



Universidad
Zaragoza

Estudio de la muerte inducida por el inhibidor de CDKs Dinaciclib en células de mieloma múltiple

ANEXO FIGURAS

Autora:

Ángela de Benito Bueno

Directores:

José Javier Naval Iraberri

Diego de Miguel Samaniego

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Figura 1. Caracterización del efecto citotóxico de Dinaciclib sobre la línea celular MM.1S

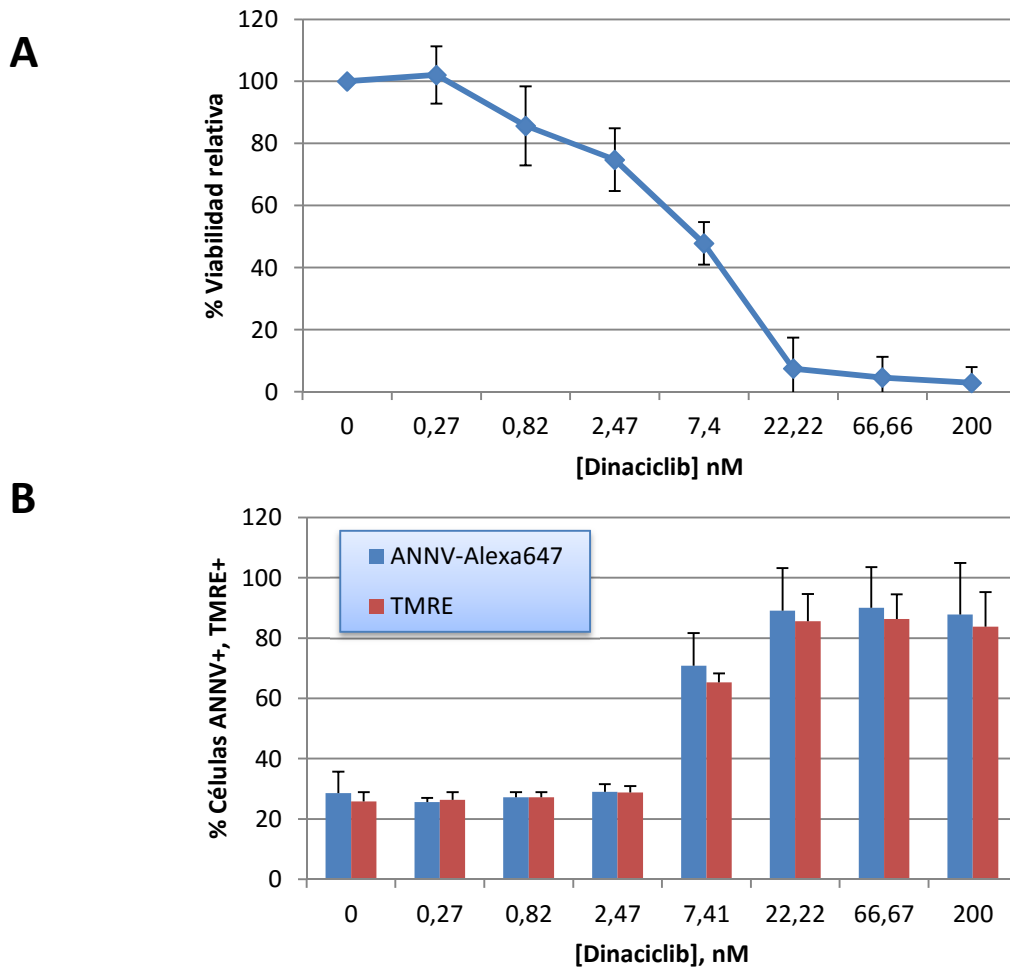


Figura 1. Caracterización del efecto citotóxico de Dinaciclib sobre la línea celular MM.1S. Representación de experimentos dosis-respuesta tras incubación durante 24 horas con las correspondientes dosis de Dinaciclib en células MM.1S sembradas a una densidad celular de 300000 cél/ml. **A)** Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con Dinaciclib en la línea celular MM.1S. La capacidad citotóxica se analizó mediante el ensayo de reducción del MTT. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad celular respecto al control. Se representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la apoptosis inducida por Dinaciclib mediante la detección de la traslocación de la fosfatidil serina y la caída del potencial de membrana mitocondrial con el doble marcaje con Anexina V-Alexa468 y TMRE. Los resultados son la media \pm SD de dos experimentos independientes.

