



**Universidad**  
Zaragoza



**Facultad de Medicina**  
**Universidad Zaragoza**

Trabajo Fin de Máster

# Papel de la vía cGas-STING en el mieloma múltiple

Role of cGAS-STING pathway in myeloma multiple

## **Autor**

Mario Belío Miranda

## **Directores**

Isabel Marzo Rubio

Pilar Mozas Alonso

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**

**Apoptosis, Inmunidad y Cáncer**

**Máster en Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del Cáncer**

**Curso académico 2024-2025**



# ABREVIATURAS

**7-AAD:** 7-aminoactinomicina D

**ACD:** Muerte celular accidental, *Accidental Cell Death*

**AECC:** Asociación Española Contra el Cáncer

**APC:** células presentadoras de antígenos, *Antigen-Presenting Cell*

**ATP:** Adenosin trifosfato

**BCMA:** *B-cell maturation antigen*

**CAR-T:** receptor de antígeno quimérico de células T, *Chimeric Antigen Receptor T-Cell*

**Caspasa:** Cistein-Aspártico Proteasa, *cysteine–aspartic acid protease*

**cDNA:** ADN codificante

**CFZ:** Carfilzomib

**cGAMP:** 2´3´GMP-AMP cíclico

**cGAS:** GMP-AMP Cíclico Sintasa, *Cyclic GMP-AMP Synthase*

**CP:** Núcleo catalítico del proteasoma, *Core Particle*

**CRT:** Calreticulina, *Calreticulin*

**CXCL10:** Ligando 10 del motivo quimiocina C-X-C, *Chemokine interferon-γ inducible protein 10 kDa*

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a peligro, *Danger-Associated Molecular Pattern*

**DISC:** complejo señalizador de muerte inducida, *Death Inducing Signaling Complex*

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico (ADN), *Deoxyribonucleic acid*

**ENKT:** linfomas de células natural killer/T (NK/T) extranodal nasal, *Extranodal natural killer/T-cell lymphoma nasal type*

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas

**FDA:** *Food and Drugs Administration*

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**HMGB1:** Proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad, *High mobility group box 1*

**IAP:** Inhibidor de caspasas, *Inhibitor of apoptosis*

**ICD:** Inhibidores del punto de control inmunológico, *Immune Checkpoint Inhibitors*

**ICD:** Muerte celular inmunogénica

**IFN:** Interferón

**Ig:** Inmunoglobulinas

**IRF3:** Factor Regulador de Interferón 3, *Interferon Regulatory Factor 3*

**MAMPs:** Patrones moleculares asociados a microorganismos, *Microbe-Associated Molecular Pattern*

**MGUS:** gammapatía monoclonal de significado indeterminado, *Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*

**MHC1:** Complejo mayor de histocompatibilidad 1, *Major Histocompatibility Complex 1*

**MM:** Mieloma múltiple

**mtDNA:** ADN mitocondrial, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCD:** Muerte celular programada, *Programed Cell Death*

**PRR:** receptores de reconocimiento de patrones, *Pattern recognition receptors*

**qPCR:** PCR cuantitativa, *quantitative PCR*

**QVD:** QVD-POH

**RNA:** Ácido Ribonucleico (ARN), *Ribonucleic acid*

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno, *Reactive Oxygen Species*

**RP:** Complejo regulador del proteasoma, *Regulatory Particle*

**Rpm:** subunidad reguladora no ATPásica, *Regulatory Particle of Non-ATPase*

**Rpt:** partícula reguladora de la triple-ATPasa, *Regulatory Particle of Triple-ATPase*

**RT-PCR:** PCR con transcriptasa inversa, *Reverse Transcription PCR*

**S63:** S63845

**SMM:** Mieloma múltiple latente, *Smoldering Multiple Myeloma*

**STING:** Estimulador de Genes del Interferón, *Stimulator of Interferon Genes*

**TBK1:** Quinasa 1 de Unión a TANK, *TANK-Binding Kinase 1*

**UPR:** Respuesta a proteínas desplegadas, *Unfolded Protein Response*

**UPS:** Degradación proteica dependiente de ubiquitina, *Ubiquitin/Proteasome System*

# Índice

1.	Resumen/ <i>Abstract</i> .....	1
2.	Introducción .....	3
2.1.	Mieloma Múltiple.....	3
2.1.1.	Características generales.....	3
2.1.2.	Desarrollo del mieloma múltiple.....	3
2.1.3.	Tratamientos actuales del mieloma múltiple.....	4
2.2.	El proteasoma .....	5
2.2.1.	Características generales.....	5
2.2.2.	Estructura y subunidades.....	6
2.2.3.	Importancia del proteasoma en el mieloma múltiple.....	7
2.3.	Muerte celular .....	8
2.3.1.	La apoptosis.....	8
2.3.2.	Miméticos de proteínas solo-BH3 .....	12
2.4.	La inmunoterapia y el mieloma múltiple .....	13
2.3.1.	Muerte inmunogénica.....	13
2.3.2.	La vía de señalización cGAS/STING.....	15
3.	Antecedentes y objetivos.....	18
4.	Materiales y métodos .....	20
4.1.	Líneas celulares .....	20
4.2.	Descongelación de células .....	20
4.3.	Ensayos de crecimiento celular .....	20
4.4.	Ensayos de citotoxicidad mediante citometría de flujo.....	21
4.5.	Análisis de expresión de proteínas mediante <i>western blot</i> .....	21
4.5.1.	Obtención de los extractos de proteína.....	21
4.5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	22
4.5.3.	<i>Western blot</i> .....	22
4.5.4.	Análisis de densitometría .....	23
4.6.	Análisis de la liberación de mtDNA .....	23
4.7.	Detección de la expresión de IFN tipo I.....	24
4.8.	Cuantificación por qPCR.....	24
4.9.	Análisis estadístico y generación de gráficas .....	26
5.	Resultados .....	27
5.1.	Efecto de la activación de cGAS/STING en mieloma múltiple. ....	27

5.1.1.	Efectos en el crecimiento celular .....	27
5.1.2.	Efectos en la viabilidad celular .....	28
5.2.	Efecto de la activación de cGAS/STING en combinación con S63845.....	30
5.3.	Efecto del carfilzomib en la vía cGAS/STING en el mieloma múltiple.....	31
5.3.1.	Cuantificación relativa de mtDNA citosólico y de IFN $\beta$ mediante qPCR.....	32
5.3.2.	Determinación de la liberación de mtDNA en el citosol .....	34
5.3.3.	Respuesta IFN tipo I.....	38
5.3.4.	Cuantificación de la expresión y fosforilación de las proteínas partícipes en la vía cGAS/STING .....	39
6.	Discusión .....	41
6.1.	Efecto de los agonistas de STING en el mieloma múltiple.....	41
6.2.	Combinación de agonistas de STING con miméticos de BH3.....	42
6.3.	Liberación del mtDNA .....	43
6.4.	Producción de IFN $\beta$ tras el tratamiento con carfilzomib .....	45
6.5.	Cuantificación de la expresión y fosforilación de las proteínas partícipes en cGAS/STING.....	45
7.	Conclusiones/Conclusions.....	48
8.	Bibliografía .....	49
Anexos.....		56
Anexo 1 .....		56
Anexo 2 .....		56
Anexo 3 .....		64

## 1. Resumen/Abstract

El mieloma múltiple (MM) es una de las neoplasias hematológicas más comunes, siendo responsable del 10% de casos de estos tipos de cáncer. Se caracteriza por la proliferación descontrolada de células B plasmáticas en la médula ósea. Causa una disfunción multisistémica, incluyendo daño óseo, hipercalcemia y fallo multiorgánico debido a la acumulación de anticuerpos denominados proteína M. En la actualidad se dispone de una gran variedad de terapias incluyendo inhibidores del proteasoma, anticuerpos monoclonales, y CAR-T, aunque su eficacia varía entre pacientes y existe una alta prevalencia de resistencias. A pesar de todos los avances, el MM se mantiene como una enfermedad incurable. El MM es un tumor poco inmunogénico, por lo que la muerte celular inmunogénica (ICD) podría potenciar el efecto de las inmunoterapias. En el presente trabajo se aborda el estudio de la vía cGAS/STING, que al activarse produce una respuesta de IFN tipo I, favoreciendo una respuesta inmune. Inicialmente se estudia el efecto del agonista de STING diABZI tanto en solitario como en combinación con el mimético de BH3, S63845. Se demuestra que diABZI es capaz de inducir muerte celular de manera dosis-dependiente en varias líneas celulares de MM, siendo especialmente sensible la línea que presenta p53 *wild type*, y al combinarlo con S63845 se obtiene un efecto mayor que en monoterapia. También se investiga la capacidad del carfilzomib, inhibidor del proteasoma, de activar la vía cGAS/STING, cuantificando la liberación de DNA mitocondrial al citosol, la producción de IFN  $\beta$  y los niveles de expresión y estado de fosforilación de las proteínas participantes de la vía. Mediante los tres enfoques se verifica la activación de cGAS/STING tras el tratamiento con carfilzomib cuando se inhiben farmacológicamente las caspasas o en líneas celulares poco dependientes de ellas. En conclusión, este trabajo destaca el potencial terapéutico de la activación de la vía cGAS-STING en el tratamiento del mieloma múltiple, tanto en monoterapia como en combinación, que, en un futuro, podría representar una alternativa terapéutica.

Multiple myeloma (MM) is one of the most common hematological malignancies, accounting for 10% of cases of these types of cancer. It is characterized by the uncontrolled proliferation of plasma B cells in the bone marrow. It causes multisystem dysfunction, including bone damage, hypercalcemia, and multi-organ failure due to the accumulation of antibodies known as M protein. Currently, a wide variety of therapies are available, including proteasome inhibitors, monoclonal antibodies, and CAR-T, although their effectiveness varies among patients, and there is a high prevalence of resistance. Despite all advancements, MM remains an incurable disease. MM is a poorly immunogenic tumor, so immunogenic cell death (ICD) could enhance the effect of immunotherapies. This study focuses on the cGAS/STING pathway, which, when activated, induces a type I IFN response, promoting an immune response. Initially, the effect of the STING agonist diABZI is studied both alone and in combination with the BH3 mimetic S63845. It is demonstrated that diABZI is capable of inducing cell death in a dose-dependent manner in several MM cell lines, with the p53 wild-type line being particularly sensitive. When combined with S63845, a greater effect is observed compared to monotherapy. Additionally, the ability of carfilzomib, a proteasome inhibitor, to activate the cGAS/STING pathway is investigated by quantifying the release of mitochondrial DNA into the cytosol, the production of IFN- $\beta$ , and the expression levels and phosphorylation state of the pathway proteins. Through these three approaches, cGAS/STING activation is confirmed following

carfilzomib treatment when caspases are pharmacologically inhibited or in cell lines that are less dependent on them. In conclusion, this study highlights the therapeutic potential of activating the cGAS-STING pathway in the treatment of multiple myeloma, both in monotherapy and in combination, which could represent a therapeutic alternative in the future.

## **2. Introducción**

### **2.1. Mieloma Múltiple**

#### **2.1.1. Características generales**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica maligna caracterizada por la proliferación clonal descontrolada de células plasmáticas en la médula ósea, acompañada por la producción excesiva de inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras, denominadas como proteína M [1].

El mieloma múltiple fue la tercera neoplasia hematológica más común en 2020, detrás del linfoma no hodgkiano y de la leucemia, detectándose anualmente 176404 casos nuevos a nivel mundial. Constituye en torno al 10% del total de neoplasias hematológicas y el 1.6% de todos los cánceres de manera global [1].

Esta afección es una entidad clínica heterogénea, que varía desde formas indolentes hasta cuadros altamente agresivos, que conduce a una disfunción multisistémica. El mieloma múltiple, al infiltrarse y ocupar la médula ósea, interfiere con la hematopoyesis, lo que resulta en el desplazamiento de las células hematopoyéticas normales y, en consecuencia, en diversas citopenias, como anemia, trombocitopenia y neutropenia. La fisiopatología del mieloma múltiple incluye una interacción compleja entre las células tumorales y el microambiente de la médula ósea, con implicaciones tanto en la supervivencia celular como en la resistencia terapéutica. A medida que la enfermedad avanza, la acumulación progresiva de células plasmáticas en la médula ósea provoca daño óseo significativo, lo que puede generar hipercalcemia e incluso parálisis. Además, el MM también produce daño en otros órganos debido al paso o acumulación de la proteína M en ellos [1,2].

El diagnóstico se basa en criterios específicos, incluyendo hallazgos de laboratorio, como la detección de proteínas monoclonales en suero y orina, estudios de imagen para evidenciar lesiones óseas, y biopsia de médula ósea para confirmar la proliferación plasmática aberrante [1].

#### **2.1.2. Desarrollo del mieloma múltiple**

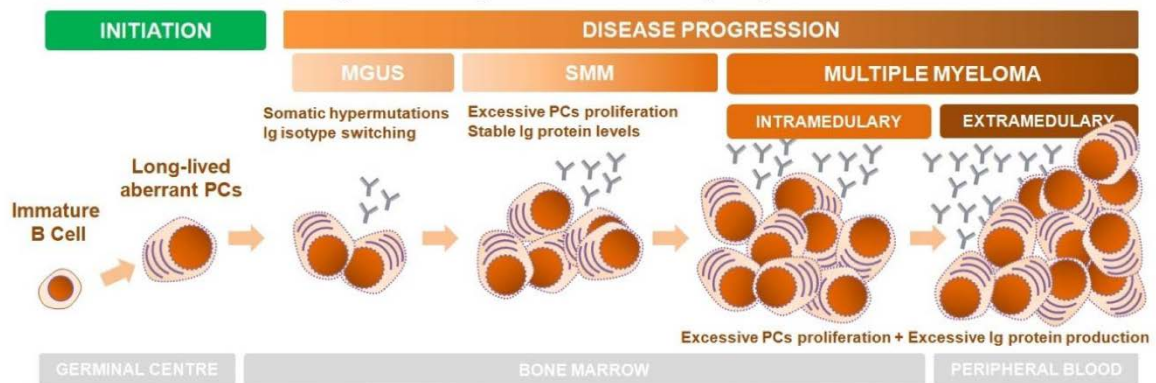
El desarrollo del MM se ha asociado con diferentes factores de riesgo como edad, género, historial familiar y exposiciones a radiaciones, no habiéndose identificado una causa exacta. Sin embargo, se ha observado que el MM evoluciona a partir de un estado precursor asintomático, denominado gammapatía monoclonal de significado indeterminado (Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance, MGUS), que fue por primera vez descrito en 1978 por Kyle y Greipp [3,4].

Los indicadores para un diagnóstico positivo son presentar una concentración inferior a 3 g/dL de proteína M en suero y menos de un 10% de células plasmáticas en la médula ósea. Al ser un estadio asintomático normalmente se identifica durante la realización de pruebas analíticas para diagnóstico de otras enfermedades. Se estima que el 2,4% de la población global padece MGUS, de la que el 1% acaba desarrollando MM [4]. A pesar de que se considera que la MGUS casi siempre precede a todos los casos de MM, apenas el 10% de pacientes

diagnosticados con MM sintomático habían sido diagnosticados previamente de MGUS, debido a su carácter asintomático [3].

El mieloma múltiple latente (Smoldering Multiple Myeloma, SMM) es un estado de evolución intermedio entre MGUS y MM, caracterizado por una mayor carga de enfermedad que MGUS. También fue descrito por primera vez por Kyle y Greipp al caracterizar un grupo de 6 pacientes que, a pesar de superar los indicadores de diagnóstico del MM, no presentaban síntomas de daño grave en los órganos [5]. Se caracteriza por un nivel mayor de 3 g/dL de proteína M sérica, presencia de más de un 10% de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea y la ausencia de daño significativo a los órganos. No se puede estimar la prevalencia del SMM debido a que su carácter asintomático impide la trazabilidad y dificulta los estudios epidemiológicos. No obstante, diversos estudios han observado que entre el 8-20% de pacientes diagnosticados con MM habían tenido SMM [3].

El cuadro clínico evoluciona con el MM creciendo inicialmente en la médula ósea. Conforme se desarrolla la enfermedad las células plasmáticas adquieren la capacidad de proliferar fuera del microambiente de la médula ósea, pudiendo progresar a un estadio de leucemia de células plasmáticas (LCP), caracterizada por la presencia de células plasmáticas en la sangre periférica; así como el mieloma múltiple extracelular (MME), que afecta al sistema nervioso, tejidos blandos, ganglios linfáticos, órganos internos y cavidades corporales [4].



**Figura 1.** Desarrollo del MM. Representación esquemática del desarrollo y progresión de la enfermedad desde la célula B inmadura hasta el mieloma múltiple, incluyendo MGUS (Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto) y SMM (Mieloma Múltiple Latente). Imagen adaptada de [6].

### 2.1.3. Tratamientos actuales del mieloma múltiple

Inicialmente, el tratamiento del mieloma múltiple se basaba en agentes alquilantes administrados por vía oral, como el melfalán, en combinación con la prednisona. Los avances en la investigación han permitido desarrollar terapias dirigidas, como los inhibidores del proteasoma (ver apartado 2.2) y anticuerpos monoclonales, que han transformado el pronóstico y manejo de esta enfermedad [7,8].

La introducción de anticuerpos monoclonales como daratumab y elotuzumab, dirigidos contra CD38 y SLAMF7, significó una gran mejoría en el tratamiento de los pacientes, aumentando la tasa de remisión y prolongando la supervivencia. Estos tipos de tratamiento

pueden inducir muerte celular mediada por complemento y fagocitosis dependiente de anticuerpo e incluso ejercer una función inmunomoduladora afectando a las células inmunosupresoras. Sin embargo, el uso de otros anticuerpos monoclonales como los inhibidores puntos de control inmunológico (*Immune Checkpoint Inhibitors*, ICDs) o su combinación con otros tratamientos han demostrado no presentar un beneficio clínico en esta enfermedad [7,8].

Al igual que en otros cánceres hematológicos, uno de los tratamientos más recientes y prometedores es el uso de receptor de antígeno quimérico de células T (CAR-T), dirigidos contra el antígeno de maduración de célula B (*B-cell maturation antigen*, BCMA) en el caso de mieloma múltiple. En la actualidad se han aprobado dos CAR-T para casos de recaída o mieloma múltiple refractario [7,8].

## **2.2. El proteasoma**

### **2.2.1. Características generales**

La regulación de la síntesis y degradación de proteínas es uno de los procesos más importantes para el correcto funcionamiento de las células, ya que la alteración en la homeostasis proteica va a provocar la muerte celular o diversas enfermedades. La degradación de proteínas en células eucariotas puede ocurrir a través de dos mecanismos, la degradación mediada por proteasoma y la degradación por lisosomas [9].

De ellos, el proteasoma es el principal sistema de degradación de proteínas en las células eucariotas, encontrándose tanto en el núcleo como en el citoplasma y siendo el responsable de la degradación del 80-90% de las proteínas intracelulares a pequeños péptidos de entre 3-25 residuos [9]. El proteasoma realiza el control de calidad en las células, degradando proteínas aberrantes o mal plegadas y proteínas de vida media-corta, que ya han podido cumplir o no su función y no resultan necesarias para la célula en ese momento. El proteasoma 26S es el principal responsable de la degradación regulada de proteínas en las células eucariotas y se conforma por un complejo proteolítico, denominado proteasoma 20S, y uno o varios complejos reguladores 19S, generando un compartimento aislado donde se producirá la degradación de proteínas [10].

El proceso de degradación se desarrolla de forma regulada, ya que si el proteasoma degradase las proteínas sin discriminación, generaría otro tipo de patologías. La regulación se realiza mediante el marcaje molecular de las proteínas a degradar. Solo las que han sido marcadas con esa “etiqueta” son capaces de entrar al proteasoma y ser degradadas [9,10]. El marcaje se realiza con ubiquitina, una proteína pequeña de 76 aminoácidos altamente conservada en organismos eucariotas. Se une a las proteínas principalmente mediante un enlace isopeptídico, un tipo de enlace covalente, generando cadenas ramificadas en residuos de lisina; o, en menor proporción, mediante enlaces éster o tioéster a residuos de serina y treonina, y cisteína, respectivamente. Este proceso de degradación es el considerado como canónico y se conoce como degradación proteica dependiente de ubiquitina (*Ubiquitin/Proteasome System*, UPS) [9].

## 2.2.2. Estructura y subunidades

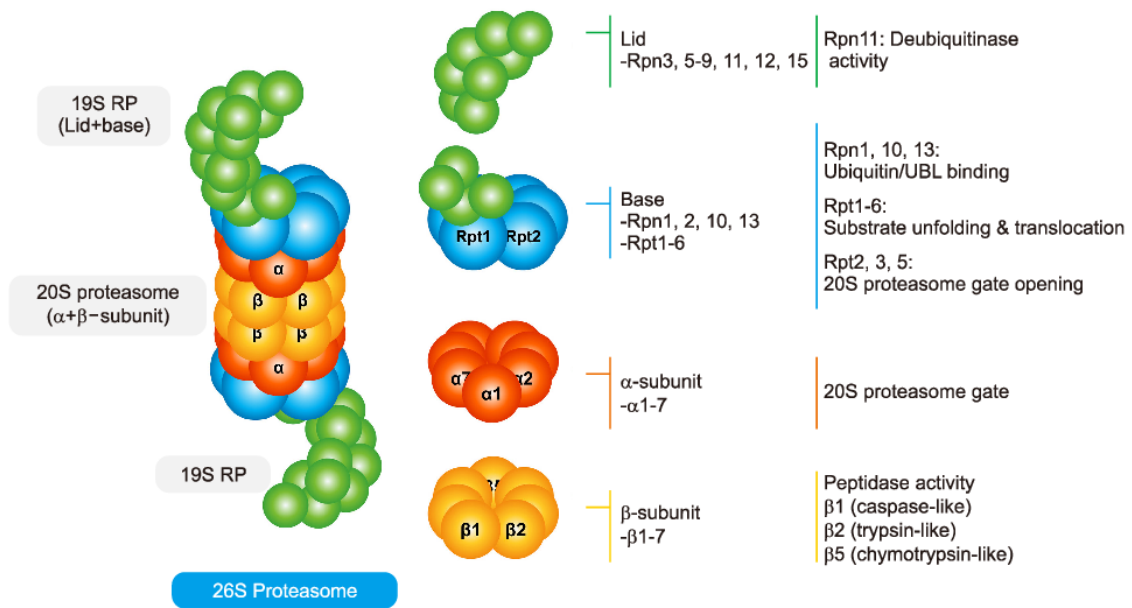
Tal y como se ha señalado, estructuralmente el proteasoma 26S se divide en el componente catalítico, proteasoma 20S o CP, y el complejo regulador 19S o RP (Figura 2).

El CP (*core particle*) es el núcleo catalítico del complejo encargado de la degradación proteolítica de las proteínas en péptidos pequeños. Está compuesto por 4 anillos heptaméricos, 2 externos  $\alpha$  y 2  $\beta$ , conformando una estructura en forma de barril. Las subunidades  $\alpha$  se encuentran en ambos extremos del barril, mientras que las subunidades beta se encuentran en el centro y presentan la actividad catalítica. Las células eucariotas presentan tres subunidades  $\beta$  con actividad catalítica:  $\beta 1$  con actividad caspasa,  $\beta 2$  con actividad tripsina y  $\beta 5$  con actividad quimotripsina. Las subunidades con actividad catalítica se expresan con un pro-péptido, que protege varios grupos n-terminales de treonina cruciales para el correcto funcionamiento y que es necesario para el correcto ensamblaje del complejo. Posteriormente son eliminados en el proteasoma 20S maduro [11].

Por lo general el centro catalítico se encuentra cubierto en uno o ambos extremos por proteínas reguladoras. El complejo regulador 19S o RP (*regulatory particle*), es el encargado de reconocer a las proteínas ubiquitinadas, eliminar el marcaje, desplegarlas y transferir la proteína al CP mediante la apertura del anillo- $\alpha$ . Se conforma por, aproximadamente, 20 subunidades diferentes que se pueden dividir en dos grupos: partícula reguladora de la triple-ATPasa (*Regulatory particle of triple-ATPase*, Rpt) y subunidad reguladora no ATPásica (*Regulatory particle of non-ATPase*, Rpn). A su vez, el RP se divide en dos supercomplejos, denominados, “base” y “tapa” [12].

