asociado a una infraexpresión de los sustratos *IKZF1* e *IKZF3*, así como *IRF4* y *c-Myc*. Por otro lado, en un estudio también basado en cribados de CRISPR se apuntó al gen *TOP2B* como una diana potencial para la sensibilización de las células de MM a los IMiDs [365]. Además, realizamos un análisis de enriquecimiento en dianas farmacológicas entre los genes identificados (por infraexpresión de las sgrNAs) que reveló que fármacos como los inhibidores de la Topoisomerasa topotecan e irinotecan, así como el inhibidor de MEK cobimetinib y el inhibidor de PI3K idelalisib podrían re-sensibilizar a Pd. Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron el papel de la vía MAPK en la resistencia a lenalidomida en combinación con dexametasona y sugerían el papel del inhibidor de MEK selumetinib en la resensibilización a estas combinaciones [215], lo cual indica concordancias entre los resultados obtenidos en los estudios mencionados en el capítulo I, que muestran una reversión de la resistencia bajo tratamiento con selumetinib (**Figura 4.19**), y los publicados por nuestro u otros grupos de investigación [215,366]. Curiosamente, encontramos 93 miARNs cuyas sgrNAs estaban infrarrepresentadas en células RPD tratadas con Pd, siendo el miARN de mayor puntuación el miR-30a. Este miARN tiene sitios de unión a la región reguladora 3'UTR del gen *CRBN* y además lo encontramos sobreexpresado en células RLD y RPD respecto a su contrapartida sensible, la línea MM.1S. Pese a todos los indicios del papel que este miARN podría tener en la resistencia a IMiDs, los estudios de inhibición de este miARN

en células RPD o la sobreexpresión en MM.1S de un mimético de miR-30a no mostraron diferencias en cuanto a la viabilidad celular en presencia de Ld o Pd, aunque sí encontramos que las células RPD transfectadas con el inhibidor de este miARN muestran una tendencia hacia una mayor expresión de CRBN. Estos resultados podrían deberse a la limitación de estos ensayos, ya que están basados en transfecciones transitorias de miméticos o inhibidores de los miARNs. Sería interesante generar líneas celulares que infraexpresen o sobreexpresen este miARN de forma estable (por ejemplo mediante transducción con lentivirus basados en vectores), para evaluar mejor su papel en la resistencia. Pese a las diferencias encontradas entre los análisis RRA (basado en puntuación agregada) y MLE (estimaciones de máxima probabilidad), los análisis de enriquecimiento llevados a cabo con los genes identificados por ambos análisis muestran vías, componentes y funciones moleculares similares. Las diferencias encontradas en los genes que identifica cada análisis podrían radicar en la dificultad intrínseca de la selección negativa para identificar una pequeña proporción de sgRNAs que se infrarrepresentan sobre la totalidad de sgRNAs. Estudios comparando ambas formas de análisis han determinado que muestran resultados similares [367], aunque el método MLE en principio arroja mayor información biológica ya que incluye un valor o puntuación β que permite identificar aquellos genes con un fuerte valor de selección en la condición de tratamiento y un valor de selección bajo para la condición control [368].

Por último, comparamos los genes de dependencia para la supervivencia de las células sensibles y resistentes a Pd para determinar posibles vulnerabilidades de la célula resistente con el objetivo final de poder abordarlas farmacológicamente. Entre los genes identificados, como cabría esperar, encontramos los que codifican para las proteínas c-Myc e IRF4 y, otros como los que codifican para las subunidades del proteasoma PSMB1, PSMB3, PSMA6 y la histona desacetilasa HDAC1, entre otros. De forma interesante, observamos un enriquecimiento en genes diana del fármaco inhibidor de histona desacetilasas romidepsin y el inhibidor del proteasoma carfilzomib. Diversos estudios han evaluado el inhibidor de HDAC panobinostat en pacientes con MM refractario [369–371] y actualmente otros inhibidores como el ricolinostat están siendo evaluados en la clínica en ensayos de fase I y II [372].

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la implementación de cribados de librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo, a pesar de su elevada complejidad técnica, ha

permitido la identificación de genes tanto de sensibilidad como de resistencia a la combinación pomalidomida + dexametasona, actualmente considerada como estándar para el paciente de MM refractario. Parte de los genes identificados han sido previamente descritos en la bibliografía por su papel en el mecanismo de acción o de resistencia de los IMiDs, y otros han sido comenzados a validar en este capítulo mediante la generación de líneas KO para cada uno de ellos. Además, el análisis ha identificado vulnerabilidades accionables que podrían revertir resistencias, aunque son necesarios estudios adicionales para validar estas dianas. Por lo tanto, la aplicación de esta tecnología se ha mostrado como una herramienta robusta y versátil para la determinación de los mecanismos de resistencia a combinaciones farmacológicas, así como para la búsqueda de dianas para poder evitar o revertir estas resistencias.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El MM es una de las neoplasias que más avances ha experimentado en las últimas dos décadas, tanto en el conocimiento biológico de la enfermedad como en el desarrollo de nuevas terapias. De forma relevante, la mejora en el tratamiento del mieloma con la introducción de nuevos fármacos ha dado como resultado mejores respuestas y más duraderas que conducen a una mayor supervivencia y posibilitan incluso, para algunos pacientes, un estado de enfermedad mínima residual negativa. No obstante, el MM sigue siendo incurable y además, la elección del mejor tratamiento en cada etapa de la enfermedad se vuelve compleja, a la vez que crucial, teniendo en cuenta que algunos fármacos se encuentran en proceso de aprobación y la disponibilidad limitada de ensayos clínicos para las diferentes combinaciones posibles [373].

La estrategia actual para el tratamiento del MM incluye terapia de inducción, consolidación y mantenimiento. Los inhibidores del proteasoma y los fármacos inmunomoduladores constituyen actualmente el eje central del tratamiento estándar y han mejorado significativamente los resultados entre los pacientes con MM [374]. En los últimos años, varios fármacos con diferentes mecanismos de acción han transformado el enfoque para el tratamiento de pacientes con MM refractario. Entre ellos destacan el fármaco inmunomodulador de tercera generación pomalidomida, los inhibidores del proteasoma de segunda generación carfilzomib e ixazomib, el inhibidor de histona desacetilasas panobinostat, los anticuerpos monoclonales (mAbs) elotuzumab y daratumumab y las células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T). A pesar de que la introducción de estos fármacos ha aumentado la supervivencia de los pacientes con MM, los pacientes de alto riesgo o refractarios siguen siendo difíciles de tratar y su pronóstico es desfavorable.

La aparición de la resistencia farmacológica tiende a ser un evento clínico habitual en neoplasias hematológicas y determinados tumores sólidos, como son los cánceres de mama, ovario, pulmón y los tumores del tracto gastrointestinal inferior [375,376]. En las dos últimas décadas, multitud de estudios han sugerido múltiples mecanismos que pueden causar estas resistencias. Por ejemplo, puede haber transportadores de membrana que eviten que el fármaco entre en las células, el fármaco puede inactivarse, pueden aparecer mutaciones o alteraciones en la expresión de la diana del fármaco, y podrían verse alterados los mecanismos de apoptosis, senescencia y reparación del ADN de las células tumorales, entre otros.

El MM es una de las neoplasias hematológicas de mayor complejidad genómica y molecular [377]. Esto incrementa las posibilidades de que uno o varios clones “escapen” al tratamiento y den lugar a la recaída. Algunos estudios han identificado rasgos genéticos de las células en el momento de la recaída, como es la pérdida bi-alélica de supresores tumorales como *TP53*, o la desregulación de *MYC* como consecuencia de reordenamientos cromosómicos [378]. Además, la progresión en MM está asociada a un incremento en la carga mutacional [379]. Por otro lado, la estructura subclonal también varía en la recaída. Se han descrito tres patrones principales de evolución clonal: ramificado, lineal y de cambio clonal [378,380]. Se puede considerar que el tratamiento causa un cuello de botella evolutivo, particularmente en pacientes que logran una respuesta completa al tratamiento, lo que proporciona una presión selectiva que puede conducir a la expansión de clones resistentes preexistentes. Es importante destacar que estos patrones de ramificación y el aumento del daño genético en las células clonales son característicos del tratamiento eficaz y el logro de respuestas profundas [381]. Por el contrario, los patrones observados en pacientes sin respuesta completa son más estables y se asocian más frecuentemente con cambios en el microambiente, posiblemente consecuencia de la presencia de clones dominantes intrínsecamente resistentes al tratamiento al inicio de la enfermedad [381]. Este patrón estable recuerda a los resultados observados en la progresión de GMSI a MM, donde la aparición de nuevas mutaciones es infrecuente, pero hay un cambio profundo en el comportamiento clínico. Una de las estrategias implementadas en la clínica para eliminar los clones residuales que pueden dar lugar a la recaída es el tratamiento de mantenimiento con lenalidomida [381], que es un fármaco generalmente bien tolerado y posee un mecanismo de acción bi-modal, causando directamente la muerte de las células tumorales y potenciando además el sistema inmune frente a las células de MM.

La adición de nuevas opciones de tratamiento y combinaciones farmacológicas ha añadido complejidad en la selección del tratamiento para los pacientes con MM y, además, la práctica clínica fuera del contexto de los ensayos clínicos es un campo en evolución en el que los datos también deben considerarse para la formulación de guías útiles en el entorno clínico y en el diseño de estudios futuros para el MM [382].

En este contexto, la determinación de los mecanismos moleculares de sensibilidad y resistencia a fármacos estándar como lenalidomida y pomalidomida, es de vital importancia tanto para una decisión terapéutica basada en las características biológicas y moleculares del paciente, como para el desarrollo de estrategias para abordar las posibles resistencias a estos fármacos.

Uno de los mayores inconvenientes para el estudio de los mecanismos causales de la aparición de resistencias es la dificultad de disponer de modelos de estudio adecuados. En esta tesis doctoral, se han desarrollado modelos *in vitro* de resistencia a lenalidomida y pomalidomida en combinación con una dosis baja de dexametasona. En estos modelos se pueden llevar a cabo estudios biológicos y moleculares para identificar mecanismos de sensibilidad y resistencia, y a su vez, también diseñar posibles estrategias con las que abordar la resistencia. Las combinaciones farmacológicas de lenalidomida y dexametasona o de pomalidomida y dexametasona fueron seleccionadas por su relevancia y el papel central que ocupan en el tratamiento del MM, no sólo en primera línea, sino también en el momento de la recaída e incluso como tratamiento de mantenimiento.

Desde la introducción de los IMiDs en el tratamiento del MM y el descubrimiento de su mecanismo de acción, alrededor de 30 estudios han analizado los mecanismos de resistencia a IMiDs y evaluado posibles combinaciones o estrategias para potenciar su efecto y/o revertir la resistencia. En relación con el mecanismo de acción, estudios recientes han encontrado que otras dianas de los IMiDs, distintas de CRBN, podrían tener un papel importante en su eficacia [202,203]; y con respecto a los mecanismos de resistencia, si bien es cierto que existe un consenso en algunos de los mecanismos biológicos de esta resistencia como son la activación de las vías de Wnt [222], MAPK [215] o STAT3 [191], aún existen ciertas controversias, como son la baja frecuencia de alteraciones identificadas en el gen *CRBN* o en otros genes relacionados con su mecanismo de acción [383]. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de sensibilidad y resistencia a IMiDs es un tema candente en la investigación actual en el MM y del que aún quedan elementos por determinar.

Al analizar la bibliografía disponible, encontramos estudios diversos en los que se analiza el papel de una determinada ruta o vía de señalización en la resistencia a IMiDs, como son las vías anteriormente mencionadas (Wnt, MAPK y STAT) [191,215,384,385];

o mecanismos concretos como la metilación de *CRBN* [386], la presencia de mutaciones o alteraciones en *CRBN* [387], o cambios en los niveles de expresión de *CRBN* o de sus sustratos principales IKZF1 o IKZF3 [387]. Teniendo en cuenta la complejidad de la célula de mieloma y que los mecanismos de resistencia descritos afectan tanto al ADN, ARN y proteína, consideramos interesante una caracterización global de la célula de mieloma de fenotipo resistente a Ld y Pd, así como la aplicación de tecnologías que permitieran interrogar el genoma completo en búsqueda de genes con un papel en la sensibilidad o resistencia a estos fármacos. En esta tesis doctoral, se han caracterizado los modelos de resistencia adquirida a Ld y Pd a nivel de ADN (variación en el número de copias y metilación de todo el genoma, y secuenciación de determinadas regiones), ARN (ARNm y miARNs) y proteína. Además, en el presente trabajo hemos profundizado en uno de los mecanismos más comunes en la aparición de la resistencia a IMiDs: la desregulación de *CRBN*. Por último, hemos aplicado un sistema de cribado basado en librerías de CRISPR KO-Cas9 de genoma completo tanto en células sensibles como resistentes para obtener una visión más amplia de los mecanismos de sensibilidad y resistencia a la combinación Pd, e identificar potenciales vulnerabilidades de la célula resistente.

La caracterización de los modelos celulares de resistencia reveló que estas células son similares a las sensibles en cuanto a su morfología e inmunofenotipo. Sin embargo, sí encontramos diferencias en su ADN, ARN y proteínas. En términos generales, las células resistentes mostraron cambios notables en el nivel de metilación del ADN y la expresión de miARNs, sugiriendo una posible reprogramación epigenética de las células resistentes. Además, identificamos, aunque en menor medida, cambios en cuanto al nivel de expresión de ARNm y de proteínas. Entre estos cambios, destacó una infraexpresión de *CRBN* en sus formas ARNm y proteína en ambos modelos de resistencia RLD y RPD.

Pese a la discusión actual acerca de la utilización de la expresión de *CRBN* o la frecuencia de mutaciones o alteraciones genéticas de *CRBN* encontradas en pacientes con MM [147,219,387] como un biomarcador de respuesta a combinaciones que incluyan un IMiD [387,388], no cabe duda del papel central que juega *CRBN* en el mecanismo de acción de los IMiDs. Curiosamente, las células RLD y RPD mostraron alteraciones comunes de pérdida de material genético. Sin embargo, estas alteraciones en el ADN no explicaron la desregulación de *CRBN* observada ya que la delección

identificada en la región de *CRBN* es heterocigótica y, además, es compartida con la línea parental sensible. Por otro lado, tampoco se encontraron mutaciones en la secuencia de *CRBN*, indicando que otros mecanismos de regulación están implicados. Considerando la infraexpresión de *CRBN* que hemos observado en las células resistentes y la escasa información actualmente disponible acerca de los mecanismos que regulan su expresión, decidimos profundizar en este campo. Sin embargo, y pese a los diferentes estudios llevados a cabo, tan sólo encontramos una relación entre la expresión de ciertos miARNs y la expresión de *CRBN* y sensibilidad a los IMiDs. Estos resultados sugieren que probablemente sea necesario que varios cambios o mecanismos moleculares tengan que sucederse desde la transcripción hasta la degradación proteica de *CRBN*, para modificar su expresión de forma robusta. Además, podrían existir otros mecanismos responsables de la desregulación de *CRBN* y que aún no hemos analizado. En este sentido, la expresión génica puede verse afectada también por la presencia de marcas epigenéticas en las histonas, la actividad de factores de transcripción y las interacciones con *enhancers* que podrían inducir la transcripción génica, entre otros. Precisamente, el análisis bioinformático realizado en el capítulo I indicó que 2 enzimas con actividad metilante y desmetilante de la lisina 27 de la histona 3 (EZH2 y KDM6A, respectivamente) se localizan con elevada frecuencia en las regiones reguladoras del gen *CRBN*, sugiriendo el posible papel de la regulación por marcas metiladoras en la expresión de este gen. Profundizando en este aspecto, nuestro estudio evaluando la inhibición de la metil transferasa de histonas EZH2, que demostró revertir la resistencia a Ld y Pd, no recuperó los niveles de expresión de *CRBN*. Sin embargo, este hallazgo refuerza la hipótesis de una posible reprogramación epigenética de las células resistentes. Actualmente nos encontramos llevando a cabo un ensayo analizando la expresión de marcas modificadoras de histonas en la región de *CRBN* que podría arrojar luz acerca de los mecanismos causales de su desregulación. Por otro lado, se estudiarán los factores de transcripción, así como las interacciones con *enhancers* que podrían regular su expresión y que, además, podrían determinar si las células resistentes han sufrido un cambio global en la organización tridimensional de la cromatina, y en última instancia describir los *enhancers* o *silencers* de *CRBN*.

Además, con los cribados de las librerías CRISPR KO a nivel del genoma completo, hemos podido identificar potenciales mecanismos de resistencia y sensibilidad a la

combinación farmacológica Pd, así como genes de dependencia de las células con fenotipo resistente RPD que sugieren vulnerabilidades o posibles dianas para abordar las resistencias. La combinación de los cribados de selección positiva y negativa de las librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo, junto con la utilización de herramientas bioinformáticas para el análisis de la abundancia de sgRNAs, nos ha permitido identificar genes cuya inactivación podría potenciar el efecto citotóxico de la combinación Pd, generar o revertir resistencias. Además, en los estudios de enriquecimiento pudimos identificar fármacos que podrían potenciar el efecto de Pd, así como revertir la resistencia a esta combinación. Precisamente, entre los fármacos identificados que podrían inducir la muerte de las células resistentes encontramos inhibidores de la vía MAPK, que previamente habíamos demostrado eficaces para revertir la resistencia de RLD y RPD (capítulo I); e inhibidores de la Topoisomerasa, cuyo papel en la reversión de la resistencia a IMiDs ha sido recientemente descrito [365]. Por otro lado, también identificamos genes conocidos por su papel en la sensibilidad a los IMiDs como son *CRBN*, *IRF4*, *MYC*, componentes de las vías de Wnt y MAPK, entre otros; y genes que codifican proteínas diana que podrían suponer vulnerabilidades de la célula resistente como son los factores IRF4 y c-Myc, HDAC1, Mcl-1, las subunidades del proteasoma PSMB1, PSMB3 y PSMA6, y Akt2. Estos resultados, por tanto, apoyan el uso de inhibidores de la vía de Wnt, MAPK, inhibidores de HDACs y del proteasoma como abordajes para revertir la resistencia a Pd. Además, en los estudios de validación, hemos confirmado el papel en la resistencia de algunos de los genes identificados (*CRBN*, *SPOP*, *EDC4*, *FBXO33*, *NCOR1* y *PLAA*). Por lo tanto, en nuestra experiencia, la aplicación de librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo se ha mostrado como una herramienta precisa y versátil para interrogar la función génica en el contexto de la resistencia farmacológica, obteniendo gran cantidad de información que concuerda con la bibliografía y cuyos resultados están siendo validados.

En conclusión, esta tesis doctoral aporta una visión amplia acerca de las características específicas de modelos de líneas celulares de mieloma con resistencia adquirida a agentes inmunomoduladores. A parte de haber identificado algunos genes y mecanismos implicados en dicha resistencia, también se han descrito algunas estrategias farmacológicas para revertirla. Esperamos que, en un futuro, estos

resultados puedan completarse y contribuyan a la reversión y manejo de posibles resistencias desarrolladas en los pacientes con esta enfermedad.

6. CONCLUSIONES

1. La exposición continua y a dosis creciente de lenalidomida o pomalidomida (en combinación con una dosis baja de dexametasona) en la línea celular de mieloma MM.1S posibilita la generación de modelos *in vitro* de resistencia adquirida a estas combinaciones.
2. Los modelos de resistencia adquirida a las combinaciones de lenalidomida o pomalidomida y dexametasona (RLD y RPD, respectivamente) presentan similares características morfológicas e inmunofenotípicas a las células sensibles parentales.
3. Las células resistentes RLD y RPD presentan diferencias en cuanto a sus características genómicas, epigenéticas (metilación del ADN y expresión de miARNs), transcriptómicas y proteómicas con respecto a su contrapartida sensible MM.1S:
 - 3.1. Las células resistentes muestran alteraciones comunes de pérdida de material genético respecto a las sensibles.
 - 3.2. El patrón de metilación del ADN es similar entre las células RLD y RPD, y diferente al de MM.1S.
 - 3.3. A nivel transcriptómico y de forma basal, las células resistentes desregulan significativamente genes con respecto a las sensibles. Además, las células sensibles desregulan una gran cantidad de genes bajo tratamiento con las combinaciones Ld o Pd, mientras que las resistentes desregulan pocos genes.
 - 3.4. Las células RLD y RPD desregulan de forma significativa miARNs, encontrándose prácticamente en su totalidad de forma sobreexpresada en comparación con la línea MM.1S.
 - 3.5. Los modelos de resistencia presentan una sobreexpresión de proteínas implicadas en vías de señalización como la vía de las MAPK y las proteínas antiapoptóticas. Además, mientras que el tratamiento con Ld y Pd induce una inhibición de las vías MAPK, PIM quinasas y KSP en las células sensibles, este efecto no se observa en las células resistentes tratadas con las respectivas combinaciones.

4. El tratamiento con el inhibidor de MEK selumetinib revierte la resistencia de los modelos RLD y RPD. Además, los fármacos venetoclax, PIM-447 y filanesib inducen una reversión parcial de la resistencia.
5. Los modelos de resistencia RLD y RPD infraexpresan CRBN tanto a nivel de ARNm como proteína.
6. Tanto la línea sensible MM.1S como las resistentes RLD y RPD presentan una delección heterocigótica en la región del gen *CRBN*.
7. No encontramos diferencias en el nivel de metilación del ADN de las regiones analizadas del cuerpo génico y promotor de *CRBN* entre células sensibles y resistentes.
8. El pretratamiento y posterior combinación del EZH2i tazemetostat con Ld o Pd revierte la resistencia a ambas combinaciones de forma independiente a CRBN.
9. La inhibición de los miARNs miR-7f-5p y miR30a-5p en las células resistentes RPD recupera parcialmente la expresión de CRBN sin mostrar un efecto en la sensibilidad a Pd.
10. La aplicación de cribados de librerías de CRISPR-Cas9 de genoma completo supone un método eficaz y robusto para la identificación de genes de sensibilidad y resistencia a Pd.
 - 10.1. La inactivación o ausencia en los genes *CRBN*, *SPOP*, *EDC4*, *FBXO33*, *NCOR1* y *PLAA* reduce la sensibilidad a Pd.
 - 10.2. La inactivación de genes componente del signalosoma COP9 (*COPS7B*, *COPS2*) y los relacionados con procesos de ubiquitinación (*UBE2G1*, *UBE2A*, *MIB2*, *FBXO21*, *KLHL42* y *KLHL9*), la regulación epigenética (*HDAC3*, *HDAC7*, *CBX1*) o la vía de NOTCH (*JAG1*, *KDELC1*, entre otros), podría reducir la sensibilidad a Pd.
 - 10.3. Los inhibidores de *checkpoints* inmunes atezolizumab, nivolumab y pembrolizumab podrían potenciar el efecto de Pd.
 - 10.4. La inactivación de las proteínas MEK, c-Myc, MTOR, TP53-RK, IRF4 y TOP2A, entre otras, podría revertir la resistencia adquirida a Pd.
 - 10.5. La identificación de genes de dependencia para la supervivencia de la línea RPD, como *IRF4*, *MYC*, *PCNA*, *HDAC1*, *MCL1*, *PSMB1*, *PSMB3*, *PSMA6* y *AKT2*, entre otros, sugiere una posible vulnerabilidad de estas células

resistentes a la inhibición de estas moléculas, y las posiciona como potenciales dianas farmacológicas para abordar la resistencia a Pd.

10.6. Los fármacos quimioterápicos paclitaxel y cisplatino, el inhibidor del proteasoma carfilzomib y el inhibidor de histona desacetilasas romidepsin podrían inducir la muerte de las células resistentes a Pd.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I

Tabla 7.1. Análisis MAGeCK-RRA mostrando los 300 genes cuyas guías aparecen sobrerrepresentadas en las células MM.1S tratadas con Pd respecto al vehículo (p-valor < 0,05; FC > 2) resultado del cribado de selección positiva. Los genes aparecen ordenados por p-valor. sgRNAs: número de sgRNAs significativamente sobrerrepresentadas. FC: Fold Change.

