

Universidad CEU Cardenal Herrera
CEINDO - CEU Escuela Internacional de Doctorado
Programa en Ciencia y Tecnología de la Salud



Estudio de la función de Rnd3 en el mieloma múltiple

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Josep Escrivà Fernández

Dirigida por:
Dr. Enric Poch Jiménez
Dra. Begoña Ballester Lurbe

VALÈNCIA
2022

Enric Poch Jiménez, Profesor titular del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera; y **Begoña Ballester Lurbe**, Profesora adjunta del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

INFORMAN: que el trabajo titulado “Estudio de la función de Rnd3 en el mieloma múltiple” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera por **Josep Escrivà Fernández**, Graduado en Bioquímica y Ciencias Biomédicas.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que el interesado pueda optar al título de Doctor por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

València, 25 de marzo de 2022

Dr. Enric Poch Jiménez

Dra. Begoña Ballester Lurbe

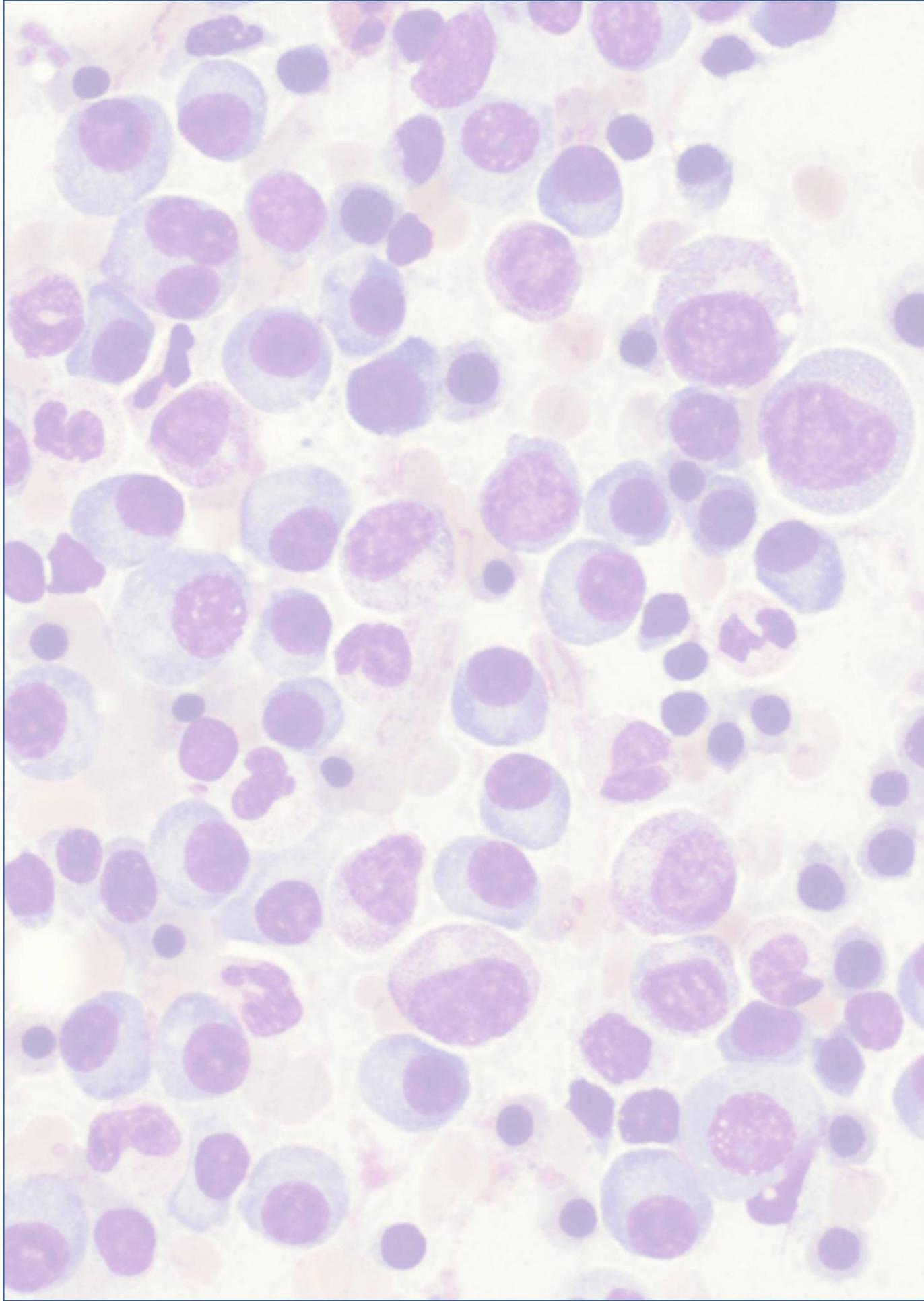
Este trabajo ha sido realizado con financiación de los Proyectos *Puente CEU-Banco Santander* y el Proyecto Precompetitivo CEU- FUSP-PPC-19-28A751CC, y gracias a un contrato predoctoral FPI-CEU de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

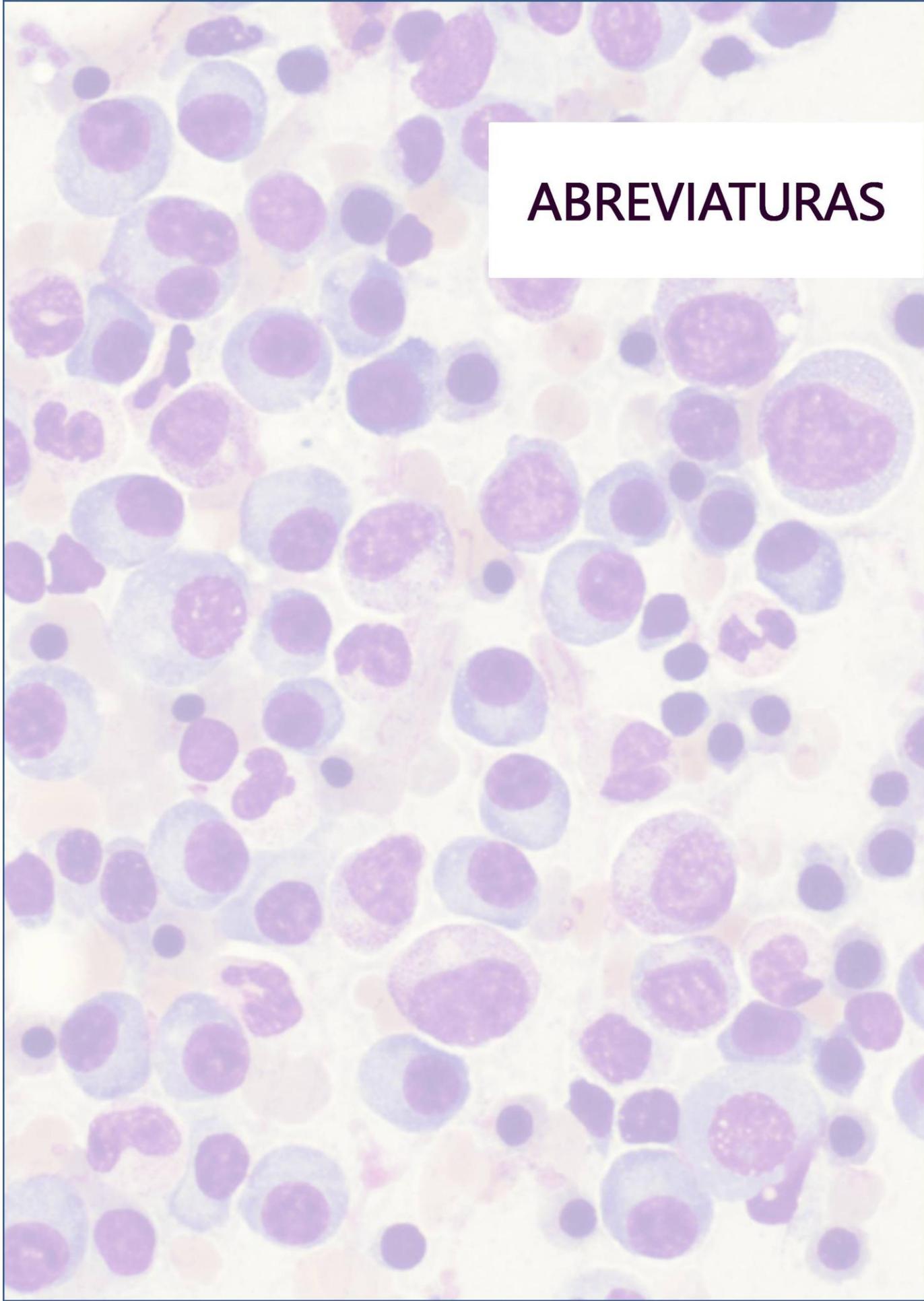
ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Mieloma múltiple	25
1.1. Etiología del MM.....	27
1.2. Alteraciones cromosómicas en MM: eventos citogenéticos primarios.....	27
1.3. Eventos citogenéticos secundarios.....	29
1.4. Microambiente de la médula ósea	31
1.4.1. Microambiente tumoral de la médula ósea en MM.....	32
1.5. Tratamiento del MM	36
2. Familia de proteínas Rho	38
2.1. Función biológica de las proteínas Rho	40
2.2. Proteínas Rho y cáncer	42
2.2.1. Proteínas Rho y mieloma múltiple.....	43
3. Proteínas Rnd	44
4. Rnd3.....	46
4.1. Funciones celulares de Rnd3	47
4.2. Rnd3 y cáncer	50
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57

MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Cultivos celulares.....	63
2. Obtención de las líneas celulares RPMI 8226 y JLN3 deficientes en Rnd3	64
2.1. Clonaje de los sgRNA en el plásmido lentiviral pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-Puro.....	64
2.2. Transfección, producción y concentración de partículas lentivirales	67
2.3. Transducción de las células RPMI 8226 y JLN3 para el silenciamiento de Rnd3.....	69
3. Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y qPCR	69
4. Extracción e inmunodetección de proteínas.	71
5. Ensayos <i>in vitro</i>	74
5.1. Proliferación celular.....	74
5.2. Análisis del ciclo celular	75
5.3. Ensayos de adhesión celular.....	75
5.4. Ensayos de sensibilidad a fármacos.....	76
5.5. Ensayos de privación nutricional.....	77
6. Estudio y análisis del transcriptoma mediante la secuenciación de RNA (RNAseq)	77
7. Cuantificación de CXCL10 en el medio celular mediante un kit de ELISA	79
8. Análisis estadístico	80

RESULTADOS	83
1. Análisis de la expresión de Rnd3 en líneas celulares de MM	85
2. Obtención y validación de las líneas celulares de MM deficientes en Rnd3	85
3. Rnd3 no altera la proliferación ni la progresión del ciclo celular en las líneas de MM	88
4. La ausencia de Rnd3 no afecta a la capacidad de adhesión de las células de MM	90
5. La sensibilidad a fármacos no se ve alterada en las células de MM en ausencia de Rnd3	91
6. La ausencia de Rnd3 no altera la supervivencia de las células tras la deprivación de nutrientes	93
7. Análisis del transcriptoma de las células de MM deficientes en Rnd3	94
8. La ausencia de Rnd3 produce un incremento de la expresión de CXCL10 en las células de MM	100
DISCUSIÓN	105
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127





ABREVIATURAS

A **ASCT:** trasplante autólogo de células madre

B **BMPC:** células plasmáticas de la médula ósea
BSA: albúmina sérica bovina

C **CAM-DR:** resistencia a fármacos mediada por adhesión celular
CB: centroblasto
CC: centrocito
CRISPRi: CRISPR *interference*

D **DLBCL:** linfoma difuso de células B grandes
dCas9: *dead* Cas9 (Cas9 sin actividad endonucleasa)
DMBA/TPA: 7,12-dimetilbenzantraceno/12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

E **EMM:** mieloma múltiple extracelular

F **FBS:** suero bovino fetal
FL: linfoma folicular
FN: fibronectina

G **GAP:** *GTPase activation protein*
GDI: *Rho GDP dissociation inhibitor*
GDP: guanosín difosfato
GEF: *guanine nucleotide exchange factor*
GEPIA2: *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2*
GO: *Gene Ontology*
GTP: guanosín trifosfato
GTPasa: guanosina trifosfatasa

Abreviaturas

H

HBSS: *Hank's balanced salt solution*

HDAC: histona deacetilasa

I

IMDM: *Iscove's modified Dulbecco's medium*

IMiDs: *immunomodulatory drugs* (fármacos inmunomoduladores)

IPs: inhibidores del proteasoma

K

KD: *knock-down*

KO: *knock-out*

KRAB: *Krüppel associated box*

M

mAbs: anticuerpos monoclonales

MEM: célula B de memoria

MGUS: gammapatía monoclonal de significado incierto

MLC: cadena ligera de miosina

MM: mieloma múltiple

N

NB: célula B primitiva

NK: *natural killer*

P

PBS: tampón fosfato salino

PCL: leucemia de células plasmáticas

P/S: penicilina/estreptomicina

R

Rho: homólogas a Ras

RNAseq: secuenciación de RNA

RPMI 1640: *Roswell's Park Memorial Institute 1640 medium*

S

SEM: error estándar de la media

sgRNA: RNA guía

SMM: *smoldering multiple mieloma* (mieloma múltiple latente)

T

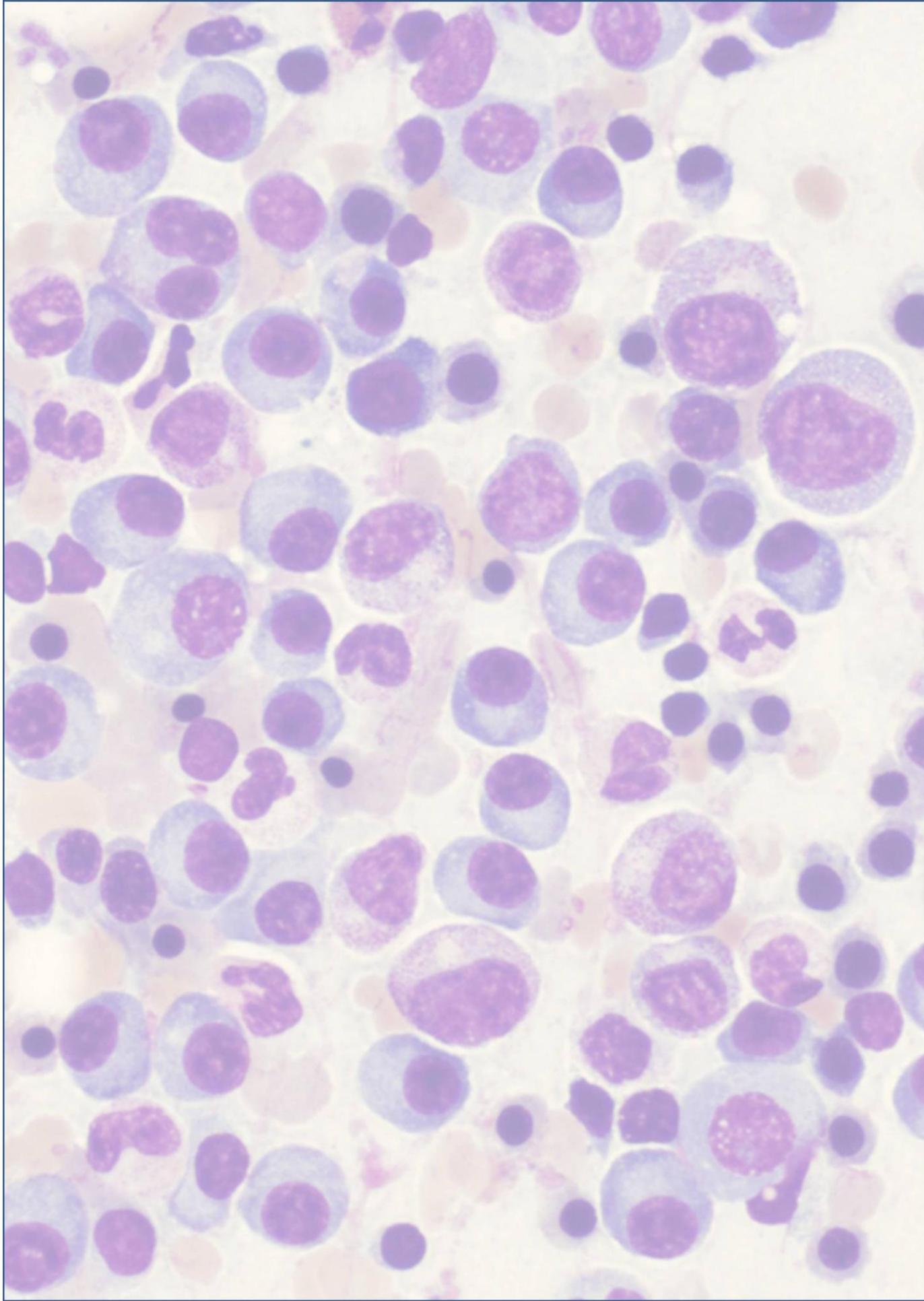
TBS: tampón tris salino

TBS-T: TBS con 0,05% tween 20

TPC: células plasmáticas de las amígdalas

W

WT: *wild type*





RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica muy común, caracterizada por la proliferación excesiva de células plasmáticas diferenciadas a partir de linfocitos B en el interior de la médula ósea. Esta enfermedad presenta diferentes etapas en las que evoluciona desde periodos tempranos asintomáticos hasta la manifestación de síntomas clínicos típicos del MM.

A pesar de que actualmente existen diversos tratamientos para el MM, es frecuente la aparición de recaídas, siendo la tasa relativa de supervivencia a 5 años es del 50%. Esto implica que, a pesar de los avances científicos de los últimos años, la enfermedad sigue considerándose incurable, por lo que es necesario conocer con mayor profundidad los mecanismos celulares que intervienen tanto en el desarrollo de la enfermedad como en la aparición de resistencias al tratamiento.

El objetivo de este trabajo es estudiar el papel de Rnd3 en el MM. Rnd3 es una proteína Rho atípica incluida dentro de la subfamilia Rnd. Las proteínas Rho están clásicamente implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina y han sido ampliamente relacionadas con procesos de transformación celular, destacando su implicación en la proliferación y la migración de las células tumorales. En el caso concreto de Rnd3 también existen evidencias que la relacionan con la progresión tumoral, aunque su función oncogénica u oncosupresora es dependiente del tipo celular y tumoral.

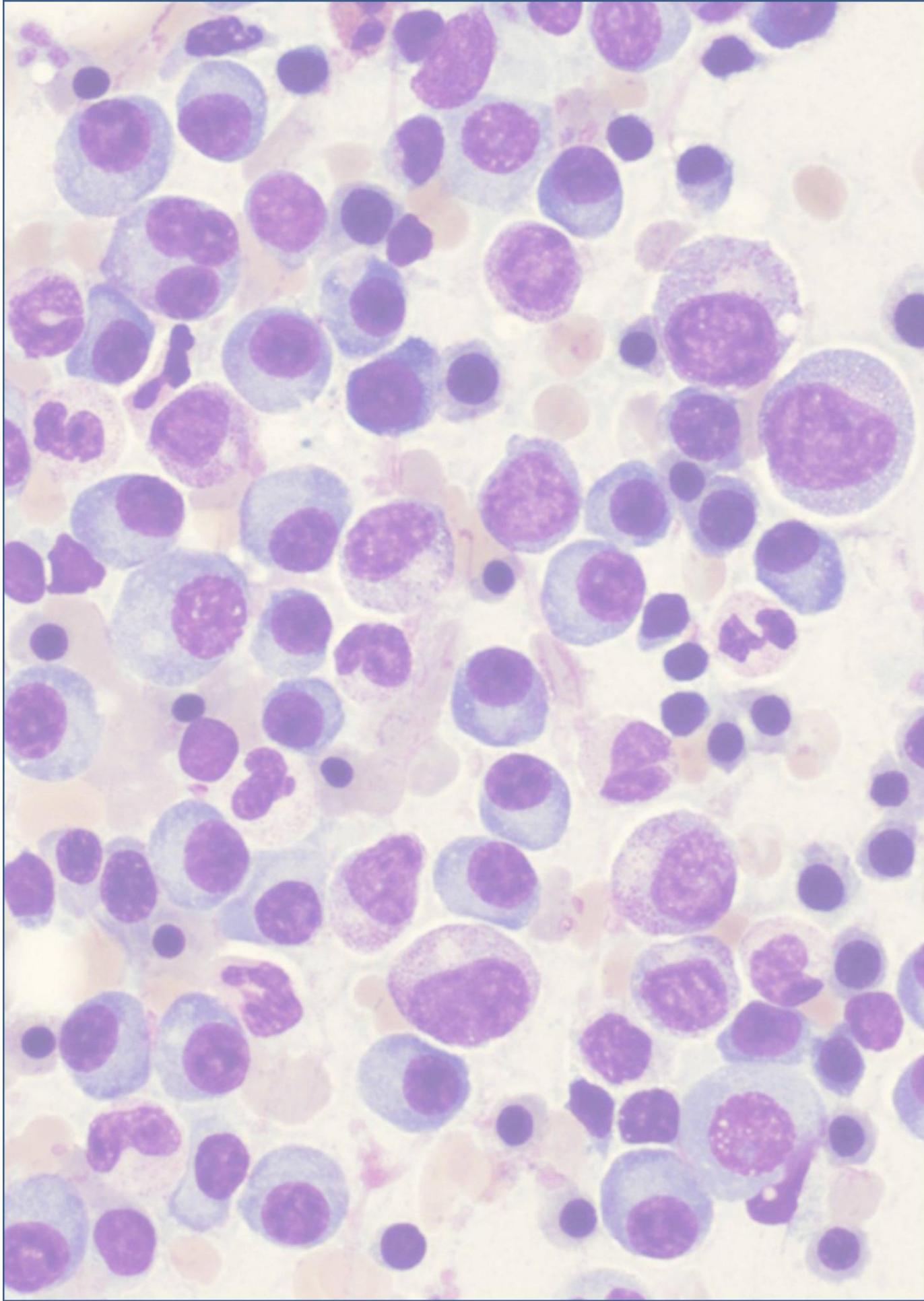
Datos previos indican un incremento de la expresión de *RND3* en muestras de MM procedentes de modelos murinos que mimetizan la enfermedad humana, así como también en células plasmáticas procedentes de pacientes con MM respecto a células plasmáticas sanas.

Resumen

Para profundizar en el papel de Rnd3 en el MM hemos generado dos líneas celulares de MM (RPMI 8226 y JIN3) deficientes en Rnd3, y hemos analizado su efecto en los procesos de proliferación, adhesión celular y sensibilidad a fármacos.

Por otro lado, hemos realizado un estudio transcriptómico para determinar el papel de Rnd3 en la regulación de la expresión de genes implicados en MM. Como resultado destaca la expresión diferencial del gen que codifica para una quimiocina, CXCL10, que se encuentra implicada en la migración de las células del sistema inmunitario y que recientemente se ha relacionado con fenómenos de inmunoterapia e inmunovigilancia en diferentes tumores. Finalmente, hemos validado estos resultados en células deficientes en Rnd3 observando un incremento en la expresión de esta quimiocina, tanto a nivel de mRNA como de expresión proteica. Así pues, estos resultados indican un papel inhibitorio de Rnd3 sobre la expresión de CXCL10. Sin embargo, esto no tiene un efecto sobre las propias células tumorales, sugiriendo un papel paracrino de CXCL10 sobre el microambiente tumoral y sobre el sistema inmunitario.

En conjunto, este trabajo sugiere un nuevo papel de Rnd3 en la regulación de la expresión de CXCL10 y su posible papel en la patología del MM.





INTRODUCCIÓN

1. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación excesiva de células plasmáticas diferenciadas a partir de linfocitos B en el interior de la médula ósea. Estas células plasmáticas anormales se caracterizan por la producción y secreción de inmunoglobulinas monoclonales, además de otras citoquinas que, en última instancia, provocan las manifestaciones clínicas de la enfermedad: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas [1].

Actualmente el MM es la segunda neoplasia hematológica más común, por detrás del linfoma de no Hodgkin [1]. Suele afectar a personas mayores de 60 años y, según datos extraídos de la página web de la Sociedad Americana del Cáncer, la tasa relativa de supervivencia a 5 años es del 50%. Esto implica que, a pesar de los avances científicos de los últimos años, la enfermedad sigue considerándose incurable debido a las recaídas después del tratamiento [2].

En cuanto a la evolución del MM, existen etapas previas a la enfermedad sin manifestaciones clínicas como la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), que se caracteriza por la baja presencia de células plasmáticas tumorales en la médula ósea, aunque ya con producción de inmunoglobulinas (**figura 1**). Cuando estas células plasmáticas superan el 10% del número de células presente en la médula ósea, pero con ausencia de manifestaciones clínicas, la enfermedad se conoce como mieloma múltiple latente (*Smoldering Multiple Myeloma*, SMM), y se corresponde con una etapa intermedia entre MGUS y MM [3, 4]. El SMM acaba progresando hacia la enfermedad sintomática conocida como MM. Finalmente, las células plasmáticas pueden adquirir

Introducción

la capacidad de proliferar fuera de la médula ósea y desarrollar enfermedades extramedulares como el mieloma múltiple extramedular (EMM) o la leucemia de células plasmáticas (PCL) (**figura 1**) [3, 4].

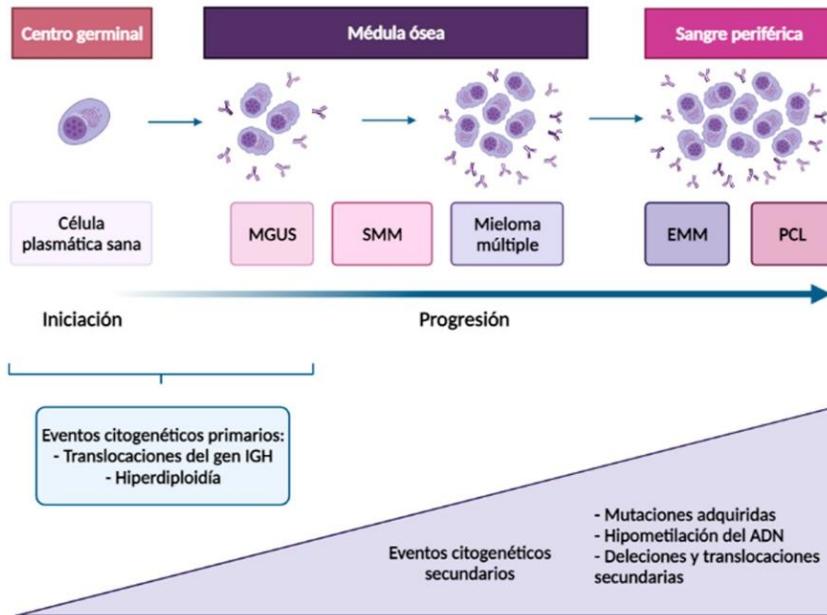


Figura 1. Progresión del mieloma múltiple. El desarrollo de la enfermedad empieza con las células plasmáticas sanas que se encuentran en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios. En esa localización empiezan a sufrir los primeros eventos primarios (translocaciones e hiperdiploidías). Una vez llegan a la médula ósea, durante la fase asintomática MGUS, los eventos primarios se mantienen, así como la producción de inmunoglobulinas. Esta fase progresa hasta la fase de MM pasando por un estadio intermedio de SMM también asintomático. Durante esta progresión ocurren los eventos secundarios (mutaciones, hipometilación del ADN, deleciones, etc.) Cuando las células plasmáticas adquieren la capacidad de proliferar fuera de la médula ósea desencadenan EMM y PCL.

1.1. Etiología del MM

Las células plasmáticas son el último estadio de diferenciación de los linfocitos B que se encargan de optimizar la inmunidad humoral mediante la producción de anticuerpos. Para que esto ocurra es necesario que las células B expresen un receptor funcional codificado en los genes de las inmunoglobulinas. Estos genes sufren fenómenos de reorganización somática del DNA entre los que se incluyen procesos de recombinación V(D)J, hipermutación somática y recombinación de cambio de clase, que les permiten generar anticuerpos diferentes y de alta afinidad hacia antígenos determinados [3]. Estos procesos son realizados gracias a la expresión de la deaminasa de citidina inducida por activación, que introduce cortes de doble cadena en el DNA de los genes de las inmunoglobulinas (generalmente el gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas o *IGH*, situado en el cromosoma 14) [4]. Mientras la maquinaria funciona correctamente, no se produce ninguna alteración, pero es posible que la acción de esta enzima genere alteraciones cromosómicas, como translocaciones, que pongan algún oncogén bajo la acción de un potenciador de la expresión del gen *IGH*. Esto puede alterar la expresión de los oncogenes y facilitar la supervivencia de las células plasmáticas, que se establecerán como inmortalizadas y aberrantes en la médula ósea [1, 3].

