



Universidad
Zaragoza



Proteínas implicadas en la apoptosis inducida por el inhibidor de Cdk dinaciclib en células de mieloma humano

Proteins involved in apoptosis induced by the Cdk inhibitor dinaciclib in human myeloma cells

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Autora: Elena Campos Pardos

Director: José Javier Naval Iraberri

Grupo "Apoptosis, Inmunidad y Cáncer"

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza

Año 2017



**Universidad
Zaragoza**

D. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICA:

Que el Trabajo Fin de Grado “Proteínas implicadas en la apoptosis inducida por el inhibidor de Cdk dinaciclib en células de mieloma múltiple humano” ha sido realizado por Elena Campos Pardos en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo mi dirección y reúne, a mi juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado (TFG), ya que cumple los objetivos recogidos en las directrices del TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Junio 2017

Fdo: José Javier Naval Iraberri

ÍNDICE

0. RESUMEN / ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. MIELOMA MÚLTIPLE.....	2
1.2. CICLO CELULAR, Cdks Y DINACICLIB.....	3
1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	5
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	7
3.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	8
3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	22
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

ANEXOS

0. RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de neoplasia que afecta a las células de la médula ósea y se caracteriza por una proliferación anormal y acumulación de células plasmáticas, las cuales producen una inmunoglobulina monoclonal que provoca daños en el organismo.

Actualmente, el MM sigue siendo una enfermedad incurable, a pesar de que existen tratamientos quimioterápicos y fármacos dirigidos que han conseguido aumentar la supervivencia de los pacientes con mieloma y mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Se ha propuesto una nueva estrategia terapéutica basada en inhibir la actividad de los principales reguladores positivos de la progresión del ciclo celular, las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), con la finalidad de impedir la proliferación descontrolada característica de las células tumorales. En este contexto, se ha encontrado una molécula que posee una potente actividad inhibidora de diversas Cdks, y se conoce con el nombre de dinaciclib.

En el presente trabajo fin de grado, se ha analizado el efecto citotóxico del dinaciclib y su capacidad para inducir la muerte celular programada o apoptosis en células de mieloma múltiple humano. Además, se han estudiado diversas proteínas de la familia Bcl-2 (reguladoras de la vía intrínseca de la apoptosis) para intentar comprender el mecanismo de acción del dinaciclib por el cual es capaz de inducir apoptosis en células de mieloma.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la apoptosis inducida por dinaciclib se produce como consecuencia de la disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1, que es un factor clave para la supervivencia de las células de MM. Por su parte, las proteínas proapoptóticas solo-BH3 Puma y Noxa parecen no intervenir en dicho mecanismo.

0. ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a neoplasm that mainly affects the bone marrow. It is characterized by an abnormal proliferation and accumulation of plasma cells, which produce a monoclonal immunoglobulin that causes damage to the organism.

Nowadays, MM is still an incurable disease. In spite of this, there are several types of chemotherapy treatments and targeted drugs that have managed to increase the survival rate in myeloma patients and improve the prognosis of the disease.

A new therapeutic strategy has emerged based on the inhibition of the activity of the major positive regulators of cell cycle progression, the cyclin-dependent kinases (Cdks), in order to prevent the uncontrolled proliferation characteristic of these tumor cells. In this context, dinaciclib has emerged as a new molecule possessing a potent inhibitory activity of several Cdk at low concentrations.

In the present Degree thesis, we have analyzed the cytotoxic effect of dinaciclib and its ability to induce the programmed cell death or apoptosis in multiple myeloma human cells. In addition, several proteins from the Bcl-2 family (regulators of the intrinsic apoptosis pathway) have been studied in order to elucidate the mechanism of apoptosis induction by dinaciclib in myeloma cells.

Our results suggest that apoptosis occur following Mcl-1 decrease. The main protein involved in dinaciclib-dependent apoptosis is the antiapoptotic protein Mcl-1, which is key to survival of human MM cells. On the other hand, pro-apoptotic BH3-only proteins Puma and Noxa appear not to be involved in this mechanism.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer hematológico caracterizado por la proliferación maligna de células B plasmáticas, derivadas generalmente de un solo clon inicial, que se expanden y acumulan en la médula ósea. Esto conlleva la aparición de citopenias, reabsorción ósea y la producción continua y aumentada de una proteína monoclonal, conocida como “proteína M”, que se deposita en tejidos o tiene actividad de auto-anticuerpo. Se trata de un fragmento de inmunoglobulina (Ig) o una cadena ligera de Ig. Dada su tendencia a formar depósitos y a su potencial actividad como auto-anticuerpo, la producción en exceso de estas Ig tóxicas puede interferir en diversas funciones de la sangre y en el normal funcionamiento de los riñones. También puede causar alteraciones en la piel, desórdenes neurológicos y metabólicos, favorecer el desarrollo de infecciones y lesionar los huesos. Las células mielomatosas pueden llegar a desplazar a las células normales de la medula ósea dificultando la producción normal de eritrocitos, leucocitos y plaquetas [1], [2].

El MM supone alrededor del 1% de todos los tumores y el 10% de las neoplasias hematológicas. Su incidencia está condicionada por la edad (el 75% de los pacientes tienen más de 55 años al diagnóstico; edad media: 69 años), sexo y raza (más frecuente en hombres negros) [3].

La forma en que una célula plasmática se transforma en una célula de mieloma todavía no se comprende completamente, aunque se sabe que existen muchas anomalías genéticas en las células de mieloma que afectan a varios cromosomas, tales como translocaciones, pérdidas y ganancias cromosómicas o mutaciones en genes individuales [4]. Las translocaciones primarias parecen estar involucradas en la patogénesis temprana, mientras que las secundarias se relacionan con la progresión tumoral [5]. En la mayoría de translocaciones primarias, causadas por recombinaciones génicas específicas de células B, se suelen yuxtaponer uno o más oncogenes con secuencias reguladoras de la transcripción de genes de Ig [6], lo que sugiere que las mutaciones ocurren con el cambio de isotipo de IgM a otro isotipo de Ig. Las mutaciones afectan frecuentemente a genes que codifican proteínas importantes para el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Por ejemplo, los oncogenes y genes supresores de tumores tales como ras, FGFR3, c-maf, las ciclinas D1 y D3, p53 y rb están implicados en la patogénesis del MM [5], [6].

La etiología del mieloma todavía no está clara. Se cree que la exposición a determinadas sustancias químicas (como pesticidas, herbicidas o dioxinas), así como las radiaciones ionizantes, algunos virus y una estimulación inmune crónica junto con otros desórdenes autoinmunes, podrían ser causas potenciales o factores desencadenantes de la enfermedad [7], [4], [6].

1.1.1. TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Existen numerosos tratamientos del MM cuyo fin es frenar la evolución de la enfermedad, mejorar los síntomas y la calidad de vida, evitar las recaídas y aumentar la supervivencia. Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de curar la enfermedad, a excepción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos a partir de un donante compatible. Los tratamientos pueden variar en función del estado de la enfermedad, del momento de diagnóstico y de la edad.

Las opciones de tratamiento estándar combinan fármacos quimioterápicos clásicos, como melfalán (agente alquilante), prednisona (glucocorticoide antiinflamatorio que induce la expresión de genes apoptóticos) [8] y vincristina (alcaloide que impide la adición de tubulina a los microtúbulos,

deteniendo la mitosis), con nuevos tratamientos basados en fármacos dirigidos, como los inmunomoduladores (IMiDs, talidomía, lenalidomida y pomalidomida) y los inhibidores del proteasoma (bortezomib y carfilzomib) [3], [6], [9].

Por un lado, los IMiDs poseen propiedades antiangiogénicas, antiinflamatorias y antiproliferativas, disminuyen la producción de citoquinas implicadas en supervivencia y proliferación y potencian la inmunidad contra células de MM estimulando a las células T y NK [10]. Por otro lado, los inhibidores del proteasoma inducen muerte celular por apoptosis en células de mieloma, ya que la actividad del proteasoma es necesaria para el control de calidad en estas células que necesitan un recambio proteico muy rápido, el cual se ve impedido por estos fármacos [4]. Sin embargo, las terapias dirigidas no consiguen erradicar todos los clones de células plasmáticas tumorales. Esto provoca recaídas en los pacientes y la necesidad de terapias adicionales. Por este motivo, es importante desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en nuevas dianas moleculares.

En este sentido, el estudio de la maquinaria que regula el ciclo celular ha permitido identificar moléculas o procesos alterados en las células tumorales. Con este fin se han desarrollado los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) como el flavopiridol y el dinaciclib [11] [12].

1.2. CICLO CELULAR, Cdks Y DINACICLIB

El ciclo celular representa una serie de eventos ordenados secuencialmente y regulados que permiten a la célula crecer y proliferar. Un elemento crítico en la progresión del ciclo es la familia de proteínas Cdks o serín-treonin quinasas dependientes de ciclinas. Cuando estas proteínas están activas, las células avanzan de una fase a otra del ciclo y se dividen. Algunas Cdks están también implicadas en el control de la transcripción génica y en otros procesos celulares [13],[14],[15].

La actividad de estas quinasas está gobernada por una compleja red de subunidades reguladoras y fosforilaciones que alteran la conformación de dichas Cdks y modulan su actividad. Dentro de este entramado de moléculas reguladoras, las ciclinas regulan positivamente las Cdks, y los inhibidores endógenos de Cdks (Cdk-i) lo hacen de manera negativa [13],[14].

Por tanto, la actividad de las Cdks requiere la unión de estas subunidades proteicas reguladoras o ciclinas, las cuales son sintetizadas y destruidas en momentos específicos durante el ciclo celular, regulando así la actividad quinasa de las Cdks de manera precisa y eficiente [15].

De la enorme variedad de Cdks y ciclinas codificadas por el genoma humano, solo unos determinados complejos de Cdk-ciclina están directamente involucrados en la regulación del ciclo celular [15]. Concretamente, en la interfase del ciclo celular participan tres Cdks (Cdk2, Cdk4 y Cdk6); durante la mitosis, una Cdk mitótica (Cdk1); y diez ciclinas que pertenecen a cuatro subfamilias diferentes (A-, B-, D- y E-) [15]. Cdk2 y Cdk1 son los principales motores que impulsan la división celular. La Cdk2 interacciona primero con la ciclina E al comienzo de la fase S (síntesis de DNA) y, durante esta fase es reemplazada por la ciclina A. A continuación, en la fase G2 la unión de Cdk1 a la ciclina B induce el inicio de la mitosis. Finalmente, la Cdk4 y Cdk6 se asocian con miembros de la subfamilia de ciclinas D induciendo la proliferación de las células en la fase G1 tras la mitosis [16].

Existen puntos de control en el ciclo celular que detectan posibles defectos durante la síntesis del DNA y la segregación cromosómica, regulando la progresión adecuada del ciclo. La activación de estos puntos de control induce el arresto del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad de las Cdk. De esta manera, las células tienen oportunidad para reparar las alteraciones en el DNA, evitando así la transmisión del DNA defectuoso a las células hijas.

Si la reparación no tiene éxito, las células pueden entrar en apoptosis [15]. Alternativamente, la acumulación de alteraciones en el DNA puede resultar en una transformación neoplásica [17].

Además, la actividad de la RNA polimerasa II (RNAPol II) de mamíferos se regula durante el ciclo celular mediante fosforilación/desfosforilación de su dominio carboxilo terminal (CTD). Las principales quinasas, aunque no las únicas, implicadas en estas fosforilaciones pertenecen a la superfamilia de las Cdks, y son concretamente los complejos Cdk7-ciclina H, Cdk8-ciclina C y Cdk9-ciclina T1/T2a/T2b/K que se asocian con complejos de iniciación y elongación de la transcripción para regularla positivamente [16].

Cdk7 tiene una doble función en la célula. Como ya se ha dicho, regula la transcripción a través de la fosforilación del CTD de la RNAPol II, siendo Cdk7 un componente del factor de transcripción TFIIH de la RNAPol II. Además, Cdk7 también está involucrada en el control del ciclo celular gracias a su capacidad de fosforilar diversas Cdks reguladoras de dicho ciclo [16], [18]. Por su parte, la Cdk8 es la más compleja de las tres. Su acción se ha asociado con efectos positivos y negativos sobre la transcripción, sugiriendo una función de interruptor [18], [19]. Finalmente, la Cdk9 forma parte del complejo p-TEFb (un factor de elongación positivo de la RNAPol II), el cual promueve la fosforilación del CTD de la RNAPol II tras la elongación de la transcripción, contrarrestando también la función de factores de elongación de la transcripción negativos [16], [18].