Gen	p-valor	sgR	FC	Gen	p-valor	sgR	FC
CRBN	2,28E-07	6	95,82	THOC2	1,94E-03	4	3,17
SPOP	2,28E-07	6	7,17	GZMA	2,06E-03	5	2,46
COPS7B	6,27E-05	5	3,68	JAG1	2,13E-03	6	2,04
KRTAP23-1	1,37E-04	3	3,55	SRGAP2D	2,15E-03	5	2,51
AP3B2	1,46E-04	4	3,12	CRIP2	2,42E-03	6	2,68
DNPEP	1,52E-04	5	5,28	PHKG1	2,60E-03	5	2,46
TEX35	2,03E-04	5	3,26	CCDC105	2,78E-03	6	2,11
NCOR1	2,33E-04	4	3,61	ZBED2	2,79E-03	6	2,16
ZBTB14	2,35E-04	5	3,84	FBXO33	2,86E-03	5	2,09
UBE2G1	2,58E-04	4	2,74	POMZP3	3,19E-03	4	2,08
PLAA	3,03E-04	6	4,18	SMC1B	3,26E-03	6	2,13
KIAA1210	3,17E-04	6	2,85	CACNA1B	3,34E-03	6	2,10
FANCM	3,31E-04	6	2,19	FAM200A	3,52E-03	5	2,17
ZNF737	2,85E-04	4	2,76	GPSM2	3,61E-03	5	2,09
EDC4	3,72E-04	5	3,75	C1orf229	3,65E-03	6	2,64
ARSK	3,96E-04	5	4,74	MEMO1	3,70E-03	6	2,94
KDELC1	5,04E-04	6	2,37	ZNF385B	3,76E-03	5	2,56
ELMSAN1	5,82E-04	4	2,68	N4BP1	3,96E-03	5	2,12
ATMIN	7,22E-04	6	2,52	EML3	3,97E-03	3	2,34
DNAJB4	1,05E-03	6	2,33	IL3RA_X	4,30E-03	5	2,21
ACAD9	1,13E-03	4	2,66	FBXO21	4,30E-03	6	2,26
FRG1	1,15E-03	6	3,03	JKAMP	4,39E-03	6	2,39
SPATC1	1,18E-03	6	2,96	DISP1	4,40E-03	6	2,59
TNRC18	1,25E-03	4	3,68	UBE2A	4,41E-03	6	2,73
NFKBIA	1,41E-03	5	2,37	CMPK2	4,43E-03	4	2,02
MUC16	1,55E-03	3	2,33	IL1R1	4,48E-03	5	3,01
KLHL42	1,57E-03	6	2,30	KLRD1	4,91E-03	4	2,77
HDAC7	1,61E-03	4	2,34	SFTPD	5,10E-03	4	2,42
AZI2	1,63E-03	5	2,47	PLEKHD1	5,47E-03	6	2,65
RASD2	1,65E-03	5	2,34	KRTAP10-9	4,89E-03	4	3,63

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>
FAM133A	5,56E-03	5	2,48	ZNF446	1,04E-02	5	2,27
PPP2R2A	5,59E-03	4	2,16	PPP6R1	1,07E-02	5	2,06
MAP2K4	5,63E-03	4	2,11	ACAD8	1,10E-02	5	2,20
SRPK1	5,02E-03	5	2,15	FAM20A	1,10E-02	6	2,96
GALNT4	5,79E-03	4	2,27	KLHL9	1,11E-02	6	2,25
HIST1H1A	5,85E-03	4	2,67	TMEM240	1,12E-02	4	3,52
KIAA0195	5,88E-03	6	2,10	PRRX2	1,01E-02	4	3,44
AGA	5,91E-03	5	3,15	ANKHD1-	8,37E-03	3	2,55
TLL2	5,94E-03	5	2,43	SEC14L1	1,14E-02	5	2,02
LGALS8	6,05E-03	4	2,91	HEXA	1,15E-02	5	2,44
KCNT1	5,49E-03	4	2,46	MIB2	1,16E-02	4	2,53
UNC5A	6,42E-03	4	2,15	MBD2	1,18E-02	5	2,04
OR5M10	6,52E-03	4	2,27	ZNF679	1,19E-02	5	2,47
HOXD1	6,62E-03	4	2,30	NPPC	1,23E-02	4	2,52
CBX7	6,69E-03	5	2,28	IFNAR2	1,11E-02	3	2,53
DNAJB13	6,71E-03	4	2,65	TRAF2	1,29E-02	5	2,39
MTNR1B	6,91E-03	4	2,18	NMBR	1,31E-02	4	2,17
ZMAT2	6,33E-03	3	3,20	ZNF699	1,32E-02	4	2,45
NHLRC3	7,20E-03	5	2,52	UBQLN1	1,32E-02	4	2,23
PAICS	7,52E-03	5	2,64	RHCG	1,35E-02	4	2,19
NUDT7	7,78E-03	6	2,04	TRIM64	1,36E-02	5	2,15
RRS1	7,91E-03	5	2,98	ZCCHC11	1,37E-02	6	2,16
ARMC8	8,06E-03	4	2,93	VIL1	1,40E-02	5	2,15
PAIP2	8,10E-03	6	2,32	VAR52	1,25E-02	4	2,36
RPGRIP1L	8,48E-03	5	2,12	TSPAN11	1,43E-02	5	2,36
COPS2	8,96E-03	5	2,12	C1orf64	1,47E-02	6	2,40
HDAC3	9,16E-03	4	2,33	GAPT	1,49E-02	4	2,10
CHD9	9,23E-03	4	2,76	MUCL1	1,49E-02	5	2,15
MGAT3	9,41E-03	5	2,93	CCDC50	1,51E-02	5	2,55
FIG4	9,42E-03	4	2,96	ZNF716	1,52E-02	4	2,74
ZNF543	9,47E-03	5	2,28	PLCB2	1,56E-02	6	2,90
ANP32D	9,49E-03	5	2,25	ACP2	1,58E-02	5	2,66
TMEM88B	9,54E-03	4	2,44	ZNF250	1,66E-02	4	2,53
DSG3	9,70E-03	5	2,12	OR6C1	1,66E-02	4	2,05
HNRNPA0	9,73E-03	5	2,45	SERINC5	1,66E-02	5	2,38
CCDC158	9,76E-03	5	2,97	CDKAL1	1,67E-02	5	2,20
MPPE1	9,94E-03	4	2,72	PHF7	1,67E-02	5	2,92
TEAD2	9,98E-03	6	2,13	CADM3	1,68E-02	5	2,73
OR5T3	1,03E-02	5	2,09	MAT1A	1,51E-02	4	2,28
DDX26B	1,04E-02	5	2,72	RNF6	1,74E-02	4	2,12

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>
RNPC3	1,74E-02	5	2,47	HMGN4	2,37E-02	4	2,95
SELM	1,76E-02	5	2,31	MGAT4C	2,39E-02	4	2,01
NT5C3B	1,78E-02	4	2,06	CEP152	2,39E-02	5	2,05
ILK	1,79E-02	5	2,04	AIG1	2,40E-02	4	2,29
BMPR1B	1,79E-02	4	2,29	LMOD2	2,44E-02	4	2,07
PMPCB	1,82E-02	5	2,53	SPRR1A	2,46E-02	5	2,02
CCDC88C	1,82E-02	4	2,05	PTEN	2,53E-02	4	2,06
TGFBR3L	1,82E-02	5	3,05	hsa-mir-6843	1,90E-02	3	3,45
SEZ6L2	1,86E-02	5	2,15	OR51L1	2,54E-02	4	2,05
NES	1,86E-02	5	2,01	COMMD4	2,54E-02	4	2,17
DEFB106A	1,88E-02	4	2,13	PDIA2	2,57E-02	5	2,07
FNBP1	1,92E-02	4	2,29	KRT12	2,61E-02	5	2,06
LGALS7B	1,43E-02	3	2,55	PEX19	2,31E-02	3	2,62
DDX39B	1,93E-02	4	2,17	ADD1	2,66E-02	4	2,04
NR3C1	1,94E-02	4	3,02	FAM126A	2,40E-02	4	3,38
FANCB	1,95E-02	5	2,57	C20orf26	2,75E-02	4	2,15
VGLL3	1,96E-02	6	2,23	ADORA2B	2,76E-02	5	2,22
C20orf197	1,98E-02	5	2,20	TRABD2A	2,77E-02	4	2,06
WAC	2,01E-02	5	2,79	RALGPS2	2,78E-02	4	2,00
IL15	2,03E-02	4	2,20	CASP2	2,79E-02	4	2,02
NDUFA8	2,04E-02	4	2,36	hsa-let-7b	2,15E-02	3	3,31
MLC1	2,05E-02	4	2,44	PCDH11Y	2,59E-02	3	2,80
AACS	2,05E-02	4	2,22	HLA-DQB2	2,88E-02	5	2,19
ESR2	2,06E-02	5	2,17	HK1	2,88E-02	4	2,25
SPATA31C2	2,07E-02	4	2,15	MED24	2,60E-02	4	2,21
PHLDB3	2,12E-02	5	2,28	MOCS1	2,92E-02	4	2,05
FNTA	2,13E-02	4	2,00	SMARCD1	2,96E-02	5	2,15
PSME1	2,14E-02	4	2,05	C1orf65	2,97E-02	5	2,11
43898	1,97E-02	4	2,00	GK5	3,04E-02	5	2,54
CXCL16	2,24E-02	4	3,01	RASSF6	3,07E-02	5	2,03
HOXA11	2,24E-02	5	2,09	APBA3	3,09E-02	5	2,09
DUSP13	2,24E-02	5	2,02	DNAJC4	3,09E-02	4	2,08
YIF1B	2,28E-02	4	2,15	PPIF	3,12E-02	4	2,27
PRH1	2,29E-02	4	2,63	CCL7	3,14E-02	4	2,13
ZNF671	2,32E-02	4	2,88	ATXN1L	3,14E-02	4	2,11
LOC284385	1,73E-02	3	3,50	CAPRIN1	3,15E-02	5	2,26
SCNN1G	2,33E-02	4	2,03	hsa-mir-556	1,94E-02	3	2,79
TNMD	2,34E-02	5	2,17	CLK4	3,18E-02	4	2,21
RPS6KA3	2,35E-02	5	2,06	METTL7A	3,20E-02	5	2,35
TEAD1	2,36E-02	5	2,03	ECI1	2,97E-02	3	3,31

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgR</i>	<i>FC</i>
AK9	3,22E-02	5	2,07	hsa-mir-639	3,39E-02	4	2,37
GNAS	3,23E-02	5	2,56	SYNGR3	4,02E-02	3	3,76
MGP	3,27E-02	5	2,07	hsa-mir-548o	3,43E-02	4	2,02
GTPBP1	3,29E-02	4	2,73	NCAM2	4,20E-02	4	2,30
NFE2L1	3,34E-02	5	2,34	CYP39A1	4,20E-02	4	2,26
DOPEY2	3,34E-02	4	2,54	hsa-mir-6750	3,48E-02	3	2,51
MESP1	3,39E-02	4	2,53	BABAM1	4,27E-02	5	2,13
MYH1	3,39E-02	4	2,34	HTN1	2,79E-02	3	2,08
CUL4B	3,40E-02	5	2,10	KAZN	4,28E-02	5	2,54
PDAP1	3,40E-02	5	2,40	SLC26A1	4,30E-02	4	2,25
PSG4	3,46E-02	5	2,47	MAPK9	4,32E-02	5	2,00
RBBP9	3,46E-02	5	2,05	CBLN2	4,32E-02	5	2,26
CHRN2	3,46E-02	4	2,19	hsa-mir-4507	3,58E-02	4	2,07
ALKBH2	3,49E-02	4	2,09	CDSN	4,22E-02	5	2,04
hsa-mir-7974	2,77E-02	3	2,42	HMBOX1	4,37E-02	4	2,25
AMMECR1	3,49E-02	5	2,12	FTO	4,39E-02	4	2,38
DRD3	3,51E-02	5	2,10	AKAP11	4,40E-02	5	2,22
MINOS1	3,52E-02	4	2,31	KATNB1	4,43E-02	4	2,41
CBX1	3,55E-02	5	2,00	USP8	4,45E-02	5	2,33
FAM127C	3,57E-02	4	2,04	RUSC1	4,47E-02	5	2,14
hsa-mir-5096	2,86E-02	4	3,03	IFLTD1	4,48E-02	4	2,39
ANKRD12	3,60E-02	5	2,26	ABCA13	4,51E-02	4	2,06
TNFSF9	2,94E-02	4	2,38	hsa-mir-539	3,75E-02	3	2,10
GMPR2	3,68E-02	5	2,03	ABCA5	4,55E-02	4	2,11
ABCA6	3,69E-02	4	2,05	DPEP1	4,58E-02	4	2,05
hsa-mir-4750	2,96E-02	3	4,32	TRAT1	4,47E-02	4	2,09
PPP1R14A	3,71E-02	4	2,16	C11orf87	4,66E-02	4	2,04
AKNAD1	3,72E-02	5	2,15	C12orf44	4,72E-02	4	2,07
AKAP3	3,77E-02	5	2,13	SPEG	4,73E-02	4	2,13
LAMC3	3,77E-02	5	2,29	ZBED6	4,74E-02	4	2,42
TMED5	3,83E-02	4	2,07	DES	4,77E-02	5	2,27
HHIP	3,88E-02	4	2,12	KNSTRN	4,87E-02	4	2,13
C9	3,94E-02	5	2,01	CYP11A1	4,90E-02	4	2,31
MTCH1	4,05E-02	5	2,05	hsa-mir-6742	4,10E-02	4	2,41
TSTD3	4,07E-02	4	2,20	NLRC4	4,91E-02	4	2,10
ZFP28	4,08E-02	4	2,20	MRPL42	4,97E-02	4	2,31
MTHFSD	4,08E-02	5	2,12	GLRA2	4,97E-02	4	2,01
YOD1	4,11E-02	5	2,04	hsa-mir-132	4,25E-02	3	2,27
MLF1	4,14E-02	4	2,46	KIAA0586	4,82E-02	3	2,54
CDCA3	4,15E-02	5	2,14	SLTM	4,01E-02	3	2,15

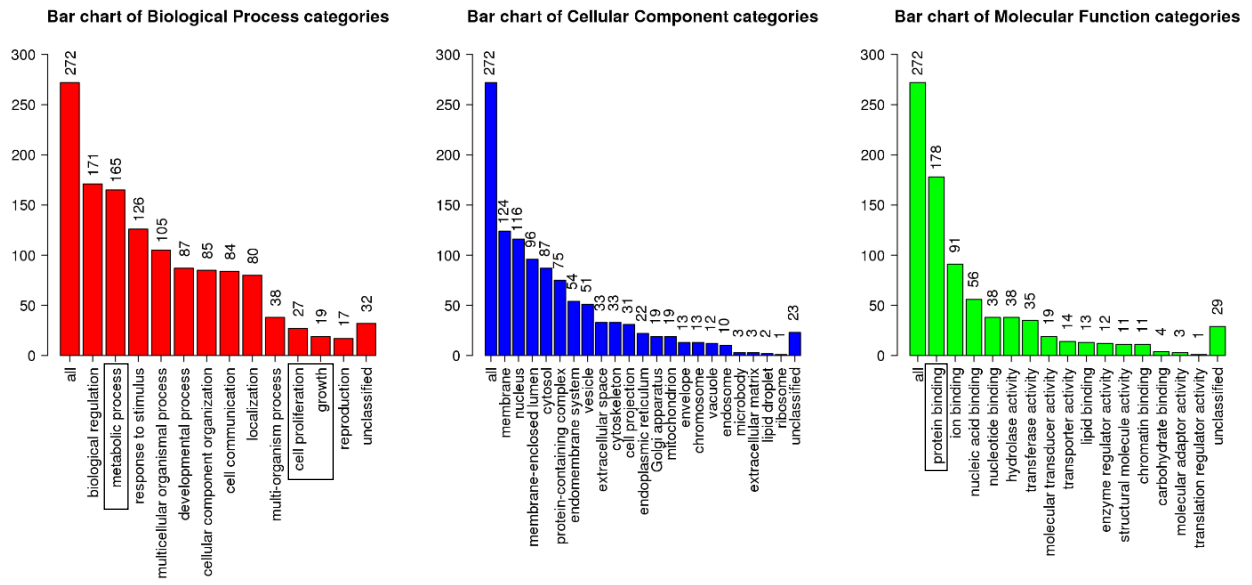


Figura 7.1. Análisis de enriquecimiento realizado con los 272 genes que codifican para proteína de los 300 hits identificados en el cribado de selección positiva con p -valor < 0,05 y Fold Change > 2.

Tabla 7.2. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos con los 272 genes resultado de la selección positiva.

Gene Set	Description: Biological Process	P Value
GO:0010498	<u>proteasomal protein catabolic process</u>	0.00028899
GO:0000209	<u>protein polyubiquitination</u>	0.0012279
GO:0051703	intraspecies interaction between organisms	0.0076315
GO:0001963	synaptic transmission, dopaminergic	0.0099327
GO:0030431	sleep	0.0099327
GO:0090077	foam cell differentiation	0.013866
GO:0007588	excretion	0.016007
GO:0048638	regulation of developmental growth	0.016119
GO:0051705	multi-organism behavior	0.017658
GO:0097305	response to alcohol	0.019242
GO:0035264	multicellular organism growth	0.019994
GO:0048511	rhythmic process	0.020341
GO:0070646	protein modification by small protein removal	0.024364
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	0.027429
GO:0007272	ensheathment of neurons	0.029226
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	0.029954
GO:0035690	cellular response to drug	0.030652
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	0.032865
GO:0006457	protein folding	0.033103
GO:0098743	cell aggregation	0.036458

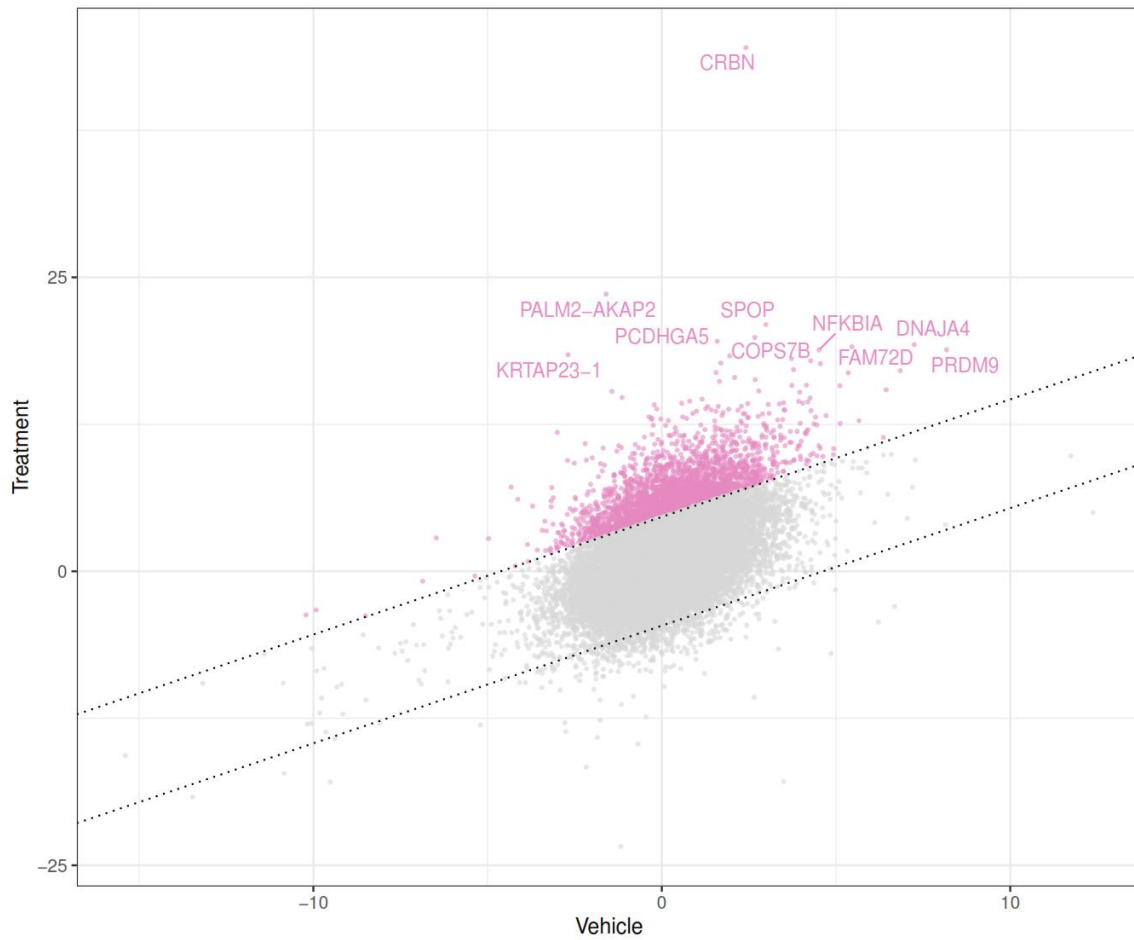


Figura 7.2. Análisis MAGeCK-MLE de las sgRNAs tras el cribado de selección positiva con Pd, mostrando los Top-10 genes con mayor puntuación.

Tabla 7.3. Análisis MAGeCK-RRA mostrando los 213 genes cuyas guías aparecen infrarrepresentadas en las células MM.1S tratadas con Pd respecto al vehículo (p-valor < 0,05; FC < 0,5) resultado del cribado de selección positiva. Los genes aparecen ordenados por p-valor. sgRNAs: número de sgRNAs significativamente infrarrepresentadas. FC: Fold Change.

Gen	p-valor	sgRNAs	FC	Gen	p-valor	sgRNAs	FC
APCDD1L	1,35E-05	4	0,36	SLC38A1	4,80E-03	4	0,50
DMAP1	4,68E-05	4	0,34	TDRD6	5,14E-03	4	0,38
BTN2A2	6,91E-05	4	0,31	PYHIN1	5,23E-03	5	0,41
IGF1R	1,44E-04	4	0,39	PRPF6	5,30E-03	5	0,38
GPRIN2	1,64E-04	6	0,36	BAG6	5,40E-03	5	0,42
CTNNB1	2,05E-04	4	0,45	ARRDC4	5,48E-03	5	0,40
SARS	1,03E-03	6	0,42	MYPOP	5,50E-03	5	0,44
HFE2	1,05E-03	5	0,46	RNF135	5,50E-03	3	0,44
MYO3B	1,17E-03	5	0,36	IL1B	6,32E-03	5	0,43
USP54	1,27E-03	5	0,34	hsa-mir-3655	7,11E-03	4	0,43
EDNRA	1,39E-03	6	0,48	SLC6A12	7,63E-03	4	0,48
PTDSS1	1,50E-03	6	0,47	WIF1	7,79E-03	4	0,41
UIMC1	1,52E-03	5	0,45	C15orf40	7,81E-03	5	0,49
hsa-mir-5191	1,72E-03	3	0,45	NFAM1	8,02E-03	5	0,43
ZNF143	1,72E-03	6	0,44	RPS9	8,15E-03	6	0,40
BFSP1	1,95E-03	5	0,38	DPM1	8,40E-03	6	0,42
hsa-mir-4280	2,12E-03	4	0,39	PLEKHH2	8,56E-03	5	0,41
MRPL28	2,17E-03	6	0,48	hsa-mir-6895	8,89E-03	3	0,44
hsa-mir-3646	2,24E-03	3	0,45	CTU1	8,97E-03	6	0,33
CERS2	2,56E-03	5	0,33	DDX10	8,98E-03	6	0,40
hsa-mir-	2,66E-03	4	0,38	EP400	9,28E-03	5	0,37
hsa-mir-491	2,88E-03	4	0,48	hsa-mir-617	9,38E-03	4	0,47
CNTN6	3,06E-03	4	0,43	DEFA4	9,47E-03	4	0,49
OR4K2	3,06E-03	5	0,42	CLEC4C	9,71E-03	6	0,50
TRIM8	3,16E-03	5	0,43	TMEM30B	9,81E-03	5	0,28
WRAP53	3,25E-03	5	0,42	TRIM15	9,91E-03	5	0,48
POMGNT2	3,30E-03	4	0,37	SPHKAP	1,01E-02	5	0,48
FBP1	3,63E-03	4	0,44	KRT5	1,01E-02	5	0,40
CD274	3,84E-03	4	0,31	MARS2	1,03E-02	5	0,16
LRTOMT	4,49E-03	5	0,44	SSH3	1,05E-02	5	0,36
ACRV1	4,55E-03	5	0,45	ZNF883	1,06E-02	4	0,50
hsa-mir-5708	4,63E-03	3	0,27	ETV7	1,06E-02	5	0,43

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>FAM151A</i>	1,08E-02	4	0,46	<i>MICALCL</i>	1,54E-02	5	0,42
<i>RBM4B</i>	1,09E-02	5	0,41	<i>TRIM43</i>	1,55E-02	5	0,27
<i>SSBP1</i>	1,09E-02	4	0,49	<i>CDYL</i>	1,58E-02	5	0,48
<i>SLFN11</i>	1,10E-02	5	0,49	<i>ZNF785</i>	1,63E-02	4	0,41
<i>hsa-mir-6790</i>	1,10E-02	4	0,45	<i>NRROS</i>	1,65E-02	3	0,42
<i>NAE1</i>	1,10E-02	6	0,45	<i>TPX2</i>	1,70E-02	6	0,34
<i>CHRD1</i>	1,10E-02	5	0,38	<i>SRSF10</i>	1,72E-02	5	0,38
<i>NHLH1</i>	1,10E-02	4	0,48	<i>EBI3</i>	1,73E-02	5	0,46
<i>SHQ1</i>	1,11E-02	4	0,49	<i>CTPS1</i>	1,74E-02	4	0,42
<i>CHORDC1</i>	1,11E-02	5	0,42	<i>COA6</i>	1,75E-02	4	0,38
<i>SUCLA2</i>	1,11E-02	5	0,47	<i>METTL15</i>	1,77E-02	4	0,44
<i>NCL</i>	1,12E-02	6	0,47	<i>EPHA4</i>	1,79E-02	5	0,46
<i>LILRB1</i>	1,15E-02	4	0,44	<i>CAPS2</i>	1,81E-02	4	0,43
<i>PGRMC1</i>	1,15E-02	5	0,40	<i>FRMPD2</i>	1,82E-02	4	0,47
<i>TBX19</i>	1,17E-02	4	0,50	<i>SUMF1</i>	1,83E-02	4	0,39
<i>SLC33A1</i>	1,19E-02	5	0,41	<i>OR2AG1</i>	1,84E-02	5	0,34
<i>MFI2</i>	1,19E-02	6	0,43	<i>CPNE3</i>	1,85E-02	4	0,44
<i>MGST1</i>	1,24E-02	4	0,45	<i>hsa-mir-4421</i>	1,85E-02	4	0,49
<i>hsa-mir-184</i>	1,25E-02	3	0,42	<i>SLC9A3R2</i>	1,86E-02	5	0,20
<i>ANKRD50</i>	1,25E-02	6	0,44	<i>AP4S1</i>	1,89E-02	5	0,45
<i>POLA2</i>	1,27E-02	4	0,50	<i>hsa-mir-8064</i>	1,89E-02	3	0,37
<i>hsa-mir-4705</i>	1,29E-02	3	0,50	<i>THOC3</i>	1,94E-02	6	0,49
<i>hsa-mir-542</i>	1,29E-02	3	0,44	<i>MAPK7</i>	1,95E-02	5	0,39
<i>REN</i>	1,30E-02	5	0,48	<i>BCAS1</i>	2,01E-02	5	0,49
<i>HSD11B1L</i>	1,32E-02	5	0,29	<i>hsa-mir-6743</i>	2,04E-02	4	0,26
<i>POMP</i>	1,32E-02	5	0,48	<i>MICU3</i>	2,04E-02	4	0,46
<i>UTS2B</i>	1,38E-02	6	0,40	<i>SLC25A33</i>	2,05E-02	5	0,40
<i>FAM91A1</i>	1,39E-02	5	0,44	<i>hsa-mir-</i>	2,06E-02	4	0,44
<i>ACTR2</i>	1,39E-02	4	0,33	<i>C8orf87</i>	2,10E-02	5	0,44
<i>GRB2</i>	1,42E-02	5	0,45	<i>hsa-mir-6827</i>	2,10E-02	4	0,40
<i>DENND4A</i>	1,42E-02	5	0,42	<i>USP21</i>	2,15E-02	4	0,48
<i>SLC25A19</i>	1,43E-02	4	0,37	<i>HSPBP1</i>	2,19E-02	4	0,39
<i>SMARCA5</i>	1,43E-02	5	0,49	<i>FGF12</i>	2,24E-02	6	0,46
<i>hsa-mir-1471</i>	1,44E-02	3	0,33	<i>OR4K14</i>	2,32E-02	4	0,36
<i>NARS</i>	1,46E-02	5	0,32	<i>hsa-mir-</i>	2,33E-02	3	0,35
<i>TSPAN32</i>	1,47E-02	4	0,48	<i>RPS16</i>	2,40E-02	4	0,45
<i>CKMT2</i>	1,49E-02	4	0,46	<i>C9orf92</i>	2,40E-02	5	0,36
<i>TMED3</i>	1,51E-02	5	0,48	<i>TICAM1</i>	2,47E-02	4	0,42
<i>CACNA1S</i>	1,52E-02	4	0,47	<i>MANF</i>	2,48E-02	6	0,46
<i>hsa-mir-1183</i>	1,54E-02	4	0,47	<i>hsa-mir-3169</i>	2,48E-02	3	0,45