1.2. Alteraciones cromosómicas en MM: eventos citogenéticos primarios

No hay un evento concreto en la biología de las células plasmáticas que determine la progresión de MGUS o SMM a MM, pero sí que hay evidencias que demuestran que determinadas alteraciones cromosómicas facilitan esta transición [1, 3]. Estas alteraciones se

Introducción

conocen como eventos citogenéticos primarios y ocurren en las etapas tempranas de la enfermedad [1]. Los eventos citogenéticos primarios más frecuentes se pueden englobar en dos grupos diferenciados: a) las translocaciones que implican al gen *IGH*, localizado en el cromosoma 14 y, b) las hiperdiploidías ocurridas en los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19 [5].

En cuanto a las translocaciones del cromosoma 14, suelen afectar a la expresión y función de la familia de ciclinas D (ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3) ya sea de forma directa o indirecta (**tabla 1**). De este modo, las translocaciones producen una alteración del ciclo celular a nivel de la entrada en fase G1/S, facilitando la proliferación celular de las células plasmáticas [4, 6].

Tabla 1. Translocaciones primarias más frecuentes del cromosoma 14 en MM.

Translocación	Gen implicado
t(4;14)	FGFR3 y MMSET
t(6;14)	CCDN3
t(11;14)	CCDN1
t(14;16)	MAF
t(14;20)	MAFB

El mecanismo exacto por el cual las hiperdiploidías afectan a la transformación de las células plasmáticas todavía no está del todo descrito. La trisomía del cromosoma 11 es de las más recurrentes en los pacientes con MM, produciendo la sobreexpresión de la ciclina D1 [5] y una desregulación de MYC en los pacientes [7].

Aun así, a pesar de que estas alteraciones primarias se encuentran presentes en la etapa temprana de la enfermedad, no son suficientes para desencadenar la progresión del MM. Para ello, son necesarios otros eventos genéticos, conocidos como eventos secundarios, que se van adquiriendo de forma progresiva y que facilitan la transformación final de las células plasmáticas [1].

1.3. Eventos citogenéticos secundarios

A medida que la enfermedad avanza, las células plasmáticas sufren una serie de eventos citogenéticos secundarios que permiten la progresión de la enfermedad. Entre ellos, los más frecuentes son las mutaciones adquiridas en determinados oncogenes, generalmente de la ruta MAPK/ERK (50%), como *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGR1* y *FGFR3* [8]. También es recurrente la adquisición de mutaciones en otros genes implicados en la reparación del DNA (15%), como *TP53*, *ATR*, *ATM* y *ZFX4* [9]; así como mutaciones en múltiples conjuntos de genes relacionados con la vía no canónica de NF- κ B como *TRAF3*, *NFKBIA*, *BIR2/3* y *CYLD*, lo cual lleva asociada una activación constitutiva de la misma, incrementando la expresión de proteínas antiapoptóticas [10]. Por último, también se han observado mutaciones en la vía de PI3K en pacientes con la translocación de MAF [11], y otras implicadas en la progresión del ciclo celular, en genes como *CCDN1/2/3*, *CDK4/6* y *RB1*[9].

Además de la adquisición de mutaciones, la regulación epigenética también juega un papel relevante. Existen estudios que demuestran que, mientras la hipermetilación del DNA es similar en pacientes con MGUS y MM, los niveles de hipometilación en el DNA de los pacientes con MM son muy superiores al de los pacientes con MGUS [12, 13]. Esta hipometilación generalizada del DNA, puede facilitar la expresión de

Introducción

determinados oncogenes como *MYC* y *CCDN1*, permitiendo la transformación de MGUS a MM [14].

Por último, también es frecuente observar alteraciones cromosómicas secundarias en las células de MM. Entre ellas se encuentran la delección del brazo corto del cromosoma 17, que implica la eliminación del gen supresor de tumores *TP53* y con ello, un incremento de la inestabilidad genómica [15, 16]; y la translocación de *MYC* y *APOBEC* [17].

Cabe destacar que estas alteraciones secundarias no tienen que estar, necesariamente, presentes en todas las células plasmáticas causantes del tumor. Esto sugiere una evolución ramificada de la enfermedad, más próxima a la teoría evolutiva darwiniana que a la teoría lineal clásica usada para explicar la progresión tumoral en tumores sólidos [18]. Así pues, en MM existe una heterogeneidad clonal en la que diferentes clones con diferentes mutaciones adquiridas de forma aleatoria deberán competir para colonizar la médula ósea y garantizar su supervivencia (**figura 2**) [6, 19, 20]. Esta heterogeneidad clonal aumenta de forma drástica la complejidad de la enfermedad ya que cada uno de ellos puede responder de forma diferente al tratamiento e interactuar de forma distinta con el microambiente de la médula ósea [5]. Por tanto, para estudiar la progresión del MM, además de tener en cuenta todos estos factores, también hay que conocer el microambiente de la médula ósea, el cual juega un papel muy relevante en el desarrollo de la enfermedad.

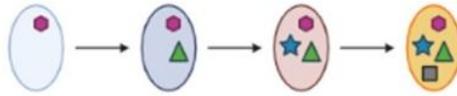
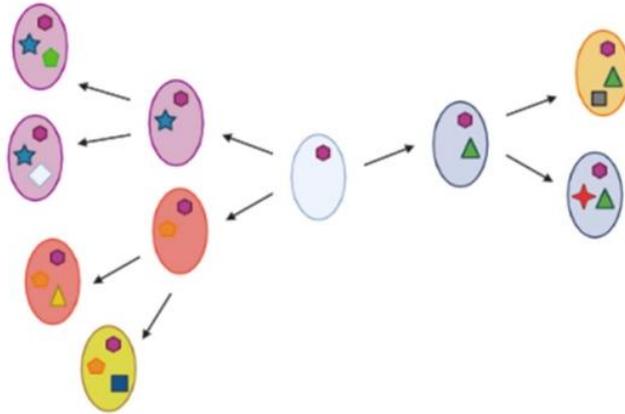
A. Evolución lineal**B. Evolución ramificada**

Figura 2. Modelos de evolución tumoral. **A.** Evolución lineal clásica en el que una célula maligna va adquiriendo mutaciones de forma progresiva. **B.** Evolución ramificada más cercana a la teoría darwiniana en el que la célula tumoral puede dar lugar a diferentes clones que pueden adquirir mutaciones de forma independiente e incrementan la complejidad tumoral. Este es el modelo de progresión que se observa en MM.

1.4. Microambiente de la médula ósea

El microambiente de la médula ósea, en condiciones sanas, es capaz de albergar a las células y moléculas de señalización necesarias para poder regular la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Está compuesto por diferentes tipos celulares, ya sean células hematopoyéticas o no hematopoyéticas, así como también por

componentes celulares necesarios para regular la homeostasis de éstas, tales como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, proteínas de la matriz extracelular, etc. [21].

Entre los diferentes tipos celulares presentes en el microambiente de la médula ósea observamos células endoteliales, que forman los vasos sanguíneos necesarios para la entrada de las células plasmáticas en la médula ósea desde la sangre periférica, y que se conoce como nicho vascular. También encontramos osteoblastos y osteoclastos formando el nicho osteogénico, así como también el estroma de la médula ósea o nicho estromal, formado principalmente por células no hematopoyéticas como las células madre mesenquimales, capaces de dar lugar a otros tipos celulares necesarios para el mantenimiento de las células plasmáticas. Por último, también cabe destacar el microambiente inmunitario, que se refiere a un compartimento funcional formado por células del sistema inmunitario (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, etc.) encargado de la inmunovigilancia en la médula ósea [21].

1.4.1. Microambiente tumoral de la médula ósea en MM

El microambiente tumoral de la médula ósea juega un papel muy importante en la progresión del MM. En condiciones normales, las células plasmáticas circulan por los vasos sanguíneos y necesitan salir de ellos para retenerse en la médula ósea. Lo mismo ocurre con las células de MM y, para ello, juegan un papel relevante el eje CXCL12/CXCR4 y el nicho vascular. Las células endoteliales producen una gran cantidad de quimiocina CXCL12, que al unirse su receptor CXCR4, presente en las células plasmáticas, facilita su extravasación y su retención en la médula ósea [22]. Además, el eje CXCL12/CXCR4 incrementa la expresión de integrinas (entre otras moléculas de adhesión) en la superficie de las

células de MM, que interactúan con las células del nicho estromal, así como con proteínas de la matriz extracelular, facilitando su adhesión y retención en la médula ósea [23, 24].

Una vez en la médula ósea, las células de MM deben competir con las células sanas para poder sobrevivir. Para ello, estas células interactúan con las células mesenquimales del nicho estromal, incrementando la expresión de integrinas y otras moléculas de adhesión. Asimismo, las células estromales también producen CXCL12 e IL-6, responsable de la supervivencia de las células de MM por activación de las rutas JAK-STAT y ERK [24].

Del mismo modo, el nicho osteogénico también juega un papel relevante en la supervivencia de las células de MM. Este nicho está compuesto por osteoblastos y osteoclastos, que se encargan de la formación y reabsorción de hueso respectivamente. En condiciones normales, existe un equilibrio entre ambas poblaciones, pero en MM dicho equilibrio se rompe, ya que las células plasmáticas malignas facilitan la diferenciación a osteoclastos, que a su vez producen IL-6 y osteopontina para promover la supervivencia de las células de MM y la angiogénesis, respectivamente. Este fenómeno es el causante de unos de los síntomas más característicos del MM, como la hipercalcemia y el daño óseo [25, 26].

Por último, las células de MM también interactúan con las células del sistema inmunitario induciendo cambios en la expresión de quimiocinas inflamatorias, que convierten la médula ósea en un ambiente inmunosupresor que facilita la evasión el sistema inmunitario [24]. Por ejemplo, las células de MM son capaces de facilitar la diferenciación de los macrófagos hacia un perfil M2, considerado protumorigénico, ya que induce inmunosupresión a través de IL-10 y

Introducción

angiogénesis mediante la secreción de VEGF [27, 28]. Las células de MM también son capaces de inducir de forma directa inmunosupresión mediante la inactivación de linfocitos NK y linfocitos T citotóxicos, o bien mediante la activación de linfocitos T reguladores [29]. Todo ello en conjunto, induce un estado en el sistema inmunitario conocido como “exhausto” que permite la evasión de éste por la propia acción de las células de MM [24].

En conclusión, el microambiente tumoral de la médula ósea es un factor muy importante a tener en cuenta en la progresión de la enfermedad. Este microambiente facilita el establecimiento de las células de MM en la médula ósea mediante interacciones celulares y secreción de quimiocinas. Pero a su vez, después de establecerse, las células de MM también son capaces de modificar el propio microambiente a través de quimiocinas e interacciones celulares que promueven su supervivencia e incluso resistencias a los diferentes tratamientos [24]. Todo ello, generando un entorno inmunosupresor que permite la evasión de la vigilancia producida por el sistema inmunitario, y que abre nuevas puertas al tratamiento del MM mediante inmunoterapia (**figura 3**) [30].

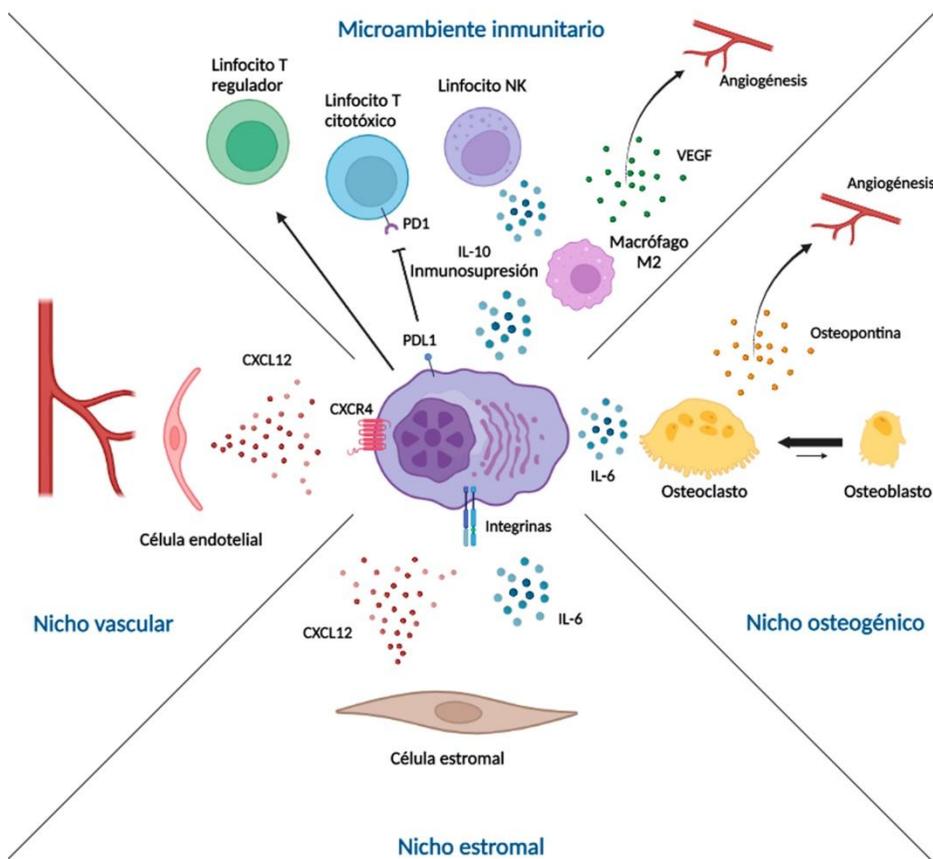


Figura 3. Microambiente tumoral de la médula ósea. El nicho vascular formado por las células endoteliales facilita la infiltración de las células plasmáticas en la médula ósea a través del eje CXCL12/CXCR4. En la médula ósea, el nicho estromal formado por las células mesenquimales y estromales facilita la retención de las células plasmáticas mediante el eje CXCL12/CXCR4 y mediante moléculas de adhesión como las integrinas. Estas células además promueven la supervivencia de las células de MM secretando IL-6, secretada también por los osteoclastos del nicho osteogénico. En él, las células de MM producen un incremento de osteoclastos, que a su vez inducen angiogénesis a través de osteopontina. Por último, las células plasmáticas favorecen un entorno inmunosupresor en la médula ósea a través de secreción de citoquinas e interacciones con las diferentes células del sistema inmunitario.

1.5. Tratamiento del MM

Actualmente, existen distintas estrategias terapéuticas para el tratamiento del MM. De forma clásica, se ha utilizado la administración individual o combinada de fármacos con diferentes mecanismos de acción, como corticosteroides, agentes alquilantes, inhibidores del proteasoma (IPs) e inhibidores de histonas deacetilasas (HDACs). En muchos casos, se suele administrar una combinación de estos fármacos y luego se somete al paciente a un trasplante autólogo de células madre (ASCT) [31].

En cuanto a los diferentes fármacos usados y sus mecanismos de acción, los agentes alquilantes clásicos como el melphalan o la ciclofosfamida actúan sobre las células altamente proliferativas ya que se intercalan en el DNA provocando la muerte celular [31]. Los IPs, como el bortezomib, carfilzomib e ixazomib, actúan sobre el proteasoma, impidiendo la degradación de proteínas pro-apoptóticas y disminuyendo la resistencia a los estímulos apoptóticos [32]. Por otra parte, fármacos como panobinostat y vorinostat son inhibidores de HDACs, por lo que actúan sobre la cromatina de las células plasmáticas tumorales, activando la expresión de genes supresores de tumores e induciendo muerte celular [33].

No obstante, a pesar de que estos fármacos son capaces de reducir el número de células plasmáticas tumorales en la médula ósea, es frecuente la aparición de recaídas, ya sea por la propia evolución clonal del MM o por fenómenos de resistencia adquirida al tratamiento. Una gran parte de ello se debe al microambiente de la médula ósea, que es capaz de inducir fenómenos de resistencia a fármacos mediados por adhesión celular (CAM-DR) y que producen la adhesión de las células de MM al estroma de la médula ósea impidiendo la muerte de éstas por

apoptosis [34]. Además, juega un papel importante el microambiente inmunitario creando un entorno inmunosupresor que permite la supervivencia de las células de MM gracias a la evasión de la inmunovigilancia [35].

Es por ello por lo que se han desarrollado otros fármacos basados en inmunoterapia, como fármacos inmunomoduladores (IMiDs) o anticuerpos monoclonales (mAbs). Por su parte, los IMiDs como talidomida, lenalidomida y pomalidomida, actúan sobre la inflamación en el microambiente de la médula ósea evitando la progresión de las células de MM, reduciendo la expresión de citoquinas como IL-6 e inhibiendo la angiogénesis y las interacciones con las células estromales [36]. Algunos IMiDs también actúan sobre cereblon, una proteína del complejo E3 ubiquitin ligasa, lo que impide la ubiquitinación de proteínas en las células de MM y produce la muerte celular por acumulación de proteínas tóxicas [37]. Por otra parte, los mAbs daratumumab, isatuximab y elotuzumab se unen a antígenos específicos de la superficie de las células de MM induciendo la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos [38].

Actualmente, la inmunoterapia del MM ha evolucionado hacia un panorama dirigido a revertir la inmunosupresión observada en la médula ósea. De este modo, es el propio sistema inmunitario el que se encarga de combatir a las células plasmáticas malignas presentes. Un ejemplo de ello son las nuevas terapias dirigidas a la inhibición de los puntos de control inmunitarios, en las cuales mAbs anti-PD1, anti-TIGIT o anti-CTLA4 son capaces de revertir la inmunosupresión y el fenotipo exhausto de los linfocitos T citotóxicos, incrementando su función e impidiendo la evasión del sistema inmunitario por parte de las células de MM [30].

Por último, existe la posibilidad de utilizar linfocitos T modificados con un receptor de antígenos quimérico, lo cual se conoce como terapia celular CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T cell therapy*). En esta terapia, los linfocitos T del paciente se modifican en el laboratorio para que ataquen a las células tumorales con expresión de un antígeno determinado y se inyectan de nuevo. En el caso del MM, el antígeno más estudiado y con mejores respuestas es el BCMA, un antígeno de maduración de las células B que se expresa en las células plasmáticas de MM. Lamentablemente, a pesar de que esta terapia produce respuestas tempranas muy buenas, la falta de durabilidad de las propias células CAR-T impide que la enfermedad se controle a largo plazo en muchos pacientes[30].

2. Familia de proteínas Rho

La familia de proteínas Rho, llamadas así por ser **homólogas** a **Ras** (*Ras homologous proteins*), es una de las cinco familias que se engloban dentro de la superfamilia Ras [39, 40]. A nivel molecular consiste en un grupo de proteínas G monoméricas con capacidad GTPasa intrínseca [39, 40]. Las proteínas Rho están altamente conservadas en las células eucariotas y, en mamíferos, se han descrito hasta 20 miembros diferentes, de los cuales RhoA, Cdc42 y Rac1 son los mejor caracterizados [40]. Según sus características funcionales y bioquímicas, se pueden agrupar en ocho subfamilias. No obstante, también pueden dividirse según su actividad y regulación en dos grupos más grandes: las proteínas Rho clásicas y las proteínas Rho atípicas (**figura 4**) [41].

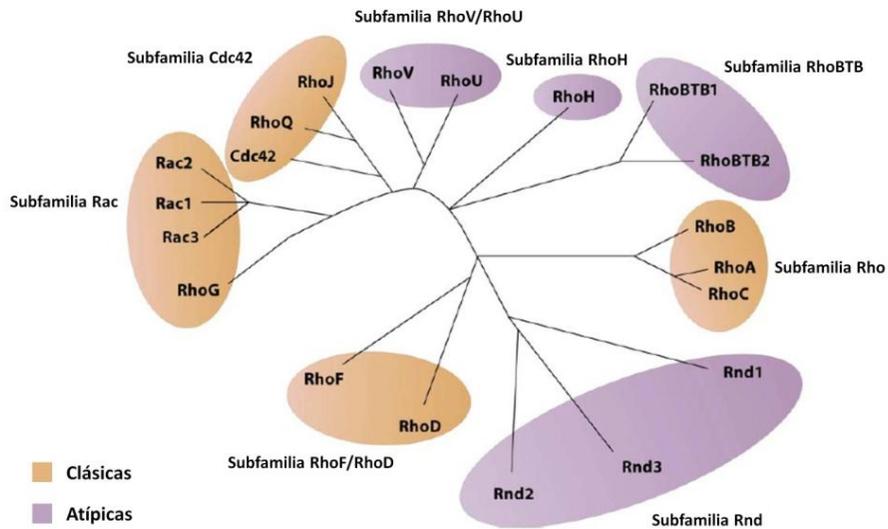


Figura 4. Clasificación de la familia de proteínas Rho. Según sus características bioquímicas y funcionales se clasifican en 8 subfamilias que, a su vez, se dividen en dos grupos en función de su actividad y regulación. Adaptada de Haga y Ridley, 2016 [41].

Las proteínas Rho clásicas son aquellas cuya actividad viene determinada por un intercambio cíclico entre moléculas de GTP y GDP [41-43]. Así pues, estas proteínas pueden presentar dos estados conformacionales: el estado unido a GTP, considerado como estado activo; y el estado unido a GDP o inactivo [41-43]. El cambio entre ambos estados viene determinado por la acción de unas proteínas reguladoras conocidas como GEF (*Guanine nucleotide Exchange factors*), que facilitan la unión de las proteínas Rho a GTP y, por tanto, su conformación activa; o GAP (*Rho GTPase activation protein*), que se encargan de inducir la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, permitiendo la hidrólisis de GTP a GDP y promoviendo su conformación inactiva. También existen otras proteínas reguladoras, conocidas como GDI (*Rho GDP dissociation inhibitor*), que se encargan de retener a las proteínas

Introducción

Rho unidas a GDP en el citoplasma, lejos de la membrana plasmática, para evitar su unión a GTP y con ello su activación (**figura 5**) [41-43].

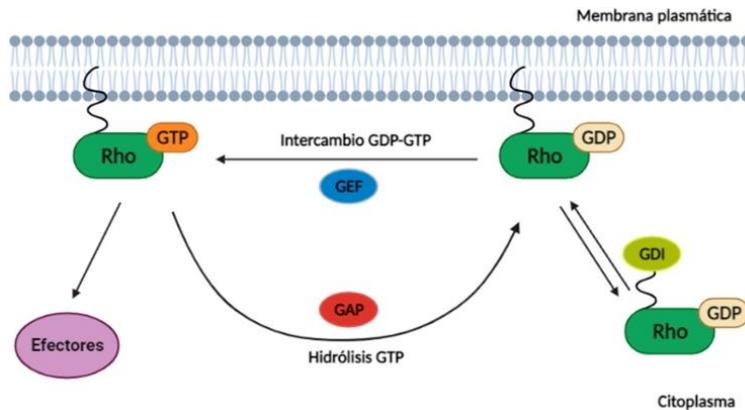


Figura 5. Mecanismo de regulación de las proteínas de la familia Rho. Las proteínas Rho ciclan entre dos estados conformacionales: uno activo unido a GTP y otro inactivo unido a GDP. Las proteínas GEF se encargan de activar a las proteínas Rho intercambiando GDP por GTP en el sitio de unión, mientras que las proteínas GAP promueven la hidrólisis de GTP a GDP, por lo que inactivan a las proteínas Rho. Por último, las proteínas GDI secuestran a las proteínas Rho en el citoplasma impidiendo su activación.

2.1. Función biológica de las proteínas Rho

La principal función asociada a las proteínas Rho es la reorganización del citoesqueleto de actina [39, 40]. De este modo, las tres proteínas Rho más estudiadas (RhoA, Cdc42 y Rac1), una vez localizadas en la membrana plasmática, son capaces de interactuar con sus efectores para inducir cambios en el citoesqueleto de actina [44]. En el caso de RhoA, su principal efector es ROCK, una proteína con actividad serina/treonina kinasa capaz de fosforilar e inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), lo cual aumenta la fosforilación de MLC

y la polimerización de los filamentos de actina-miosina [44, 45]. Cdc42, por su parte, tiene como efector al complejo WASP, que a su vez actúa sobre el complejo Arp2/3 y promueve la polimerización de actina [46]. En el caso de Rac1, también se produce un incremento de la polimerización de actina a través del complejo Arp2/3, pero esta vez, mediada por el complejo WAVE [47]. Asimismo, estas tres proteínas también son capaces de inducir la reorganización del citoesqueleto a través de las quinasas LIM, que inhiben la función de cofilina y facilitan la polimerización de los filamentos de actina [44].

De este modo, a través de sus diferentes efectores, RhoA, Cdc42 y Rac1 son capaces de inducir cambios en el citoesqueleto de actina que acaban en la producción de fibras de estrés y adhesiones focales en el caso de RhoA, o bien en la formación de protuberancias de la membrana plasmática ricas en actina llamadas filopodios cuando son inducidos por la acción de Cdc42 y lamelipodios cuando actúa Rac1. Debido a esto, las proteínas Rho se han asociado, clásicamente, a fenómenos de adhesión, migración y motilidad celular [48-50].

Además de su implicación en el citoesqueleto de actina y en los procesos de migración celular, las proteínas Rho también juegan un papel importante en la proliferación y la progresión del ciclo celular [39, 40, 51]. Así, RhoA es necesaria para la progresión G1/S, contribuyendo a la correcta expresión de ciclina D1 en la fase G1 [52]. Del mismo modo, Rac1 induce la expresión de ciclina D1 a través de NF- κ B en células epiteliales y mesenquimales [53], mientras que Cdc42 induce la expresión de ciclina E y la entrada en fase G1 en fibroblastos inmortalizados [54]. Debido a su papel en procesos de proliferación y migración celular, algunas proteínas Rho se han asociado con procesos

de transformación y progresión tumoral, sugiriendo su implicación en la biología celular del cáncer [55-57].

2.2. Proteínas Rho y cáncer

A pesar del papel relevante de las proteínas Rho en la regulación y la migración celular, y de su similitud con otras proteínas oncogénicas de la familia Ras, hasta la fecha ninguna de las proteínas Rho ha sido considerada como un oncogén. Sin embargo, desde ya hace un tiempo, se ha propuesto a las proteínas Rho como una familia de proteínas involucrada en la progresión tumoral. Así, se han encontrado mutaciones en determinadas proteínas Rho en distintos tipos de cáncer [41, 58]. Por ejemplo, se han encontrado mutaciones puntuales de RhoA en tumores gástricos, así como también en linfomas angioinmunoblásticos de células T. Del mismo modo, se han descrito mutaciones en Rac1 en melanomas y tumores de mama [59].

A pesar de que estas mutaciones son importantes para el desarrollo y progresión de determinados tumores, la implicación de las proteínas Rho en la biología del cáncer viene determinada por su desregulación en muchos tipos tumorales [41, 60]. Esta desregulación puede ser a nivel de expresión génica o bien, deberse a cambios en la actividad de las propias proteínas inducidos por sus reguladores directos (GEF, GAP y GDI). De este modo, se sabe que proteínas Rho como RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42, Rac1, Rac2, Rac3, RhoV y RhoF se encuentran desreguladas en numerosos tipos de cáncer. Pero, de nuevo, las más estudiadas son RhoA, Rac1 y Cdc42, jugando un papel importante en todas las etapas de la progresión tumoral, desde la transformación hasta la metástasis [51, 55].

Aun así, el papel de las proteínas Rho en la progresión tumoral sigue sin ser del todo claro, de modo que pueden actuar tanto de promotores como de supresores tumorales dependiendo del tipo celular y tumoral, existiendo evidencias que demuestran ambas funciones [59, 61-63].

2.2.1. Proteínas Rho y mieloma múltiple

Al igual que en muchos tipos tumorales, hay estudios que demuestran el papel de las proteínas Rho en el desarrollo de neoplasias hematológicas, y en concreto en el MM. RhoA y Rac1 juegan un papel importante en fenómenos de adhesión y quimiotaxis a través de sus efectores ROCK y LIMK en células de MM [64]. Además, se sabe que la vía RhoA/ROCK está implicada en fenómenos de resistencia a fármacos mediados por adhesión celular en MM a través de Wnt [65]. Del mismo modo, la expresión del gen supresor de tumores *DLC1* en líneas celulares de MM, produce cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina a través de RhoA, inhibiendo la invasión y la migración de las células [66]. También se ha descrito el papel de la vía RhoA/ROCK en el microambiente de la médula ósea, induciendo un fenotipo más resistente y propicio para la adhesión celular en las células estromales de la médula ósea a través de CXCL12[67].

Otras proteínas Rho han sido también asociadas a la progresión del MM. Es el caso de RhoC, cuya inhibición facilita la apoptosis de líneas celulares de MM e impide la proliferación de éstas [68]. Asimismo, la expresión de RhoU, una proteína Rho atípica, disminuye a medida que avanza la enfermedad, lo cual podría relacionarse con su función reguladora de fenómenos de migración y proliferación en MM [69].