La “tapa” está compuesta al menos por nueve Rpn: Rpn 3, Rpn 5, Rpn 6, Rpn 7, Rpn 8, Rpn 9, Rpn 11, Rpn 12 y Rpn 15. Su principal función es la deubiquitinación de las proteínas captadas mediante la actividad metalloisopeptidasa de Rpn 11, permitiendo que la ubiquitina sea posteriormente reciclada. Respecto al resto de subunidades todavía no se ha descrito su función con exactitud [12,13].

El supercomplejo “base” tiene tres funciones: captar las proteínas mediante el reconocimiento de la modificación con ubiquitina, el desplegamiento de la proteína y la apertura del anillo- $\alpha$ . Está constituido por 6 subunidades ATPasa homólogas (Rpt 1-Rpt 6), adyacentes al anillo A de la CP, y 4 subunidades reguladoras no ATPasa (Rpn 1, Rpn 2, Rpn 10 y Rpn 13). Como ocurre en el supercomplejo “tapa”, todavía no se ha descrito la función de muchas de las subunidades. Tan solo se ha determinado que Rpn 13 y Rpn 10 funcionan como receptores de ubiquitina, interaccionando con esta y atrapando a las proteínas que hayan sido marcadas, mientras que las 6 subunidades Rpt, mediante la hidrólisis de ATP, son las responsables del cambio conformacional que induce la apertura del anillo A, además de participar en la unión, desplegamiento y posterior traslocación de la proteína a degradar [12].



**Figura 2.** Estructura del proteasoma 26S, conformado por el núcleo catalítico 20S y la región reguladora 19S, subdividida a su vez en tapa y base. Se indica la actividad de las subunidades en los casos en los que se conoce dicha actividad [9].

### 2.2.3. Importancia del proteasoma en el mieloma múltiple

El proteasoma también es el encargado de la degradación de proteínas oncogenas, factores de transcripción y proteínas supresoras de tumores, por lo que la alteración en su actividad juega un papel importante en la carcinogénesis y desarrollo de diversos tipos de cáncer. En concreto, en el mieloma múltiple la UPS está desregulada, provocando una mayor actividad del proteasoma y, por ende, una mayor degradación de proteínas, incluyendo algunas relacionadas con la carcinogénesis como p53 e IκB, entre otros [14–16]. La sobreactividad del proteasoma en el MM va a afectar a diversos procesos: control del ciclo celular, vías de señalización de respuesta a estrés, señales anti-apoptóticas mediante proteínas Bcl-2,.... Todas estas alteraciones acaban favoreciendo el proceso de carcinogénesis y posteriormente beneficiando su crecimiento, desarrollo y supervivencia celular [14–17].

Igualmente, dado que el mieloma múltiple genera y secreta grandes cantidades de proteína M, también se genera una gran cantidad de proteínas aberrantes o dañadas, que no se pueden plegar y, por ende, cumplir su función; por tanto, estas proteínas deben ser degradadas en el proteasoma. Si se usan inhibidores del proteasoma se impide que estas proteínas se degraden, provocando que se acumulen, y que se genere una respuesta a proteínas desplegadas (UPR) que acaba provocando la muerte celular mediante apoptosis [14,15,17].

Dada la importancia del proteasoma en el MM se han desarrollado diversos inhibidores del proteasoma como terapia. En la actualidad existen 3 aprobados para uso clínico:

- **Bortezomib (Velcade®):** fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos, *Food and Drugs Administration*) en 2003. Es un dipéptido del ácido borónico cuya función de inhibición del proteasoma es

reversible. Se une preferentemente a la subunidad  $\beta 5$ , aunque también se une, con menor afinidad y a dosis altas, a las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  [15].

- **Carfilzomib (Kyprolis®)**: Fue aprobado por la FDA en 2012 y es un tetrapéptido formado por una epoxicetona que inhibe irreversiblemente la actividad del proteasoma al unirse, igual que el bortezomib, a la unidad  $\beta 5$ . Presenta una mayor especificidad que bortezomib, lo que se traduce en un menor efecto “*off-target*”. Sin embargo, no interacciona con el resto de las subunidades catalíticas, al contrario que bortezomib [13,15]. A nivel clínico se ha observado una mayor eficacia y tolerabilidad que bortezomib, siendo además eficaz en pacientes que habían desarrollado resistencia a otros fármacos y/o bortezomib [17].
- **Ixazomib (Ninlaro®)**: Fue aprobado por la FDA en 2015, siendo el último inhibidor del proteasoma aprobada. Presenta la misma estructura y mecanismo de acción que el bortezomib, sin embargo, mientras que el carfilzomib y bortezomib se administran de forma intravenosa el ixazomib se hace mediante vía oral. Permitiendo que sea administrado por el mismo y no sean necesarias visitas al hospital y de profesional médico, reduciendo costes y aumentando la calidad de vida del paciente [18].

## 2.3. Muerte celular

La muerte celular es un proceso fisiológico esencial para mantener la homeostasis celular al eliminar células dañadas, que ya han cumplido su función y dejan de ser necesarias o están infectadas por algún patógeno externo como un virus. En un organismo pluricelular es esencial mantener el equilibrio entre la proliferación y muerte celular, ya que la pérdida del equilibrio puede ser la causa de diversas enfermedades, como el cáncer al incrementarse la proliferación o ciertas enfermedades autoinmunes al aumentar la muerte celular [19].

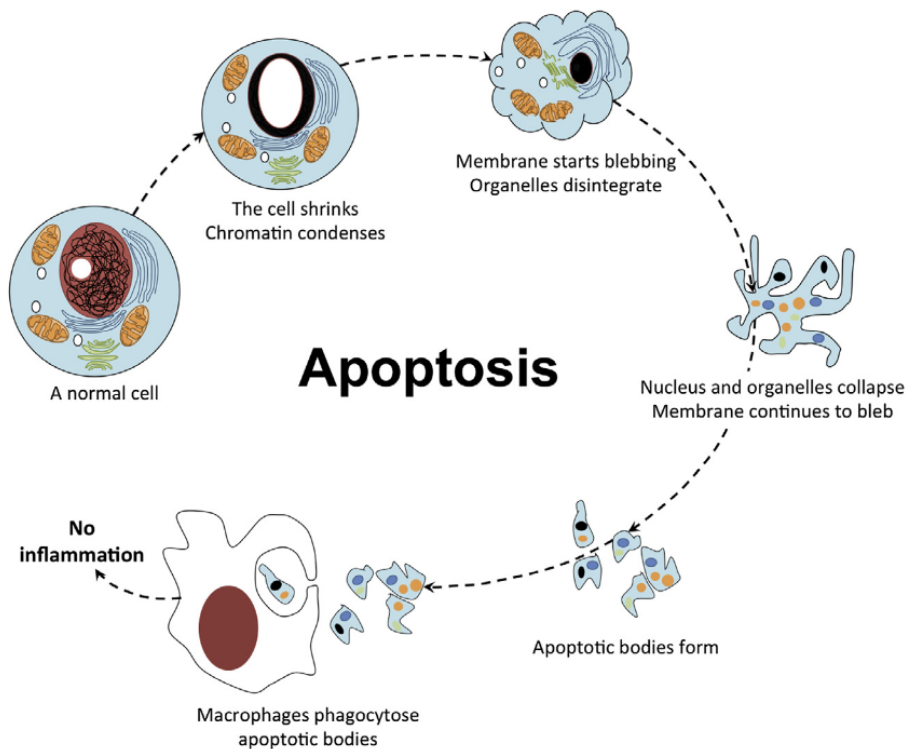
La muerte celular puede ser accidental (ACD) o programada (PCD) y ser inducida por varios factores. La ACD es una muerte pasiva causada por estreses físicos (alta presión, temperatura, presión osmótica...), daño mecánico o químico que resultan en la necrosis como principal mecanismo de muerte [20].

La PCD es una forma activa de muerte celular controlada genéticamente y es el principal mecanismo para mantener la homeostasis. La regulación de la PCD se puede alterar mediante el uso de fármacos o genes, acelerándola, induciéndola o retrasándola. Algunos tipos de PCD, como la ferroptosis, sulfidptosis... se han descubierto recientemente, pero otros ya se habían caracterizado hace más de 50 años, como la apoptosis [20].

### 2.3.1. La apoptosis

El término apoptosis fue acuñado por Kerr, Wylie y Currie en 1972 para describir un tipo de muerte celular, al observar la eliminación de las células por parte del tejido para la supervivencia del organismo [21]. El conocimiento de este proceso en mamíferos resultó de una investigación

de la apoptosis en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* por parte de Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz, galardonados en 2002 con el premio nobel de medicina y fisiología [22]. Es un organismo pluricelular formado por 1090 células somáticas, y durante su desarrollo hasta la etapa adulta observaron que, en todos los individuos, 131 de esas células morían en un momento determinado. Concluyeron que se trataba de un proceso controlado que presentaba una alta precisión. El proceso y los genes implicados se caracterizaron en el nemátodo y posteriormente se identificaron los genes homólogos en mamíferos [21–23].



**Figura 3.** Cambios morfológicos durante las diferentes etapas de la muerte celular apoptótica [24].

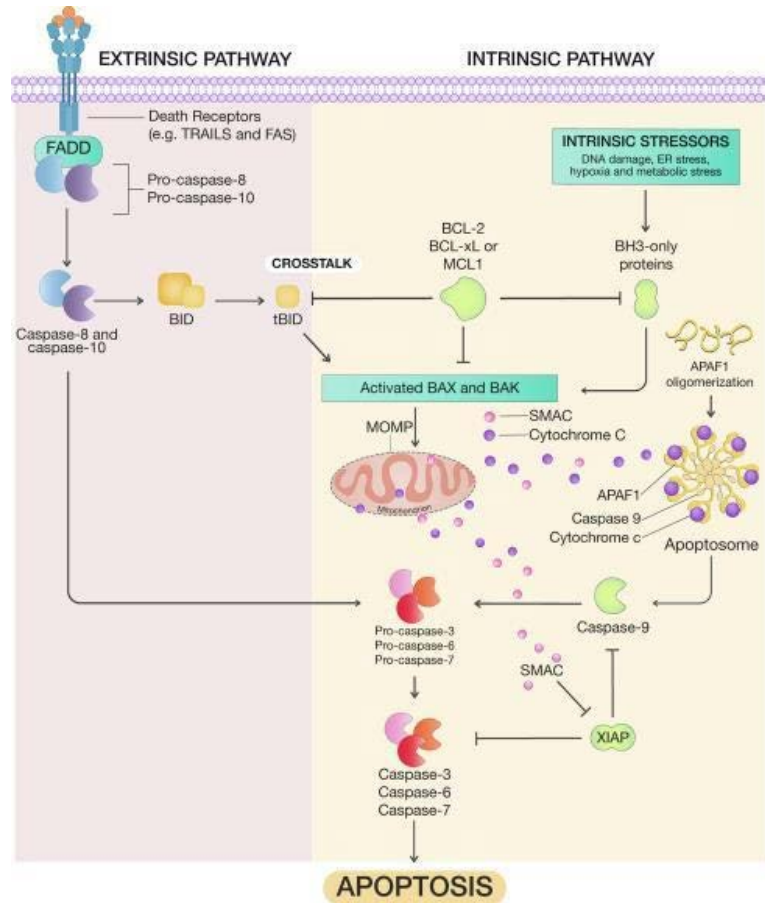
Durante la apoptosis se producen una serie de cambios morfológicos característicos. En primer lugar, las células pierden las interacciones intercelulares y la adhesión celular, disminuyen de tamaño y adquieren una forma redondeada. Posteriormente se produce una condensación del citosol y compactación de la cromatina, que genera agregados adheridos a la membrana nuclear. Estos posteriormente serán degradados por nucleasas en fragmentos pequeños de DNA de aproximadamente 180 pares de bases y múltiplos [20,23].

De forma simultánea el retículo endoplasmático se dilata y genera vesículas, que se fusionan con la membrana plasmática, formándose burbujas en la membrana y dotándola de una morfología característica de este tipo de muerte celular (*blebbing*) [20,23].

Finalmente, la membrana plasmática se fragmenta y se generan cuerpos apoptóticos, los cuales serán rápidamente degradados ya que con anterioridad a la fragmentación de la célula se produce la traslocación de la fosfatidilserina de la hemicapa interna a la externa. Las moléculas de fosfatidilserina expuestas en la cara externa de la membrana plasmática actúan como señal quimiotáctica “*eat me*”, atrayendo a células fagocíticas que eliminarán los cuerpos apoptóticos. De este modo se evita la liberación de material citoplasmático al exterior que

generaría una respuesta inflamatoria, por lo que este tipo de muerte se le considera “silenciosa” [20,23].

La apoptosis puede iniciarse mediante dos vías de señalización (Figura 4), concluyendo ambas con la activación de enzimas proteolíticas Cistein-Aspártico Proteasas (Caspasas), responsables de la degradación de las proteínas y estructuras celulares.



**Figura 4.** Diagrama de la activación de la apoptosis mediante la vía extrínseca (izquierda) e intrínseca (derecha) [25].

- **Vía intrínseca o mitocondrial:**

Es una de las vías de señalización celular más conservada, donde las mitocondrias juegan un papel crucial. Puede iniciarse por una plétora de estreses: ausencia de factores de crecimiento, daño de DNA, estrés del retículo endoplasmático, especies reactivas de oxígeno (ROS)... [26]. Dichos estreses provocan la oligomerización de BAX y BAK en la membrana mitocondrial provocando su permeabilización y consecuente pérdida del potencial de membrana y liberación de su contenido, donde destacan el citocromo C y SMAC/DIABLO [26,27].

El citocromo C interacciona con Apaf-1, dATP y la procaspasa 9 para formar el apoptosoma que induce la activación de la caspasa 9. La caspasa 9 es una caspasa iniciadora, ya que no es la responsable directa de la apoptosis, sino que activa a las caspasas 3, 6 y 7, conocidas como caspasas efectoras, al encargarse de la degradación

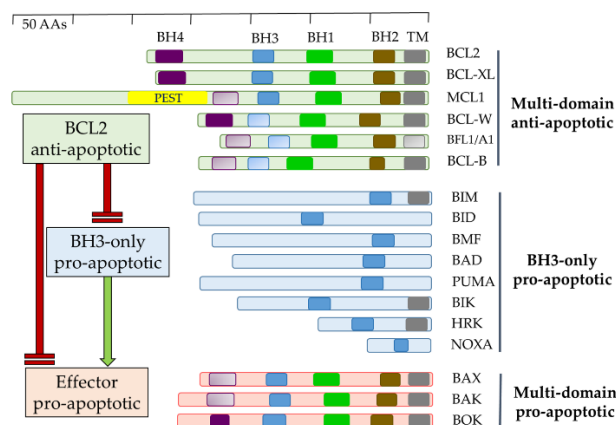
de las proteínas. Mientras que SMAC/DIABLO interactúa con los inhibidores de caspasas (IAPs), evitando que interactúen con las caspasas y permitiendo su correcta activación [26,27].

Todo el proceso está regulado por la familia de proteínas Bcl-2, las cuales pueden presentar 4 dominios distintos representantes de esta familia BH1, BH2, BH3 y BH4 (Figura 5). Dependiendo de los dominios presentes y de su función, se dividen en 3 grupos: proteínas anti-apoptóticas, proteínas pro-apoptóticas solo BH3 (BH3-only) y proteínas pro-apoptóticas multidominio [19,26,28].

Entre las proteínas anti-apoptóticas se encuentran Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1, que previenen la apoptosis al unirse e inhibir a las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 [28].

Las proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax, Bak y Bok) son las encargadas de generar el poro en la membrana mitocondrial al oligomerizar. En ausencia de señales de muerte Bax se encuentra libre en el citosol o en la membrana mitocondrial, mientras que Bak se encuentra asociada a la membrana en forma inactiva o bloqueada por las proteínas antiapoptóticas de la familia [28].

Las proteínas pro-apoptóticas solo BH3 (BH3-only) forman un grupo muy extenso y se caracterizan por contener únicamente el dominio BH3. Algunos de sus miembros son: Bid, Bad, Bim, Puma y Noxa, entre otras. Favorecen la activación de la apoptosis mediante 2 mecanismos: interactuando con las proteínas anti-apoptóticas liberando a Bax y Bak, o asociándose a Bax y/o Bak [26,28].



**Figura 5.** Organización de la familia de proteínas Bcl-2 según sus dominios BH y su función en la apoptosis [28].

- **Vía extrínseca**

La vía extrínseca de la apoptosis (Figura 4) se activa debido a alteraciones en el microambiente extracelular y depende principalmente de dos clases de receptores de membrana: los receptores mortales, que se activan al unirse a su correspondiente

ligando, y los receptores de dependencia, que se activan cuando la concentración de su ligando disminuye [26].

Algunos receptores mortales son, entre otros, Fas y TRAIL-R1 y TRAIL-R2 que se unen a FasL y TRAIL, respectivamente, lo que provoca cambios conformacionales en su dominio intracelular, permitiendo la interacción del receptor con FADD mediante sus dominios DD. Tras la unión de FADD se recluta a la caspasa 8/10 y varias isoformas de c-FLIP, formándose así el complejo señalizador de muerte inducida (DISC), que activará a la caspasa iniciadora, encargándose ésta de la activación de las caspasas efectoras. Hay aproximadamente 20 clases distintas de receptores de dependencia que en presencia de su ligando promueven la supervivencia celular y proliferación. Sin embargo, al disminuir la concentración de su ligando correspondiente van a activar diferentes cascadas de señalización mortales. Este proceso aún no se ha descrito con exactitud, pero, al igual que con los receptores mortales, siempre acaba activando a la caspasa 8 que posteriormente activa a las caspasas efectoras [26].

La activación de la caspasa 8, además de provocar la activación de las caspasas 3, 6 y 7, también puede inducir la activación de la vía intrínseca mediante el procesamiento de la proteína solo BH3 Bid, generando tBid (Bid truncado), el cual se transloca a la membrana externa mitocondrial donde favorece la permeabilización de la mitocondria mediante Bax/Bak [25,26].

### **2.3.2. Miméticos de proteínas solo-BH3**

Actualmente la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) reconoce más de 200 tipos de cáncer, cada uno con unas características y mecanismos únicos, lo que complica su estudio y tratamiento [29]. A pesar de esta gran heterogeneidad, se ha observado una serie de características comunes durante su desarrollo, siendo una de ellas la resistencia a la muerte celular y evasión de la apoptosis. Un mecanismo mediante el cual pueden alcanzar dicha característica es el aumento de expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL,...) [30,31]. De hecho, se ha observado que en cánceres hematológicos existe una alta prevalencia de la sobreexpresión de estas proteínas, por lo que se han desarrollado fármacos que recrean la actividad de las proteínas BH3-only, pudiendo así interaccionar con las proteínas anti-apoptóticas, favoreciendo e induciendo la activación de la apoptosis en las células tumorales. A estos fármacos se les ha denominado miméticos de BH3. En un inicio se realizaron *cribados* de quimiotecas para identificarlos y, posteriormente, modificarlos mediante modulación de estructuras asistida por resonancia magnética nuclear. Todo ello para obtener compuestos con las propiedades deseadas: menor toxicidad, mayor afinidad e incluso afinidad por solo un tipo de proteína Bcl-2 [28].

En la actualidad, el único mimético de BH3 aprobado para uso clínico por la FDA es el venetoclax, inhibidor selectivo de Bcl-2 que está aprobado para la leucemia linfática crónica y la leucemia mieloide aguda. En el caso del mieloma múltiple, hasta el momento, hay ensayos clínicos que muestran que el venetoclax es especialmente efectivo en los casos en los que se da la translocación (11;14), presente en el 15-20% de pacientes, produciendo una sobreexpresión

de Bcl-2 [28,32]. Aunque solo se haya aprobado un fármaco, se han desarrollado muchos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre ellos, se han investigado miméticos que inhiben a Mcl-1, ya que se ha observado que es esencial para el desarrollo del mieloma múltiple, llegando a sobreexpresar en el 40% de casos [33]. Se han llegado a realizar ensayos clínicos, como con el S63845, un potente inhibidor de Mcl-1, con el que se observó citotoxicidad *in vitro* en células con expresión alta de Mcl-1 y que ha sido probado en varios ensayos clínicos en fase I, tanto en monoterapia como en combinación con otros fármacos [34]. Sin embargo, se ha observado que la inhibición de Mcl-1 provoca una alta toxicidad cardíaca, al ser esta proteína crucial para mantener la homeostasis cardíaca y expresarse altos niveles de en el corazón. Este efecto tóxico es la principal razón por la que no se haya aprobado todavía ninguno de estos compuestos para su uso clínico [33].

## **2.4. La inmunoterapia y el mieloma múltiple**

La inmunoterapia, usada como tratamiento del cáncer desde hace años, sigue siendo en la actualidad el principal tratamiento para diversos tipos de cáncer. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos varía, no solo entre tipos de cáncer, si no hasta entre pacientes con la misma clase de cáncer [35]. En función de la respuesta a la inmunoterapia, se ha propuesto la clasificación de los tumores en “calientes” (con una alta inmunogenicidad, infiltración del sistema inmune y, por lo tanto, una mayor sensibilidad a la inmunoterapia) y “fríos” (con presencia de linfocitos T reguladores, menor infiltración y por lo general resistentes a la inmunoterapia) [36].

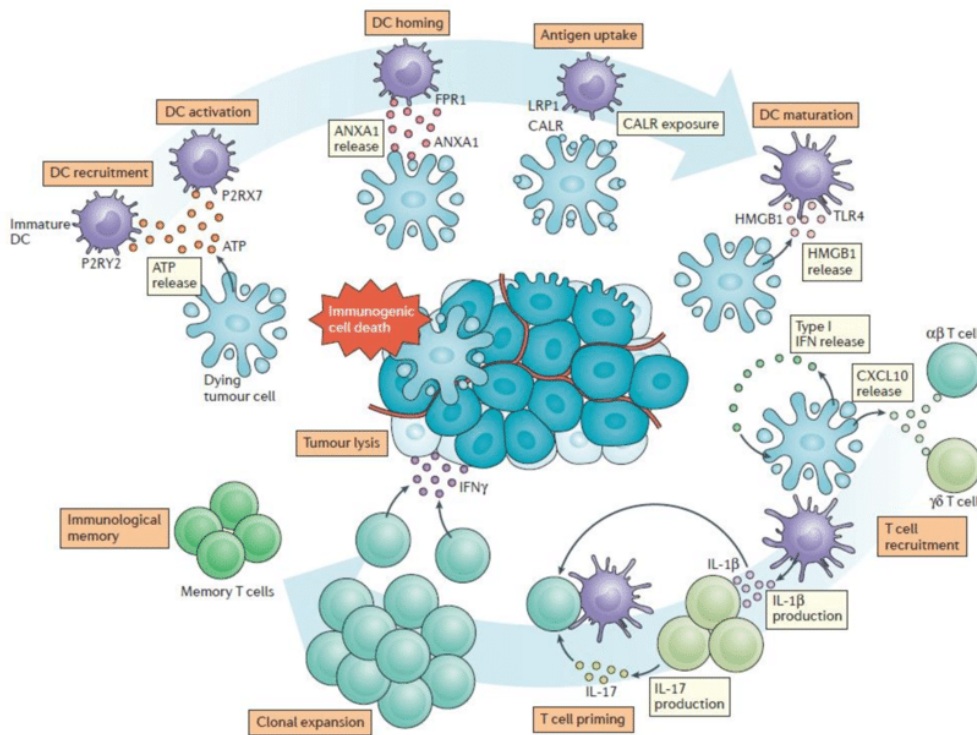
La inmunoterapia ya es un pilar esencial en el tratamiento del MM, siendo los anticuerpos frente a CD38, como el daratumab, anticuerpos bi-específicos y CAR-T usados habitualmente para su tratamiento, teniendo por lo general una eficacia alta, pero detectándose una población de pacientes que no responden al tratamiento [35]. Aunque los tratamientos sean eficaces, el MM es considerado como un tumor “frío”, especialmente debido al microambiente en la médula ósea. Convertir el microambiente “frío” en “caliente” en el MM podría inducir respuestas inmunes duraderas, consiguiéndose un beneficio clínico, incluso en pacientes con peor pronóstico [6].