A diferencia de las células normales que solo proliferan cuando son estimuladas por señales de proliferación y mitogénicas, las células tumorales proliferan continuamente debido a una desregulación del ciclo celular. Este descontrol está producido principalmente por una sobreexpresión de las ciclinas, la pérdida de la función fisiológica de las Cdks y/o el déficit de expresión de los inhibidores endógenos de las Cdks (Cdk-i) [11], [14].

Estas desregulaciones junto con la evasión de otros controles fisiológicos relacionados con la detención de la proliferación en presencia de DNA dañado, permiten a las células tumorales proliferar descontroladamente. Además, estas anomalías son comunes a muchos tipos de cáncer y parecen jugar también un papel importante en el MM, donde destacan la desregulación de la ciclina D y la pérdida de varios Cdk-i [12]. En relación a esto, una alta tasa proliferativa de las células de mieloma se asocia con un mal pronóstico en estos pacientes. Esto sugiere que las Cdk podrían ser dianas terapéuticas, pues su inhibición impide y detiene el crecimiento celular descontrolado [14].

En la actualidad, hay una serie de compuestos químicos en ensayos clínicos que inhiben directamente las Cdks, inhibiendo subsiguientemente el crecimiento celular y la transcripción [14].

El primero de estos fármacos evaluado en ensayos clínicos fue el flavopiridol [*ver estructura química en Anexo I*]. El flavopiridol es un flavonoide semisintético que compite con el ATP por la unión al sitio activo de muchas Cdks, y puede inducir el arresto del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis dependiendo del tipo celular, las condiciones del cultivo y las concentraciones del fármaco [20]. Sin embargo, el flavopiridol no ha demostrado una actividad clínica significativa en pacientes con MM *in vivo* (sobre todo en pacientes con MM en recaída o refractario), a pesar de haber demostrado una potente actividad contra líneas celulares de mieloma y células de pacientes de mieloma *in vitro* [12], [21]. Siguiendo en esta línea de investigación, se ha desarrollado un nuevo inhibidor de Cdks con una mayor especificidad y actividad inhibidora que el flavopiridol y, por tanto, con menores efectos adversos. [*Ver comparación de las IC₅₀ entre el dinaciclib y el flavopiridol en Anexo I*]. Este compuesto es el dinaciclib [22]. [*Ver estructura química en Anexo I*].

1.2.1 DINACICLIB

El dinaciclib (SCH 727965) es un potente inhibidor de la actividad de las Cdk1, Cdk2, Cdk5 y Cdk9, siendo más potente su inhibición frente a la Cdk9 [22].

La inhibición de la Cdk9 causada por el dinaciclib provoca la parada de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II, hecho que causa un descenso en los niveles de las proteínas de vida media corta. Adicionalmente, la inhibición de las Cdk1 y Cdk2 produce la parada del ciclo celular, con la posibilidad de causar una apoptosis más tardía. Finalmente, aunque la Cdk5 no controla directamente la regulación del ciclo celular (pues funciona en procesos como la plasticidad sináptica y la migración y maduración neuronal), se ha demostrado en estudios previos que la inhibición de Cdk5 puede aumentar la sensibilidad de las células de mieloma a los fármacos inhibidores del proteasoma [12].

En estudios anteriores, se seleccionó este compuesto como un posible candidato clínico para el tratamiento del MM en recaída realizando un screening funcional in vivo que integraba parámetros de seguridad junto con parámetros de eficacia. Comparándolo con el flavopiridol, demostró una actividad superior con un índice terapéutico mejorado. Y en ensayos de células completas se observó una supresión completa de la fosforilación de la proteína Rb, hecho que se correlacionó con el inicio de la apoptosis en más de 100 líneas tumorales. Además, se observó que para obtener efectos celulares duraderos era suficiente la exposición corta de las células tumorales a este compuesto [22]. En estudios más recientes, se ha evaluado el dinaciclib en ensayos clínicos de fase I y II en pacientes con MM, y se ha encontrado que el dinaciclib parece tener actividad como agente único en el tratamiento del MM y que posee un buen perfil de seguridad. Además, se han observado respuestas alentadoras en pacientes con recaídas de la enfermedad y con mieloma múltiple refractario [12].

1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo genéticamente programado constituido por un conjunto de acontecimientos ordenados que permiten a una célula inducir su propia muerte ante diversos estímulos intracelulares o extracelulares, tales como la ausencia de factores de crecimiento, falta de oxígeno, exposición radiaciones ionizantes o a fármacos antitumorales, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daños en el DNA, etc., e incluso procesos fisiológicos normales como el envejecimiento y el desarrollo.

La apoptosis es un proceso de vital importancia biológica. Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis es necesaria para la correcta formación de los tejidos. También sucede durante la etapa adulta para regular la homeostasis del organismo, renovando las células que forman parte de los tejidos [24], [25]. Además, es clave para la supervivencia de los organismos multicelulares pues les permite deshacerse de células dañadas o infectadas que pueden interferir con la función normal [26].

Este tipo de muerte conduce a la aparición en la célula de un conjunto de cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen: adquisición de forma esférica, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, exposición de fosfatidil serina (PS) en el exterior de la membrana plasmática, caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, contracción del citoplasma celular, formación de burbujas en la membrana plasmática (*blebbing*) y formación de cuerpos apoptóticos, sin pérdida de la integridad de la membrana plasmática [26].

La apoptosis puede iniciarse por dos vías de señalización:

- La vía intrínseca o mitocondrial: ocurre por decisiones propias de la célula en respuesta a estímulos que generan alteraciones irreversibles en ella, como daño en el DNA o ROS. Se activa por una serie de sensores internos celulares. Se desencadena por perturbación de las mitocondrias [27].
- La vía extrínseca o de los receptores mortales: se produce en respuesta a estímulos externos y se activa a través de la unión de receptores mortales de la célula a sus respectivos ligando [27].

Ambas vías confluyen en la activación de las caspasas, cisteín-proteasas con especificidad de corte después de Asp que llevarán a cabo el desmantelamiento de la estructura celular.

1.3.1 VÍA INTRÍNSECA. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2

La vía intrínseca o vía mitocondrial está muy bien caracterizada. Está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales desempeñan funciones clave en la inducción o inhibición de la apoptosis por la vía intrínseca, mediante interacciones de unas con otras.

Estas proteínas poseen entre uno y cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH), denominados BH1, BH2, BH3 y BH4. En función de los dominios BH que contienen y de su papel en la apoptosis, los miembros de esta familia se clasifican en tres subfamilias:

- Proteínas antiapoptóticas. Contienen los cuatro dominios BH. Inhiben la apoptosis debido a que interactúan con las proteínas proapoptóticas multidominio secuestrándolas e impidiendo su actuación. En esta subfamilia encontramos a Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-B y A1 [28].
- Proteínas proapoptóticas multidominio. Contienen tres dominios BH (BH1-3). Promueven la apoptosis mediante la formación de un poro en la membrana externa mitocondrial. Estas proteínas son Bax y Bak [28].
- Proteínas solo-BH3. Poseen un único dominio BH3. Tienen un papel crucial como sensores del estrés celular. Se unen a las proteínas antiapoptóticas neutralizándolas. Pertenecen a esta subfamilia las proteínas Bim, Bid, Puma, Noxa, Bik, Bad, Bmf y Hrk [28].

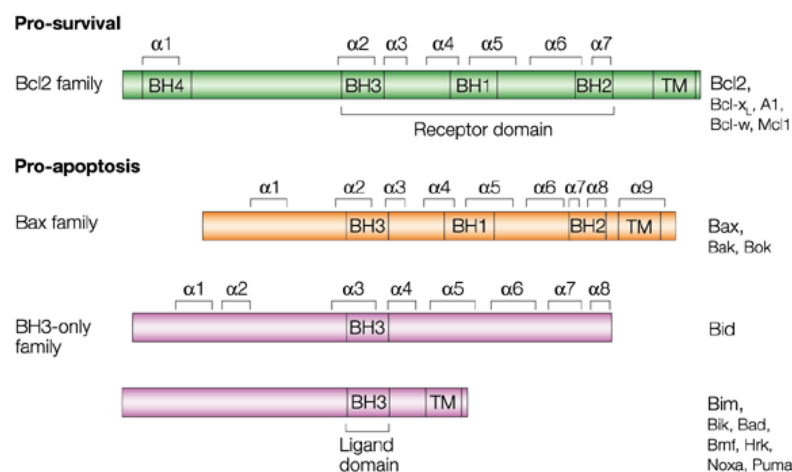


Figura 1. Subfamilias de la superfamilia de proteínas Bcl-2 [28].

La vía intrínseca se pone en funcionamiento en situaciones de estrés celular; y ante estas situaciones, se activan miembros de la familia solo-BH3 produciéndose la inhibición de las proteínas antiapoptóticas y la formación de un poro en la membrana mitocondrial externa por oligomerización de Bax y Bak. Este poro permite la salida al citosol del citocromo C y otras proteínas apoptogénicas.

En el citosol, el citocromo C induce la formación del macrocomplejo denominado apoptosoma compuesto por 7 moléculas de la proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor 1*) que se unen estequiométricamente a la procaspasa 9 y al propio citocromo C. Esto permite la activación de la caspasa 9, proteína que activará, a su vez, a la caspasa 3, la cual proteolizará diferentes sustratos en el citosol, desencadenando el fenotipo apoptótico en la célula [28], [29].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Diversos resultados de estudios llevados a cabo con el dinaciclib sugieren que este compuesto es un inhibidor de CDKs potente y selectivo, pudiendo presentarse como un nuevo agente citotóxico contra las células tumorales de mieloma múltiple humano.

En estudios anteriores realizados en nuestro departamento (*De Benito, Trabajo de Fin de Grado, 2016*) se comprobó que el dinaciclib induce muerte por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple MM.1S y RPMI 8226, y que produce el arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ de forma dosis-dependiente.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, en este TFG se pretende analizar el mecanismo de apoptosis del inhibidor de Cdks dinaciclib en células de mieloma múltiple humanas, planteándonos los siguientes

OBJETIVOS:

1. Evaluar la citotoxicidad del fármaco dinaciclib en células de mieloma múltiple, concretamente en las líneas celulares MM.1S y U266.
2. Analizar el mecanismo por el cual el dinaciclib induce muerte celular por apoptosis en dichas líneas de mieloma múltiple, estudiando la expresión de diversas proteínas de la familia Bcl-2, implicadas en la regulación de la muerte celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

Durante este trabajo se ha empleado un medio de cultivo adecuado a los requerimientos de las líneas empleadas. Se ha utilizado el medio RPMI-1640, de Gibco (Invitrogen, Barcelona). Para obtener el medio completo se suplementó el medio basal con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), L-glutamina 2mM y antibióticos: penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (Sigma).

Los frascos de cultivo y el resto de material de plástico empleado (placas de 6, 24 o 96 pocillos, tubos de fondo cónico Falcon, etc.) fue estéril. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar, España) y en condiciones estériles. Las células fueron cultivadas en un incubador termostatzado (Heraeus Cell, Alemania) a 37°C en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

3.1.2. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se han empleado dos líneas celulares, ambas disponibles en el grupo de investigación:

- **MM.1S:** línea de mieloma múltiple humano aislada originalmente de la sangre periférica de una mujer de 42 años de raza negra. Estas células pueden crecer tanto en una monocapa ligeramente adherida como en suspensión. Se subcultivan cada 2-3 días.
- **U266:** línea de mieloma múltiple humano aislada originalmente de la sangre periférica de un varón de 53 años. Estas células crecen en suspensión. Se subcultivan cada 2-3 días.

3.1.3 CONTAJE Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD

La determinación tanto de la viabilidad celular como de la densidad celular del cultivo se ha realizado mediante tinción con Azul Trypan (Sigma) al 0,4% diluido en NaCl 0,15M. Esta técnica se basa en que las células muertas que han perdido la integridad de la membrana son permeables a este colorante adquiriendo por tanto una coloración azul, mientras que las células viables (o en las etapas iniciales de la apoptosis que todavía mantienen su membrana íntegra) no se tiñen. De esta manera se pueden diferenciar las células muertas de las vivas.

Para realizar el conteo se preparó una mezcla de Azul Trypan y una alícuota de la suspensión celular en una proporción 1:1 (50 µL de colorante + 50 µL de suspensión celular). A continuación, esta mezcla se depositó en un hemocitómetro de Neubauer y se observó al microscopio (Ophthipot, Nikon), procediéndose al conteo celular. La densidad celular y el porcentaje de viabilidad del cultivo se determinaron aplicando las siguientes expresiones:

$$\text{Densidad celular} \rightarrow \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas} \times \text{Factor de dilución}(= 2) \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

(Siendo 10^4 el factor de corrección o ajuste por el volumen de la cámara Neubauer)

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

Todos los experimentos se realizaron partiendo de una viabilidad celular de, al menos, 90%.