Figura 2. Caracterización del efecto citotóxico de Dinaciclib sobre la línea celular RPMI 8226

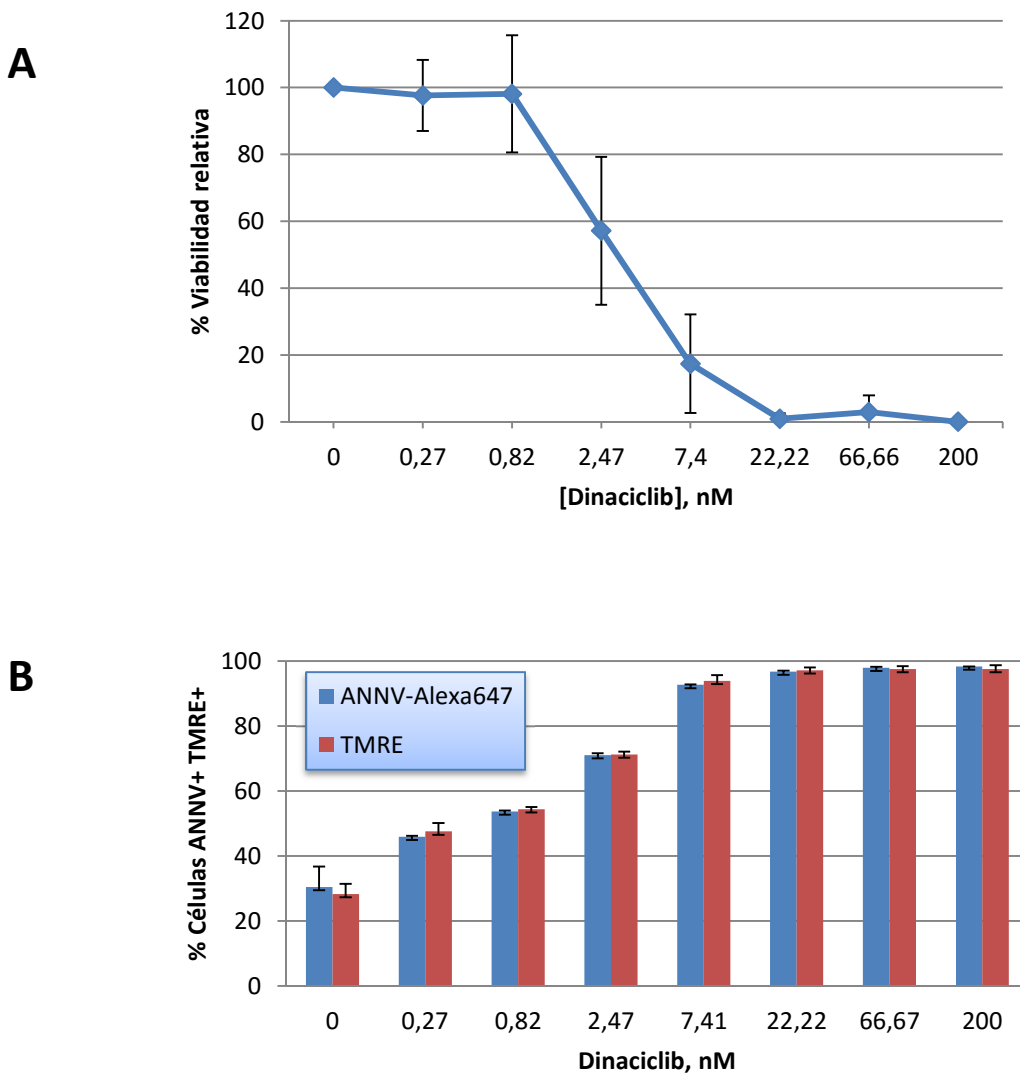


Figura 2. Caracterización del efecto citotóxico de Dinaciclib sobre la línea celular RPMI 8226 8226. Representación de experimentos dosis-respuesta tras incubación durante 24 horas con las correspondientes dosis de Dinaciclib en células RPMI 8226 sembradas a una densidad celular de 300000 cél/ml. **A)** Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con Dinaciclib en la línea celular RPMI 8226. La capacidad citotóxica se analizó mediante el ensayo de reducción del MTT. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad celular respecto al control. Se representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la apoptosis inducida por Dinaciclib mediante la detección de la traslocación de la fosfatidil serina y la caída del potencial de membrana mitocondrial con el doble marcaje con Anexina V-Alexa468 y TMRE. Los resultados son la media \pm SD de dos experimentos independientes.