### **2.3.1. Muerte inmunogénica**

Como se ha explicado anteriormente, la apoptosis es una muerte “silenciosa”, es decir, no inmunogénica, o incluso tolerogénica, debido a la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular que facilita su rápida fagocitosis. No obstante, recientemente ha surgido el concepto de muerte celular inmunogénica (ICD), un tipo de muerte celular programada con carácter inmunogénico que puede verse desencadenada por el uso de diversos fármacos. Se caracteriza por la habilidad de generar una respuesta inmune adaptativa contra los denominados autoantígenos alterados o neoantígenos tumorales, en el caso de células cancerosas, o contra antígenos derivados de patógenos, en caso de infecciones [37,38].

Otro factor vital para que se genere una respuesta inmune es la adyuvancia conferida por los patrones moleculares asociados a microorganismos y/o peligro (MAMPs y DAMPs, respectivamente). Los DAMPs (Figura 6) son moléculas intracelulares que poseen una función específica en las células, pero si se exponen en el exterior, al igual que los MAMPs, generan una señal de peligro que desencadena la activación del sistema inmune. Esta señal de “peligro” es reconocida por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en las células del sistema inmune innato, como las células dendríticas y los macrófagos [37,38].

La ICD se puede desencadenar por una gran variedad de estímulos y se ha dividido en 4 grupos según el estímulo que la desencadena: dependiente de patógenos, quimioterapéuticos, estreses físicos y necroptótica [37]. De hecho, cuando se describió por primera vez se detectaron muchos tratamientos ya aprobados que inducían este tipo de muerte en células tumorales, como en 2005 cuando se observó que, tras el tratamiento con doxorubicina (antraciclina aprobada en 1974) de dos líneas celulares murinas (CT26 y MCA205) y posterior inyección en ratones inmunocompetentes, se generaba un efecto protector contra la reexposición en dichas líneas celulares [39].



**Figura 6.** Representación de los diferentes DAMPs y efecto que tienen en el sistema inmune [37].

En la actualidad se han descrito una gran cantidad de moléculas que funcionan como DAMPs. A continuación, se resumen las más importantes y mejor descritas:

El ATP es una molécula esencial para la vida, siendo la principal fuente de energía para la mayoría de los procesos celulares, que al secretarse va a favorecer el reclutamiento de células presentadoras de antígenos (APCs) y su activación, mediante los receptores P2RX7 y P2RY2. Se ha observado que para la su secreción es esencial la autofagia, liberándose solo en las células que no la presentan alterada y con tratamientos que inducen su activación [37,38].

La calreticulina (CRT) es una proteína de 46 kDa identificada en 1974 como una proteína del lumen del retículo endoplasmático, donde realiza varias funciones. Actúa como chaperona y asiste en el ensamblaje del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (Major Histocompatibility Complex 1, MHC1), y juega un papel crucial en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y señalización. Aunque se encuentre principalmente en el lumen del retículo endoplasmático también tiene varias funciones fuera de éste, como la regulación del transporte nuclear. Incluso puede llegar a detectarse en la parte externa de la membrana plasmática, donde puede ser reconocida por células que expresan LRP1. De hecho, la translocación de CRT a la membrana plasmática ocurre con diversos quimioterapéuticos, siendo una potente señal “eat me”, que facilita y favorece que las células del cáncer sean fagocitadas por APCs. Esto resulta en la presentación de antígenos y posterior respuesta de linfocitos T citotóxicos contra el tumor [37,38,40].

La proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) es una proteína no histónica que se une al DNA. En concreto, se encuentra en el núcleo regulando la actividad de NF- $\kappa$ B, p53 y otros factores de transcripción. Puede liberarse al medio extracelular donde tiene un potente efecto inmunoestimulador al interactuar con diversos PRRs (TLR2, TLR4 y RAGE), mediando una potente respuesta proinflamatoria. El mecanismo por el que se termina secretando HMGB1 aún no está descrito, pero se ha relacionado con la permeabilización de la membrana plasmática, ya que las células que sufren necrosis lo liberan en altas cantidades [37,38,40].

La producción de interferones de tipo I (IFNs I) también se asocia con la ICD. Algunos tipos de quimioterapéuticos provocan la producción de IFN I por parte de las células tumorales, teniendo un efecto paracrino y autocrino. Por un lado, inducen la activación de diferentes células del sistema inmune, especialmente del sistema inmune innato, como las células dendríticas y NK. Por otro lado, también inducen la producción de un segundo DAMP por las propias células tumorales, el ligando 10 del motivo quimiocina C-X-C (CXCL10). El CXCL10 favorece el reclutamiento de linfocitos T al unirse a su receptor, CXCR3. En conclusión, la producción de IFN I favorece una mayor infiltración de linfocitos mediante CXCL10 y un aumento en la presentación de antígenos y en la actividad citolítica al activar las células dendríticas y NK, respectivamente [37].

El DNA de doble cadena (dsDNA) se encuentra en el núcleo y en las mitocondrias. Ciertos estreses pueden provocar su liberación al citoplasma, donde puede ser reconocido como DAMP e inducir la producción de citoquinas inmunoestimuladoras como el IFN I mediante rutas de señalización como cGAS/STING [37].

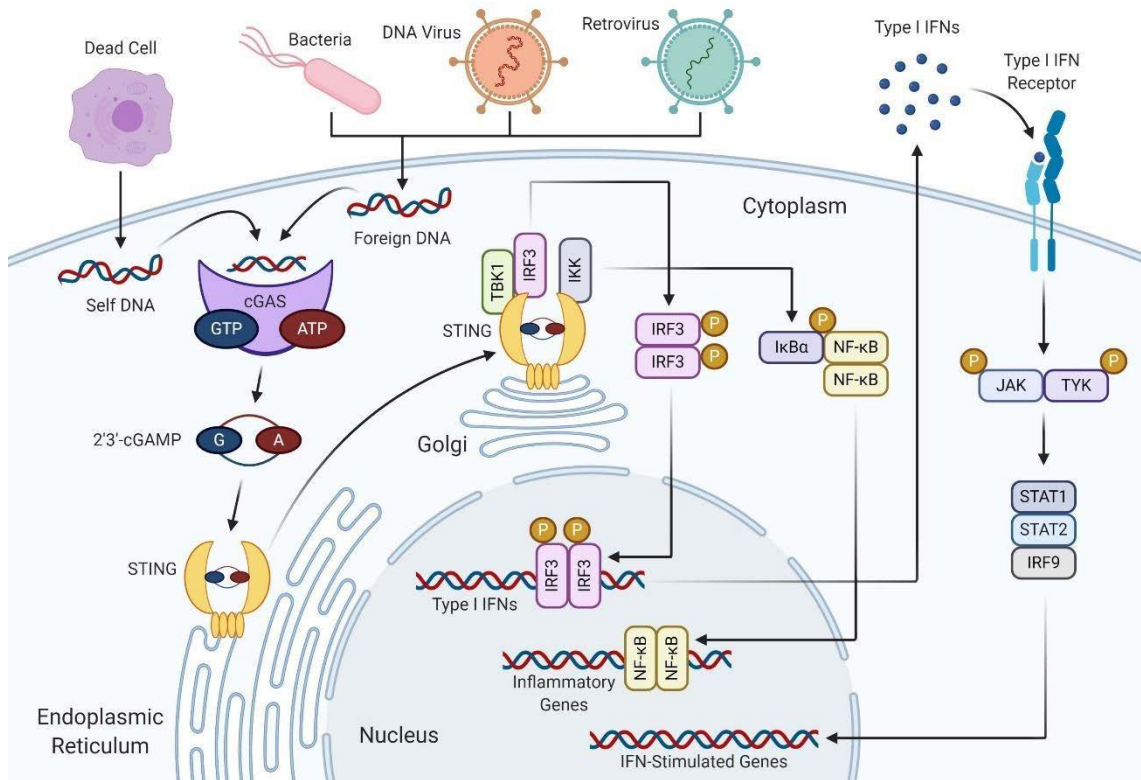
### **2.3.2. La vía de señalización cGAS/STING**

La vía cGAS/STING tiene un papel importante en la respuesta inmune contra infecciones y tumores. Las células, han desarrollado un sistema para detectar DNA patógeno. En caso de infección por virus o algún otro patógeno que libere el DNA en el citoplasma éste será detectado por la GMP-AMP cíclico sintasa (cGAS), que dimerizará y sufrirá un cambio conformacional que permitirá la síntesis de 2'3'GMP-AMP cíclico (cGAMP) [41,42]. (Figura 7)

El cGAMP es un mensajero secundario que se une al estimulador de genes del interferón (STING), proteína que se encuentra unida al retículo endoplasmático. Tras la unión de cGAMP, STING sufre un cambio conformacional de su extremo C-terminal, favoreciendo el reclutamiento

de la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1), la cual se autofosforila, y posteriormente fosforila al factor regulador de interferón 3 (IRF3) [41].

Finalmente, IRF3, tras fosforilarse, dimeriza y se transloca al núcleo, donde cumple su función como factor de transcripción y desencadena la expresión de genes de respuesta de interferón tipo I que presentan un efecto antiviral [41].



**Figura 7.** Diagrama de la detección y señalización de la vía cGAS/STING provocando la expresión de interferones de tipo I [43].

No fue hasta el 2014 cuando tres estudios independientes observaron la activación de cGAS/STING debida a la liberación de DNA mitocondrial en el citoplasma [44–46]. Estos estudios demostraron que el mtDNA, normalmente restringido en las mitocondrias, puede actuar como DAMP al ser liberado en el citosol. La liberación del mtDNA puede ser generada por fármacos que produzcan un estrés en la célula, como podría ser el caso de los inhibidores del proteasoma anteriormente comentados. En consecuencia, generan ICD y favorecen que, aparte del efecto citotóxico directo del fármaco, se desencadene una respuesta inmune contra el tumor o se pueda obtener una mayor eficacia en combinación con algún tipo de inmunoterapia [41].

De hecho, el interés en esta ruta de señalización es tan grande que se han desarrollado agonistas de STING para inducir su activación sin necesidad de la presencia de dsDNA en el citoplasma, incluso se han y siguen realizando, ensayos clínicos en diferentes tipos de cáncer [47]. Desde hace años se han investigado tanto compuestos naturales como sintéticos, los cuales se dividen principalmente en tres grupos: dinucleótidos cíclicos sintéticos, que fueron los primeros en desarrollarse y tienen una estructura similar a la de cGAMP; compuestos sintéticos no nucleotídicos de bajo peso molecular que, al interactuar con STING, inducen su activación, son más fáciles de sintetizar y tienen un efecto más selectivo que los dinucleótidos cíclicos y

entre los que se encuentra el diABZI, un agonista usado en este trabajo; y vectores bacterianos, que son los más novedosos, en los que se emplean bacterias que expresan altos niveles de dinucleótidos cíclicos al estar sometidas a ciertos estímulos, como la hipoxia presente en muchos tumores [48].

Actualmente también se está investigando el uso de agonistas conjugados a anticuerpos o en combinación con otras terapias alcanzado en algunos casos los ensayos clínicos. Sin embargo, hoy en día aún no se ha aprobado ninguno para su uso en clínica [48].

### 3. Antecedentes y objetivos.

Los enfoques más recientes para el tratamiento contra el cáncer apuestan cada vez más por el uso de terapias combinadas. Una de las principales razones es que la terapia combinada permite disminuir la dosis administrada de cada fármaco por separado y, por consiguiente, reducir los efectos adversos causados por las toxicidades asociadas. Así mismo, la terapia combinada disminuye la probabilidad del desarrollo de resistencias, lo cual es muy común en los estadios más avanzados de la enfermedad, y que, además, es una de las razones por las cuales muchos pacientes se quedan sin opciones terapéuticas. Este sería en el caso de los miméticos de BH3 ya que, a pesar de su alta eficacia y de que se observa una regresión del cáncer, los pacientes tienden a presentar recaídas y desarrollan resistencia al tratamiento. Muchas de estas resistencias van relacionadas con alteraciones en las proteínas de la familia Bcl-2, como sobreexpresión de proteína anti-apoptóticas o menor expresión de proteína solo-BH3.

Se ha hipotetizado que la activación de la vía cGAS/STING podría revertir la resistencia y presentar un efecto sinérgico con los miméticos de BH3. Aparte de generar una respuesta de IFN tipo I, la activación de la vía cGAS/STING también induce apoptosis mediante el aumento de expresión de proteínas BH3-only y otras proteínas apoptóticas, como Smac/DIABLO, las caspasas 3 y 7 y Apaf1 [49,50]. Recientemente en estudios *in vitro* se ha observado que la combinación de agonistas de STING con miméticos de BH3 tienen un efecto sinérgico en líneas celulares de linfomas de células natural killer/T (NK/T) extranodal nasal (ENKT) que habían adquirido resistencia a los miméticos de BH3 mediante la mutación de p53, demostrándose así que la combinación de miméticos de BH3 junto a la activación cGAS/STING podría ser un abordaje novedoso y efectivo para el tratamiento de células tumorales al potenciar las señales apoptóticas [50].

La activación de cGAS/STING no se ve limitada al uso de agonistas de STING. Se han descrito diversos fármacos que provocan la liberación de mtDNA y la activación de forma “natural” de cGAS/STING. Entre estos fármacos se encuentran los inhibidores del proteasoma, como el bortezomib, con el que se ha observado la liberación de mtDNA y la consecuente activación de la vía cGAS/STING en estudios *in vitro* en mieloma múltiple [7], generando, de este modo, un mayor efecto citotóxico intrínseco que los agonistas de STING, y un aumento de la inmunogenicidad impulsando una respuesta inmune frente a las células tumorales al activar la vía cGAS/STING.

En este trabajo, se propone evaluar la activación de la vía cGAS-STING en líneas celulares de mieloma múltiple, por un lado, en respuesta a miméticos BH3, como se ha descrito en linfoma, y, por otro lado, también en respuesta a un inhibidor del proteasoma.

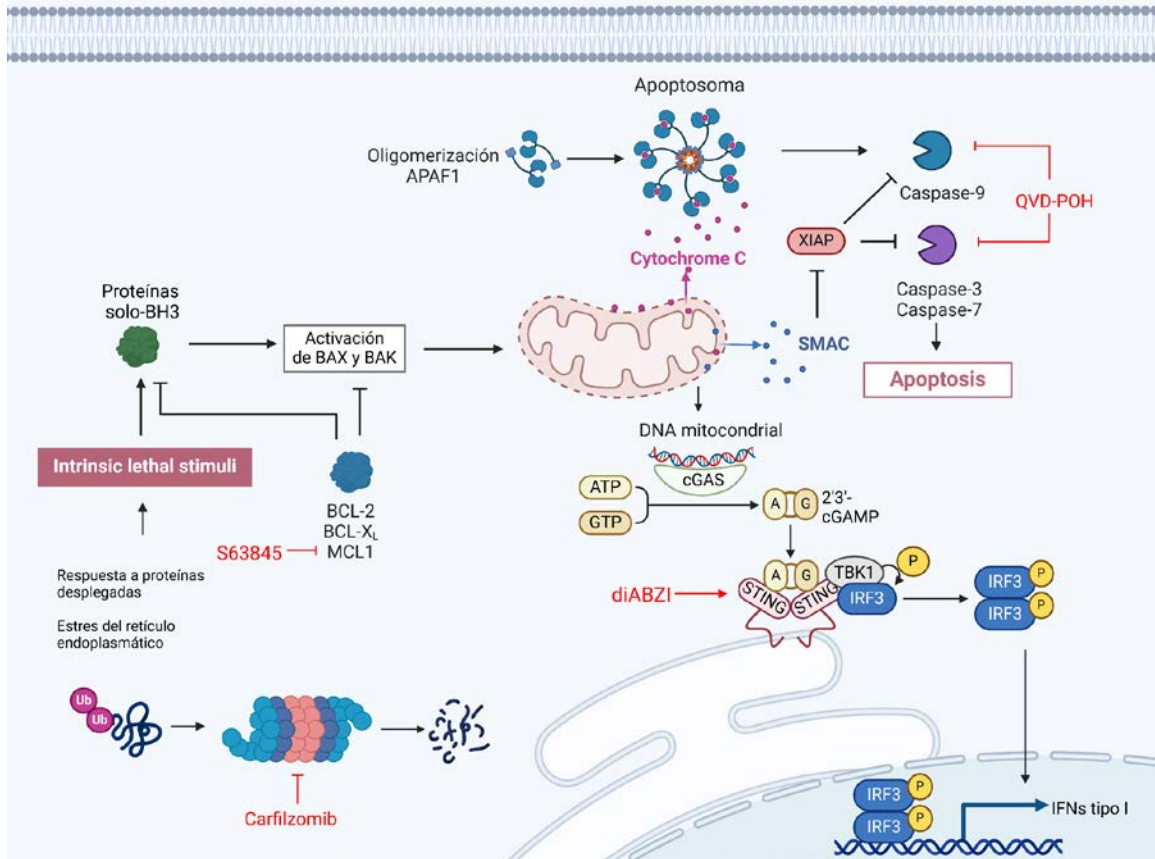
Se plantean los siguientes objetivos específicos/concretos:

- 1) Estudiar los efectos de la activación de la vía cGAS/STING mediante diABZI en el mieloma múltiple en monoterapia o combinación con S63845.
- 2) Estudiar la activación de la vía cGAS/STING en mieloma múltiple tras el tratamiento con carfilzomib a través de:

2.1) La determinación de la liberación de mtDNA en el citoplasma mediante qPCR.

2.2) El análisis de la expresión de IFN tipo I mediante RT-qPCR.

2.3) El estudio de los niveles de expresión y fosforilación mediante western-blot de las proteínas partícipes en la vía cGAS/STING.



**Figura 8.** Diagrama representativo de la degradación proteica mediante proteasoma, activación de la apoptosis mediante la vía intrínseca y la activación de la vía de señalización cGAS/STING. Se muestran en rojo los 4 fármacos usados en el presente trabajo y sus efectos. Creación propia mediante BioRender.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Líneas celulares**

En este trabajo se ha hecho uso de las siguientes líneas celulares de mieloma: RPMI8226 CVCL\_0014, NCI-H929 (CVCL-1600), llamada a partir de ahora H929, y KMS34 (CVCL\_2996). Las dos últimas líneas fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup> con tampón de filtro en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, *Sigma*) y un cóctel de antibióticos compuesto por estreptomina (10 mg/mL, *Sigma*) y penicilina (10000 U/mL, *Sigma*). Para la línea RPMI8226 se empleó suero fetal bovino al 10% (SFB, *Sigma*) previamente deplementado mediante incubación a 58°C durante 30 minutos. El complemento es un sistema de proteínas del sistema inmunológico. Es necesario que se elimine para el cultivo de RPMI8228 porque en el grupo de investigación se ha observado que estas células crecen peor en presencia del complemento. Las células se cultivaron dentro de un incubador termostatzado a 37°C en aire húmedo y con 5% de CO<sub>2</sub> (*Heraeus Cell*).

Periódicamente se realizaron tests para descartar la posible contaminación por micoplasmas, se utilizaron kits comerciales Mycoplasma Gel Detection Kit (Biotools) o MycroStrip™ (InvivoGen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En caso de detectar la contaminación se iniciaban nuevos cultivos mediante células criopreservadas o se realizaba un tratamiento con el kit de descontaminación BM-Cyclin (Roche).

El pasaje de los cultivos se realizó periódicamente y cada 2-3 días se evaluó la densidad y la viabilidad utilizando un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50i*) mediante la prueba de exclusión de azul tripán (*Sigma*) en una cámara de *Neubauer*. Esta prueba nos permite distinguir a las células muertas y vivas, ya que el colorante solo penetra en las células que tengan la membrana dañada, dándoles una tonalidad azul.

### **4.2. Descongelación de células**

Las diferentes líneas celulares se almacenaban congeladas en tubos criogénicos dentro un congelador a -80°C o un dewar con N<sub>2</sub>. Para la descongelación de las diferentes líneas, se añadió al criotubo 1 ml del medio de cultivo completo atemperado. A continuación, la suspensión celular se trasvasó a un tubo de fondo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 233xg. Finalmente, se eliminó el sobrenadante por decantación, el pellet celular se resuspendió en su medio de cultivo correspondiente y las células se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup>.

### **4.3. Ensayos de crecimiento celular**

Para evaluar la viabilidad celular tras el tratamiento con diABZI se realizó el ensayo de Mossman. Para ello, se sembró cada línea celular en una placa de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 3x10<sup>4</sup> cel/pocillo en un volumen final de 100 µL, y se incubaron durante 24 horas a 37°C con concentraciones crecientes de diABZI (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 5, 50, 100 y 200 nM). Tras la incubación con el inhibidor, se añadieron 10 µL de una solución de MTT de 5 mg/mL en cada pocillo y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Durante la incubación, las células vivas reducen el MTT a cristales de formazán, de color púrpura. A continuación, se solubilizaron los cristales con 100 µL de una mezcla de isopropanol y 0.05 M HCl. Los cristales se resuspendieron para facilitar su disolución y se acabaron de disolver en un agitador de placas (Bioblock).

Finalmente, se midió la absorbancia de cada uno de los pocillos a 550 nm en un lector de placas EZ Read 400 (Biochrom).

#### **4.4. Ensayos de citotoxicidad mediante citometría de flujo**

La evaluación de la citotoxicidad de diABZI en solitario se realizó mediante la siembra de las células a una densidad de  $2 \times 10^5$  cel/pocillo en un volumen de 500  $\mu$ l en placas de 48 pocillos (KMS34 y H929) o 24 pocillos (RPMI8226) de fondo plano. Se añadieron concentraciones crecientes de diABZI (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 500 nM) y se incubaron durante 24 horas.

Para los experimentos de combinación de S63845 con diABZI se sembraron las células siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las células se incubaron de nuevo con las mismas dosis de diABZI en combinación con 10, 25 y 100 nM de S63845 para H929, RPMI8226 y KMS34, respectivamente, y se incubaron durante 24 horas.

Para evaluar la muerte celular, tras el tratamiento con los compuestos, las células se incubaron con anexina-V-FITC y 7-AAD (*BD Biosciences*, Madrid, España) al 0.5 % y 3.33%, respectivamente, en un tampón de unión (140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) durante 10 minutos en oscuridad, y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur, *BD Biosciences*). En el presente trabajo se utilizó anexina V recombinante unida a FITC que ha sido generada en el laboratorio siguiendo las indicaciones y el protocolo descrito por Logue et al. [51] y Dynomics GmbH [52].

#### **4.5. Análisis de expresión de proteínas mediante *western blot***

##### **4.5.1. Obtención de los extractos de proteína**

Para la obtención de los extractos proteicos, se sembraron  $3 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos en un volumen final de 10 mL de medio completo. Se añadieron 5, 7.5 y 10 nM de carfilzomib a H929, KMS34 y RPMI8226, respectivamente y se incubaron durante 6 y 18 horas a 37°C. Como muestra control, se mantuvo un pocillo/placa al que no se le añadió ningún fármaco, obteniéndose un total de 3 muestras control para cada línea celular.

Pasado el tiempo de incubación se recogieron las células en un tubo de fondo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 233xg. Se desechó el sobrenadante y el pellet celular resultante se resuspendió en 1 mL de PBS a 4°C (150 mM NaCl; 8 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ; 1.6 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.4). La muestra resuspendida se trasvasó a un tubo eppendorf y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 460xg, repitiéndose este proceso 3 veces. A continuación, se desechó de nuevo el sobrenadante y se añadieron 35  $\mu$ L de tampón de lisis 1x (Thermo Fisher, FNN0011) conteniendo inhibidores de fosfatasa y proteasas (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher, 78440). Se dejó incubar durante 30 minutos en hielo, mezclándolo mediante vortex cada 10 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 14462xg durante 20 minutos a 4°C y finalmente se recuperaron 30  $\mu$ L del sobrenadante obtenido. Para cuantificar la cantidad de proteína en cada una de las muestras se realizó un ensayo Bradford (*Thermo Fisher*, Rockfors, 15398086).

Seguidamente, se prepararon las muestras para ser cargadas en un gel de poliacrilamida-SDS. Para ello, se mezclaron 25  $\mu$ L de tampón de carga 2x Tris-Glicina SDS (Thermo Fisher, LC2673) con los volúmenes de muestras calculados a partir del ensayo Bradford, de manera que

todas contenían la misma cantidad de proteína, completando con PBS hasta llegar a un volumen final de 50 µL.

#### 4.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Para separar las proteínas se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida/bis-acrilamida. Los extractos proteicos preparados de acuerdo con el apartado 5.5.1 se incubaron a 85°C durante 2 minutos y tras ello se centrifugaron durante 1 minuto a 100xg. Posteriormente, se cargaron aproximadamente 50 µg de cada muestra en cada uno de los pocillos del gel. En el primer carril de cada gel, se añadieron 4 µL de un marcador de peso molecular (BlueStar Plus Prestained Protein marker, Cultiex, MWP04).