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>PGAM1</i>	2,49E-02	5	0,49	<i>MRGPRG</i>	3,66E-02	4	0,44
<i>CECR2</i>	2,49E-02	3	0,48	<i>HOXA4</i>	3,66E-02	5	0,50
<i>hsa-mir-629</i>	2,50E-02	4	0,45	<i>FRY</i>	3,75E-02	5	0,42
<i>TSR1</i>	2,51E-02	5	0,36	<i>L2HGDH</i>	3,75E-02	4	0,43
<i>DCAF17</i>	2,54E-02	5	0,41	<i>PDP1</i>	3,80E-02	4	0,32
<i>GUCA2A</i>	2,59E-02	6	0,50	<i>hsa-mir-6809</i>	3,83E-02	3	0,44
<i>AGGF1</i>	2,61E-02	5	0,42	<i>CHMP4C</i>	3,85E-02	5	0,44
<i>USP5</i>	2,63E-02	4	0,49	<i>hsa-mir-6849</i>	3,86E-02	3	0,39
<i>ADRA2A</i>	2,63E-02	5	0,49	<i>HIST1H4C</i>	3,90E-02	4	0,50
<i>AMD1</i>	2,65E-02	5	0,42	<i>RAC1</i>	3,90E-02	5	0,46
<i>EIF3I</i>	2,65E-02	4	0,38	<i>PDCD1</i>	3,90E-02	4	0,50
<i>hsa-mir-8086</i>	2,66E-02	4	0,11	<i>ADRA1D</i>	3,92E-02	5	0,46
<i>USPL1</i>	2,68E-02	5	0,49	<i>KIRREL3</i>	3,98E-02	5	0,45
<i>C22orf31</i>	2,70E-02	5	0,40	<i>SLC22A10</i>	3,99E-02	4	0,49
<i>SFMBT1</i>	2,73E-02	5	0,48	<i>PDF</i>	4,07E-02	4	0,48
<i>ATP10D</i>	2,79E-02	4	0,49	<i>KCTD17</i>	4,12E-02	5	0,49
<i>hsa-mir-</i>	2,84E-02	4	0,42	<i>hsa-mir-6072</i>	4,14E-02	3	0,44
<i>GEN1</i>	2,90E-02	4	0,46	<i>hsa-mir-3652</i>	4,21E-02	4	0,39
<i>WDR24</i>	2,92E-02	5	0,40	<i>NKD1</i>	4,21E-02	5	0,43
<i>ZNF234</i>	2,97E-02	5	0,45	<i>hsa-mir-301a</i>	4,25E-02	3	0,38
<i>PLEKHA1</i>	2,99E-02	4	0,47	<i>TTC22</i>	4,27E-02	5	0,43
<i>C19orf43</i>	3,03E-02	4	0,46	<i>HARS</i>	4,31E-02	4	0,43
<i>RPL41</i>	3,04E-02	4	0,27	<i>SMIM15</i>	4,33E-02	5	0,43
<i>TIRAP</i>	3,10E-02	5	0,42	<i>IQGAP2</i>	4,61E-02	4	0,45
<i>DRAP1</i>	3,17E-02	5	0,33	<i>C1orf216</i>	4,64E-02	5	0,50
<i>POLD4</i>	3,18E-02	5	0,40	<i>hsa-mir-4530</i>	4,67E-02	4	0,46
<i>hsa-mir-301b</i>	3,23E-02	3	0,45	<i>hsa-mir-5091</i>	4,67E-02	3	0,49
<i>WWC2</i>	3,31E-02	5	0,39	<i>HIST1H2BO</i>	4,69E-02	5	0,46
<i>POU3F4</i>	3,39E-02	3	0,49	<i>COX10</i>	4,71E-02	5	0,46
<i>MIS18A</i>	3,40E-02	5	0,45	<i>PGRMC2</i>	4,72E-02	3	0,46
<i>hsa-mir-3941</i>	3,41E-02	3	0,49	<i>RGS3</i>	4,83E-02	4	0,40
<i>KBTD4</i>	3,43E-02	4	0,39	<i>hsa-mir-</i>	4,93E-02	3	0,46
<i>IZUMO4</i>	3,47E-02	5	0,25	<i>TRIM48</i>	4,95E-02	5	0,47
<i>CRYL1</i>	3,51E-02	5	0,47	<i>ARHGAP39</i>	4,98E-02	4	0,35
<i>SH3BGRL2</i>	3,61E-02	4	0,49				

Tabla 7.4. Análisis MAGeCK-RRA mostrando los 388 genes cuyas guías aparecen infrarrepresentadas en las células RPD tratadas con Pd respecto al vehículo (p-valor < 0,05; FC < 0,75). Los genes aparecen ordenados por p-valor. sgRNAs: número de sgRNAs significativamente infrarrepresentadas. FC: Fold Change.

Gen	p-valor	sgRNAs	FC	Gen	p-valor	sgRNAs	FC
FUT4	7,28E-05	4	0,69	hsa-mir-1271	3,80E-03	3	0,73
MRPL17	1,98E-04	3	0,71	hsa-mir-513a-1	3,80E-03	4	0,68
SLC19A1	2,52E-04	6	0,48	hsa-mir-608	3,86E-03	4	0,72
SPANXN3	4,36E-04	3	0,64	C10orf131	3,87E-03	3	0,52
ZFP2	4,44E-04	4	0,71	ST8SIA5	4,17E-03	3	0,74
PHEX	5,47E-04	3	0,73	TUT1	4,23E-03	5	0,56
hsa-mir-30a	6,31E-04	4	0,63	TOR1A	4,36E-03	5	0,75
MEGF10	7,96E-04	3	0,70	hsa-mir-1185-1	4,82E-03	4	0,73
hsa-mir-5009	9,46E-04	4	0,68	FRA10AC1	4,86E-03	4	0,48
hsa-mir-4295	1,03E-03	3	0,61	RAB38	4,94E-03	4	0,68
hsa-mir-378b	1,04E-03	4	0,70	hsa-mir-6854	4,98E-03	4	0,65
hsa-mir-1202	1,23E-03	4	0,55	PFDN6	5,02E-03	5	0,75
IL31RA	1,23E-03	5	0,63	SLC30A6	5,18E-03	5	0,70
PLA2G6	1,43E-03	4	0,65	TSPYL1	5,33E-03	6	0,70
CUBN	1,48E-03	4	0,70	ARHGEF16	5,38E-03	5	0,69
ZSCAN9	1,52E-03	4	0,65	ENDOD1	5,56E-03	6	0,37
OR4C16	1,61E-03	4	0,74	DCAF4L2	5,63E-03	3	0,69
hsa-mir-3690-1	1,77E-03	3	0,75	PPP2R1B	5,70E-03	3	0,75
HHAT	1,78E-03	5	0,74	PMAIP1	5,79E-03	5	0,71
HSD17B7	1,80E-03	5	0,68	SPATA24	5,84E-03	3	0,70
SYNC	1,92E-03	5	0,65	CSNK2A2	5,87E-03	4	0,68
DHRS4L2	1,99E-03	4	0,46	CHMP2B	6,01E-03	4	0,71
hsa-mir-548o	2,21E-03	3	0,69	DEFB107A	6,04E-03	3	0,72
DUOX1	2,38E-03	4	0,74	hsa-mir-599	6,04E-03	4	0,67
hsa-mir-6762	2,65E-03	4	0,56	PSPN	6,05E-03	5	0,73
GREB1L	2,79E-03	4	0,75	AP3M2	6,11E-03	4	0,71
MUC16	2,83E-03	4	0,74	DIP2B	6,19E-03	4	0,66
CATSPER2	2,94E-03	5	0,66	ANGPTL2	6,25E-03	3	0,66
DOCK5	3,08E-03	5	0,72	MON1A	6,36E-03	5	0,64
LRPPRC	3,10E-03	3	0,73	OBFC1	6,43E-03	3	0,66
DPH3	3,19E-03	3	0,66	OR10J3	6,43E-03	4	0,72
SLC46A2	3,22E-03	5	0,48	hsa-mir-30b	6,61E-03	4	0,72
TNFAIP3	3,25E-03	5	0,65	hsa-mir-506	6,67E-03	3	0,73
C1orf159	3,42E-03	5	0,68	hsa-mir-5589	6,69E-03	4	0,70
CYP3A43	3,51E-03	4	0,65	KIAA0101	6,72E-03	4	0,54
hsa-mir-3926-1	3,53E-03	4	0,73	CACNB2	7,01E-03	5	0,68
hsa-mir-3679	3,75E-03	3	0,68	SAMM50	7,06E-03	4	0,68

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>FAM111A</i>	7,10E-03	5	0,63	<i>TM7SF2</i>	1,25E-02	5	0,58
<i>HIST1H1C</i>	7,19E-03	4	0,64	<i>PEX14</i>	1,26E-02	3	0,69
<i>ATP6V1F</i>	7,37E-03	6	0,71	<i>NIPAL3</i>	1,26E-02	5	0,65
<i>RINL</i>	7,43E-03	6	0,54	<i>ATP2B1</i>	1,27E-02	4	0,70
<i>hsa-mir-20b</i>	7,69E-03	3	0,73	<i>SERPINE3</i>	1,28E-02	4	0,75
<i>SATB2</i>	7,73E-03	5	0,68	<i>PI4K2A</i>	1,28E-02	6	0,66
<i>hsa-mir-520f</i>	7,88E-03	4	0,68	<i>hsa-mir-4472-1</i>	1,29E-02	3	0,65
<i>HSPB6</i>	7,95E-03	3	0,70	<i>ZNF501</i>	1,30E-02	3	0,63
<i>hsa-mir-4776-1</i>	8,07E-03	4	0,74	<i>AIPL1</i>	1,33E-02	4	0,73
<i>MYC</i>	8,57E-03	5	0,68	<i>PIWIL4</i>	1,33E-02	4	0,71
<i>USP37</i>	8,77E-03	4	0,74	<i>BCAS4</i>	1,34E-02	4	0,62
<i>hsa-mir-7153</i>	9,02E-03	4	0,67	<i>PC</i>	1,36E-02	4	0,65
<i>hsa-mir-7151</i>	9,27E-03	3	0,67	<i>CAMTA2</i>	1,36E-02	4	0,72
<i>hsa-mir-5087</i>	9,33E-03	3	0,60	<i>hsa-mir-4658</i>	1,39E-02	4	0,72
<i>HSPA5</i>	9,35E-03	6	0,69	<i>hsa-mir-3148</i>	1,43E-02	4	0,60
<i>FAM167B</i>	9,48E-03	4	0,71	<i>hsa-mir-6767</i>	1,46E-02	3	0,73
<i>CD300LG</i>	9,56E-03	4	0,61	<i>ERMN</i>	1,48E-02	4	0,69
<i>hsa-mir-181c</i>	9,61E-03	3	0,59	<i>PKD1</i>	1,49E-02	4	0,64
<i>hsa-mir-486</i>	9,67E-03	4	0,73	<i>TRAPPC8</i>	1,50E-02	5	0,73
<i>LYG1</i>	9,72E-03	3	0,73	<i>MTOR</i>	1,50E-02	5	0,73
<i>SLCO1B1</i>	9,90E-03	5	0,70	<i>LOC728392</i>	1,53E-02	4	0,71
<i>hsa-mir-4522</i>	9,96E-03	4	0,64	<i>NT5C3A</i>	1,53E-02	5	0,75
<i>MBTD1</i>	9,96E-03	4	0,69	<i>TOP1</i>	1,55E-02	4	0,68
<i>hsa-mir-101-1</i>	1,00E-02	3	0,64	<i>hsa-mir-548ai</i>	1,63E-02	4	0,74
<i>hsa-mir-548aa-1</i>	1,02E-02	4	0,75	<i>TSR1</i>	1,64E-02	4	0,70
<i>MUC4</i>	1,07E-02	4	0,75	<i>hsa-mir-6807</i>	1,66E-02	4	0,70
<i>SPACA4</i>	1,08E-02	5	0,66	<i>CHODL</i>	1,66E-02	4	0,71
<i>EVX2</i>	1,08E-02	5	0,70	<i>ELOVL6</i>	1,67E-02	4	0,65
<i>hsa-mir-570</i>	1,11E-02	4	0,64	<i>TOMM20</i>	1,69E-02	3	0,67
<i>FAM133B</i>	1,11E-02	6	0,69	<i>C12orf50</i>	1,71E-02	4	0,67
<i>FBXO40</i>	1,14E-02	6	0,72	<i>NRG4</i>	1,72E-02	4	0,66
<i>C9orf163</i>	1,15E-02	4	0,74	<i>LAG3</i>	1,73E-02	5	0,41
<i>FDXACB1</i>	1,15E-02	4	0,62	<i>MRPL55</i>	1,73E-02	5	0,67
<i>HIGD1A</i>	1,17E-02	5	0,74	<i>ERLEC1</i>	1,73E-02	4	0,63
<i>RIBC1</i>	1,18E-02	5	0,71	<i>hsa-mir-3181</i>	1,76E-02	4	0,49
<i>ARHGAP22</i>	1,18E-02	5	0,75	<i>hsa-mir-371a</i>	1,81E-02	3	0,75
<i>hsa-mir-6083</i>	1,18E-02	4	0,64	<i>CDK5RAP3</i>	1,81E-02	4	0,71
<i>ARMC12</i>	1,20E-02	4	0,66	<i>PARP15</i>	1,83E-02	5	0,75
<i>PHF15</i>	1,21E-02	5	0,63	<i>NBPF3</i>	1,87E-02	3	0,65
<i>WNT5A</i>	1,21E-02	3	0,73	<i>WNT2B</i>	1,87E-02	5	0,54
<i>hsa-mir-7154</i>	1,22E-02	3	0,67	<i>KRT37</i>	1,88E-02	4	0,61
<i>MED9</i>	1,22E-02	6	0,48	<i>PFKFB2</i>	1,89E-02	4	0,73
<i>SYCE1</i>	1,23E-02	5	0,67	<i>C4orf48</i>	1,90E-02	5	0,67
<i>CEP72</i>	1,23E-02	4	0,59	<i>hsa-mir-2113</i>	1,90E-02	4	0,68
<i>BBOX1</i>	1,24E-02	5	0,58	<i>IQCK</i>	1,91E-02	4	0,75

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>CKS1B</i>	1,92E-02	4	0,72	<i>hsa-mir-5699</i>	2,50E-02	4	0,73
<i>hsa-mir-7162</i>	1,93E-02	4	0,61	<i>MCEE</i>	2,51E-02	5	0,65
<i>NACA2</i>	1,94E-02	5	0,59	<i>hsa-mir-3139</i>	2,52E-02	4	0,64
<i>CXCL2</i>	1,95E-02	4	0,71	<i>hsa-mir-6763</i>	2,53E-02	4	0,72
<i>MS4A10</i>	1,98E-02	5	0,70	<i>CLDN5</i>	2,54E-02	5	0,71
<i>hsa-mir-588</i>	2,02E-02	4	0,72	<i>NOL7</i>	2,55E-02	4	0,70
<i>ACPL2</i>	2,03E-02	4	0,70	<i>PPP2R2B</i>	2,56E-02	4	0,70
<i>CDH15</i>	2,05E-02	5	0,72	<i>PMS2</i>	2,58E-02	4	0,58
<i>CDV3</i>	2,06E-02	3	0,65	<i>SLC36A1</i>	2,60E-02	4	0,45
<i>hsa-mir-6512</i>	2,06E-02	3	0,66	<i>TMEM14B</i>	2,62E-02	4	0,62
<i>PAX5</i>	2,10E-02	4	0,71	<i>hsa-mir-518f</i>	2,63E-02	3	0,70
<i>PAPSS2</i>	2,10E-02	4	0,66	<i>SLC25A32</i>	2,64E-02	4	0,70
<i>CAMKV</i>	2,14E-02	4	0,69	<i>SERINC5</i>	2,65E-02	3	0,74
<i>ARL2</i>	2,14E-02	3	0,75	<i>hsa-mir-376a-1</i>	2,65E-02	4	0,68
<i>VPS13A</i>	2,17E-02	5	0,69	<i>OR52E8</i>	2,66E-02	5	0,64
<i>PPIL1</i>	2,17E-02	5	0,64	<i>ITGB3BP</i>	2,67E-02	4	0,63
<i>SPCS2</i>	2,18E-02	5	0,58	<i>hsa-mir-1285-1</i>	2,70E-02	4	0,67
<i>ABCG2</i>	2,20E-02	3	0,70	<i>MKNK2</i>	2,72E-02	4	0,68
<i>LRRTM1</i>	2,21E-02	3	0,72	<i>LLPH</i>	2,73E-02	4	0,60
<i>ZNF534</i>	2,22E-02	4	0,73	<i>hsa-mir-6811</i>	2,73E-02	3	0,70
<i>NT5E</i>	2,23E-02	4	0,65	<i>hsa-mir-4275</i>	2,74E-02	4	0,75
<i>hsa-mir-875</i>	2,24E-02	4	0,69	<i>MBIP</i>	2,74E-02	4	0,56
<i>POLR3D</i>	2,24E-02	4	0,71	<i>ACTL7A</i>	2,77E-02	4	0,75
<i>FAHD2A</i>	2,27E-02	4	0,74	<i>USP7</i>	2,80E-02	5	0,50
<i>GPR37L1</i>	2,28E-02	4	0,71	<i>GOLT1B</i>	2,83E-02	5	0,72
<i>BBIP1</i>	2,29E-02	5	0,72	<i>RUSC2</i>	2,84E-02	4	0,72
<i>hsa-mir-1302-6</i>	2,31E-02	3	0,68	<i>CLCNKA</i>	2,84E-02	5	0,68
<i>CAMK2B</i>	2,31E-02	3	0,70	<i>TMEM27</i>	2,84E-02	5	0,68
<i>KRTAP4-2</i>	2,33E-02	5	0,74	<i>hsa-mir-6866</i>	2,86E-02	4	0,58
<i>MMP8</i>	2,33E-02	4	0,74	<i>hsa-mir-6722</i>	2,87E-02	3	0,69
<i>SUSD1</i>	2,33E-02	4	0,73	<i>DDA1</i>	2,95E-02	3	0,71
<i>hsa-let-7a-2</i>	2,34E-02	4	0,73	<i>ACTR3</i>	2,98E-02	4	0,72
<i>hsa-mir-6828</i>	2,34E-02	4	0,72	<i>FKRP</i>	2,98E-02	4	0,65
<i>PDSS1</i>	2,35E-02	5	0,72	<i>TMEM200C</i>	3,00E-02	5	0,67
<i>SV2C</i>	2,35E-02	5	0,71	<i>BSPRY</i>	3,02E-02	4	0,72
<i>MAG</i>	2,36E-02	4	0,71	<i>NDUFB9</i>	3,02E-02	4	0,63
<i>hsa-mir-556</i>	2,38E-02	3	0,65	<i>C1orf56</i>	3,03E-02	5	0,59
<i>TAF6</i>	2,40E-02	4	0,62	<i>hsa-mir-1284</i>	3,03E-02	4	0,57
<i>hsa-mir-376b</i>	2,42E-02	3	0,64	<i>RAP1GDS1</i>	3,04E-02	4	0,71
<i>FXYP7</i>	2,42E-02	5	0,73	<i>CAMKMT</i>	3,05E-02	4	0,64
<i>IHH</i>	2,43E-02	4	0,70	<i>TAS2R42</i>	3,06E-02	4	0,72
<i>HIST1H1D</i>	2,45E-02	5	0,57	<i>TMEM119</i>	3,07E-02	4	0,60
<i>SIT1</i>	2,45E-02	5	0,65	<i>hsa-mir-549a</i>	3,08E-02	4	0,74
<i>KNDC1</i>	2,47E-02	3	0,67	<i>MYCL</i>	3,10E-02	4	0,71
<i>hsa-mir-3658</i>	2,47E-02	4	0,66	<i>KRT33A</i>	3,12E-02	4	0,72

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>OR2M4</i>	3,17E-02	4	0,74	<i>FAM227B</i>	3,71E-02	4	0,73
<i>RRN3</i>	3,17E-02	4	0,61	<i>CRHBP</i>	3,80E-02	4	0,71
<i>ARHGEF10</i>	3,20E-02	5	0,65	<i>hsa-mir-372</i>	3,80E-02	4	0,74
<i>OST4</i>	3,20E-02	3	0,72	<i>AMIGO2</i>	3,82E-02	5	0,59
<i>hsa-mir-591</i>	3,21E-02	4	0,71	<i>NFRKB</i>	3,83E-02	4	0,62
<i>PHOX2B</i>	3,22E-02	4	0,66	<i>RNASE6</i>	3,85E-02	5	0,70
<i>hsa-mir-4740</i>	3,22E-02	4	0,71	<i>EXOSC10</i>	3,87E-02	3	0,70
<i>METRNL</i>	3,23E-02	4	0,74	<i>MLL5</i>	3,87E-02	4	0,74
<i>hsa-mir-5688</i>	3,23E-02	4	0,72	<i>TMEM89</i>	3,88E-02	5	0,68
<i>ARHGAP26</i>	3,23E-02	5	0,65	<i>C5orf58</i>	3,91E-02	3	0,75
<i>VCX3B</i>	3,23E-02	3	0,69	<i>DNAAF3</i>	3,91E-02	3	0,73
<i>hsa-mir-1228</i>	3,23E-02	3	0,42	<i>ATAD3B</i>	3,92E-02	5	0,65
<i>C8orf33</i>	3,24E-02	3	0,70	<i>PYY</i>	3,94E-02	4	0,74
<i>CAND2</i>	3,24E-02	3	0,72	<i>TOMM20L</i>	3,96E-02	4	0,53
<i>ING4</i>	3,25E-02	5	0,66	<i>HTRA2</i>	3,97E-02	4	0,21
<i>hsa-mir-18b</i>	3,25E-02	3	0,67	<i>hsa-mir-7109</i>	3,97E-02	4	0,69
<i>C16orf13</i>	3,28E-02	5	0,72	<i>hsa-mir-4726</i>	3,98E-02	4	0,58
<i>hsa-mir-5684</i>	3,28E-02	4	0,63	<i>SLC27A5</i>	4,03E-02	4	0,52
<i>hsa-mir-621</i>	3,28E-02	4	0,75	<i>hsa-mir-645</i>	4,05E-02	4	0,73
<i>RGS14</i>	3,32E-02	4	0,73	<i>CPNE9</i>	4,07E-02	4	0,71
<i>hsa-mir-6089-1</i>	3,34E-02	3	0,72	<i>EPHX2</i>	4,07E-02	4	0,75
<i>hsa-mir-4738</i>	3,36E-02	3	0,55	<i>MPV17</i>	4,11E-02	4	0,73
<i>KLHL18</i>	3,36E-02	5	0,74	<i>hsa-mir-326</i>	4,15E-02	4	0,69
<i>TBC1D28</i>	3,39E-02	3	0,74	<i>ARHGAP21</i>	4,18E-02	3	0,65
<i>TSNARE1</i>	3,41E-02	5	0,73	<i>hsa-mir-524</i>	4,18E-02	3	0,70
<i>GUCY1B3</i>	3,41E-02	3	0,69	<i>FCER2</i>	4,18E-02	4	0,66
<i>hsa-mir-6786</i>	3,44E-02	4	0,50	<i>hsa-mir-6516</i>	4,18E-02	4	0,61
<i>RGL3</i>	3,49E-02	4	0,69	<i>ELMOD3</i>	4,18E-02	4	0,70
<i>hsa-mir-597</i>	3,51E-02	4	0,73	<i>KLHL34</i>	4,22E-02	3	0,74
<i>TUBA3E</i>	3,52E-02	3	0,49	<i>CHRM5</i>	4,26E-02	4	0,66
<i>TMEM66</i>	3,52E-02	5	0,74	<i>ZNF517</i>	4,28E-02	4	0,71
<i>hsa-mir-3119-1</i>	3,54E-02	3	0,68	<i>BEND2</i>	4,30E-02	4	0,73
<i>HIST1H1B</i>	3,56E-02	5	0,34	<i>FAM159A</i>	4,31E-02	4	0,73
<i>FCN2</i>	3,56E-02	5	0,71	<i>PCDHB7</i>	4,32E-02	5	0,62
<i>MACROD2</i>	3,57E-02	3	0,70	<i>hsa-mir-937</i>	4,36E-02	3	0,41
<i>SMU1</i>	3,58E-02	4	0,69	<i>RPS9</i>	4,36E-02	4	0,60
<i>ZHX2</i>	3,61E-02	3	0,72	<i>AATF</i>	4,36E-02	5	0,50
<i>ATP2A3</i>	3,63E-02	5	0,67	<i>hsa-mir-1277</i>	4,37E-02	3	0,46
<i>hsa-mir-6071</i>	3,64E-02	4	0,72	<i>GABRG3</i>	4,37E-02	3	0,70
<i>SLA</i>	3,66E-02	5	0,72	<i>hsa-mir-320c-2</i>	4,43E-02	4	0,73
<i>GNG12</i>	3,66E-02	4	0,55	<i>CDC37</i>	4,45E-02	4	0,70
<i>hsa-mir-6829</i>	3,67E-02	4	0,73	<i>P2RX5</i>	4,45E-02	4	0,74
<i>TPM4</i>	3,68E-02	4	0,61	<i>TRAM1L1</i>	4,46E-02	4	0,70
<i>TAF1B</i>	3,69E-02	4	0,69	<i>CDH5</i>	4,47E-02	5	0,65
<i>PROSC</i>	3,70E-02	5	0,71	<i>TMEM174</i>	4,49E-02	4	0,75

<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>	<i>Gen</i>	<i>p-valor</i>	<i>sgRNAs</i>	<i>FC</i>
<i>hsa-mir-6881</i>	4,49E-02	4	0,64	<i>NRIP3</i>	4,78E-02	5	0,70
<i>hsa-mir-4677</i>	4,50E-02	3	0,74	<i>CBLN3</i>	4,79E-02	3	0,70
<i>hsa-mir-4251</i>	4,50E-02	4	0,69	<i>PSMD8</i>	4,79E-02	5	0,68
<i>ZBTB2</i>	4,54E-02	5	0,74	<i>NSMF</i>	4,81E-02	4	0,69
<i>SSR4</i>	4,54E-02	3	0,72	<i>HRNR</i>	4,82E-02	3	0,75
<i>TLX1</i>	4,56E-02	5	0,72	<i>MINOS1</i>	4,82E-02	3	0,61
<i>CT62</i>	4,56E-02	3	0,71	<i>LRRC66</i>	4,83E-02	3	0,68
<i>hsa-mir-137</i>	4,56E-02	4	0,70	<i>NOS1AP</i>	4,83E-02	4	0,69
<i>RGS7BP</i>	4,58E-02	5	0,62	<i>RIC8B</i>	4,84E-02	5	0,73
<i>LIX1L</i>	4,61E-02	3	0,72	<i>SLC39A3</i>	4,85E-02	4	0,69
<i>ALDH1L1</i>	4,61E-02	4	0,71	<i>PDPK1</i>	4,87E-02	3	0,67
<i>NABP2</i>	4,63E-02	5	0,71	<i>ZNF790</i>	4,87E-02	4	0,73
<i>ZNF496</i>	4,63E-02	3	0,70	<i>CAPZB</i>	4,88E-02	3	0,62
<i>HECTD2</i>	4,63E-02	4	0,52	<i>OR11A1</i>	4,89E-02	4	0,65
<i>DNM2</i>	4,64E-02	4	0,50	<i>GADD45B</i>	4,90E-02	4	0,70
<i>KLHL12</i>	4,64E-02	5	0,70	<i>hsa-mir-299</i>	4,91E-02	4	0,75
<i>ZNF124</i>	4,68E-02	3	0,63	<i>ENO4</i>	4,92E-02	4	0,73
<i>ASCL5</i>	4,70E-02	5	0,70	<i>KLHL2</i>	4,93E-02	3	0,73
<i>C2</i>	4,70E-02	4	0,72	<i>CAPSL</i>	4,95E-02	3	0,63
<i>HBQ1</i>	4,70E-02	4	0,69	<i>COX15</i>	4,96E-02	4	0,56
<i>MSH4</i>	4,73E-02	3	0,63	<i>PAM</i>	4,96E-02	3	0,71
<i>SHD</i>	4,75E-02	4	0,75	<i>ATP1A4</i>	4,98E-02	4	0,69

Tabla 7.5. Análisis de enriquecimiento de vías (pathways) de tipo KEGG con las dianas de los 93 miARNs identificados en el cribado de selección negativa.