3.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

3.2.1 Determinación de la proliferación celular: ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MTT

Para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con dinaciclib a dosis crecientes y a diferentes tiempos de incubación (curvas dosis-respuesta), se ha empleado una modificación del método de Mossman. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetitiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en un compuesto coloreado de color azul (azul de formazán) realizada por las deshidrogenasas mitocondriales y las del retículo endoplásmico. Solo las enzimas de las células vivas y viables pueden producir la conversión de las sales de tetrazolio (de color amarillo y solubles) a cristales de formazán (de color violeta e insoluble). La cantidad de cristales formados es proporcional al número de células metabólicamente activas. De esta manera, cuantificando la absorbancia de los pocillos en un lector de microplacas, podemos analizar la supervivencia y proliferación celular del cultivo en respuesta a un tratamiento con el fármaco de interés.

Se utilizaron placas de 96 pocillos con un volumen de 50 µL de cultivo celular en cada pocillo a una densidad celular de 6×10^5 cél/mL. A cada pocillo se le añadió 50 µL de una dilución del fármaco en medio completo (se prepararon diluciones seriadas del fármaco a concentraciones crecientes desde 1,5 nM hasta 100 nM), excepto a los pocillos control a los que se les añadieron 50 µL de medio

completo. Se establecieron 4 pocillos por punto experimental y, además, pocillos “blanco” que contenían 100 µL de medio de cultivo sin células. La placa se incubó durante 24 – 72 h en el incubador de cultivos a 37°C y, transcurrido este tiempo, se añadieron 10 µL por pocillo de una disolución del reactivo MTT (5mg/mL en PBS) con una pipeta multicanal. Se dejaron incubar las placas durante 2h en la estufa. Una vez se observó la formación de cristales, se añadieron 70 µL de isopropanol en HCl 0,05M. Los cristales se disolvieron por agitación en un agitador de placas (Bioblock) y, posteriormente, se determinaron las absorbancias de los pocillos a 550 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ex, Thermo), frente a los blancos apropiados (pocillos sometidos a la misma manipulación que los cultivos celulares pero conteniendo solo medio completo). Los resultados obtenidos se interpretaron usando los programas *Excel* y *GraphPad Prism 5*.

3.2.2 Determinación de la translocación de fosfatidilserina: CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA V

Dado que el ensayo de MTT no permite distinguir entre inhibición de crecimiento y muerte celular, se realizó simultáneamente un marcaje celular con anexina V para cuantificar directamente la apoptosis en las células y distinguir entre ambos efectos del fármaco.

La anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina (PS), fosfolípido de membrana localizado en la cara interna de la bicapa lipídica y que se transloca a la cara externa de la misma durante los primeros estadios de la apoptosis. Mediante el acoplamiento de la proteína fluorescente alofococianina (APC) a la Anexina V es posible determinar el porcentaje de células muertas por citometría de flujo.

En este ensayo se sembraron 500µL por pocillo de una suspensión celular con una densidad de 3×10^5 cél/mL en placas de 24 pocillos. A cada pocillo se le añadió el volumen necesario de una dilución de fármaco para obtener la concentración final deseada en un volumen final de 500 µL. El rango de concentraciones para realizar esta curva dosis-respuesta del fármaco (dinaciclib) fue desde 1,5 nM hasta 100nM. Las placas se incubaron durante 24 – 48 h.

Pasado este tiempo, se procedió al marcaje. Para ello, se traspasó el contenido de los pocillos a tubos de citómetro, que se centrifugaron a 335 xg durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet de cada tubo se resuspendió en 100 µL de una mezcla que contenía ABB (annexin binding buffer), agua destilada y solución stock de anexina. Los volúmenes a añadir de cada reactivo se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

- Volumen total = (nº de pocillos) x 100 µL
- Volumen de ABB = (nº de pocillos) x 100 µL x (1/10)* *Se hizo una dilución 1/10 del stock
- Volumen de agua destilada = Volumen total – Volumen ABB
- Volumen de anexina-APC = (nº de pocillos) x 4 µL* x (1/100) *Vol. anexina/pocillo

Tras añadir la solución de anexina, se mantuvieron los tubos en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 20 minutos. Pasado este tiempo se analizó el marcaje en un citómetro de flujo (FACScalibur, BD).

Los resultados obtenidos se interpretaron usando los *softwares CellQuest* y *FlowJo 7.6.1*.

3.3. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2

Se analizó la participación de diversas proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por dinaciclib en las células de mieloma humano MM.1S y U266, mediante dos técnicas: *Western Blotting* y citometría de flujo.

3.3.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante *WESTERN BLOTTING*

I. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales.

Se utilizaron placas de 6 pocillos en las que se establecieron cultivos de células de MM que se incubaron a diferentes tiempos con dinaciclib. La densidad celular a la que se sembraron las células en cada pocillo fue de 3×10^5 cél/mL, y los tiempos de incubación con dinaciclib 4h, 6h, 17h y 24h.

Transcurridos estos tiempos, se recogió de cada pocillo el volumen de suspensión celular adecuado, que se centrifugó a 869 xg durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con un exceso de volumen de PBS estéril (5-6 mL). Una vez realizado el lavado, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS y la suspensión celular se traspasó a tubos Eppendorf. A continuación, los tubos Eppendorf se centrifugaron de nuevo, en las mismas condiciones anteriores, y el sobrenadante se desechó mediante succión por vacío haciendo uso de la bomba de vacío. El pellet se resuspendió en el volumen adecuado de tampón de lisis. Este tampón de lisis contenía: Tritón-X-100 al 1%; NaCl 150 mM; Tris/HCl 50 mM pH: 7,6; glicerol al 10% v/v; EDTA 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; pirofosfato sódico 10 mM; leupeptina 10 µg/mL; fluoruro de sodio y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM. Para calcular el volumen necesario de tampón de lisis se utilizó una proporción de 100 µL de tampón lisis por cada 5×10^6 de células totales.

Tras resuspender las muestras en tampón de lisis, se mantuvieron durante 30 minutos en un baño de hielo. Pasado este tiempo, los extractos se centrifugaron a 20800 xg durante 30 min a 4°C en un rotor *FA 45-30-11 (Eppendorf)*. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se depositó en tubos eppendorf, que se guardaron en el congelador a -20°C hasta su uso.

El contenido de cada extracto se normalizó de dos formas distintas: o bien mediante cuantificación de las proteínas totales con el ensayo del BCA (ácido bicinónico, Sigma) o mediante igual número de células azul Trypan-negativas.

II. Preparación de las muestras para electroforesis.

Antes de cargar las muestras en un gel de electroforesis, se les añadió tampón de lisis concentrado (3x) a los extractos descongelados. La cantidad añadida debió ser igual a la mitad del volumen de extracto correspondiente. Este tampón contenía Tris/HCl 150 mM pH: 7,4; SDS 3%; molibdato de sodio 0,3 mM; pirofosfato sódico 30 mM; fluoruro de sodio 30 mM; glicerol al 30% v/v; β-mercaptoetanol 30% v/v y azul de bromofenol 0,06% p/v. A continuación, los extractos se calentaron a 95°C durante 5 min en un baño seco (Selecta) y después se centrifugaron durante 1 min a 10625 xg.

III. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas de los extractos se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS. Para ello, se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida verticales discontinuos compuesto por un gel concentrador o *stacking gel*, necesario para concentrar las proteínas recubiertas con SDS, y un gel separador al (12% de poliacrilamida) donde las proteínas

se separan de acuerdo a su peso molecular. La composición de ambos geles es la misma pero contienen distinta proporción de acrilamida. Dicha composición se recoge en el [Anexo II](#).

Una vez gelificados los geles, se dispusieron en una cubeta de electroforesis vertical (Hoefler) y se añadió a la misma el tampón de electroforesis o *Running Buffer*, compuesto por Tris base 25mM, glicina 192 mM y SDS al 0,01%.

Tras haber preparado las muestras, se cargaron en sus carriles correspondientes junto con 3 μ L del marcador de PM (BlueStar Plus Prestained Protein Marker, Nippongenetics). La electroforesis se realizó a 180V y 20 mA por gel durante 2h y 15 min aproximadamente.

Pasado este tiempo, se procedió a realizar la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (GE HealthCare) mediante un sistema de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad). Se realizó un montaje tipo sándwich donde se colocaron el gel y la membrana entre papeles de filtro Whatman humedecidos previamente en una disolución de tampón de transferencia que contenía metanol al 20%. El tampón de transferencia contenía Tris-HCl 48 mM, pH: 8,3; glicina 39mM y SDS 0,037%. El sándwich se colocó en el cassette de transferencia semiseca evitando la aparición de burbujas y se conectó a una fuente de electroforesis para realizar la transferencia a 20 V y 400 mA durante 1h y 15 min. Pasado este tiempo, se recuperaron las membranas y se sumergieron en una solución de Rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético al 0,05%, el cual permite colorear las bandas de proteínas de forma reversible. De esta manera, se comprobó que la transferencia se había producido correctamente. Una vez hecho esto, se retiró el colorante y se bloqueó la membrana durante al menos 30 min con leche al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris-HCl 10 mM, pH: 8,0; NaCl 0,12M; Tween-20 0,1%; timerosal 10% (p/v)).

IV. Análisis de proteínas por *Western Blotting*

Transcurrido el tiempo de bloqueo de la membrana, se hicieron unos lavados rápidos con tampón B para eliminar el exceso de agente bloqueante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico de la proteína que se pretendía analizar, a la concentración adecuada diluido en una solución de tampón B con 5% de BSA y 0,05% de azida de sodio. Se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con tampón B en agitación durante 10 min cada uno de ellos. A continuación se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario (a una dilución de 0,1 μ g/mL diluido en tampón B con 2,5 % de leche en polvo), dirigido contra el primario, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación, a la concentración recomendada por el fabricante. Los anticuerpos secundarios empleados, conjugados con fosfatasa alcalina o con peroxidasa, permitieron la posterior detección mediante un ensayo enzimático. Tras la incubación, se lavó el anticuerpo secundario en las mismas condiciones que el anticuerpo primario y se procedió al revelado de la membrana mediante quimioluminiscencia (técnica basada en la detección de la luz emitida por un sustrato tras su oxidación). El sustrato de la peroxidasa (*ECL Western Blotting Substrate*, Thermo) se incubó durante 2 min, y el sustrato de la fosfatasa alcalina (*PhospaGLO AP Substrat*, KPL) durante 5 min. A continuación, la membrana se transfirió a una funda de plástico transparente colocada en un cassette de revelado radiológico y se eliminó el exceso de sustrato. Se procedió al revelado en un cuarto oscuro, colocando el film de revelado (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sobre la funda que contenía la membrana. El tiempo de exposición dependió del anticuerpo empleado. Acto seguido, el film se reveló por inmersión secuencial en líquido revelador (100 mL de revelador y 350 mL de agua destilada), agua destilada y

líquido fijador (100 mL de fijador y 350 mL de agua destilada). Tras el revelado, el film se secó al aire libre y se digitalizó. Las bandas de proteínas se analizaron por densitometría con el *software Image J*.

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se recogen en la [Tabla A3 del Anexo III](#).

3.3.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante MARCAJE INTRACELULAR Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Se adaptó un protocolo utilizado en estudios previos del grupo en los que se analizaron los niveles intracelulares de Puma y Noxa tras el tratamiento con otra droga distinta al dinaciclib [30].

Se partió de alrededor de 13,5 mL de cultivo a una densidad de 3×10^5 cél/mL con un total de 4×10^6 de células tratadas o no con dinaciclib a diferentes concentraciones y tiempos.

Pasado el tiempo de incubación con dinaciclib, se realizó un conteo de las células y se determinó la viabilidad celular de los cultivos. A continuación, los cultivos se traspasaron a tubos de fondo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 869 xg durante 5 min. El pellet formado se resuspendió en 500 µL de Paraformaldehído al 1% en PBS para fijar las células durante 15 min a 4°C. Seguidamente, se traspasó el contenido de los tubos Falcon a tubos de citómetro y, se centrifugaron a 335 xg durante 5 min. El pellet se resuspendió en 200 µL de una disolución de PBS que contenía 0,1% de saponina y 5% de suero de cabra. Cada tubo se dividió en 2 tubos, conteniendo cada uno de ellos 100 µL totales. Así, podíamos tener en cada tubo células en distintas condiciones marcadas con anticuerpos diferentes.