Se usaron geles de poliacrilamida Novex™ WedgeWell™ de 4 a 20 %, Tris-glicina (Thermo Fisher Scientific, XP04202BOX), los cuales presentan un gradiente desde el 4% a 20% de poliacrilamida, generando una matriz porosa idónea para la separación de proteínas entre 6 y 200 kDa. Las muestras se separaron aplicando una corriente de 180 V y 20 mA durante un periodo de 80 minutos en un tampón de electroforesis con la siguiente composición: Trizma 19 mM, Sigma; glicina 192 mM, Panreac; 0.01% SDS, Merck.

#### 4.5.3. Western blot

Tras la realización de la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa presente en el kit iBlot™ 3 Transfer Stacks, midi, nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific, IB33001) junto al resto de material necesario para la transferencia. Para realizar dicha transferencia se utilizó un equipo de transferencia de tipo seca (iBlot™ 3 Western Blot Transfer Device), seleccionando el programa de transferencia para proteínas pequeñas (40-120 kDa).

Tras la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó con una disolución de leche en polvo al 5% (p/v) en tampón B (0.1g/l timerosal; 5mL/L Tween; disueltos en PBS) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente, se realizaron varios lavados con tampón B para desechar el excedente de solución bloqueante. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico contra la proteína que se deseaba detectar (Tabla 1) durante toda la noche en la cámara fría y en agitación. Transcurrido ese tiempo se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón B.

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas mediante Western Blot.

Diana (clon del anticuerpo)	Especie	Dilución	Casa comercial
STING	Conejo	1:500	ThermoFisher, PA5-23381
TBK	Ratón	1:500	ThermoFisher, MA1-20344
TBK pSer172	Conejo	1:500	Novus Biotechnne, NBP3-16918-20ul
IRF3	Conejo	1:1000	ThermoFisher, MA5-32348
IRF3 pSer385	Ratón	1:500	ThermoFisher, PA5-36775

Diana (clon del anticuerpo)	Especie	Dilución	Casa comercial
$\alpha$ -Tubulina	Ratón	1:10000	Cell Signaling, 3873
$\beta$ -Actina	Ratón	1:10000	Sigma Aldrich, A1978

Acto seguido se incubó la membrana durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de conejo o ratón conjugado con la peroxidasa de rábano, a una concentración 1:10000 (v/v) y en una solución de tampón B con leche en polvo al 2,5% (p/v), en agitación. Pasada la hora de incubación, se volvieron a realizar 3 lavados y se añadió un sustrato quimioluminiscente (Sustrato para inmunotransferencia Western Blotting de ECL Pierce™, Thermo Fisher, 32106) sobre la membrana, incubándose durante 2 minutos. Finalmente, las proteínas de interés fueron detectadas mediante el equipo Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences).

Como control de carga se analizaron los niveles de expresión de la  $\beta$ -actina o  $\alpha$ -tubulina en cada uno de los carriles. Son proteínas de 42 kDa y 55 kDa, respectivamente, con función estructural que se encuentran de forma abundante en todo tipo celular. Para ello, se siguió el mismo protocolo explicado anteriormente, con la única diferencia de que el anticuerpo primario usado fue un Ig anti- $\beta$ -actina o  $\alpha$ -tubulina de ratón, y el secundario, un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano.

#### 4.5.4. Análisis de densitometría

Para el análisis de las intensidades de las bandas obtenidas por *western blot* se utilizó el programa informático ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.), que permite transformar dicha intensidad en una medida cuantificable que, tras ser normalizada con la señal del control de carga, permite comparar las diferentes muestras entre sí.

#### 4.6. Análisis de la liberación de mtDNA

Para cuantificar/analizar la liberación de mtDNA en el citosol se sembraron  $3 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos en un volumen final de 10 mL de medio completo. En dos pocillos se realizó un pretratamiento con QVD-OPH a 10  $\mu$ M durante 15 minutos y después se añadió 5, 7,5 y 10 nM de carfilzomib a H929, KMS34 y RPMI8226, respectivamente, o 100 nM de S63845. En otro se añadió tan solo carfilzomib en las mismas dosis que en el anterior pocillo, y en otro no se añadió ningún fármaco, siendo éste nuestro control. Se incubaron 6 horas a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación se recogieron las células en un tubo de fondo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 233xg. Se desechó el sobrenadante y el pellet celular resultante se resuspendió en 1 mL de PBS 4°C, se trasvasó a un tubo eppendorf y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 460xg. A continuación, se inició el protocolo de fraccionamiento, para obtener la fracción citosólica. En primer lugar, se retiró el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 400  $\mu$ L de tampón digitonina (50 mM HEPES; 0,15 mM NaCl; 0.005% p/v digitonina) y se incubó a 4°C durante 5 minutos en un agitador de noria. La digitonina es un detergente que va a permeabilizar la membrana plasmática de las células. Pasados los 5 minutos

se centrifugó a 950xg durante 5 minutos a 4°C y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, que se centrifugó a 17000xg durante 5 minutos a 4°C. Se volvió a trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, obteniéndose así finalmente nuestra fracción citosólica. El pellet resultante tras la incubación con digitonina se lavó 3 veces con PBS frío centrifugando a 950xg durante 5 minutos a 4°C y, finalmente, se resuspendió en 200 µL de PBS, obteniéndose así la fracción que contiene la membrana plasmática, los orgánulos y núcleos denominada, a partir de ahora, como fracción mitocondrial + nuclear (Mt-Nc).

Posteriormente se procedió a la extracción del DNA en ambas fracciones usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), y el DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría mediante el Nanodrop 2000 (Thermofisher). Finalmente se realizó una qPCR para determinar la cantidad de mtDNA frente al DNA nuclear en todas las líneas celulares bajo las distintas condiciones de estudio, como se explicará más adelante.

#### **4.7. Detección de la expresión de IFN tipo I**

Para el análisis de la expresión de IFN  $\beta$  se sembraron las células de manera análoga a los experimentos para la detección de mtDNA, salvo que se estudió una condición adicional añadiendo 100 nM de diABZI e incubando durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación se recogieron las células en un tubo de fondo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 233xg. Se desechó el sobrenadante y el pellet celular resultante se resuspendió en 1 mL de PBS y se trasvasó a un tubo eppendorf. A continuación, se extrajo el mRNA mediante el kit Quick-RNA™ Miniprep (ZYMO RESEARCH) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El RNA obtenido se cuantificó mediante el Nanodrop 2000 (Thermofisher) y se sintetizó el cDNA mediante una RT-PCR usando el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech). Con el cDNA resultante se realizó una qPCR para observar diferencias en la expresión de IFN  $\beta$ , tal y como se indica en el apartado siguiente.

#### **4.8. Cuantificación por qPCR**

Para los experimentos de liberación de DNA mitocondrial se utilizaron 3 pares de cebadores o primers, 2 de ellos replican secuencias del genoma mitocondrial (MT-CO2 y MT-DNA Loop) y el tercero del genoma nuclear. Los cebadores fueron amablemente cedidos por la Dra. Raquel Moreno Loshuertos (Universidad de Zaragoza). Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

##### **MT-CO2:**

Fw: CGATCCCTCCCTTACCATCA

Rev: CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT

##### **MT-DNA Loop:**

Fw: TATCTTTTGCCGGTATGCACTTTTAACAGT

Rev: TGATGAGATTAGTAGTATGGGAGTGG

##### **$\beta$ -Globina:**

Fw: GTGCATCTGACTCCTGAGGAGA

Rev: CCTTGATACCAACCTGCCAG

En el caso del estudio de expresión de IFN tipo I se escogió amplificar IFN  $\beta$ , la pareja de cebadores empleada se adquirió a la casa comercial Thermo Fisher y su secuencia es [53]:

**IFN  $\beta$ :**

Fw: GGCACAACAGGTAGTAG

Rev: GTGGAGAAGCACAAACAGGAGA

Para cuantificar los 3 genes empleados como referencia interna o *housekeeping* se utilizaron tres parejas de cebadores que ya se habían empleado en otras ocasiones en investigaciones previas del grupo. Sus secuencias son [54]:

**HPRT:**

Fw: CCTGGCGTCGTGATTAGTGA

Rev: CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT

**UBC:**

Fw: ATTTGGGTCGCGGTTCTTG

Rev: TGCCTTGACATTCTCGATGGT

**YWHAZ:**

Fw: ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA

Rev: CCGCCAGGACAAACAGTAT

Las reacciones de qPCRs se realizaron en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza y el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en su equipo QuantStudio 7 Pro (Thermo Fisher), usando una placa de 96 pocillos MicroAmp™ (Thermo Fisher, 4346907) y un volumen final de 20  $\mu$ l: 10  $\mu$ l MasterMix PowerTrack SYBR Green (ThermoFisher, A46110), 1  $\mu$ l de cada uno de los cebadores, directo y reverso, a 10  $\mu$ M, X  $\mu$ l DNA y agua libre de nucleasas (Fisher Scientific, 11538646) hasta completar los 20  $\mu$ l. El volumen de DNA varía según la concentración de la muestra y el experimento. En el caso de la detección de mtDNA se añadieron entre 0.5-3  $\mu$ l de DNA para que la cantidad final de DNA estuviese en torno a 100 ng, mientras que en el experimento la expresión de IFN $\beta$  se añadieron 2  $\mu$ l, para tener 10 ng de cDNA en la reacción final.

Posteriormente, se realizaron las qPCRs en modo de ciclos rápidos siguiendo el programa representado en la Tabla 2, que incluye una curva de fusión para verificar la especificidad de la qPCR.

**Tabla 2.** Condiciones térmicas y tiempos empleados para las qPCRs.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación UDG	50°C	2 minutos	1
Activación polimerasa	95°C	2 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 segundo	40
Hibridación/Elongación	60°C	30 segundos	

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Curva de fusión	95°C	15 segundos	1
	60°C	1 minuto	1
	95 °C	15 segundos	1

Una vez realizada la qPCR se calculó el nivel relativo de mRNA mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [55]. Explicado brevemente, se compara el umbral de ciclo (Ct), ciclo en el que se supera el valor de fluorescencia de la línea umbral, del gen de interés normalizado con un gen de referencia interno o *housekeeping* ( $\Delta Ct$ ) y luego se evalúa la diferencia entre las condiciones experimentales de interés y el control ( $\Delta\Delta Ct$ ). Finalmente, se aplica la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para obtener el cambio relativo en la expresión, donde valores mayores a 1 indican un aumento de su expresión.

#### 4.9. Análisis estadístico y generación de gráficas

El análisis estadístico y la representación e interpretación de los datos obtenidos en los ensayos, se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism 8. En todos los análisis estadísticos se aplicó la prueba t de Student desapareada.

Para determinar si había un efecto sinérgico al realizar tratamientos combinados se calculó la muerte celular específica hipotéticamente esperada (EXP) y se comparó con la muerte celular específica observada (OBS). Este método es una aproximación de la teoría de independencia de Bliss, en la cual se considera al tratamiento combinado sinérgico si el efecto OBS es significativamente mayor (un 10% de diferencia de muerte específica) respecto al EXP [56]. La muerte celular específica EXP se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$EXP = \%muerte\ específica\ diABZI + \%muerte\ específica\ S63845 - \frac{\%muerte\ específica\ diABZI \times \%muerte\ específica\ S63845}{100}$$

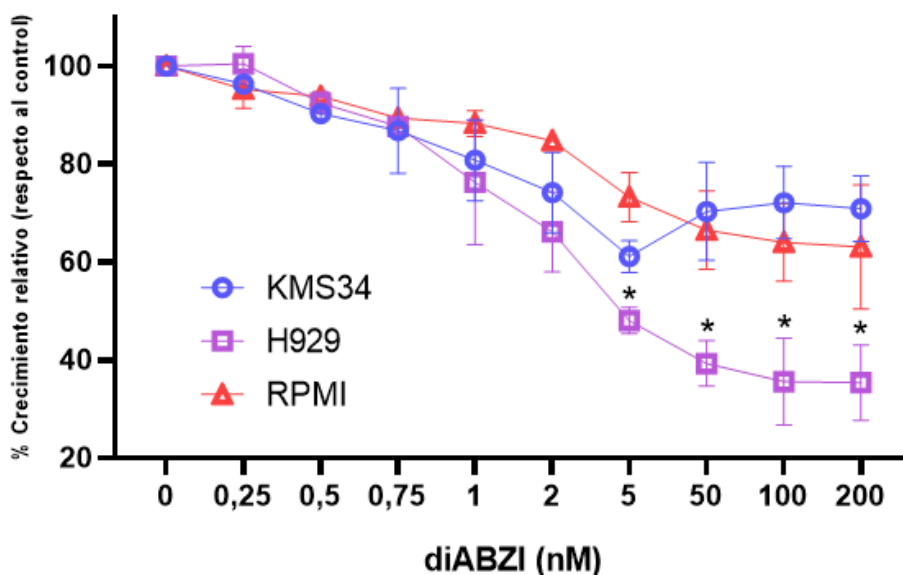
## 5. Resultados

### 5.1. Efecto de la activación de cGAS/STING en mieloma múltiple.

En primer lugar, se procedió a comparar la sensibilidad entre las diferentes líneas celulares KMS34, H929 y RPMI8226 a la activación de la vía cGAS/STING mediante el agonista de STING diABZI. Todas las líneas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes de diABZI e incubadas durante 24 horas a 37°C y se analizó el efecto sobre la proliferación y la muerte celular

#### 5.1.1. Efectos en el crecimiento celular

Como se muestra en la Figura 9, diABZI inhibe el crecimiento de manera dependiente de la concentración, empezándose a observar un claro descenso del crecimiento celular a partir de la dosis de 0,75 nM. Así mismo, se puede observar que la línea celular H929 es notablemente más sensible a diABZI que RPMI8226 y KMS34, siendo estas dos últimas líneas igualmente afectadas. Esta diferencia empieza a ser significativa a partir de la dosis de 5 nM, alcanzando el máximo a 100 nM, concentración a partir de la cual se mantiene la inhibición del crecimiento conforme se aumenta la dosis.



**Figura 9.** Análisis de crecimiento celular después del tratamiento con diABZI. Las células se trataron con concentraciones crecientes de diABZI, se incubaron durante 24 horas y se evaluó el crecimiento celular mediante el ensayo MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de crecimiento relativo en comparación con el control, células no tratadas (CTRL)  $\pm$  SD de al menos 2 experimentos independientes (n=2) realizados por triplicado. La significación estadística representa aquellos valores en los que la inhibición del crecimiento celular por parte de los fármacos fue mayor en un tipo de célula dado en comparación con las células KMS34. \* $p \leq 0.05$

### 5.1.2. Efectos en la viabilidad celular

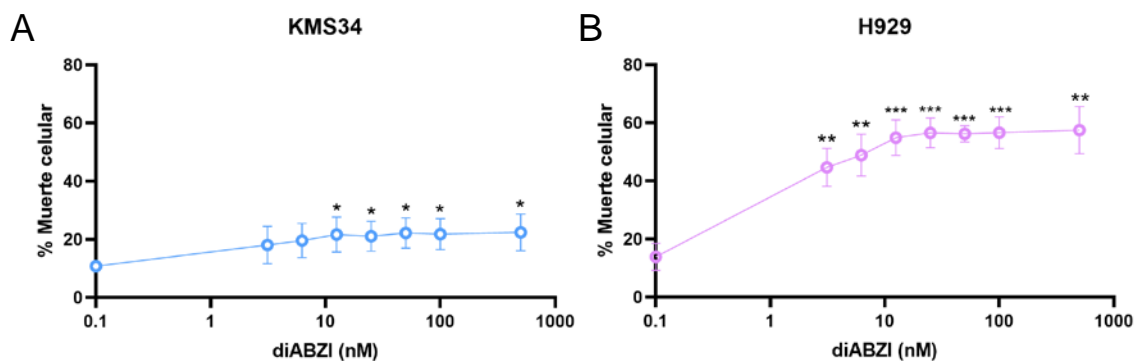
Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran que diABZI tiene un efecto citotóxico diferente en cada línea celular, siendo H929 y RPMI8226 más sensibles que KMS34 (Figura 10).

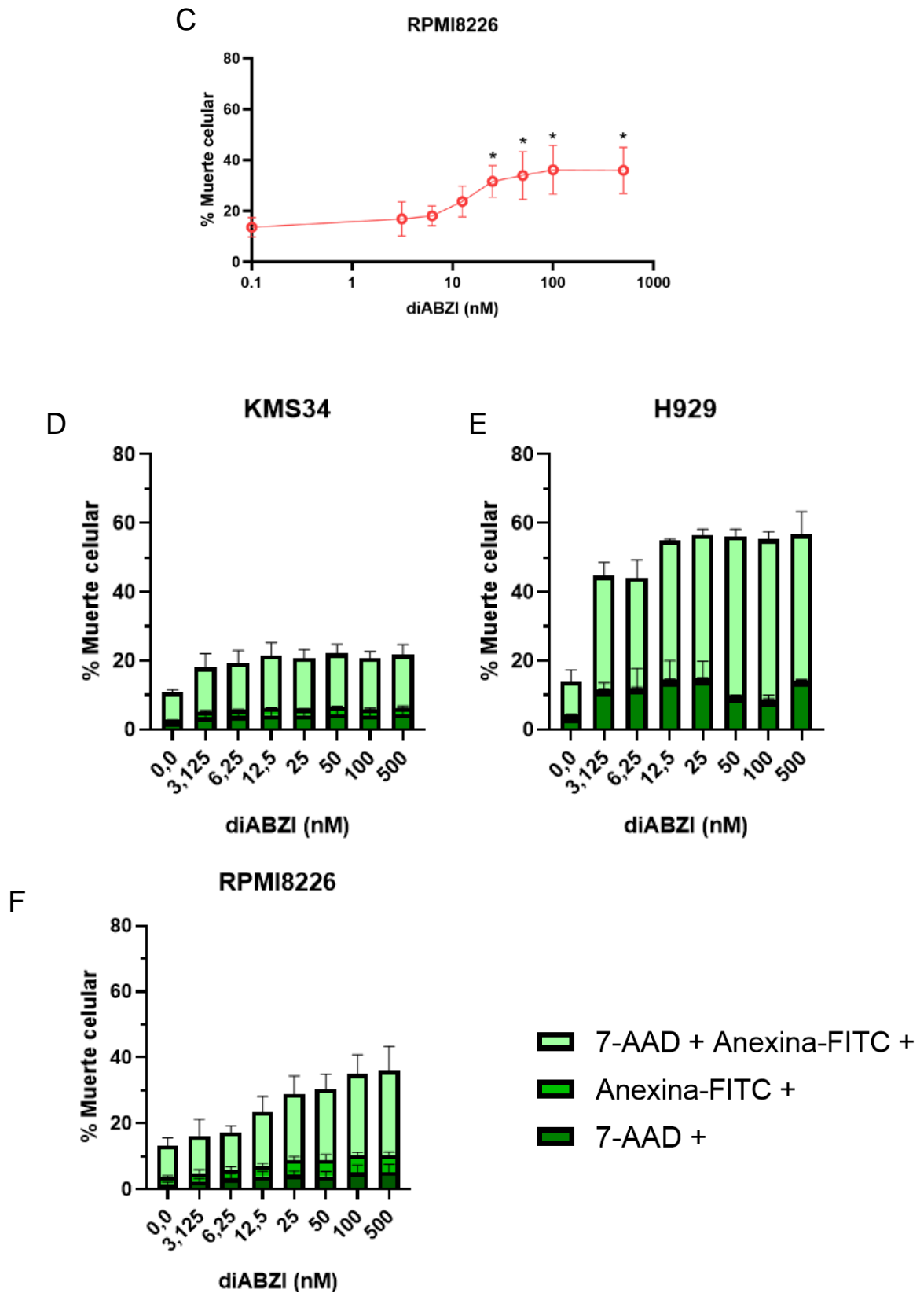
La administración de diABZI no tiene un efecto destacable en KMS34 (Figura 10.A), provocando la muerte en torno al 20% de las células en todas las concentraciones usadas. Se observa que su efecto aumenta ligeramente al aumentar la concentración, siendo inicialmente la muerte celular del 18% en las concentraciones más bajas (3.125-12.5 nM) y aumentando ligeramente hasta el 23% en las dosis más altas.

Respecto a la citotoxicidad en RPMI8226 (Figura 10.C) se observa que tiene una clara dependencia de la concentración, siendo significativa a partir de la dosis de 25 nM. Asimismo, se ha identificado una mayor sensibilidad que en el caso de KMS34, ya que el tratamiento con diABZI llega a provocar la muerte del 35% de las células en las dosis más altas.

De igual forma que en el apartado 6.1.1, la línea celular más sensible es H929 (Figura 10.B), presentándose ya un efecto destacable en las dosis más bajas, donde diABZI induce una muerte celular entorno al 45%, que aumenta ligeramente al administrar dosis mayores, llegando a alcanzar el 57% de muerte celular.

Las células muertas se pueden separar en 3 poblaciones distintas, solo positivas para uno de los marcajes, 7-AAD + o anexina-FITC +, o positivo simultáneamente a ambos 7-AAD + anexina-FITC +. En KMS34 (Figura 10.D) y RPMI8226 (Figura 10.F) la población mayoritaria de células muertas es positiva a ambos marcajes, mientras que las restantes presentan valores similares y muy inferiores. Igualmente, en H929 (Figura 10.E) la población mayoritaria sigue siendo positiva a ambos marcajes, pero en esta ocasión también se ha detectado una alta cantidad de células muertas tan solo 7-AAD +.





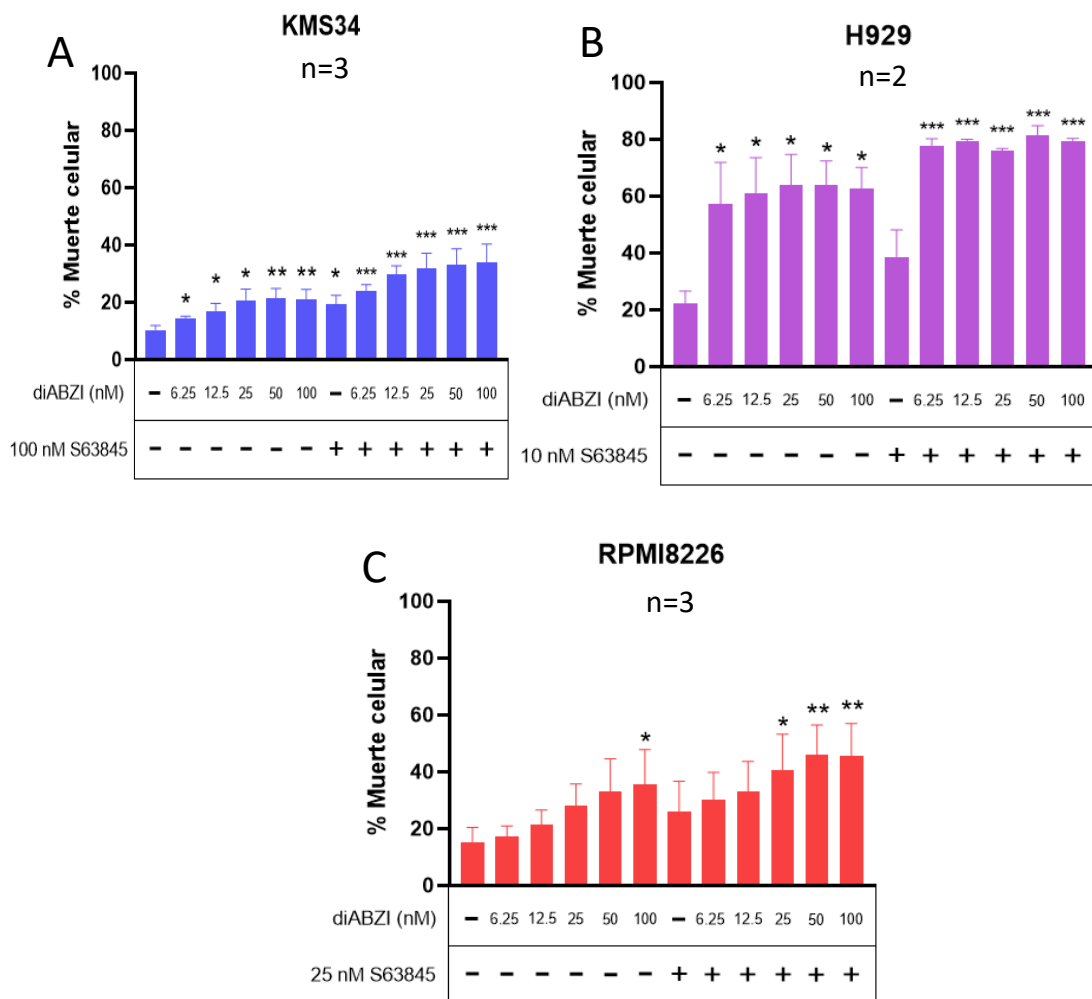
**Figura 10.** Resultados obtenidos a partir del ensayo de citotoxicidad de diABZI. Las 3 líneas celulares KMS34 (A y D), H929 (B y E) y RPMI8226 (C y F) se incubaron con concentraciones crecientes de diABZI durante 24 horas. Seguidamente, las células se marcaron simultáneamente con anexina-V-FITC y 7-AAD y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD del porcentaje de células muertas totales (A, B y C) o para las poblaciones celulares según el marcaje (D,

E, y F) de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=3). La significación estadística representa aquellos valores en los que la muerte celular por parte del fármaco fue mayor en un tipo celular en comparación con su respectivo control. \*p≤0.05 \*\* p≤0.01 \*\*\* p≤0.001

## 5.2. Efecto de la activación de cGAS/STING en combinación con S63845.

Dados los resultados obtenidos en el apartado 5.1, se decidió combinar el agonista de STING (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 nM), con dosis subletales del mimético de BH3, inhibidor de Mcl-1, S63845 de 10, 25 y 100 nM sobre H929, RPMI8226 y KMS34, respectivamente. Las dosis de S63845 fueron determinadas a partir de experimentos realizados previamente en el laboratorio y se corroboraron mediante un ensayo dosis-respuesta (Anexo 1). Tras un periodo de incubación de 72 horas a 37°C, se realizó un marcaje con anexina-V-FITC y 7-AAD y se analizó por citometría de flujo para determinar la muerte celular.