3. Proteínas Rnd

Las proteínas Rnd constituyen una de las cuatro subfamilias dentro de la familia Rho consideradas como atípicas [70, 71]. Estas proteínas tienen su origen en los cordados ancestrales, por lo que son de evolución reciente y sólo están presentes en vertebrados [72]. La subfamilia Rnd está formada por 3 proteínas llamadas Rnd1, Rnd2 y Rnd3, que deben su nombre al fenotipo redondeado (**Round**) que inducen al ser sobreexpresadas [70, 71, 73]. Su característica principal consiste en cambios en los aminoácidos correspondientes al sitio de unión a GTP, que impiden la hidrólisis de este. De este modo, las proteínas Rnd carecen de actividad GTPasa, por lo que siempre estarán unidas a GTP y, con ello, constitutivamente activas [70, 71, 74].

Debido a su permanente estado activo, la regulación de las proteínas Rnd se realiza mediante mecanismos distintos, que implican una regulación de la expresión génica a nivel transcripcional o post-transcripcional, así como también una regulación a través de modificaciones post-traduccionales [42, 75]. Muchas de estas modificaciones post-traduccionales permiten la correcta localización de las proteínas en las membranas celulares para que realicen su función. Por ejemplo, Rnd1 y Rnd3 suelen estar presentes en la membrana plasmática, mientras que Rnd2 se asocia a endomembranas o se expresa en el citoplasma [71]. Además, se sabe que Rnd3, a diferencia de Rnd1 y Rnd2, es capaz de ser fosforilada por algunos de sus efectores para inducir su traslocación al citoplasma o para incrementar su estabilidad, añadiendo un grado de complejidad mayor a su regulación [76, 77].

En cuanto a su expresión, las proteínas Rnd presentan una expresión dependiente de tejido. Rnd1 y Rnd2, se expresan de forma mayoritaria

en hígado y testículo, mientras que Rnd3 presenta una expresión ubicua en todo el organismo, apareciendo mayoritariamente en cerebro y próstata, y con una expresión muy baja en páncreas y médula ósea [70, 71, 78].

La función biológica principal de las proteínas Rnd, al igual que ocurre con las otras proteínas Rho, es la reorganización del citoesqueleto de actina, generalmente actuando de forma antagónica a RhoA [79]. Así pues, se les ha asignado funciones celulares importantes como el desarrollo neural, ejerciendo un papel fundamental en la guía axonal [80], así como en otros procesos celulares como la migración y la progresión del ciclo celular, sugiriendo una función relacionada con la transformación y la progresión tumoral [78, 81, 82].

En relación a su función en la biología celular del cáncer, las proteínas Rnd no presentan alteraciones genéticas en prácticamente ningún tipo tumoral [78]. No obstante, los niveles de expresión de las diferentes proteínas Rnd sí se encuentran alterados en muchos tipos tumorales respecto al tejido sano y, su papel como promotor o supresor tumoral es dependiente del tipo de tumor [70, 71, 78].

4. Rnd3

Rnd3 es la proteína mejor caracterizada dentro de la subfamilia Rnd. Tal y como se ha comentado anteriormente, la principal función de Rnd3 es la reorganización del citoesqueleto de actina, jugando un papel antagónico a RhoA [79]. Para llevar a cabo esta función, Rnd3 actúa a diferentes niveles de la vía RhoA/ROCK [83, 84] (**figura 6A**). En primer lugar, Rnd3 es capaz de unirse a p190GAP activando su función, que consiste en facilitar la hidrólisis de GTP por parte de RhoA, reduciendo los niveles de RhoA-GTP y por tanto, limitando su función [79, 85]. Del mismo modo, Rnd3 también es capaz de unirse e inhibir a una proteína GEF, Syx, que actúa como una proteína activadora de RhoA, por lo que la inhibición inducida por Rnd3 produce de nuevo una disminución de la función de RhoA [86]. Por último, Rnd3 también es capaz de unirse directamente a ROCK-I, el principal efector de RhoA, induciendo un cambio conformacional en él que impide su unión a RhoA y se traduce en una menor fosforilación de MLC, impidiendo así la formación de fibras de estrés [87, 88].

Sin embargo, también se han descrito otras funciones de Rnd3 independientes de la vía RhoA/ROCK y el citoesqueleto de actina [84]. Por tanto, Rnd3 es capaz de regular la expresión de ciclina D1 a nivel post-transcripcional, actuando sobre la entrada en fase G1 en la progresión del ciclo celular [89] (**figura 6B**), así como también en procesos de apoptosis, regulando a otras proteínas como Rb, caspasa 3, BAX o BCL-2 [84, 90-93] (**figura 6C**).

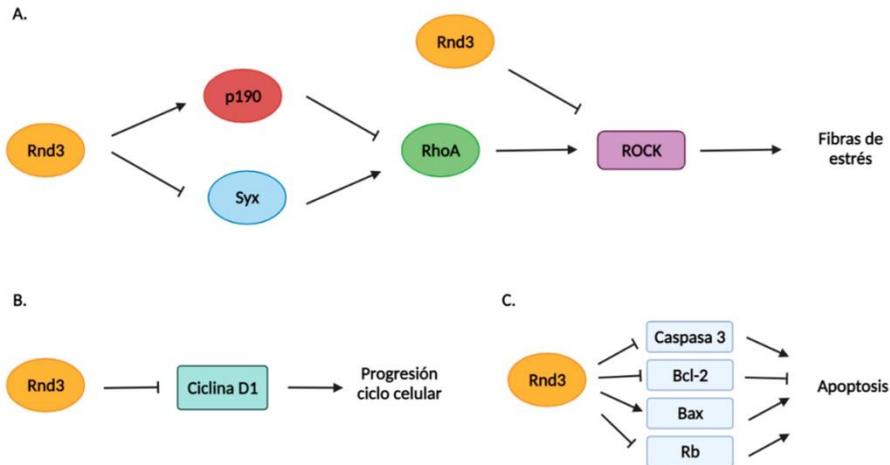


Figura 6. Vías moleculares reguladas por Rnd3. A. Rnd3 actúa sobre la formación de fibras de estrés a través de la vía RhoA/ROCK. B. Rnd3 interviene en la progresión del ciclo celular, regulando la entrada en fase G1 mediante ciclina D1. C. Rnd3 está involucrado en la apoptosis regulando a diferentes efectores. Adaptada de Jie *et al.* 2015 [84].

4.1. Funciones celulares de Rnd3

Debido a su implicación en la reorganización del citoesqueleto de actina y en otros procesos como el ciclo celular y la apoptosis, Rnd3 se encuentra asociada a procesos celulares muy diversos e importantes para la homeostasis celular como la polaridad celular, diferenciación, supervivencia, proliferación y migración [84, 94] (**figura 7**).

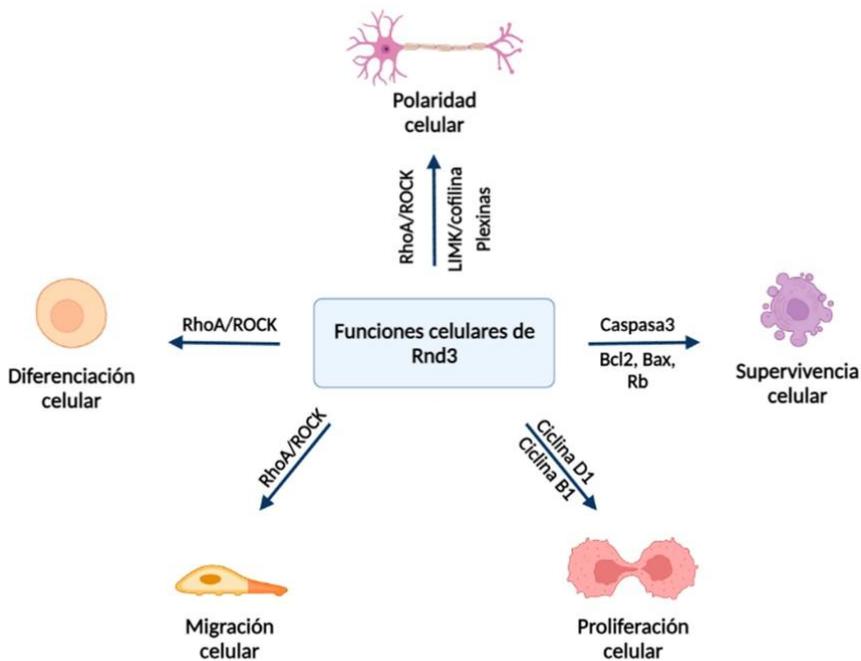


Figura 7. Funciones de Rnd3 en la célula. Resumen de las principales funciones de Rnd3 asociadas a procesos celulares como la polaridad, diferenciación, supervivencia, proliferación y migración celular. Adaptada de Paysan *et al.* 2016 [94].

En los últimos años, uno de los intereses de nuestro laboratorio ha sido profundizar en las posibles funciones de Rnd3, demostrando el papel de esta proteína en el desarrollo del sistema nervioso central. Los niveles de Rnd3 son especialmente altos en el cerebro durante la etapa embrionaria y van disminuyendo progresivamente hasta alcanzar la edad adulta. Concretamente los mayores niveles de expresión se encuentran en la región de los bulbos olfatorios y la corteza [95]. Usando un modelo murino deficiente en Rnd3, nuestro laboratorio ha demostrado que los ratones carentes de esta proteína presentan un tamaño menor que los ratones silvestres, así como también una esperanza de vida que no

supera las tres semanas [96]. Además, la ausencia de Rnd3 produce un fenotipo caracterizado por graves alteraciones motoras y un retraso del desarrollo del sistema nervioso central, concretamente observándose un retraso en el desarrollo de las sinapsis neuromusculares y un menor número de motoneuronas en la médula espinal, ausencia del nervio peroneo común y atrofia por denervación de los músculos diana de este nervio [96]. Del mismo modo, nuestro laboratorio ha descrito la importancia de Rnd3 en la correcta migración de los neuroblastos a través de la corriente migratoria rostral, observándose un incremento de este tipo de células y una alteración de su migración, como consecuencia se ha observado un menor número de las interneuronas calbindina positivas en el bulbo olfatorio [97]. Por otro lado, resultados recientes de nuestro grupo demuestran que Rnd3 realiza un papel relevante en los procesos de mielinización axonal y diferenciación de oligodendrocitos [98].

En cuando a la diferenciación celular, también se ha observado que Rnd3 regula de forma específica y transitoria la diferenciación de queratinocitos basales, mientras que su ausencia induce la proliferación y retrasa la diferenciación de los mismos [99]. Del mismo modo, hay estudios que describen el papel de Rnd3 en la supervivencia celular. Por ejemplo, ratones con haploinsuficiencia en Rnd3 presentan una predisposición a desarrollar una cardiomiopatía apoptótica [100]. Además, nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de Rnd3 induce apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano, U87 [93].

Asimismo, son muchos los trabajos que demuestran la intervención de Rnd3 en procesos de proliferación y migración celular [101-103]. Concretamente, en nuestro laboratorio también hemos demostrado que Rnd3 es necesario para la inhibición por contacto y que un

silenciamiento de su expresión aumenta la capacidad migratoria e invasiva de las células MDA-MB-231 [81].

Es por ello, que en los últimos años se ha especulado con la posibilidad de que Rnd3 juegue un papel importante en la transformación y progresión tumoral, siendo todavía objeto de debate si su función es oncogénica u oncosupresora.

4.2. Rnd3 y cáncer

Debido a la alteración de la expresión de Rnd3 en determinados tumores, hay muchos estudios que atribuyen a Rnd3 una función importante en la transformación y progresión tumoral. En consecuencia, existen dos puntos de vista enfrentados para determinar la verdadera función de Rnd3 en la biología celular del cáncer [94]. El primero de ellos consiste en que Rnd3 tiene una función supresora de tumores, siendo su pérdida la que contribuye a la tumorigénesis. Por el contrario, otros trabajos proponen una función oncogénica de Rnd3, sugiriendo que su expresión es la que facilita la progresión tumoral [94].

Estudios realizados en tumores de próstata, hepáticos y en carcinomas de células escamosas, demuestran una disminución de la expresión Rnd3 respecto a los tejidos sanos (**figura 8**). La expresión ectópica de Rnd3 en líneas celulares de cáncer de próstata induce una parada de ciclo celular a través de ciclina B1 [90]. La disminución de la expresión de Rnd3 en los tumores hepáticos se asocia con la aparición de nódulos metastásicos y con una disminución de la esperanza de vida [104-106]. En el caso de los carcinomas de células escamosas, la ausencia de Rnd3 permite una mayor proliferación e invasión en la línea celular EC1 a través de PTEN/PI3K/Akt [107]. Además, resultados de nuestro

laboratorio demuestran que los ratones heterocigotos para Rnd3 son más sensibles a desarrollar tumores en la piel después de un tratamiento con DMBA/TPA [81]. Por tanto, estos resultados sugieren una función oncosupresora de Rnd3, ya que su ausencia facilita la transformación y progresión tumoral, asociándose con un peor pronóstico.

Por otro lado, existen estudios realizados en tumores pulmonares y gástricos que proponen una función oncogénica de Rnd3. Estos trabajos demuestran que la expresión de Rnd3 se encuentra incrementada en las muestras tumorales respecto a las muestras sanas (**figura 8**). El incremento de Rnd3 en las muestras de cáncer de pulmón no microcítico se asocia con un mal pronóstico [108, 109]. Lo mismo ocurre con los tumores gástricos, en los que, además, Rnd3 juega un papel importante en la resistencia a fármacos, ya que el silenciamiento de Rnd3 induce sensibilidad a cisplatino en la línea tumoral gástrica resistente SGC7901/DDP [110], mientras que la expresión ectópica en la línea parental SGC7901 facilita la resistencia a diferentes fármacos antitumorales [92].

Además, existen tipos tumorales donde la controversia se produce dentro del propio tumor. Es el caso de los glioblastomas y los tumores de colon (**figura 8**). En referencia al cáncer de colon, existen dos estudios enfrentados que muestran resultados contradictorios: uno de ellos presenta a Rnd3 como supresor tumoral, ya que su expresión disminuye en las muestras tumorales frente a las sanas [111]; mientras que el otro lo presenta como oncogén, debido a que su expresión se muestra incrementada en las muestras tumorales, correlacionando además con fenómenos de invasión, metástasis y recaídas después del tratamiento [112]. Por su parte, los glioblastomas son tumores más complejos debido a su desarrollo en el tejido neural, por lo que también hay trabajos que

Introducción

demuestran una disminución de Rnd3 en glioblastomas, mientras que otros muestran un incremento relacionado con la proliferación, migración e invasión de las células tumorales [113, 114].

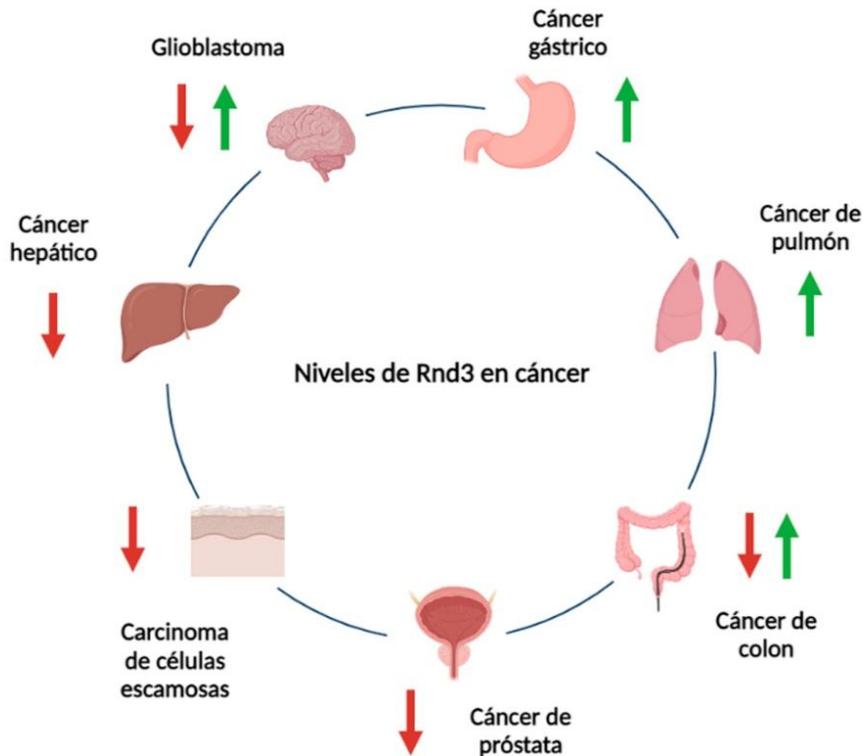


Figura 8. Esquema representativo de los niveles de Rnd3 en diferentes tipos tumorales. La expresión de Rnd3 se encuentra incrementada o disminuida dependiendo del tipo tumoral, por lo que su función oncogénica u oncosupresora también depende del tipo de cáncer. Adaptada de Paysan *et al.* 2016 [94].

Así pues, se ha establecido una relación entre *Rnd3* y el cáncer, evidenciando su papel en la aparición y progresión de ciertos tumores. Sin embargo, no existen estudios relacionados con la expresión de *Rnd3* en neoplasias hematológicas. Recientemente, un estudio realizado con datos de GEPIA2 (*Gene Expression Profiling Interative Analysis*) muestra un aumento de la expresión de *RND3* en linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) [78]. Esto nos llevó a establecer una colaboración con el laboratorio de Síndromes Linfoproliferativos liderado por el Dr. Martínez-Climent del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Pamplona), con el fin de analizar bioinformáticamente la expresión de *RND3* en distintas neoplasias hematológicas. Datos procedentes de dicho grupo obtenidos del análisis transcriptómico de modelos murinos de MM que mimetizan la enfermedad humana, muestran un incremento de la expresión de *RND3* frente a muestras de ratones sanos. Además, el incremento de la expresión se produce de forma progresiva desde las células sanas a las muestras de MM, pasando por la etapa intermedia MGUS (**figura 9A**). Al analizar los niveles de expresión de *RND3* en muestras humanas, también se observa un incremento de la expresión en pacientes con MM frente a muestras procedentes de células plasmáticas sanas y otras poblaciones de células B (**figura 9B**). Por tanto, con estas evidencias nos planteamos evaluar **el papel de *Rnd3* en la enfermedad de MM**.

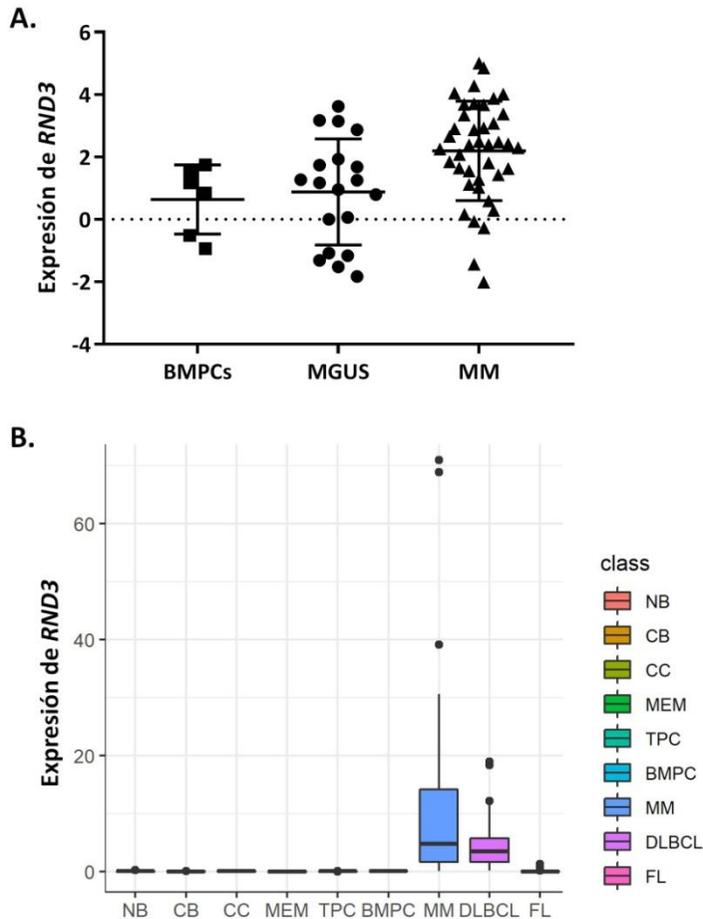
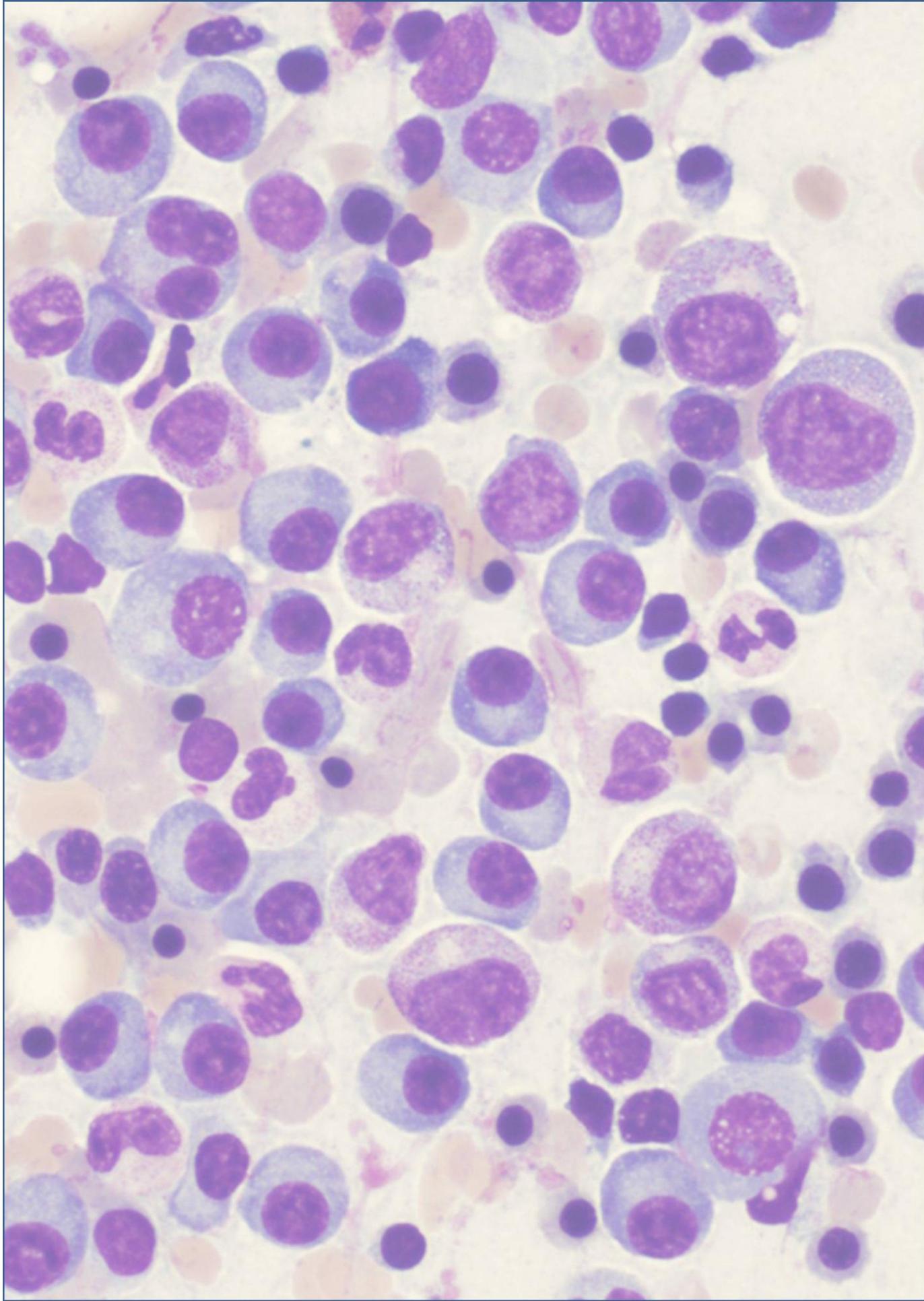
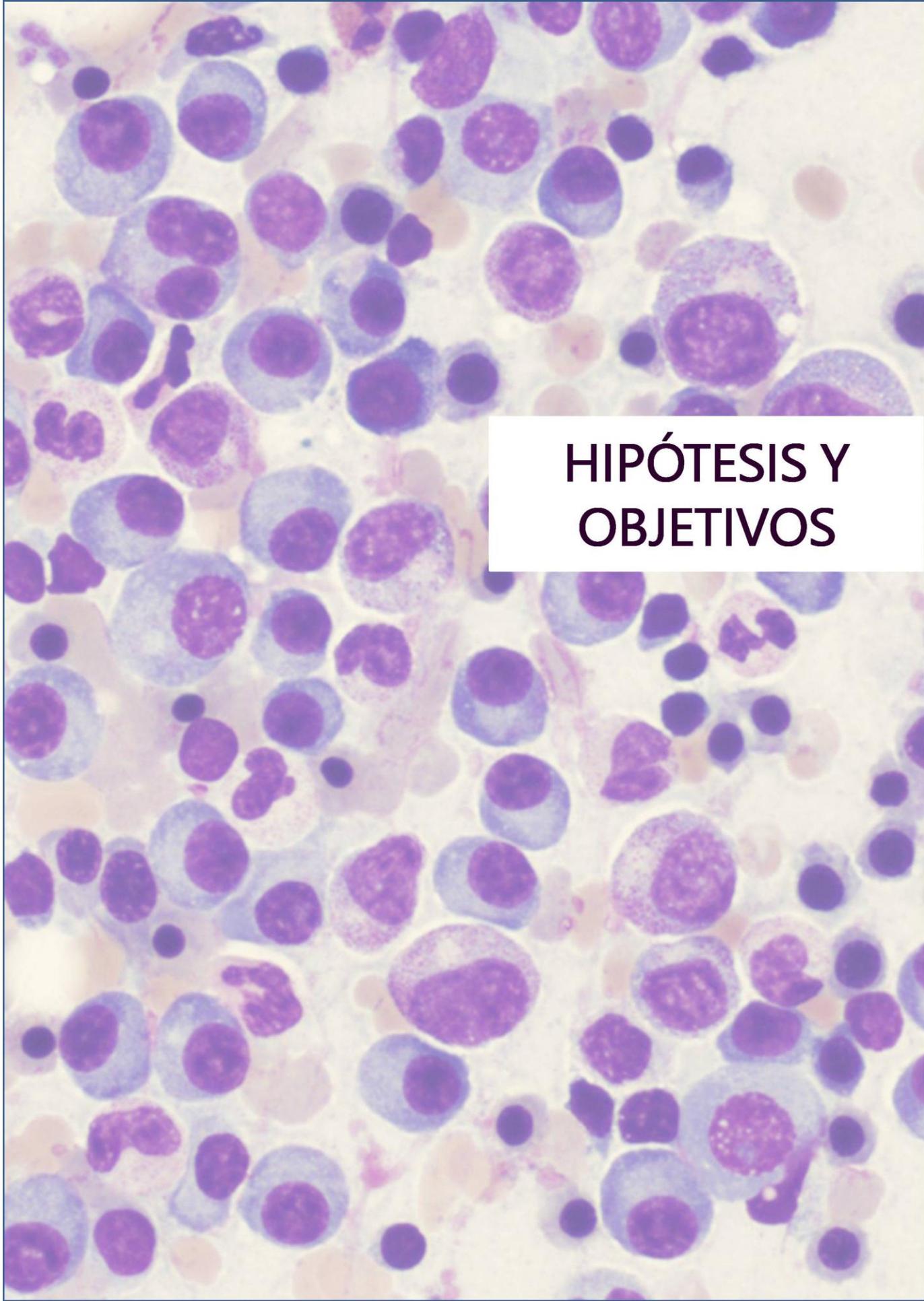


Figura 9. Niveles de expresión de *RND3* en MM. **A.** La expresión de *RND3* se incrementa en muestras de MM procedentes de modelos murinos frente a muestras de MGUS y células plasmáticas sanas de la médula ósea (BMPCs). Este incremento tiende a ser progresivo desde las células sanas hasta la fase de MM, ya que en la fase MGUS ya se observa un ligero aumento. Estos datos han sido extraídos del análisis transcriptómico de diferentes ratones que mimetizan la enfermedad (n=40) y recogidos en el trabajo de Larrayoz *et al.* (Manuscrito en revisión). **B.** La expresión de *RND3* se incrementa en células procedentes de pacientes con MM (n=37) y DLBCL (n=80) respecto a células plasmáticas sanas procedentes de médula ósea y amígdala (BMPC y TPC) y otras subpoblaciones de células B (NB, CB, CC y MEM). Los datos han sido obtenidos del análisis transcriptómico usado en otros trabajos de Jiang *et al.* 2017 [115], Agirre *et al.* 2019 [116] y Carrasco-León *et al.* 2021 [117].