KEGG PATHWAY	P-VALUE	KEGG PATHWAY	P-VALUE
Endocytosis	1,9E+03	Adrenergic signaling in	9,6E-03
TGF-beta signaling pathway	3,4E+03	Glycosaminoglycan	1,5E-02
Fatty acid biosynthesis	1,4E+05	AMPK signaling pathway	1,5E-02
Renal cell carcinoma	8,6E+05	p53 signaling pathway	1,5E-02
ECM-receptor interaction	3,0E+06	Glutamatergic synapse	1,5E-02
Thyroid hormone signaling	7,6E+06	MAPK signaling pathway	1,5E-02
Focal adhesion	7,6E+06	mRNA surveillance pathway	1,7E-02
Proteoglycans in cancer	7,6E+06	Rap1 signaling pathway	1,9E-02
Axon guidance	2,4E-04	Cell cycle	1,9E-02
Mucin type O-Glycan	2,5E-04	Glycosaminoglycan	2,0E-02
Hippo signaling pathway	3,2E-04	Oocyte meiosis	2,0E-02
ErbB signaling pathway	7,0E-04	GABAergic synapse	2,1E-02
Circadian rhythm	7,4E-04	Pantothenate and CoA	2,1E-02
Adherens junction	7,4E-04	Bacterial invasion of	2,4E-02
Colorectal cancer	7,6E-04	Retrograde endocannabinoid	2,4E-02
Glioma	8,7E-04	Glycosphingolipid	2,8E-02
Signaling pathways	8,7E-04	Endometrial cancer	2,8E-02
FoxO signaling pathway	8,7E-04	Lysine degradation	2,8E-02
Morphine addiction	1,6E-03	RNA transport	2,8E-02
Ubiquitin mediated	1,8E-03	Pancreatic cancer	3,1E-02
Protein processing in	2,7E-03	Transcriptional misregulation	3,1E-02
Wnt signaling pathway	3,3E-03	Choline metabolism in cancer	3,3E-02
Pathways in cancer	3,6E-03	Oxytocin signaling pathway	3,3E-02
mTOR signaling pathway	3,8E-03	Gap junction	3,4E-02
Ras signaling pathway	4,4E-03	Prostate cancer	3,4E-02
cAMP signaling pathway	6,3E-03	Arrhythmogenic right	3,7E-02
N-Glycan biosynthesis	8,9E-03	Homologous recombination	3,9E-02
Dopaminergic synapse	9,4E-03	PI3K-AKT signaling pathway	4,4E-02

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kyle, R.A.; Rajkumar, S.V. Multiple Myeloma. *Blood* **2008**, *111*, 2962–2972, doi:10.1182/blood-2007-10-078022.
2. Sirohi, B.; Powles, R. Multiple Myeloma. *The Lancet* **2004**, *363*, 875–887, doi:10.1016/S0140-6736(04)15736-X.
3. Solly, S. Remarks on the Pathology of Mollities Ossium; with Cases. *Med Chir Trans* **1844**, *27*, 435–498.8.
4. v. Rustizky, J. Multiples Myelom. *Deutsche Zeitschrift f. Chirurgie* **1873**, *3*, 162–172, doi:10.1007/BF02911073.
5. Ramón y Cajal, S. Estudios Histológicos Sobre Los Tumores Epiteliales. *Revista de Trimestr Microgr* **1896**, *1*, 83.
6. Wright, J.H. A CASE OF MULTIPLE MYELOMA. *J Boston Soc Med Sci* **1900**, *4*, 195–204.5.
7. Key Statistics for Multiple Myeloma Available online: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/about/key-statistics.html> (accessed on 18 June 2021).
8. Global Cancer Observatory, WHO Summary Statistics. Multiple Myeloma, Spain. *Global Cancer Observatory* 1–2.
9. Costantini, A.S.; Benvenuti, A.; Vineis, P.; Kriebel, D.; Tumino, R.; Ramazzotti, V.; Rodella, S.; Stagnaro, E.; Crosignani, P.; Amadori, D.; et al. Risk of Leukemia and Multiple Myeloma Associated with Exposure to Benzene and Other Organic Solvents: Evidence from the Italian Multicenter Case–Control Study. *American Journal of Industrial Medicine* **2008**, *51*, 803–811, doi:10.1002/ajim.20592.
10. Kyle, R.A.; Rajkumar, S.V. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *British Journal of Haematology* **2006**, *134*, 573–589, doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06235.x.
11. Dispenzieri, A.; Katzmann, J.A.; Kyle, R.A.; Larson, D.R.; Melton, L.J.; Colby, C.L.; Therneau, T.M.; Clark, R.; Kumar, S.K.; Bradwell, A.; et al. Prevalence and Risk of Progression of Light-Chain Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (LC-MGUS): A Newly Defined Entity. *Lancet* **2010**, *375*, 1721–1728, doi:10.1016/S0140-6736(10)60482-5.
12. Weinhold, N.; Johnson, D.C.; Rawstron, A.C.; Försti, A.; Doughty, C.; Vijayakrishnan, J.; Broderick, P.; Dahir, N.B.; Begum, D.B.; Hosking, F.J.; et al. Inherited Genetic Susceptibility to Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance. *Blood* **2014**, *123*, 2513–2517, doi:10.1182/blood-2013-10-532283.
13. Kyle, R.A.; Larson, D.R.; Therneau, T.M.; Dispenzieri, A.; Kumar, S.; Cerhan, J.R.; Rajkumar, S.V. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 241–249, doi:10.1056/NEJMoa1709974.
14. Kyle, R.A.; Greipp, P.R. Smoldering Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **1980**, *302*, 1347–1349, doi:10.1056/NEJM198006123022405.
15. Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Dimopoulos, M.A.; González-Calle, V.; Kastiris, E.; Hajek, R.; De Larrea, C.F.; Morgan, G.J.; Merlini, G.; Goldschmidt, H.; et al. International Myeloma Working Group Risk Stratification Model for Smoldering Multiple Myeloma (SMM). *Blood Cancer J.* **2020**, *10*, 1–11, doi:10.1038/s41408-020-00366-3.
16. Hoffbrand, A.V.; Higgs, D.R.; Keeling, D.M.; Mehta, A.B. *Postgraduate Haematology*, 7th Edition | Wiley Available online: <https://www.wiley.com/engb/Postgraduate+Haematology+%2C+7th+Edition-p-9781118854327> (accessed on 17 July 2021).
17. Rajkumar, S.V. Multiple Myeloma: 2018 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management. *Am J Hematol* **2018**, *93*, 981–1114, doi:10.1002/ajh.25117.
18. Hanbali, A.; Hassanein, M.; Rasheed, W.; Aljurf, M.; Alsharif, F. The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. *Advances in Hematology* **2017**, *2017*, 1–11, doi:10.1155/2017/4812637.

19. Rajkumar, S.V.; Greipp, P.R. PROGNOSTIC FACTORS IN MULTIPLE MYELOMA. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **1999**, *13*, 1295–1314, doi:10.1016/S0889-8588(05)70128-3.
20. Durie, B.G.; Salmon, S.E. A Clinical Staging System for Multiple Myeloma. Correlation of Measured Myeloma Cell Mass with Presenting Clinical Features, Response to Treatment, and Survival. *Cancer* **1975**, *36*, 842–854, doi:10.1002/1097-0142(197509)36:3<842::aid-cncr2820360303>3.0.co;2-u.
21. Greipp, P.R.; Miguel, J.S.; Durie, B.G.M.; Crowley, J.J.; Barlogie, B.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Child, J.A.; Avet-Loiseau, H.; Kyle, R.A.; et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *JCO* **2005**, *23*, 3412–3420, doi:10.1200/JCO.2005.04.242.
22. Chng, W.J.; Dispenzieri, A.; Chim, C.-S.; Fonseca, R.; Goldschmidt, H.; Lentzsch, S.; Munshi, N.; Palumbo, A.; Miguel, J.S.; Sonneveld, P.; et al. IMWG Consensus on Risk Stratification in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2014**, *28*, 269–277, doi:10.1038/leu.2013.247.
23. Fonseca, R.; Bergsagel, P.L.; Drach, J.; Shaughnessy, J.; Gutierrez, N.; Stewart, A.K.; Morgan, G.; Van Ness, B.; Chesi, M.; Minvielle, S.; et al. International Myeloma Working Group Molecular Classification of Multiple Myeloma: Spotlight Review. *Leukemia* **2009**, *23*, 2210–2221, doi:10.1038/leu.2009.174.
24. Palumbo, A.; Avet-Loiseau, H.; Oliva, S.; Lokhorst, H.M.; Goldschmidt, H.; Rosinol, L.; Richardson, P.; Caltagirone, S.; Lahuerta, J.J.; Facon, T.; et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* **2015**, *33*, 2863–2869, doi:10.1200/JCO.2015.61.2267.
25. Medina, A.; Puig, N.; Flores-Montero, J.; Jimenez, C.; Sarasquete, M.-E.; Garcia-Alvarez, M.; Prieto-Conde, I.; Chillon, C.; Alcoceba, M.; Gutierrez, N.C.; et al. Comparison of Next-Generation Sequencing (NGS) and next-Generation Flow (NGF) for Minimal Residual Disease (MRD) Assessment in Multiple Myeloma. *Blood Cancer J* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41408-020-00377-0.
26. Li, F.; Xu, Y.; Deng, S.; Li, Z.; Zou, D.; Yi, S.; Sui, W.; Hao, M.; Qiu, L. MicroRNA-15a/16-1 Cluster Located at Chromosome 13q14 Is down-Regulated but Displays Different Expression Pattern and Prognostic Significance in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 38270–38282, doi:10.18632/oncotarget.5681.
27. Wang, L.; Wang, H.; Chen, H.; Wang, W.; Chen, X.; Geng, Q.; Xia, Z.; Lu, Y. Serum Levels of Soluble Programmed Death Ligand 1 Predict Treatment Response and Progression Free Survival in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 41228–41236, doi:10.18632/oncotarget.5682.
28. Jung, S.-H.; Kim, J.S.; Lee, W.S.; Oh, S.J.; Ahn, J.-S.; Yang, D.-H.; Kim, Y.-K.; Kim, H.-J.; Lee, J.-J. Prognostic Value of the Inverse Platelet to Lymphocyte Ratio (IPLR) in Patients with Multiple Myeloma Who Were Treated up Front with a Novel Agent-Containing Regimen. *Ann Hematol* **2016**, *95*, 55–61, doi:10.1007/s00277-015-2521-x.
29. Zhou, M.; Zhao, H.; Wang, Z.; Cheng, L.; Yang, L.; Shi, H.; Yang, H.; Sun, J. Identification and Validation of Potential Prognostic lncRNA Biomarkers for Predicting Survival in Patients with Multiple Myeloma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2015**, *34*, 102, doi:10.1186/s13046-015-0219-5.
30. Lee, N.; M.D; Lee, H.; M.D; Moon, S.Y.; M.D; Sohn, J.Y.; M.D; Hwang, S.M.; M.D; et al. Adverse Prognostic Impact of Bone Marrow Microvessel Density in Multiple Myeloma. *Annals of Laboratory Medicine* **2015**, *35*, 563–569, doi:10.3343/alm.2015.35.6.563.
31. Vandyke, K.; Chow, A.W.S.; Williams, S.A.; To, L.B.; Zannettino, A.C.W. Circulating N-Cadherin Levels Are a Negative Prognostic Indicator in Patients with Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* **2013**, *161*, 499–507, doi:10.1111/bjh.12280.
32. Lullo, G.D.; Marcatti, M.; Heltai, S.; Brunetto, E.; Tresoldi, C.; Bondanza, A.; Bonini, C.; Ponzoni, M.; Tonon, G.; Ciceri, F.; et al. Th22 Cells Increase in Poor Prognosis Multiple Myeloma and Promote Tumor Cell Growth and Survival. *Oncol Immunology* **2015**, *4*, e1005460, doi:10.1080/2162402X.2015.1005460.

33. Li, F.; Hao, M.; Feng, X.; Zang, M.; Qin, Y.; Yi, S.; Li, Z.; Xu, Y.; Zhou, L.; Sui, W.; et al. Downregulated MiR-33b Is a Novel Predictor Associated with Disease Progression and Poor Prognosis in Multiple Myeloma. *Leukemia Research* **2015**, *39*, 793–799, doi:10.1016/j.leukres.2015.04.010.
34. Bolomsky, A.; Hose, D.; Schreder, M.; Seckinger, A.; Lipp, S.; Klein, B.; Heintel, D.; Ludwig, H.; Zojer, N. Insulin like Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7) Expression Is Linked to Poor Prognosis but May Protect from Bone Disease in Multiple Myeloma. *Journal of Hematology & Oncology* **2015**, *8*, 10, doi:10.1186/s13045-014-0105-1.
35. Jung, G.; Roh, J.; Lee, H.; Gil, M.; Yoon, D.H.; Suh, C.; Jang, S.; Park, C.-J.; Huh, J.; Park, C.-S. Autophagic Markers BECLIN 1 and LC3 Are Associated with Prognosis of Multiple Myeloma. *ASH* **2015**, *134*, 17–24, doi:10.1159/000368848.
36. Trotter, T.N.; Li, M.; Pan, Q.; Peker, D.; Rowan, P.D.; Li, J.; Zhan, F.; Suva, L.J.; Javed, A.; Yang, Y. Myeloma Cell-Derived Runx2 Promotes Myeloma Progression in Bone. *Blood* **2015**, *125*, 3598–3608, doi:10.1182/blood-2014-12-613968.
37. García-Ortiz, A.; Rodríguez-García, Y.; Encinas, J.; Maroto-Martín, E.; Castellano, E.; Teixidó, J.; Martínez-López, J. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers* **2021**, *13*, 217, doi:10.3390/cancers13020217.
38. Matthias, P.; Rolink, A.G. Transcriptional Networks in Developing and Mature B Cells. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 497–508, doi:10.1038/nri1633.
39. Dorshkind, K.; Rawlings, D.J. *B Cell Development. Hematology Basic Principles and Practice., 4th Ed., Pp. 119-134*; 4th ed.;
40. Barwick, B.G.; Gupta, V.A.; Vertino, P.M.; Boise, L.H. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01121.
41. Jacob, J.; Kelsoe, G.; Rajewsky, K.; Weiss, U. Intracloonal Generation of Antibody Mutants in Germinal Centres. *Nature* **1991**, *354*, 389–392, doi:10.1038/354389a0.
42. Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M. Chromosome Translocations in Multiple Myeloma. *Oncogene* **2001**, *20*, 5611–5622, doi:10.1038/sj.onc.1204641.
43. Fonseca, R.; Debes-Marun, C.S.; Picken, E.B.; Dewald, G.W.; Bryant, S.C.; Winkler, J.M.; Blood, E.; Oken, M.M.; Santana-Dávila, R.; González-Paz, N.; et al. The Recurrent IgH Translocations Are Highly Associated with Nonhyperdiploid Variant Multiple Myeloma. *Blood* **2003**, *102*, 2562–2567, doi:10.1182/blood-2003-02-0493.
44. Chng, W.J.; Glebov, O.; Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M. Genetic Events in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* **2007**, *20*, 571–596, doi:10.1016/j.beha.2007.08.004.
45. Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L. Multiple Myeloma: Evolving Genetic Events and Host Interactions. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 175–187, doi:10.1038/nrc746.
46. Bergsagel, P.L.; Chesi, M.; Nardini, E.; Brents, L.A.; Kirby, S.L.; Kuehl, W.M. Promiscuous Translocations into Immunoglobulin Heavy Chain Switch Regions in Multiple Myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 13931–13936.
47. Fonseca, R.; Blood, E.A.; Oken, M.M.; Kyle, R.A.; Dewald, G.W.; Bailey, R.J.; Van Wier, S.A.; Henderson, K.J.; Hoyer, J.D.; Harrington, D.; et al. Myeloma and the t(11;14)(Q13;Q32); Evidence for a Biologically Defined Unique Subset of Patients. *Blood* **2002**, *99*, 3735–3741, doi:10.1182/blood.V99.10.3735.
48. Avet-Loiseau, H.; Facon, T.; Grosbois, B.; Magrangeas, F.; Rapp, M.-J.; Harousseau, J.-L.; Minvielle, S.; Bataille, R.; for the Intergroupe Francophone du Myélome Oncogenesis of Multiple Myeloma: 14q32 and 13q Chromosomal Abnormalities Are Not Randomly Distributed, but Correlate with Natural History, Immunological Features, and Clinical Presentation. *Blood* **2002**, *99*, 2185–2191, doi:10.1182/blood.V99.6.2185.
49. Keats, J.J.; Maxwell, C.A.; Taylor, B.J.; Hendzel, M.J.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Larratt, L.M.; Mant, M.J.; Reiman, T.; Belch, A.R.; et al. Overexpression of Transcripts Originating

- from the MMSET Locus Characterizes All t(4;14)(P16;Q32)-Positive Multiple Myeloma Patients. *Blood* **2005**, *105*, 4060–4069, doi:10.1182/blood-2004-09-3704.
50. Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M.; Zhan, F.; Sawyer, J.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. Cyclin D Dysregulation: An Early and Unifying Pathogenic Event in Multiple Myeloma. *Blood* **2005**, *106*, 296–303, doi:10.1182/blood-2005-01-0034.
 51. Chesi, M.; Nardini, E.; Lim, R.S.C.; Smith, K.D.; Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L. The t(4;14) Translocation in Myeloma Dysregulates Both FGFR3 and a Novel Gene, MMSET, Resulting in IgH/MMSET Hybrid Transcripts. *Blood* **1998**, *92*, 3025–3034, doi:10.1182/blood.V92.9.3025.
 52. Santra, M.; Zhan, F.; Tian, E.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. A Subset of Multiple Myeloma Harboring the t(4;14)(P16;Q32) Translocation Lacks FGFR3 Expression but Maintains AnIGH/MMSET Fusion Transcript. *Blood* **2003**, *101*, 2374–2376, doi:10.1182/blood-2002-09-2801.
 53. Martinez-Garcia, E.; Popovic, R.; Min, D.-J.; Sweet, S.M.M.; Thomas, P.M.; Zamdborg, L.; Heffner, A.; Will, C.; Lamy, L.; Staudt, L.M.; et al. The MMSET Histone Methyl Transferase Switches Global Histone Methylation and Alters Gene Expression in t(4;14) Multiple Myeloma Cells. *Blood* **2011**, *117*, 211–220, doi:10.1182/blood-2010-07-298349.
 54. Chesi, M.; Nardini, E.; Brents, L.A.; Schröck, E.; Ried, T.; Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L. Frequent Translocation t(4;14)(P16.3;Q32.3) in Multiple Myeloma Is Associated with Increased Expression and Activating Mutations of Fibroblast Growth Factor Receptor 3. *Nat Genet* **1997**, *16*, 260–264, doi:10.1038/ng0797-260.
 55. Chesi, M.; Brents, L.A.; Ely, S.A.; Bais, C.; Robbiani, D.F.; Mesri, E.A.; Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L. Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is an Oncogene That Contributes to Tumor Progression in Multiple Myeloma. *Blood* **2001**, *97*, 729–736, doi:10.1182/blood.V97.3.729.
 56. Kalff, A.; Spencer, A. The t(4;14) Translocation and FGFR3 Overexpression in Multiple Myeloma: Prognostic Implications and Current Clinical Strategies. *Blood Cancer Journal* **2012**, *2*, e89–e89, doi:10.1038/bcj.2012.37.
 57. Mikhael, J.R.; Dingli, D.; Roy, V.; Reeder, C.B.; Buadi, F.K.; Hayman, S.R.; Dispenzieri, A.; Fonseca, R.; Sher, T.; Kyle, R.A.; et al. Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (MSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clinic Proceedings* **2013**, *88*, 360–376, doi:10.1016/j.mayocp.2013.01.019.
 58. Avet-Loiseau, H.; Daviet, A.; Saunier, S.; Myérome, R.B. on behalf of the I.F. du Chromosome 13 Abnormalities in Multiple Myeloma Are Mostly Monosomy 13. *British Journal of Haematology* **2000**, *111*, 1116–1117, doi:10.1111/j.1365-2141.2000.02488.x.
 59. Shaughnessy, J.; Tian, E.; Sawyer, J.; Bumm, K.; Landes, R.; Badros, A.; Morris, C.; Tricot, G.; Epstein, J.; Barlogie, B. High Incidence of Chromosome 13 Deletion in Multiple Myeloma Detected by Multiprobe Interphase FISH. *Blood* **2000**, *96*, 1505–1511, doi:10.1182/blood.V96.4.1505.
 60. Jovanović, K.K.; Escure, G.; Demonchy, J.; Willaume, A.; Van de Wyngaert, Z.; Farhat, M.; Chauvet, P.; Facon, T.; Quesnel, B.; Manier, S. Dereglulation and Targeting of TP53 Pathway in Multiple Myeloma. *Front Oncol* **2019**, *8*, 665, doi:10.3389/fonc.2018.00665.
 61. Fonseca, R.; Van Wier, S.A.; Chng, W.J.; Ketterling, R.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Bergsagel, P.L.; Rajkumar, S.V.; Greipp, P.R.; Litzow, M.R.; et al. Prognostic Value of Chromosome 1q21 Gain by Fluorescent in Situ Hybridization and Increase CKS1B Expression in Myeloma. *Leukemia* **2006**, *20*, 2034–2040, doi:10.1038/sj.leu.2404403.
 62. Avet-Loiseau, H.; Attal, M.; Moreau, P.; Charbonnel, C.; Garban, F.; Hulin, C.; Leyvraz, S.; Michallet, M.; Yakoub-Agha, I.; Garderet, L.; et al. Genetic Abnormalities and Survival in Multiple Myeloma: The Experience of the Intergroupe Francophone Du Myérome. *Blood* **2007**, *109*, 3489–3495, doi:10.1182/blood-2006-08-040410.

63. Shah, G.L.; Landau, H.; Londono, D.; Devlin, S.M.; Kosuri, S.; Lesokhin, A.M.; Lendvai, N.; Hassoun, H.; Chung, D.J.; Koehne, G.; et al. Gain of Chromosome 1q Portends Worse Prognosis in Multiple Myeloma despite Novel Agent-Based Induction Regimens and Autologous Transplantation. *Leuk Lymphoma* **2017**, *58*, 1823–1831, doi:10.1080/10428194.2016.1260126.
64. Shou, Y.; Martelli, M.L.; Gabrea, A.; Qi, Y.; Brents, L.A.; Roschke, A.; Dewald, G.; Kirsch, I.R.; Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M. Diverse Karyotypic Abnormalities of the C-Myc Locus Associated with c-Myc Dysregulation and Tumor Progression in Multiple Myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 228–233.
65. Avet-Loiseau, H.; Gerson, F.; Magrangeas, F.; Minvielle, S.; Harousseau, J.-L.; Bataille, R.; for the Intergroupe Francophone du Myélome Rearrangements of the C-Myc Oncogene Are Present in 15% of Primary Human Multiple Myeloma Tumors. *Blood* **2001**, *98*, 3082–3086, doi:10.1182/blood.V98.10.3082.
66. Barwick, B.G.; Neri, P.; Bahlis, N.J.; Nooka, A.K.; Dhodapkar, M.V.; Jaye, D.L.; Hofmeister, C.C.; Kaufman, J.L.; Gupta, V.A.; Auclair, D.; et al. Multiple Myeloma Immunoglobulin Lambda Translocations Portend Poor Prognosis. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1911, doi:10.1038/s41467-019-09555-6.
67. Walker, B.A.; Wardell, C.P.; Brioli, A.; Boyle, E.; Kaiser, M.F.; Begum, D.B.; Dahir, N.B.; Johnson, D.C.; Ross, F.M.; Davies, F.E.; et al. Translocations at 8q24 Juxtapose MYC with Genes That Harbor Superenhancers Resulting in Overexpression and Poor Prognosis in Myeloma Patients. *Blood Cancer J* **2014**, *4*, e191, doi:10.1038/bcj.2014.13.
68. Affer, M.; Chesi, M.; Chen, W.-D.G.; Keats, J.J.; Demchenko, Y.N.; Roschke, A.V.; Van Wier, S.; Fonseca, R.; Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M. Promiscuous Rearrangements of the MYC Locus Hijack Enhancers and Super-Enhancers to Dysregulate MYC Expression in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2014**, *28*, 1725–1735, doi:10.1038/leu.2014.70.
69. Bolli, N.; Biancon, G.; Moarii, M.; Gimondi, S.; Li, Y.; de Philippis, C.; Maura, F.; Sathiaselan, V.; Tai, Y.-T.; Mudie, L.; et al. Analysis of the Genomic Landscape of Multiple Myeloma Highlights Novel Prognostic Markers and Disease Subgroups. *Leukemia* **2018**, *32*, 2604–2616, doi:10.1038/s41375-018-0037-9.
70. Chapman, M.A.; Lawrence, M.S.; Keats, J.J.; Cibulskis, K.; Sougnez, C.; Schinzel, A.C.; Harview, C.L.; Brunet, J.-P.; Ahmann, G.J.; Adli, M.; et al. Initial Genome Sequencing and Analysis of Multiple Myeloma. *Nature* **2011**, *471*, 467–472, doi:10.1038/nature09837.
71. Maura, F.; Bolli, N.; Angelopoulos, N.; Dawson, K.J.; Leongamornlert, D.; Martincorena, I.; Mitchell, T.J.; Fullam, A.; Gonzalez, S.; Szalat, R.; et al. Genomic Landscape and Chronological Reconstruction of Driver Events in Multiple Myeloma. *Nat Commun* **2019**, *10*, 3835, doi:10.1038/s41467-019-11680-1.
72. Popovic, R.; Martinez-Garcia, E.; Giannopoulou, E.G.; Zhang, Q.; Zhang, Q.; Ezponda, T.; Shah, M.Y.; Zheng, Y.; Will, C.M.; Small, E.C.; et al. Histone Methyltransferase MMSET/NSD2 Alters EZH2 Binding and Reprograms the Myeloma Epigenome through Global and Focal Changes in H3K36 and H3K27 Methylation. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004566, doi:10.1371/journal.pgen.1004566.
73. Ezponda, T.; Dupéré-Richer, D.; Will, C.M.; Small, E.C.; Varghese, N.; Patel, T.; Nabet, B.; Popovic, R.; Oyer, J.; Bulic, M.; et al. UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 Inhibition. *Cell Rep* **2017**, *21*, 628–640, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.078.
74. Walker, B.A.; Mavrommatis, K.; Wardell, C.P.; Ashby, T.C.; Bauer, M.; Davies, F.E.; Rosenthal, A.; Wang, H.; Qu, P.; Hoering, A.; et al. Identification of Novel Mutational Drivers Reveals Oncogene Dependencies in Multiple Myeloma. *Blood* **2018**, *132*, 587–597, doi:10.1182/blood-2018-03-840132.
75. Duncan, C.G.; Barwick, B.G.; Jin, G.; Rago, C.; Kapoor-Vazirani, P.; Powell, D.R.; Chi, J.-T.; Bigner, D.D.; Vertino, P.M.; Yan, H. A Heterozygous IDH1R132H/WT Mutation Induces