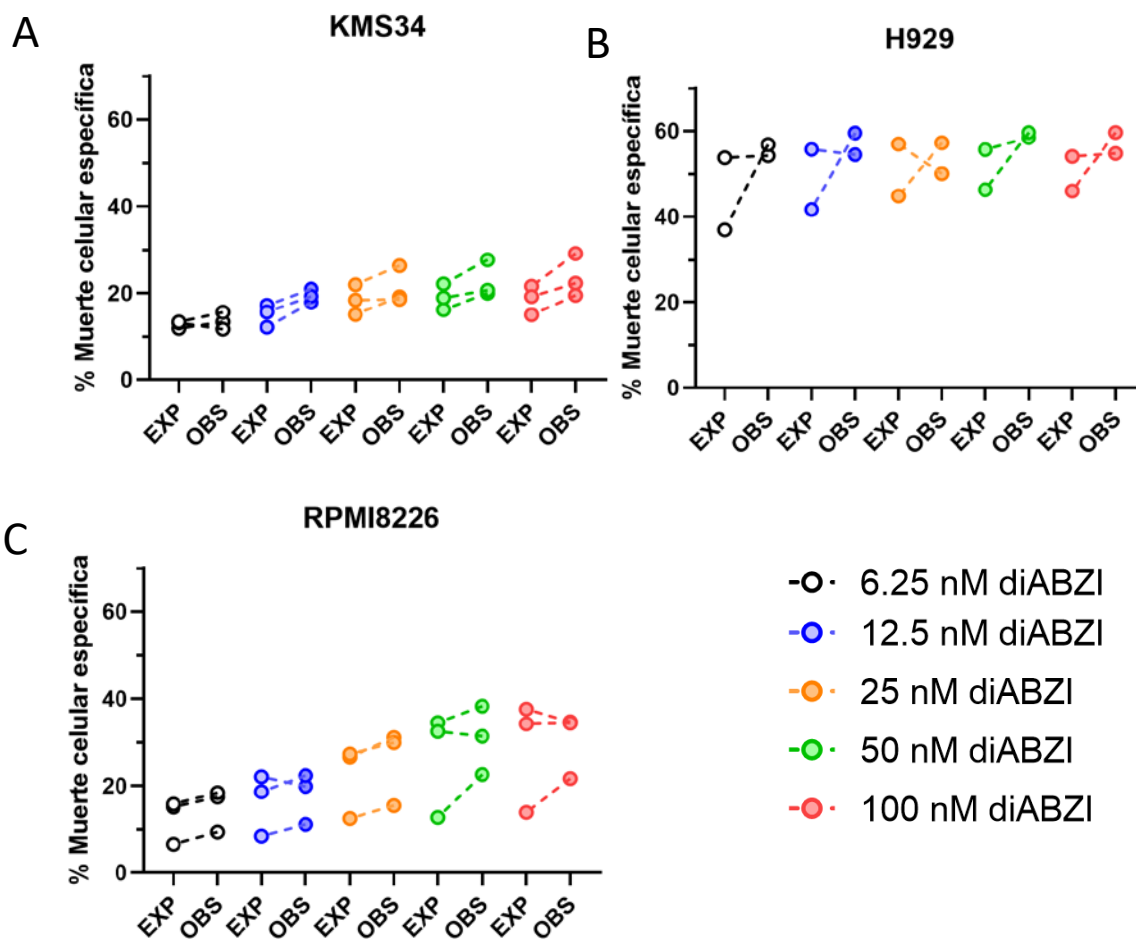
En este ensayo, al combinar diABZI con S63845 (Figura 11) se obtuvieron resultados similares con las 3 líneas celulares. Como era de esperar, se mantuvo el efecto de diABZI, descrito en el anterior apartado, y de S63845, con dosis que provocaron la muerte celular en torno al 20-30 %.



**Figura 11.** Efecto citotóxico del agonista diABZI (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 nM) solo o en combinación con S63845 10, 25 o 100 nM sobre (B) H929, (C) RPMI8226 y (A) KMS34, respectivamente. Los

resultados se expresan como la media  $\pm$  SD del porcentaje de células muertas de al menos 2 experimentos independientes realizados por duplicado ( $n=2-3$ ). La significación estadística representa aquellos valores en los que la muerte celular por parte del tratamiento fue mayor en comparación con su respectivo control. \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$

Respecto a la combinación de ambos tratamientos, en todas las líneas celulares se observó un aumento de la muerte celular (Figura 11). Al calcular la muerte celular específica EXP, como se ha detallado en el apartado 5.9, y medirse la OBS se vio que, por lo general, la muerte observada era ligeramente mayor (Figura 12). Cabe destacar que en la línea celular H929 una de las réplicas sí que presenta una diferencia mayor a 10% muerte celular específica OBS y EXP, mientras que la segunda no, por lo que sería necesario realizar más réplicas para poder determinar qué efecto tiene la combinación de los fármacos en esta línea celular.



**Figura 12.** Efecto citotóxico del agonista diABZI (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 nM) solo o en combinación con S63845 10, 25 o 100 nM sobre (B) H929, (C) RPMI8226 y (A) KMS34, respectivamente. Representación de la muerte celular específica EXP y OBS.

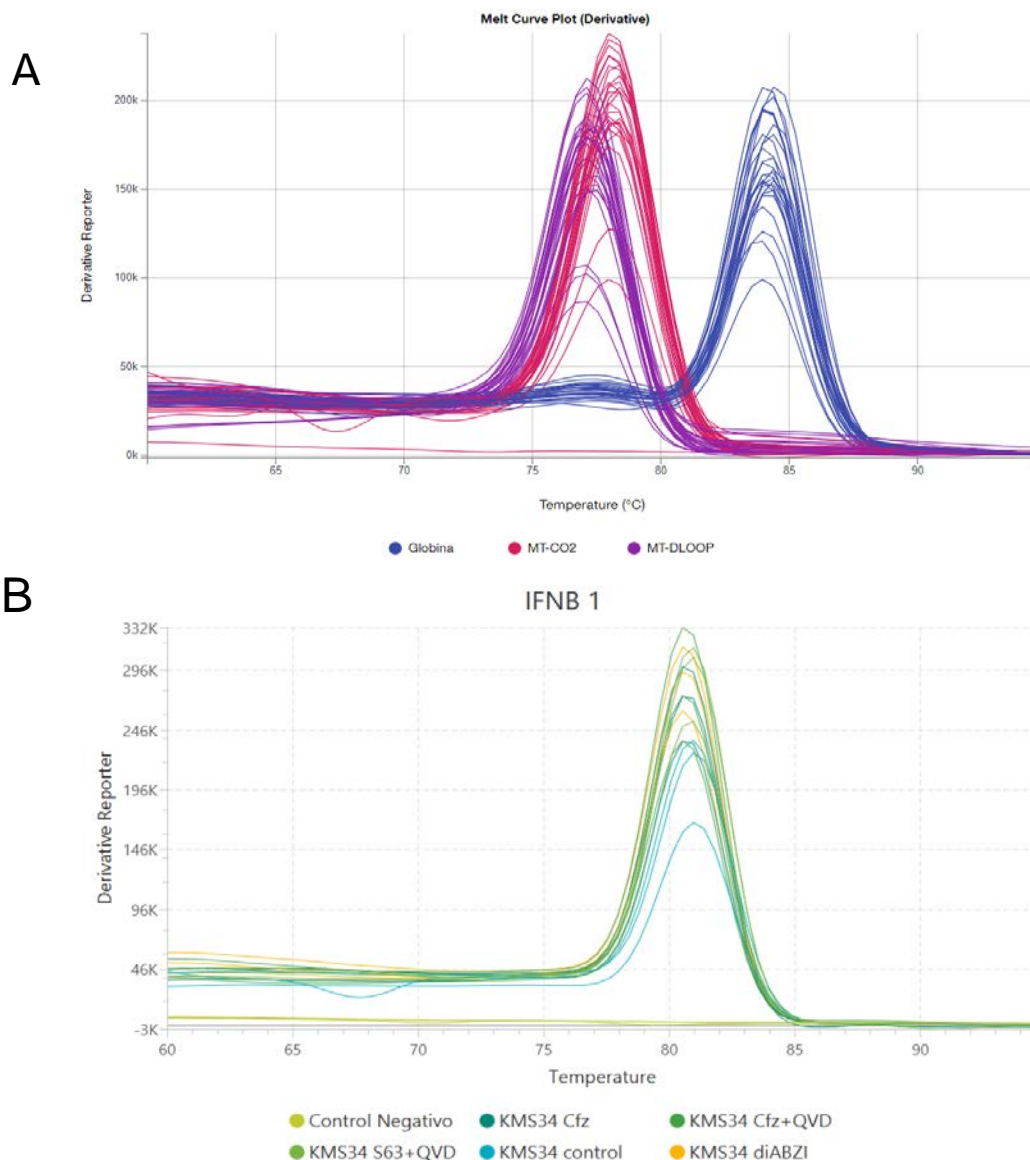
### 5.3. Efecto del carfilzomib en la vía cGAS/STING en el mieloma múltiple

Como se ha detallado en la introducción de este trabajo, se han descrito diferentes fármacos que pueden inducir la activación de la vía cGAS/STING, como el inhibidor del proteasoma bortezomib. En este trabajo se abordó el efecto del carfilzomib y su capacidad de activar dicha vía de señalización, para ello, se realizó la cuantificación relativa del mtDNA citosólico, expresión

de IFN tipo I y cuantificación de la expresión y nivel de fosforilación de las proteínas participantes en la vía de señalización.

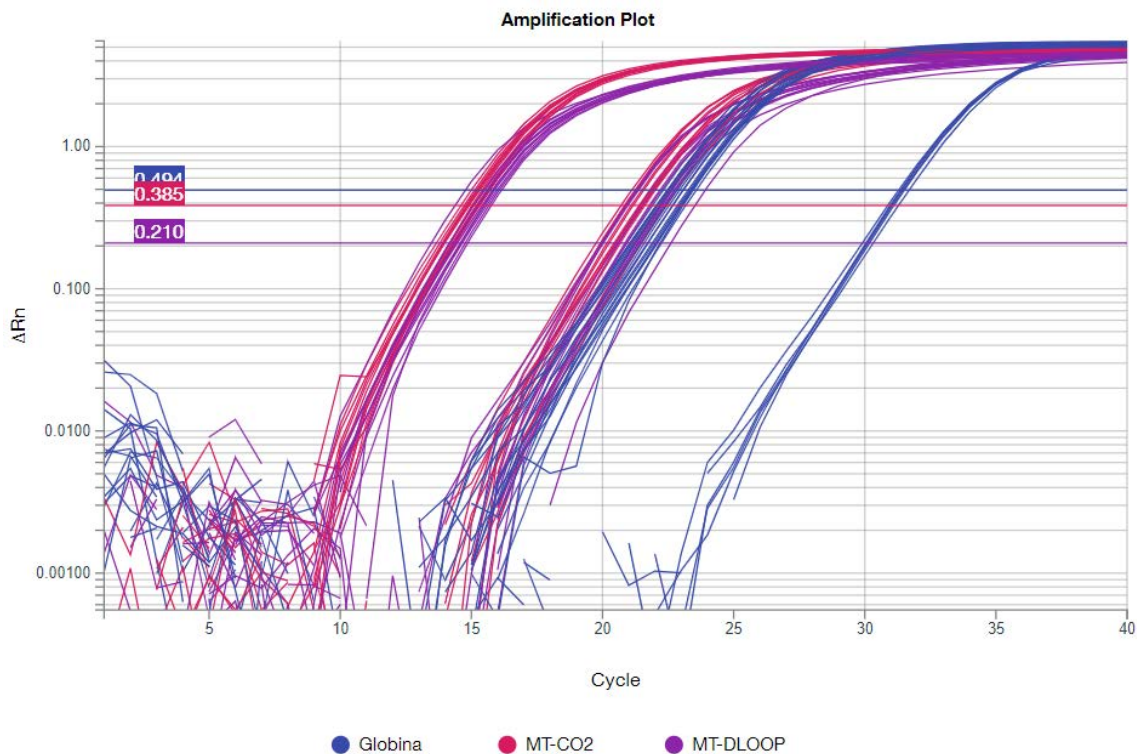
### 5.3.1. Cuantificación relativa de mtDNA citosólico y de IFN $\beta$ mediante qPCR

Tras llevar a cabo las qPCR, en primer lugar, se verificó su especificidad comprobando que se hubiera generado un solo pico en la curva de fusión (Figura 13). Dicha curva se genera al ir aumentando la temperatura progresivamente, provocando que el DNA se desnaturalice y, por tanto, disminuya la fluorescencia. Cada secuencia de DNA tiene una  $T_m$  (temperatura de fusión) característica que depende de su secuencia, por lo tanto, si se hubiesen generado productos inespecíficos que hubieran podido interferir con los resultados se hubieran obtenido varios picos en la curva de fusión, pero no es el caso.



**Figura 13.** (A) Curvas de fusión de una de las qPCR de los experimentos de detección de mtDNA, en las que se observan 3 picos, correspondientes, cada uno de ellos, a los fragmentos de  $\beta$ -globina, MT-CO2 y MT-DLOOP amplificados. (B) Curva de fusión de las muestras de KMS34 tras la qPCR de IFN  $\beta$ .

Como se puede observar en la figura 13 A, por cada uno de los pares de cebadores utilizados se obtuvo un pico diferente, ya que se están replicando secuencias distintas. En todas las qPCRs se obtuvo un único pico para cada par de cebadores, mostrando que no se habían amplificado secuencias no deseadas o inespecíficas. A continuación, se obtuvieron los valores de Ct (Figura 14) y se calculó el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  tal y como se ha explicado en el apartado 4.8. Los datos se muestran en la tabla 3 para las muestras de la fracción citosólica para la determinación de liberación de mtDNA en KMS34. El resto de Ct y sus cálculos se muestran en el Anexo 2, tabla S1.



**Figura 14.** Representación de las curvas de amplificación, variación de fluorescencia normalizada respecto al ciclo de la qPCR, para una réplica de RPMI. Se indica el valor umbral para cada uno de los genes amplificados y su valor.

**Tabla 3.** Valores de Ct,  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para las muestras de la fracción citosólica de una de las réplicas en KMS34. **CFZ:** Carfilzomib **S63:** S63845 **QVD:** QVD-POH **Ctrl:** Control

Muestra	Gen	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Nivel de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
KMS34 citosólico Ctrl	$\beta$ -globina	25.81	-	-	-
	MT-CO2	23.38	-2.43	0.00	1
	MT-DLOOP	22.2	-3.61	0.00	1

Muestra	Gen	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Nivel de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
KMS34 citosólico CFZ	$\beta$ -globina	25.25	-	-	-
	MT-CO2	23.63	-1.62	0.81	0.57
	MT-DLOOP	22.84	-2.41	1.20	0.43
KMS34 citosólico CFR+QVD	$\beta$ -globina	31.36	-	-	-
	MT-CO2	24.21	-7.15	-4.72	26.32
	MT-DLOOP	23.06	-8.30	-4.69	25.81
KMS34 citosólico S63+QVD	$\beta$ -globina	31.30	-	-	-
	MT-CO2	24.22	-7.08	-4.65	25.05
	MT-DLOOP	23.11	-8.19	-4.58	23.91

### 5.3.2. Determinación de la liberación de mtDNA en el citosol

En primer lugar, tras la extracción de las muestras de DNA se midió la concentración y el coeficiente de absorbancia 260/280 (Tabla 4) mediante Nanodrop. Se realizaron 2 extracciones de DNA de H929 y 3 de KMS34 y RPMI, obteniendo 8 muestras por cada extracción, en total 64 muestras. Se observó una alta variabilidad en la concentración de DNA, oscilando entre 28.7 y 265.5 ng/ $\mu$ L, siendo la concentración similar entre las muestras citosólicas y Mt-Nc en cada extracción. El coeficiente de absorbancia 260/280 se utiliza para determinar valores de pureza del DNA, con un valor de 1.7-1.9 para DNA puro. En nuestras muestras se obtuvieron valores en torno a 1.9-2.1, sugiriendo posible contaminación con RNA.

**Tabla 4.** Valores de concentración (ng/ $\mu$ L) y del coeficiente de absorbancia 260/280 para todas las muestras de cada línea celular. Se realizaron 2 extracciones (Extr.) para H929 y 3 para KMS34 y RPMI. **CFZ:** Carfilzomib **S63:** S63845 **QVD:** QVD-POH **Ctrl:** Control

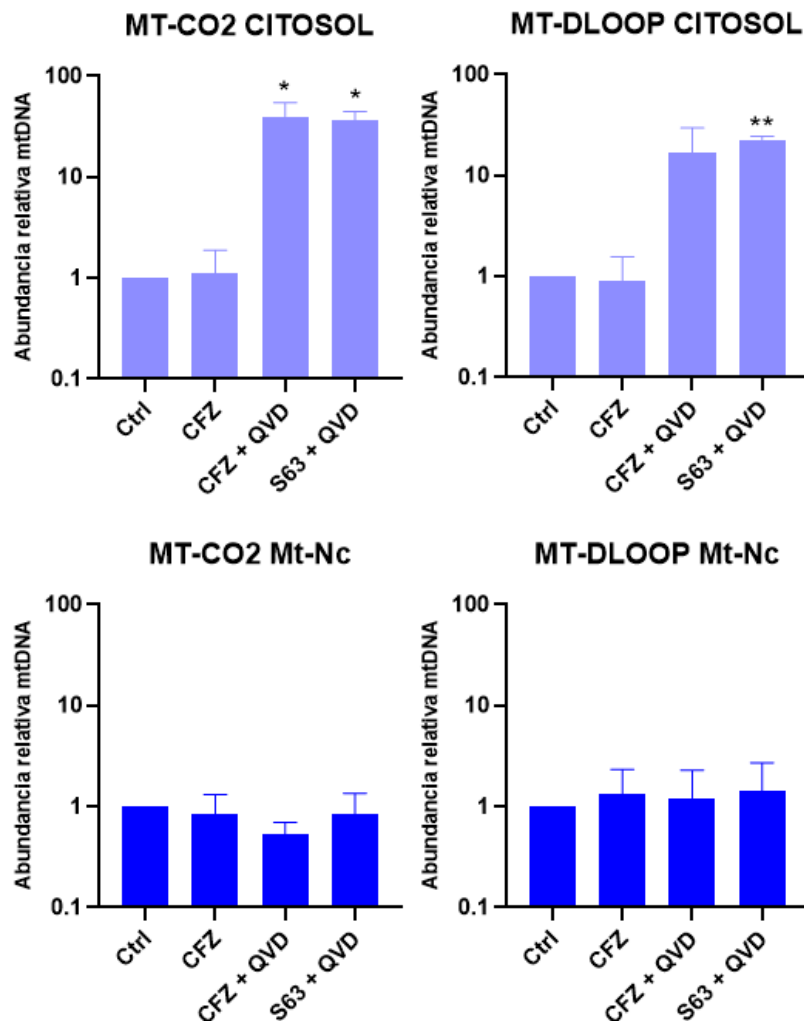
Muestra	Concentración DNA (ng/ $\mu$ L)			Coeficiente absorbancia 260/280		
	Extr. I	Extr. II	Extr. III	Extr. I	Extr. II	Extr. III
H929 citosólico Ctrl	28.7	78.50	-	2.11	2.02	-
H929 citosólico CFZ	29.2	65.25	-	2.20	2.00	-
H929 citosólico CFR+QVD	41.2	81.50	-	2.10	2.01	-

Muestra	Concentración DNA (ng/ $\mu$ L)			Coeficiente absorbancia 260/280		
	Extr. I	Extr. II	Extr. III	Extr. I	Extr. II	Extr. III
H929 citosólico S63+QVD	38.9	72.50	-	2.14	1.87	-
H929 Mt-Nc Ctrl	36.6	154.50	-	2.07	1.99	-
H929 Mt-Nc CFZ	49.1	105.75	-	2.09	1.98	-
H929 Mt-Nc CFR+QVD	54.6	122.50	-	2.11	1.94	-
H929 Mt-Nc S63+QVD	29.8	118.00	-	2.10	1.95	-
KMS34 citosólico Ctrl	159.75	188.00	39.25	2.20	2.19	2.29
KMS34 citosólico CFZ	171.00	139.25	57.00	2.17	2.18	2.09
KMS34 citosólico CFR+QVD	176.50	124.00	41.25	2.19	2.24	2.11
KMS34 citosólico S63+QVD	159.50	104.50	39.75	2.21	2.26	2.15
KMS34 Mt-Nc Ctrl	248.50	149.75	172.50	2.00	2.07	1.97
KMS34 Mt-Nc CFZ	162.75	125.00	176.50	2.02	2.08	1.97
KMS34 Mt-Nc CFR+QVD	169.75	133.00	149.75	1.99	2.07	2.02
KMS34 Mt-Nc S63+QVD	183.00	140.50	129.25	2.03	2.03	2.02
RPMI citosólico Ctrl	69.8	149.25	177.50	1.88	2.05	2.01
RPMI citosólico CFZ	92.8	143.25	212.25	1.83	2.05	2.12
RPMI citosólico CFR+QVD	49.8	121.00	224.00	1.90	2.12	2.20
RPMI citosólico S63+QVD	61.7	103.50	217.25	1.89	2.13	2.18
RPMI Mt-Nc Ctrl	39.9	164.50	210.75	1.94	2.04	2.06
RPMI Mt-Nc CFZ	42.6	173.75	245.00	1.89	2.05	2.04
RPMI Mt-Nc CFR+QVD	46.1	203.75	265.50	1.97	2.05	2.04
RPMI Mt-Nc S63+QVD	42.8	184.50	218.75	2.00	2.02	2.05

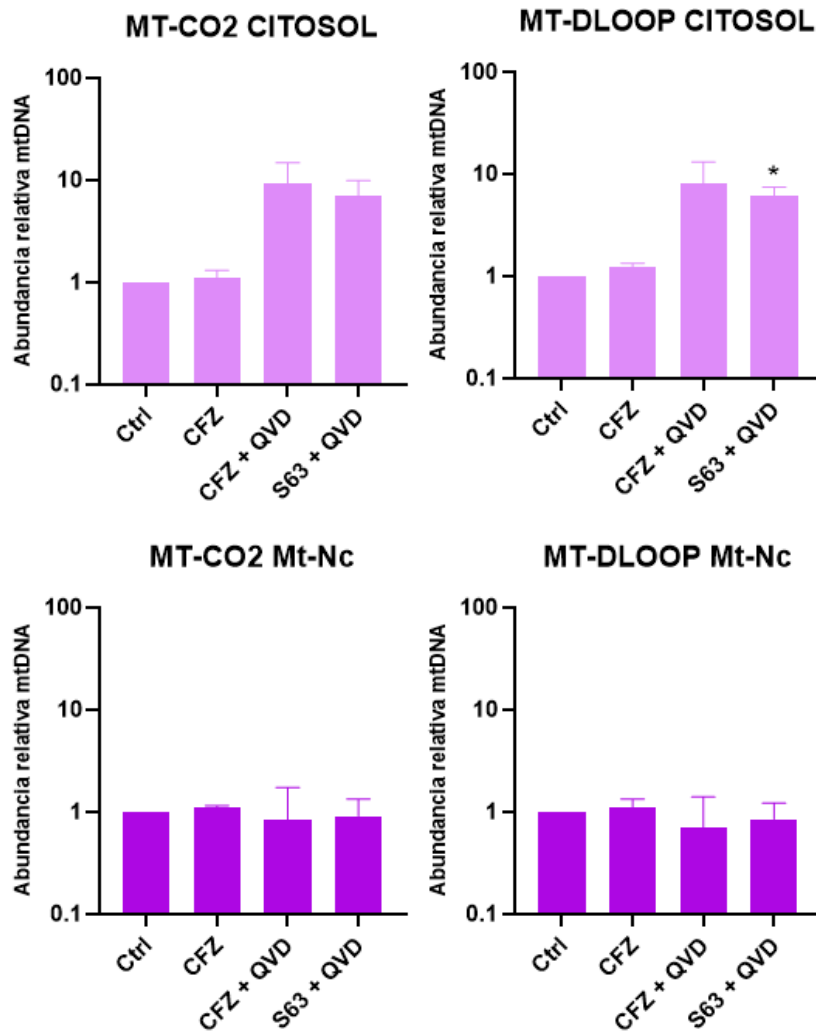
Una vez realizada la qPCR se calculó el nivel relativo de MT-CO2 y MT-DLOOP en la fracción citosólica y Mt-Nc en KMS34 (Figura 15), H929 (Figura 16) y RPMI (Figura 17). Para ello, primero se calcularon los  $\Delta$ Ct de MT-CO2 y MT-DLOOP respecto a  $\beta$ -globina, gen nuclear utilizado como *housekeeping*, para normalizar las medidas y, posteriormente, se calcularon los

$\Delta\Delta Ct$  restando el valor de  $\Delta Ct$  del control al  $\Delta Ct$  de los respectivos tratamientos. Finalmente se calculó el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para obtener el nivel de expresión relativo de MT-CO2 y M-DLOOP respecto al control en las distintas condiciones de ensayo, obteniéndose resultados similares para las 3 líneas celulares. Los datos al completo se pueden consultar en el Anexo 2, tabla S1.