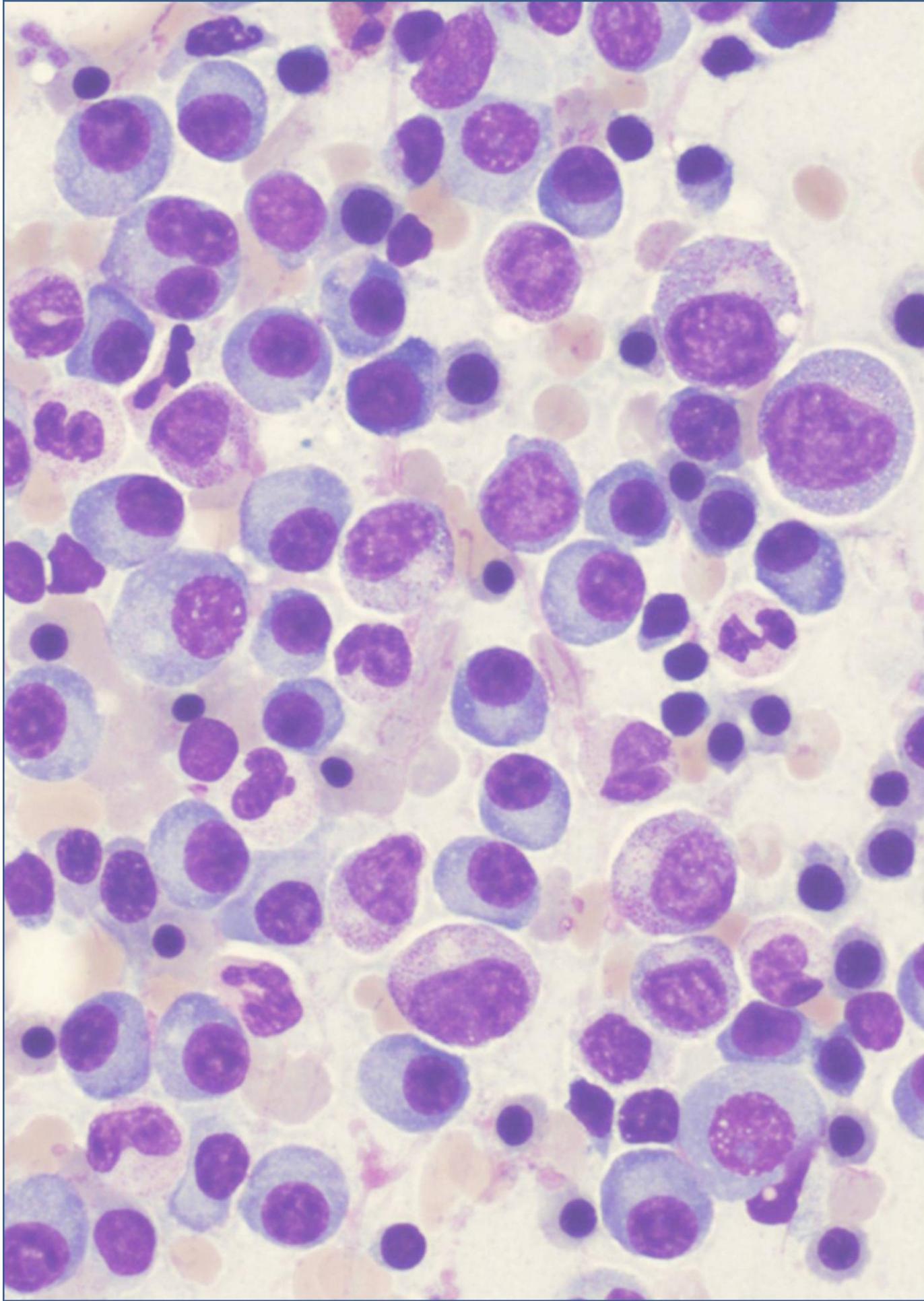


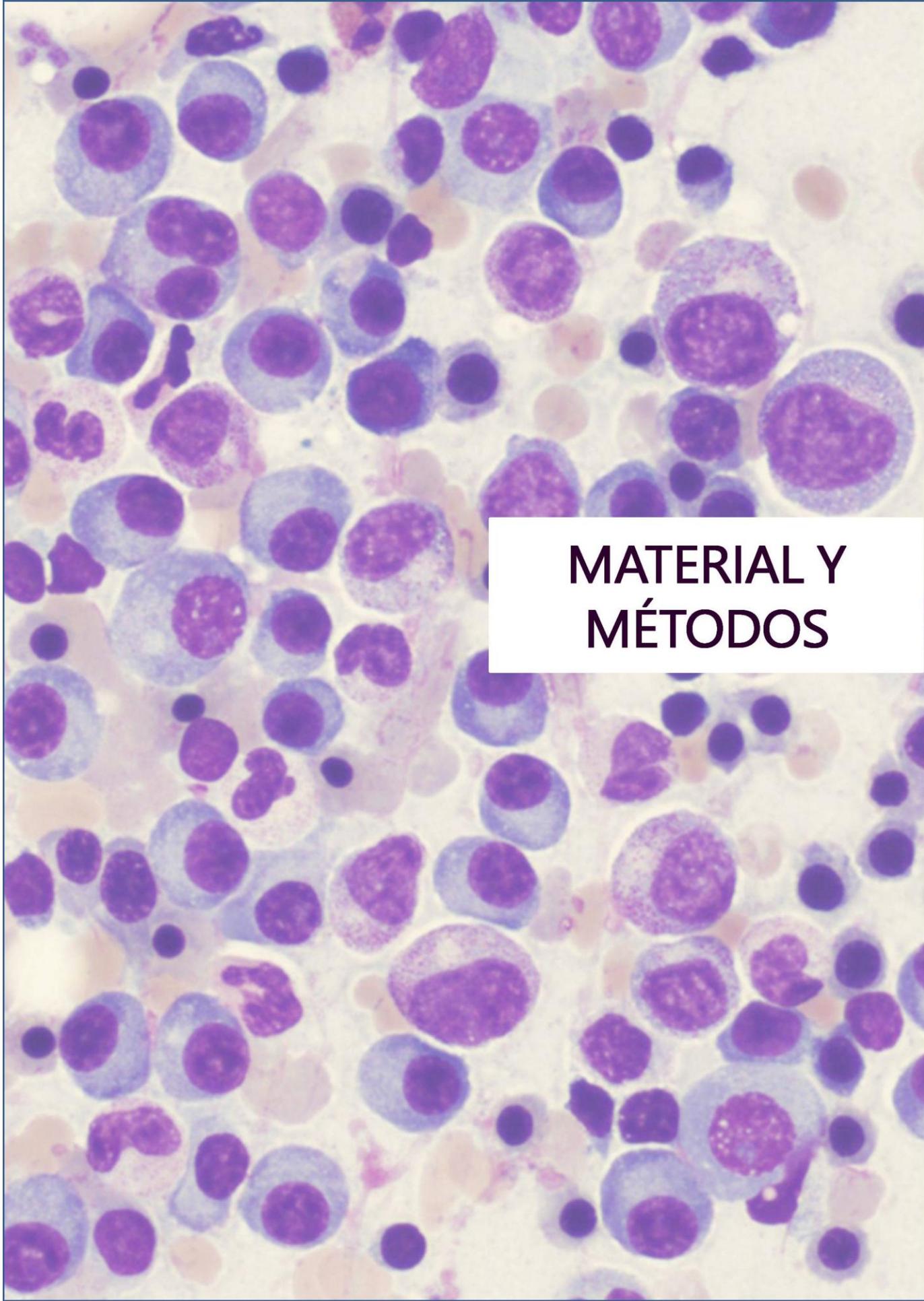
**HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS**

Rnd3 es una proteína implicada en la transformación y progresión tumoral. En estudios preliminares, hemos observado un incremento de la expresión de *RND3* en muestras de mieloma múltiple frente a muestras sanas, de modo que creemos que la expresión de esta proteína puede estar contribuyendo a la progresión de esta enfermedad.

El objetivo principal del trabajo es **evaluar la función de Rnd3 en mieloma múltiple**. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar los niveles de expresión de Rnd3 en líneas celulares de MM
2. Estudiar el papel de Rnd3 en la proliferación, adhesión y sensibilidad a fármacos y deprivación de nutrientes en MM
3. Analizar el perfil de expresión génica de las células deficientes en Rnd3 y su relación con la patología





MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado dos líneas humanas derivadas de mieloma múltiple, RPMI 8226 y JIN3, obtenidas del repositorio alemán de células (DSMZ - *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*) y cedidas por el laboratorio del Dr. Martínez-Climent, respectivamente.

Para la obtención de las partículas lentivirales se utilizaron células renales humanas inmortalizadas 293T, que contienen el antígeno T del virus SV40.

El mantenimiento de la línea celular RPMI 8226 se realizó en medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher); para las células JIN3 se usó medio IMDM (Gibco, Thermo Fisher), mientras que para las células 293T se utilizó medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher). Todos los medios fueron suplementados con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco, Thermo Fisher) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Gibco, Thermo Fisher), como antibiótico.

Las células se mantuvieron en un incubador HERAcCell (HERAEUS) en condiciones constantes de temperatura (37°C) y CO₂ (5%). La manipulación de las líneas celulares se realizó en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A (NUAIRE, LABGARD). Para la recolección de las células 293T fue necesario usar tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, Thermo Fisher). Los lavados de las células se hicieron en tampón fosfato salino (PBS, Gibco, Thermo Fisher) y las centrifugaciones en una centrífuga de cabezal basculante Eppendorf 5810R a una velocidad de 500g durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

2. Obtención de las líneas celulares RPMI 8226 y JLN3 deficientes en Rnd3

La obtención de las líneas celulares deficientes en Rnd3 se realizó mediante la transducción lentiviral de dichas células usando la tecnología CRISPRi, produciendo una represión transcripcional del gen de interés a través de su promotor, sin que haya una edición génica [118]. Brevemente, la técnica consiste en la utilización de una variante de la enzima Cas9 catalíticamente inactiva (*dead* Cas9 o dCas9). Esta enzima lleva fusionada un dominio *Krüppel associated box* (KRAB) que induce metilación del DNA y disminuye la accesibilidad de la cromatina en la zona del promotor, reprimiendo la expresión a nivel transcripcional. Finalmente, la enzima dCas9 se dirige al promotor del gen de interés mediante un RNA guía (sgRNA) específico para el gen de interés, produciéndose la represión transcripcional del mismo.

2.1. Clonaje de los sgRNA en el plásmido lentiviral pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-Puro

Las secuencias de DNA necesarias para la obtención de los sgRNA se obtuvieron de una librería depositada en el repositorio de Addgene (#62217). Para este trabajo, se diseñaron dos secuencias dirigidas al promotor de *RND3* y una dirigida a una región no codificante (scramble) y que sirvió para demostrar la especificidad del silenciamiento y como control para los experimentos realizados. En el diseño de los oligonucleótidos se incluyeron en los extremos los sitios de restricción reconocidos por la enzima Esp3I (Thermo Fisher), permitiendo así su posterior clonaje en el vector lentiviral pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-Puro (#71236, Addgene) (**tabla 2**).

Tabla 2. Lista de las diferentes secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
sgRND3 forward #3	CACCGGAAACGCGGCGCAGACGAGG
sgRND3 reverse #3	AAACCCTCGTCTGCGCCGCGTTTCC
sgRND3 forward #4	CACCGGGGACTTGGGAGGCGCGGTG
sgRND3 reverse #4	AAACCACCGCGCCTCCCAAGTCCCC
sgRNA scramble forward	CACCGGGAGGACGATCGTACTCCAG
sgRNA scramble reverse	AAACTGGAGTACGATCGTCTCC

* En negrita se muestran las secuencias de reconocimiento para Esp3I necesarias para el clonaje en el vector lentiviral

En primer lugar, se realizó la hibridación de cada secuencia con su complementaria mediante una incubación a 37°C durante 30 minutos y una posterior incubación de 5 minutos a 95°C. Finalmente se procedió a enfriar progresivamente la mezcla hasta llegar a temperatura ambiente.

En paralelo, se procedió a linealizar el vector lentiviral llevando a cabo una digestión del mismo con la enzima de restricción Esp3I (Thermo Fisher) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizó la ligación de los distintos fragmentos de DNA mediante una incubación a 16°C durante 16 horas en presencia de la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher).

Después de la ligación, se produjo la transformación de los plásmidos resultantes en bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α mediante el método de choque térmico [119] y su posterior crecimiento en placas de LB-Agar (Miller, Scharlau) en presencia del antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich). Las colonias aisladas se crecieron en medio LB líquido (Lennox, Laboratorios Conda) con ampicilina a 37°C en agitación durante 16

Material y métodos

horas. A continuación, se realizó la extracción del DNA plasmídico mediante el kit de extracción GenElute Plasmid Miniprep kit (Sigma-Aldrich) y se comprobó, tanto por PCR como por secuenciación, la presencia de las secuencias sgRNA. Finalmente, se realizó la obtención a gran escala de dichos plásmidos mediante el kit comercial PureLink Plasmid Filter Midiprep kit (Invitrogen).

Todo este procedimiento se encuentra resumido y esquematizado en la **figura 10**.

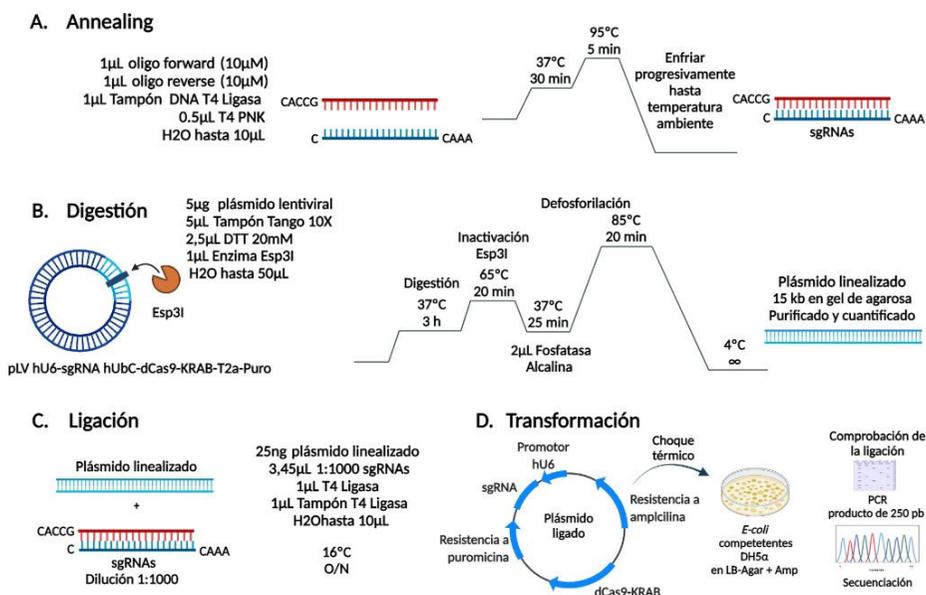


Figura 10. Protocolo esquematizado del clonaje de las secuencias sgRNA y su clonación en el vector lentiviral. A. En primer lugar, la hibridación de las secuencias fue necesaria para generar los sgRNA. **B.** Se realizó también la digestión del vector lentiviral usando la enzima de restricción Esp3I. **C.** La ligación de los guías en el vector lentiviral se realizó en presencia de la enzima T4 DNA ligasa a 16°C. **D.** Por último, se transformaron los plásmidos en bacterias competentes para su producción a gran escala después de su comprobación mediante PCR y secuenciación.

Con ello, y junto con los plásmidos responsables de la producción y el empaquetamiento de partículas virales, se realizó la transfección de las células 293T para proceder con la producción y la concentración de partículas lentivirales.

2.2. Transfección, producción y concentración de partículas lentivirales

Para la obtención de las partículas virales se utilizó el método de transfección de fosfato cálcico [120]. Se cotransfectaron cada uno de los plásmidos portadores de los sgRNA descritos anteriormente, junto con los plásmidos necesarios para la producción de las partículas lentivirales (**tabla 3**). La transfección de la mezcla de plásmidos se realizó usando CaCl_2 y HBS 2X, y se incubó a 37°C durante 16 horas.

Para la obtención de cada construcción lentiviral se necesitaron 5 placas de 10 cm conteniendo células 293T al 60-70% de confluencia. Transcurrido ese tiempo se cambió el medio a las células por medio DMEM fresco (6 ml de medio por placa) y se mantuvieron durante 48 horas más. Pasadas esas 48 horas, los medios correspondientes a cada sgRNA se recolectaron y se centrifugaron a 2000g durante 10 minutos (para eliminar las células en suspensión) y se filtraron con un filtro de 0.2 μm . Posteriormente las partículas lentivirales se ultracentrifugaron a 125000g durante 2 horas y 30 minutos a 4°C usando el rotor SW32 de la ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter). Después, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet correspondiente en 1ml de PBS estéril durante 1 hora manteniéndolo en hielo durante todo el proceso y agitándolo cada 15 minutos aproximadamente. Finalmente, se procedió con la transducción de las células RPMI 8226 y JIN3.

Tabla 3. Lista de plásmidos usados en este trabajo para la producción de partículas lentivirales

Nombre	Función	Contenido
pVSV-G Retroviral vector (pVSVG)	Envoltura	Expresa la proteína G del virus de estomatitis vesicular, necesaria para la entrada del virus
pMDLg-pRRE (pRRE)	Empaquetamiento	Incluye gag, que codifica para proteínas estructurales del virus; pol, necesario para las enzimas específicas del retrovirus; y RRE, un sitio de unión para la proteína Rev
pRSV-REV (pREV)	Empaquetamiento	Expresa la proteína Rev, que facilita la exportación del RNA desde el núcleo
pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-Puro	Usado para generar los diferentes guías	Contiene toda la maquinaria para llevar a cabo la técnica CRISPRi pero sin sgRNA específico
pLV hU6-sgRND3 #3 hUbC-dCas9-KRAB-Puro (sgRND3 #3)	Silenciamiento de Rnd3	Contiene un guía dirigido al promotor de RND3
pLV hU6-sgRND3 #4 hUbC-dCas9-KRAB-Puro (sgRND3 #4)		
pLV hU6-sgRNA Scramble hUbC-dCas9-KRAB-Puro (Scramble)	Control del sistema CRISPRi	Contiene un guía dirigido a una región no codificante

2.3. Transducción de las células RPMI 8226 y JN3 para el silenciamiento de Rnd3

La transducción de las células se realizó en placas de 6 pocillos. Se sembraron 1×10^6 células por pocillo en 1 ml de su correspondiente medio de cultivo. Por cada millón de células se añadieron 100 μ l de partículas lentivirales y se facilitó la infección con 1 μ l de polibreno 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) y una espinulación de las placas a 700g durante 90 minutos a 32°C usando la centrífuga Eppendorf 5810R. A continuación, se dejaron las placas en el incubador a 37°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio y se reemplazó con su correspondiente medio fresco. Para seleccionar las células infectadas se añadió al medio 2 μ g/ml de puromicina (Sigma Aldrich) durante 24 horas. Las células resistentes a puromicina se amplificaron y se comprobó el silenciamiento de las mismas mediante PCR cuantitativa (qPCR) y western blot.

3. Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y qPCR

Para la extracción de RNA total, se recolectaron 5×10^5 células de cada línea, se centrifugaron y se lavaron con PBS, tal y como se ha descrito anteriormente. Después del lavado se procedió a la extracción del RNA mediante el kit comercial NZY Total RNA Isolation kit (Nzytech) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El kit se basa en la lisis celular mediante un tampón con β -mercaptoetanol y una serie de centrifugaciones usando columnas de purificación. El RNA total se eluyó en agua libre de RNasas y se cuantificó usando el aparato SimpliNano (GE Healthcare Life Science).

Material y métodos

Una vez extraído el RNA, se almacenó a -80°C o se continuó con la síntesis de cDNA usando el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis kit (Nzytech) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La retrotranscripción se realizó mediante una incubación a 25°C durante 10 minutos, seguido de otra a 50°C durante 30 minutos y otra a 85°C durante 5 minutos, para luego dejar enfriar. Posteriormente, se añadió la RNasa H y se realizó una última incubación a 37°C durante 20 minutos. Una vez sintetizado, el cDNA se almacenó a -20°C o bien se usó para analizar la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Para la realización de la qPCR se usó la mezcla de reactivos comerciales NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) ROX (Nzytech). Este reactivo se mezcló con los cebadores correspondientes (**tabla 4**) y con la cantidad necesaria de cDNA de cada muestra (10 ng/reacción) en un volumen final de 20 μl para realizar la amplificación usando el aparato AriaMx (Agilent Technologies). Para el análisis de la expresión génica se usó el software informático Agilent Aria 1.71 (Agilent Technologies), tomando como referencia el gen constitutivo *RPLP0* y los resultados obtenidos se representaron usando el método de expresión relativa basado en $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, que representa la variación de expresión frente a las muestras control (las células silvestres en nuestro caso).

Tabla 4. Lista de cebadores usados para el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa tiempo real

Gen	Secuencia (5'-->3')	Tamaño del producto amplificado (pb)
RND3 forward	GCAGACGCCAGTGCCTAT	192
RND3 reverse	ATCCGCTTTGTGGCTCTCTG	
CXCL10 forward	CCTGCAAGCCAATTTGTCCA	170
CXCL10 reverse	TGCATCGATTTTGCTCCCT	
RPLP0 forward	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	240
RPLP0 reverse	TGCCCTGGAGATTTAGTG	

4. Extracción e inmunodetección de proteínas.

Para la extracción de proteínas se recolectaron 1×10^6 células de cada condición, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Después del lavado se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH8), acompañado de un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Tablets Mini EDTA-free, Roche) y de fosfatasa (10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 μM DTT). Todas las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos para su posterior centrifugación a 21000g durante 20 minutos a 4°C en la centrífuga refrigerada Himac CT15RE (VWR). A continuación, se recogió el sobrenadante y se realizó la cuantificación de cada muestra utilizando el método de Bradford y usando una recta patrón establecida con albúmina sérica bovina (BSA), lo cual nos permitió estimar la concentración proteica de cada muestra por interpolación. La medida de

Material y métodos

las absorbancias se llevó a cabo en el espectrofotómetro de placas Victor X3 (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 595 nm.

El análisis de la expresión proteica se realizó mediante la técnica de western blot. Cada una de las muestras (30 µg de proteína) se mezcló con tampón Laemmli (Bio-Rad) y se hirvió durante 3 minutos. Las muestras se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5% mediante un sistema de electroforesis vertical MiniProtean III (Bio-Rad) a 200V durante 60 minutos en el tampón de electroforesis (Tris-glicina-SDS 10X, Bio-Rad) y tomando como referencia de pesos moleculares el marcador NZYColour Protein Marker I (Nzytech). Seguidamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF 0.45 µm Immobilon TM-P Transfer Membrane (Millipore) mediante un sistema de transferencia MiniProtean (Bio-Rad) y utilizando un tampón de transferencia (Tris-glicina 10X, Bio-Rad) y 20% metanol. La transferencia se realizó en frío durante 1 hora a 100V y con un amperaje constante de 350 mA. Una vez pasado ese tiempo, se comprobó la eficacia de la transferencia tiñendo las membranas con la solución de rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) al 0.1% en 1% de ácido acético. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de la solución y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, en una solución de bloqueo compuesta por leche al 5% en tampón tris salino (TBS). Inmediatamente después del bloqueo se produjo la incubación de las membranas con el anticuerpo primario correspondiente (**tabla 5**) diluido a la concentración idónea en una solución de BSA al 3% durante 16 horas a 4°C y en agitación.

Tabla 5. Listado de anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas mediante western blot

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
Anti-RhoE/Rnd3	Sigma-Aldrich	05-723	1:200	Anticuerpo primario monoclonal de ratón
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	1:500	Anticuerpo primario monoclonal de ratón
Anti-Mouse IgG-HRP (Fc)	Thermo Fisher	31437	1:5000	Anticuerpo secundario conjugado con HRP

Transcurrido ese tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-0.05% Tween-20 (TBS-T) durante 5 minutos para eliminar los restos del anticuerpo primario e, inmediatamente, se incubaron con el anticuerpo secundario (**tabla 5**) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 minutos con TBS-T y, por último, se produjo la detección de las proteínas mediante quimioluminiscencia, haciendo uso del reactivo Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher) y del aparato ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science).

Si las membranas requerían de una segunda incubación con otros anticuerpos, se produjo una incubación con una solución de *stripping* compuesta por 200mM Glicina pH 2.5, 1% SDS y 0.1M β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida de

sus correspondientes 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y la incubación con solución de bloqueo durante 1 hora.

5. Ensayos *in vitro*

Para la caracterización fenotípica de las células deficientes en Rnd3 se realizaron diferentes ensayos funcionales *in vitro*, entre los que se encuentran ensayos de proliferación y de ciclo celular, ensayos de adhesión, ensayos de deprivación nutricional y ensayos de sensibilidad a fármacos.

5.1. Proliferación celular

Para determinar la capacidad de proliferación de cada una de las líneas celulares se sembraron, en placas de 96 pocillos, 1.5×10^4 células por pocillo. La densidad celular se midió a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) mediante el ensayo colorimétrico MTS (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y después de una incubación de 2 horas con 20 μ l/pocillo del reactivo MTS. Este reactivo contiene un compuesto de tetrazolio que es reducido a un producto coloreado cuya conversión es proporcional a la cantidad de células vivas que hay en el pocillo. El producto coloreado se detectó midiendo la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro de placas (Victor X3, PerkinElmer).

5.2. Análisis del ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular se mantuvieron las células en cultivo y a las 24 horas se recogieron 1×10^6 células y se fijaron con etanol frío al 80% en PBS durante otras 24 horas. Transcurrido ese tiempo las células fueron centrifugadas a 300g durante 5 minutos y se lavaron con PBS dos veces. A continuación, fueron resuspendidas en 500 μ l de PBS, se tiñeron con una solución de yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración de 40 ng/ μ l y con RNasa A (Sigma Aldrich) a 250 ng/ μ l durante 15 minutos. Posteriormente, se analizó el perfil de fluorescencia a 495 nm a través de un citómetro de flujo (CytoFlex, Beckman Coulter), y se determinó el porcentaje de células que había en cada fase del ciclo: fase G0/G1, fase S y fase G2/M.

5.3. Ensayos de adhesión celular

Para estudiar la adhesión celular fue necesario recubrir con una matriz de fibronectina (40 μ g/ml, Sigma Aldrich) los pocillos de una placa de 96 pocillos con paredes y fondo opacos (Thermo Fisher). El recubrimiento se realizó cubriendo los pocillos con la solución de fibronectina (FN) y dejando que se secase durante 16-24 horas. A continuación, los pocillos recubiertos se lavaron dos veces con PBS y se utilizaron para el ensayo de adhesión.

Para poder medir la tasa de adhesión de las células a la matriz de FN, se tiñeron las células durante 30 minutos con una solución de calcein-AM (2 nM, Santa Cruz Biotechnology). Calcein-AM es un compuesto no fluorescente capaz de penetrar la membrana celular y ser hidrolizada a calceína, un producto fluorescente que puede ser cuantificado y que es proporcional al número de células vivas. Transcurridos los 30 minutos de

tinción, las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS y se incubaron durante 45 minutos más para eliminar el exceso de calceína. A continuación, se lavaron una vez más, se resuspendieron en medio sin suero y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en las diferentes condiciones (suspensión y adhesión a FN). Se añadieron también pocillos control, que nos indicaron la señal de fluorescencia correspondiente al número total de células sembradas. A continuación, las células teñidas se incubaron durante 4 horas a 37°C y al 5% de CO_2 en el incubador y, transcurrido ese tiempo, fueron lavadas muy suavemente dos veces con medio sin suero. Por último, se midió la fluorescencia de los pocillos mediante el lector de placas Victor X3 (Perkin Elmer), usando una longitud de onda de excitación de 496 nm y una de emisión de 516 nm. La tasa de adhesión se calculó mediante la relación de los pocillos en sus respectivas condiciones (suspensión y adhesión) frente a los pocillos control.

5.4. Ensayos de sensibilidad a fármacos

Para estudiar la sensibilidad de nuestras células al tratamiento, escogimos una batería de fármacos usados para el tratamiento del MM y que tienen diferentes mecanismos de acción para inducir la muerte celular. Entre ellos se encuentran un IP como bortezomib, un inhibidor de histona deacetilasas (HDAC) como panobinostat; y un inductor de apoptosis como S63845, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de Mcl1, una proteína antiapoptótica encargada de la supervivencia en las células tumorales.