El siguiente paso consistió en añadir los volúmenes de anticuerpo primario oportunos para que la dilución final de los mismos estuviese en el intervalo recomendado por el proveedor (tener en cuenta la concentración de la alícuota o el stock inicial). Era importante que hubiese la misma cantidad de anticuerpo primario específico contra la proteína y de control de isotipo (anticuerpos que permiten cuantificar las uniones inespecíficas inherentes al tipo de clase). Se incubaron las células con los anticuerpos primarios correspondientes durante 30 min a temperatura ambiente.

Transcurridos los 30 min, las células se centrifugan a 931 xg durante 5 min y se lavaron con 100 µL de una solución de saponina al 0,03% en PBS. A continuación, se añadieron los volúmenes adecuados (calculados a partir de la concentración del stock y de la dilución final recomendada) de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Se incubaron las células con los anticuerpos durante 30 min a oscuridad y temperatura ambiente. Pasados los 30 min se centrifugaron las suspensiones celulares a 931 xg durante 5 min y el pellet se resuspendió en 100-200 µL de PBS para su análisis en el citómetro de flujo. Los datos se procesaron con el *software FlowJo 7.6.1*.

Ver los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la [Tabla A4 del Anexo III](#).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del dinaciclib en células de mieloma múltiple humano MM.1S y U266

4.1.1. Dinaciclib provoca inhibición de la proliferación en las células de mieloma

En primer lugar, se realizaron ensayos de dosis-respuesta para evaluar la capacidad de inhibición de la proliferación celular que posee el dinaciclib sobre las dos líneas celulares de mieloma usadas como modelo de trabajo (MM.1S y U266). Esto se llevó a cabo mediante el ensayo de reducción del MTT.

Tal y como se observa en la **Figura 2**, el dinaciclib produjo una fuerte inhibición de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente en ambas líneas, con una IC_{50} situada alrededor de 10-12 nM. Se puede observar que la pendiente de la curva a concentraciones bajas de fármaco es bastante pronunciada. La IC_{50} del dinaciclib en la línea MM.1S tras 24h y 48h de incubación fue, en ambos casos, 11 nM aproximadamente; y en la línea U266, 12 y 10 nM respectivamente. En esta segunda línea, tras 24h de incubación con dinaciclib, la inhibición de la proliferación celular se empezó a producir a dosis menores y fue más gradual que en el caso de las MM.1S.

Un hecho que llama la atención es que, al estudiar el efecto tóxico de dosis crecientes de dinaciclib a las 24 h a partir de una concentración en torno a 20 nM se alcanza una meseta y, por mucho que aumentemos la concentración de dinaciclib, no disminuye la viabilidad celular. Es decir, existe una subpoblación de células que parece ser más resistente al efecto del dinaciclib.

Si analizamos este efecto tras un tiempo de incubación mayor (48h), vemos que esta población celular resistente al dinaciclib disminuye. En el caso de las células U266 se necesita mantener la incubación durante 72 h para conseguir una disminución prácticamente completa de la viabilidad.

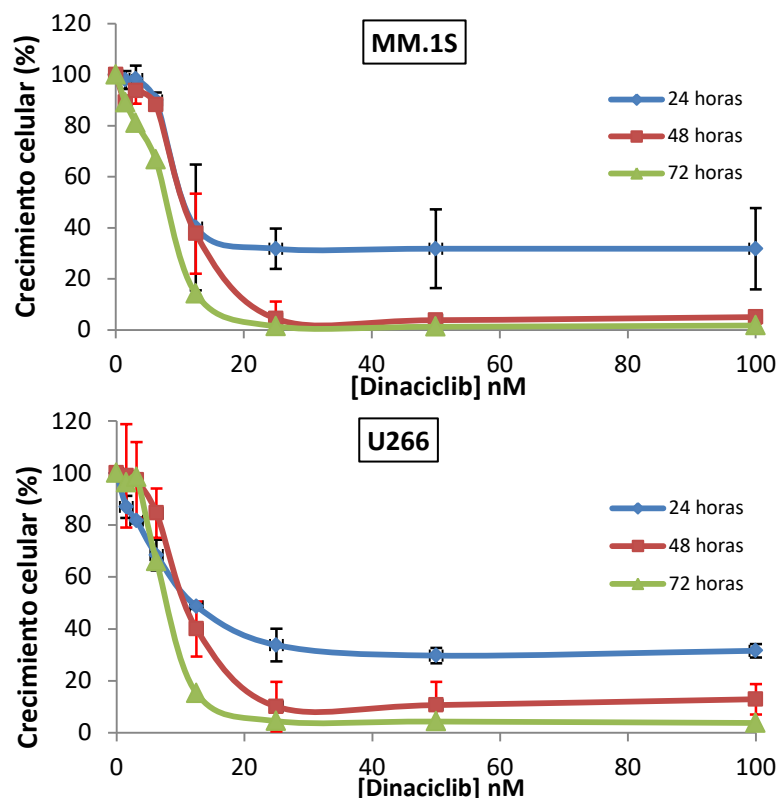


Figura 2. Efecto del inhibidor de Cdks dinaciclib sobre el crecimiento de las células de mieloma MM.1S y U266. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL en medio completo en una placa de 96 pocillos y se incubaron con las concentraciones indicadas de dinaciclib durante 24 - 72 h. Transcurrido este tiempo, se añadió el colorante MTT y se incubó durante 2h, analizando su reducción por medida de la A_{550} en un lector de microplacas. Los valores de crecimiento mostrados son la media \pm SD de 8 determinaciones individuales de dos experimentos diferentes.

Este ensayo de reducción del MTT permite detectar el porcentaje de células metabólicamente activas tras añadir dosis crecientes de dinaciclib al medio de cultivo. Sin embargo, no nos permite distinguir realmente la cantidad de células muertas. Es por esto que no sabemos si la inhibición del crecimiento celular observada se debe a que las células han dejado de proliferar y, por tanto, el

dinaciclib ha tenido un efecto citostático; o a que las células han sufrido muerte celular y, por lo tanto, el dinaciclib ha tenido un efecto citotóxico. Por este motivo, se necesitó un ensayo complementario que nos permita diferenciar entre ambos efectos.

4.1.2. Efecto citotóxico del dinaciclib y muerte celular por inducción de apoptosis.

Para comprobar si el dinaciclib tenía un efecto citotóxico sobre las células, se analizó mediante citometría de flujo la traslocación de la PS a la cara externa de la membrana plasmática (evento característico de los primeros estadios de la apoptosis).

Los resultados obtenidos (*Figura 3*) mostraron que la apoptosis aumentaba con la concentración de dinaciclib en ambas líneas celulares. En las células MM.1S expuestas durante 24h a la droga se empezó a hacer notar este efecto a una concentración de 5 nM, alcanzándose un máximo a la concentración de 50 nM, a partir de la cual la apoptosis apenas aumentó. Además había un 20-30% de células en promedio que no sufrían apoptosis y permanecían viables a concentraciones altas de dinaciclib. Este hallazgo se correlaciona con los resultados obtenidos en el ensayo del MTT. Tras una incubación de 48h, el porcentaje de células vivas disminuyó pero siguió detectándose una pequeña subpoblación resistente.

Por su parte, las células U266 se comportaron de manera similar, alcanzando un máximo de apoptosis a una concentración de 100 nM de dinaciclib tras 24h de exposición al mismo. También se observó una pequeña población de células, de alrededor de un 15-20% del total, que parecían no sufrir apoptosis. Sin embargo, al aumentar el tiempo de incubación con el fármaco (48h), la apoptosis solo aumentó moderadamente y la población de células que permanecieron viables fue algo mayor que en el caso de las células MM.1S.

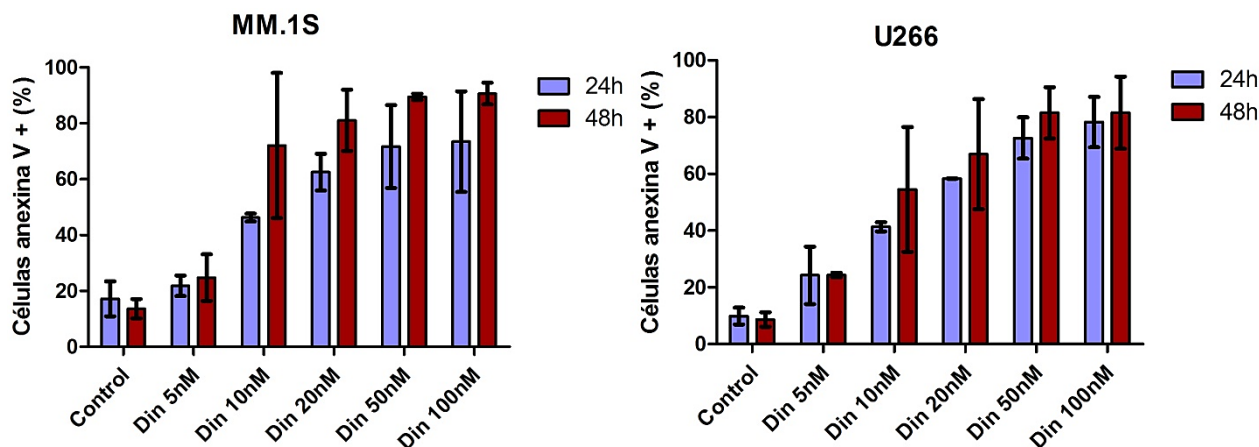


Figura 3. Exposición de PS en las células MM.1S y U266 incubadas con dinaciclib (Din.) durante 24h ó 48h a las concentraciones indicadas. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL y la exposición de PS se evaluó mediante marcaje con anexina V-APC y análisis por citometría de flujo. Se representan los valores medios \pm SD de dos experimentos diferentes.

Estos resultados, junto con los obtenidos en el ensayo de reducción del MTT, indican que la inhibición del crecimiento observada con dinaciclib se debió a la inducción de muerte celular por apoptosis en ambas líneas celulares.

Como conclusión general se puede decir que, a la vista de los resultados obtenidos, el efecto del dinaciclib sobre las líneas celulares MM.1S y U266 es dosis y tiempo dependiente, y se puede atribuir casi en su totalidad a un efecto citotóxico. Además, se observa un porcentaje de células que responden de manera más lenta al dinaciclib y tardan más en morir.

4.2. Análisis del mecanismo de la apoptosis inducida por dinaciclib en células de mieloma múltiple humano.

Con el fin de estudiar el mecanismo mediante el cual el dinaciclib provoca la apoptosis en las líneas de mieloma MM.1S y U266, se estudió la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 involucradas en la regulación de la apoptosis por la vía intrínseca. Este análisis se realiza mediante dos técnicas, *Western Blotting* y análisis por citometría de flujo.

4.2.1. Expresión de Mcl-1, Bcl-xL y Bim analizada mediante *Western Blotting* (WB).

Tradicionalmente, los cambios en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 ante diversas condiciones se han analizado mediante *WB*. Actualmente, existen algunos anticuerpos capaces de reconocer en células humanas algunas de las proteínas de la familia Bcl-2, permitiendo realizar un marcaje intracelular y posterior análisis por citometría. Sin embargo, no se han encontrado anticuerpos que sean suficientemente específicos contra Mcl-1, Bcl-xL o Bim para determinar su expresión por citometría de flujo. Por este motivo, se decidió analizar la expresión de dichas proteínas mediante la técnica *Western Blotting*.

Esta técnica no requiere unos anticuerpos que sean totalmente específicos, pero tiene sus limitaciones. El *Western Blotting* es una técnica semi-cuantitativa (a diferencia de la citometría de flujo, que permite la cuantificación completa de los datos) donde se obtienen valores medios de la expresión de proteínas de un pool de células; por ello, no nos permite distinguir poblaciones con una expresión diferenciada de las proteínas de estudio.

Las proteínas que se estudiaron mediante esta técnica fueron las antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL y la proapoptótica solo-BH3 Bim. Además se utilizó la detección de tubulina como control de carga para normalizar las señales de las proteínas de estudio. Dentro de las proteínas antiapoptóticas (aquellas que impiden que la apoptosis se induzca y se lleve a cabo), se decidió estudiar la expresión de Mcl-1 ya que se ha visto que la mayoría de las células de mieloma múltiple tienen una fuerte dependencia de esta proteína antiapoptótica para su supervivencia [31],[32]; y se ha demostrado que el estroma de la médula ósea es capaz de inducir la expresión de esta proteína a través de la producción de la citoquina de supervivencia de células plasmáticas interleuquina-6 (IL-6) [33]. También se analizó la expresión de Bcl-xL pues en algunas líneas de mieloma, como por ejemplo U266, hay una sobreexpresión de la misma (al igual que de Mcl-1). Con respecto a Bcl-2, dado que esta proteína es, *a priori*, menos importante en células de mieloma, se decidió no estudiarla. Por su parte, Bim es una proteína proapoptótica solo-BH3 que actúa como inductora de la apoptosis. Se ha visto que las células de mieloma expresan las tres isoformas principales de Bim y que, además, están reguladas negativamente por la IL-6[34]. Por este motivo, se consideró importante analizar la expresión de las tres proteínas en el estudio del mecanismo de inducción de apoptosis del dinaciclib.