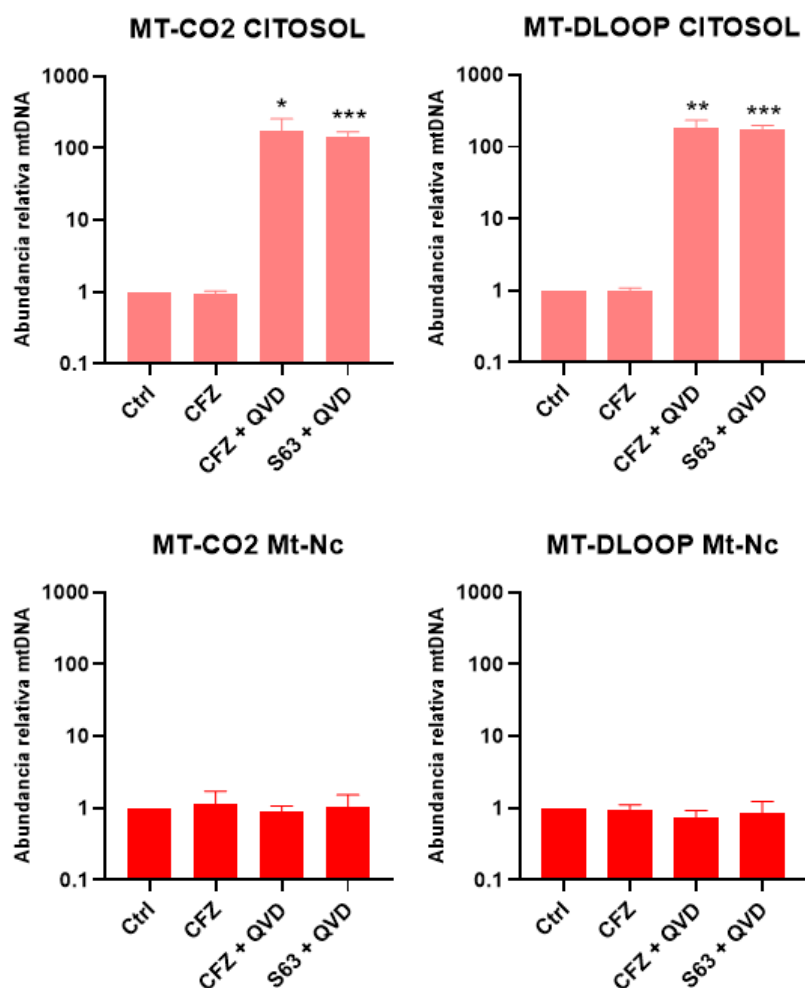
En la fracción Mt-Nc el nivel de mtDNA se mantiene estable en todos los tratamientos, mientras que en la fracción citosólica el carfilzomib no altera los niveles del mtDNA, sin embargo, la combinación de QVD-POH con S63845 o carfilzomib provoca un aumento del mtDNA en el citosol, detectándose por igual al amplificar MT-CO2 y MT-DOOP. Las 3 líneas no se ven afectadas por igual, observándose un aumento leve del mtDNA en H929 y KMS34, aumentando 5 y 20 veces, respectivamente, y un aumento mayor en RPMI8226, llegando a alcanzar un aumento de 200 veces respecto al control.



**Figura 15.** Representación de la abundancia relativa de MT-CO2 (columna izquierda) y MT-DLOOP (columna derecha) en la fracción citosólica (fila superior) y Mt-Nc (fila inferior) en la línea celular KMS34 tras el tratamiento con QVD-POH (QVD) en combinación con carfilzomib (CFZ) o S63845 (S63), o carfilzomib o diABZI en monoterapia. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de la abundancia relativa del mtDNA correspondiente, normalizado respecto al control, de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en el control (Ctrl). \* $p \leq 0.05$  \*\* $p \leq 0.01$  \*\*\* $p \leq 0.001$



**Figura 16.** Representación de la abundancia relativa de MT-CO2 (columna izquierda) y MT-DLOOP (columna derecha) en la fracción citosólica (fila superior) y Mt-Nc (fila inferior) en la línea celular H929 tras el tratamiento con QVD-POH (QVD) en combinación con carfilzomib (CFZ) o S63845 (S63), o carfilzomib o diABZI en monoterapia. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de la abundancia relativa del mtDNA correspondiente, normalizado respecto al control, de al menos 2 experimentos independientes. La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en el control (Ctrl). \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$



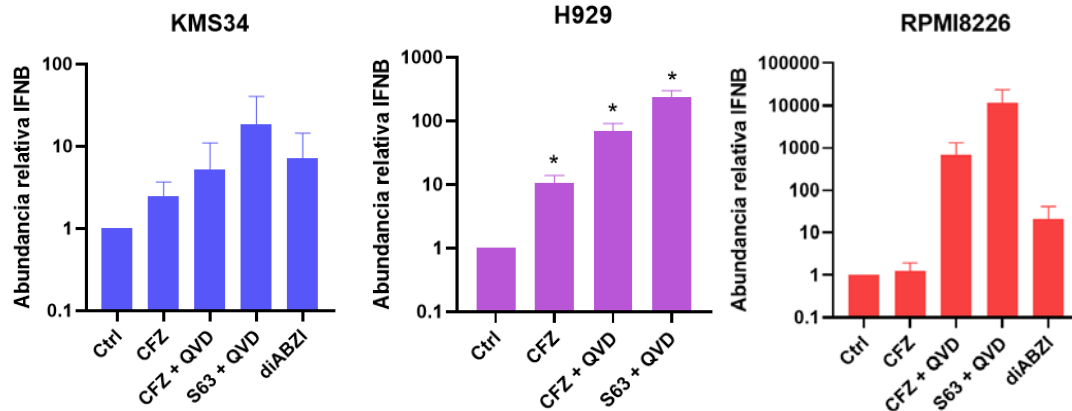
**Figura 17.** Representación de la abundancia relativa de MT-CO2 (columna izquierda) y MT-DLOOP (columna derecha) en la fracción citosólica (fila superior) y Mt-Nc (fila inferior) en la línea celular RPMI8226 tras el tratamiento con QVD-POH (QVD) en combinación con carfilzomib (CFZ) o S63845 (S63), o carfilzomib o diABZI en monoterapia. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de la abundancia relativa del mtDNA correspondiente, normalizado respecto al control, de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en el control (Ctrl). \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$

### 5.3.3. Respuesta IFN tipo I

Las muestras de RNA extraídas se retrotranscribieron a cDNA siguiendo el protocolo recogido en el apartado 4.7. Posteriormente se realizó la qPCR y se analizaron los resultados obtenidos de forma análoga a como se ha explicado en el apartado anterior, calculando finalmente el nivel de abundancia de IFN  $\beta$  (Figura 18). En este caso en vez de usar un único gen *housekeeping* se utilizaron 3 (YWHAZ, UBC y HPRT) realizándose el promedio de la  $\Delta$ Ct del IFN  $\beta$  respecto a estos genes. Se muestran todos los resultados obtenidos en el Anexo 2, tabla S2.

Al igual que en el caso anterior, la combinación de QVD-POH con S63845 o carfilzomib provoca un efecto similar en las 3 líneas celulares, aumentando la expresión de IFN  $\beta$ , siendo de nuevo este efecto especialmente destacable en la línea celular RPMI8226, donde la expresión de IFN  $\beta$  es 11000 veces mayor a la observada en el control. Respecto a KMS34 y H929, se observó que el aumento de expresión de IFN  $\beta$  era claramente mayor en H929.

El carfilzomib en monoterapia no tuvo ningún efecto en KMS34 y RPMI8226, sin embargo, sí que aumentaba ligeramente la expresión de IFN  $\beta$  en H929. Mientras que diABZI también aumentaba la expresión de IFN  $\beta$  en KMS34 y RPMI8226, pero en menor medida que las combinaciones comentadas anteriormente.



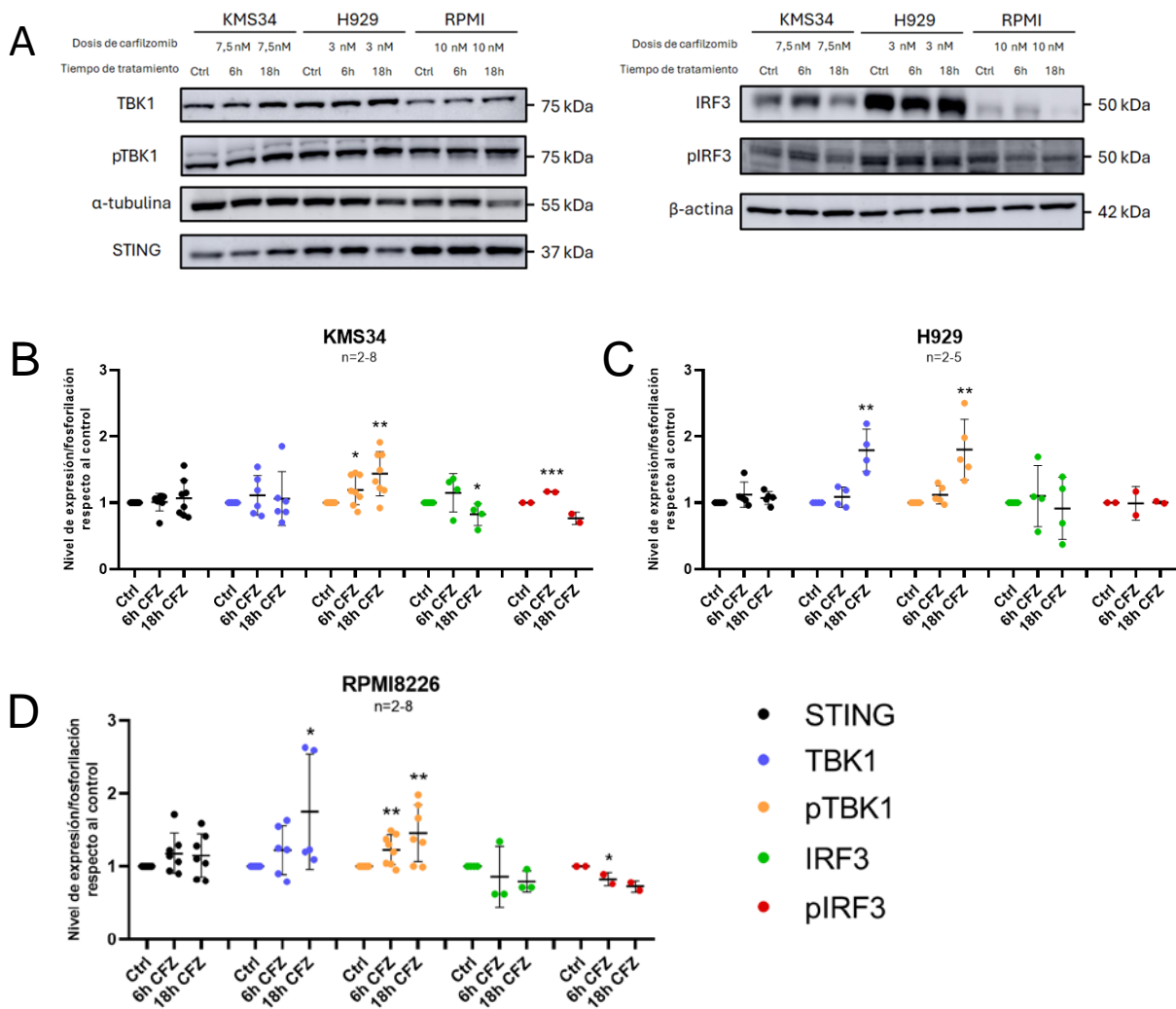
**Figura 18.** Representación de la abundancia relativa de IFN  $\beta$  tras el tratamiento de la combinación QVD-POH (QVD) en combinación de carfilzomib (CFZ) o S63845 (S63), o carfilzomib o diABZI en monoterapia para KMS34 (izquierda), H929 (centro) o RPMI8226 (derecha). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de la abundancia relativa de IFN  $\beta$ , normalizado respecto al control, de al menos 2 experimentos independientes. La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en el control (Ctrl). \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$

#### 5.3.4. Cuantificación de la expresión y fosforilación de las proteínas partícipes en la vía cGAS/STING

Se comparó el nivel de expresión de STING, IRF3 y TBK1, y de fosforilación de IRF3 en Ser385 y de TBK1 en Ser172 tras el tratamiento con carfilzomib durante 6 o 18 horas en las 3 líneas celulares (Figura 19).

Respecto al nivel de expresión de STING no se detectó ningún cambio tras el tratamiento con carfilzomib en las 3 líneas celulares, manteniéndose su expresión estable. Aunque IRF3 también se mantiene estable tras 6 horas de tratamiento, a las 18 horas se ha detectado que disminuye ligeramente en las 3 líneas celulares, llegando a ser significativo en KMS34. Por lo contrario, la expresión de TBK1 aumenta tras la exposición a carfilzomib durante 18 horas, especialmente en H929.

La fosforilación de IRF3 y TBK1 también se ve afectada. Tanto a las 6 horas como a las 18 horas se ha detectado un aumento de pTBK1, a las 6 horas solo en KMS34 y RPMI8226 y las 18 horas también de H929. El nivel de fosforilación de IRF3 se mantiene por lo general estable, tan solo aumentando en KMS34 a las 6 horas, volviendo a disminuir a las 18 horas. También se detectó un descenso de la fosforilación de IRF3 a las 6 horas en RPMI8226.



**Figura 19.** Análisis de la expresión de STING, TBK1 e IRF3, y de la fosforilación de IRF3 en Ser385 y TBK1 en Ser172 mediante *western blot* en las líneas celulares KMS34, H929 y RPMI8226 tratadas con 7.5 nM, 3 nM y 10 nM, respectivamente, de carfilzomib durante 6 o 18 horas. (A) Inmunoblots de las proteínas de interés junto a la  $\beta$ -actina y  $\alpha$ -tubulina, usadas como control de carga. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SD del nivel de expresión/fosforilación de TBK1, pTBK1, STING, IRF3 y pIRF3 de entre 2 a 8 experimentos independientes, mostrando el valor de cada réplica para KMS34 (B), H929 (C) o RPMI (D). La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en el control respectivo (Ctrl). \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$

## 6. Discusión

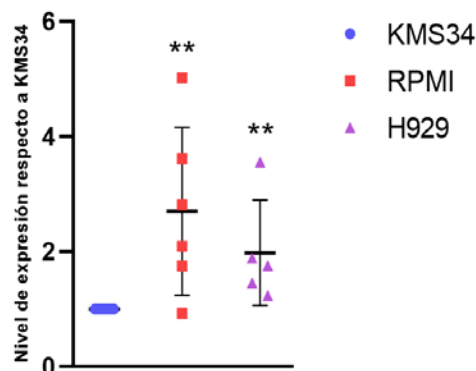
### 6.1. Efecto de los agonistas de STING en el mieloma múltiple

La detección de fármacos que inducen ICD es un campo de investigación muy importante hoy en día, ya que el aumento de la inmunogenicidad de los tumores puede potencialmente mejorar el efecto de la inmunoterapia. En la actualidad se han descrito muchos mecanismos de ICD, entre ellos la producción de una respuesta inflamatoria. Esta se puede llegar a alcanzar mediante varias vías de señalización, como puede ser cGAS/STING, por lo que podría convertirse en un enfoque clave para transformar tumores inmunológicamente "fríos" en "calientes", mejorando las inmunoterapias [57]. Ya existen una gran variedad de fármacos, llamados agonistas de STING, para inducir su activación, los cuales, aparte de inducir la respuesta inflamatoria y favorecer que se genere una respuesta inmune, también presentan un efecto citotóxico, el cual estudiamos en el presente trabajo.

En un principio se esperaba que la sensibilidad de las líneas celulares a los agonistas de STING dependiera del nivel de expresión de STING, siendo más sensibles aquellas células donde se expresara más, tal y como se había observado en otros estudios [50]. Los resultados obtenidos con el uso de diABZI en monoterapia, tanto en el estudio de la inhibición del crecimiento (Figura 9), como en su efecto citotóxico (Figura 10), demostraron que la línea celular más sensible es H929, seguida de RPMI8226 y finalmente KMS34, donde no se observó un efecto destacable. Sin embargo, fijándonos en el nivel de expresión basal de STING (Figura 20), se esperaría que RPMI8226 fuese la más sensible seguida de H929, concluyendo, por tanto, que el nivel de expresión de STING no es el único factor que determina la sensibilidad al uso de agonistas de STING.

Viendo las distintas poblaciones de células muertas tras el tratamiento con diABZI se puede intuir el tipo de muerte celular que han sufrido las células. En KMS34 y RPMI la población doble positiva es representativa de células que han sufrido la apoptosis. Inicialmente son solo anexina-FITC +, y en condiciones fisiológicas serían eliminadas por células fagocíticas. Dado que en el cultivo celular no hay células fagocíticas, la muerte acaba derivando en una necrosis secundaria, en la que se permeabiliza la membrana y las células terminan siendo doble positivas. En H929 la mayoría de las células han sufrido una muerte similar que en KMS34 y RPMI8226, pero también se ha detectado un aumento de la población 7-AAD +, la cual se asocia con muertes relacionadas con la inflamación, como necrosis primaria, necroptosis, piroptosis..., sugiriendo que el tratamiento con diABZI en H929 ya podría generar un efecto inmunoestimulador.

#### Comparación expresión basal de STING



**Figura 20.** Análisis de la expresión de STING basal respecto a KMS34. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SD del nivel de expresión 8 experimentos independientes, mostrando el valor de cada réplica. La significancia estadística representa aquellos valores en los que el nivel de mtDNA fue mayor que en KMS34. \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$

Una de las diferencias más destacables entre las líneas H929, KMS34 y RPMI8226 es el estado de p53, estando mutado en estas dos últimas líneas celulares [58–60]. Como se ha comentado anteriormente, la inducción de apoptosis mediante la vía cGAS/STING es debida a la inducción de expresión de proteínas pro-apoptóticas. Se ha descrito que el aumento de la expresión de estas proteínas en linfocitos T es dependiente de IRF3, responsable del aumento notable de IFN tipo I y noxa, y de p53, que regula la expresión de Puma [49]. En el propio estudio se demostró el mismo efecto en linfomas de células T y los autores ya propusieron que este efecto podría reproducirse en otros tipos de cáncer hematológico [49]. De hecho, si comparamos la sensibilidad a diABZI con la sensibilidad a S63845 [34] (Anexo 1) se observa el mismo patrón, sugiriendo una relación directa entre el uso de agonistas de STING y la inducción de expresión de proteínas solo-BH3. De igual forma, se ha descrito que algunos fármacos pueden generar necrosis primaria dependiente de p53, apoyando la hipótesis de que p53 es la responsable del efecto diferencial en H929 respecto a KMS34 y RPMI8226 [61].

En otros estudios también se ha reportado que el estado de p53 tiene un efecto directo en la activación o inhibición de la vía cGAS/STING, habiéndose observado que p53 *wild type* es necesario para una correcta activación de la vía, produciéndose una disminución de su activación al silenciarlo genéticamente [62]. Incluso se ha llegado a observar en diversas líneas celulares que p53 mutado puede llegar a inhibirla, interaccionando con TBK1 y evitando que interaccione con STING, e impidiendo la translocación de IRF3 al núcleo [63].

Es posible que el efecto observado con diABZI pueda ser debido a la actividad de p53. La confirmación de dicha hipótesis requiere la realización de más estudios, como podría ser medir el nivel de proteínas solo-BH3 o realizar una dosis respuesta con una línea celular *knock-down/knock-out* de p53 y su respectivo *wild type*.

## **6.2. Combinación de agonistas de STING con miméticos de BH3.**

A pesar de la gran relación entre la vía cGAS/STING y las proteínas solo-BH3, y que se haya observado en otros estudios el efecto sinérgico de la combinación de agonistas de STING junto a miméticos de BH3 [50], en el presente trabajo no se ha observado dicho efecto (Figura 12). La combinación de ambos fármacos sí que presenta un mayor efecto citotóxico al aumentar la muerte celular respecto a su administración en monoterapia en las 3 líneas (Figura 11). Sin embargo, al calcular la muerte celular específica EXP y OBS no se ve una diferencia significativa entre ambas, determinando que su combinación presenta un efecto aditivo y no sinérgico. Estos resultados nos podrían estar indicando que el efecto de la combinación de ambos fármacos puede depender del tipo de tumor, habiéndose descrito un efecto sinérgico al tratar líneas celulares de ENKT [50], y aditivo en MM.

Este hecho es especialmente claro en el caso de RPMI8226 y KMS34, mientras que para H929 no se puede discernir si su efecto es aditivo o sinérgico. Para esta línea celular tan solo se realizaron 2 réplicas en este experimento. En una de ellas se obtuvo una muerte celular específica OBS similar, incluso ligeramente menor, que la EXP, mientras que en la segunda réplica se observó una muerte celular OBS un 20% mayor que la EXP, superando el 10% establecido para determinar que la combinación haya tenido un efecto sinérgico. La explicación para la diferencia observada entre ambas réplicas posiblemente sea el estado inicial de las células, presentando una alta muerte celular inicial (22.5%) en la primera réplica. De todas

formas, sería necesario realizar más réplicas para poder determinar cómo afecta la combinación a las células H929 y, en el caso de que se terminase observado un efecto sinérgico, sería interesante, al igual que se ha explicado en el apartado anterior, estudiar el papel e implicación de p53.