De modo que, para estudiar la toxicidad de estos fármacos en nuestras células, se realizaron curvas de dosis-respuesta para cada fármaco en todas las líneas celulares. Para ello, se sembraron 3×10^4

células/pocillo en placas de 96 pocillos y se administraron diferentes cantidades de cada uno de los fármacos. Las dosis de inicio fueron 50 nM para bortezomib, 100 nM para panobinostat y 12.5 μ M para S63845. Para la realización de las curvas de supervivencia, las células se trataron con diluciones seriadas de los distintos fármacos durante 48 horas. Finalmente, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS tal y como se ha descrito anteriormente.

5.5. Ensayos de privación nutricional

Para estudiar la dependencia metabólica de las distintas líneas celulares, se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Para ello, se usó medio RPMI 1640 sin glucosa o medio RPMI 1640 sin glutamina (Gibco, Thermo Fisher) y se combinaron con medio RPMI 1640 con ambos nutrientes (glucosa 11mM y glutamina 2mM). De este modo, se obtuvieron medios al 0, 6, 12, 25, 50 y 100 % de glucosa o glutamina. Las células se incubaron durante 48 horas y se midió la viabilidad celular mediante el reactivo MTS, tal y como se ha indicado anteriormente.

6. Estudio y análisis del transcriptoma mediante la secuenciación de RNA (RNAseq)

La secuenciación de RNA se realizó en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra) adaptando la tecnología de SCRIB-Seq [121]. A continuación, se secuenciaron las bibliotecas utilizando un secuenciador NextSeq2000 (Illumina). Se secuenciaron de 5 a 10 millones de lecturas de pares para cada muestra y se demultiplexaron utilizando Cutadapt.

Material y métodos

El análisis de los datos resultantes de la secuenciación de RNA se realizó utilizando los siguientes pasos: en primer lugar, la calidad de las muestras se verificó utilizando el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Luego, se realizó la alineación de las secuencias con el genoma humano (hg38) usando STAR [122]; posteriormente se procedió a la cuantificación de la expresión génica mediante el recuento del número de lecturas de regiones exónicas usando featureCounts [123]; la anotación génica se realizó mediante Gencode v38 [124]; y finalmente, el análisis estadístico de expresión diferencial se realizó utilizando R/Bioconductor [125].

Los datos de expresión génica se normalizaron con edgeR [126] y voom [127]. Después de la evaluación de la calidad y la detección de valores atípicos utilizando R/Bioconductor [125], se realizó un proceso de filtrado, en el cual los genes con recuentos inferiores a 6 en más del 50% de las muestras de todas las condiciones estudiadas se consideraron como no expresados.

A continuación, se utilizó LIMMA [127] para identificar los genes con expresión diferencial significativa entre las condiciones experimentales. En este caso, las muestras procedentes de las células deficientes en Rnd3 (sgRND3 #3 y sgRND3 #4) en comparación con las muestras control de cada línea celular (WT y scramble para la línea RPMI 8226, y sólo WT para la línea JJN3). Los genes se seleccionaron como diferencialmente expresados usando un p-valor de corte inferior a 0.05, solo cuando el logFC observado era significativo y coherente en los resultados de ambas líneas celulares. Por último, también se realizaron análisis funcionales y de agrupamiento y representaciones gráficas utilizando R/Bioconductor [125] y clusterProfiler [128].

7. Cuantificación de CXCL10 en el medio celular mediante un kit de ELISA

Para cuantificar la cantidad de quimiocina CXCL10 secretada por las células de MM al medio de cultivo celular, fue necesaria la utilización de un kit comercial basado en un ensayo de ELISA tipo sándwich (Human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit, R&D systems).

Todas las células fueron sembradas a una densidad de 7×10^5 células/ml en el medio fresco correspondiente y en placas de 6 pocillos. Transcurridas 24 horas, el medio fue recolectado, centrifugado para eliminar los restos de células y congelado a -80°C hasta su uso para realizar el ensayo.

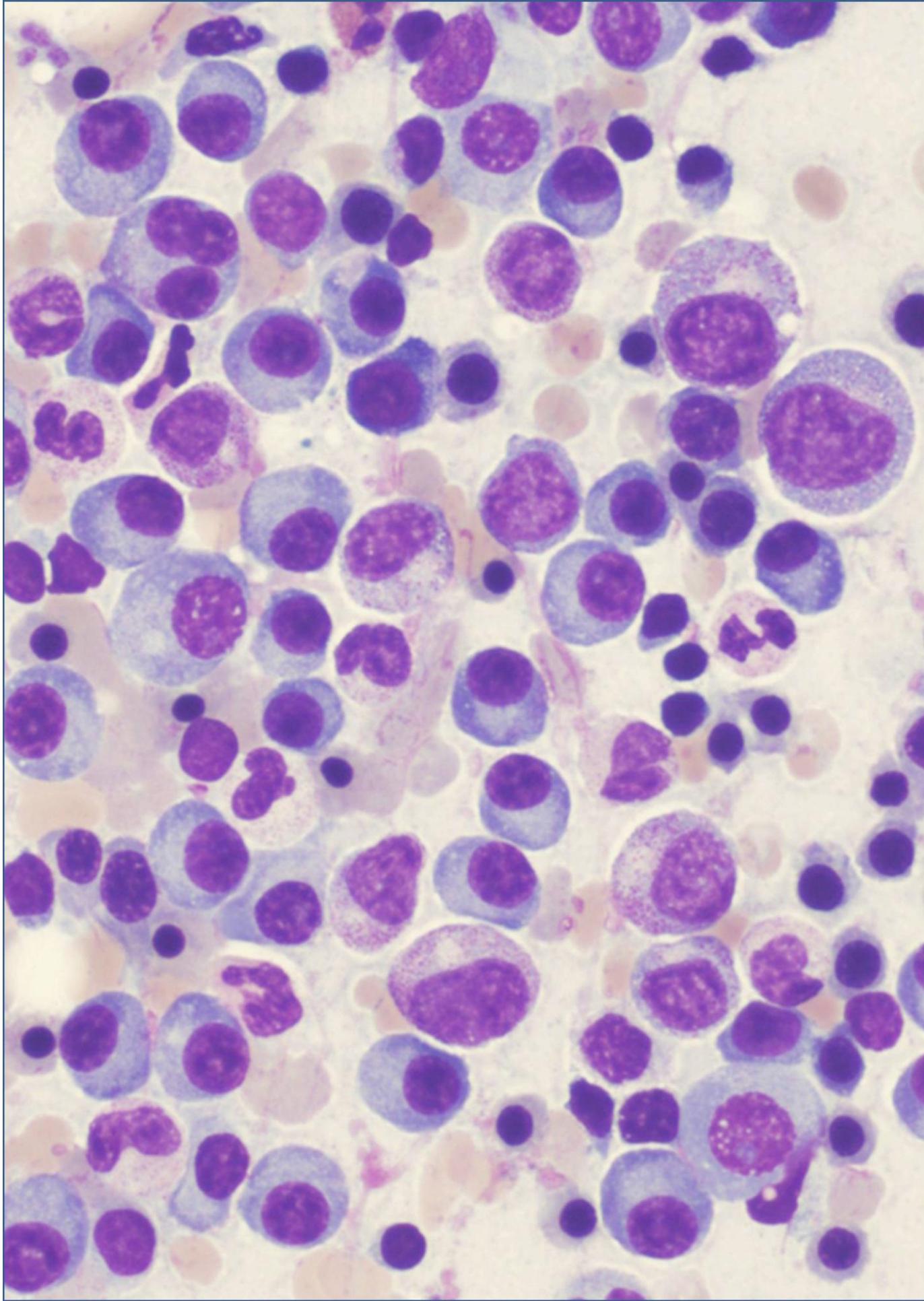
El ensayo de ELISA se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para ello, fue necesario establecer una recta patrón de cantidades conocidas de CXCL10, que nos permitiera posteriormente determinar por interpolación la cantidad de CXCL10 presente en nuestras muestras. En el caso de la línea celular RPMI 8226, fue necesario diluir 30 veces las muestras antes de realizar el ensayo, mientras que las muestras correspondientes a la línea celular JJN3 no requirieron dicha dilución y se incubaron directamente sobre los pocillos comerciales del kit.

Esta primera incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, los pocillos se lavaron hasta 4 veces y se incubaron durante dos horas más en las mismas condiciones con el anticuerpo de CXCL10 conjugado contenido en el kit. Después de esta segunda incubación, los pocillos se lavaron 4 veces más y se realizó una incubación final de 30 minutos a la misma temperatura con la solución de revelado, esta vez, protegiendo los pocillos de la luz. Finalmente, la

reacción fue parada con la solución de parada presente en el kit y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Victor X3 (Perkin Elmer). La concentración de CXCL10 (expresada en pg/ml) presente en nuestras muestras fue determinada interpolando los valores de absorbancia resultantes del ensayo en la recta patrón establecida previamente en el mismo.

8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico Prism (GraphPad). Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Para analizar las diferencias estadísticas entre 3 o más grupos se utilizaron test ANOVA, de una o de dos vías según las necesidades del estudio. En caso de existir diferencias individuales, éstas se analizaron utilizando un test *post hoc* de Tukey. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0.05 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).





RESULTADOS

1. Análisis de la expresión de Rnd3 en líneas celulares de MM

En primer lugar, se obtuvieron extractos proteicos de diferentes líneas celulares de MM y se analizó la expresión de Rnd3 mediante western blot. De las 8 líneas de MM estudiadas 5 de ellas presentan una expresión de Rnd3 detectable mediante esta técnica (RPMI 8226, H929, JJN3, MM1S y KMS11), mientras que las 3 restantes no expresan la proteína (**figura 11**).

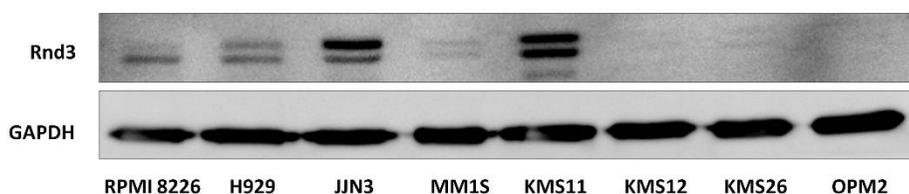


Figura 11. Análisis de los niveles de expresión de Rnd3 en diferentes líneas humanas de MM detectada mediante western blot.

Para la realización experimentos posteriores se escogieron dos de las líneas celulares con expresión de Rnd3, RPMI 8226 y JJN3, y se procedió a su silenciamiento mediante la técnica CRISPRi.

2. Obtención y validación de las líneas celulares de MM deficientes en Rnd3

Las células RPMI 8226 y JJN3 fueron transducidas con las partículas lentivirales que contenían la maquinaria necesaria para el silenciamiento mediante la técnica CRISPRi junto con los guías dirigidos al promotor de

Resultados

RND3 o bien, a una región no codificante (scramble) tal y como se describe en material y métodos. Las células transducidas fueron seleccionadas mediante la adición de puromicina. Una vez obtenida la correspondiente línea estable, se obtuvieron muestras de mRNA y proteína para la comprobación de los niveles de Rnd3 mediante qPCR y western blot. Tal y como se observa en la **figura 12**, en ambas líneas celulares, se demostró que las células transducidas con los distintos guías dirigidos a *RND3* mostraban una disminución significativa de su expresión, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, respecto a las células *wild type* (WT). En el caso de las células RPMI 8226 también se analizaron los niveles de expresión de Rnd3 en células transducidas con el sgRNA scramble mostrando que los niveles de Rnd3 eran muy similares, tanto a nivel de mRNA como de proteína, a las células silvestres. En el caso de las células JN3, no se pudo obtener una línea scramble, por lo que los resultados mostrados para esta línea celular han sido comparados únicamente frente a células WT.

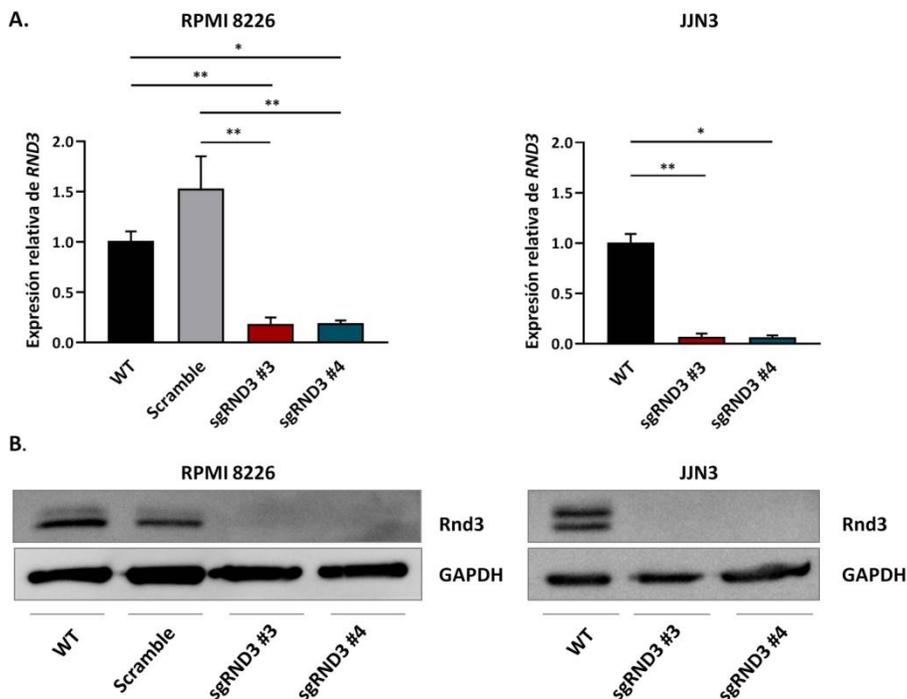


Figura 12. Las células RPMI y JJN3 transducidas presentan una disminución significativa de la expresión de Rnd3 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. **A.** Niveles de expresión génica relativa de *RND3* respecto al gen constitutivo *RPLP0* en las diferentes líneas celulares de MM. Los resultados de expresión relativa se muestran como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tomando como referencia las células WT. El análisis estadístico entre grupos se realizó mediante un test ANOVA de una vía ($n=3$). Las diferencias individuales entre los grupos se analizaron con un test *post hoc* de Tukey. **B.** Imagen representativa de la expresión proteica de Rnd3 en las diferentes células de MM obtenida mediante western blot.

Además, se comprobó que el silenciamiento de la expresión de Rnd3 se mantenía en el tiempo (mínimo 7 semanas post-transducción, datos no mostrados). De modo que, en nuestro caso, las células RPMI scramble y deficientes en Rnd3, así como las células JJN3 silenciadas, fueron amplificadas y usadas en los experimentos posteriores junto con las células WT.

3. Rnd3 no altera la proliferación ni la progresión del ciclo celular en las líneas de MM

En primer lugar, una vez establecidas nuestras líneas de MM Rnd3 *knock-down* (KD), se analizaron la capacidad de proliferación y la progresión del ciclo celular que presentaban estas células en comparación con las células control (WT y scramble).

Para el análisis de la proliferación, se sembraron las células en placas de 96 pocillos y su capacidad de crecimiento se midió a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) mediante el ensayo de MTS, tal y como se detalla en material y métodos. Tanto en la línea RPMI 8226 como en la JJN3 se observa como las células deficientes en Rnd3 tienen un perfil de crecimiento similar al de las células silvestres (**figura 13A**).

Para realizar el análisis del ciclo celular, se tiñeron las células con yoduro de propidio para poder determinar el porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular (fase G1, fase S y fase G2/M) mediante citometría de flujo. Al igual que lo ocurrido en los ensayos de proliferación, en ambas líneas celulares, no se observan diferencias en las distintas fases del ciclo celular en las células deficientes en Rnd3 (**figura 13B**).

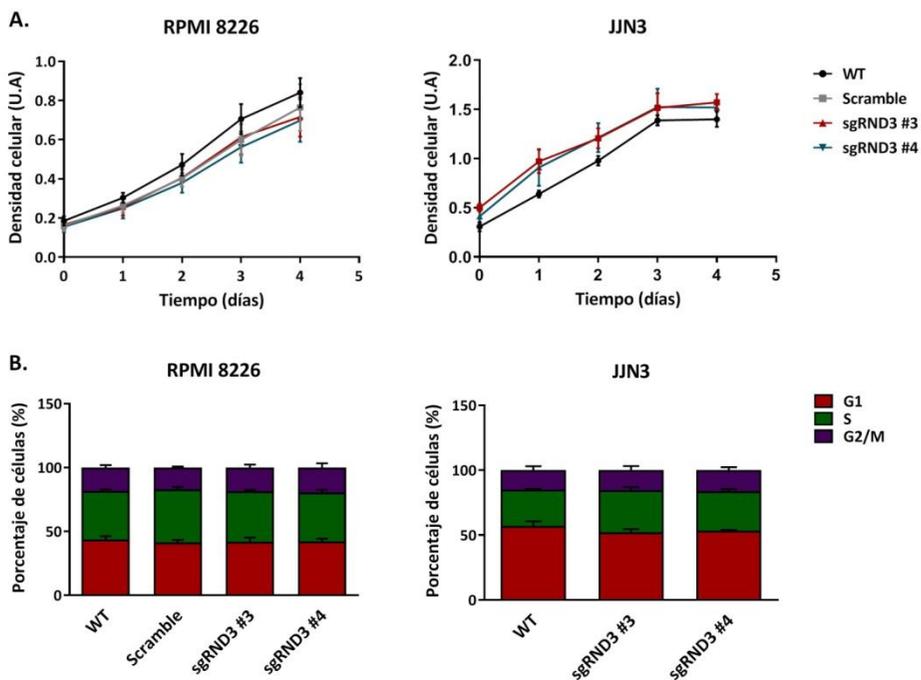


Figura 13. Las células deficientes en Rnd3 no presentan una alteración en su crecimiento ni en la progresión del ciclo celular. A. Representación de la densidad celular a diferentes tiempos obtenida a partir de la medida de absorbancia. **B.** Análisis mediante citometría de flujo de las distintas fases del ciclo celular. El test ANOVA (n=3) no muestra diferencias significativas en ninguno de los casos.

Por tanto, estos resultados indican que Rnd3 no está jugando un papel relevante en la progresión del ciclo celular ni en la capacidad de crecimiento de las células de MM.

4. La ausencia de Rnd3 no afecta a la capacidad de adhesión de las células de MM

Puesto que Rnd3 está implicado en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la formación de adhesiones focales, se estudió la capacidad de adhesión de las distintas líneas celulares. Para ello, se realizaron ensayos de adhesión a una matriz de fibronectina (FN). Las células previamente teñidas con Calcein-AM se sembraron en pocillos tratados o no tratados con FN. Las células se incubaron durante 4 horas y, después de lavar los pocillos con PBS para eliminar las células en suspensión, se midió la fluorescencia en cada uno de ellos para determinar la cantidad de células adheridas. Además, se añadieron pocillos control (que no fueron lavados tras la incubación) para determinar la fluorescencia correspondiente al número total de células sembradas y que sirvieron para calcular el porcentaje de adhesión correspondiente a cada tipo celular.

Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de adhesión de las células RPMI 8226 es el mismo tanto en células silvestres como deficientes en Rnd3 (**figura 14**). En el caso de las células JN3 se observa que dicho porcentaje de adhesión es significativamente superior en las células carentes de Rnd3 cuando se compara con las células JN3 WT (**figura 14**). Por tanto, estos resultados sugieren que Rnd3 no está implicado en el proceso de adhesión celular en las células de MM.

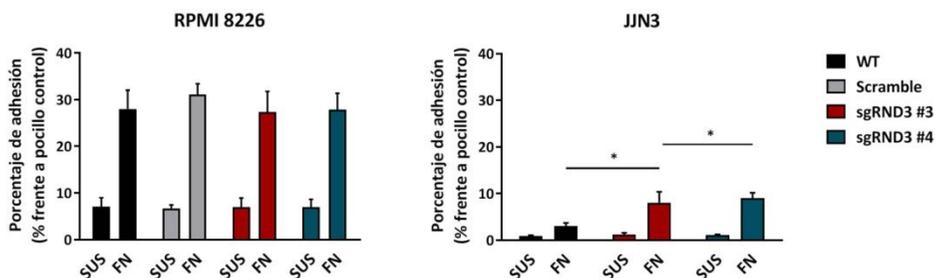


Figura 14. Las células silenciadas no presentan una alteración en la tasa de adhesión respecto a las células control. Análisis de la tasa de adhesión de las células RPMI y JLN3 deficientes en Rnd3. Los valores se calcularon mediante la relación de los pocillos en sus respectivas condiciones (suspensión y adhesión) frente a los pocillos control. El test de ANOVA (n=4) muestra diferencias significativas sólo en las células JLN3.

5. La sensibilidad a fármacos no se ve alterada en las células de MM en ausencia de Rnd3

Para esclarecer si Rnd3 estaba implicado en la resistencia a fármacos en las células de MM, se estudió la sensibilidad de ambas líneas celulares a una batería de fármacos usados en la clínica para el tratamiento del MM. Para ello, se escogieron 3 fármacos implicados en rutas de señalización celular diferentes para producir la muerte celular. En primer lugar, escogimos el fármaco S63845, un inhibidor de la proteína antiapoptótica Mcl1. El segundo de los fármacos utilizados fue el panobinostat, un inhibidor de HDAC y por último bortezomib, un inhibidor del proteasoma.

Para estudiar la sensibilidad de las células a estos fármacos, se realizaron ensayos de dosis-respuesta para obtener las diferentes curvas de supervivencia, tal y como se describe en material y métodos. Como se puede observar en la **figura 15**, las células deficientes en Rnd3 muestran

Resultados

un perfil de sensibilidad a fármaco similar a las células silvestres, y para todos los fármacos testados. De modo que los resultados sugieren que Rnd3 no está jugando un papel relevante en la sensibilidad a fármacos en células de MM.

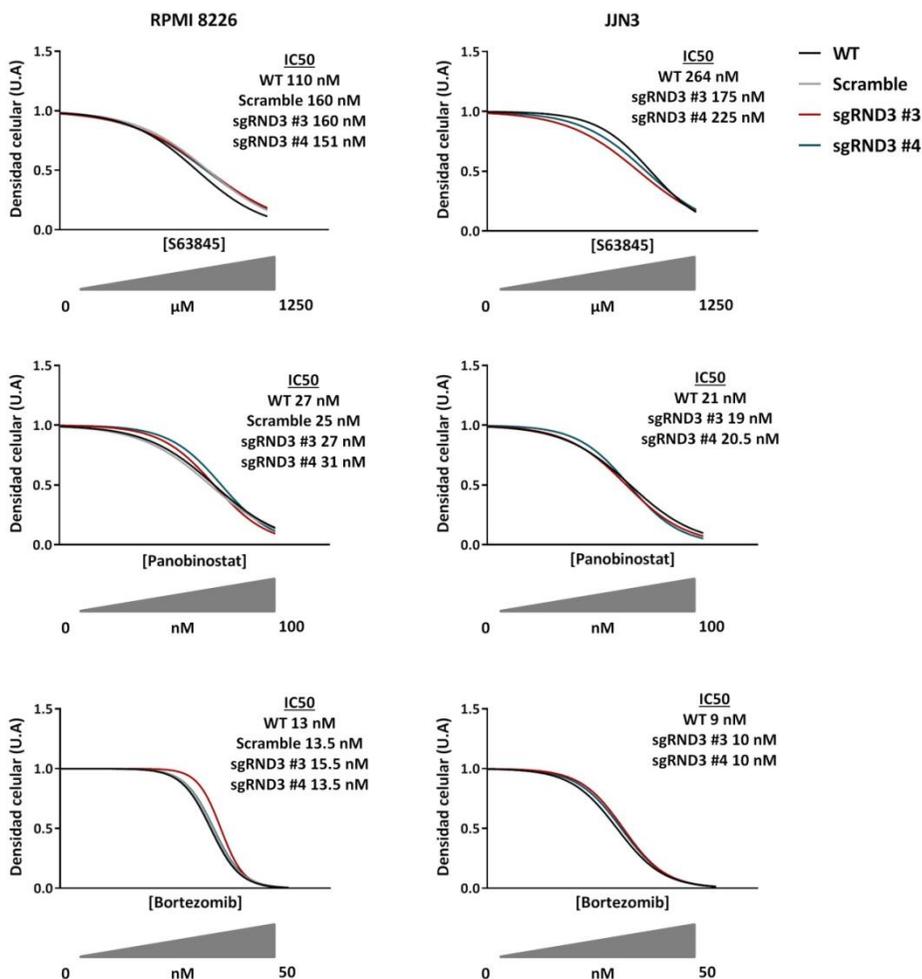


Figura 15. La ausencia de Rnd3 no altera la sensibilidad a fármacos en células de MM. Las gráficas muestran las curvas de dosis-respuesta a los diferentes fármacos testados (S63845, panobinostat y bortezomib) tanto en células RPMI y JLN3. El test ANOVA (n=2) no muestra diferencias significativas en la IC50 para cada fármaco entre los grupos de estudio.

6. La ausencia de Rnd3 no altera la supervivencia de las células tras la deprivación de nutrientes

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que, en un modelo celular de fibroblastos murinos inmortalizados, las células deficientes en Rnd3 presentaban una alteración del metabolismo oxidativo, siendo completamente dependientes de glucólisis. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió comprobar si ocurría lo mismo en nuestros modelos celulares de MM deficientes en Rnd3. Para ello, se realizaron experimentos de deprivación progresiva de nutrientes (glucosa y glutamina) durante 48 horas. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, tal y como se describe en material y métodos. Transcurridas las 48 horas se determinó la supervivencia celular.

Los resultados muestran una disminución en el número de células a medida que reducimos las concentraciones de glucosa o glutamina en el medio. No obstante, las células Rnd3 KD no presentan una alteración de la supervivencia respecto a las células control (**figura 16**), sugiriendo que la ausencia de Rnd3 no altera la sensibilidad a la deprivación de nutrientes.

Resultados

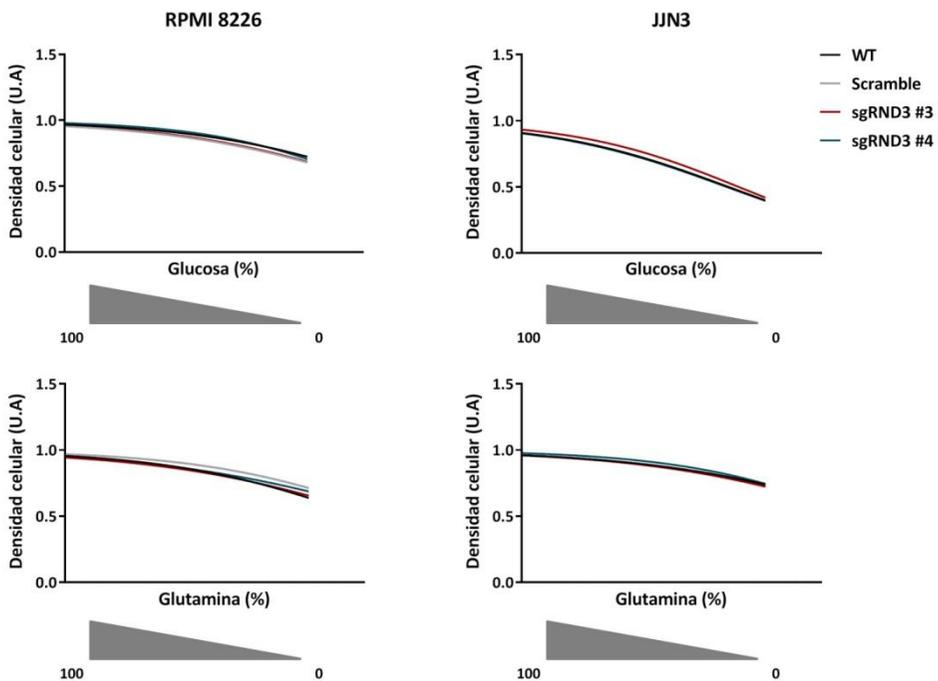


Figura 16. Las células deficientes en Rnd3 no presentan una sensibilidad mayor a la deprivación nutricional. Las gráficas muestran la supervivencia de las células al ser mantenidas en porcentajes decrecientes de glucosa y glutamina durante 48 horas. El test ANOVA (n=2) no muestra diferencias significativas en la viabilidad entre las células silenciadas y las células control.

7. Análisis del transcriptoma de las células de MM deficientes en Rnd3

Tras la caracterización del fenotipo de las dos líneas de MM deficientes en Rnd3 y al no encontrar diferencias en los procesos celulares en los que Rnd3 ha sido clásicamente implicado, se decidió realizar un estudio transcriptómico, con el fin de dilucidar el posible papel de esta proteína en el MM.