Tras la incubación de las líneas de mieloma con dinaciclib a una concentración de 10 nM a diferentes tiempos (*Figura 4 (A) y (B)*), se observó que las células U266 respondían a la droga disminuyendo la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL de manera rápida y gradual. Esta disminución fue más pronunciada para Mcl-1, ya que su expresión se redujo casi un 70% con respecto al control tras haber sido incubadas las células durante 24h con la droga. Tras este mismo tiempo, los niveles de Bcl-xL disminuyeron hasta un 50% con respecto a la situación control. Como ya se ha dicho anteriormente, la línea de mieloma U266 es muy dependiente de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL para su supervivencia (se puede observar en el carril Control que la

expresión basal de estas proteínas es bastante alta). Aparentemente, el dinaciclib inhibe la expresión de estas proteínas antiapoptóticas, aumentando así la susceptibilidad de las células a sufrir apoptosis.

Una posible explicación a esta disminución tan pronunciada de Mcl-1 sería que, además de estar degradándose por las caspasas (ya que Mcl-1 es sustrato de caspasas), el dinaciclib estuviera causando la detención de la transcripción mediante la inhibición de Cdk9. Como Mcl-1 es una proteína de recambio alto y vida media corta, si se inhibe su síntesis y se estimula su degradación, sus niveles en la célula van a disminuir de manera acelerada. Resultados similares se obtuvieron en un estudio donde se analizó el mecanismo de acción del flavopiridol, otro inhibidor de Cdks, en las líneas de mieloma 8226, ANBL-6, ARP1 y OPM-2. Estos autores concluyeron que Mcl-1 era una diana importante para la apoptosis inducida por flavopiridol producida a través de la inhibición de la transcripción del mRNA de Mcl-1 junto con una rápida degradación de la proteína vía ubiquitinación-proteasoma [35]. Mcl-1 puede, además, degradarse por acción de las caspasas, ya que Mcl-1 es sustrato de caspasas. Sin embargo, este razonamiento no es aplicable a Bcl-xL, pues no tiene vida media corta ni es sustrato de caspasas.

Por el contrario, no se observó un patrón consistente en la variación de los niveles de Bim. A tiempos cortos de exposición al fármaco parece aumentar su expresión, pero a tiempos más largos parece disminuir.

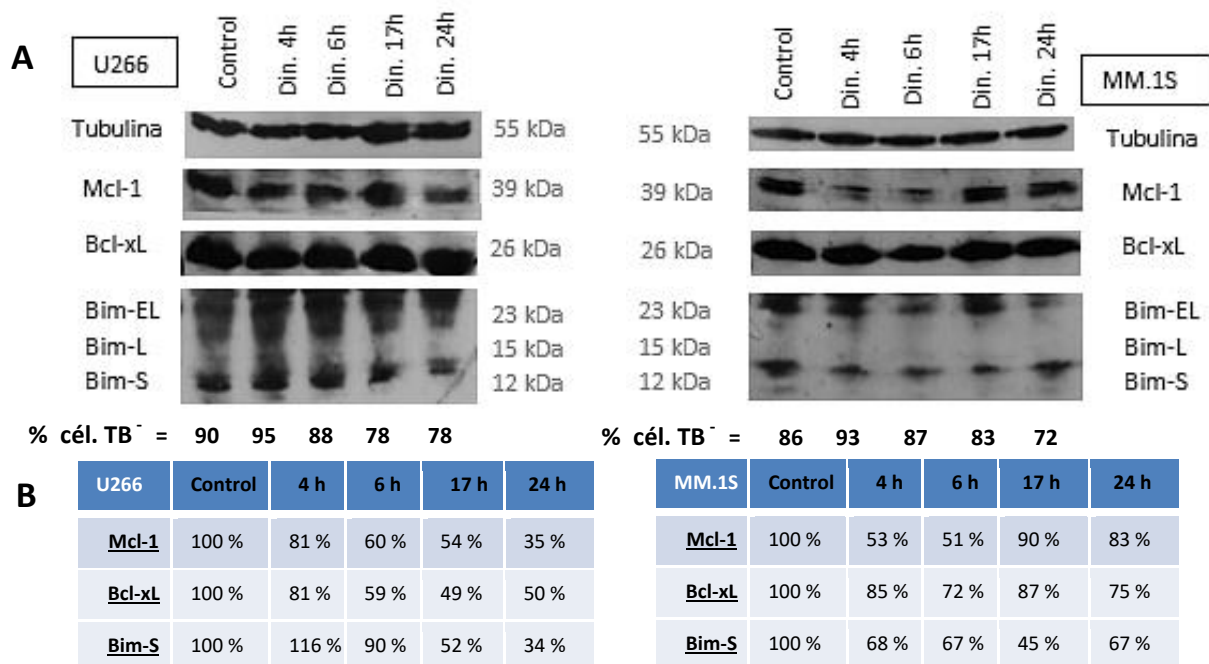


Figura 4. Ensayo de Western Blotting de proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas U266 y MM.1S incubadas a una concentración de dinaciclib (Din.) de 10 nM durante los tiempos indicados. (A) Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL. Se normalizó la cantidad de proteínas cargadas en los pocillos mediante el ensayo de cuantificación de la BCA. En el caso de las células U266, se cargaron 100 μ g de proteínas; mientras que en las MM.1S se cargaron 45 μ g de proteínas. Se muestra en cada caso los porcentajes de viabilidad determinados mediante tinción con azul Trypan (% cél. TB⁻) **(B)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de proteínas por densitometría y normalización con respecto a los controles de tubulina.

Con respecto a las células MM.1S, llama la atención que cuando se incuban con el dinaciclib durante tiempos cortos, se produce una disminución rápida de Mcl-1 (a 4h ya se alcanza la mitad de muerte); pero a medida que aumenta el tiempo de exposición a dicho compuesto, los niveles de la

proteína se recuperan parcialmente (*Figura 4 (A) y (B)*). Estos resultados serían compatibles con la existencia de una población de células de mieloma que no habían sufrido todavía apoptosis (población ya observada en los ensayos de MTT y de cuantificación de apoptosis por marcaje con anexina V-APC) en las que hubo un aumento significativo de los niveles de Mcl-1, quizá debida a la expulsión del fármaco por un transportador ABC [36] o a otro mecanismo de compensación que se ponga en marcha tras una exposición prolongada al dinaciclib. En el estudio anteriormente nombrado [35], también se observó este inesperado hallazgo del aumento de los niveles de Mcl-1 en tres de las cuatro líneas celulares estudiadas, sin conseguir ninguna explicación satisfactoria.

Algo parecido se observó en el perfil de expresión de la proteína Bcl-xL. La explicación a este fenómeno deberá ser abordada en estudios posteriores.

En las células MM.1S ocurre con Bim lo mismo que en las células U266. No se observó una variación consistente en el patrón de expresión de Bim, aunque quizá en este caso se pudo deber, en parte, a un problema técnico.

Para intentar interpretar mejor estos resultados, se realizó un nuevo experimento aumentando la dosis de dinaciclib a 15 nM para obtener una mayor muerte celular en ambas líneas. En este segundo experimento se normalizó la cantidad de proteínas cargadas en los pocillos del gel de electroforesis por un número igual de células azul Trypan-negativas (células vivas).

No obstante, en este segundo experimento tampoco se alcanzó un porcentaje de muerte alto (ver % de células *Trypan blue (TB)*-negativas en *Figura 5 (A)*). A partir de las suspensiones celulares control o tratadas con el dinaciclib, se tomaron 5×10^5 células azul Trypan-negativas para hacer los extractos, por lo que en este caso estábamos analizando la expresión proteica de aquellas células que todavía no habían experimentado necrosis secundaria tras el tratamiento con dinaciclib.

Después del tratamiento con dinaciclib 15 nM, las células U266 disminuyeron inicialmente su expresión de Mcl-1 (*Figura 5 (A) y (B)*). Aunque a las 17h de incubación se produjo un aumento relativo en los niveles de Mcl-1, tras 24h de exposición a la droga la expresión de la proteína disminuyó alrededor de un 26% respecto a la situación control. Con respecto a Bcl-xL, se observó que su expresión disminuía a tiempos cortos de incubación con el dinaciclib, alcanzado su mínimo de expresión a las 17h, pero pareció aumentar a las 24h de tratamiento con la droga. En cuanto a Bim, la expresión de todas las isoformas respecto a la situación control disminuyó (*Figura 5 (A) y (B)*).

Por su parte, las células MM.1S se comportaron de forma ligeramente diferente (*Figura 5 (A) y (B)*). Los niveles de Mcl-1 a tiempos cortos de incubación con el dinaciclib disminuyeron. Sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición al fármaco, se volvió a detectar un aumento relativo significativo en los niveles de expresión de Mcl-1. Por otro lado, Bcl-xL parece disminuir como respuesta al dinaciclib; y además se observa que la expresión basal de esta proteína en células MM.1S es menor que la detectada en células U266. Finalmente, Bim pareció aumentar a tiempos largos de incubación observándose, además, la expresión de otras isoformas de Bim.

Para concluir, los resultados extraídos de estos experimentos sugieren que el dinaciclib provoca una disminución de los niveles de Mcl-1 que puede ser determinante en la inducción de apoptosis en las líneas de mieloma U266 y MM.1S. Sin embargo, en MM.1S se observa un fenómeno de tipo “rebote” en la expresión de esta proteína, hecho que no hemos podido explicar con los experimentos llevados a cabo, y que sugiere la existencia de un posible mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria del dinaciclib en esta línea celular.

Por otra parte, no se obtuvieron resultados concluyentes de los cambios en la expresión de Bcl-xL y Bim, por lo que se debería llevar a cabo un estudio más exhaustivo, en el que no solo se repitiesen las condiciones ensayadas hasta ahora, sino que también se examinasen nuevas concentraciones de dinaciclib e, incluso, nuevos tiempos de incubación.

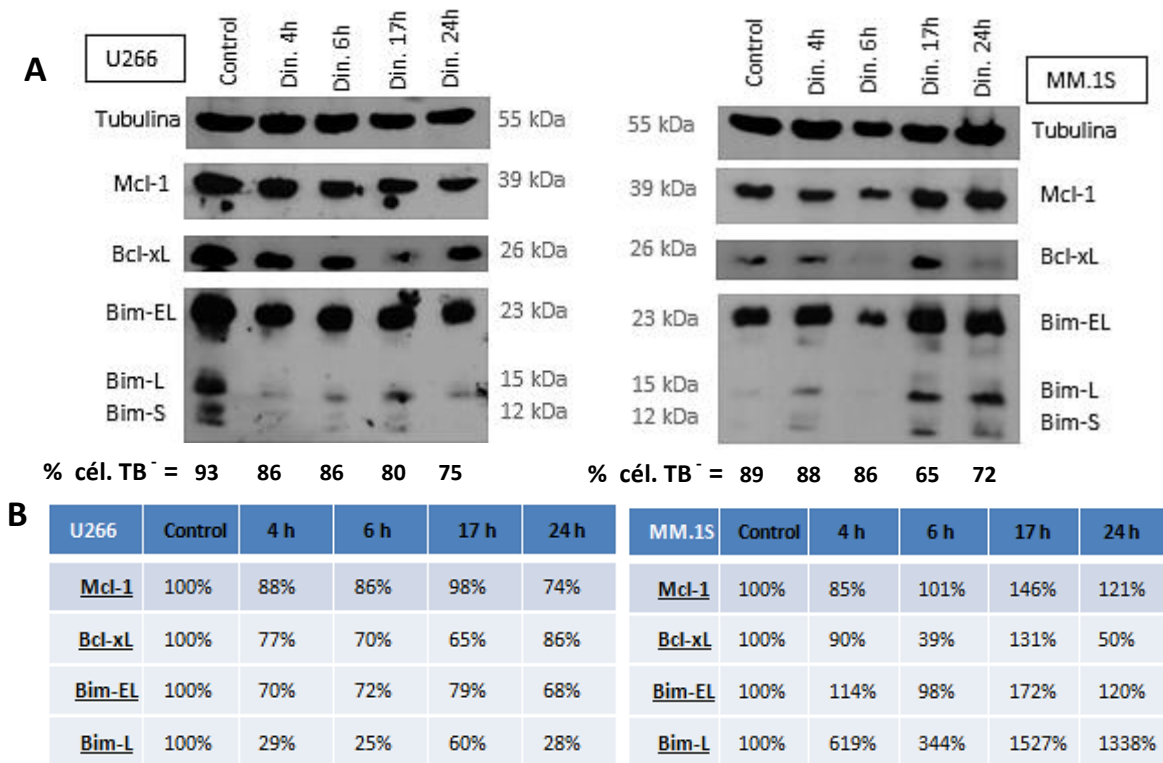


Figura 5. Ensayo de WB de proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas U266 y MM.1S incubadas a 15 nM de dinaciclib (Din.) durante los tiempos indicados. (A) Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL. Se cargaron 5×10^5 células totales en cada pocillo del gel de electroforesis. Se muestra en cada caso la viabilidad determinada mediante tinción con azul Trypan (% cél. TB). (B) Cuantificación de la intensidad de las bandas de proteínas por densitometría y normalización con respecto a los controles de tubulina. Se muestran los resultados representativos de dos experimentos independientes.