Fijándonos detalladamente en el trabajo en el que se observó el efecto sinérgico de agonistas de STING y los miméticos de BH3, al combinar S63845 junto a diferentes agonistas de STING en linfomas de célula B de ratones, obtienen resultados similares a los observados en este trabajo, aumentando la citotoxicidad en la combinación sin alcanzar un muy superior que al obtenido en monoterapia. Por el contrario, cuando combinan A-1331852, mimético de BH3 con afinidad a Bcl-XL, junto a los agonistas de STING en líneas celulares de ENKT con mutaciones en p53, sí que se observaba un efecto sinérgico. Esta diferencia según la diana del mimético de BH3 usada puede ser debida al cambio transcripcional que producen los agonistas de STING, produciendo especialmente la sobreexpresión de la proteína solo-BH3 noxa y de IFN  $\beta$ . Noxa se une preferentemente a Mcl-1 [64], por ende, al combinar S63845 junto a diABZI el efecto citotóxico observado se generaría preferentemente mediante la inhibición de Mcl-1, mientras que en la combinación con A-1331852 se estaría induciendo la apoptosis inhibiendo simultáneamente a Bcl-XL y Mcl-1. El uso de miméticos de BH3 con diferente diana ya está ampliamente estudiado, concluyendo que su combinación tiene un potente efecto sinérgico en diversos tipos de cáncer como en leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple [65–67], pero al iniciar los experimentos *in vivo* en ratones se detectó una alta toxicidad hepática, imposibilitando su uso en clínica [66]. Por lo tanto, la combinación de agonistas de STING junto a A-1331852 podría tener el mismo mecanismo de acción, pero con un perfil menos tóxico, posibilitando su uso para el tratamiento de pacientes.

### **6.3. Liberación del mtDNA**

En primer lugar, se realizó la determinación de la liberación del mtDNA tras el tratamiento con carfilzomib, con y sin un pretratamiento con QVD-POH. Como control positivo se trataron con S63845 junto al pretratamiento con QVD-POH, tratamiento con el que se ha descrito la liberación de mtDNA y posterior activación de cGAS/STING [50].

Inicialmente se esperaba que los valores del DNA extraídos de la fracción citosólica fuesen menores que los de la fracción Mt-Nc, dado que esta última contiene los núcleos y mitocondrias, orgánulos en los que se ubica la mayoría del DNA en las células. Sin embargo, en todas las extracciones se han obtenido valores similares o ligeramente inferiores en la fracción citosólica respecto a la Mt-Nc (Tabla 3).

En un principio, puede pensarse que estos resultados se deben a que durante el proceso de fraccionamiento se haya permeabilizado demasiado la célula, provocando la liberación de núcleos y mitocondrias a la fracción citosólica, aumentando, por consiguiente, la cantidad de DNA en el citosol y disminuyendo la de la fracción Mt-Nc. No obstante, esta hipótesis se descarta ya que el proceso de fraccionamiento se optimizó para disminuir al máximo el tiempo en el que las células se resuspenden en el tampón digitonina, para evitar justamente su hiperpermeabilización. Para ello, se fueron probando distintas concentraciones de digitonina y distintos tiempos, comprobando cada vez la permeabilización de las células mediante tinción con azul trypan.

También existe la posibilidad de que, tras el aislamiento de la fracción citosólica, al realizar los tres lavados del pellet restante con PBS, al estar las células ya permeabilizadas se pierda parte de su contenido. Para verificarlo se podría guardar el PBS utilizado para realizar los lavados, aislar el DNA de estas muestras y cuantificar, e incluso llegar a realizar una PCR a punto final. Estos lavados son necesarios para eliminar cualquier resto de digitonina que pudiera interferir en la extracción del DNA. En caso de que se verificará la pérdida del material genético durante los lavados, se podría plantear el uso de otro detergente para permeabilizar la membrana que no interfiera con la extracción de DNA y no fuera necesario realizar los lavados. De todas formas, esto no tiene un efecto directo en las fracciones citosólicas en las que queremos evaluar la liberación de mtDNA.

Como se ha podido observar en las figuras 15, 16 y 17, tras calcular la cantidad relativa de MT-CO2 y MT-DLOOP respecto a la  $\beta$ -globina, los niveles de ambos genes del genoma mitocondrial se mantienen estables en las fracciones Mt-Nc en las 3 líneas celulares y en todas las condiciones. De igual forma, el tratamiento con carfilzomib tampoco altera el nivel de mtDNA en la fracción citosólica, mientras que el uso de carfilzomib y S63845 (control positivo), pretratando las células con QVD-POH, genera un aumento de la expresión de ambos genes en la fracción citosólica, demostrando la liberación de mtDNA en el citoplasma. Cabe destacar que este aumento del mtDNA en el citoplasma no se da por igual en las 3 líneas celulares, siendo especialmente acentuado en RPMI8226. Entre KMS34 y H929, el efecto es ligeramente mayor en KMS34 respecto H929. Estos resultados sugieren una relación directa entre la actividad de las caspasas y la liberación del mtDNA.

El tratamiento con carfilzomib tiene un efecto directo en la mitocondria causando un descenso del potencial de membrana mitocondrial, producción de ATP y un aumento del estrés oxidativo [68,69]. Este efecto puede ser causado por la acumulación de proteínas mal plegadas o aberrantes y, por consiguiente, un estrés del retículo endoplasmático y UPR [70] el cual se ha descrito que puede generar la permeabilización de la mitocondria y liberación de mtDNA y proteínas apoptóticas, como citocromo C y SMAC/DIABLO [71]. Al liberarse el citocromo C se induciría la apoptosis rápidamente, provocando la muerte de las células e impidiendo la acumulación de mtDNA en el citosol. Al ser tratadas con el inhibidor de caspasas QVD-POH, a pesar de liberarse citocromo C, la muerte celular se ralentizaría y permitiría la acumulación de mtDNA en el citosol. De hecho, en estudios previos realizados en el laboratorio, se ha estudiado la dependencia de las diferentes líneas celulares a las caspasas al morir, determinando una alta dependencia de RPMI8226, a diferencia de KMS34, que presentaba una leve dependencia a ellas y de H929, en las que su inhibición no tenía ningún efecto. Estos resultados también corroborarían la hipótesis propuesta, habiéndose detectado un mayor aumento del mtDNA en las líneas que presentan una mayor dependencia a las caspasas, y por ende morirían menos al ser inhibidas mediante QVD-POH.

Respecto a los resultados obtenidos en las qPCRs de mtDNA, ha llamado la atención que, en las fracciones citosólicas, se ha observado en las muestras control y en las tratadas con carfilzomib el Ct del gen de  $\beta$ -globina en torno al ciclo 24, mientras que en las muestras pretratadas con QVD-POH se retrasa hasta el ciclo 33 (Anexo 2). Estos resultados son reproducibles en todas las réplicas y líneas celulares, a excepción de una réplica de KMS34, la cual se ha descartado al considerar que los resultados obtenidos no son representativos debido

a la alta muerte celular del cultivo (45%). La diferencia entre los Ct puede deberse a varios factores. Por un lado, en la literatura [72] se comenta que Ct inferiores a 30 en las fracciones citosólicas indicarían contaminación por DNA nuclear. En nuestro caso, esta hipótesis se descartaría, ya que se ha observado el mismo patrón en todas las líneas celulares de forma reproducible y, como se ha comentado anteriormente, se ha optimizado el protocolo para evitar estos problemas.

Por otro lado, dado que todas las muestras han presentado una pureza baja y posible contaminación con RNA, se podría haber sobreestimado la cantidad de DNA y, en consecuencia, haber usado una cantidad menor de DNA en las qPCR. Como el Ct tan solo se retrasa en las muestras pretratadas con QVD-POH, el uso de este fármaco podría alterar la cantidad de RNA en el citosol, provocando que estas muestras tengan una menor cantidad de DNA real. Por consiguiente, se habría introducido una menor cantidad de DNA en las qPCRs, explicando el retraso observado en el Ct. Para determinar si esta hipótesis es cierta se podría tratar la muestra con RNAsa y volver a cuantificar el DNA, para compararlo con los valores obtenidos previamente.

#### **6.4. Producción de IFN $\beta$ tras el tratamiento con carfilzomib**

Al estudiar la producción de IFN  $\beta$  tras el tratamiento con carfilzomib en KMS34 y RPMI8226 (Figura 18) se han obtenido resultados acordes a los obtenidos en la liberación de mtDNA, produciéndose solo IFN  $\beta$  con los mismos tratamientos en los que se había detectado previamente la liberación del mtDNA (Figuras 15 y 17), es decir, carfilzomib o S63845 junto al pretratamiento de QVD-POH. De igual forma, se ha observado una mayor producción de IFN  $\beta$  en RPMI, como era de esperar dada la mayor liberación de mtDNA en el citosol, mostrando de nuevo la correlación e incompatibilidad de la vía cGAS/STING con una muerte dependiente de caspasas.

Sorprendentemente, en H929 también se ha detectado una leve producción de IFN  $\beta$  tras la exposición a carfilzomib en monoterapia (Figura 18) a pesar de que no se hubiera detectado mtDNA en el citosol (Figura 16). Dado que los experimentos de detección de mtDNA se realizaron a 4 horas y los de IFN  $\beta$  a 24 horas, podría ser que la liberación de mtDNA que induce la activación de cGAS/STING se produzca a tiempos largos. Aunque también se ha observado una producción superior a KMS34 al pretratar con QVD-POH, a pesar de haberse detectado una menor liberación de mtDNA al citosol. Este hallazgo sugiere que la producción de IFN  $\beta$  podría no deberse únicamente a la activación de cGAS/STING en H929. Se ha descrito que IRF3 también se puede fosforilar y activar por IKK $\epsilon$ , una quinasa que se activa mediante el TLR3 [73,74]. Para determinar el papel de ambas vías y cuál es realmente la responsable serían necesarios más estudios, como la extracción de DNA y cuantificación de mtDNA en incubaciones más largas.

#### **6.5. Cuantificación de la expresión y fosforilación de las proteínas partícipes en cGAS/STING**

Finalmente se decidió determinar el efecto de carfilzomib en la vía cGAS/STING estudiando cambios en la expresión o fosforilación de las proteínas partícipes. Como se ha podido observar en las figuras 19 B, C y D, la expresión de STING e IRF3 se mantuvo estable en las 3 líneas celulares tras la exposición a carfilzomib. Sin embargo, la expresión de TBK1 aumentaba en RPMI8226 y H929. El nivel de fosforilación de IRF3 y TBK1 nos servirá como indicador para determinar si la

vía cGAS/STING se activaría o no. Tal y como se muestra en la figura 19 B, C y D, se ha detectado un aumento de fosforilación de TBK1, sin embargo, no se ha observado un aumento de fosforilación de IRF3. Consideramos que los resultados obtenidos para la fosforilación de IRF3 no son fiables, debido a que al realizar los *westerns blots* el anticuerpo usado mostró una especificidad menor que la esperada (Anexo 3), siendo incapaces de verificar que la banda de proteína usada para la cuantificación corresponda realmente de la fosforilación de IRF3, por lo que se debería de comprobar con otro anticuerpo distinto.

El aumento de fosforilación en TBK1 nos estaría indicando la activación de la vía cGAS/STING. Sin embargo, al igual que en el apartado anterior, dado que no se ha detectado liberación de mtDNA (Figura 15, 16 y 17) la fosforilación observada podría ser debida a la acción de otras quinasas, como IKK $\epsilon$ . Como ya se ha comentado, esta quinasa se activa principalmente mediante el TLR3. El papel de esta vía en el mieloma múltiple es complejo, habiéndose descrito casos en los que favorece su progresión y otros en los que induce apoptosis y muerte celular. La vía se activa tras la unión a TLR de dsRNA, el cual se ha documentado que lo liberan células tras la necrosis [73]. A efectos prácticos se generaría una respuesta similar desde el punto de vista inmunológico, ya que ambas vías convergen en TBK1 y se concluiría produciendo una respuesta de IFN tipo I y la ICD.

Paradójicamente, a pesar de detectarse la fosforilación de TBK1, no se termina observando la producción de IFN  $\beta$  en KMS34 y RPMI8226, o se ha producido una leve cantidad como en H929. Una vez más podría deberse a la actividad de las caspasas. Tras la permeabilización de las mitocondrias se podría activar cGAS/STING y fosforilar a TBK1, pero no se llegaría a expresar IFN  $\beta$  dado que antes se iniciaría la muerte celular mediante apoptosis, la cual tras la activación de las caspasas produce la muerte celular en 1-2 horas [75]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los 3 experimentos, se podría concluir que carfilzomib puede inducir ICD mediante cGAS/STING en MM, pero sería necesaria la inhibición farmacológica o baja dependencia de las caspasas. Para la liberación del mtDNA es necesaria la permeabilización de las mitocondrias, que inducirá la activación de la apoptosis. Una de las principales características de la muerte celular programada es la muerte “silenciosa” sin activación del sistema inmune y durante la apoptosis las caspasas “silencian” la vía cGAS/STING para asegurar una muerte no inmunogénica. Este hecho se había descrito y observado en diferentes estudios [50,76,77].

La muerte celular inmunogénica (ICD) en el mieloma múltiple representa un enfoque prometedor para potenciar las terapias inmunológicas. Es esencial un conocimiento detallado de los mecanismos por los que se induce y la caracterización de los fármacos que la inducen. En este estudio se ha demostrado que carfilzomib es capaz de inducir la producción de IFN  $\beta$  en células con una muerte no dependiente de caspasas, pero el mecanismo por el que lo hacen aún no está claro, pudiendo ser mediante cGAS/STING o TLR3. Un mismo fármaco puede inducir diferentes tipos de ICD, por lo que también podría ser causado por ambas vías. De hecho, en investigaciones anteriores del grupo ya se había caracterizado que carfilzomib induce la exposición de calreticulina en la membrana plasmática del MM [78].

El hecho de que carfilzomib tenga la capacidad de inducir la expresión de IFN  $\beta$  potencialmente mediante la activación de cGAS/STING podría contribuir a su eficacia en el tratamiento del MM, siendo la sensibilidad o resistencia observada causada por alteraciones que modifiquen la actividad de la vía cGAS/STING, como podrían ser las mutaciones en p53.

Además, como ya se ha comentado inicialmente en la introducción, el mieloma múltiple es una enfermedad heterogénea y con un microambiente muy complejo y variado, pudiendo determinar también la sensibilidad al ser un microambiente más, o menos, inmunosupresor [38]. Y no solo eso, sino que la activación del sistema inmune puede tener tanto efectos beneficiosos como perjudiciales. Se han detectado linfocitos T reguladores que disminuyen la expresión de MHC I en MM mediante la inhibición de cGAS/STING, favoreciendo el escape al sistema inmune. Este efecto se revierte al activarse cGAS/STING mediante sus agonistas [79]. En otros estudios se ha detectado la liberación de mtDNA por parte del MM al microambiente, provocando la activación de la vía cGAS/STING en las células circundantes, como macrófagos, en este caso favoreciendo la progresión de la enfermedad y asociándose a un peor pronóstico [80]. Sería necesario más estudios *in vivo* para elucidar si realmente la activación de cGAS/STING tendría un efecto beneficioso, tanto en monoterapia como en combinación, debido en parte al papel dual del sistema inmune en el cáncer [81].

## 7. Conclusiones/Conclusions

Tras el análisis de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El uso de agonistas de STING como diABZI presenta un efecto citotóxico en el mieloma múltiple, especialmente en células que expresan p53 *wild type*.
- La combinación de diABZI junto a S63845 presenta un mayor efecto citotóxico que ambos tratamientos en monoterapia, siendo un efecto aditivo.
- Carfilzomib y S63845 parecen inducir la liberación de mtDNA cuando las caspasas están inhibidas.
- Carfilzomib y el inhibidor de Mcl-1 inducen ICD mediante la producción de IFN  $\beta$  en células con una muerte no dependiente de caspasas o inhibición farmacológica de las caspasas.

After analysing the obtained results, the following conclusions can be drawn:

- The use of STING agonists such as diABZI exerts a cytotoxic effect on multiple myeloma, particularly in cells expressing wild-type p53.
- The combination of diABZI with S63845 exhibits a greater cytotoxic effect than either treatment alone, showing an additive effect.
- Carfilzomib and S63845 appear to induce the release of mtDNA when caspases are inhibited.
- Carfilzomib and the Mcl-1 inhibitor induce ICD through IFN- $\beta$  production in cells undergoing caspase-independent death or when caspases are pharmacologically inhibited.

## 8. Bibliografía

- [1] Huang J, Chan SC, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, Xu W, et al. The epidemiological landscape of multiple myeloma: a global cancer registry estimate of disease burden, risk factors, and temporal trends. *Lancet Haematol* 2022;9:e670–7. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(22\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(22)00165-X).
- [2] Malard F, Neri P, Bahlis NJ, Terpos E, Moukalled N, Hungria VTM, et al. Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers* 2024 10:1 2024;10:1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00529-7>.
- [3] Ho M, Patel A, Goh CY, Moscvin M, Zhang L, Bianchi G. Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Leukemia* 2020;34:3111–25. <https://doi.org/10.1038/S41375-020-01051-X>.
- [4] Salomon-Perzyński A, Jamroziak K, Głodkowska-Mrówka E. Clonal Evolution of Multiple Myeloma—Clinical and Diagnostic Implications. *Diagnostics* 2021;11:1534. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS11091534>.
- [5] Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 1980;302:1347–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM198006123022405>.
- [6] Yamamoto L, Amodio N, Gulla A, Anderson KC. Harnessing the Immune System Against Multiple Myeloma: Challenges and Opportunities. *Front Oncol* 2021;10:606368. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.606368>.
- [7] Gulla A, Anderson KC. Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into the future. *Haematologica* 2020;105:2358. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2020.247015>.
- [8] Elbezanti WO, Challagundla KB, Jonnalagadda SC, Budak-Alpdogan T, Pandey MK. Past, Present, and a Glance into the Future of Multiple Myeloma Treatment. *Pharmaceuticals* 2023;16:415. <https://doi.org/10.3390/PH16030415>.
- [9] Jang HH. Regulation of Protein Degradation by Proteasomes in Cancer. *J Cancer Prev* 2018;23:153–61. <https://doi.org/10.15430/JCP.2018.23.4.153>.
- [10] Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:1015–68. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.68.1.1015>.
- [11] Zhang H, Zhou C, Mohammad Z, Zhao J. Structural basis of human 20S proteasome biogenesis. *Nature Communications* 2024 15:1 2024;15:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52513-0>.
- [12] Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem* 2018;87:697. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-062917-011931>.
- [13] Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:12. <https://doi.org/10.2183/PJAB.85.12>.

- [14] McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resistance Updates* 2008;11:164–79. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2008.08.002>.
- [15] Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer and Metastasis Reviews* 2017;36:561–84. <https://doi.org/10.1007/S10555-017-9707-8>.
- [16] Fricker LD. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2020;60:457–76. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010919-023603>.
- [17] Andreu-Vieyra C, Berenson JR. Carfilzomib in multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:1685–99. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.953050>.
- [18] Muz B, Ghazarian RN, Ou M, Luderer MJ, Kusdono HD, Azab AK. Spotlight on ixazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:217–26. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93602>.
- [19] Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM. Cell death. *Cell* 2024;187:235–56. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2023.11.044>.
- [20] Chen Y, Li X, Yang M, Liu SB. Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death. *Cell Death & Disease* 2024 15:5 2024;15:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06712-8>.
- [21] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57. <https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>.
- [22] Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817–29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8).
- [23] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [24] Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci* 2015;22:760–72. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2015.03.005>.
- [25] Balaji S, Terrero D, Tiwari AK, Ashby CR, Raman D. Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2021;126:91–122. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2021.01.005>.
- [26] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25:486. <https://doi.org/10.1038/S41418-017-0012-4>.
- [27] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:395. <https://doi.org/10.1038/S41571-020-0341-Y>.
- [28] Klener P, Sovilj D, Renesova N, Andera L. BH3 Mimetics in Hematologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 10157 2021;22:10157. <https://doi.org/10.3390/IJMS221810157>.

- [29] ¿Cuántos Tipos de Cáncer Existen? | AECC n.d. <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer> (accessed June 8, 2023).
- [30] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>.
- [31] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [32] Lasica M, Anderson MA. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *J Pers Med* 2021;11:463. <https://doi.org/10.3390/JPM11060463>.
- [33] Tantawy SI, Timofeeva N, Sarkar A, Gandhi V. Targeting MCL-1 protein to treat cancer: opportunities and challenges. *Front Oncol* 2023;13:1226289. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1226289>.
- [34] Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 2016 538:7626 2016;538:477–82. <https://doi.org/10.1038/nature19830>.
- [35] Asensi Cantó P, Arnao Herraiz M, de la Rubia Comos J. Immunotherapy in multiple myeloma. *Medicina Clínica (English Edition)* 2024;162:485–93. <https://doi.org/10.1016/J.MEDCLE.2024.05.003>.
- [36] Wang M, Wang S, Desai J, Trapani JA, Neeson PJ. Therapeutic strategies to remodel immunologically cold tumors. *Clin Transl Immunology* 2020;9. <https://doi.org/10.1002/CTI2.1226>.
- [37] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2017;17:97–111. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.107>.
- [38] Serrano-del Valle A, Anel A, Naval J, Marzo I. Immunogenic Cell Death and Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Front Cell Dev Biol* 2019;7:50. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00050>.
- [39] Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005;202:1691. <https://doi.org/10.1084/JEM.20050915>.
- [40] Krysko D V., Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:12 2012;12:860–75. <https://doi.org/10.1038/nrc3380>.
- [41] Riley JS, Tait SW. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Rep* 2020;21. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201949799>.
- [42] Guerrero-Ochoa P, Rodríguez-Zapater S, Anel A, Esteban LM, Camón-Fernández A, Espilez-Ortiz R, et al. Prostate Cancer and the Mevalonate Pathway 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25042152>.
- [43] Ma R, Ortiz Serrano TP, Davis J, Prigge AD, Ridge KM. The cGAS-STING pathway: The role of self-DNA sensing in inflammatory lung disease. *FASEB J* 2020;34:13156–70. <https://doi.org/10.1096/FJ.202001607R>.

- [44] West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 2015;520:553–7. <https://doi.org/10.1038/NATURE14156>.
- [45] Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, Li T, West AP, De Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 2014;159:1563–77. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.11.037>.
- [46] White MJ, McArthur K, Metcalf D, Lane RM, Cambier JC, Herold MJ, et al. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 2014;159:1549–62. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.11.036>.
- [47] Zhu Y, An X, Zhang X, Qiao Y, Zheng T, Li X. STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle. *Molecular Cancer* 2019 18:1 2019;18:1–15. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-1087-Y>.
- [48] Amouzegar A, Chelvanambi M, Filderman JN, Storkus WJ, Luke JJ. STING Agonists as Cancer Therapeutics. *Cancers (Basel)* 2021;13:2695. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112695>.
- [49] Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, et al. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. *Nat Commun* 2017;8:427. <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00573-W>.
- [50] Diepstraten ST, Yuan Y, La Marca JE, Young S, Chang C, Whelan L, et al. Putting the STING back into BH3-mimetic drugs for TP53-mutant blood cancers. *Cancer Cell* 2024;42:850-868.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2024.04.004/ATTACHMENT/944F5B65-66AF-4744-A1A2-202CCA6936E9/MMC1.PDF>.
- [51] Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nature Protocols* 2009 4:9 2009;4:1383–95. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.143>.
- [52] Jena: Dynamics GmbH. Catalogue Fluorescent Dyes for Bioanalytical and Hightech Applications. 5th ed. 2017.
- [53] Kuhl N, Linder A, Philipp N, Nixdorf D, Fischer H, Veth S, et al. STING agonism turns human T cells into interferon-producing cells but impedes their functionality . *EMBO Rep* 2023;24. <https://doi.org/10.15252/EMBR.202255536>.
- [54] Slomp A, Moesbergen LM, Eldering E, Kersten MJ, Minnema MC, Peperzak V. Phosphatase PP2A enhances MCL-1 protein half-life in multiple myeloma cells. *Cell Death & Disease* 2021 12:3 2021;12:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03351-7>.
- [55] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>.
- [56] Beltrán-Visiedo M, Jiménez-Alduán N, Díez R, Cuenca M, Benedi A, Serrano-Del Valle A, et al. Dinaciclib synergizes with BH3 mimetics targeting BCL-2 and BCL-XL in multiple myeloma cell lines partially dependent on MCL-1 and in plasma cells from patients. *Mol Oncol* 2023;17:2507. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13522>.