Para llevar a cabo el estudio del transcriptoma de las diferentes líneas celulares, se obtuvieron muestras de RNA procedentes de células RPMI y JLN3 controles y deficientes en Rnd3, tal y como se describe en material y métodos. Este RNA fue analizado mediante la técnica de secuenciación 3'UTR y se procedió a un estudio bioinformático para identificar la expresión diferencial de genes entre los distintos grupos celulares. Para ello se realizó el análisis agrupando las muestras en dos grupos: un grupo control, representado por las muestras de las células RPMI 8226 y JLN3 WT junto con las RPMI 8226 scramble; y un grupo de células silenciadas, en el que se incluían todas las muestras de las células deficientes en Rnd3, independientemente de la línea celular y del guía usado para su silenciamiento. De este modo, se seleccionaron los genes diferencialmente expresados de forma significativa y coherente en ambas líneas celulares.

Los resultados extraídos del análisis mostraron un total de 94 genes diferencialmente expresados de forma significativa entre los dos grupos de estudio y de forma coherente entre las dos líneas celulares, tal y como se muestra en la **figura 17**. En rojo se muestran aquellos genes con una mayor expresión mientras que el color verde corresponde con una expresión menor. Las muestras se agruparon de la siguiente manera: las células Rnd3 KD aparecen a la izquierda (en color rojo y naranja en función de la línea celular), mientras que las células control aparecen a la derecha (en color azul). Respecto a las líneas celulares, las células RPMI 8226 se representan en el árbol de agrupación en color verde claro y las células JLN3 en color rojo claro.

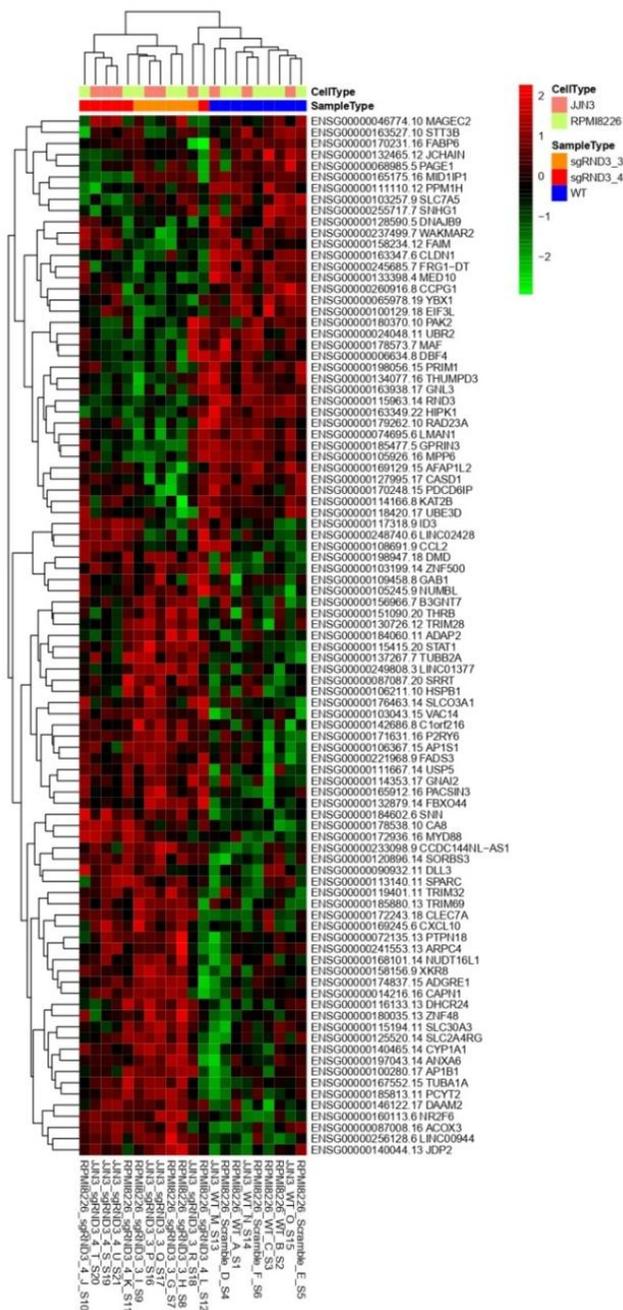


Figura 17. Panel de expresión diferencial entre las células deficientes en Rnd3 y las células control de ambas líneas celulares extraído del RNAseq. Los códigos de colores correspondientes a las muestras y a la expresión génica se detallan en el texto.

A continuación, se utilizó la base de datos Gene Ontology (GO) para realizar un estudio de enriquecimiento según las categorías basadas en los procesos biológicos asociados a dichos genes. Con este criterio, se seleccionaron los genes que presentaban diferencias significativas entre ambos grupos. Finalmente, se descartaron los genes asociados a procesos biológicos sin relevancia en MM. A partir de la información obtenida, establecimos un listado de 19 genes diferencialmente expresados que se agruparon en 6 categorías funcionales: transporte y movilización de iones de calcio, producción de citoquinas proinflamatorias, migración y motilidad celular, interacciones célula-célula, angiogénesis y señalización por AMP cíclico (**figura 18**). Todas estas categorías funcionales, se corresponden a procesos celulares que están relacionados entre sí y que se han descrito como relevantes en la fisiopatología del MM.

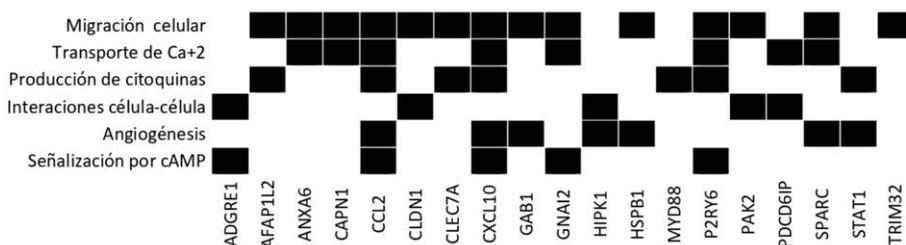


Figura 18. Representación del estudio de enriquecimiento de las categorías funcionales de GO a las que pertenecen los genes diferencialmente expresados de forma significativa entre las células control y silenciadas.

De entre todos los genes que se muestran en las figuras 16 y 17, se seleccionó *CXCL10*. Este gen codifica para una quimiocina proinflamatoria que es secretada por ciertos tipos celulares y que, al unirse a su receptor CXCR3, produce una cascada señalización

Resultados

intracelular que acaba en movilización de iones de calcio y en la regulación del citoesqueleto de actina. En general, CXCL10 está implicada en muchos procesos celulares como el crecimiento celular, la apoptosis y la modulación de la angiogénesis (actuando como antiangiogénico), pero sobre todo juega un papel importante en la polarización y la migración de células inmunitarias. Por este motivo, el papel del eje CXCL10/CXCR3 en la biología del MM y otras neoplasias es objeto de interés y está siendo ampliamente estudiado, sobre todo en la inmunovigilancia e inmunoterapia [129].

Los resultados obtenidos en el panel de expresión extraído del análisis bioinformático muestran cómo, las células silenciadas con el sgRND3 #3 presentan una mayor expresión de *CXCL10* en comparación con los valores de expresión de las células control (**figura 19**). En el caso del sgRND3 #4, este aumento de expresión se observa únicamente en las células JN3, siendo el perfil de los resultados en las RPMI 8226 similar a su grupo control.

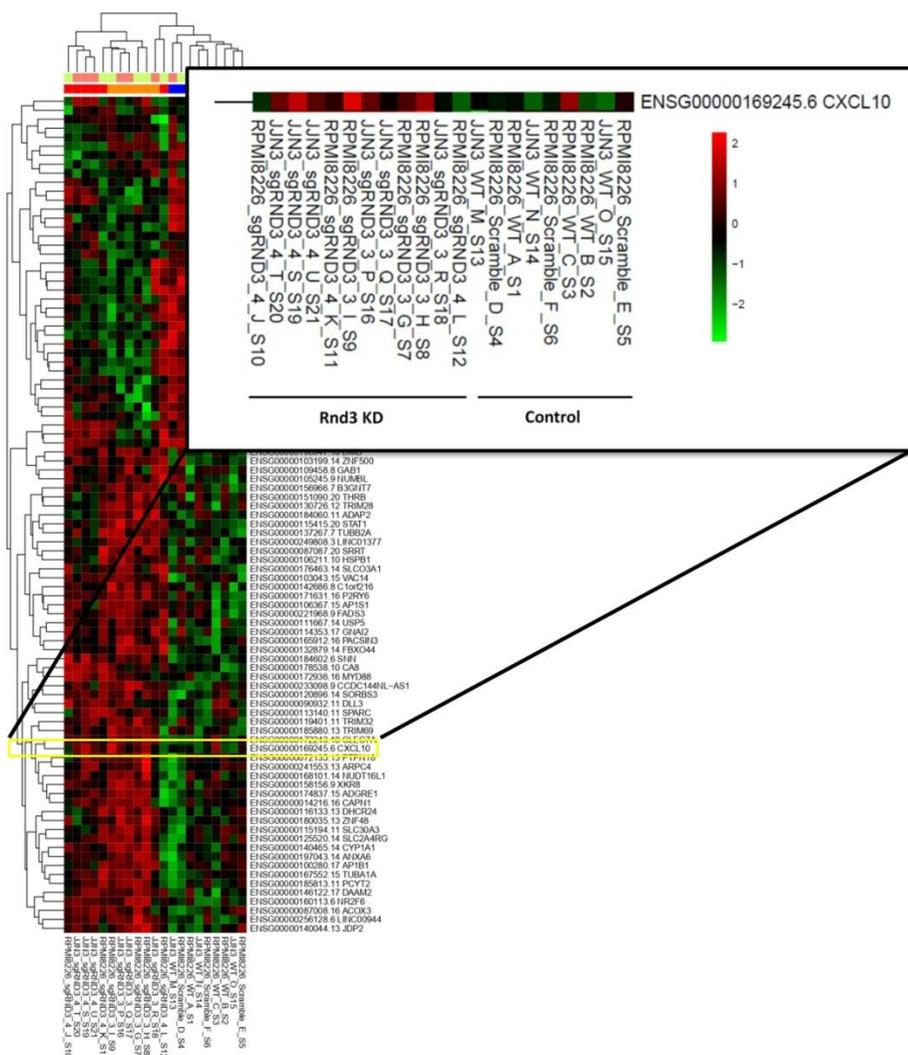


Figura 19. Extracto del panel de expresión diferencial resultante del análisis bioinformático. La región ampliada corresponde a la expresión de *CXCL10* según los datos de RNAseq en las diferentes líneas celulares que constituyen los dos grupos de estudio (control y Rnd3 KD).

8. La ausencia de Rnd3 produce un incremento de la expresión de CXCL10 en las células de MM

Para validar los resultados de expresión de *CXCL10* obtenidos mediante el análisis de RNAseq, se analizó mediante qPCR los niveles de expresión de mRNA de *CXCL10* en las células de MM. La expresión relativa de *CXCL10* se incrementa de forma significativa en las células deficientes en Rnd3 respecto a la expresión observada en las células control (**figura 20A**), no obstante, el comportamiento es distinto en las dos líneas celulares. En las células JN3 el incremento de la expresión es homogéneo tanto en las células silenciadas con el guía #3 como con el guía #4. En el caso de las células RPMI 8226 silenciadas con el guía #3 también se observa un aumento de la expresión de *CXCL10*, sin embargo las células silenciadas con el guía #4 muestran un patrón similar a las células control (**figura 20A**), confirmando los resultados previamente obtenidos con el análisis bioinformático.

Puesto que *CXCL10* es una citoquina secretada por las células, se decidió evaluar también los niveles de proteína secretada al medio de cultivo en las distintas líneas celulares. Para ello se sembraron las células durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo el medio se recolectó y se usó para realizar un ensayo de ELISA tal y como se describe en material y métodos. Del mismo modo que ocurre en el caso de los niveles de expresión génica, la secreción proteica de *CXCL10* al medio de cultivo se incrementa de forma significativa en las células deficientes en Rnd3 respecto a las células control. De nuevo, los resultados obtenidos en las células JN3 muestran que las células silenciadas con ambos guías incrementan de forma significativa la secreción de la proteína al medio celular respecto a las células WT (**figura 20B**).

En el caso de las células RPMI 8226, observamos que las células silenciadas con el guía #3 también muestran un aumento de la secreción de CXCL10. En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, donde no se observan cambios en la expresión de CXCL10 en las células silenciadas con el guía #4, decidimos no incluirlo en este experimento. (figura 20B).

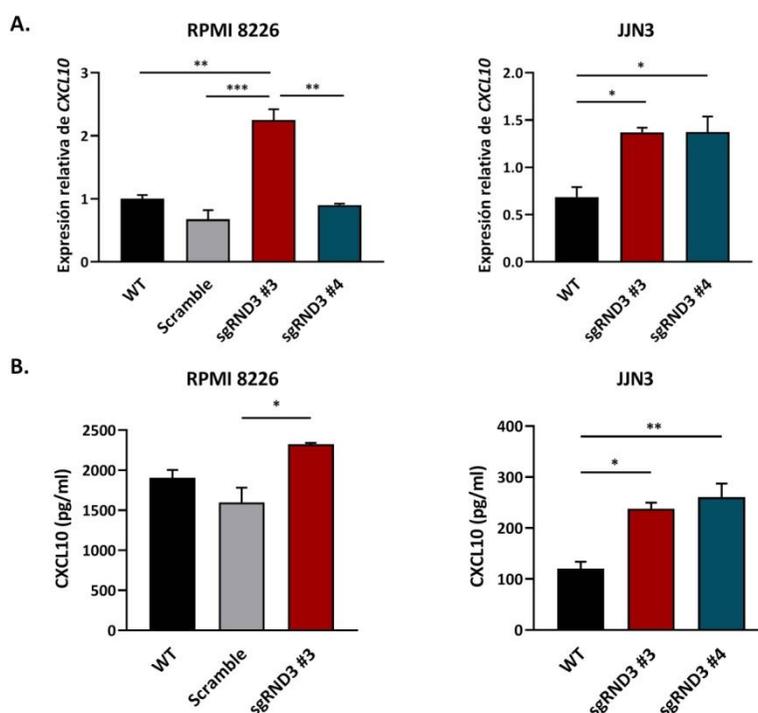
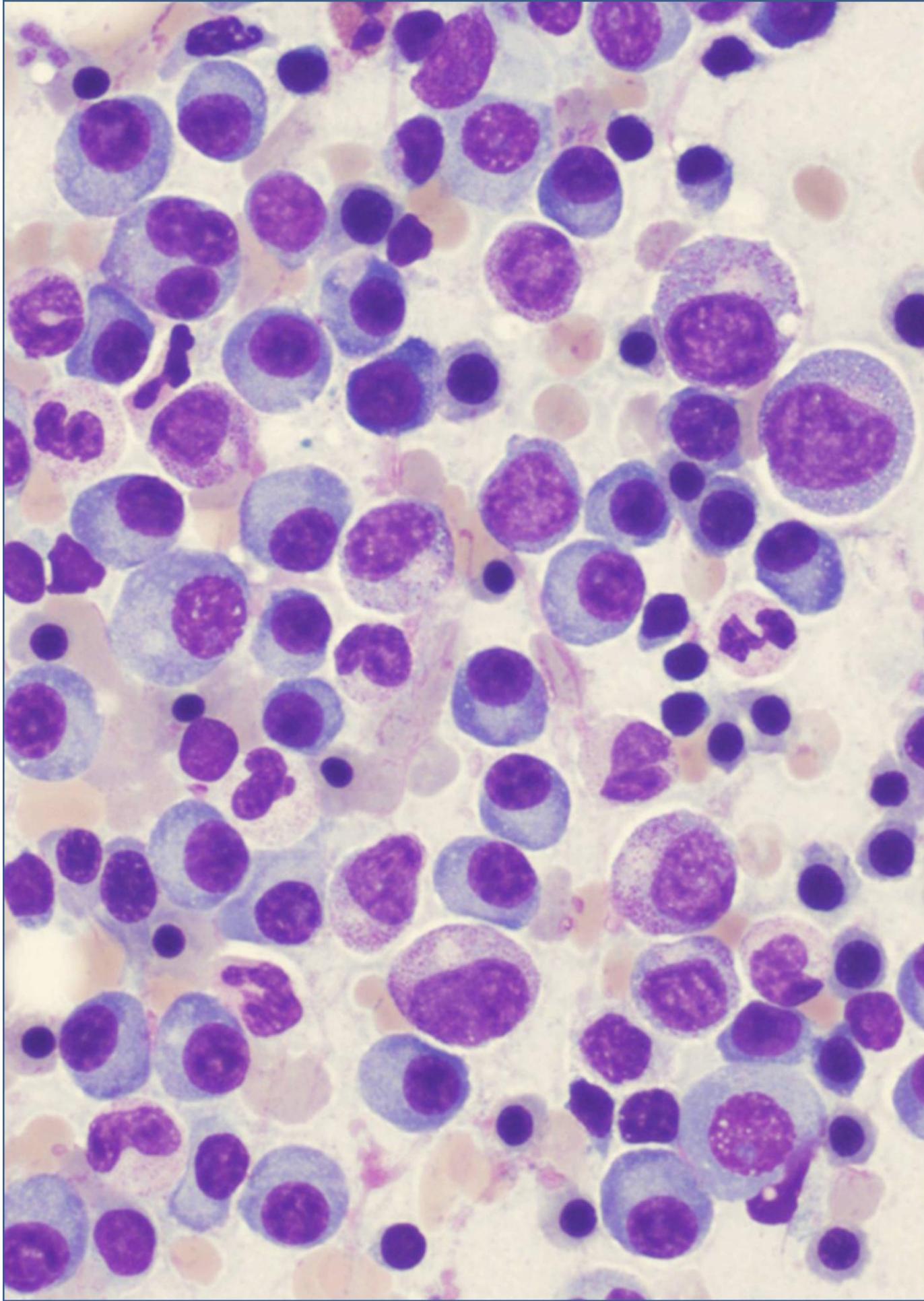


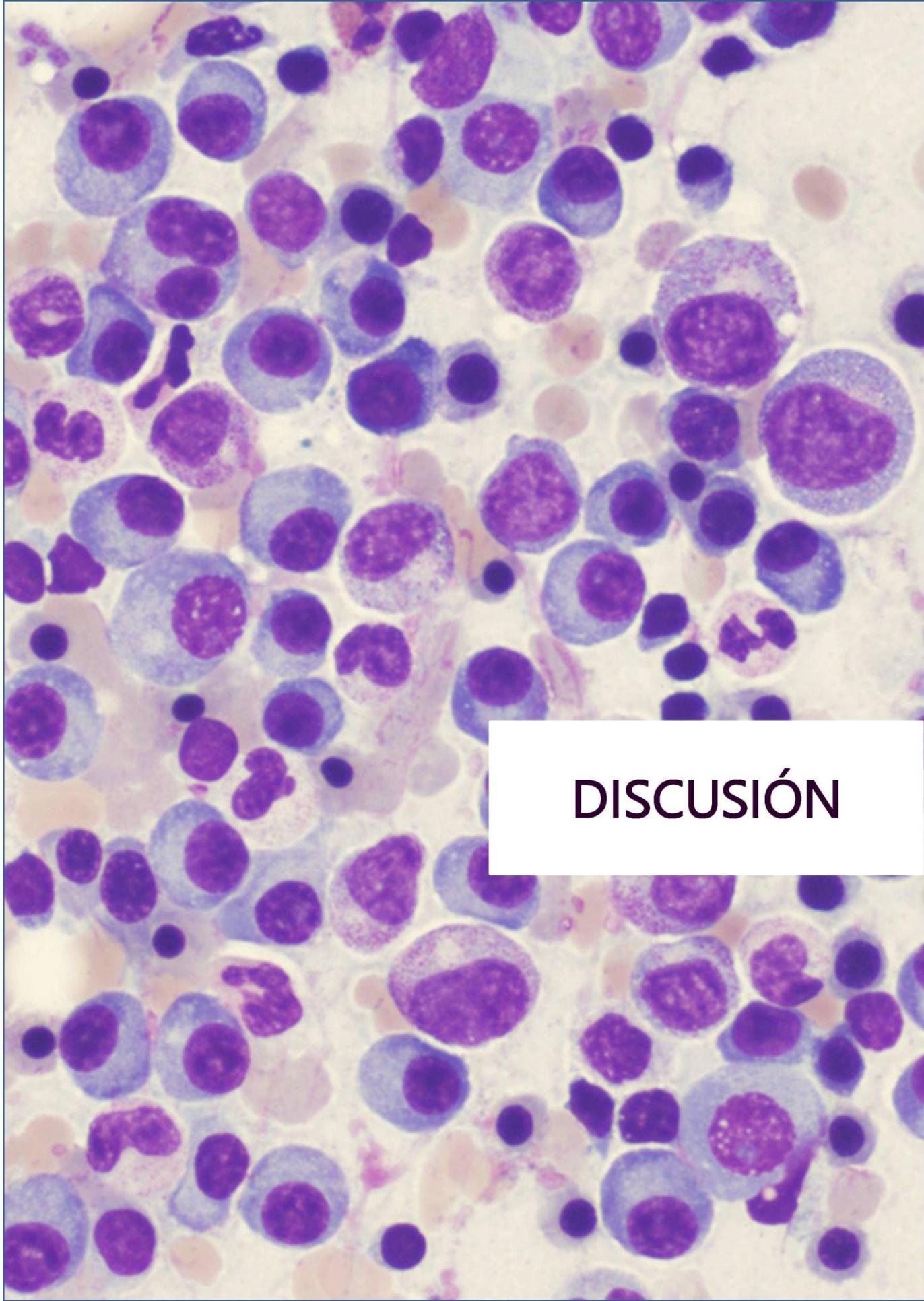
Figura 20. La ausencia de Rnd3 produce un incremento en la expresión y secreción de CXCL10. A. Representación de los niveles relativos de expresión del mRNA de CXCL10 en las diferentes líneas celulares. Se observa un aumento significativo de la expresión en las células Rnd3 KD respecto a las células control en ambas líneas celulares. **B.** Representación de la concentración proteica de CXCL10 en los medios de cultivo de cada una de las líneas celulares. El test ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos y el análisis *post hoc* de Tukey mostró las diferencias individuales entre los grupos (n=3).

Resultados

En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la ausencia de Rnd3 en dos modelos celulares de MM diferentes, produce un incremento de la expresión y la secreción de CXCL10.

En resumen, en este trabajo hemos querido caracterizar el papel de Rnd3 en el MM. Para ello, hemos generado dos líneas celulares de MM (RPMI 8226 y JIN3) deficientes en Rnd3, y hemos analizado su efecto en los procesos de proliferación y adhesión celular. Además hemos investigado el posible papel de Rnd3 en la sensibilidad a fármacos, ya que la resistencia al tratamiento es un fenómeno frecuente en esta enfermedad. Por último hemos realizado un estudio transcriptómico para determinar el papel de Rnd3 en la regulación de la expresión de genes implicados en MM. Como resultado de este análisis se han identificado genes diferencialmente expresados entre los dos grupos experimentales (control y Rnd3 KD). Entre todos los genes diferencialmente expresados en los dos grupos de estudio destacamos a *CXCL10*, un gen que codifica para una quimiocina implicada en la migración de las células del sistema inmunitario y que recientemente se ha relacionado con fenómenos de inmunoterapia e inmunovigilancia en diferentes tumores. Nuestros resultados muestran una expresión incrementada en las células deficientes en Rnd3, tanto a nivel de mRNA como de expresión proteica. Con estos resultados proponemos un nuevo papel de Rnd3 en la regulación de la expresión de CXCL10 y su posible papel en el MM.





DISCUSIÓN

Rnd3 es una proteína Rho atípica perteneciente a la subfamilia Rnd. Su característica principal es la ausencia de actividad GTPasa, permaneciendo constitutivamente activa [70, 71]. Entre todas sus funciones, la más conocida es la relacionada con la dinámica de formación del citoesqueleto de actina, jugando un papel inhibitorio de la vía RhoA/ROCK [79], inhibiendo la formación de fibras de estrés de actina. La proteína Rnd3 ha sido ampliamente implicada en fenómenos de proliferación, adhesión y migración celular, destacando su papel en el desarrollo neural así como en procesos de transformación tumoral. Resultados de nuestro laboratorio demuestran esa función, poniendo de manifiesto el papel de Rnd3 en el correcto desarrollo del sistema nervioso central, ya que su ausencia en un modelo murino se asocia con graves alteraciones neurales y motoras [95-98].

Debido a sus funciones sobre el ciclo celular, la migración y adhesión celular, así como en la apoptosis, Rnd3 también ha sido asociada con patologías como el cáncer [84]. Sin embargo, el papel que desempeña Rnd3 en la progresión tumoral es aún controvertido, ya que existen evidencias que demuestran tanto su función oncosupresora como su función oncogénica, sugiriendo que el papel de Rnd3 es dependiente del contexto celular y tisular [94]. Así, la expresión de Rnd3 se encuentra disminuida en tumores de células escamosas, hepáticos y prostáticos [90, 104-107], mientras que se encuentra incrementada en tumores gástricos y pulmonares, lo cual se asocia con un peor pronóstico [92, 108-110].

En nuestro laboratorio hemos demostrado que Rnd3 es necesario para la progresión del ciclo celular [93, 130]. Por otro lado, hemos demostrado la importancia de Rnd3 en la transformación tumoral, ya que su ausencia facilita la inmortalización celular y aumenta la

Discusión

susceptibilidad a la aparición de tumores en un modelo de inducción química. Del mismo modo, demostramos que Rnd3 interviene en la migración de las células tumorales, disminuyendo su potencial metastásico en un modelo murino [81].

Existen diversos estudios que demuestran el papel de las proteínas Rho en el desarrollo de neoplasias hematológicas. En nuestro caso, el interés en el papel de Rnd3 en tumores hematológicos surgió debido a una colaboración con el laboratorio de Síndromes Linfoproliferativos liderado por Dr. Martínez-Climent. En médula ósea y en células B la expresión de *RND3* es muy baja. Tras analizar la expresión de *RND3* en diferentes neoplasias hematológicas humanas observamos que su expresión se encuentra incrementada en MM. Por otro lado, analizando la expresión de *RND3* en bases de datos de expresión génica procedente de modelos murinos que mimetizan la enfermedad humana, observamos que su expresión aumenta a medida que progresa la enfermedad, siendo los valores de expresión más bajos en células plasmáticas normales de la médula ósea e incrementándose a medida que la patología progresa hacia el estadio intermedio MGUS y, por último, hasta la fase de MM. Estos resultados nos sugirieron que Rnd3 podría estar implicada en la enfermedad.

Tras analizar la expresión endógena de Rnd3 mediante western blot, escogimos dos líneas, RPMI 8226 y JLN3, y silenciamos la expresión de la proteína mediante la técnica CRISPRi. Una vez obtenidas las dos líneas celulares deficientes en Rnd3, lo primero que realizamos fue su caracterización fenotípica, puesto que no existen hasta el momento evidencias del papel de Rnd3 en MM.

Una de las características principales del MM son las translocaciones del cromosoma 14, que suelen afectar a la expresión y la función de las

ciclinas, encargadas de la progresión del ciclo celular. Es por ello, que las células plasmáticas causantes del MM presentan alteraciones en la entrada en fase G1/S [4, 6]. Como se ha comentado anteriormente, Rnd3 regula la proliferación en diferentes modelos celulares a través de la expresión de determinadas ciclinas, más concretamente ciclina D1, ciclina E y ciclina B1 [89, 90, 107, 131-134]. De hecho, en nuestro laboratorio hemos descrito que la sobreexpresión de Rnd3 produce una parada de ciclo celular debido a una disminución de la fosforilación de Rb y de ciclina D1 en células de glioblastoma humano [93]. Además, hemos demostrado que Rnd3 es necesario para la progresión del ciclo celular, ya que se acumula durante la fase G1 y su expresión disminuye durante la transición G1/S debido a su degradación por la acción de Skp2 [130]. En el caso del MM, otras proteínas Rho y sus efectores están influyendo sobre la progresión del ciclo celular. Una inhibición de la actividad de Rho, Cdc42 y Rac1 disminuye la proliferación de las células de MM sin afectar a su viabilidad [135]. Además, Citron, un efector de proteínas Rho esencial para la citocinesis en la progresión del ciclo celular, se encuentra incrementado en MM y su silenciamiento reduce la proliferación en células de MM tanto *in vitro* como *in vivo*, produciendo una acumulación de las células en fase G2/M [136]. Del mismo modo, la inhibición de la vía Rho/ROCK a través del bloqueo de RhoC impide la proliferación de líneas celulares de MM e incrementa su apoptosis [68]. Por otro lado, la proteína Rho atípica RhoU presenta una función reguladora de la proliferación en MM, ya que el silenciamiento de su expresión se relaciona con una disminución de ciclina D2, produciendo una parada del ciclo celular y una acumulación en fase G1 [69]. No obstante, a pesar de la implicación de diferentes proteínas Rho en la proliferación de las células de MM, nuestros resultados muestran que

Discusión

Rnd3 no está directamente implicado en la proliferación celular ni en la progresión del ciclo en este modelo celular.