Figura 3. Análisis de la condensación y fragmentación del material nuclear mediante tinción con Hoechst 33342 y visualización por microscopía de fluorescencia en las líneas celulares MM.1S y RPMI 8226.

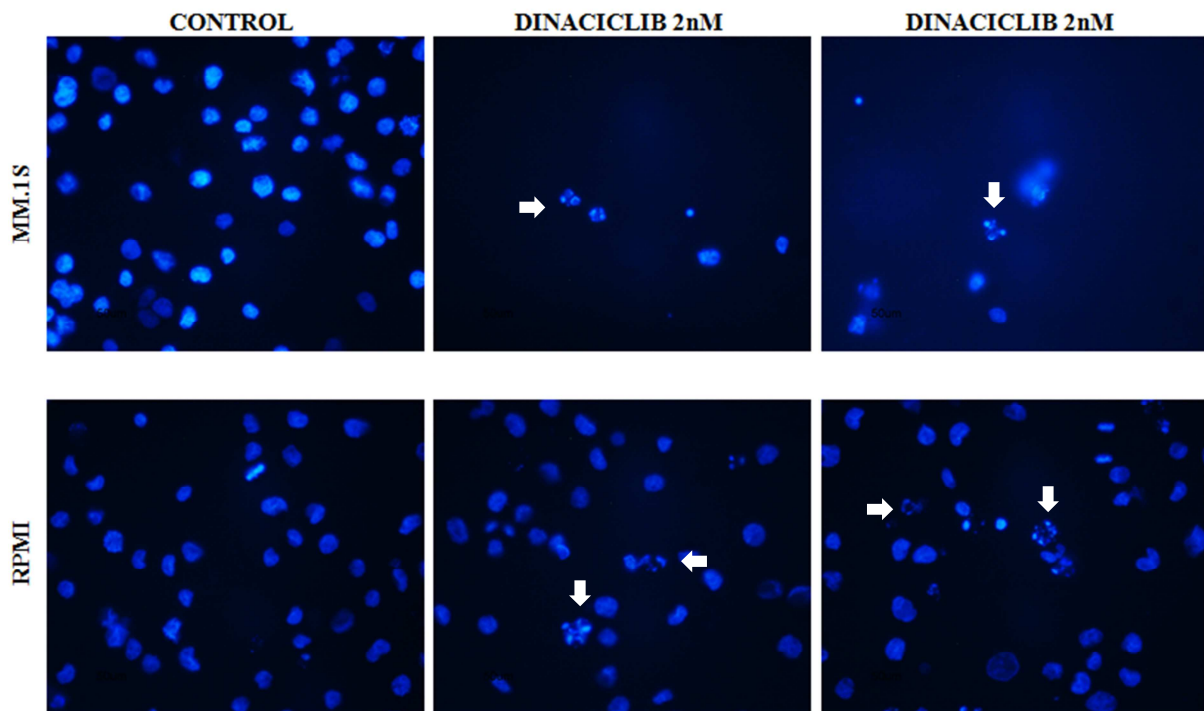


Figura 3. Análisis de la condensación y fragmentación del material nuclear mediante tinción con Hoechst 33342 y visualización por microscopía de fluorescencia en las líneas celulares MM.1S y RPMI 8226. Las células MM.1S y RPMI 8226 se trataron durante 24 horas en ausencia o presencia de Dinaciclib a una concentración final de 2 nM. Después de dicho tratamiento se realizó la tinción de núcleos para caracterizar la condensación y fragmentación del material nuclear, fenómeno característico de la apoptosis celular. En las imágenes se observa el marcaje con Hoechst en microscopía de fluorescencia con un aumento original de 400x.