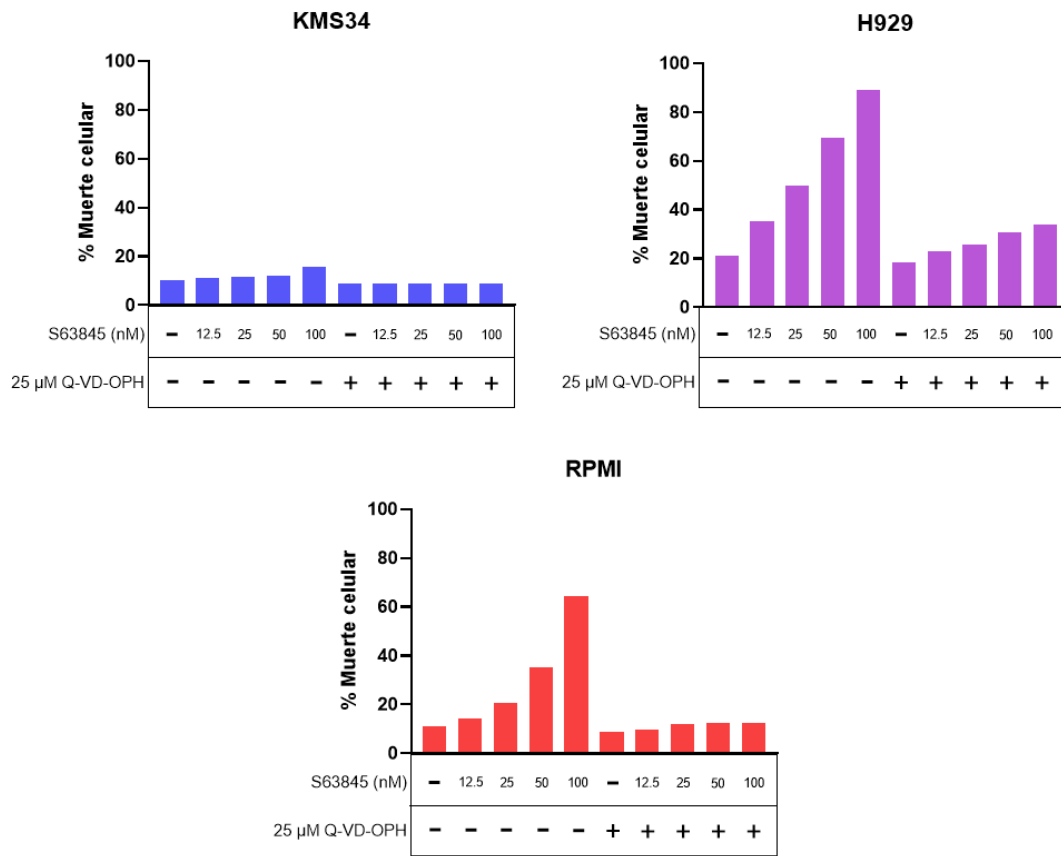
- [57] Ablasser A, Chen ZJ. CGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science* (1979) 2019;363. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT8657/ASSET/516868A5-F4D8-46BD-9DD3-8CBDF355BD55/ASSETS/GRAPHIC/363\\_AAT8657\\_FA.JPEG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT8657/ASSET/516868A5-F4D8-46BD-9DD3-8CBDF355BD55/ASSETS/GRAPHIC/363_AAT8657_FA.JPEG).
- [58] Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011;96:574–82. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2010.033456>.
- [59] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603–7. <https://doi.org/10.1038/NATURE11003>.
- [60] Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004;91:355–8. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6601894>.
- [61] Ying Y, Padanilam BJ. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D—overlapping pathways of regulated necrosis? *Cell Mol Life Sci* 2016;73:2309. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2202-5>.
- [62] Ghosh M, Saha S, Li J, Montrose DC, Martinez LA. p53 engages the cGAS/STING cytosolic DNA sensing pathway for tumor suppression. *Mol Cell* 2023;83:266. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.12.023>.
- [63] Ghosh M, Saha S, Bettke J, Nagar R, Parrales A, Iwakuma T, et al. Mutant p53 suppresses innate immune signaling to promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2021;39:494. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2021.01.003>.
- [64] Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, Krystal GW, Harada H. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death & Disease* 2014 5:2 2014;5:e1052–e1052. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.6>.
- [65] Moujalled DM, Pomilio G, Ghiurau C, Ivey A, Salmon J, Rijal S, et al. Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2018;33:905. <https://doi.org/10.1038/S41375-018-0261-3>.
- [66] Savvidou I, Khong T, Carmichael I, Shah JS, Mithraprabhu S, Spencer A. Targeting Bclxl Mitigates Mcl1 Chemoresistance in Multiple Myeloma. *Blood* 2021;138:2656. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2021-149936>.
- [67] Algarín EM, Díaz-Tejedor A, Mogollón P, Hernández-García S, Corchete LA, San-Segundo L, et al. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica* 2020;105:E116–20. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.212308>.
- [68] Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3281–90. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-01-065888>.

- [69] Forghani P, Rashid A, Sun F, Liu R, Li D, Lee MR, et al. Carfilzomib Treatment Causes Molecular and Functional Alterations of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 2021;10:e022247. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.022247>.
- [70] Kikuchi S, Suzuki R, Ohguchi H, Yoshida Y, Lu D, Cottini F, et al. Class IIa HDAC inhibition enhances ER stress-mediated cell death in multiple myeloma. *Leukemia* 2015;29:1918–27. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.83>.
- [71] Samali A, Gupta S, Cuffe L, Szegezdi E, Logue SE, Neary C, et al. Mechanisms of ER Stress-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization. *Int J Cell Biol* 2010;2010:170215. <https://doi.org/10.1155/2010/170215>.
- [72] Bryant JD, Lei Y, VanPortfliet JJ, Winters AD, West AP. Assessing Mitochondrial DNA Release into the Cytosol and Subsequent Activation of Innate Immune-related Pathways in Mammalian Cells. *Curr Protoc* 2022;2. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.372>.
- [73] Akesolo O, Buey B, Beltrán-Visiedo M, GiralDOS D, Marzo I, Latorre E. Toll-like receptors: New targets for multiple myeloma treatment? *Biochem Pharmacol* 2022;199:114992. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2022.114992>.
- [74] Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:491–6. <https://doi.org/10.1038/NI921>.
- [75] Glover HL, Schreiner A, Dewson G, Tait SWG. Mitochondria and cell death. *Nature Cell Biology* 2024 26:9 2024;26:1434–46. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01429-4>.
- [76] Xiong Y, Tang YD, Zheng C. The crosstalk between the caspase family and the cGAS–STING signaling pathway. *J Mol Cell Biol* 2021;13:739–47. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJAB071>.
- [77] McArthur K, Whitehead LW, Heddleston JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* 2018;359. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO6047>.
- [78] Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O, de Miguel D, Ramírez-Labrada A, Martínez-Lostao L, et al. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2016;382:1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.08.019>.
- [79] Zhang D, Zhan D, Zhang R, Sun Y, Duan C, Yang J, et al. Treg-derived TGF-β1 dampens cGAS-STING signaling to downregulate the expression of class I MHC complex in multiple myeloma. *Scientific Reports* 2024 14:1 2024;14:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62298-3>.
- [80] Jibril A, Hellmich C, Wojtowicz EE, Hampton K, Maynard R, De Silva R, et al. Plasma cell-derived mtDAMPs activate the macrophage STING pathway, promoting myeloma progression. *Blood* 2023;141:3065–77. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2022018711>.
- [81] Fan X, Song | Xiaoshuang, Chen W, Liang H, Nakatsukasa H, Dunfang Zhang |, et al. cGAS-STING signaling in cancer: Regulation and therapeutic targeting. *MedComm – Oncology* 2023;2:e49. <https://doi.org/10.1002/MOG2.49>.



# Anexos

## • Anexo 1



**Figura S1.** Efecto citotóxico de S63845 (12.5, 25, 50 y 100 nM) solo o en combinación con QVD-POH 25 μM sobre (B) H929, (C) RPMI8226 y (A) KMS34, respectivamente. Los resultados se expresan como el porcentaje de células muertas de 1 experimento realizado por duplicado (n=1).

## • Anexo 2

**Tabla S1.** Valores de Ct, ΔCt, ΔΔCt y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para todas las muestras de los experimentos de cuantificación de mtDNA. **CFZ:** Carfilzomib **S63:** S63845 **QVD:** QVD-POH **Ctrl:** Control

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
KMS34 citosólico Ctrl	β-globina	25.81	-	-	-	20.56	-	-	-	24.61	-	-	-
	MT-CO2	23.38	-2.43	0.00	1	19.79	-0.77	0.00	1.00	23.51	-1.10	0.00	1.00
	MT-DLOOP	22.2	-3.61	0.00	1	18.27	-2.29	0.00	1.00	22.01	-2.60	0.00	1.00

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
KMS34 citosólico CFZ	$\beta$ -globina	25.25	-	-	-	20.47	-	-	-	25.20	-	-	-
	MT-CO2	23.63	-1.62	0.81	0.57	19.35	-1.13	-0.36	1.28	23.37	-1.83	-0.73	1.66
	MT-DLOOP	22.84	-2.41	1.20	0.43	18.08	-2.40	-0.10	1.07	22.15	-3.05	-0.45	1.37
KMS34 citosólico CFR+QVD	$\beta$ -globina	31.36	-	-	-	20.39	-	-	-	29.46	-	-	-
	MT-CO2	24.21	-7.15	-4.72	26.32	19.31	-1.08	-0.31	1.24	22.72	-6.74	-5.65	50.10
	MT-DLOOP	23.06	-8.30	-4.69	25.81	17.98	-2.42	-0.12	1.09	23.96	-5.50	-2.90	7.48
KMS34 citosólico S63+QVD	$\beta$ -globina	31.30	-	-	-	20.50	-	-	-	28.79	-	-	-
	MT-CO2	24.22	-7.08	-4.65	25.05	19.21	-1.29	-0.52	1.44	22.29	-6.49	-5.39	42.07
	MT-DLOOP	23.11	-8.19	-4.58	23.91	17.85	-2.65	-0.35	1.28	21.79	-7.00	-4.40	21.15
KMS34 Mt-Nc Ctrl	$\beta$ -globina	22.14	-	-	-	20.78	-	-	-	20.71	-	-	-
	MT-CO2	14.53	-7.61	0.00	1.00	15.22	-5.55	0.00	1.00	14.78	-5.94	0.00	1.00
	MT-DLOOP	14.14	-8.00	0.00	1.00	15.07	-5.71	0.00	1.00	14.99	-5.73	0.00	1.00
KMS34 Mt-Nc CFZ	$\beta$ -globina	21,87	-	-	-	19.90	-	-	-	21.23	-	-	-
	MT-CO2	15.30	-6.57	1.05	0.48	15.64	-4.26	1.30	0.41	15.07	-6.17	-0.23	1.17
	MT-DLOOP	14.54	-7.33	0.67	0.63	13.78	-6.12	-0.40	1.32	14.47	-6.76	-1.03	2.05
KMS34 Mt-Nc CFR+QVD	$\beta$ -globina	21.80	-	-	-	19.79	-	-	-	20.87	-	-	-
	MT-CO2	15.49	-6.30	1.31	0.40	14.83	-4.96	0.60	0.66	15.56	-5.31	0.63	0.65
	MT-DLOOP	14.92	-6.87	1.13	0.46	14.08	-5.71	0.01	1.00	14.16	-6.71	-0.98	1.97
KMS34 Mt-Nc	$\beta$ -globina	21.87	-	-	-	19.81	-	-	-	21.15	-	-	-

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
S63+QVD	MT-CO2	15.34	-6.53	1.09	0.47	14.62	-5.19	0.36	0.78	14.94	-6.21	-0.27	1.20
	MT-DLOOP	14.90	-6.97	1.03	0.49	14.18	-5.63	0.08	0.95	14.20	-6.95	-1.23	2.34
H929 citosólico Ctrl	$\beta$ -globina	24.22	-	-	-	24.89	-	-	-				
	MT-CO2	20.42	-3.79	0.00	1.00	22.04	-2.85	0.00	1.00				
	MT-DLOOP	19.88	-4.34	0.00	1.00	21.35	-3.54	0.00	1.00				
H929 citosólico CFZ	$\beta$ -globina	24.75	-	-	-	25.00	-	-	-				
	MT-CO2	21.02	-3.72	0.07	0.95	21.82	-3.17	-0.32	1.25				
	MT-DLOOP	20.24	-4.51	-0.17	1.13	21.08	-3.92	-0.38	1.30				
H929 citosólico CFR+QVD	$\beta$ -globina	26.90	-	-	-	27.25	-	-	-				
	MT-CO2	21.04	-5.86	-2.06	4.18	20.69	-6.57	-3.71	13.11				
	MT-DLOOP	20.42	-6.48	-2.14	4.41	20.17	-7.09	-3.54	11.67				
H929 citosólico S63+QVD	$\beta$ -globina	26.39	-	-	-	27.63	-	-	-				
	MT-CO2	20.37	-6.02	-2.23	4.68	21.61	-6.02	-3.17	9.00				
	MT-DLOOP	19.66	-6.73	-2.39	5.26	21.27	-6.37	-2.83	7.09				
H929 Mt-Nc Ctrl	$\beta$ -globina	23.02	-	-	-	20.59	-	-	-				
	MT-CO2	14.72	-8.30	0.00	1.00	15.07	-5.52	0.00	1.00				
	MT-DLOOP	13.94	-9.08	0.00	1.00	14.54	-6.05	0.00	1.00				
H929 Mt-Nc CFZ	$\beta$ -globina	23.73	-	-	-	21.22	-	-	-				
	MT-CO2	15.25	-8.48	-0.18	1.14	15.61	-5.61	-0.09	1.07				

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
	MT-DLOOP	14.71	-9.01	0.06	0.96	14.83	-6.39	-0.34	1.26				
H929 Mt-Nc CFR+QVD	$\beta$ -globina	21.10	-	-	-	21.01	-	-	-				
	MT-CO2	15.22	-5.88	2.42	0.19	14.94	-6.07	-0.55	1.47				
	MT-DLOOP	14.34	-6.76	2.32	0.20	14.70	-6.30	-0.25	1.19				
H929 Mt-Nc S63+QVD	$\beta$ -globina	22.51	-	-	-	20.77	-	-	-				
	MT-CO2	14.91	-7.59	0.70	0.61	14.99	-5.78	-0.27	1.20				
	MT-DLOOP	14.20	-8.31	0.77	0.59	14.57	-6.20	-0.15	1.11				
RPMI citosólico Ctrl	$\beta$ -globina	23.00	-	-	-	22.71	-	-	-	23.01	-	-	-
	MT-CO2	21.35	-1.65	0.00	1.00	20.14	-2.57	0.00	1.00	21.18	-1.83	0.00	1.00
	MT-DLOOP	20.14	-2.86	0.00	1.00	18.53	-4.17	0.00	1.00	20.56	-2.44	0.00	1.00
RPMI citosólico CFZ	$\beta$ -globina	22.75	-	-	-	22.36	-	-	-	22.43	-	-	-
	MT-CO2	21.11	-1.65	0.00	1.00	19.80	-2.57	0.00	1.00	20.79	-1.64	0.19	0.88
	MT-DLOOP	19.77	-2.98	-0.12	1.09	18.39	-3.97	0.20	0.87	19.99	-2.44	0.00	1.00
RPMI citosólico CFR+QVD	$\beta$ -globina	31.38	-	-	-	31.50	-	-	-	31.40	-	-	-
	MT-CO2	22.61	-8.77	-7.12	139.2	22.05	-9.44	-6.87	117.2	21.50	-9.90	-8.07	268.8
	MT-DLOOP	21.34	-10.04	-7.18	144.5	20.08	-11.42	-7.25	152.2	21.05	-10.36	-7.91	240.8
RPMI citosólico S63+QVD	$\beta$ -globina	31.40	-	-	-	31.39	-	-	-	31.47	-	-	-
	MT-CO2	22.90	-8.50	-6.86	115.8	21.69	-9.70	-7.13	140.1	22.24	-9.22	-7.40	168.5
	MT-DLOOP	21.17	-10.23	-7.37	165.1	19.57	-11.82	-7.65	200.6	21.74	-9.73	-7.28	155.8

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
RPMI Mt-Nc Ctrl	$\beta$ -globina	20.97	-	-	-	21.77	-	-	-	23.06	-	-	-
	MT-CO2	15.13	-5.83	0.00	1.00	13.30	-8.47	0.00	1.00	14.96	-8.10	0.00	1.00
	MT-DLOOP	12.84	-8.12	0.00	1.00	11.67	-10.10	0.00	1.00	14.36	-8.70	0.00	1.00
RPMI Mt-Nc CFZ	$\beta$ -globina	21.46	-	-	-	21.94	-	-	-	22.52	-	-	-
	MT-CO2	14.78	-6.68	-0.85	1.80	13.68	-8.27	0.20	0.87	14.86	-7.66	0.44	0.74
	MT-DLOOP	13.52	-7.94	0.18	0.88	11.65	-10.30	-0.20	1.15	14.07	-8.45	0.24	0.84
RPMI Mt-Nc CFR+QVD	$\beta$ -globina	20.82	-	-	-	22.24	-	-	-	23.34	-	-	-
	MT-CO2	15.05	-5.77	0.06	0.96	14.26	-7.97	0.50	0.71	15.20	-8.15	-0.05	1.04
	MT-DLOOP	13.59	-7.23	0.89	0.54	12.61	-9.62	0.48	0.72	14.75	-8.59	0.11	0.93
RPMI Mt-Nc S63+QVD	$\beta$ -globina	21.13	-	-	-	21.99	-	-	-	23.33	-	-	-
	MT-CO2	14.89	-6.24	-0.41	1.33	14.58	-7.41	1.06	0.48	14.82	-8.51	-0.41	1.33
	MT-DLOOP	13.16	-7.97	0.15	0.90	13.00	-8.99	1.11	0.46	14.36	-8.97	-0.28	1.21

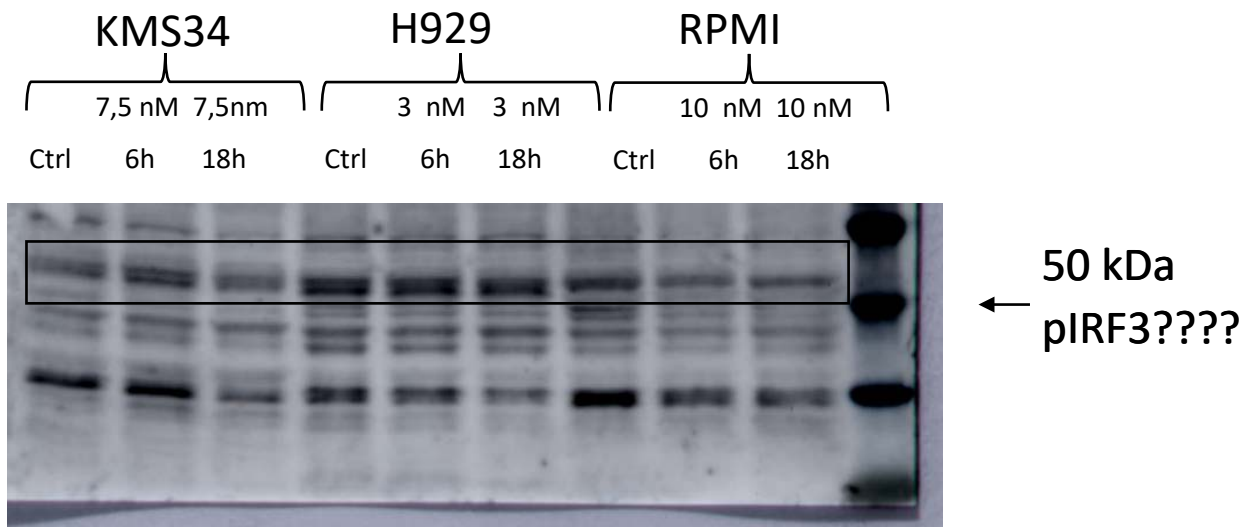
**Tabla S2.** Valores de Ct,  $\Delta$ Ct,  $\Delta\Delta$ Ct y  $2^{-\Delta\Delta$ Ct para todas muestras de los experimentos de cuantificación de IFN  $\beta$ . **CFZ:** Carfilzomib **S63:** S63845 **QVD:** QVD-POH **Ctrl:** Control

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Ct	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
KMS34 Ctrl	HPRT	24.67				22.31							
	IFN $\beta$	30.16	7.00	0.00	1.00	32.63	11.47	0.00	1.00				
	UBC	22.77				20.99							
	YWHAZ	22.03				20.17							
KMS34 CFZ	HPRT	25.62				25.68							
	IFN $\beta$	29.05	6.27	-0.73	1.66	31.54	9.74	-1.74	3.33				
	UBC	20.67				19.43							
	YWHAZ	22.03				20.29							
KMS34 CFR+QVD	HPRT	25.70				23.83							
	IFN $\beta$	29.30	6.77	-0.23	1.18	28.64	8.26	-3.22	9.30				
	UBC	19.79				17.49							
	YWHAZ	22.10				19.84							
KMS34 S63+QVD	HPRT	24.16				24.18							
	IFN $\beta$	27.31	5.36	-1.64	3.12	27.61	6.38	-5.10	34.18				
	UBC	20.61				20.00							
	YWHAZ	21.07				19.52							
KMS34 diABZI	HPRT	24.98				23.92							
	IFN $\beta$	29.30	6.11	-0.89	1.85	29.60	7.85	7.85	0.004				

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	UBC	22.72				21.00							
	YWHAZ	21.86				20.35							
H929 Ctrl	HPRT	21.25				24.01							
	IFN $\beta$	24.55	4.34	0.00	1.00	27.62	5.02	0.00	1.00				
	UBC	18.91				21.17							
	YWHAZ	20.44				22.61							
H929 CFZ	HPRT	27.63				25.92							
	IFN $\beta$	23.07	-0.84	-5.19	36.43	24.51	1.33	-3.69	12.88				
	UBC	21.37				20.42							
	YWHAZ	22.73				23.19							
H929 CFR+QVD	HPRT	25.64				23.77							
	IFN $\beta$	18.97	-3.50	-7.84	229.4	19.58	-1.39	-6.41	85.02				
	UBC	19.63				18.49							
	YWHAZ	22.13				20.64							
H929 S63+QVD	HPRT	24.29				23.40							
	IFN $\beta$	17.35	-4.75	-9.09	546.1	17.87	-3.12	-8.14	282.2				
	UBC	19.86				18.52							
	YWHAZ	22.15				21.04							
RPMI Ctrl	HPRT	22.90				21.87				23.54			

Muestra	Gen	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
		Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	IFN $\beta$	31.36	10.10	0.00	1.00	26.23	5.72	0.00	1.00	33.38	12.31	0.00	1.00
	UBC	19.77				19.60				20.15			
	YWHAZ	21.09				20.04				19.54			
RPMI CFZ	HPRT	22.41				21.23				23.59			
	IFN $\beta$	29.55	9.39	-0.71	1.64	26.52	6.79	1.06	0.48	32.09	11.59	-0.72	1.65
	UBC	18.46				18.43				18.39			
	YWHAZ	19.62				19.55				19.53			
RPMI CFR+QVD	HPRT	21.68				22.95				23.92			
	IFN $\beta$	20.73	0.64	-9.46	704.3	21.26	0.69	-5.03	32.72	23.03	1.97	-10.33	1288
	UBC	18.25				19.02				19.21			
	YWHAZ	20.32				19.74				20.04			
RPMI S63+QVD	HPRT	26.10				24.36				25.97			
	IFN $\beta$	20.37	-3.20	-13.30	10117	18.47	-3.14	-8.86	465.8	19.80	-2.26	-14.56	24179
	UBC	20.60				18.56				19.39			
	YWHAZ	24.01				21.90				20.82			
RPMI diABZI	HPRT	23.45				23.31				23.03			
	IFN $\beta$	27.10	5.51	-4.59	24.15	28.18	6.77	1.05	0.48	27.13	7.00	-5.31	39.6
	UBC	19.96				20.32				18.93			
	YWHAZ	21.37				20.59				18.44			

• Anexo 3



**Figura S3.** Análisis de la fosforilación de IRF3 en Ser385 mediante *western blot* en las líneas celulares KMS34, H929 y RPMI8226 tratadas con 7.5 nM, 3 nM y 10 nM, respectivamente, de carfilzomib durante 6 o 18 horas. Inmunoblot de pIRF3.