- Genome-Wide Alterations in DNA Methylation. *Genome Res* **2012**, *22*, 2339–2355, doi:10.1101/gr.132738.111.
76. Lin, C.Y.; Lovén, J.; Rahl, P.B.; Paranal, R.M.; Burge, C.B.; Bradner, J.E.; Lee, T.I.; Young, R.A. Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated C-Myc. *Cell* **2012**, *151*, 56–67, doi:10.1016/j.cell.2012.08.026.
 77. Wang, D.; Hashimoto, H.; Zhang, X.; Barwick, B.G.; Lonial, S.; Boise, L.H.; Vertino, P.M.; Cheng, X. MAX Is an Epigenetic Sensor of 5-Carboxylcytosine and Is Altered in Multiple Myeloma. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, 2396–2407, doi:10.1093/nar/gkw1184.
 78. Yang, H.; Ye, D.; Guan, K.-L.; Xiong, Y. IDH1 and IDH2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 5562–5571.
 79. Okano, M.; Bell, D.W.; Haber, D.A.; Li, E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **1999**, *99*, 247–257, doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6.
 80. Ng, M.H.L.; Chung, Y.F.; Lo, K.W.; Wickham, N.W.R.; Lee, J.C.K.; Huang, D.P. Frequent Hypermethylation of P16 and P15 Genes in Multiple Myeloma. *Blood* **1997**, *89*, 2500–2506, doi:10.1182/blood.V89.7.2500.
 81. Galm, O.; Yoshikawa, H.; Esteller, M.; Osieka, R.; Herman, J.G. SOCS-1, a Negative Regulator of Cytokine Signaling, Is Frequently Silenced by Methylation in Multiple Myeloma. *Blood* **2003**, *101*, 2784–2788, doi:10.1182/blood-2002-06-1735.
 82. Chim, C.-S.; Fung, T.-K.; Cheung, W.-C.; Liang, R.; Kwong, Y.-L. SOCS1 and SHP1 Hypermethylation in Multiple Myeloma: Implications for Epigenetic Activation of the Jak/STAT Pathway. *Blood* **2004**, *103*, 4630–4635, doi:10.1182/blood-2003-06-2007.
 83. Salhia, B.; Baker, A.; Ahmann, G.; Auclair, D.; Fonseca, R.; Carpten, J. DNA Methylation Analysis Determines the High Frequency of Genic Hypomethylation and Low Frequency of Hypermethylation Events in Plasma Cell Tumors. *Cancer Res* **2010**, *70*, 6934–6944.
 84. Heuck, C.J.; Mehta, J.; Bhagat, T.; Gundabolu, K.; Yu, Y.; Khan, S.; Chrysofakis, G.; Schinke, C.; Tariman, J.; Vickrey, E.; et al. Myeloma Is Characterized by Stage Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *J Immunol* **2013**, *190*, 2966–2975, doi:10.4049/jimmunol.1202493.
 85. Sive, J.I.; Feber, A.; Smith, D.; Quinn, J.; Beck, S.; Yong, K. Global Hypomethylation in Myeloma Is Associated with Poor Prognosis. *British Journal of Haematology* **2016**, *172*, 473–475, doi:10.1111/bjh.13506.
 86. López-Corral, L.; Corchete, L.A.; Sarasquete, M.E.; Mateos, M.V.; García-Sanz, R.; Fermiñán, E.; Lahuerta, J.-J.; Bladé, J.; Oriol, A.; Teruel, A.I.; et al. Transcriptome Analysis Reveals Molecular Profiles Associated with Evolving Steps of Monoclonal Gammopathies. *Haematologica* **2014**, *99*, 1365–1372, doi:10.3324/haematol.2013.087809.
 87. Zhan, F.; Huang, Y.; Colla, S.; Stewart, J.P.; Hanamura, I.; Gupta, S.; Epstein, J.; Yaccoby, S.; Sawyer, J.; Burington, B.; et al. The Molecular Classification of Multiple Myeloma. *Blood* **2006**, *108*, 2020–2028, doi:10.1182/blood-2005-11-013458.
 88. Min, D.-J.; Ezponda, T.; Kim, M.; Will, C.; Martinez-Garcia, E.; Popovic, R.; Basrur, V.; Elenitoba-Johnson, K.; Licht, J. MMSET Stimulates Myeloma Cell Growth through MicroRNA-Mediated Modulation of c-MYC. *Leukemia* **2013**, *27*, 10.1038/leu.2012.269, doi:10.1038/leu.2012.269.
 89. Gao, S.-S.; Wang, Y.-J.; Zhang, G.-X.; Zhang, W.-T. Potential Diagnostic Value of Circulating MiRNA for Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Journal of Bone Oncology* **2020**, *25*, 100327, doi:10.1016/j.jbo.2020.100327.
 90. Carrasco-Leon, A.; Ezponda, T.; Meydan, C.; Valcárcel, L.V.; Ordoñez, R.; Kulis, M.; Garate, L.; Miranda, E.; Segura, V.; Guruceaga, E.; et al. Characterization of Complete LncRNAs Transcriptome Reveals the Functional and Clinical Impact of LncRNAs in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2021**, *35*, 1438–1450, doi:10.1038/s41375-021-01147-y.
 91. Borjan, B.; Kern, J.; Steiner, N.; Gunsilius, E.; Wolf, D.; Untergasser, G. Spliced XBP1 Levels Determine Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to Proteasome Inhibitor Bortezomib

- Independent of the Unfolded Protein Response Mediator GRP78. *Front Oncol* **2020**, *9*, 1530, doi:10.3389/fonc.2019.01530.
92. Nagoshi, H.; Taki, T.; Kuroda, J.; Nishida, K.; Gotoh, M.; Okuda, K.; Kobayashi, S.; Yamamoto, M.; Tsutsumi, Y.; Kobayashi, T.; et al. Identification and Functional Significance of Novel Type of Structurally Aberrant Transcripts of DCC In B-Cell Malignancies. *Blood* **2010**, *116*, 3623, doi:10.1182/blood.V116.21.3623.3623.
 93. Adamia, S.; Reiman, T.; Crainie, M.; Mant, M.J.; Belch, A.R.; Pilarski, L.M. Intronic Splicing of Hyaluronan Synthase 1 (HAS1): A Biologically Relevant Indicator of Poor Outcome in Multiple Myeloma. *Blood* **2005**, *105*, 4836–4844, doi:10.1182/blood-2004-10-3825.
 94. Bauer, M.A.; Ashby, C.; Wardell, C.; Boyle, E.M.; Ortiz, M.; Flynt, E.; Thakurta, A.; Morgan, G.; Walker, B.A. Differential RNA Splicing as a Potentially Important Driver Mechanism in Multiple Myeloma. *Haematologica* **2021**, *106*, 736–745, doi:10.3324/haematol.2019.235424.
 95. Hideshima, T.; Mitsiades, C.; Tonon, G.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. Understanding Multiple Myeloma Pathogenesis in the Bone Marrow to Identify New Therapeutic Targets. *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7*, 585–598, doi:10.1038/nrc2189.
 96. Maiso, P.; Mogollón, P.; Ocio, E.M.; Garayoa, M. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Multiple Myeloma: Their Role as Active Contributors to Myeloma Progression. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13112542.
 97. Hideshima, T.; Anderson, K.C. Signaling Pathway Mediating Myeloma Cell Growth and Survival. *Cancers* **2021**, *13*, 216, doi:10.3390/cancers13020216.
 98. Hiroshi, Y.; Teru, H.; Paul, G.R.; Kenneth, C.A. Recent Advances in the Treatment of Multiple Myeloma. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2006**, *7*, 381–393.
 99. Steelman, L.S.; Abrams, S.L.; Whelan, J.; Bertrand, F.E.; Ludwig, D.E.; Bäsecke, J.; Libra, M.; Stivala, F.; Milella, M.; Tafuri, A.; et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/MTOR and Jak/STAT Pathways to Leukemia. *Leukemia* **2008**, *22*, 686–707, doi:10.1038/leu.2008.26.
 100. Lin, G.L.; Hankenson, K.D. Integration of BMP, Wnt, and Notch Signaling Pathways in Osteoblast Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **2011**, *112*, 3491–3501, doi:https://doi.org/10.1002/jcb.23287.
 101. Tian, E.; Zhan, F.; Walker, R.; Rasmussen, E.; Ma, Y.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J.D. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **2003**, *349*, 2483–2494, doi:10.1056/NEJMoa030847.
 102. Balemans, W.; Ebeling, M.; Patel, N.; Van Hul, E.; Olson, P.; Dioszegi, M.; Lanza, C.; Wuyts, W.; Van Den Ende, J.; Willems, P.; et al. Increased Bone Density in Sclerosteosis Is Due to the Deficiency of a Novel Secreted Protein (SOST). *Human Molecular Genetics* **2001**, *10*, 537–544, doi:10.1093/hmg/10.5.537.
 103. Winkler, D.G.; Sutherland, M.K.; Geoghegan, J.C.; Yu, C.; Hayes, T.; Skonier, J.E.; Shpektor, D.; Jonas, M.; Kovacevich, B.R.; Staehling-Hampton, K.; et al. Osteocyte Control of Bone Formation via Sclerostin, a Novel BMP Antagonist. *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 6267–6276, doi:10.1093/emboj/cdg599.
 104. Colucci, S.; Brunetti, G.; Oranger, A.; Mori, G.; Sardone, F.; Specchia, G.; Rinaldi, E.; Curci, P.; Liso, V.; Passeri, G.; et al. Myeloma Cells Suppress Osteoblasts through Sclerostin Secretion. *Blood Cancer Journal* **2011**, *1*, e27–e27, doi:10.1038/bcj.2011.22.
 105. Giuliani, N.; Bataille, R.; Mancini, C.; Lazzaretti, M.; Barillé, S. Myeloma Cells Induce Imbalance in the Osteoprotegerin/Osteoprotegerin Ligand System in the Human Bone Marrow Environment. *Blood* **2001**, *98*, 3527–3533, doi:10.1182/blood.V98.13.3527.
 106. Pearce, R.N.; Sordillo, E.M.; Yaccoby, S.; Wong, B.R.; Liao, D.F.; Colman, N.; Michaeli, J.; Epstein, J.; Choi, Y. Multiple Myeloma Disrupts the TRANCE/ Osteoprotegerin Cytokine Axis to Trigger Bone Destruction and Promote Tumor Progression. *PNAS* **2001**, *98*, 11581–11586, doi:10.1073/pnas.201394498.

107. Vallet, S.; Mukherjee, S.; Vaghela, N.; Hideshima, T.; Fulciniti, M.; Pozzi, S.; Santo, L.; Cirstea, D.; Patel, K.; Sohani, A.R.; et al. Activin A Promotes Multiple Myeloma-Induced Osteolysis and Is a Promising Target for Myeloma Bone Disease. *PNAS* **2010**, *107*, 5124–5129, doi:10.1073/pnas.0911929107.
108. Garcia-Gomez, A.; De Las Rivas, J.; Ocio, E.M.; Díaz-Rodríguez, E.; Montero, J.C.; Martín, M.; Blanco, J.F.; Sanchez-Guijo, F.M.; Pandiella, A.; San Miguel, J.F.; et al. Transcriptomic Profile Induced in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells after Interaction with Multiple Myeloma Cells: Implications in Myeloma Progression and Myeloma Bone Disease. *Oncotarget* **2014**, *5*, 8284–8305, doi:10.18632/oncotarget.2058.
109. Roodman, G.D. Osteoblast Function in Myeloma. *Bone* **2011**, *48*, 135–140, doi:10.1016/j.bone.2010.06.016.
110. Wang, X.; Zhang, Z.; Yao, C. Angiogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Invest* **2011**, *29*, 37–41, doi:10.3109/07357907.2010.496758.
111. Radtke, F.; Raj, K. The Role of Notch in Tumorigenesis: Oncogene or Tumour Suppressor? *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 756–767, doi:10.1038/nrc1186.
112. Mitsiades, C.S.; Mitsiades, N.; Poulaki, V.; Schlossman, R.; Akiyama, M.; Chauhan, D.; Hideshima, T.; Treon, S.P.; Munshi, N.C.; Richardson, P.G.; et al. Activation of NF- κ B and Upregulation of Intracellular Anti-Apoptotic Proteins via the IGF-1/Akt Signaling in Human Multiple Myeloma Cells: Therapeutic Implications. *Oncogene* **2002**, *21*, 5673–5683, doi:10.1038/sj.onc.1205664.
113. Garcia-Gomez, A.; Li, T.; de la Calle-Fabregat, C.; Rodríguez-Ubreva, J.; Ciudad, L.; Català-Moll, F.; Godoy-Tena, G.; Martín-Sánchez, M.; San-Segundo, L.; Muntión, S.; et al. Targeting Aberrant DNA Methylation in Mesenchymal Stromal Cells as a Treatment for Myeloma Bone Disease. *Nature Communications* **2021**, *12*, 421, doi:10.1038/s41467-020-20715-x.
114. Petty, A.J.; Yang, Y. Tumor-Associated Macrophages in Hematologic Malignancies: New Insights and Targeted Therapies. *Cells* **2019**, *8*, 1526, doi:10.3390/cells8121526.
115. Lorenzo-Sanz, L.; Muñoz, P. Tumor-Infiltrating Immunosuppressive Cells in Cancer-Cell Plasticity, Tumor Progression and Therapy Response. *Cancer Microenviron* **2019**, *12*, 119–132, doi:10.1007/s12307-019-00232-2.
116. Li, Y.; Zheng, Y.; Li, T.; Wang, Q.; Qian, J.; Lu, Y.; Zhang, M.; Bi, E.; Yang, M.; Reu, F.; et al. Chemokines CCL2, 3, 14 Stimulate Macrophage Bone Marrow Homing, Proliferation, and Polarization in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 24218–24229.
117. Kawano, Y.; Zavidij, O.; Park, J.; Moschetta, M.; Kokubun, K.; Mouhieddine, T.H.; Manier, S.; Mishima, Y.; Murakami, N.; Bustoros, M.; et al. Blocking IFNAR1 Inhibits Multiple Myeloma-Driven Treg Expansion and Immunosuppression. *J Clin Invest* **128**, 2487–2499, doi:10.1172/JCI88169.
118. Bonanno, G.; Mariotti, A.; Procoli, A.; Folgiero, V.; Natale, D.; De Rosa, L.; Majolino, I.; Novarese, L.; Rocci, A.; Gambella, M.; et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Activity Correlates with Immune System Abnormalities in Multiple Myeloma. *J Transl Med* **2012**, *10*, 247, doi:10.1186/1479-5876-10-247.
119. Prabhala, R.H.; Pelluru, D.; Fulciniti, M.; Prabhala, H.K.; Nanjappa, P.; Song, W.; Pai, C.; Amin, S.; Tai, Y.-T.; Richardson, P.G.; et al. Elevated IL-17 Produced by Th17 Cells Promotes Myeloma Cell Growth and Inhibits Immune Function in Multiple Myeloma. *Blood* **2010**, *115*, 5385–5392, doi:10.1182/blood-2009-10-246660.
120. D'Agostino, M.; Raje, N. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy in Multiple Myeloma: Can We Do Better? *Leukemia* **2020**, *34*, 21–34, doi:10.1038/s41375-019-0669-4.
121. Dabbah, M.; Attar-Schneider, O.; Tartakover Matalon, S.; Shefler, I.; Jarchowsky Dolberg, O.; Lishner, M.; Drucker, L. Microvesicles Derived from Normal and Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentially Modulate Myeloma Cells' Phenotype and Translation Initiation. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 708–716, doi:10.1093/carcin/bgx045.

122. Deng, M.; Yuan, H.; Liu, S.; Hu, Z.; Xiao, H. Exosome-Transmitted LINC00461 Promotes Multiple Myeloma Cell Proliferation and Suppresses Apoptosis by Modulating MicroRNA/BCL-2 Expression. *Cytotherapy* **2019**, *21*, 96–106, doi:10.1016/j.jcyt.2018.10.006.
123. Faict, S.; Muller, J.; De Veirman, K.; De Bruyne, E.; Maes, K.; Vrancken, L.; Heusschen, R.; De Raeve, H.; Schots, R.; Vanderkerken, K.; et al. Exosomes Play a Role in Multiple Myeloma Bone Disease and Tumor Development by Targeting Osteoclasts and Osteoblasts. *Blood Cancer Journal* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41408-018-0139-7.
124. Li, B.; Xu, H.; Han, H.; Song, S.; Zhang, X.; Ouyang, L.; Qian, C.; Hong, Y.; Qiu, Y.; Zhou, W.; et al. Exosome-Mediated Transfer of LncRUNX2-AS1 from Multiple Myeloma Cells to MSCs Contributes to Osteogenesis. *Oncogene* **2018**, *37*, 5508–5519, doi:10.1038/s41388-018-0359-0.
125. Roccaro, A.M.; Sacco, A.; Maiso, P.; Azab, A.K.; Tai, Y.-T.; Reagan, M.; Azab, F.; Flores, L.M.; Campigotto, F.; Weller, E.; et al. BM Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Facilitate Multiple Myeloma Progression. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 1542–1555, doi:10.1172/JCI66517.
126. Dabbah, M.; Jarchowsky-Dolberg, O.; Attar-Schneider, O.; Tartakover Matalon, S.; Pasmanik-Chor, M.; Drucker, L.; Lishner, M. Multiple Myeloma BM-MSCs Increase the Tumorigenicity of MM Cells via Transfer of VLA4-Enriched Microvesicles. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 100–110, doi:10.1093/carcin/bgz169.
127. Wang, J.; Hendrix, A.; Hernot, S.; Lemaire, M.; Bruyne, E.D.; Valckenborgh, E.V.; Lahoutte, T.; Wever, O.D.; Vanderkerken, K.; Menu, E. Bone Marrow Stromal Cell-Derived Exosomes as Communicators in Drug Resistance in Multiple Myeloma Cells. *Blood* **2014**, *124*, 555–566, doi:10.1182/blood-2014-03-562439.
128. Harris, C.C. Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990s. *Cancer Res* **1991**, *51*, 5023s–5044s.
129. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
130. Arends, M.J.; Wyllie, A.H. Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology. *Int Rev Exp Pathol* **1991**, *32*, 223–254, doi:10.1016/b978-0-12-364932-4.50010-1.
131. Danial, N.N.; Korsmeyer, S.J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **2004**, *116*, 205–219, doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7.
132. Vries, E.G.E. de; Gietema, J.A.; Jong, S. de Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 2390–2393, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0352.
133. Chen, Q.; Gong, B.; Mahmoud-Ahmed, A.S.; Zhou, A.; Hsi, E.D.; Hussein, M.; Almasan, A. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-Related Proteins Regulate Type I Interferon-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma. *Blood* **2001**, *98*, 2183–2192.
134. Chen, Q.; Gong, B.; Almasan, A. Distinct Stages of Cytochrome c Release from Mitochondria: Evidence for a Feedback Amplification Loop Linking Caspase Activation to Mitochondrial Dysfunction in Genotoxic Stress Induced Apoptosis. *Cell Death Differ* **2000**, *7*, 227–233, doi:10.1038/sj.cdd.4400629.
135. Mazumder, S.; Gong, B.; Chen, Q.; Drazba, J.A.; Buchsbaum, J.C.; Almasan, A. Proteolytic Cleavage of Cyclin E Leads to Inactivation of Associated Kinase Activity and Amplification of Apoptosis in Hematopoietic Cells. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 2398–2409, doi:10.1128/MCB.22.7.2398-2409.2002.
136. Kumar, R.; Herbert, P.E.; Warrens, A.N. An Introduction to Death Receptors in Apoptosis. *International Journal of Surgery* **2005**, *3*, 268–277, doi:10.1016/j.ijsu.2005.05.002.
137. Salvesen, G.S.; Duckett, C.S. IAP Proteins: Blocking the Road to Death's Door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, *3*, 401–410, doi:10.1038/nrm830.
138. Oancea, M.; Mani, A.; Hussein, M.A.; Almasan, A. Apoptosis of Multiple Myeloma. *Int J Hematol* **2004**, *80*, 224–231, doi:10.1532/IJH97.04107.

139. Pettersson, M.; Jernberg-Wiklund, H.; Larsson, L.-G.; Sundstrom, C.; Givol, I.; Tsujimoto, Y.; Nilsson, K. Expression of the Bcl-2 Gene in Human Multiple Myeloma Cell Lines and Normal Plasma Cells. *Blood* **1992**, *79*, 495–502, doi:10.1182/blood.V79.2.495.495.
140. Harada, N.; Hata, H.; Yoshida, M.; Soniki, T.; Nagasaki, A.; Kuribayashi, N.; Kimura, T.; Matsuzaki, H.; Mitsuya, H. Expression of Bcl-2 Family of Proteins in Fresh Myeloma Cells. *Leukemia* **1998**, *12*, 1817–1820, doi:10.1038/sj.leu.2401168.
141. Tu, Y.; Renner, S.; Xu, F.; Fleishman, A.; Taylor, J.; Weisz, J.; Vescio, R.; Rettig, M.; Berenson, J.; Krajewski, S.; et al. BCL-X Expression in Multiple Myeloma: Possible Indicator of Chemoresistance. *Cancer Res* **1998**, *58*, 256–262.
142. Trisciuglio, D.; Tupone, M.G.; Desideri, M.; Di Martile, M.; Gabellini, C.; Buglioni, S.; Pallocca, M.; Alessandrini, G.; D’Aguanno, S.; Del Bufalo, D. BCL-XL Overexpression Promotes Tumor Progression-Associated Properties. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, 1–15, doi:10.1038/s41419-017-0055-y.
143. Flynt, E.; Bisht, K.; Sridharan, V.; Ortiz, M.; Towfic, F.; Thakurta, A. Prognosis, Biology, and Targeting of TP53 Dysregulation in Multiple Myeloma. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9020287.
144. Munawar, U.; Roth, M.; Barrio, S.; Wajant, H.; Siegmund, D.; Bargou, R.C.; Kortüm, K.M.; Stühmer, T. Assessment of TP53 Lesions for P53 System Functionality and Drug Resistance in Multiple Myeloma Using an Isogenic Cell Line Model. *Sci Rep* **2019**, *9*, 18062, doi:10.1038/s41598-019-54407-4.
145. Hao, S.; Lin, P.; Medeiros, L.J.; Fang, L.; Carballo-Zarate, A.A.; Konoplev, S.N.; Sargent, R.L.; Weber, D.M.; Thomas, S.K.; Manasanch, E.E.; et al. Clinical Implications of Cytogenetic Heterogeneity in Multiple Myeloma Patients with TP53 Deletion. *Mod Pathol* **2017**, *30*, 1378–1386, doi:10.1038/modpathol.2017.63.
146. Chavan, S.S.; He, J.; Tytarenko, R.; Deshpande, S.; Patel, P.; Bailey, M.; Stein, C.K.; Stephens, O.; Weinhold, N.; Petty, N.; et al. Bi-Allelic Inactivation Is More Prevalent at Relapse in Multiple Myeloma, Identifying RB1 as an Independent Prognostic Marker. *Blood Cancer J* **2017**, *7*, e535, doi:10.1038/bcj.2017.12.
147. Kortüm, K.M.; Mai, E.K.; Hanafiah, N.H.; Shi, C.-X.; Zhu, Y.-X.; Bruins, L.; Barrio, S.; Jedlowski, P.; Merz, M.; Xu, J.; et al. Targeted Sequencing of Refractory Myeloma Reveals a High Incidence of Mutations in CRBN and Ras Pathway Genes. *Blood* **2016**, *128*, 1226–1233, doi:10.1182/blood-2016-02-698092.
148. Dang, C.V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35, doi:10.1016/j.cell.2012.03.003.
149. Maes, A.; Menu, E.; Veirman, K.D.; Maes, K.; Vand erkerken, K.; De Bruyne, E. The Therapeutic Potential of Cell Cycle Targeting in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 90501–90520, doi:10.18632/oncotarget.18765.
150. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif* **2003**, *36*, 131–149, doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
151. He, G.; Siddik, Z.H.; Huang, Z.; Wang, R.; Koomen, J.; Kobayashi, R.; Khokhar, A.R.; Kuang, J. Induction of P21 by P53 Following DNA Damage Inhibits Both Cdk4 and Cdk2 Activities. *Oncogene* **2005**, *24*, 2929–2943, doi:10.1038/sj.onc.1208474.
152. Manier, S.; Salem, K.Z.; Park, J.; Landau, D.A.; Getz, G.; Ghobrial, I.M. Genomic Complexity of Multiple Myeloma and Its Clinical Implications. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 100–113, doi:10.1038/nrclinonc.2016.122.
153. Rio-Machin, A.; Ferreira, B.I.; Henry, T.; Gómez-López, G.; Agirre, X.; Alvarez, S.; Rodriguez-Perales, S.; Prosper, F.; Calasanz, M.J.; Martínez, J.; et al. Downregulation of Specific miRNAs in Hyperdiploid Multiple Myeloma Mimics the Oncogenic Effect of IgH Translocations Occurring in the Non-Hyperdiploid Subtype. *Leukemia* **2013**, *27*, 925–931, doi:10.1038/leu.2012.302.