En cuanto a las funciones de Rnd3, la más conocida es la que ejerce sobre la reorganización del citoesqueleto de actina. Actuando sobre sus diferentes efectores, Rnd3 es capaz de reducir la actividad de la vía RhoA/ROCK y, con ello, disminuir la formación de fibras de estrés en la célula [79, 83, 85]. Las células de MM no presentan una gran capacidad migratoria hasta las fases avanzadas de la enfermedad, donde las células son capaces de sobrevivir fuera de la médula ósea y provocar una leucemia de células plasmáticas. Sin embargo, el proceso de adhesión sí tiene una relevancia importante en la patología, sobre todo en relación con la resistencia a fármacos. En MM existe un fenómeno de resistencia a fármacos que está mediado por adhesión celular (CAM-DR), de modo que las células de MM son capaces de adherirse a la matriz de la médula ósea y resistir la apoptosis inducida por los fármacos [34, 137, 138]. Diferentes proteínas Rho se han visto implicadas en procesos de adhesión celular y CAM-DR en células de MM. Es el caso de RhoA, su expresión facilita la adhesión de células de MM a una matriz de fibronectina (FN) a través de la expresión de CXCL12 y la vía de señalización Wnt/RhoA/ROCK [64, 65]. Además, células MM con una mayor actividad de RhoA presentan una mayor expresión de la proteína de adhesión sindecan-1, facilitando su adhesión a una capa de células estromales [139]. En otro modelo de adhesión, un incremento de RhoA en las células estromales de la médula ósea induce un fenotipo más propicio para la adhesión de células MM [67]. Debido a que Rnd3 ejerce un papel antagonista sobre la función de RhoA y la vía de ROCK, decidimos testar su posible función en el proceso de adhesión en células de MM. Los resultados obtenidos evidencian que Rnd3 no está jugando un papel relevante en este proceso en los modelos celulares testados, ya

que su ausencia no afecta a la capacidad adherente de estas células a una matriz de FN. Hay que tener en cuenta que, las diferencias que se observan en el caso de las células JN3, no se pueden considerar relevantes para el transcurso de la enfermedad, ya que el porcentaje de adhesión observado en ausencia de Rnd3 respecto al número total de células es muy bajo (inferior al 10%). De hecho, el porcentaje de adhesión de las células RPMI 8226 en los pocillos no tratados ya es del 10%. En cualquier caso, los resultados observados podrían deberse a que las células de MM ya presentan un fenotipo redondeado (característico de la expresión de Rnd3) porque crecen en suspensión. Por otro lado, el silenciamiento de Rnd3 no provoca ningún cambio morfológico aparente que sugiera cambios en el citoesqueleto de actina o en las adhesiones focales. De hecho, otros autores tampoco observan cambios en la morfología de las células con niveles de RhoA elevados [139]. Otra posible explicación es que Rnd3 juega un papel en los procesos de adhesión en un contexto más relacionado con el microambiente, es decir, Rnd3 estaría mediando de manera indirecta en el proceso de adhesión. Para confirmar esta hipótesis, se deberían realizar ensayos de adhesión sobre una capa de células estromales, lo que quizás supondría un entorno más cercano al microambiente tumoral. De hecho, en el estudio del transcriptoma hemos observado cambios en la expresión de genes relacionados con las interacciones célula a célula.

Uno de los problemas asociados al MM es la gran cantidad de recaídas que sufren los pacientes después del tratamiento. Esto es debido a que las células de MM, a través de múltiples vías, son capaces de resistir el tratamiento y reproducir de nuevo la enfermedad. Es por ello que actualmente se utilizan combinaciones de diferentes fármacos entre los que se encuentran los agentes quimioterapéuticos convencionales, pero también otros como los inmunomoduladores y los

Discusión

anticuerpos monoclonales [30, 31]. En MM, como ya se ha comentado anteriormente, se ha demostrado el papel de RhoA en la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular [64, 65]. En nuestro caso, decidimos testar la sensibilidad de las células de MM a una batería de fármacos usados para el tratamiento de la enfermedad, como panobinostat, bortezomib y S63845. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que la ausencia de Rnd3 no afecta a la sensibilidad a los fármacos, a pesar de que existen evidencias de que esta proteína está implicada en fenómenos de resistencia a fármacos en otros tumores [106, 110, 140]. Especialmente interesante es el caso de la línea tumoral gástrica SGC7901/DDP, donde el silenciamiento de Rnd3 induce sensibilidad a cisplatino, mientras que la expresión de Rnd3 en la línea parental SGC7901 promueve la resistencia a determinados fármacos mediante la disminución de la expresión de Bax a nivel post-transcripcional [92]. Esto abriría la posibilidad de que pudiéramos observar algún cambio en la sensibilidad en el caso de S63845, ya que actúa sobre la misma vía, pero no se observa tal alteración.

Resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran un nuevo papel de Rnd3 en la funcionalidad mitocondrial y en el metabolismo glucolítico (Cueto-Ureña *et al.* Manuscrito en revisión). Estos resultados muestran como la ausencia de Rnd3 en fibroblastos murinos produce una alteración del metabolismo oxidativo y una mayor dependencia del metabolismo glucolítico, siendo los fibroblastos deficientes en Rnd3 dependientes de glucólisis. Por esta razón, y a pesar de que las células de MM son un modelo diferente a los fibroblastos, quisimos determinar si la ausencia de Rnd3 en estas líneas celulares producía un fenotipo similar. Los resultados obtenidos muestran que las células deficientes en Rnd3 no son más sensibles a la deprivación nutricional, ni en un modelo

de ausencia de glucosa ni a otro sustrato energético básico para los linfocitos como es la glutamina.

Puesto que los resultados obtenidos no muestran una función de Rnd3 en los procesos de proliferación, adhesión y metabolismo en células MM decidimos realizar un análisis transcriptómico, con el fin de ver qué rutas moleculares o procesos biológicos podían estar alterados y explicar una posible relación de Rnd3 con esta patología, que tal vez pudiera estar más relacionada con el microambiente tumoral y no tanto con las propias células plasmáticas causantes del tumor. Mediante el uso de técnicas bioinformáticas se establecieron diferencias transcripcionales entre los dos grupos de estudio: el control (RPMI 8226 WT, RPMI 8226 scramble y JJN3 WT) y el silenciado (ambas líneas deficientes en Rnd3 usando dos sgRNA diferentes). La mayoría de los genes expresados de forma diferencial entre ambos grupos se agruparon en 6 categorías funcionales según GO: transporte y movilización de iones de calcio, producción de citoquinas inflamatorias, migración y motilidad celular, interacciones célula-célula, angiogénesis y señalización por AMP cíclico. Todas ellas pueden tener una implicación en la patología del MM y, además, puesto que no aparece ninguna alteración fenotípica observable en las células deficientes en Rnd3, sería posible pensar que Rnd3 está alterando alguna de estas vías y que ello tiene su efecto en las células del microambiente tumoral.

De entre todos los genes que resultaron alterados en el análisis transcriptómico, destaca la presencia del gen *CXCL10*, cuya expresión se encuentra incrementada en las células deficientes en Rnd3. Este gen codifica para una quimiocina proinflamatoria que recientemente se ha asociado con procesos tumorales. Las quimiocinas son un grupo de alrededor de 50 proteínas secretables (aproximadamente 8-14kDa).

Discusión

Existen diferentes tipos de quimiocinas según la posición de los dos primeros residuos de cisteína: CC-, CXC-, C- y CX3C- [141, 142]. Al ser secretadas, las quimiocinas interactúan con sus receptores (receptores transmembrana acoplados a proteínas G), produciendo la cascada de señalización celular correspondiente. CXCL10, junto con CXCL9 y CXCL11, tienen como receptor a CXCR3. Este receptor se encuentra altamente expresado en diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario como monocitos, células dendríticas, linfocitos T efectores y NK, así como en determinadas células tumorales [143, 144].

La principal función de CXCL10 como quimiocina proinflamatoria es la de reclutar a las diferentes células del sistema inmunitario hacia el sitio de inflamación [145]. El eje CXCL10/CXCR3 tiene una gran importancia en la diferenciación de los linfocitos T inmaduros, induciendo su polarización hacia un fenotipo de linfocitos Th1, implicados en la respuesta inmunitaria frente a agentes externos [142, 143, 145, 146]. Además, se ha asociado la función de CXCL10 con un carácter antiangiogénico, debido a que no presenta el motivo ELR (Glu-Leu-Arg) característico de otras quimiocinas CXC-, y que se asocia con una función proangiogénica [146]. Así pues, gracias a la capacidad de movilización de las diferentes células del sistema inmunitario, junto con su capacidad antiangiogénica y el hecho de que las células tumorales puedan expresar su receptor, CXCL10 tiene una gran relevancia en la biología del cáncer [142, 143, 145, 146].

En cuanto a la función de CXCL10 en la progresión tumoral se proponen dos escenarios. El primero de ellos radica en que la secreción de CXCL10 actúe de forma autocrina sobre las propias células tumorales, promoviendo su supervivencia a modo de factor de crecimiento o movilizándolo a las células cancerosas hacia otros tejidos [147]. Por otro

lado, CXCL10 puede actuar también a nivel paracrino sobre las células del sistema inmunitario, reclutándolas al sitio del tumor para realizar su función. De hecho, esta señalización paracrina se ha relacionado con una mayor eficacia de la inmunoterapia, usándose como estrategia para hacer que un tumor “frío” (resistente a la inmunoterapia debido a su ambiente inmunosupresor), se vuelva un tumor “caliente” mediante señales proinflamatorias que induzcan una mayor sensibilidad a la inmunoterapia [147, 148].

En nuestro modelo, las células de MM deficientes en Rnd3 presentan un aumento significativo de la expresión y la secreción de CXCL10, indicando que Rnd3 actúa, directa o indirectamente, como un regulador negativo de la expresión de CXCL10 en estas células. Sin embargo, el aumento de la expresión y secreción de CXCL10 en las células deficientes en Rnd3 no produce ningún efecto sobre las propias células tumorales, ya que no hemos observado cambios en su proliferación, adhesión y sensibilidad a fármacos. Esta ausencia de fenotipo en las células Rnd3 KD se explica por la expresión del receptor de CXCL10 en estas células de MM, ya que todas ellas presentan una expresión similar y muy baja de CXCR3 según el análisis transcriptómico (datos no mostrados), sugiriendo que el papel modulador de Rnd3 sobre CXCL10 puede producir una señalización de tipo paracrina sobre las células del microambiente tumoral y del sistema inmunitario.

Respecto a su función antiangiogénica, la expresión de CXCL10 se asocia con una reducción del tamaño tumoral debido a una disminución en la formación de vasos sanguíneos en determinados modelos murinos [149, 150]. Lo mismo ocurre en el caso del MM, donde se ha demostrado que un incremento de la expresión de CXCL10 por parte de células de MM reduce la proliferación de células endoteliales *in vitro* [151].

Discusión

Además, la sobreexpresión de CXCL10 es capaz de reducir la capacidad proangiogénica de las células *in vitro* y bloquear el crecimiento tumoral *in vivo* inhibiendo la angiogénesis y reduciendo el daño óseo provocado por la enfermedad [152]. Esto podría sugerir que, en células de MM con alta expresión de Rnd3, los niveles de CXCL10 estarían disminuidos, lo que implicaría una mayor capacidad angiogénica por parte de las células plasmáticas causantes del tumor y un peor pronóstico de la enfermedad.

También existen evidencias de que CXCL10 se asocia con un buen pronóstico en determinados tipos tumorales debido a su capacidad para reclutar localmente a los linfocitos efectores. Así, la expresión de CXCL10 en cáncer ovárico se asocia con una mayor supervivencia y un aumento de linfocitos efectores (sobre todo CD4⁺ y CD8⁺) en el sitio del tumor [153, 154]. Del mismo modo, un tratamiento con inhibidores de DPP4 incrementa la expresión de CXCL10 en melanoma y promueve la infiltración tumoral de linfocitos efectores [155]. Además, esto hace que los tumores respondan mejor a la inmunoterapia anti-PD1 y anti-CTLA4, ya que el reclutamiento de linfocitos efectores incrementa la inflamación en el sitio tumoral y reduce la inmunosupresión, facilitando por tanto la actuación de la inmunoterapia [153-155].

En relación con el MM, existen diversos estudios que se oponen a la función oncosupresora de CXCL10, relacionando su expresión con un peor pronóstico, debido a que el incremento de CXCL10 puede asociarse con un incremento de su receptor en los linfocitos NK, que a su vez puede interferir en la señalización del eje CXCL12/CXCR4 en estos linfocitos e impedir su retención en la médula ósea, lo cual se traduce en un menor reclutamiento de NK y una menor supervivencia de los ratones [156-158].

No obstante, en modelos murinos, se ha demostrado que la expresión de CXCL10 en células de MM produce una menor generación de tumores y el tratamiento de los ratones con CXCL10 reduce de forma significativa el tamaño del tumor e incrementa el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos y NK [151]. Teniendo esto en cuenta, nuestra hipótesis es que el incremento de CXCL10 observado en las células de MM deficientes en *Rnd3* podría facilitar el reclutamiento de linfocitos efectores a la médula ósea, reduciendo la inmunosupresión característica del MM, generada por los linfocitos T reguladores, y mejorando la inmunoterapia.

Estudios recientes establecen una relación entre CXCL10 y las proteínas Rho. Por un lado, hay un estudio que demuestra la modulación de CXCL10 en células dendríticas a través de *Rac1*, ya que la inhibición farmacológica de esta proteína Rho reduce la secreción de CXCL10 a través de las vías de señalización ERK, p38 y JNK [159]. Más interesantes todavía son los resultados obtenidos en otro estudio donde se demuestra que los pacientes con tumores gástricos con mutaciones en *RHOA* presentan un microambiente tumoral inmunosupresivo con una gran infiltración de linfocitos T reguladores [160]. Estas mutaciones tienen como resultado una menor actividad de RhoA, que disminuye su unión a GTP y a sus efectores. Esto produce una activación de la ruta PI3K-Akt, que se traduce en una inhibición de STAT1 e IRF1, que son los reguladores transcripcionales de CXCL10. Por tanto, la menor actividad de RhoA reduce la secreción de CXCL10, que está asociada con el reclutamiento de linfocitos T efectores [160]. Estos autores también describen que las mutaciones en *RHOA* producen una menor respuesta al tratamiento anti-PD1, debido al gran ambiente inmunosupresor. Sin embargo, una inhibición de Akt en estos tumores activa a STAT1 e IRF1 y se incrementa la expresión y secreción de CXCL10 que, a su vez, es capaz de reclutar linfocitos T citotóxicos al ambiente tumoral, lo cual mejora

Discusión

significativamente el tratamiento anti-PD1 [160]. Así pues, este estudio propone a RhoA como un regulador de la expresión de CXCL10, ya que los tumores que no presentan mutaciones en su gen incrementan la expresión de la quimiocina y presentan una mayor infiltración de linfocitos T efectores.

Estos resultados coinciden con nuestra hipótesis sobre el papel de Rnd3 en la regulación de CXCL10, puesto que Rnd3 tiene una función antagónica sobre la actividad de RhoA. Además, sabemos que la expresión de Rnd3 se encuentra incrementada en muestras de MM y que ello se relaciona con una represión de CXCL10 en nuestro modelo celular, ya que la ausencia de Rnd3 incrementa los niveles de la quimiocina.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos en tumores gástricos, es lógico pensar que, en MM, el incremento de Rnd3 pueda estar inhibiendo la actividad de RhoA. Esto, del mismo modo que ocurre en los tumores gástricos con mutaciones en *RHOA*, puede provocar que se inhiba la activación de STAT1 e IRF1 y se reduzca la expresión de CXCL10 y el reclutamiento de linfocitos efectores, limitando la respuesta a la inmunoterapia. Además, este escenario coincidiría con el análisis transcriptómico de las líneas celulares, puesto que en el panel de expresión diferencial observamos un incremento de *CXCL10* en las células deficientes en Rnd3, y también un incremento en *STAT1* (datos no mostrados), lo cual iría en la misma dirección que los resultados observados en tumores gástricos.

Por otro lado, otro estudio reciente en diferentes líneas tumorales demuestra que la inhibición de MEK en combinación con otros fármacos es capaz de inducir la expresión de CXCL10, aumentando el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos al ambiente tumoral y

mejorando el tratamiento anti-PD1 [161]. Esto también puede tener su relevancia para el papel de Rnd3 en MM, ya que se sabe que la ruta MEK está constitutivamente activa en la mayoría de los pacientes con MM debido a mutaciones en los genes que participan en esta vía. Teniendo en cuenta la activación de la ruta MEK y la expresión de Rnd3 en MM, y viendo el papel que juega la inhibición de MEK sobre la expresión de CXCL10 en diferentes líneas tumorales, se podría sugerir un papel regulador de MEK en la expresión de Rnd3 que, a su vez, regule la expresión de CXCL10 a través de RhoA y STAT1 en células de MM. De hecho, ya se ha descrito un papel regulador de MEK en la expresión de Rnd3 en líneas celulares epiteliales y de melanoma, en las cuales una inhibición de MEK provoca una disminución de la expresión de Rnd3 [162, 163].

Así pues, nuestros resultados muestran que la expresión de Rnd3 en MM reprime la expresión de CXCL10. Esto no tiene un efecto sobre las propias células tumorales, por lo que sugiere un papel de Rnd3 sobre el microambiente tumoral y sobre el sistema inmunitario. Resultados de otros autores nos llevan a pensar que este papel represor de Rnd3 sobre CXCL10 pueda estar regulado por la activación de la vía MEK y/o por la inhibición de la actividad de RhoA y STAT1, sugiriendo un nuevo papel de Rnd3 como regulador negativo de la expresión de CXCL10 en MM, lo que podría correlacionarse con un peor pronóstico de la enfermedad (**figura 21**).

Discusión

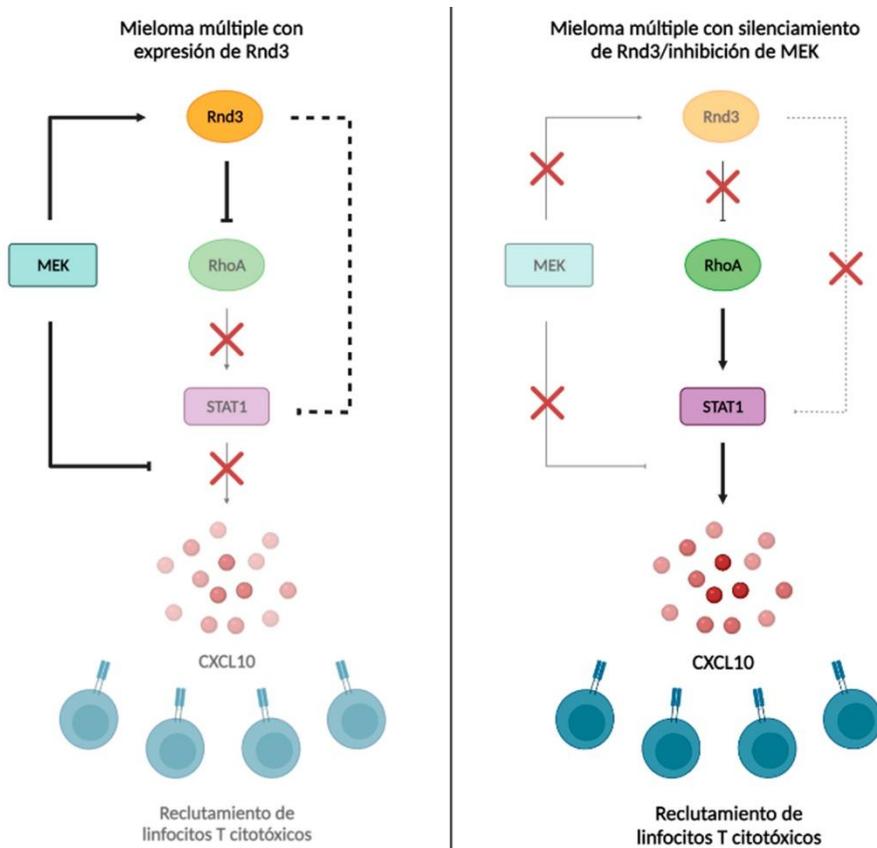
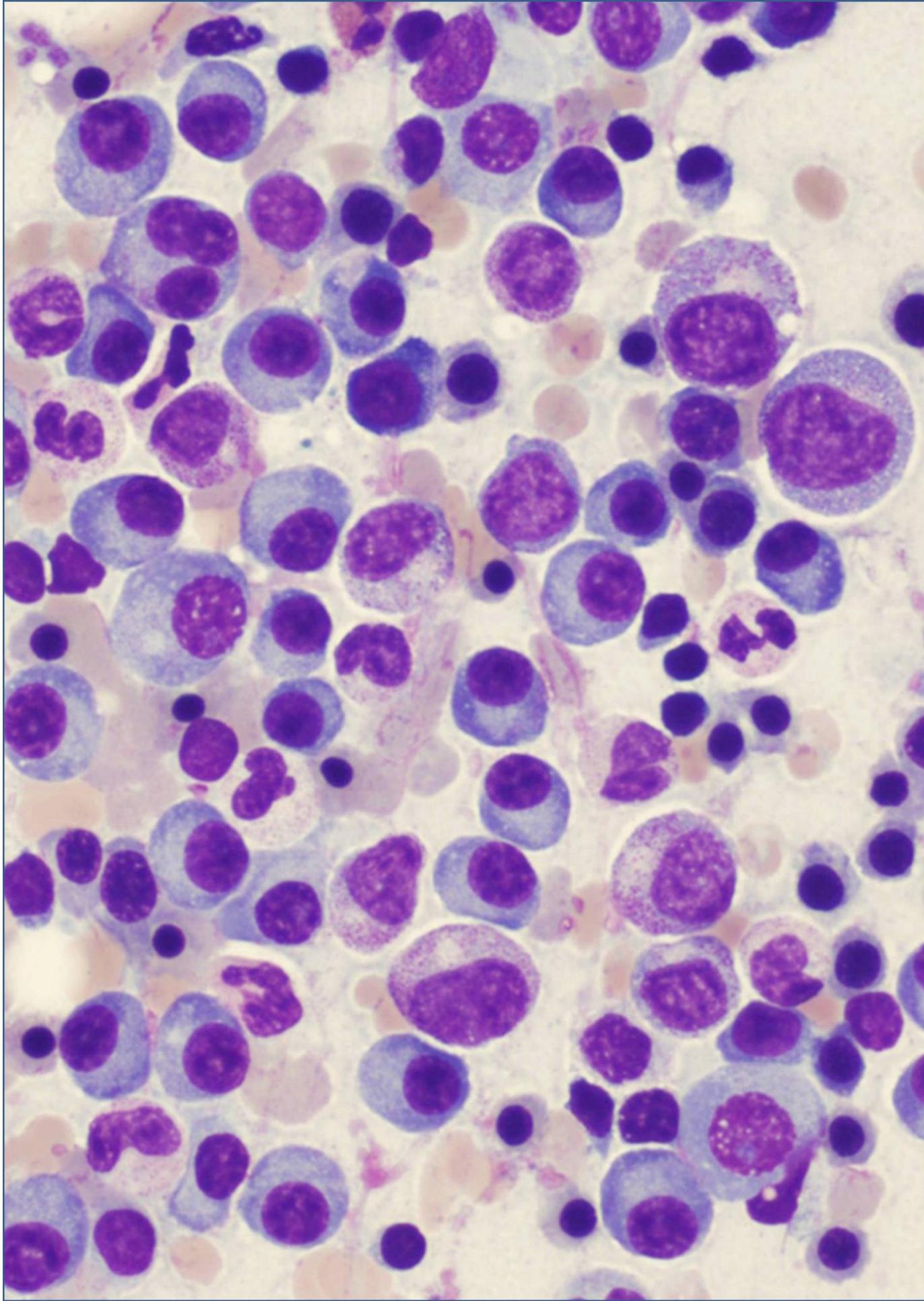
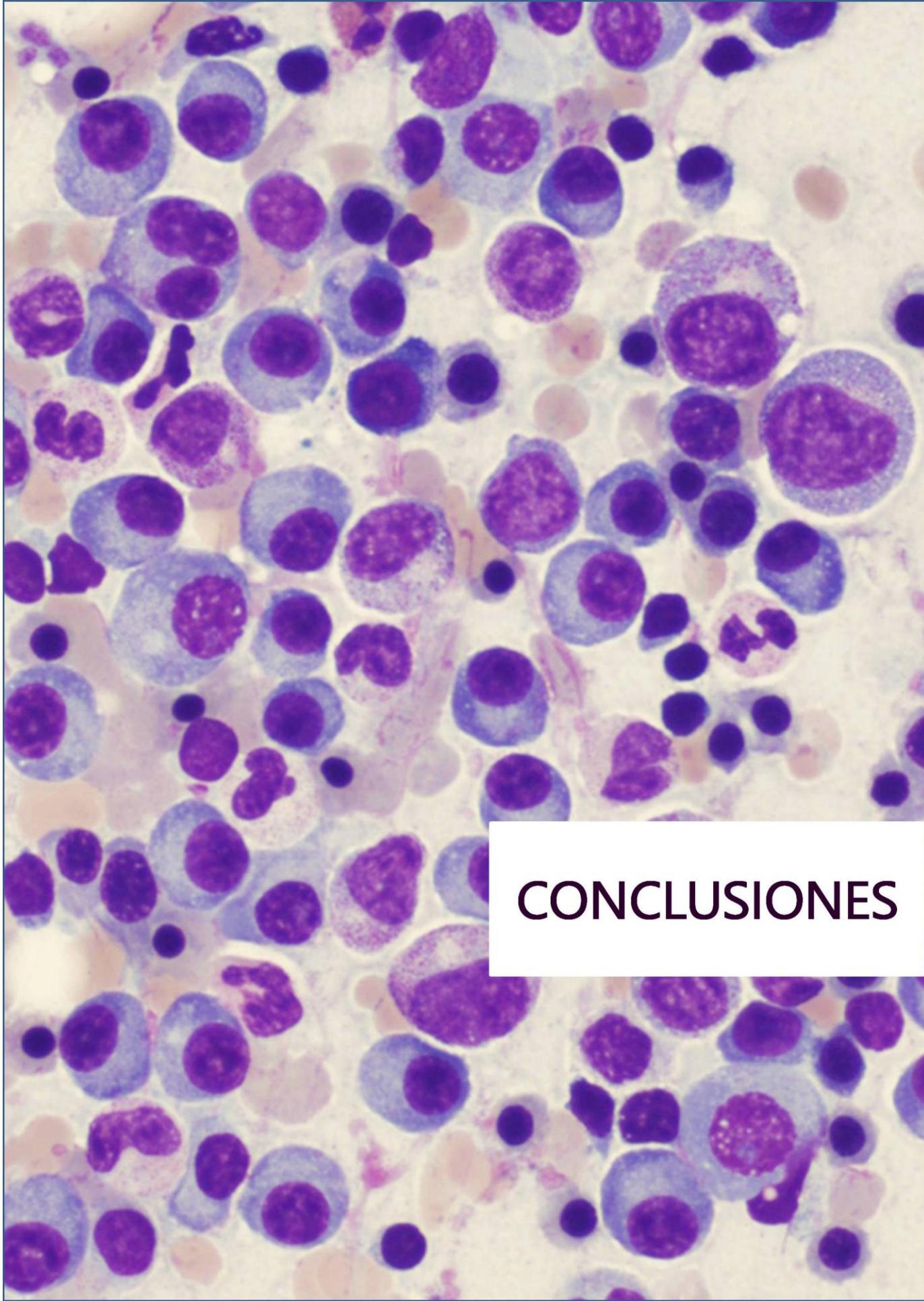


Figura 21. Esquema representativo de nuestra hipótesis sobre el papel de Rnd3 en MM. A la izquierda, las células de MM con expresión de Rnd3. Esta expresión puede deberse a la activación de MEK en MM. En este modelo, Rnd3 estaría inhibiendo la vía RhoA/ROCK, que a su vez inhibiría la expresión de CXCL10 a través de STAT1 y el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos. A la derecha, la inhibición de MEK y/o el silenciamiento de Rnd3 permitiría la activación de la vía RhoA/ROCK y, con ello, la expresión de CXCL10 y el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos.