Figura 4. Análisis del efecto de Dinaciclib sobre el ciclo celular en células MM.1S

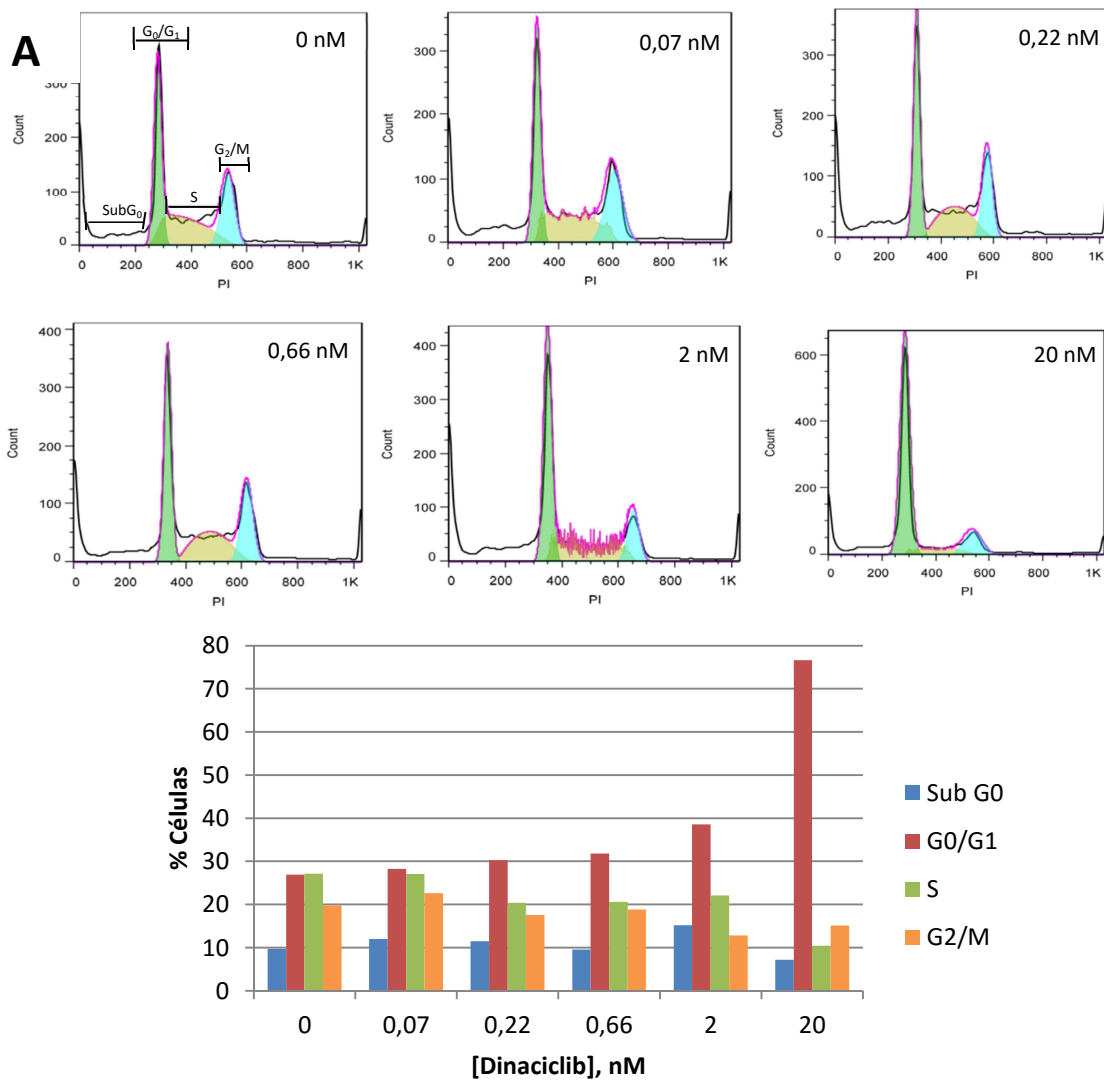


Figura 4. Análisis del efecto de Dinaciclib sobre el ciclo celular en células MM.1S Las células a una densidad de 500.000 cél/ml fueron incubadas en presencia o ausencia de Dinaciclib en distintas concentraciones. Posteriormente se analizó el marcaje con yoduro de propidio (PI) mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de dos ensayos realizados. **A)** Porcentaje de células presente en cada una de las fases del ciclo, analizado con el programa FowJo 7.6.1 (Windows) con la herramienta especializada en visualización de datos de ciclo celular “Cell Cycle”. Se adjunta además la representación de los histogramas obtenidos mediante el uso del software. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular para las distintas concentraciones de Dinaciclib.