154. Dimopoulos, K.; Gimsing, P.; Grønbaek, K. The Role of Epigenetics in the Biology of Multiple Myeloma. *Blood Cancer J* **2014**, *4*, e207, doi:10.1038/bcj.2014.29.
155. Bretones, G.; Delgado, M.D.; León, J. Myc and Cell Cycle Control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2015**, *1849*, 506–516, doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.013.
156. Chesi, M.; Bergsagel, P.L. Molecular Pathogenesis of Multiple Myeloma: Basic and Clinical Updates. *Int J Hematol* **2013**, *97*, 313–323, doi:10.1007/s12185-013-1291-2.
157. Gonzalez-Paz, N.; Chng, W.J.; McClure, R.F.; Blood, E.; Oken, M.M.; Ness, B.V.; James, C.D.; Kurtin, P.J.; Henderson, K.; Ahmann, G.J.; et al. Tumor Suppressor P16 Methylation in Multiple Myeloma: Biological and Clinical Implications. *Blood* **2006**, *109*, 1228–1232, doi:10.1182/blood-2006-05-024661.
158. Walker, B.A.; Boyle, E.M.; Wardell, C.P.; Murison, A.; Begum, D.B.; Dahir, N.M.; Proszek, P.Z.; Johnson, D.C.; Kaiser, M.F.; Melchor, L.; et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *JCO* **2015**, *33*, 3911–3920, doi:10.1200/JCO.2014.59.1503.
159. Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 153–166, doi:10.1038/nrc2602.
160. Kumar, S.K.; Dispenzieri, A.; Lacy, M.Q.; Gertz, M.A.; Buadi, F.K.; Pandey, S.; Kapoor, P.; Dingli, D.; Hayman, S.R.; Leung, N.; et al. Continued Improvement in Survival in Multiple Myeloma: Changes in Early Mortality and Outcomes in Older Patients. *Leukemia* **2014**, *28*, 1122–1128, doi:10.1038/leu.2013.313.
161. Lacy, M.Q.; Hayman, S.R.; Gertz, M.A.; Dispenzieri, A.; Buadi, F.; Kumar, S.; Greipp, P.R.; Lust, J.A.; Russell, S.J.; Dingli, D.; et al. Pomalidomide (CC4047) Plus Low-Dose Dexamethasone As Therapy for Relapsed Multiple Myeloma. *JCO* **2009**, *27*, 5008–5014, doi:10.1200/JCO.2009.23.6802.
162. Richardson, P.G.; Oriol, A.; Beksac, M.; Liberati, A.M.; Galli, M.; Schjesvold, F.; Lindsay, J.; Weisel, K.; White, D.; Facon, T.; et al. Pomalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone for Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma Previously Treated with Lenalidomide (OPTIMISMM): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology* **2019**, *20*, 781–794, doi:10.1016/S1470-2045(19)30152-4.
163. Dimopoulos, M.A.; Palumbo, A.; Corradini, P.; Cavo, M.; Delforge, M.; Di Raimondo, F.; Weisel, K.C.; Oriol, A.; Hansson, M.; Vacca, A.; et al. Safety and Efficacy of Pomalidomide plus Low-Dose Dexamethasone in STRATUS (MM-010): A Phase 3b Study in Refractory Multiple Myeloma. *Blood* **2016**, *128*, 497–503, doi:10.1182/blood-2016-02-700872.
164. Blokhin, N.; Larionov, L.; Perevodchikova, N.; Chebotareva, L.; Merkulova, N. Clinical Experiences with Sarcolysin in Neoplastic Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1958**, *68*, 1128–1132, doi:https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1958.tb42675.x.
165. Bergsagel, D.E.; Sprague, C.C.; Austin, C.; Griffith, K.M. Evaluation of New Chemotherapeutic Agents in the Treatment of Multiple Myeloma. IV. L-Phenylalanine Mustard (NSC-8806). *Cancer Chemother Rep* **1962**, *21*, 87–99.
166. Hoogstraten, B.; Sheehe, P.R.; Cuttner, J.; Cooper, T.; Kyle, R.A.; Oberfield, R.A.; Townsend, S.R.; Harley, J.B.; Hayes, D.M.; Costa, G.; et al. Melphalan in Multiple Myeloma. *Blood* **1967**, *30*, 74–83.
167. Mass, R.E. A Comparison of the Effect of Prednisone and a Placebo in the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancer Chemother Rep* **1962**, *16*, 257–259.
168. Alexanian, R.; Haut, A.; Khan, A.U.; Lane, M.; McKelvey, E.M.; Migliore, P.J.; Stuckey, W.J., Jr.; Wilson, H.E. Treatment for Multiple Myeloma: Combination Chemotherapy With Different Melphalan Dose Regimens. *JAMA* **1969**, *208*, 1680–1685, doi:10.1001/jama.1969.03160090040009.
169. Alexanian, R.; Barlogie, B.; Dixon, D. High-Dose Glucocorticoid Treatment of Resistant Myeloma. *Ann Intern Med* **1986**, *105*, 8–11, doi:10.7326/0003-4819-105-1-8.

170. Gandhi, A.K.; Kang, J.; Capone, L.; Parton, A.; Wu, L.; Zhang, L.H.; Mendy, D.; Lopez-Girona, A.; Tran, T.; Sapinoso, L.; et al. Dexamethasone Synergizes with Lenalidomide to Inhibit Multiple Myeloma Tumor Growth, but Reduces Lenalidomide-Induced Immunomodulation of T and NK Cell Function. *Curr Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 155–167, doi:10.2174/156800910791054239.
171. Miguel, J.S.; Weisel, K.; Moreau, P.; Lacy, M.; Song, K.; Delforge, M.; Karlin, L.; Goldschmidt, H.; Banos, A.; Oriol, A.; et al. Pomalidomide plus Low-Dose Dexamethasone versus High-Dose Dexamethasone Alone for Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma (MM-003): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology* **2013**, *14*, 1055–1066, doi:10.1016/S1470-2045(13)70380-2.
172. Osserman, E.F.; DiRe, L.B.; DiRe, J.; Sherman, W.H.; Hersman, J.A.; Storb, R. Identical Twin Marrow Transplantation in Multiple Myeloma. *ASH* **1982**, *68*, 215–223, doi:10.1159/000206984.
173. Barlogie, B.; Alexanian, R.; Dicke, K.A.; Zagars, G.; Spitzer, G.; Jagannath, S.; Horwitz, L. High-Dose Chemoradiotherapy and Autologous Bone Marrow Transplantation for Resistant Multiple Myeloma. *Blood* **1987**, *70*, 869–872, doi:10.1182/blood.V70.3.869.869.
174. Lenz, W.; Pfeiffer, R.A.; Kosenow, W.; Hayman, D.J. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *The Lancet* **1962**, *279*, 45–46, doi:10.1016/S0140-6736(62)92665-X.
175. D'Amato, R.J.; Loughnan, M.S.; Flynn, E.; Folkman, J. Thalidomide Is an Inhibitor of Angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 4082–4085.
176. Singhal, S.; Mehta, J.; Desikan, R.; Ayers, D.; Roberson, P.; Eddlemon, P.; Munshi, N.; Anaissie, E.; Wilson, C.; Dhodapkar, M.; et al. Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **1999**, *341*, 1565–1571, doi:10.1056/NEJM199911183412102.
177. Dimopoulos, M.; Spencer, A.; Attal, M.; Prince, H.M.; Harousseau, J.-L.; Dmoszynska, A.; San Miguel, J.; Hellmann, A.; Facon, T.; Foà, R.; et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 2123–2132, doi:10.1056/NEJMoa070594.
178. Lepper, E.; Smith, N.; Cox, M.; Scripture, C.; Figg, W. Thalidomide Metabolism and Hydrolysis: Mechanisms and Implications. *CDM* **2006**, *7*, 677–685, doi:10.2174/138920006778017777.
179. Hoffmann, M.; Kasserra, C.; Reyes, J.; Schafer, P.; Kosek, J.; Capone, L.; Parton, A.; Kim-Kang, H.; Surapaneni, S.; Kumar, G. Absorption, Metabolism and Excretion of [14C]Pomalidomide in Humans Following Oral Administration. *Cancer Chemother Pharmacol* **2013**, *71*, 489–501, doi:10.1007/s00280-012-2040-6.
180. Chen, N.; Wen, L.; Lau, H.; Surapaneni, S.; Kumar, G. Pharmacokinetics, Metabolism and Excretion of [14C]-Lenalidomide Following Oral Administration in Healthy Male Subjects. *Cancer Chemother Pharmacol* **2012**, *69*, 789–797, doi:10.1007/s00280-011-1760-3.
181. Rasco, D.W.; Papadopoulos, K.P.; Pourdehnad, M.; Gandhi, A.K.; Hagner, P.R.; Li, Y.; Wei, X.; Chopra, R.; Hege, K.; DiMartino, J.; et al. A First-in-Human Study of Novel Cereblon Modulator Avadomide (CC-122) in Advanced Malignancies. *Clin Cancer Res* **2019**, *25*, 90–98, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1203.
182. Lonial, S.; van de Donk, N.W.C.J.; Popat, R.; Zonder, J.A.; Minnema, M.C.; Larsen, J.; Nguyen, T.V.; Chen, M.S.; Bensmaine, A.; Cota, M.; et al. First Clinical (Phase 1b/2a) Study of Iberdomide (CC-220; IBER), a CELMoD, in Combination with Dexamethasone (DEX) in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *JCO* **2019**, *37*, 8006–8006, doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.8006.
183. Kotla, V.; Goel, S.; Nischal, S.; Heuck, C.; Vivek, K.; Das, B.; Verma, A. Mechanism of Action of Lenalidomide in Hematological Malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* **2009**, *2*, 36, doi:10.1186/1756-8722-2-36.

184. Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* **2010**, *327*, 1345–1350, doi:10.1126/science.1177319.
185. Matyskiela, M.E.; Lu, G.; Ito, T.; Pagarigan, B.; Lu, C.-C.; Miller, K.; Fang, W.; Wang, N.-Y.; Nguyen, D.; Houston, J.; et al. A Novel Cereblon Modulator Recruits GSPT1 to the CRL4CRBN Ubiquitin Ligase. *Nature* **2016**, *535*, 252–257, doi:10.1038/nature18611.
186. An, J.; Ponthier, C.M.; Sack, R.; Seebacher, J.; Stadler, M.B.; Donovan, K.A.; Fischer, E.S. PSILAC Mass Spectrometry Reveals ZFP91 as IMiD-Dependent Substrate of the CRL4 CRBN Ubiquitin Ligase. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15398, doi:10.1038/ncomms15398.
187. Sperling, A.S.; Burgess, M.; Keshishian, H.; Gasser, J.; Jan, M.; Sharma, R.; Fulciniti, M.; Munshi, N.; Carr, S.A.; Ebert, B.L. Discovery of a Novel Mechanism of Resistance to Thalidomide Derivatives. *Blood* **2018**, *132*, 949–949, doi:10.1182/blood-2018-99-115110.
188. Donovan, K.A.; An, J.; Nowak, R.P.; Yuan, J.C.; Fink, E.C.; Berry, B.C.; Ebert, B.L.; Fischer, E.S. Thalidomide Promotes Degradation of SALL4, a Transcription Factor Implicated in Duane Radial Ray Syndrome. *eLife* **7**, e38430, doi:10.7554/eLife.38430.
189. Zhu, Y.X.; Braggio, E.; Shi, C.-X.; Kortuem, K.M.; Bruins, L.A.; Schmidt, J.E.; Chang, X.-B.; Langlais, P.; Luo, M.; Jedlowski, P.; et al. Identification of Cereblon-Binding Proteins and Relationship with Response and Survival after IMiDs in Multiple Myeloma. *Blood* **2014**, *124*, 536–545, doi:10.1182/blood-2014-02-557819.
190. Krönke, J.; Udeshi, N.D.; Narla, A.; Grauman, P.; Hurst, S.N.; McConkey, M.; Svinkina, T.; Heckl, D.; Comer, E.; Li, X.; et al. Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science* **2014**, *343*, 301–305, doi:10.1126/science.1244851.
191. Zhu, Y.X.; Shi, C.-X.; Bruins, L.A.; Wang, X.; Riggs, D.L.; Porter, B.; Ahmann, J.M.; Campos, C.B. de; Braggio, E.; Bergsagel, P.L.; et al. Identification of Lenalidomide Resistance Pathways in Myeloma and Targeted Resensitization Using Cereblon Replacement, Inhibition of STAT3 or Targeting of IRF4. *Blood Cancer Journal* **2019**, *9*, 19, doi:10.1038/s41408-019-0173-0.
192. Mitsiades, N.; Mitsiades, C.S.; Poulaki, V.; Chauhan, D.; Richardson, P.G.; Hideshima, T.; Munshi, N.C.; Treon, S.P.; Anderson, K.C. Apoptotic Signaling Induced by Immunomodulatory Thalidomide Analogs in Human Multiple Myeloma Cells: Therapeutic Implications. *Blood* **2002**, *99*, 4525–4530, doi:10.1182/blood.V99.12.4525.
193. Li, S.; Pal, R.; Monaghan, S.A.; Schafer, P.; Ouyang, H.; Mapara, M.; Galson, D.L.; Lentzsch, S. IMiD Immunomodulatory Compounds Block C/EBP β Translation through EIF4E down-Regulation Resulting in Inhibition of MM. *Blood* **2011**, *117*, 5157–5165, doi:10.1182/blood-2010-10-314278.
194. Hideshima, T.; Chauhan, D.; Shima, Y.; Raje, N.; Davies, F.E.; Tai, Y.-T.; Treon, S.P.; Lin, B.; Schlossman, R.L.; Richardson, P.; et al. Thalidomide and Its Analogs Overcome Drug Resistance of Human Multiple Myeloma Cells to Conventional Therapy. *Blood* **2000**, *96*, 2943–2950.
195. Raje, N.; Kumar, S.; Hideshima, T.; Ishitsuka, K.; Chauhan, D.; Mitsiades, C.; Podar, K.; Gouill, S.L.; Richardson, P.; Munshi, N.C.; et al. Combination of the MTOR Inhibitor Rapamycin and CC-5013 Has Synergistic Activity in Multiple Myeloma. *Blood* **2004**, *104*, 4188–4193, doi:10.1182/blood-2004-06-2281.
196. Chamberlain, P.P.; Lopez-Girona, A.; Miller, K.; Carmel, G.; Pagarigan, B.; Chie-Leon, B.; Rychak, E.; Corral, L.G.; Ren, Y.J.; Wang, M.; et al. Structure of the Human Cereblon–DDB1–Lenalidomide Complex Reveals Basis for Responsiveness to Thalidomide Analogs. *Nat Struct Mol Biol* **2014**, *21*, 803–809, doi:10.1038/nsmb.2874.
197. Fischer, E.S.; Böhm, K.; Lydeard, J.R.; Yang, H.; Stadler, M.B.; Cavadini, S.; Nagel, J.; Serluca, F.; Acker, V.; Lingaraju, G.M.; et al. Structure of the DDB1–CRBN E3 Ubiquitin Ligase in Complex with Thalidomide. *Nature* **2014**, *512*, 49–53, doi:10.1038/nature13527.

198. Eichner, R.; Heider, M.; Fernández-Sáiz, V.; van Bebbber, F.; Garz, A.-K.; Lemeer, S.; Rudelius, M.; Targosz, B.-S.; Jacobs, L.; Knorn, A.-M.; et al. Immunomodulatory Drugs Disrupt the Cereblon–CD147–MCT1 Axis to Exert Antitumor Activity and Teratogenicity. *Nature Medicine* **2016**, *22*, 735–743, doi:10.1038/nm.4128.
199. Lu, G.; Middleton, R.E.; Sun, H.; Naniong, M.; Ott, C.J.; Mitsiades, C.S.; Wong, K.-K.; Bradner, J.E.; Kaelin, W.G. The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science* **2014**, *343*, 305–309, doi:10.1126/science.1244917.
200. Laubach, J.; Richardson, P.; Anderson, K. Multiple Myeloma. *Annu. Rev. Med.* **2011**, *62*, 249–264, doi:10.1146/annurev-med-070209-175325.
201. Ganesan, S.; Palani, H.K.; Balasundaram, N.; David, S.; Devasia, A.J.; George, B.; Mathews, V. Combination Lenalidomide/Bortezomib Treatment Synergistically Induces Calpain-Dependent Ikaros Cleavage and Apoptosis in Myeloma Cells. *Mol Cancer Res* **2020**, *18*, 529–536, doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0431.
202. Hideshima, T.; Ogiya, D.; Liu, J.; Harada, T.; Kurata, K.; Bae, J.; Massefski, W.; Anderson, K.C. Immunomodulatory Drugs Activate NK Cells via Both Zap-70 and Cereblon-Dependent Pathways. *Leukemia* **2021**, *35*, 177–188, doi:10.1038/s41375-020-0809-x.
203. Hideshima, T.; Cottini, F.; Nozawa, Y.; Seo, H.-S.; Ohguchi, H.; Samur, M.K.; Cirstea, D.; Mimura, N.; Iwasawa, Y.; Richardson, P.G.; et al. P53-Related Protein Kinase Confers Poor Prognosis and Represents a Novel Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Blood* **2017**, *129*, 1308–1319, doi:10.1182/blood-2016-09-738500.
204. Quach, H.; Ritchie, D.; Stewart, A.K.; Neeson, P.; Harrison, S.; Smyth, M.J.; Prince, H.M. Mechanism of Action of Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2010**, *24*, 22–32, doi:10.1038/leu.2009.236.
205. Corral, L.G.; Haslett, P.A.J.; Muller, G.W.; Chen, R.; Wong, L.-M.; Ocampo, C.J.; Patterson, R.T.; Stirling, D.I.; Kaplan, G. Differential Cytokine Modulation and T Cell Activation by Two Distinct Classes of Thalidomide Analogues That Are Potent Inhibitors of TNF- α . *The Journal of Immunology* **1999**, *163*, 380–386.
206. LeBlanc, R.; Hideshima, T.; Catley, L.P.; Shringarpure, R.; Burger, R.; Mitsiades, N.; Mitsiades, C.; Cheema, P.; Chauhan, D.; Richardson, P.G.; et al. Immunomodulatory Drug Costimulates T Cells via the B7-CD28 Pathway. *Blood* **2004**, *103*, 1787–1790, doi:10.1182/blood-2003-02-0361.
207. Zhu, D.; Corral, L.G.; Fleming, Y.W.; Stein, B. Immunomodulatory Drugs Revlimid® (Lenalidomide) and CC-4047 Induce Apoptosis of Both Hematological and Solid Tumor Cells through NK Cell Activation. *Cancer Immunol Immunother* **2008**, *57*, 1849–1859, doi:10.1007/s00262-008-0512-7.
208. Schafer, P.H.; Gandhi, A.K.; Loveland, M.A.; Chen, R.S.; Man, H.-W.; Schnetkamp, P.P.M.; Wolbring, G.; Govinda, S.; Corral, L.G.; Payvandi, F.; et al. Enhancement of Cytokine Production and AP-1 Transcriptional Activity in T Cells by Thalidomide-Related Immunomodulatory Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *305*, 1222–1232, doi:10.1124/jpet.102.048496.
209. Payvandi, F.; Wu, L.; Naziruddin, S.D.; Haley, M.; Parton, A.; Schafer, P.H.; Chen, R.S.; Muller, G.W.; Hughes, C.C.W.; Stirling, D.I. Immunomodulatory Drugs (IMiDs) Increase the Production of IL-2 from Stimulated T Cells by Increasing PKC- θ Activation and Enhancing the DNA-Binding Activity of AP-1 but Not NF-KB, OCT-1, or NF-AT. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **2005**, *25*, 604–616, doi:10.1089/jir.2005.25.604.
210. Davies, F.E.; Raje, N.; Hideshima, T.; Lentzsch, S.; Young, G.; Tai, Y.-T.; Lin, B.; Podar, K.; Gupta, D.; Chauhan, D.; et al. Thalidomide and Immunomodulatory Derivatives Augment Natural Killer Cell Cytotoxicity in Multiple Myeloma. *Blood* **2001**, *98*, 210–216, doi:10.1182/blood.V98.1.210.
211. Hayashi, T.; Hideshima, T.; Akiyama, M.; Podar, K.; Yasui, H.; Raje, N.; Kumar, S.; Chauhan, D.; Treon, S.P.; Richardson, P.; et al. Molecular Mechanisms Whereby

- Immunomodulatory Drugs Activate Natural Killer Cells: Clinical Application. *British Journal of Haematology* **2005**, *128*, 192–203, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05286.x.
212. Galustian, C.; Meyer, B.; Labarthe, M.-C.; Dredge, K.; Klaschka, D.; Henry, J.; Todryk, S.; Chen, R.; Muller, G.; Stirling, D.; et al. The Anti-Cancer Agents Lenalidomide and Pomalidomide Inhibit the Proliferation and Function of T Regulatory Cells. *Cancer Immunol Immunother* **2009**, *58*, 1033–1045, doi:10.1007/s00262-008-0620-4.
 213. Lopez-Girona, A.; Mendy, D.; Ito, T.; Miller, K.; Gandhi, A.K.; Kang, J.; Karasawa, S.; Carmel, G.; Jackson, P.; Abbasian, M.; et al. Cereblon Is a Direct Protein Target for Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Lenalidomide and Pomalidomide. *Leukemia* **2012**, *26*, 2326–2335, doi:10.1038/leu.2012.119.
 214. Zhu, Y.X.; Braggio, E.; Shi, C.-X.; Bruins, L.A.; Schmidt, J.E.; Wier, S.V.; Chang, X.-B.; Bjorklund, C.C.; Fonseca, R.; Bergsagel, P.L.; et al. Cereblon Expression Is Required for the Antimyeloma Activity of Lenalidomide and Pomalidomide. *Blood* **2011**, *118*, 4771–4779, doi:10.1182/blood-2011-05-356063.
 215. Ocio, E.M.; Fernández-Lázaro, D.; San-Segundo, L.; López-Corral, L.; Corchete, L.A.; Gutiérrez, N.C.; Garayoa, M.; Paíno, T.; García-Gómez, A.; Delgado, M.; et al. *In Vivo* Murine Model of Acquired Resistance in Myeloma Reveals Differential Mechanisms for Lenalidomide and Pomalidomide in Combination with Dexamethasone. *Leukemia* **2015**, *29*, 705–714, doi:10.1038/leu.2014.238.
 216. Song, T.; Liang, S.; Liu, J.; Zhang, T.; Yin, Y.; Geng, C.; Gao, S.; Feng, Y.; Xu, H.; Guo, D.; et al. CRL4 Antagonizes SCFFbxo7-Mediated Turnover of Cereblon and BK Channel to Regulate Learning and Memory. *PLOS Genetics* **2018**, *14*, e1007165, doi:10.1371/journal.pgen.1007165.
 217. Xu, G.; Jiang, X.; Jaffrey, S.R. A Mental Retardation-Linked Nonsense Mutation in Cereblon Is Rescued by Proteasome Inhibition *. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 29573–29585, doi:10.1074/jbc.M113.472092.
 218. Liu, J.; Song, T.; Zhou, W.; Xing, L.; Wang, S.; Ho, M.; Peng, Z.; Tai, Y.-T.; Hideshima, T.; Anderson, K.C.; et al. A Genome-Scale CRISPR-Cas9 Screening in Myeloma Cells Identifies Regulators of Immunomodulatory Drug Sensitivity. *Leukemia* **2019**, *33*, 171–180, doi:10.1038/s41375-018-0205-y.
 219. Thakurta, A.; Gandhi, A.K.; Waldman, M.F.; Bjorklund, C.; Ning, Y.; Mendy, D.; Schafer, P.; Lopez-Girona, A.; Lentzsch, S.; Schey, S.A.; et al. Absence of Mutations in Cereblon (CRBN) and DNA Damage-Binding Protein 1 (DDB1) Genes and Significance for IMiD Therapy. *Leukemia* **2014**, *28*, 1129–1131, doi:10.1038/leu.2013.315.
 220. Sperling, A.S.; Burgess, M.; Keshishian, H.; Gasser, J.A.; Bhatt, S.; Jan, M.; Słabicki, M.; Sellar, R.S.; Fink, E.C.; Miller, P.G.; et al. Patterns of Substrate Affinity, Competition, and Degradation Kinetics Underlie Biological Activity of Thalidomide Analogs. *Blood* **2019**, *134*, 160–170, doi:10.1182/blood.2019000789.
 221. Zhou, N.; Gutierrez-Uzquiza, A.; Zheng, X.Y.; Chang, R.; Vogl, D.T.; Garfall, A.L.; Bernabei, L.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; et al. RUNX Proteins Desensitize Multiple Myeloma to Lenalidomide via Protecting IKZFs from Degradation. *Leukemia* **2019**, *33*, 2006–2021, doi:10.1038/s41375-019-0403-2.
 222. Bjorklund, C.C.; Ma, W.; Wang, Z.Q.; Davis, R.E.; Kuhn, D.J.; Kornblau, S.M.; Wang, M.; Shah, J.J.; Orlowski, R.Z. Evidence of a Role for Activation of Wnt/Beta-Catenin Signaling in the Resistance of Plasma Cells to Lenalidomide. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 11009–11020, doi:10.1074/jbc.M110.180208.
 223. Sebastian, S.; Zhu, Y.X.; Braggio, E.; Shi, C.-X.; Panchabhai, S.C.; Van Wier, S.A.; Ahmann, G.J.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Stewart, A.K.; et al. Multiple Myeloma Cells' Capacity to Decompose H₂O₂ Determines Lenalidomide Sensitivity. *Blood* **2017**, *129*, 991–1007, doi:10.1182/blood-2016-09-738872.
 224. Mojica, F.J.M.; Ferrer, C.; Juez, G.; Rodríguez-Valera, F. Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the Archaea *Haloferax Mediterranei* and

- Haloferax Volcanii and Could Be Involved in Replicon Partitioning. *Molecular Microbiology* **1995**, *17*, 85–93, doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x.
225. Mojica, F.J.M.; Díez-Villaseñor, C.; Soria, E.; Juez, G. Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria. *Molecular Microbiology* **2000**, *36*, 244–246, doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
 226. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **2013**, *339*, 819–823, doi:10.1126/science.1231143.
 227. Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K.M.; Aach, J.; Guell, M.; DiCarlo, J.E.; Norville, J.E.; Church, G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* **2013**, *339*, 823–826, doi:10.1126/science.1232033.
 228. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821, doi:10.1126/science.1225829.
 229. Mao, Z.; Bozzella, M.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. DNA Repair by Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination during Cell Cycle in Human Cells. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2902–2906, doi:10.4161/cc.7.18.6679.
 230. Rouet, P.; Smih, F.; Jasin, M. Introduction of Double-Strand Breaks into the Genome of Mouse Cells by Expression of a Rare-Cutting Endonuclease. *Mol Cell Biol* **1994**, *14*, 8096–8106.
 231. Maeder, M.L.; Linder, S.J.; Cascio, V.M.; Fu, Y.; Ho, Q.H.; Joung, J.K. CRISPR RNA-Guided Activation of Endogenous Human Genes. *Nat Methods* **2013**, *10*, 977–979, doi:10.1038/nmeth.2598.
 232. Perez-Pinera, P.; Kocak, D.D.; Vockley, C.M.; Adler, A.F.; Kadi, A.M.; Polstein, L.R.; Thakore, P.I.; Glass, K.A.; Ousterout, D.G.; Leong, K.W.; et al. RNA-Guided Gene Activation by CRISPR-Cas9-Based Transcription Factors. *Nat Methods* **2013**, *10*, 973–976, doi:10.1038/nmeth.2600.
 233. Chavez, A.; Scheiman, J.; Vora, S.; Pruitt, B.W.; Tuttle, M.; Iyer, E.P.R.; Lin, S.; Kiani, S.; Guzman, C.D.; Wiegand, D.J.; et al. Highly Efficient Cas9-Mediated Transcriptional Programming. *Nature Methods* **2015**, *12*, 326–328, doi:10.1038/nmeth.3312.
 234. Konermann, S.; Brigham, M.D.; Trevino, A.E.; Joung, J.; Abudayyeh, O.O.; Barcena, C.; Hsu, P.D.; Habib, N.; Gootenberg, J.S.; Nishimasu, H.; et al. Genome-Scale Transcriptional Activation by an Engineered CRISPR-Cas9 Complex. *Nature* **2015**, *517*, 583–588, doi:10.1038/nature14136.
 235. Gilbert, L.A.; Larson, M.H.; Morsut, L.; Liu, Z.; Brar, G.A.; Torres, S.E.; Stern-Ginossar, N.; Brandman, O.; Whitehead, E.H.; Doudna, J.A.; et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* **2013**, *154*, 442–451, doi:10.1016/j.cell.2013.06.044.
 236. Gilbert, L.A.; Horlbeck, M.A.; Adamson, B.; Villalta, J.E.; Chen, Y.; Whitehead, E.H.; Guimaraes, C.; Panning, B.; Ploegh, H.L.; Bassik, M.C.; et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* **2014**, *159*, 647–661, doi:10.1016/j.cell.2014.09.029.
 237. Zhou, Y.; Zhu, S.; Cai, C.; Yuan, P.; Li, C.; Huang, Y.; Wei, W. High-Throughput Screening of a CRISPR/Cas9 Library for Functional Genomics in Human Cells. *Nature* **2014**, *509*, 487–491, doi:10.1038/nature13166.
 238. Shalem, O.; Sanjana, N.E.; Hartenian, E.; Shi, X.; Scott, D.A.; Mikkelsen, T.; Heckl, D.; Ebert, B.L.; Root, D.E.; Doench, J.G.; et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* **2014**, *343*, 84–87, doi:10.1126/science.1247005.
 239. Wang, T.; Wei, J.J.; Sabatini, D.M.; Lander, E.S. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *Science* **2014**, *343*, 80–84, doi:10.1126/science.1246981.