4.2.2. Expresión intracelular de Noxa, Puma y Bim analizada por citometría de flujo.

El estudio de la expresión de proteínas intracelulares mediante citometría de flujo presenta ventajas en comparación con la técnica tradicional (*Western Blotting*). El análisis por citometría de flujo permite una menor y mejor manipulación de las células (solo se permeabilizan, por lo que conservan su arquitectura). Además, se obtienen resultados individuales para cada célula, lo que permite diferenciar poblaciones de células con distintos niveles de expresión de la proteína objeto de estudio. Una posible limitación sería que en esta técnica es clave que el anticuerpo empleado sea altamente específico y presente una sensibilidad adecuada.

Se realizó un marcaje intracelular de las proteínas Puma y Noxa (proapoptóticas solo-BH3) y se analizó su expresión en la célula mediante citometría de flujo. Se escogió esta técnica porque ambas proteínas tienen un peso molecular muy pequeño y por *Western Blotting* es difícil detectarlas. Además, la citometría permite una mejor cuantificación de los datos.

En primer lugar se analizó la expresión de Noxa y Puma en células MM.1S y U266 en ausencia y presencia de dinaciclib 10 nM (durante 24h), concentración que causó la muerte de casi el 40% de las células (**Figura 6 (C)**).

Los diagramas de dot-plot revelaron el aumento de rugosidad de las células (se desplazan hacia la derecha del eje x, correspondiente a los detectores de dispersión lateral, SSC) a medida que sufrían apoptosis tras exposición prolongada al dinaciclib (**Figura 6 (D) y (E)**).

La expresión de Noxa en células MM.1S disminuyó ligeramente cuando las células se incubaron con la droga (**Figura 6 (A)**). En cambio, los niveles de Puma (**Figura 6 (B)**), se vieron reducidos de manera significativa por la acción del dinaciclib, observándose dos poblaciones celulares que expresaban distintos niveles de la misma proteína. Un pequeño número de células mantuvo la expresión de Puma (relativo a las células control), mientras que un alto porcentaje de células expresaron mucha menos cantidad de Puma. Esta observación es congruente con el hecho de que Puma es sustrato de caspasas. Sin embargo, los niveles de Noxa, que no es sustrato de caspasas, también descendieron.

Se pensó que la disminución de estas proteínas podría deberse a que las células estaban en una fase de apoptosis tan tardía (necrosis secundaria) que las proteínas implicadas habían comenzado a degradarse. Por este motivo se decidió repetir el experimento disminuyendo el tiempo de incubación con el dinaciclib (a la misma concentración) y añadiendo z-VAD 50 μ M, un inhibidor general de caspasas.

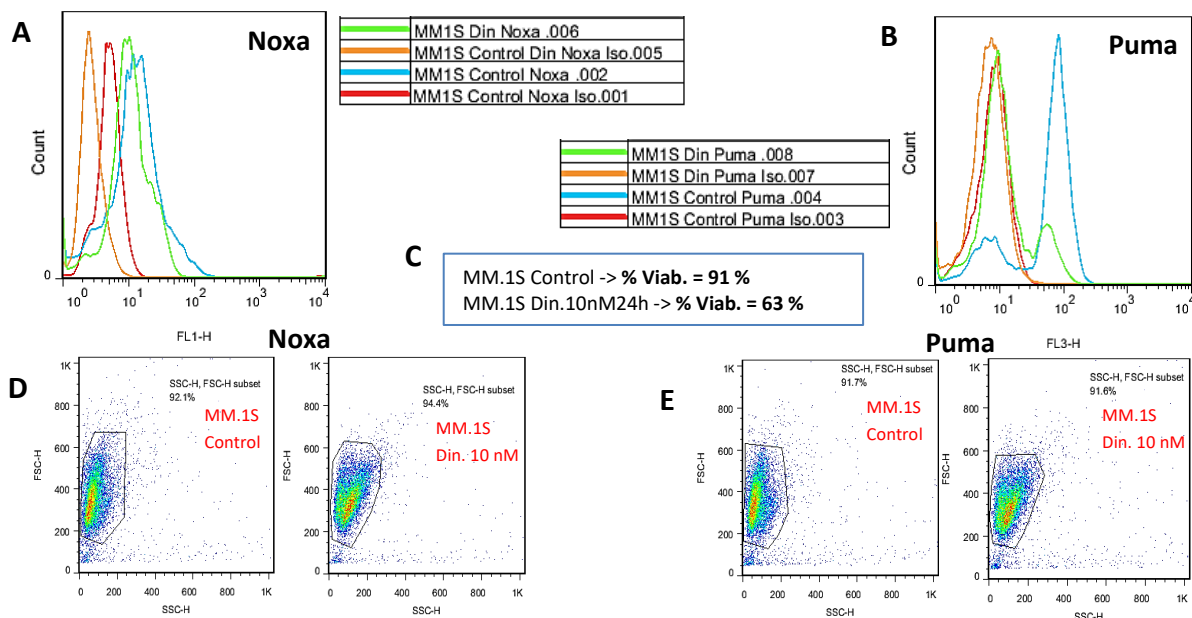


Figura 6. Análisis de la expresión de Puma y Noxa en células MM.1S en ausencia o presencia de dinaciclib 10 nM durante 24h. Las células se incubaron a una densidad de 3×10^5 cél/m. (A) y (B) Histogramas que muestran la variación de la expresión de Noxa y Puma, respectivamente, junto con los picos de fluorescencia de los controles de isotipo empleados –recogidos en *Anexo II*-. (C) Porcentajes de viabilidad de las células control (no tratadas) y de las tratadas con dinaciclib, determinados por tinción con azul Trypan. (D) y (E) Diagramas de dot-plot de las células analizadas en el estudio de la expresión de Noxa y Puma respectivamente. Se muestra el *gate* de la población seleccionada para el análisis de expresión.

Tal y como se observa en la **Figura 7 (A) y (B)**, los niveles de Noxa y Puma en las células MM.1S en ausencia o presencia de dinaciclib y z-VAD no variaron, quizás porque no se indujo apoptosis (los porcentajes de muerte son escasos, **Figura 7 (C)**, y Puma no se ha degradado por las caspasas).

En cuanto a la línea U266, el análisis de los niveles de Puma no se pudo realizar debido a problemas técnicos. El análisis de la expresión de Noxa reveló que, en ausencia de z-VAD, había una población de células que expresaba menor cantidad de Noxa respecto a la situación control. Sin embargo, al añadir el inhibidor de las caspasas, los niveles de Noxa se recuperaron, es decir, que las células mantenían constantes los niveles de expresión de Noxa aun en presencia de dinaciclib (**Figura 7 (D)**).

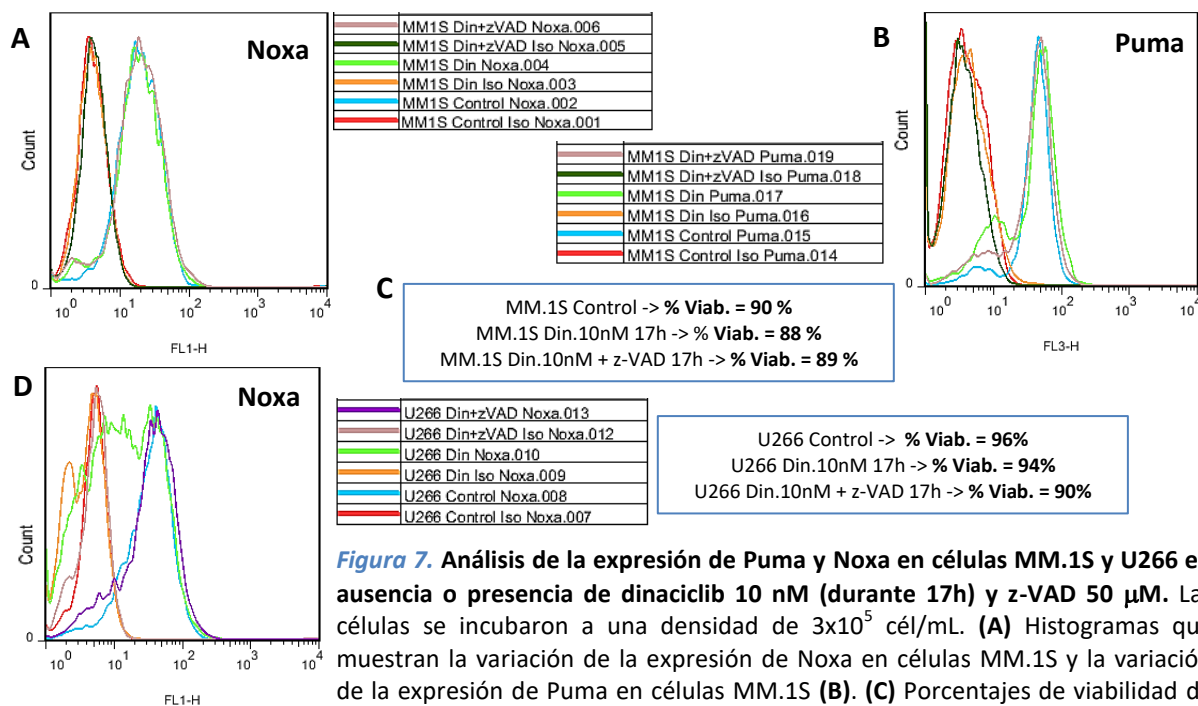


Figura 7. Análisis de la expresión de Puma y Noxa en células MM.1S y U266 en ausencia o presencia de dinaciclib 10 nM (durante 17h) y z-VAD 50 μ M. Las células se incubaron a una densidad de 3×10^5 cél/mL. **(A)** Histogramas que muestran la variación de la expresión de Noxa en células MM.1S y la variación de la expresión de Puma en células MM.1S **(B)**. **(C)** Porcentajes de viabilidad de las células MM.1S empleadas en el marcaje (determinados mediante tinción con azul Trypan). **(D)** Variación de la expresión de Noxa en células U266, y porcentajes de viabilidad de las células (determinados por tinción con azul Trypan).

Se realizó un tercer experimento en el que las células se incubaron durante 24h con una dosis de dinaciclib 12,5 nM y en presencia o ausencia de z-VAD.

De nuevo se observó que, tras incubación con dinaciclib a una dosis capaz de inducir apoptosis en las células de mieloma, los niveles de Noxa y Puma disminuyeron en ambas líneas (**Figura 8**). En los histogramas que muestran los niveles de expresión de Puma, distinguimos dos subpoblaciones celulares: una de ellas expresa más cantidad de proteína que la otra. Esto puede deberse a que, como ya se ha discutido anteriormente, un porcentaje de células es menos sensible al dinaciclib y, por tanto, todavía no habían sufrido apoptosis a la concentración empleada de dinaciclib en el experimento. En las células en las que se ha añadido z-VAD y se ha inhibido la actividad de las caspasas, los niveles de Puma y Noxa no variaron con respecto al control.

Como muestran los diagramas dot-plot FSC vs. SSC (**Figura 8**), el efecto citotóxico del dinaciclib provocó un desplazamiento de la población celular hacia SSC más altas y FSC más bajas. Este patrón es indicativo de que está ocurriendo muerte celular.

Finalmente, se intentó estudiar la expresión de la proteína solo-BH3 Bim mediante marcaje intracelular y posterior análisis por citometría de flujo. La diferencia entre analizar los niveles de esta proteína a través de citometría de flujo y de *Western Blotting* es que, mientras que la primera técnica solo muestra la variación del *pool* global de proteína sin distinguirse las distintas isoformas, el *Western Blotting* resuelve las proteínas en función de sus pesos moleculares permitiendo observar las distintas isoformas e, incluso, su abundancia.