Figura 5. Caracterización del efecto citotóxico de CAL-101 sobre la línea celular MM.1S

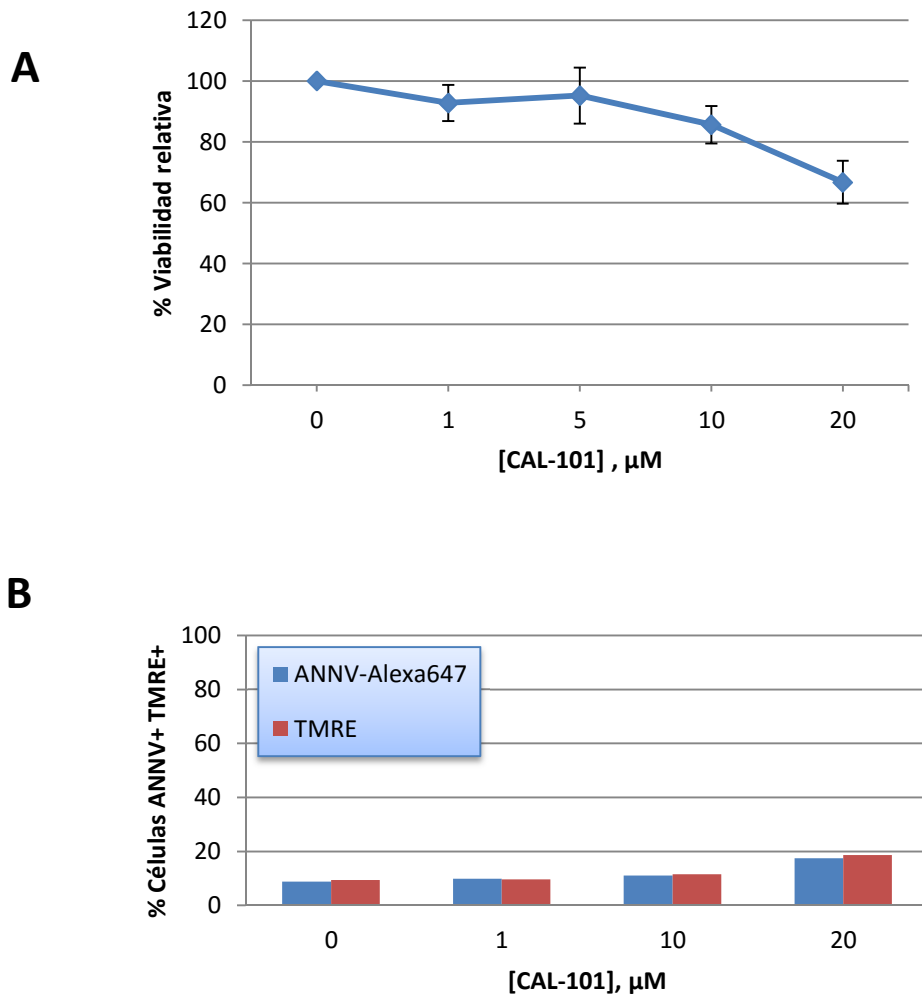


Figura 5. Análisis de citotoxicidad del fármaco CAL-101 en células MM.1S. Las células se sembraron a una densidad celular de 300000 cél/ml y se incubaron en presencia o ausencia de fármaco durante 48 horas. **A)** Determinación de la disminución de la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT, la gráfica representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. **B)** Determinación de la capacidad apoptótica de CAL-101 mediante la cuantificación de la traslocación de fosfatidilserina y de la caída del potencial mitocondrial usando las sondas Anexina V-Alexa647 y TMRE respectivamente.