240. Root, D.E.; Hacohen, N.; Hahn, W.C.; Lander, E.S.; Sabatini, D.M. Genome-Scale Loss-of-Function Screening with a Lentiviral RNAi Library. *Nature Methods* **2006**, *3*, 715–719, doi:10.1038/nmeth924.
241. Paddison, P.J.; Silva, J.M.; Conklin, D.S.; Schlabach, M.; Li, M.; Aruleba, S.; Balija, V.; O’Shaughnessy, A.; Gnoj, L.; Scobie, K.; et al. A Resource for Large-Scale RNA-Interference-Based Screens in Mammals. *Nature* **2004**, *428*, 427–431, doi:10.1038/nature02370.
242. Moffat, J.; Sabatini, D.M. Building Mammalian Signalling Pathways with RNAi Screens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*, 177–187, doi:10.1038/nrm1860.
243. Berns, K.; Hijmans, E.M.; Mullenders, J.; Brummelkamp, T.R.; Velds, A.; Heimerikx, M.; Kerkhoven, R.M.; Madiredjo, M.; Nijkamp, W.; Weigelt, B.; et al. A Large-Scale RNAi Screen in Human Cells Identifies New Components of the P53 Pathway. *Nature* **2004**, *428*, 431–437, doi:10.1038/nature02371.
244. Boutros, M.; Kiger, A.A.; Armknecht, S.; Kerr, K.; Hild, M.; Koch, B.; Haas, S.A.; Consortium, H.F.A.; Paro, R.; Perrimon, N. Genome-Wide RNAi Analysis of Growth and Viability in *Drosophila* Cells. *Science* **2004**, *303*, 832–835, doi:10.1126/science.1091266.
245. Echeverri, C.J.; Beachy, P.A.; Baum, B.; Boutros, M.; Buchholz, F.; Chanda, S.K.; Downward, J.; Ellenberg, J.; Fraser, A.G.; Hacohen, N.; et al. Minimizing the Risk of Reporting False Positives in Large-Scale RNAi Screens. *Nature Methods* **2006**, *3*, 777–779, doi:10.1038/nmeth1006-777.
246. Jackson, A.L.; Burchard, J.; Schelter, J.; Chau, B.N.; Cleary, M.; Lim, L.; Linsley, P.S. Widespread siRNA “off-Target” Transcript Silencing Mediated by Seed Region Sequence Complementarity. *RNA* **2006**, *12*, 1179–1187, doi:10.1261/rna.25706.
247. Birmingham, A.; Anderson, E.M.; Reynolds, A.; Ilesley-Tyree, D.; Leake, D.; Fedorov, Y.; Baskerville, S.; Maksimova, E.; Robinson, K.; Karpilow, J.; et al. 3’ UTR Seed Matches, but Not Overall Identity, Are Associated with RNAi off-Targets. *Nature Methods* **2006**, *3*, 199–204, doi:10.1038/nmeth854.
248. Shi, J.; Wang, E.; Milazzo, J.P.; Wang, Z.; Kinney, J.B.; Vakoc, C.R. Discovery of Cancer Drug Targets by CRISPR-Cas9 Screening of Protein Domains. *Nat Biotechnol* **2015**, *33*, 661–667, doi:10.1038/nbt.3235.
249. Sun, W.; He, B.; Yang, B.; Hu, W.; Cheng, S.; Xiao, H.; Yang, Z.; Wen, X.; Zhou, L.; Xie, H.; et al. Genome-Wide CRISPR Screen Reveals SGOL1 as a Druggable Target of Sorafenib-Treated Hepatocellular Carcinoma. *Laboratory Investigation* **2018**, *98*, 734–744, doi:10.1038/s41374-018-0027-6.
250. Szlachta, K.; Kucsu, C.; Tufan, T.; Adair, S.J.; Shang, S.; Michaels, A.D.; Mullen, M.G.; Fischer, N.L.; Yang, J.; Liu, L.; et al. CRISPR Knockout Screening Identifies Combinatorial Drug Targets in Pancreatic Cancer and Models Cellular Drug Response. *Nat Commun* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-018-06676-2.
251. Wu, Y.; Zhou, L.; Wang, Z.; Wang, X.; Zhang, R.; Zheng, L.; Kang, T. Systematic Screening for Potential Therapeutic Targets in Osteosarcoma through a Kinome-Wide CRISPR-Cas9 Library. *Cancer Biol Med* **2020**, *17*, 782–794, doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0162.
252. Li, H.; Zhao, L.; Lau, Y.S.; Zhang, C.; Han, R. Genome-Wide CRISPR Screen Identifies LGALS2 as an Oxidative Stress-Responsive Gene with an Inhibitory Function on Colon Tumor Growth. *Oncogene* **2021**, *40*, 177–188, doi:10.1038/s41388-020-01523-5.
253. Manguso, R.T.; Pope, H.W.; Zimmer, M.D.; Brown, F.D.; Yates, K.B.; Miller, B.C.; Collins, N.B.; Bi, K.; LaFleur, M.W.; Juneja, V.R.; et al. In Vivo CRISPR Screening Identifies Ptpn2 as a Cancer Immunotherapy Target. *Nature* **2017**, *547*, 413–418, doi:10.1038/nature23270.
254. Burr, M.L.; Sparbier, C.E.; Chan, Y.-C.; Williamson, J.C.; Woods, K.; Beavis, P.A.; Lam, E.Y.N.; Henderson, M.A.; Bell, C.C.; Stolzenburg, S.; et al. CMTM6 Maintains the Expression of PD-L1 and Regulates Anti-Tumour Immunity. *Nature* **2017**, *549*, 101–105, doi:10.1038/nature23643.

255. Wang, T.; Birsoy, K.; Hughes, N.W.; Krupczak, K.M.; Post, Y.; Wei, J.J.; Lander, E.S.; Sabatini, D.M. Identification and Characterization of Essential Genes in the Human Genome. *Science* **2015**, *350*, 1096–1101, doi:10.1126/science.aac7041.
256. Wei, L.; Lee, D.; Law, C.-T.; Zhang, M.S.; Shen, J.; Chin, D.W.-C.; Zhang, A.; Tsang, F.H.-C.; Wong, C.L.-S.; Ng, I.O.-L.; et al. Genome-Wide CRISPR/Cas9 Library Screening Identified PHGDH as a Critical Driver for Sorafenib Resistance in HCC. *Nat Commun* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41467-019-12606-7.
257. Bester, A.C.; Lee, J.D.; Chavez, A.; Lee, Y.-R.; Nachmani, D.; Vora, S.; Victor, J.; Sauvageau, M.; Rinn, J.L.; Provero, P.; et al. An Integrated Genome Wide CRISPRa Approach to Functionalize lncRNAs in Drug Resistance. *Cell* **2018**, *173*, 649–664.e20, doi:10.1016/j.cell.2018.03.052.
258. Zheng, A.; Chevalier, N.; Calderoni, M.; Dubuis, G.; Dormond, O.; Ziros, P.G.; Sykiotis, G.P.; Widmann, C. CRISPR/Cas9 Genome-Wide Screening Identifies KEAP1 as a Sorafenib, Lenvatinib, and Regorafenib Sensitivity Gene in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2019**, *10*, 7058–7070, doi:10.18632/oncotarget.27361.
259. Pettitt, S.J.; Krastev, D.B.; Brandsma, I.; Dréan, A.; Song, F.; Aleksandrov, R.; Harrell, M.I.; Menon, M.; Brough, R.; Campbell, J.; et al. Genome-Wide and High-Density CRISPR-Cas9 Screens Identify Point Mutations in PARP1 Causing PARP Inhibitor Resistance. *Nat Commun* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-018-03917-2.
260. Schleicher, E.M.; Dhoonmoon, A.; Jackson, L.M.; Clements, K.E.; Stump, C.L.; Nicolae, C.M.; Moldovan, G.-L. Dual Genome-Wide CRISPR Knockout and CRISPR Activation Screens Identify Mechanisms That Regulate the Resistance to Multiple ATR Inhibitors. *PLoS Genet* **2020**, *16*, doi:10.1371/journal.pgen.1009176.
261. Makhov, P.; Sohn, J.A.; Serebriiskii, I.G.; Fazliyeva, R.; Khazak, V.; Bumber, Y.; Uzzo, R.G.; Kolenko, V.M. CRISPR/Cas9 Genome-Wide Loss-of-Function Screening Identifies Druggable Cellular Factors Involved in Sunitinib Resistance in Renal Cell Carcinoma. *British Journal of Cancer* **2020**, *123*, 1749–1756, doi:10.1038/s41416-020-01087-x.
262. Guièze, R.; Liu, V.M.; Rosebrock, D.; Jourdain, A.A.; Hernández-Sánchez, M.; Zurita, A.M.; Sun, J.; Hacken, E.T.; Baranowski, K.; Thompson, P.A.; et al. Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 369–384.e13, doi:10.1016/j.ccell.2019.08.005.
263. Breinig, M.; Schweitzer, A.Y.; Herianto, A.M.; Revia, S.; Schaefer, L.; Wendler, L.; Cobos Galvez, A.; Tschaharganeh, D.F. Multiplexed Orthogonal Genome Editing and Transcriptional Activation by Cas12a. *Nat Methods* **2019**, *16*, 51–54, doi:10.1038/s41592-018-0262-1.
264. Qi, L.S.; Larson, M.H.; Gilbert, L.A.; Doudna, J.A.; Weissman, J.S.; Arkin, A.P.; Lim, W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **2013**, *152*, 1173–1183, doi:10.1016/j.cell.2013.02.022.
265. Katayama, S.; Shiraishi, K.; Gorai, N.; Andou, M. A CRISPR/Cas9-Based Method for Targeted DNA Methylation Enables Cancer Initiation in B Lymphocytes. *Advanced Genetics* **2021**, *2*, e10040, doi:10.1002/ggn2.10040.
266. Kang, J.G.; Park, J.S.; Ko, J.-H.; Kim, Y.-S. Regulation of Gene Expression by Altered Promoter Methylation Using a CRISPR/Cas9-Mediated Epigenetic Editing System. *Sci Rep* **2019**, *9*, 11960, doi:10.1038/s41598-019-48130-3.
267. Pauli, C.; Liu, Y.; Rohde, C.; Cui, C.; Fijalkowska, D.; Gerloff, D.; Walter, C.; Krijgsveld, J.; Dugas, M.; Edemir, B.; et al. Site-Specific Methylation of 18S Ribosomal RNA by SNORD42A Is Required for Acute Myeloid Leukemia Cell Proliferation. *Blood* **2020**, *135*, 2059–2070, doi:10.1182/blood.2019004121.
268. Han, K.; Pierce, S.E.; Li, A.; Spees, K.; Anderson, G.R.; Seoane, J.A.; Lo, Y.-H.; Dubreuil, M.; Olivas, M.; Kamber, R.A.; et al. CRISPR Screens in Cancer Spheroids Identify 3D Growth Specific Vulnerabilities. *Nature* **2020**, *580*, 136–141, doi:10.1038/s41586-020-2099-x.

269. Zhu, Y.; Feng, F.; Hu, G.; Wang, Y.; Yu, Y.; Zhu, Y.; Xu, W.; Cai, X.; Sun, Z.; Han, W.; et al. A Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Host Factors That Regulate SARS-CoV-2 Entry. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-21213-4.
270. Behan, F.M.; Iorio, F.; Picco, G.; Gonçalves, E.; Beaver, C.M.; Migliardi, G.; Santos, R.; Rao, Y.; Sassi, F.; Pinnelli, M.; et al. Prioritization of Cancer Therapeutic Targets Using CRISPR–Cas9 Screens. *Nature* **2019**, *568*, 511–516, doi:10.1038/s41586-019-1103-9.
271. Shi, C.-X.; Kortüm, K.M.; Zhu, Y.X.; Bruins, L.A.; Jedlowski, P.; Votruba, P.G.; Luo, M.; Stewart, R.A.; Ahmann, J.; Braggio, E.; et al. CRISPR Genome-Wide Screening Identifies Dependence on the Proteasome Subunit PSMC6 for Bortezomib Sensitivity in Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther* **2017**, *16*, 2862–2870, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0130.
272. Sievers, Q.L.; Gasser, J.A.; Cowley, G.S.; Fischer, E.S.; Ebert, B.L. Genome-Wide Screen Identifies Cullin-RING Ligase Machinery Required for Lenalidomide-Dependent CRL4CRBN Activity. *Blood* **2018**, *132*, 1293–1303, doi:10.1182/blood-2018-01-821769.
273. Maiso, P.; Carvajal-Vergara, X.; Ocio, E.M.; López-Pérez, R.; Mateo, G.; Gutiérrez, N.; Atadja, P.; Pandiella, A.; Miguel, J.F.S. The Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Is a Potent Antimyeloma Agent That Overcomes Drug Resistance. *Cancer Res* **2006**, *66*, 5781–5789, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4186.
274. Liao, Y.; Wang, J.; Jaehnig, E.J.; Shi, Z.; Zhang, B. WebGestalt 2019: Gene Set Analysis Toolkit with Revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47*, W199–W205, doi:10.1093/nar/gkz401.
275. Fischer, A.H.; Jacobson, K.A.; Rose, J.; Zeller, R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc* **2008**, *2008*, pdb.prot4986, doi:10.1101/pdb.prot4986.
276. Du, P.; Zhang, X.; Huang, C.-C.; Jafari, N.; Kibbe, W.A.; Hou, L.; Lin, S.M. Comparison of Beta-Value and M-Value Methods for Quantifying Methylation Levels by Microarray Analysis. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 587, doi:10.1186/1471-2105-11-587.
277. Covassin, L.D.; Siekmann, A.F.; Kacergis, M.C.; Laver, E.; Moore, J.C.; Villefranc, J.A.; Weinstein, B.M.; Lawson, N.D. A Genetic Screen for Vascular Mutants in Zebrafish Reveals Dynamic Roles for Vegf/Plcg1 Signaling during Artery Development. *Dev Biol* **2009**, *329*, 212–226, doi:10.1016/j.ydbio.2009.02.031.
278. Koike-Yusa, H.; Li, Y.; Tan, E.-P.; Velasco-Herrera, M.D.C.; Yusa, K. Genome-Wide Recessive Genetic Screening in Mammalian Cells with a Lentiviral CRISPR-Guide RNA Library. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 267–273, doi:10.1038/nbt.2800.
279. Joung, J.; Konermann, S.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Platt, R.J.; Brigham, M.D.; Sanjana, N.E.; Zhang, F. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout and Transcriptional Activation Screening. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 828–863, doi:10.1038/nprot.2017.016.
280. Li, W.; Xu, H.; Xiao, T.; Cong, L.; Love, M.I.; Zhang, F.; Irizarry, R.A.; Liu, J.S.; Brown, M.; Liu, X.S. MAGeCK Enables Robust Identification of Essential Genes from Genome-Scale CRISPR/Cas9 Knockout Screens. *Genome Biology* **2014**, *15*, 554, doi:10.1186/s13059-014-0554-4.
281. Wang, B.; Wang, M.; Zhang, W.; Xiao, T.; Chen, C.-H.; Wu, A.; Wu, F.; Traugh, N.; Wang, X.; Li, Z.; et al. Integrative Analysis of Pooled CRISPR Genetic Screens Using MAGeCKFlute. *Nat Protoc* **2019**, *14*, 756–780, doi:10.1038/s41596-018-0113-7.
282. Verhelle, D.; Corral, L.G.; Wong, K.; Mueller, J.H.; Parseval, L.M.; Jensen-Pergakes, K.; Schafer, P.H.; Chen, R.; Glezer, E.; Ferguson, G.D.; et al. Lenalidomide and CC-4047 Inhibit the Proliferation of Malignant B Cells While Expanding Normal CD34+ Progenitor Cells. *Cancer Res* **2007**, *67*, 746–755, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2317.
283. Cox, D.N.; Chao, A.; Baker, J.; Chang, L.; Qiao, D.; Lin, H. A Novel Class of Evolutionarily Conserved Genes Defined by Piwi Are Essential for Stem Cell Self-Renewal. *Genes Dev* **1998**, *12*, 3715–3727, doi:10.1101/gad.12.23.3715.
284. Rojas-Ríos, P.; Simonelig, M. PiRNAs and PIWI Proteins: Regulators of Gene Expression in Development and Stem Cells. *Development* **2018**, *145*, doi:10.1242/dev.161786.

285. Yan, H.; Wu, Q.-L.; Sun, C.-Y.; Ai, L.-S.; Deng, J.; Zhang, L.; Chen, L.; Chu, Z.-B.; Tang, B.; Wang, K.; et al. PiRNA-823 Contributes to Tumorigenesis by Regulating de Novo DNA Methylation and Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2015**, *29*, 196–206, doi:10.1038/leu.2014.135.
286. Chen, C.S.; Nelson, C.M.; Khauv, D.; Bennett, S.; Radisky, E.S.; Hirai, Y.; Bissell, M.J.; Radisky, D.C. Homology with Vesicle Fusion Mediator Syntaxin-1a Predicts Determinants of Epimorphin/Syntaxin-2 Function in Mammary Epithelial Morphogenesis. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 6877–6884, doi:10.1074/jbc.M805908200.
287. Miura, K.; Yoshino, R.; Hirai, Y.; Goto, T.; Ohshima, S.; Mikami, K.; Yoneyama, K.; Watanabe, D.; Sato, M.; Senoo, H.; et al. Epimorphin, a Morphogenic Protein, Induces Proteases in Rodent Hepatocytes through NF- κ B. *Journal of Hepatology* **2007**, *47*, 834–843, doi:10.1016/j.jhep.2007.07.024.
288. Bascom, J.L.; Fata, J.E.; Hirai, Y.; Sternlicht, M.D.; Bissell, M.J. Epimorphin Overexpression in the Mouse Mammary Gland Promotes Alveolar Hyperplasia and Mammary Adenocarcinoma. *Cancer Res* **2005**, *65*, 8617–8621, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1985.
289. Jia, Y.-L.; Shi, L.; Zhou, J.-N.; Fu, C.-J.; Chen, L.; Yuan, H.-F.; Wang, Y.-F.; Yan, X.-L.; Xu, Y.-C.; Zeng, Q.; et al. Epimorphin Promotes Human Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis through Activation of Focal Adhesion Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase/Matrix Metalloproteinase-9 Axis. *Hepatology* **2011**, *54*, 1808–1818, doi:10.1002/hep.24562.
290. Wang, Y.; Xu, H.; Jiao, H.; Wang, S.; Xiao, Z.; Zhao, Y.; Bi, J.; Wei, W.; Liu, S.; Qiu, J.; et al. STX2 Promotes Colorectal Cancer Metastasis through a Positive Feedback Loop That Activates the NF- κ B Pathway. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41419-018-0675-x.
291. Khalil, A.; Tanos, R.; El-Hachem, N.; Kurban, M.; Bouvagnet, P.; Bitar, F.; Nemer, G. A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1416, doi:10.1038/s41598-017-01641-3.
292. Wortmann, S.B.; Vaz, F.M.; Gardeitchik, T.; Vissers, L.E.L.M.; Renkema, G.H.; Schuurs-Hoeijmakers, J.H.M.; Kulik, W.; Lammens, M.; Christin, C.; Kluijtmans, L.A.J.; et al. Mutations in the Phospholipid Remodeling Gene SERAC1 Impair Mitochondrial Function and Intracellular Cholesterol Trafficking and Cause Dystonia and Deafness. *Nat Genet* **2012**, *44*, 797–802, doi:10.1038/ng.2325.
293. Mani, M.; Lee, S.Y.; Lucast, L.; Cremona, O.; Di Paolo, G.; De Camilli, P.; Ryan, T.A. The Dual Phosphatase Activity of Synaptojanin1 Is Required for Both Efficient Synaptic Vesicle Internalization and Re-Availability at Nerve Terminals. *Neuron* **2007**, *56*, 10.1016/j.neuron.2007.10.032, doi:10.1016/j.neuron.2007.10.032.
294. Ben-Chetrit, N.; Chetrit, D.; Russell, R.; Körner, C.; Mancini, M.; Abdul-Hai, A.; Itkin, T.; Carvalho, S.; Cohen-Dvashi, H.; Koestler, W.J.; et al. Synaptojanin 2 Is a Druggable Mediator of Metastasis and the Gene Is Overexpressed and Amplified in Breast Cancer. *Science Signaling* **2015**, *8*, ra7–ra7, doi:10.1126/scisignal.2005537.
295. Chuang, Y.; Tran, N.L.; Rusk, N.; Nakada, M.; Berens, M.E.; Symons, M. Role of Synaptojanin 2 in Glioma Cell Migration and Invasion. *Cancer Res* **2004**, *64*, 8271–8275, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2097.
296. Frishberg, Y.; Zeharia, A.; Lyakhovetsky, R.; Bargal, R.; Belostotsky, R. Mutations in HAO1 Encoding Glycolate Oxidase Cause Isolated Glycolic Aciduria. *Journal of Medical Genetics* **2014**, *51*, 526–529, doi:10.1136/jmedgenet-2014-102529.
297. Burgess, T.L.; Qian, Y.; Kaufman, S.; Ring, B.D.; Van, G.; Capparelli, C.; Kelley, M.; Hsu, H.; Boyle, W.J.; Dunstan, C.R.; et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *J Cell Biol* **1999**, *145*, 527–538.
298. Ren, Z.; van Andel, H.; de Lau, W.; Hartholt, R.B.; Maurice, M.M.; Clevers, H.; Kersten, M.J.; Spaargaren, M.; Pals, S.T. Syndecan-1 Promotes Wnt/ β -Catenin Signaling in Multiple

- Myeloma by Presenting Wnts and R-Spondins. *Blood* **2018**, *131*, 982–994, doi:10.1182/blood-2017-07-797050.
299. Jiang, P.; Liu, R.; Zheng, Y.; Liu, X.; Chang, L.; Xiong, S.; Chu, Y. MiR-34a Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response through Targeting Notch1 in Murine Macrophages. *Experimental Cell Research* **2012**, *318*, 1175–1184, doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.018.
 300. Rokavec, M.; Öner, M.G.; Li, H.; Jackstadt, R.; Jiang, L.; Lodygin, D.; Kaller, M.; Horst, D.; Ziegler, P.K.; Schwitalla, S.; et al. IL-6R/STAT3/MiR-34a Feedback Loop Promotes EMT-Mediated Colorectal Cancer Invasion and Metastasis. *J Clin Invest* **2014**, *124*, 1853–1867, doi:10.1172/JCI73531.
 301. Shi, X.; Kaller, M.; Rokavec, M.; Kirchner, T.; Horst, D.; Hermeking, H. Characterization of a P53/MiR-34a/CSF1R/STAT3 Feedback Loop in Colorectal Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **2020**, *10*, 391–418, doi:10.1016/j.jcmgh.2020.04.002.
 302. Zarone, M.R.; Misso, G.; Grimaldi, A.; Zappavigna, S.; Russo, M.; Amler, E.; Di Martino, M.T.; Amodio, N.; Tagliaferri, P.; Tassone, P.; et al. Evidence of Novel MiR-34a-Based Therapeutic Approaches for Multiple Myeloma Treatment. *Sci Rep* **2017**, *7*, 17949, doi:10.1038/s41598-017-18186-0.
 303. Cheng, D.-L.; Fang, H.-X.; Liang, Y.; Zhao, Y.; Shi, C. MicroRNA-34a Promotes INOS Secretion from Pulmonary Macrophages in Septic Suckling Rats through Activating STAT3 Pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *105*, 1276–1282, doi:10.1016/j.biopha.2018.06.063.
 304. Slabáková, E.; Culig, Z.; Remšík, J.; Souček, K. Alternative Mechanisms of MiR-34a Regulation in Cancer. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, e3100, doi:10.1038/cddis.2017.495.
 305. Chung, Y.-H.; Li, S.-C.; Kao, Y.-H.; Luo, H.-L.; Cheng, Y.-T.; Lin, P.-R.; Tai, M.-H.; Chiang, P.-H. MiR-30a-5p Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulates Expression of Tight Junction Protein Claudin-5 in Human Upper Tract Urothelial Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1826, doi:10.3390/ijms18081826.
 306. Santarpia, L.; Lippman, S.L.; El-Naggar, A.K. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets* **2012**, *16*, 103–119, doi:10.1517/14728222.2011.645805.
 307. Mansour, S.J.; Matten, W.T.; Hermann, A.S.; Candia, J.M.; Rong, S.; Fukasawa, K.; Woude, G.V.; Ahn, N.G. Transformation of Mammalian Cells by Constitutively Active MAP Kinase Kinase. *Science* **1994**, *265*, 966–970, doi:10.1126/science.8052857.
 308. Blanco-Aparicio, C.; Carnero, A. Pim Kinases in Cancer: Diagnostic, Prognostic and Treatment Opportunities. *Biochemical Pharmacology* **2013**, *85*, 629–643, doi:10.1016/j.bcp.2012.09.018.
 309. Claudio, J.O.; Masih-Khan, E.; Tang, H.; Gonçalves, J.; Voralia, M.; Li, Z.H.; Nadeem, V.; Cukerman, E.; Francisco-Pabalan, O.; Liew, C.C.; et al. A Molecular Compendium of Genes Expressed in Multiple Myeloma. *Blood* **2002**, *100*, 2175–2186, doi:10.1182/blood-2002-01-0008.
 310. Lu, J.; Zavorotinskaya, T.; Dai, Y.; Niu, X.-H.; Castillo, J.; Sim, J.; Yu, J.; Wang, Y.; Langowski, J.L.; Holash, J.; et al. Pim2 Is Required for Maintaining Multiple Myeloma Cell Growth through Modulating TSC2 Phosphorylation. *Blood* **2013**, *122*, 1610–1620, doi:10.1182/blood-2013-01-481457.
 311. Asano, J.; Nakano, A.; Oda, A.; Amou, H.; Hiasa, M.; Takeuchi, K.; Miki, H.; Nakamura, S.; Harada, T.; Fujii, S.; et al. The Serine/Threonine Kinase Pim-2 Is a Novel Anti-Apoptotic Mediator in Myeloma Cells. *Leukemia* **2011**, *25*, 1182–1188, doi:10.1038/leu.2011.60.
 312. Shah, J.J.; Kaufman, J.L.; Zonder, J.A.; Cohen, A.D.; Bensinger, W.I.; Hilder, B.W.; Rush, S.A.; Walker, D.H.; Tunquist, B.J.; Litwiler, K.S.; et al. A Phase 1 and 2 Study of Filanesib Alone and in Combination with Low-Dose Dexamethasone in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer* **2017**, *123*, 4617–4630, doi:10.1002/cncr.30892.