Tras realizar dos experimentos independientes en las mismas condiciones, los resultados obtenidos fueron dispares y, lo más importante, no fueron fiables ya que el marcaje con el control de isotipo producía igual o más fluorescencia que el del propio anticuerpo anti-Bim. Por tanto, se concluyó que el anticuerpo anti-Bim empleado tenía poca especificidad de unión en estas circunstancias, por lo que no era fiable su uso para realizar un análisis de la expresión de Bim por citometría de flujo. *Estos resultados se añaden como material suplementario en el Anexo IV.*

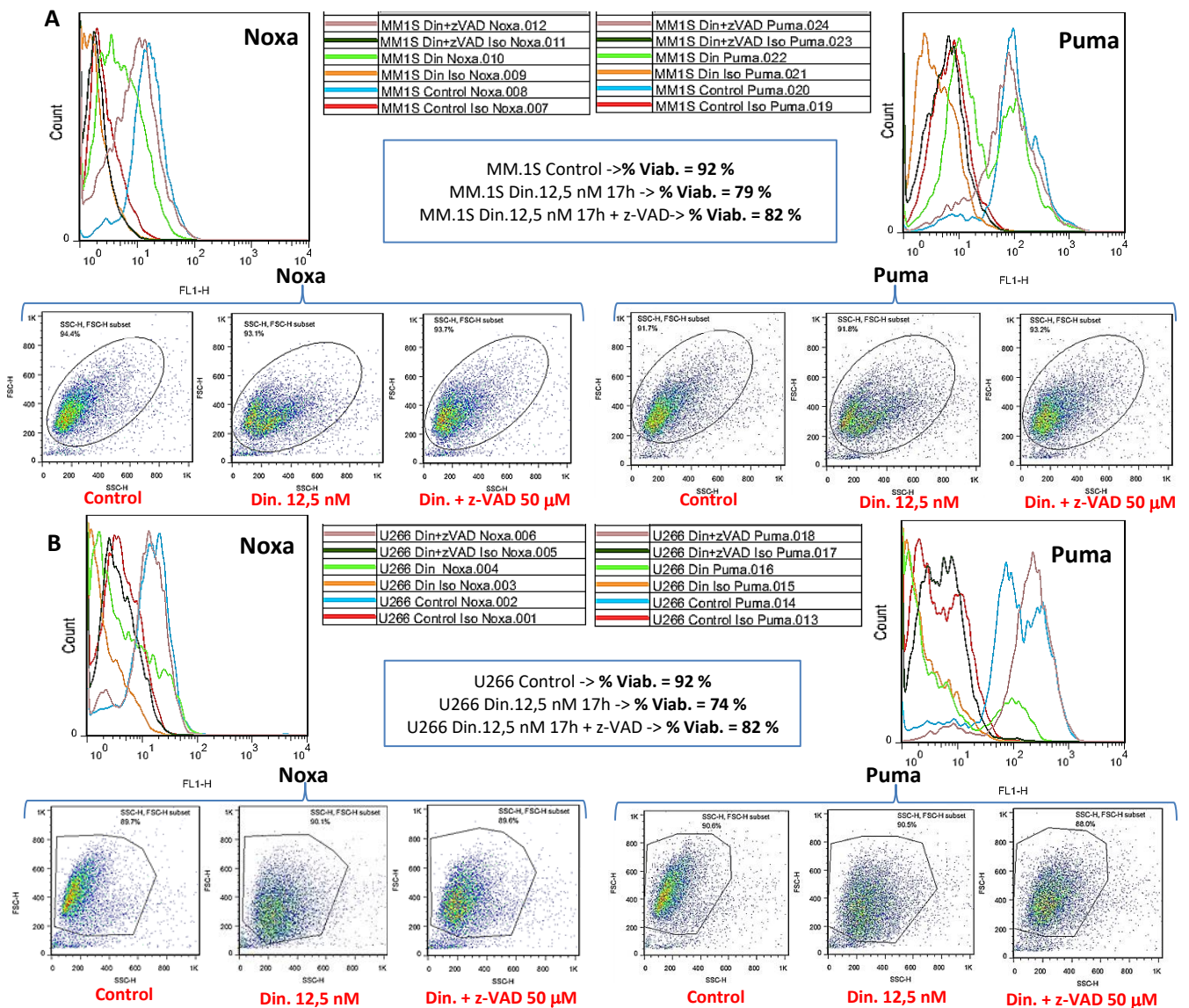


Figura 8. Análisis de la expresión de Puma y Noxa en células MM.1S (A) y U266 (B) en ausencia o presencia de dinaciclib (12,5 nM) y z-VAD 50 µM durante 24h. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL y se incubaron con los compuestos a las dosis indicadas. Se incluyen los histogramas del marcaje intracelular de Puma y Noxa, así como sus respectivos controles de isotipo. También se presentan los diagramas dot-plot FSC vs. SSC que muestran las poblaciones de células. La viabilidad celular se determinó por tinción con azul Trypan.

4.3. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se ha pretendido analizar el mecanismo por el cual el fármaco dinaciclib induce apoptosis en células de mieloma múltiple humano. Las líneas celulares con las que se trabajó en los experimentos realizados fueron MM.1S y U266. Es importante tener presente que las células de mieloma poseen mucha inestabilidad genómica lo que provoca una gran diversidad y disparidad de comportamiento en sus líneas celulares. Por este motivo, es esperable que no todas las líneas de mieloma respondan de la misma manera a variaciones en las condiciones de su entorno.

Se sabe que el dinaciclib es un potente inhibidor de las Cdk1, 2, 5 y 9. Su acción inhibitoria sobre las Cdk1 y Cdk2 puede provocar un arresto del ciclo celular en la fase G1, lo que causaría una apoptosis tardía, ya que las células pueden tener estrategias para superar los atascos en el ciclo celular. Por otro lado, al inhibir la Cdk9 se provoca una parada en la transcripción mediada por la RNA polimerasa II. Esta inhibición de la transcripción conlleva un descenso de los niveles de proteínas de vida media corta [22],[12]. En este sentido pueden verse afectados los niveles de expresión de

algunas proteínas antiapoptóticas como pueden ser Mcl-1 y Noxa. Por un lado, Mcl-1 posee secuencias PEST (Pro-Glu-Asp-Thr) que la hacen ser susceptible de una rápida degradación en el proteasoma. Por lo tanto, es una proteína que está continuamente sintetizando y degradándose. Si inhibimos con el dinaciclib, aun ligeramente, la transcripción dependiente de Cdk9, sus niveles se van a ver afectados. Por otro lado, aunque Noxa no tiene secuencias PEST, sí que posee regiones sensibles a una degradación proteasómica. Por este motivo, se estudió la implicación que pudieran tener estas proteínas en el mecanismo inductor de apoptosis del dinaciclib.

En este contexto, se inició el presente estudio en el que, en primer lugar, se comprobó y caracterizó el efecto inductor de apoptosis del dinaciclib sobre ambas líneas celulares modelo; y se realizaron curvas dosis-respuesta para seleccionar las concentraciones que se emplearían en los ensayos posteriores. Una vez hecho esto, se analizaron algunas proteínas de la familia Bcl-2 que podían estar implicadas en la apoptosis inducida por el dinaciclib.

En nuestros experimentos se observó un descenso transitorio en los niveles de expresión de Mcl-1, que puede deberse tanto a la degradación de la proteína mediada por las caspasas como a la inhibición que ejerce el dinaciclib sobre la RNA pol II durante la elongación de la transcripción. Al disminuir Mcl-1, esta proteína interaccionaría en menor medida con Bax y Bak (proteínas formadoras del poro apoptótico mitocondrial) disminuyendo así su acción antiapoptótica y permitiendo la inducción de apoptosis. Esta hipótesis estaría apoyada por el modelo indirecto de activación de Bax y Bak, según el cual un bloqueo de las proteínas antiapoptóticas (tales como Mcl-1) sería suficiente para que Bax y Bak (que se encuentran en un estado pre-activado) formasen el poro mitocondrial y desencadenasen la apoptosis [37]. Este parece ser el principal mecanismo de acción por el cual el dinaciclib induce apoptosis en las células de mieloma. Por otro lado, dado que no se observó un patrón claro en la variación de la expresión de las proteínas Bcl-xL o Bim, no podemos confirmar o descartar su posible papel o implicación en el mecanismo de inducción de la apoptosis ejercido por el dinaciclib.

Con respecto a las proteínas proapoptóticas solo-BH3 Puma y Noxa, se observó que el dinaciclib no inducía su expresión, ya que los niveles de estas proteínas no aumentaban en ninguno de los casos en los que se incubaron las células en presencia de dicho fármaco. De hecho, los niveles de estas proteínas disminuyeron tras la exposición al dinaciclib. Esto se debe a que, por un lado, Puma es degradado por las caspasas (proteasas ejecutoras de la apoptosis); y por otro lado, aunque Noxa no sea sustrato de caspasas, sí que interacciona con Mcl-1 [38], por lo que al disminuir los niveles de esta segunda proteína, se libera Noxa y esta es degradada por el proteasoma. Este razonamiento se apoya en los resultados de citometría obtenidos en los que los niveles de ambas proteínas se mantuvieron constantes tras añadir el inhibidor general de caspasas z-VAD.

Los niveles basales de expresión de Noxa en las células de mieloma son muy bajos, y solo aumentan cuando algún agente daña el DNA, en la apoptosis dependiente de p53 (en la que también aumenta los niveles de Puma) o cuando se inhibe el proteasoma. En nuestro caso, la droga empleada (dinaciclib) ni daña el DNA, ni estimula p53, ni inhibe al proteasoma. Por consiguiente, es congruente que los niveles de Noxa no aumenten. Y tampoco lo hacen los de Puma. Con todo, nuestros resultados sugieren que las proteínas proapoptóticas Puma y Noxa no participan en la apoptosis dependiente de dinaciclib.

No obstante, dado que la variabilidad observada en los estudios preliminares ha sido importante (sobre todo en los *WB*), los resultados obtenidos deberían ser confirmados con nuevos análisis.

5. CONCLUSIONES

- El dinaciclib posee un efecto citotóxico dosis-dependiente que causa apoptosis en las líneas celulares de mieloma MM.1S y U266.
- El dinaciclib provoca una disminución de los niveles de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL en la línea celular U266. En la línea MM.1S los niveles de Mcl-1 disminuyen cuando las células se incuban durante tiempos cortos con dinaciclib. A tiempos largos de exposición a la droga, los niveles de Mcl-1 se recuperan parcialmente. Esto no parece ocurrir con Bcl-xL.
- El dinaciclib no induce la expresión de Puma y Noxa, por lo que estas proteínas no parecen estar implicadas en la apoptosis dependiente de dinaciclib.
- Aunque Noxa no es sustrato de caspasas, sus niveles disminuyen en ausencia de un inhibidor de caspasas y se mantienen en presencia de este compuesto. Esto sugiere que Noxa se encuentra interaccionando con Mcl-1, y cuando los niveles de Mcl-1 se reducen, Noxa se libera de esta interacción y es degradada por el proteasoma. Por tanto, la inhibición de las caspasas impide la degradación de Mcl-1 y la liberación de Noxa.
- El mecanismo por el que el dinaciclib induce apoptosis en las células de mieloma parece depender de su inhibición de la Cdk9. Esto provoca una parada de la elongación de la transcripción y, como consecuencia, los niveles de Mcl-1 (proteína que tiene una vida media corta) descienden rápidamente y esto desencadena la muerte por apoptosis.