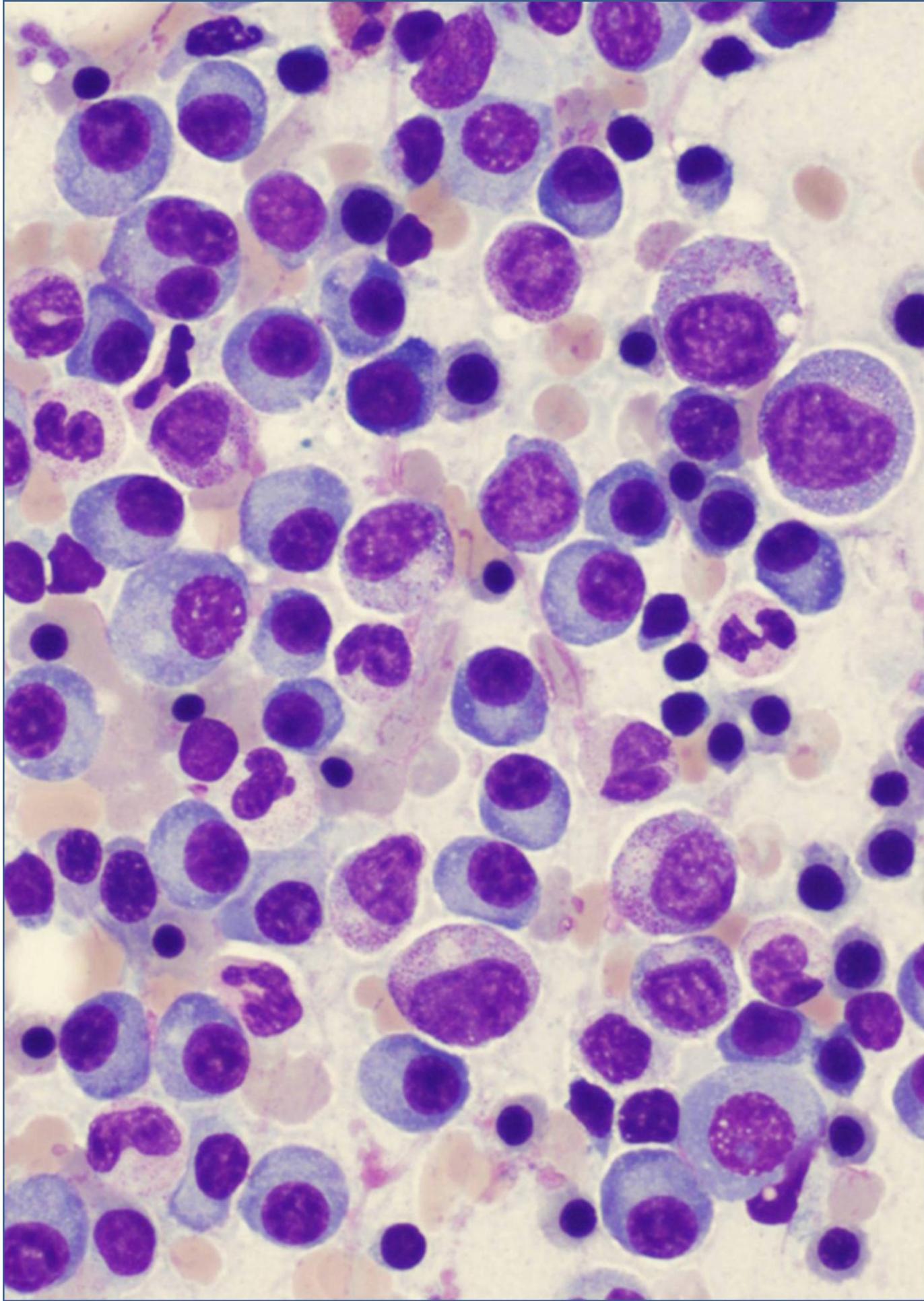
No obstante, se requiere la realización de más estudios sobre este campo para poder determinar claramente cuál es la relación entre Rnd3 y CXCL10 y su implicación en el MM, así como la modulación de la expresión de Rnd3 como una nueva estrategia terapéutica frente a la progresión de MM.

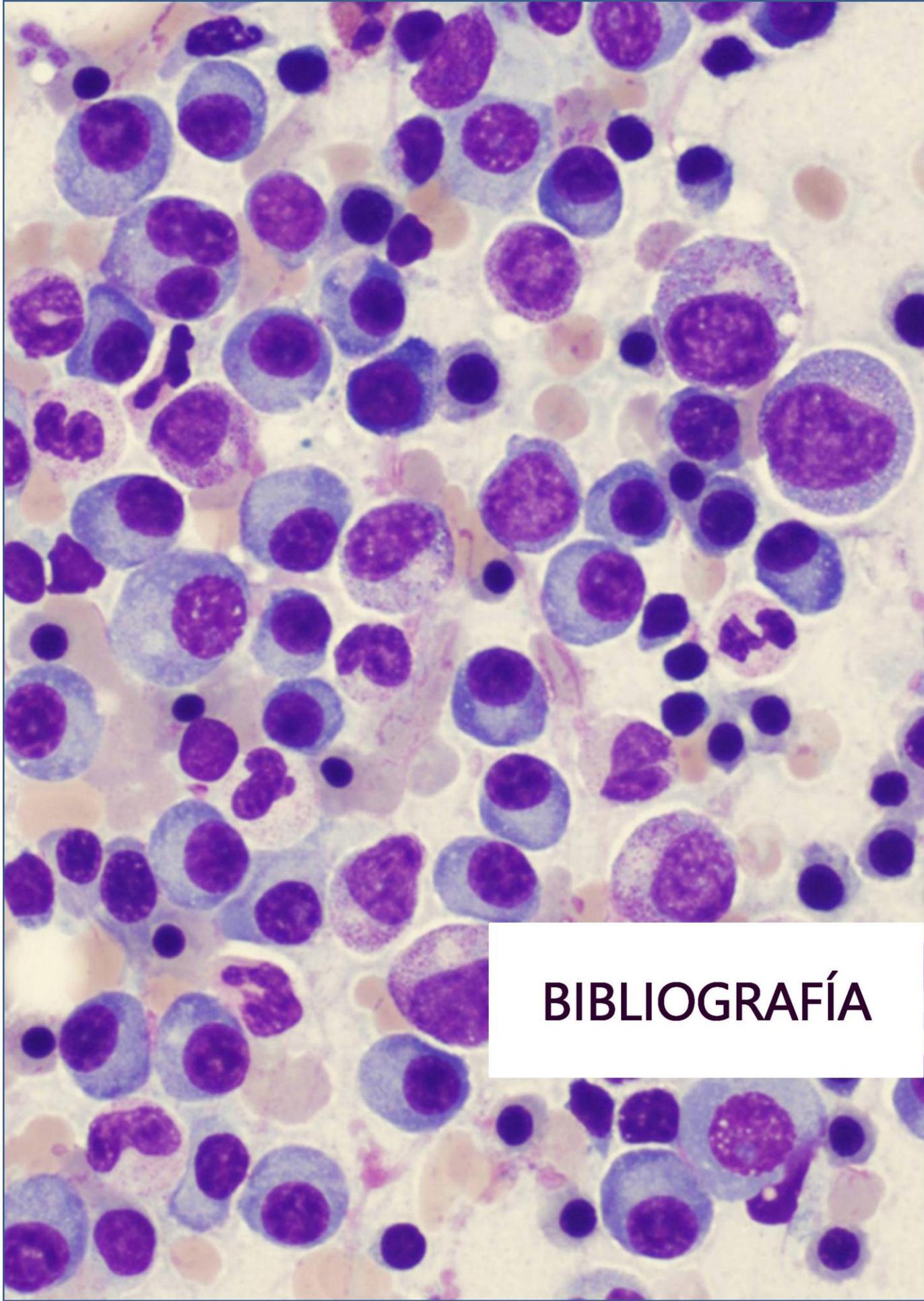




CONCLUSIONES

1. La expresión de *RND3* se incrementa en muestras procedentes de modelos murinos y pacientes con MM frente a células plasmáticas sanas y otras células B.
2. Rnd3 se expresa en varias líneas celulares de MM.
3. La ausencia de Rnd3 no produce un fenotipo evidente en células MM, no encontrando alteraciones en proliferación, adhesión ni en la sensibilidad al tratamiento y deprivación de nutrientes.
4. Las células de MM deficientes en Rnd3 presentan alteraciones transcripcionales en procesos relacionados con la patología.
5. La ausencia de Rnd3 incrementa la expresión y secreción de CXCL10 en células de MM. Este incremento no produce una respuesta de tipo autocrino, ya que no observamos cambios en el fenotipo de estas células.
6. Con estos resultados, planteamos un nuevo papel de Rnd3 en MM, en concreto en la regulación de la expresión de CXCL10 a través de la vía RhoA/ROCK y STAT1.





BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar, S.K., et al., *Multiple myeloma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17046.
2. *Survival Rates for Multiple Myeloma*. 2022 [cited 2022 21th March]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
3. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 335-48.
4. Heider, M., et al., *Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution*. Oncol Res Treat, 2021. **44**(12): p. 672-681.
5. Furukawa, Y. and J. Kikuchi, *Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma*. Int J Hematol, 2020. **111**(4): p. 496-511.
6. Pawlyn, C. and G.J. Morgan, *Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(9): p. 543-556.
7. Kumar, S.K. and S.V. Rajkumar, *The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(7): p. 409-421.
8. Maura, F., et al., *Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3835.
9. Walker, B.A., et al., *A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis*. Leukemia, 2019. **33**(1): p. 159-170.
10. Keats, J.J., et al., *Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma*. Cancer Cell, 2007. **12**(2): p. 131-44.
11. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
12. Agirre, X., et al., *Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers*. Genome Res, 2015. **25**(4): p. 478-87.

Bibliografía

13. Heuck, C.J., et al., *Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis*. J Immunol, 2013. **190**(6): p. 2966-75.
14. Lovén, J., et al., *Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers*. Cell, 2013. **153**(2): p. 320-34.
15. Lodé, L., et al., *Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma*. Haematologica, 2010. **95**(11): p. 1973-6.
16. Boyd, K.D., et al., *The clinical impact and molecular biology of del(17p) in multiple myeloma treated with conventional or thalidomide-based therapy*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(10): p. 765-74.
17. Walker, B.A., et al., *APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6997.
18. Robiou du Pont, S., et al., *Genomics of Multiple Myeloma*. J Clin Oncol, 2017. **35**(9): p. 963-967.
19. Corre, J., et al., *Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients*. Leukemia, 2018. **32**(12): p. 2636-2647.
20. Anderson, K., et al., *Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 356-61.
21. Lomas, O.C., S. Tahri, and I.M. Ghobrial, *The microenvironment in myeloma*. Curr Opin Oncol, 2020. **32**(2): p. 170-175.
22. Redondo-Muñoz, J., A. García-Pardo, and J. Teixidó, *Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 156.
23. Martínez-Moreno, M., et al., *In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by α 461 cytoplasmic-binding proteins*. Leukemia, 2016. **30**(4): p. 861-72.
24. García-Ortiz, A., et al., *The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression*. Cancers (Basel), 2021. **13**(2).
25. Roodman, G.D., *Pathogenesis of myeloma bone disease*. J Cell Biochem, 2010. **109**(2): p. 283-91.
26. Silbermann, R. and G.D. Roodman, *Myeloma bone disease: Pathophysiology and management*. J Bone Oncol, 2013. **2**(2): p. 59-69.

27. Petty, A.J. and Y. Yang, *Tumor-Associated Macrophages in Hematologic Malignancies: New Insights and Targeted Therapies*. Cells, 2019. **8**(12).
28. Beider, K., et al., *Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype*. Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11283-96.
29. Lad, D., et al., *Evaluating the role of Tregs in the progression of multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2019. **60**(9): p. 2134-2142.
30. Minnie, S.A. and G.R. Hill, *Immunotherapy of multiple myeloma*. J Clin Invest, 2020. **130**(4): p. 1565-1575.
31. Pinto, V., et al., *Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
32. Kubiczikova, L., et al., *Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(6): p. 947-61.
33. Afifi, S., et al., *Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Focus on Vorinostat and Panobinostat*. Pharmacotherapy, 2015. **35**(12): p. 1173-88.
34. Di Marzo, L., et al., *Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players*. Oncotarget, 2016. **7**(37): p. 60698-60711.
35. Botta, C., et al., *Mechanisms of Immune Evasion in Multiple Myeloma: Open Questions and Therapeutic Opportunities*. Cancers (Basel), 2021. **13**(13).
36. Kotla, V., et al., *Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies*. J Hematol Oncol, 2009. **2**: p. 36.
37. Lu, G., et al., *The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins*. Science, 2014. **343**(6168): p. 305-9.
38. Laubach, J.P., et al., *Daratumumab, Elotuzumab, and the Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma*. Clin Pharmacol Ther, 2017. **101**(1): p. 81-88.

Bibliografía

39. Jaffe, A.B. and A. Hall, *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 247-69.
40. Hall, A., *Rho family GTPases*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(6): p. 1378-82.
41. Haga, R.B. and A.J. Ridley, *Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology*. Small GTPases, 2016. **7**(4): p. 207-221.
42. Hodge, R.G. and A.J. Ridley, *Regulating Rho GTPases and their regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(8): p. 496-510.
43. Mosaddeghzadeh, N. and M.R. Ahmadian, *The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling*. Cells, 2021. **10**(7).
44. Spiering, D. and L. Hodgson, *Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 170-80.
45. Xu, B., et al., *RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2012. **227**(6): p. 2722-9.
46. Carlier, M.F., A. Ducruix, and D. Pantaloni, *Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection*. Chem Biol, 1999. **6**(9): p. R235-40.
47. Yamazaki, D., T. Oikawa, and T. Takenawa, *Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 86-100.
48. Ridley, A.J., *Rho GTPase signalling in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 103-12.
49. Lawson, C.D. and A.J. Ridley, *Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion*. J Cell Biol, 2018. **217**(2): p. 447-457.
50. Guan, X., et al., *Rho GTPases and related signaling complexes in cell migration and invasion*. Exp Cell Res, 2020. **388**(1): p. 111824.
51. Orgaz, J.L., C. Herraiz, and V. Sanz-Moreno, *Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells*. Small GTPases, 2014. **5**: p. e29019.

52. Mammoto, A., et al., *Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26323-30.
53. Klein, E.A., et al., *NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac*. Cell Cycle, 2007. **6**(9): p. 1115-21.
54. Chou, M.M., J.M. Masuda-Robens, and M.L. Gupta, *Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35241-7.
55. Vega, F.M. and A.J. Ridley, *Rho GTPases in cancer cell biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
56. Li, H., et al., *Rho GTPases and cancer*. Biofactors, 2014. **40**(2): p. 226-35.
57. Bustelo, X.R., *RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges*. Biochem Soc Trans, 2018. **46**(3): p. 741-760.
58. Porter, A.P., A. Papaioannou, and A. Malliri, *Deregulation of Rho GTPases in cancer*. Small GTPases, 2016. **7**(3): p. 123-38.
59. Svensmark, J.H. and C. Brakebusch, *Rho GTPases in cancer: friend or foe?* Oncogene, 2019. **38**(50): p. 7447-7456.
60. Jung, H., et al., *Dysregulation of Rho GTPases in Human Cancers*. Cancers (Basel), 2020. **12**(5).
61. Pillé, J.Y., et al., *Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo*. Mol Ther, 2005. **11**(2): p. 267-74.
62. Zhang, S., et al., *RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(4): p. 570-80.
63. Stengel, K. and Y. Zheng, *Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis*. Cell Signal, 2011. **23**(9): p. 1415-23.
64. Azab, A.K., et al., *RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma*. Blood, 2009. **114**(3): p. 619-629.

Bibliografía

65. Kobune, M., et al., *Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007. **6**(6): p. 1774-1784.
66. Ullmannova-Benson, V., et al., *DLC1 tumor suppressor gene inhibits migration and invasion of multiple myeloma cells through RhoA GTPase pathway*. *Leukemia*, 2009. **23**(2): p. 383-90.
67. Choi, D.S., et al., *SDF-1 α stiffens myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells through the activation of RhoA-ROCK-Myosin II*. *International Journal of Cancer*, 2015. **136**(5): p. E219-E229.
68. Feng, X., et al., *The Effect of Ras Homolog C/Rho-Associated Coiled-Protein Kinase (Rho/ROCK) Signaling Pathways on Proliferation and Apoptosis of Human Myeloma Cells*. *Medical Science Monitor*, 2019. **25**: p. 7605-7616.
69. Canovas Nunes, S., et al., *The small GTPase RhoU lays downstream of JAK/STAT signaling and mediates cell migration in multiple myeloma*. *Blood Cancer Journal*, 2018. **8**(2).
70. Chardin, P., *Function and regulation of Rnd proteins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(1): p. 54-62.
71. Riou, P., P. Villalonga, and A.J. Ridley, *Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression*. *Bioessays*, 2010. **32**(11): p. 986-92.
72. Boureux, A., et al., *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. *Mol Biol Evol*, 2007. **24**(1): p. 203-16.
73. Nobes, C.D., et al., *A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion*. *J Cell Biol*, 1998. **141**(1): p. 187-97.
74. Garavini, H., et al., *Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein*. *Biochemistry*, 2002. **41**(20): p. 6303-10.
75. Aspenström, P., A. Ruusala, and D. Pacholsky, *Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(17): p. 3673-9.

76. Riento, K., et al., *RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation*. *Embo j*, 2005. **24**(6): p. 1170-80.
77. Madigan, J.P., et al., *Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C alpha-mediated phosphorylation*. *Biochem J*, 2009. **424**(1): p. 153-61.
78. Basbous, S., et al., *Pathophysiological functions of Rnd proteins*. *Small GTPases*, 2021. **12**(5-6): p. 336-357.
79. Wennerberg, K., et al., *Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP*. *Curr Biol*, 2003. **13**(13): p. 1106-15.
80. Azzarelli, R., F. Guillemot, and E. Pacary, *Function and regulation of Rnd proteins in cortical projection neuron migration*. *Front Neurosci*, 2015. **9**: p. 19.
81. Hernández-Sánchez, M., et al., *RhoE is required for contact inhibition and negatively regulates tumor initiation and progression*. *Oncotarget*, 2015. **6**(19): p. 17479-90.
82. Ikenouchi, J. and K. Aoki, *Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases*. *Small GTPases*, 2017. **8**(2): p. 85-89.
83. Goh, L.L. and E. Manser, *The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(37): p. 31311-20.
84. Jie, W., et al., *Pathophysiological Functions of Rnd3/RhoE*. *Compr Physiol*, 2015. **6**(1): p. 169-86.
85. Monaghan-Benson, E., et al., *A Rnd3/p190RhoGAP pathway regulates RhoA activity in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts*. *Mol Biol Cell*, 2018. **29**(18): p. 2165-2175.
86. Goh, L.L. and E. Manser, *The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12409.
87. Riento, K., et al., *RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(12): p. 4219-29.
88. Julian, L. and M.F. Olson, *Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions*. *Small GTPases*, 2014. **5**: p. e29846.

Bibliografía

89. Villalonga, P., et al., *RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 7829-40.
90. Bektic, J., et al., *Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis*. Prostate, 2005. **64**(4): p. 332-40.
91. Chiarugi, P. and E. Giannoni, *Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1352-64.
92. Li, K., et al., *RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(2): p. 212-6.
93. Poch, E., et al., *RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line*. Exp Cell Res, 2007. **313**(4): p. 719-31.
94. Paysan, L., et al., *Rnd3 in Cancer: A Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor*. Mol Cancer Res, 2016. **14**(11): p. 1033-1044.
95. Ballester-Lurbe, B., et al., *RhoE is spatiotemporally regulated in the postnatal mouse CNS*. Neuroscience, 2009. **163**(2): p. 586-93.
96. Mocholí, E., et al., *RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19236.
97. Ballester-Lurbe, B., et al., *RhoE deficiency alters postnatal subventricular zone development and the number of calbindin-expressing neurons in the olfactory bulb of mouse*. Brain Struct Funct, 2015. **220**(6): p. 3113-30.
98. Madrigal, M.P., et al., *Rnd3 is necessary for the correct oligodendrocyte differentiation and myelination in the central nervous system*. Brain Struct Funct, 2021.
99. Liebig, T., et al., *RhoE is required for keratinocyte differentiation and stratification*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 452-63.
100. Yue, X., et al., *Rnd3 haploinsufficient mice are predisposed to hemodynamic stress and develop apoptotic cardiomyopathy with heart failure*. Cell Death Dis, 2014. **5**(6): p. e1284.

101. Klein, R.M. and A.E. Aplin, *Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2224-33.
102. Gadea, G., et al., *Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices*. *J Cell Biol*, 2007. **178**(1): p. 23-30.
103. Rubenstein, N.M., et al., *Rnd3/RhoE induces tight junction formation in mammary epithelial tumor cells*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**(1): p. 74-82.
104. Grise, F., et al., *Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion*. *Hepatology*, 2012. **55**(6): p. 1766-75.
105. Luo, H., et al., *Down-regulation of RhoE is associated with progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. *J Surg Oncol*, 2012. **105**(7): p. 699-704.
106. Ma, W., et al., *RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-kinase/myosin phosphatase target pathway*. *Hepatology*, 2013. **57**(1): p. 152-61.
107. Zhao, H., et al., *RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(5): p. 1363-74.
108. Cuiyan, Z., et al., *Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes*. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(3): p. 335-42.
109. Zhang, C., et al., *Overexpression of RhoE has a prognostic value in non-small cell lung cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(9): p. 2628-35.
110. Chang, L., et al., *MicroRNA-200c regulates the sensitivity of chemotherapy of gastric cancer SGC7901/DDP cells by directly targeting RhoE*. *Pathol Oncol Res*, 2014. **20**(1): p. 93-8.
111. Luo, H., et al., *Up-regulated miR-17 promotes cell proliferation, tumour growth and cell cycle progression by targeting the RND3 tumour suppressor gene in colorectal carcinoma*. *Biochem J*, 2012. **442**(2): p. 311-21.

Bibliografía

112. Zhou, J., et al., *RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20**(1): p. 175-82.
113. Clarke, K., et al., *Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(7): p. e1005325.
114. Shang, C., et al., *miR-128 regulates the apoptosis and proliferation of glioma cells by targeting RhoE*. *Oncol Lett*, 2016. **11**(1): p. 904-908.
115. Jiang, Y., et al., *CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(1): p. 38-53.
116. Agirre, X., et al., *Long non-coding RNAs discriminate the stages and gene regulatory states of human humoral immune response*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 821.
117. Carrasco-Leon, A., et al., *Characterization of complete lncRNAs transcriptome reveals the functional and clinical impact of lncRNAs in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2021. **35**(5): p. 1438-1450.
118. Mandegar, M.A., et al., *CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs*. *Cell Stem Cell*, 2016. **18**(4): p. 541-53.
119. Renzette, N., *Generation of Transformation Competent E. coli*. *Current Protocols in Microbiology*, 2011. **22**(1): p. A.3L.1-A.3L.5.
120. Kingston, R.E., C.A. Chen, and J.K. Rose, *Calcium phosphate transfection*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2003. **Chapter 9**: p. Unit 9.1.
121. Bagnoli, J.W., et al., *Sensitive and powerful single-cell RNA sequencing using mcSCR-seq*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2937.
122. Dobin, A., et al., *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(1): p. 15-21.
123. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(7): p. 923-30.
124. Harrow, J., et al., *GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project*. *Genome Res*, 2012. **22**(9): p. 1760-74.

125. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
126. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
127. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. e47.
128. Yu, G., et al., *clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters*. Omics, 2012. **16**(5): p. 284-7.
129. Liu, M., S. Guo, and J.K. Stiles, *The emerging role of CXCL10 in cancer (Review)*. Oncol Lett, 2011. **2**(4): p. 583-589.
130. Lonjedo, M., et al., *The Rho family member RhoE interacts with Skp2 and is degraded at the proteasome during cell cycle progression*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 30872-82.
131. Tong, J., et al., *TGF- β 1 stimulates human Tenon's capsule fibroblast proliferation by miR-200b and its targeting of p27/kip1 and RND3*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(4): p. 2747-56.
132. Tang, Y., et al., *Rnd3 regulates lung cancer cell proliferation through notch signaling*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111897.
133. Wang, H., et al., *The Rho GTPase RhoE exerts tumor-suppressing effects in human esophageal squamous cell carcinoma via negatively regulating epidermal growth factor receptor*. J Cancer Res Ther, 2016. **12**(Supplement): p. 60-63.
134. Zhou, J., et al., *Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer*. Autophagy, 2016. **12**(3): p. 515-28.
135. van de Donk, N.W., et al., *Geranylgeranylated proteins are involved in the regulation of myeloma cell growth*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 429-39.
136. Sahin, I., et al., *Citron Rho-interacting kinase silencing causes cytokinesis failure and reduces tumor growth in multiple myeloma*. Blood Adv, 2019. **3**(7): p. 995-1002.

Bibliografía

137. Furukawa, Y. and J. Kikuchi, *Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma*. *Int J Hematol*, 2016. **104**(3): p. 281-92.
138. Katz, B.Z., *Adhesion molecules--The lifelines of multiple myeloma cells*. *Semin Cancer Biol*, 2010. **20**(3): p. 186-95.
139. Fuhler, G.M., et al., *Bone marrow stromal cell interaction reduces syndecan-1 expression and induces kinomic changes in myeloma cells*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(11): p. 1816-28.
140. Ryan, K.R., et al., *Plakoglobin-dependent regulation of keratinocyte apoptosis by Rnd3*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 13): p. 3202-9.
141. Karin, N., *Chemokines and cancer: new immune checkpoints for cancer therapy*. *Curr Opin Immunol*, 2018. **51**: p. 140-145.
142. Karin, N. and H. Razon, *Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity*. *Cytokine*, 2018. **109**: p. 24-28.
143. Karin, N., *CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 976.
144. Russo, E., A. Santoni, and G. Bernardini, *Tumor inhibition or tumor promotion? The duplicity of CXCR3 in cancer*. *J Leukoc Biol*, 2020. **108**(2): p. 673-685.
145. Karin, N. and G. Wildbaum, *The Role of Chemokines in Shaping the Balance Between CD4(+) T Cell Subsets and Its Therapeutic Implications in Autoimmune and Cancer Diseases*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 609.
146. Tokunaga, R., et al., *CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy*. *Cancer Treat Rev*, 2018. **63**: p. 40-47.
147. Do, H.T.T., C.H. Lee, and J. Cho, *Chemokines and their Receptors: Multifaceted Roles in Cancer Progression and Potential Value as Cancer Prognostic Markers*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(2).
148. Karin, N., *Chemokines in the Landscape of Cancer Immunotherapy: How They and Their Receptors Can Be Used to Turn Cold Tumors into Hot Ones?* *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(24).

149. Arenberg, D.A., et al., *Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10)*. *Cancer Immunol Immunother*, 2001. **50**(10): p. 533-8.
150. Zhao, M., et al., *Combining CXCL10 gene therapy and radiotherapy improved therapeutic efficacy in cervical cancer HeLa cell xenograft tumor models*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(2): p. 768-772.
151. Barash, U., et al., *Heparanase enhances myeloma progression via CXCL10 downregulation*. *Leukemia*, 2014. **28**(11): p. 2178-87.
152. Storti, P., et al., *Galectin-1 suppression delineates a new strategy to inhibit myeloma-induced angiogenesis and tumoral growth in vivo*. *Leukemia*, 2016. **30**(12): p. 2351-2363.
153. Bronger, H., et al., *CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer*. *Br J Cancer*, 2016. **115**(5): p. 553-63.
154. Peng, D., et al., *Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy*. *Nature*, 2015. **527**(7577): p. 249-53.
155. Barreira da Silva, R., et al., *Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(8): p. 850-8.
156. Bernardini, G., et al., *High expression levels of IP10/CXCL10 are associated with modulation of the natural killer cell compartment in multiple myeloma*. *Leuk Lymphoma*, 2017. **58**(10): p. 2493-2496.
157. Bonanni, V., et al., *Targeting of CXCR3 improves anti-myeloma efficacy of adoptively transferred activated natural killer cells*. *J Immunother Cancer*, 2019. **7**(1): p. 290.
158. Ponzetta, A., et al., *Multiple Myeloma Impairs Bone Marrow Localization of Effector Natural Killer Cells by Altering the Chemokine Microenvironment*. *Cancer Res*, 2015. **75**(22): p. 4766-77.
159. Nabhan, M., et al., *Growth Hormone Aggregates Activation of Human Dendritic Cells Is Controlled by Rac1 and PI3 Kinase Signaling Pathways*. *J Pharm Sci*, 2020. **109**(1): p. 927-932.

Bibliografía

160. Kumagai, S., et al., *An Oncogenic Alteration Creates a Microenvironment that Promotes Tumor Progression by Conferring a Metabolic Advantage to Regulatory T Cells*. *Immunity*, 2020. **53**(1): p. 187-203.e8.
161. Limagne, E., et al., *MEK inhibition overcomes chemoimmunotherapy resistance by inducing CXCL10 in cancer cells*. *Cancer Cell*, 2022.
162. Hansen, S.H., et al., *Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(24): p. 9364-75.
163. Klein, R.M., et al., *B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(2): p. 498-508.