313. Tunquist, B.J.; Woessner, R.D.; Walker, D.H. Mcl-1 Stability Determines Mitotic Cell Fate of Human Multiple Myeloma Tumor Cells Treated with the Kinesin Spindle Protein Inhibitor ARRY-520. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 2046–2056, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0033.
314. Hernández-García, S.; San-Segundo, L.; González-Méndez, L.; Corchete, L.A.; Misiewicz-Krzeminska, I.; Martín-Sánchez, M.; López-Iglesias, A.-A.; Algarín, E.M.; Mogollón, P.; Díaz-Tejedor, A.; et al. The Kinesin Spindle Protein Inhibitor Filanesib Enhances the Activity of Pomalidomide and Dexamethasone in Multiple Myeloma. *Haematologica* **2017**, *102*, 2113–2124, doi:10.3324/haematol.2017.168666.
315. Ocio, E.M.; Motlló, C.; Rodríguez-Otero, P.; Martínez-López, J.; Cejalvo, M.J.; Martín-Sánchez, J.; Bladé, J.; García-Malo, M.D.; Dourdil, M.V.; García-Mateo, A.; et al. Filanesib in Combination with Pomalidomide and Dexamethasone in Refractory MM Patients: Safety and Efficacy, and Association with Alpha 1-Acid Glycoprotein (AAG) Levels. Phase Ib/II Pomdefil Clinical Trial Conducted by the Spanish MM Group. *British Journal of Haematology* **2021**, *192*, 522–530, doi:10.1111/bjh.16788.
316. Chari, A.; Htut, M.; Zonder, J.A.; Fay, J.W.; Jakubowiak, A.J.; Levy, J.B.; Lau, K.; Burt, S.M.; Tunquist, B.J.; Hilder, B.W.; et al. A Phase 1 Dose-Escalation Study of Filanesib plus Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Recurrent/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer* **2016**, *122*, 3327–3335, doi:10.1002/cncr.30174.
317. Lee, H.C.; Shah, J.J.; Feng, L.; Manasanch, E.E.; Lu, R.; Morphey, A.; Crumpton, B.; Patel, K.K.; Wang, M.L.; Alexanian, R.; et al. A Phase 1 Study of Filanesib, Carfilzomib, and Dexamethasone in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Blood Cancer J.* **2019**, *9*, 1–5, doi:10.1038/s41408-019-0240-6.
318. Chim, C.; Liang, R.; Leung, M.; Kwong, Y. Aberrant Gene Methylation Implicated in the Progression of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma. *J Clin Pathol* **2007**, *60*, 104–106, doi:10.1136/jcp.2006.036715.
319. Geraldes, C.; Gonçalves, A.C.; Cortesão, E.; Pereira, M.I.; Roque, A.; Paiva, A.; Ribeiro, L.; Nascimento-Costa, J.M.; Sarmiento-Ribeiro, A.B. Aberrant P15, P16, P53, and DAPK Gene Methylation in Myelomagenesis: Clinical and Prognostic Implications. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **2016**, *16*, 713-720.e2, doi:10.1016/j.clml.2016.08.016.
320. Stanganelli, C.; Arbelbide, J.; Fantl, D.B.; Corrado, C.; Slavutsky, I. DNA Methylation Analysis of Tumor Suppressor Genes in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Ann Hematol* **2009**, *89*, 191, doi:10.1007/s00277-009-0818-3.
321. Wong, K.-Y.; Liang, R.; So, C.-C.; Jin, D.-Y.; Costello, J.F.; Chim, C.-S. Epigenetic Silencing of MIR203 in Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* **2011**, *154*, 569–578, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08782.x.
322. Jost, E.; Gezer, D.; Wilop, S.; Suzuki, H.; Herman, J.G.; Osieka, R.; Galm, O. Epigenetic Dysregulation of Secreted Frizzled-Related Proteins in Multiple Myeloma. *Cancer Letters* **2009**, *281*, 24–31, doi:10.1016/j.canlet.2009.02.002.
323. Rajadhyaksha, A.M.; Ra, S.; Kishinevsky, S.; Lee, A.S.; Romanienko, P.; DuBoff, M.; Yang, C.; Zupan, B.; Byrne, M.; Daruwalla, Z.R.; et al. Behavioral Characterization of Cereblon Forebrain-Specific Conditional Null Mice: A Model for Human Non-Syndromic Intellectual Disability. *Behav Brain Res* **2012**, *226*, 428–434, doi:10.1016/j.bbr.2011.09.039.
324. Lachmann, A.; Torre, D.; Keenan, A.B.; Jagodnik, K.M.; Lee, H.J.; Wang, L.; Silverstein, M.C.; Ma'ayan, A. Massive Mining of Publicly Available RNA-Seq Data from Human and Mouse. *Nat Commun* **2018**, *9*, 1366, doi:10.1038/s41467-018-03751-6.
325. Lachmann, A.; Xu, H.; Krishnan, J.; Berger, S.I.; Mazloom, A.R.; Ma'ayan, A. ChEA: Transcription Factor Regulation Inferred from Integrating Genome-Wide ChIP-X Experiments. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2438–2444, doi:10.1093/bioinformatics/btq466.
326. Cao, R.; Zhang, Y. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Molecular Cell* **2004**, *15*, 57–67, doi:10.1016/j.molcel.2004.06.020.

327. Tran, N.; Broun, A.; Ge, K. Lysine Demethylase KDM6A in Differentiation, Development, and Cancer. *Mol Cell Biol* **2020**, *40*, e00341-20, doi:10.1128/MCB.00341-20.
328. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.-W.; Bartel, D.P. Predicting Effective MicroRNA Target Sites in Mammalian MRNAs. *eLife* **2015**, *4*, e05005, doi:10.7554/eLife.05005.
329. Nutt, S.L.; Keenan, C.; Chopin, M.; Allan, R.S. EZH2 Function in Immune Cell Development. *Biological Chemistry* **2020**, *401*, 933–943, doi:10.1515/hsz-2019-0436.
330. Yao, Y.; Hu, H.; Yang, Y.; Zhou, G.; Shang, Z.; Yang, X.; Sun, K.; Zhan, S.; Yu, Z.; Li, P.; et al. Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes (Basel)* **2016**, *7*, 83, doi:10.3390/genes7100083.
331. Ito, T.; Teo, Y.V.; Evans, S.A.; Neretti, N.; Sedivy, J.M. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage-and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep* **2018**, *22*, 3480–3492, doi:10.1016/j.celrep.2018.03.002.
332. Bachmann, I.M.; Halvorsen, O.J.; Collett, K.; Stefansson, I.M.; Straume, O.; Haukaas, S.A.; Salvesen, H.B.; Otte, A.P.; Akslen, L.A. EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *JCO* **2006**, *24*, 268–273, doi:10.1200/JCO.2005.01.5180.
333. Xu, J.; Wang, Z.; Lu, W.; Jiang, H.; Lu, J.; Qiu, J.; Ye, G. EZH2 Promotes Gastric Cancer Cells Proliferation by Repressing P21 Expression. *Pathology - Research and Practice* **2019**, *215*, 152374, doi:10.1016/j.prp.2019.03.003.
334. Kleer, C.G.; Cao, Q.; Varambally, S.; Shen, R.; Ota, I.; Tomlins, S.A.; Ghosh, D.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; Hayes, D.F.; et al. EZH2 Is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 11606–11611, doi:10.1073/pnas.1933744100.
335. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629, doi:10.1038/nature01075.
336. Fan, D.-C.; Zhao, Y.-R.; Qi, H.; Hou, J.-X.; Zhang, T.-H. MiRNA-506 Presents Multiple Tumor Suppressor Activities by Targeting EZH2 in Nasopharyngeal Carcinoma. *Auris Nasus Larynx* **2020**, *47*, 632–642, doi:10.1016/j.anl.2019.12.007.
337. Xia, L.; Zhu, X.; Zhang, L.; Xu, Y.; Chen, G.; Luo, J. EZH2 Enhances Expression of CCL5 to Promote Recruitment of Macrophages and Invasion in Lung Cancer. *Biotechnol Appl Biochem* **2020**, *67*, 1011–1019, doi:10.1002/bab.1875.
338. Pawlyn, C.; Bright, M.D.; Buros, A.F.; Stein, C.K.; Walters, Z.; Aronson, L.I.; Mirabella, F.; Jones, J.R.; Kaiser, M.F.; Walker, B.A.; et al. Overexpression of EZH2 in Multiple Myeloma Is Associated with Poor Prognosis and Dysregulation of Cell Cycle Control. *Blood Cancer Journal* **2017**, *7*, e549–e549, doi:10.1038/bcj.2017.27.
339. Goldsmith, S.R.; Fiala, M.A.; O'Neal, J.; Souroullas, G.P.; Toama, W.; Vij, R.; Schroeder, M.A. EZH2 Overexpression in Multiple Myeloma: Prognostic Value, Correlation With Clinical Characteristics, and Possible Mechanisms. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **2019**, *19*, 744–750, doi:10.1016/j.clml.2019.08.010.
340. Croonquist, P.A.; Van Ness, B. The Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is an Oncogene That Influences Myeloma Cell Growth and the Mutant Ras Phenotype. *Oncogene* **2005**, *24*, 6269–6280, doi:10.1038/sj.onc.1208771.
341. Viré, E.; Brenner, C.; Deplus, R.; Blanchon, L.; Fraga, M.; Didelot, C.; Morey, L.; Van Eynde, A.; Bernard, D.; Vanderwinden, J.-M.; et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Directly Controls DNA Methylation. *Nature* **2006**, *439*, 871–874, doi:10.1038/nature04431.
342. Kuzmichev, A.; Nishioka, K.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Reinberg, D. Histone Methyltransferase Activity Associated with a Human Multiprotein Complex Containing

- the Enhancer of Zeste Protein. *Genes Dev* **2002**, *16*, 2893–2905, doi:10.1101/gad.1035902.
343. Shi, B.; Liang, J.; Yang, X.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Wu, H.; Sun, L.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Li, R.; et al. Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 5105–5119, doi:10.1128/MCB.00162-07.
 344. Lee, S.T.; Li, Z.; Wu, Z.; Aau, M.; Guan, P.; Karuturi, R.K.M.; Liou, Y.C.; Yu, Q. Context-Specific Regulation of NF- κ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Molecular Cell* **2011**, *43*, 798–810, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.011.
 345. Xu, K.; Wu, Z.J.; Groner, A.C.; He, H.H.; Cai, C.; Lis, R.T.; Wu, X.; Stack, E.C.; Loda, M.; Liu, T.; et al. EZH2 Oncogenic Activity in Castration Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science* **2012**, *338*, 1465–1469, doi:10.1126/science.1227604.
 346. Yan, J.; Ng, S.-B.; Tay, J.L.-S.; Lin, B.; Koh, T.L.; Tan, J.; Selvarajan, V.; Liu, S.-C.; Bi, C.; Wang, S.; et al. EZH2 Overexpression in Natural Killer/T-Cell Lymphoma Confers Growth Advantage Independently of Histone Methyltransferase Activity. *Blood* **2013**, *121*, 4512–4520, doi:10.1182/blood-2012-08-450494.
 347. Geng, C.; Kaochar, S.; Li, M.; Rajapakshe, K.; Fiskus, W.; Dong, J.; Foley, C.; Dong, B.; Zhang, L.; Kwon, O.-J.; et al. SPOP Regulates Prostate Epithelial Cell Proliferation and Promotes Ubiquitination and Turnover of CMYC Oncoprotein. *Oncogene* **2017**, *36*, 4767–4777, doi:10.1038/onc.2017.80.
 348. Berglund, L.; Björling, E.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Asplund, A.; Szgyarto, C.A.-K.; Persson, A.; Ottosson, J.; Wernérus, H.; Nilsson, P.; et al. A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics* **2008**, *7*, 2019–2027, doi:10.1074/mcp.R800013-MCP200.
 349. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
 350. Doench, J.G.; Fusi, N.; Sullender, M.; Hegde, M.; Vaimberg, E.W.; Donovan, K.F.; Smith, I.; Tothova, Z.; Wilen, C.; Orchard, R.; et al. Optimized SgRNA Design to Maximize Activity and Minimize Off-Target Effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 184–191, doi:10.1038/nbt.3437.
 351. Doench, J.G.; Hartenian, E.; Graham, D.B.; Tothova, Z.; Hegde, M.; Smith, I.; Sullender, M.; Ebert, B.L.; Xavier, R.J.; Root, D.E. Rational Design of Highly Active SgRNAs for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Inactivation. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 1262–1267, doi:10.1038/nbt.3026.
 352. Hsu, P.D.; Scott, D.A.; Weinstein, J.A.; Ran, F.A.; Konermann, S.; Agarwala, V.; Li, Y.; Fine, E.J.; Wu, X.; Shalem, O.; et al. DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases. *Nat Biotechnol* **2013**, *31*, 827–832, doi:10.1038/nbt.2647.
 353. Howe, K.L.; Achuthan, P.; Allen, J.; Allen, J.; Alvarez-Jarreta, J.; Amode, M.R.; Armean, I.M.; Azov, A.G.; Bennett, R.; Bhai, J.; et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, D884–D891, doi:10.1093/nar/gkaa942.
 354. Kent, W.J.; Sugnet, C.W.; Furey, T.S.; Roskin, K.M.; Pringle, T.H.; Zahler, A.M.; Haussler, and D. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* **2002**, *12*, 996–1006, doi:10.1101/gr.229102.
 355. Brinkman, E.K.; Chen, T.; Amendola, M.; van Steensel, B. Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, e168–e168, doi:10.1093/nar/gku936.
 356. Takahashi, M.; Fujita, M.; Furukawa, Y.; Hamamoto, R.; Shimokawa, T.; Miwa, N.; Ogawa, M.; Nakamura, Y. Isolation of a Novel Human Gene, APCDD1, as a Direct Target of the β -Catenin/T-Cell Factor 4 Complex with Probable Involvement in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Res* **2002**, *62*, 5651–5656.
 357. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING V11: Protein–Protein Association

- Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47*, D607–D613, doi:10.1093/nar/gky1131.
358. Moreau, P.; Zamagni, E.; Mateos, M.-V. Treatment of Patients with Multiple Myeloma Progressing on Frontline-Therapy with Lenalidomide. *Blood Cancer J.* **2019**, *9*, 1–8, doi:10.1038/s41408-019-0200-1.
 359. Leleu, X.; Attal, M.; Arnulf, B.; Moreau, P.; Traulle, C.; Marit, G.; Mathiot, C.; Petillon, M.O.; Macro, M.; Roussel, M.; et al. Pomalidomide plus Low-Dose Dexamethasone Is Active and Well Tolerated in Bortezomib and Lenalidomide–Refractory Multiple Myeloma: Intergroupe Francophone Du Myélome 2009-02. *Blood* **2013**, *121*, 1968–1975, doi:10.1182/blood-2012-09-452375.
 360. Richardson, P.G.; Siegel, D.S.; Vij, R.; Hofmeister, C.C.; Baz, R.; Jagannath, S.; Chen, C.; Lonial, S.; Jakubowiak, A.; Bahlis, N.; et al. Pomalidomide Alone or in Combination with Low-Dose Dexamethasone in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A Randomized Phase 2 Study. *Blood* **2014**, *123*, 1826–1832, doi:10.1182/blood-2013-11-538835.
 361. Mushtaq, A.; Iftikhar, A.; Hassan, H.; Lakhani, M.; Sagar, F.N.U.; Kamal, A.; Zahid, U.; Ali, Z.; Razaq, F.; Zar, M.A.; et al. Pomalidomide-Based Regimens for Treatment of Relapsed and Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Systematic Review and Meta-Analysis of Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **2019**, *19*, 447–461, doi:10.1016/j.clml.2019.04.003.
 362. Weisel, K.; Dimopoulos, M.; Song, K.W.; Moreau, P.; Palumbo, A.; Belch, A.; Schey, S.; Sonneveld, P.; Sternas, L.; Yu, X.; et al. Pomalidomide and Low-Dose Dexamethasone Improves Health-Related Quality of Life and Prolongs Time to Worsening in Relapsed/Refractory Patients With Multiple Myeloma Enrolled in the MM-003 Randomized Phase III Trial. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **2015**, *15*, 519–530, doi:10.1016/j.clml.2015.05.007.
 363. Shaffer, A.L.; Emre, N.C.T.; Lamy, L.; Ngo, V.N.; Wright, G.; Xiao, W.; Powell, J.; Dave, S.; Yu, X.; Zhao, H.; et al. IRF4 Addiction in Multiple Myeloma. *Nature* **2008**, *454*, 226–231, doi:10.1038/nature07064.
 364. Bjorklund, C.C.; Lu, L.; Kang, J.; Hagner, P.R.; Havens, C.G.; Amatangelo, M.; Wang, M.; Ren, Y.; Couto, S.; Breider, M.; et al. Rate of CRL4CRBN Substrate Ikaros and Aiolos Degradation Underlies Differential Activity of Lenalidomide and Pomalidomide in Multiple Myeloma Cells by Regulation of C-Myc and IRF4. *Blood Cancer Journal* **2015**, *5*, e354–e354, doi:10.1038/bcj.2015.66.
 365. Costacurta, M.; Vervoort, S.J.; Hogg, S.J.; Martin, B.P.; Johnstone, R.W.; Shortt, J. Whole Genome CRISPR Screening Identifies TOP2B as a Potential Target for IMiD Sensitization in Multiple Myeloma. *1* **2020**, doi:10.3324/haematol.2020.265611.
 366. Manni, S.; Carrino, M.; Manzoni, M.; Ganesin, K.; Nunes, S.C.; Costacurta, M.; Tubi, L.Q.; Macaccaro, P.; Taiana, E.; Cabrelle, A.; et al. Inactivation of CK1 α in Multiple Myeloma Empowers Drug Cytotoxicity by Affecting AKT and β -Catenin Survival Signaling Pathways. *Oncotarget* **2017**, *8*, 14604–14619, doi:10.18632/oncotarget.14654.
 367. Hart, T.; Brown, K.R.; Sircoulomb, F.; Rottapel, R.; Moffat, J. Measuring Error Rates in Genomic Perturbation Screens: Gold Standards for Human Functional Genomics. *Mol Syst Biol* **2014**, *10*, 733, doi:10.15252/msb.20145216.
 368. Li, W.; Köster, J.; Xu, H.; Chen, C.-H.; Xiao, T.; Liu, J.S.; Brown, M.; Liu, X.S. Quality Control, Modeling, and Visualization of CRISPR Screens with MAGeCK-VISPR. *Genome Biology* **2015**, *16*, 281, doi:10.1186/s13059-015-0843-6.
 369. Ocio, E.M.; Dávila, J.; Caballero, J.-C.; Alonso, S.; de la Calle, V.G.; García-Sanz, R.; Gazi, L.; Opio, S.; Jiménez, M.; San-Miguel, J.F.; et al. Evidence of Long-Term Disease Control with Panobinostat Maintenance in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Haematologica* **2015**, *100*, e289–e291, doi:10.3324/haematol.2015.124164.

370. Ocio, E.M.; Vilanova, D.; Atadja, P.; Maiso, P.; Crusoe, E.; Fernández-Lázaro, D.; Garayoa, M.; San-Segundo, L.; Hernández-Iglesias, T.; de Álava, E.; et al. In Vitro and in Vivo Rationale for the Triple Combination of Panobinostat (LBH589) and Dexamethasone with Either Bortezomib or Lenalidomide in Multiple Myeloma. *Haematologica* **2010**, *95*, 794–803, doi:10.3324/haematol.2009.015495.
371. Laubach, J.P.; Moreau, P.; San-Miguel, J.F.; Richardson, P.G. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 4767–4773, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0530.
372. Vogl, D.T.; Raje, N.; Jagannath, S.; Richardson, P.; Hari, P.; Orlowski, R.; Supko, J.G.; Tamang, D.; Yang, M.; Jones, S.S.; et al. Ricolinostat, the First Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor, in Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **2017**, *23*, 3307–3315, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2526.
373. Kumar, S.K. Recycling Therapies for Myeloma: The Need for Prospective Trials. *Cancer* **2019**, *125*, 2920–2922, doi:10.1002/cncr.32177.
374. Anderson, K.C. Progress and Paradigms in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 5419–5427, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0625.
375. Gottesman, M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627, doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103929.
376. Sonneveld, P. Multidrug Resistance in Haematological Malignancies. *Journal of Internal Medicine* **2000**, *247*, 521–534, doi:10.1046/j.1365-2796.2000.00689.x.
377. Lawrence, M.S.; Stojanov, P.; Polak, P.; Kryukov, G.V.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Carter, S.L.; Stewart, C.; Mermel, C.H.; Roberts, S.A.; et al. Mutational Heterogeneity in Cancer and the Search for New Cancer Genes. *Nature* **2013**, *499*, 214–218, doi:10.1038/nature12213.
378. Weinhold, N.; Ashby, C.; Rasche, L.; Chavan, S.S.; Stein, C.; Stephens, O.W.; Tytarenko, R.; Bauer, M.A.; Meissner, T.; Deshpande, S.; et al. Clonal Selection and Double-Hit Events Involving Tumor Suppressor Genes Underlie Relapse in Myeloma. *Blood* **2016**, *128*, 1735–1744, doi:10.1182/blood-2016-06-723007.
379. Mikulasova, A.; Wardell, C.P.; Murison, A.; Boyle, E.M.; Jackson, G.H.; Smetana, J.; Kufova, Z.; Pour, L.; Sandecka, V.; Almasi, M.; et al. The Spectrum of Somatic Mutations in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Indicates a Less Complex Genomic Landscape than That in Multiple Myeloma. *Haematologica* **2017**, *102*, 1617–1625, doi:10.3324/haematol.2017.163766.
380. Kortüm, K.; Langer, C.; Monge, J.; Bruins, L.; Zhu, Y.; Shi, C.; Jedlowski, P.; Egan, J.; Ojha, J.; Bullinger, L.; et al. Longitudinal Analysis of 25 Sequential Sample-Pairs Using a Custom Multiple Myeloma Mutation Sequencing Panel (M3P). *Ann Hematol* **2015**, *94*, 1205–1211, doi:10.1007/s00277-015-2344-9.
381. Jones, J.R.; Weinhold, N.; Ashby, C.; Walker, B.A.; Wardell, C.; Pawlyn, C.; Rasche, L.; Melchor, L.; Cairns, D.A.; Gregory, W.M.; et al. Clonal Evolution in Myeloma: The Impact of Maintenance Lenalidomide and Depth of Response on the Genetics and Sub-Clonal Structure of Relapsed Disease in Uniformly Treated Newly Diagnosed Patients. *1* **2019**, *104*, 1440–1450, doi:10.3324/haematol.2018.202200.
382. Richardson, P.G.; San Miguel, J.F.; Moreau, P.; Hajek, R.; Dimopoulos, M.A.; Laubach, J.P.; Palumbo, A.; Luptakova, K.; Romanus, D.; Skacel, T.; et al. Interpreting Clinical Trial Data in Multiple Myeloma: Translating Findings to the Real-World Setting. *Blood Cancer Journal* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41408-018-0141-0.
383. Jones, J.R.; Barber, A.; Le Bihan, Y.-V.; Weinhold, N.; Ashby, C.; Walker, B.A.; Wardell, C.P.; Wang, H.; Kaiser, M.F.; Jackson, G.H.; et al. Mutations in CRBN and Other Cereblon Pathway Genes Are Infrequently Associated with Acquired Resistance to Immunomodulatory Drugs. *Leukemia* **2021**, 1–4, doi:10.1038/s41375-021-01373-4.

384. Liu, J.; Hideshima, T.; Xing, L.; Wang, S.; Zhou, W.; Samur, M.K.; Sewastianik, T.; Ogiya, D.; An, G.; Gao, S.; et al. ERK Signaling Mediates Resistance to Immunomodulatory Drugs in the Bone Marrow Microenvironment. *Sci Adv* **2021**, *7*, doi:10.1126/sciadv.abg2697.
385. Bjorklund, C.C.; Ma, W.; Wang, Z.-Q.; Davis, R.E.; Kuhn, D.J.; Kornblau, S.M.; Wang, M.; Shah, J.J.; Orłowski, R.Z. Evidence of a Role for Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Resistance of Plasma Cells to Lenalidomide. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 11009–11020, doi:10.1074/jbc.M110.180208.
386. Haertle, L.; Barrio, S.; Munawar, U.; Han, S.; Zhou, X.; Vogt, C.; Alonso, R.; Bittrich, M.; Ruiz-Heredia, Y.; Da-Via, M.; et al. Cereblon Enhancer Methylation and IMiD Resistance in Multiple Myeloma. *Blood* **2021**, doi:10.1182/blood.2020010452.
387. Dimopoulos, K.; Munch-Petersen, H.F.; Eskelund, C.W.; Sjö, L.D.; Ralfkiaer, E.; Gimsing, P.; Grønbaek, K. Expression of CRBN, IKZF1, and IKZF3 Does Not Predict Lenalidomide Sensitivity and Mutations in the Cereblon Pathway Are Infrequent in Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **2019**, *60*, 180–188, doi:10.1080/10428194.2018.1466290.
388. Heintel, D.; Rocci, A.; Ludwig, H.; Bolomsky, A.; Caltagirone, S.; Schreder, M.; Pfeifer, S.; Gisslinger, H.; Zojer, N.; Jäger, U.; et al. High Expression of Cereblon (CRBN) Is Associated with Improved Clinical Response in Patients with Multiple Myeloma Treated with Lenalidomide and Dexamethasone. *British Journal of Haematology* **2013**, *161*, 695–700, doi:10.1111/bjh.12338.