5. CONCLUSIONS

- Dinaciclib has elicits a dose-dependent cytotoxic effect that induces apoptosis in MM.1S and U266 myeloma cell lines.
- Dinaciclib brings out a decrease in the levels of anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL in the U266 cell line. Mcl-1 levels decrease in MM.1S cell line after the cells were incubated for short periods of time with dinaciclib. Whereas at longer incubation periods, Mcl-1 levels partially recovered. This effect is not observed in case of Bcl-xL.
- Dinaciclib does not induce Puma and Noxa expression, so these proteins appear not to be involved in dinaciclib-dependent apoptosis.
- Noxa levels decrease even though it is not a substrate of caspases. Its levels are maintained in the presence of a caspase inhibitor. This suggests that Noxa is interacting with Mcl-1, and when Mcl-1 levels are reduced, Noxa is released from this interaction and degraded by the proteasome. So, inhibition of caspases prevents Mcl-1 from degradation and Noxa from release.
- The mechanism by which dinaciclib induces apoptosis in myeloma cells seems to depend on its inhibition of Cdk9, which causes a halt in transcription elongation. As a consequence, the Mcl-1 levels (protein which has a short half-life) fall quickly and this triggers death by apoptosis.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fonseca R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. *Leukemia*, diciembre 2009; 23(12): 2210-21.
- [2] Donk NWCJ, Mutis T, Poddighe PJ, Lokhorst HM, Zweegman S. *Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma*. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016;(S1):110.
- [3] Röllig C, Knop S, et al. *Multiple myeloma*. *The Lancet*. 5 de junio de 2015; 385(9983):2197-208.
- [4] Jarauta Azcona Vidal.(2015). *Interrelaciones entre apoptosis y autofagia. Aplicación al tratamiento de células de mieloma con el inhibidor del proteasoma carfilzomib*. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.
- [5] Kuehl WM, Bergsagel PL. *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions*. *Nat Rev Cancer*. Marzo de 2002;2(3):175-87.
- [6] Gómez Benito María. (2006). *Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor de farnesil-transferasas BMS-214662, Apo2L/TRAIL e Interferón-alfa en el mieloma múltiple humano. Aplicaciones Terapéuticas*. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.
- [7] Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C, et al. *Health Effects of Dioxin Exposure: A 20-Year Mortality Study*. *Am J Epidemiol*. 1 de junio de 2001;153(11):1031-44.
- [8] López-Royuela et al. *Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells*. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 311, 2010.
- [9] Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. *Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies*. *Blood*. 1 de marzo de 2008;111(5):2516-20.
- [10] Quach H, Ritchie D, Stewart A, Neeson P, Harrison S, Smyth M, et al. *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma*. *Leukemia*. Enero de 2010;24(1):22-32.
- [11] Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. *Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective*. *Oncogene*. 2005;24(17):2909-15.
- [12] Kumar SK, LaPlant B, et al. *Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma*. *Blood*. 15 de enero de 2015;125(3):443-8.
- [13] Morgan DO. *CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):261-91.
- [14] Schwartz GK, Shah MA. *Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy*. *Journal of Clinical Oncology*. 20 de diciembre de 2005;23(36):9408-21.
- [15] Malumbres M, Barbacid M. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat Rev Cancer*. marzo de 2009;9(3):153-66.
- [16] Oelgeschläger T. *Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control*. *J Cell Physiol*. 1 de febrero de 2002;190(2):160-9.
- [17] Kastan, M. B. & Bartek, J. *Cell-cycle checkpoints and cancer*. *Nature* 432, 316–323 (2004).
- [18] Bregman DB, Pestell RG, Kidd VJ. *Cell cycle regulation and RNA polymerase II*. *Front Biosci*. 1 de febrero de 2000;5:D244-257.

- [19] Knuesel MT, Meyer KD, Bernecky C, Taatjes DJ. *The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function*. Genes Dev. 15 de febrero de 2009;23(4):439-51.
- [20] Gojo I, Zhang B, Fenton RG. *The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells through Transcriptional Repression and Down-Regulation of Mcl-1*. Clin Cancer Res. 1 de noviembre de 2002;8(11):3527-38.
- [21] Dispenzieri A, et al. *Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points*. Haematologica. Enero de 2006;91(3):390-3.
- [22] Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, et al. *Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor*. Mol Cancer Ther. agosto de 2010;9(8):2344-53.
- [23] Johnson AJ, Yeh Y-Y, Smith LL, Wagner AJ, Hessler J, Gupta S, et al. *The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia. diciembre 2012;26(12):2554-7.
- [24] Meier, P., A. Finch, and G. Evan, Apoptosis in development. Nature, 2000. 407(6805):p.784-8.
- [25] Brunner, T. and C. Mueller, *Apoptosis in disease: about shortage and excess*. Essays Biochem, 2003.39:p.119-30.
- [26] Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M. *Anti-apoptosis and cell survival: A review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1 de enero de 2011;1813(1):238-59.
- [27] Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
- [28] Cory S, Adams JM. *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer. Septiembre de 2002;2(9):647-56.
- [29] Angosto MC. *Bases moleculares de la apoptosis*. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003;69(1).
- [30] Jarauta V, Jaime P, et al. *Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo*. Cancer Letters. 1 de noviembre de 2016;382(1):1-10.
- [31] Gomez-Bougie P, et al. *Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma*. Cancer Res. 1 de junio de 2007;67(11):5418-24.
- [32] Derenne S, Monia B, et al. *Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells*. Blood. 1 de julio de 2002;100(1):194-9.
- [33] Gupta VA, Matulis SM, Conage-Pough JE, et al. *Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma*. Blood. 6 de abril de 2017;129(14):1969-79.
- [34] Gomez-Bougie P, Bataille R, Amiot M. *The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells*. Eur J Immunol. Noviembre de 2004;34(11):3156-64.
- [35] Gojo I, Zhang B, Fenton RG. *The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells through Transcriptional Repression and Down-Regulation of Mcl-1*. Clin Cancer Res. 1 de noviembre de 2002;8(11):3527-38.
- [36] Abraham J, Salama NN, Azab AK. *The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma*. Leukemia & Lymphoma. 2 de enero de 2015;56(1):26-33.
- [37] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, Delft MF van, et al. *Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak*. Science. 9 de febrero de 2007;315(5813):856-9.
- [38] Akgul C. *Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer*. Cell Mol Life Sci. abril de 2009;66(8):1326-36.

ANEXOS

ANEXO I

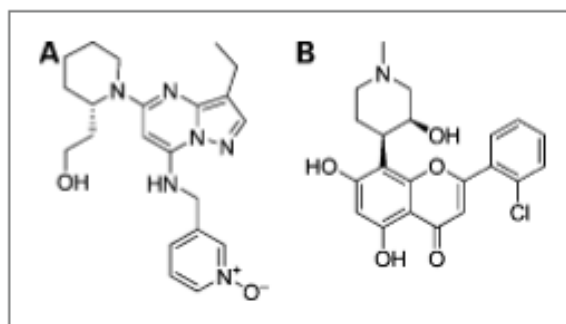


Figura A1. Estructuras del dinaciclib (A) y del flavopiridol (B).

Compuesto	Cdk2	Cdk5	Cdk1	Cdk9
	IC ₅₀ (nmol/L)			
Dinaciclib	1	1	3	4
Flavopiridol	12	14	3	4

Tabla A1. Comparación del efecto inhibitor de Cdk entre el dinaciclib y el flavopiridol. Se observa que las IC₅₀ de inhibición de Cdk del dinaciclib son menores que las del flavopiridol, lo que significa que el dinaciclib es un inhibidor más específico.

ANEXO II

Composición de los geles	Stacking	Resolving (12%)
30% Acrilamida/Bisacrilamida	0,65 mL	4 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,26 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2,5 mL
10% SDS	50 µL	100 µL
Agua destilada	3,00 mL	3,35 mL
10% APS	200 µL	200 µL
TEMED	20 µL	20 µL
TOTAL	5 mL	10 mL

Tabla A2. Composición de los geles discontinuos empleados en la separación de proteínas mediante electroforesis desnaturizante en SDS.

ANEXO III

Anticuerpos empleados en los <i>Western Blotting</i> realizados			
Anticuerpo	Tipo, especie	Dilución	Proveedor
Anti-Mcl-1	Policlonal, Conejo	1/1000	Santa Cruz
Anti-Bcl-xL	Policlonal, conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bim	Monoclonal, conejo	1/1000	Abcam
Anti-tubulina	Monoclonal, ratón	1/10000	Sigma
IgG anti-conejo PO	Monoclonal, ratón	1/20000	Sigma
IgG anti-conejo PA	Monoclonal, ratón	1/20000	Sigma
IgG anti-ratón PO	Monoclonal, conejo	1/20000	Sigma
IgG anti-ratón PA	Monoclonal, conejo	1/20000	Sigma

Tabla A3. Descripción de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en el *Western blotting*.

Anticuerpos empleados en marcaje intracelular de proteínas			
Anticuerpos primarios	Tipo, especie	Dilución	Proveedor
Anti-Noxa	Monoclonal, Ratón	1/50	Abcam
Control de isotipo: IgGs ratón IgG1	Monoclonal, Ratón	1/10	Invitrogen
Anti-Puma	Monoclonal, conejo	1/30	Abcam
Control de isotipo: IgG conejo monoclonal	Monoclonal, conejo	0,6/100 (Puma) 0,9/100 (Bim)	Abcam
Anti-Bim	Monoclonal, conejo	1/50	Abcam
Anticuerpos secundarios	Tipo, especie	Dilución	Proveedor
Anti-ratón IgG1 Alexa 488	Cabra	1/100	Molecular Probe
Anti-conejo PE-Cy5	Cabra	1/50	Caltag
Anti-conejo Alexa 488	Cabra	1/500	Invitrogen
Anti-conejo IgG Dy 488	Cabra	1/500	Abcam

Tabla A4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el marcaje intracelular de las proteínas Noxa, Puma y Bim para un posterior análisis mediante citometría de flujo.

ANEXO IV

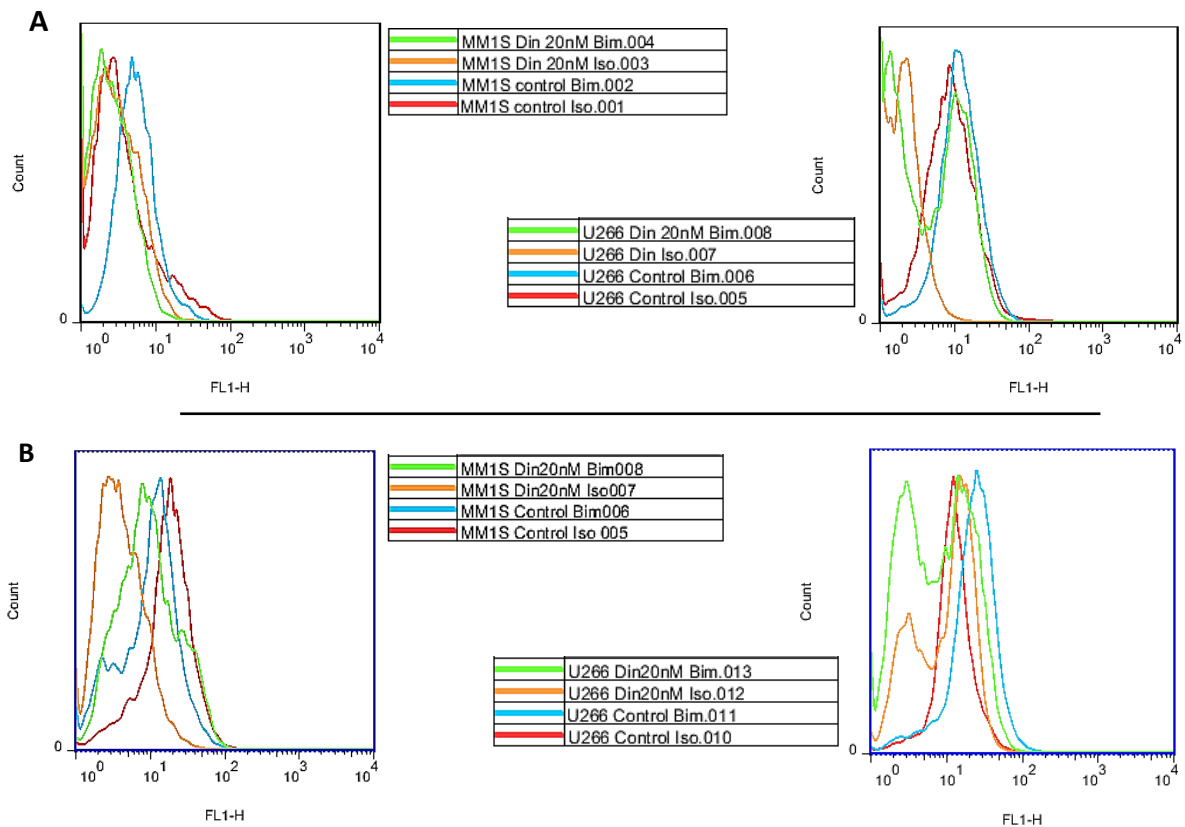


Figura A2. Análisis de Bim mediante citometría de flujo en células MM.1S y U266. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 cél/mL en ausencia o presencia de dinaciclib 20 nM durante 17h. Se hicieron dos experimentos independientes (A) y (B) con las mismas condiciones. Los picos correspondientes al marcaje de los controles de isotipo están, en algunos casos, más desplazados a la derecha que los del anticuerpo primario dirigido contra Bim. Es decir, el marcaje con el control de isotipo genera una mayor fluorescencia en las células de mieloma que el del propio anticuerpo específico. Por tanto, no se recomienda el empleo de este anticuerpo con la finalidad explicada.