Figura 6. Ensayo de citotoxicidad de CAL-101 y Dinaciclib en la línea celular MM.1S

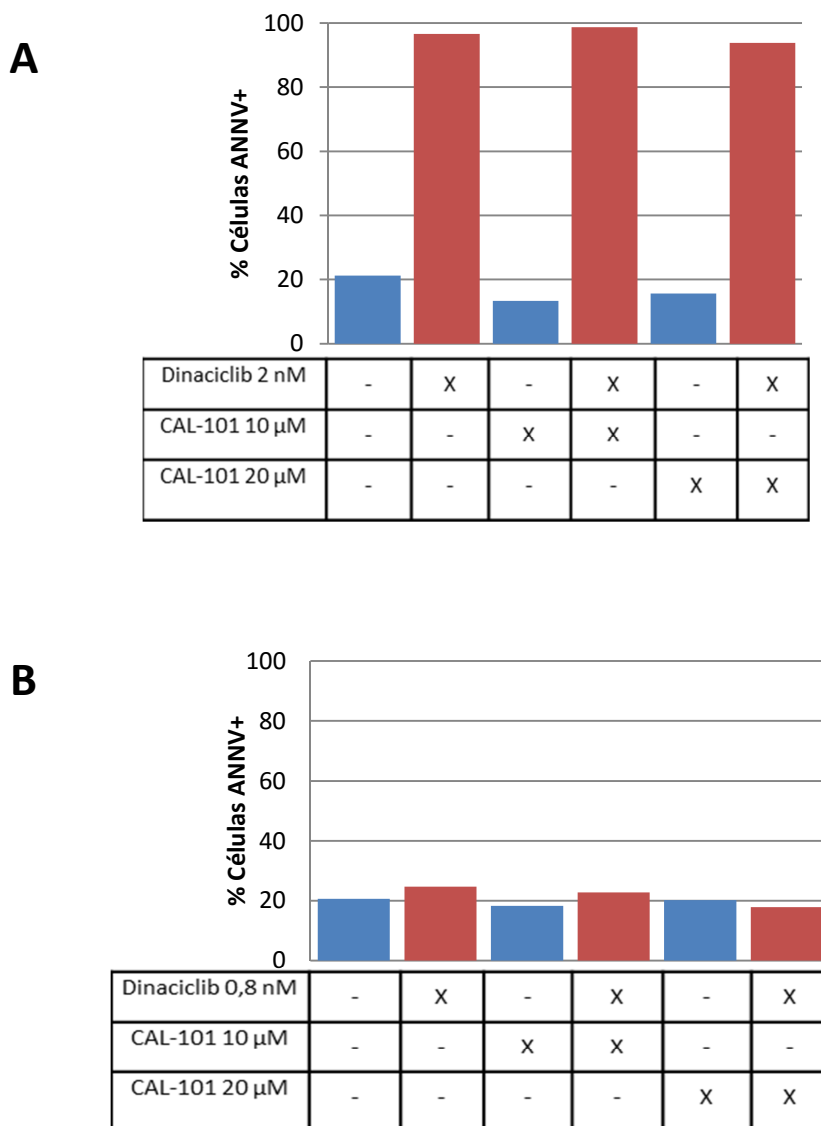


Figura 6. Ensayo de citotoxicidad de CAL-101 y Dinaciclib en la línea celular MM.1S. Ensayos dosis-respuesta de la combinación de Dinaciclib (DIN) y CAL-101 utilizando una concentración fija de Dinaciclib 2 nM (**A**) y 0,8 nM (**B**) con las dos concentraciones máximas probadas de CAL-101: 10 μM y 20 μM. La capacidad citotóxica y apoptótica se determinó en ambos casos por incubación con ambos fármacos durante 24 horas y posterior marcaje con AnexinaV y TMRE para caracterizar la traslocación de la fosfatidil serina y la caída del potencial mitocondrial respectivamente. Las gráficas son las representaciones de un experimento realizado en cada caso.

Figura 7. Ensayo de citotoxicidad de la combinación Dinaciclib y TRAIL en la línea celular RPMI 8226

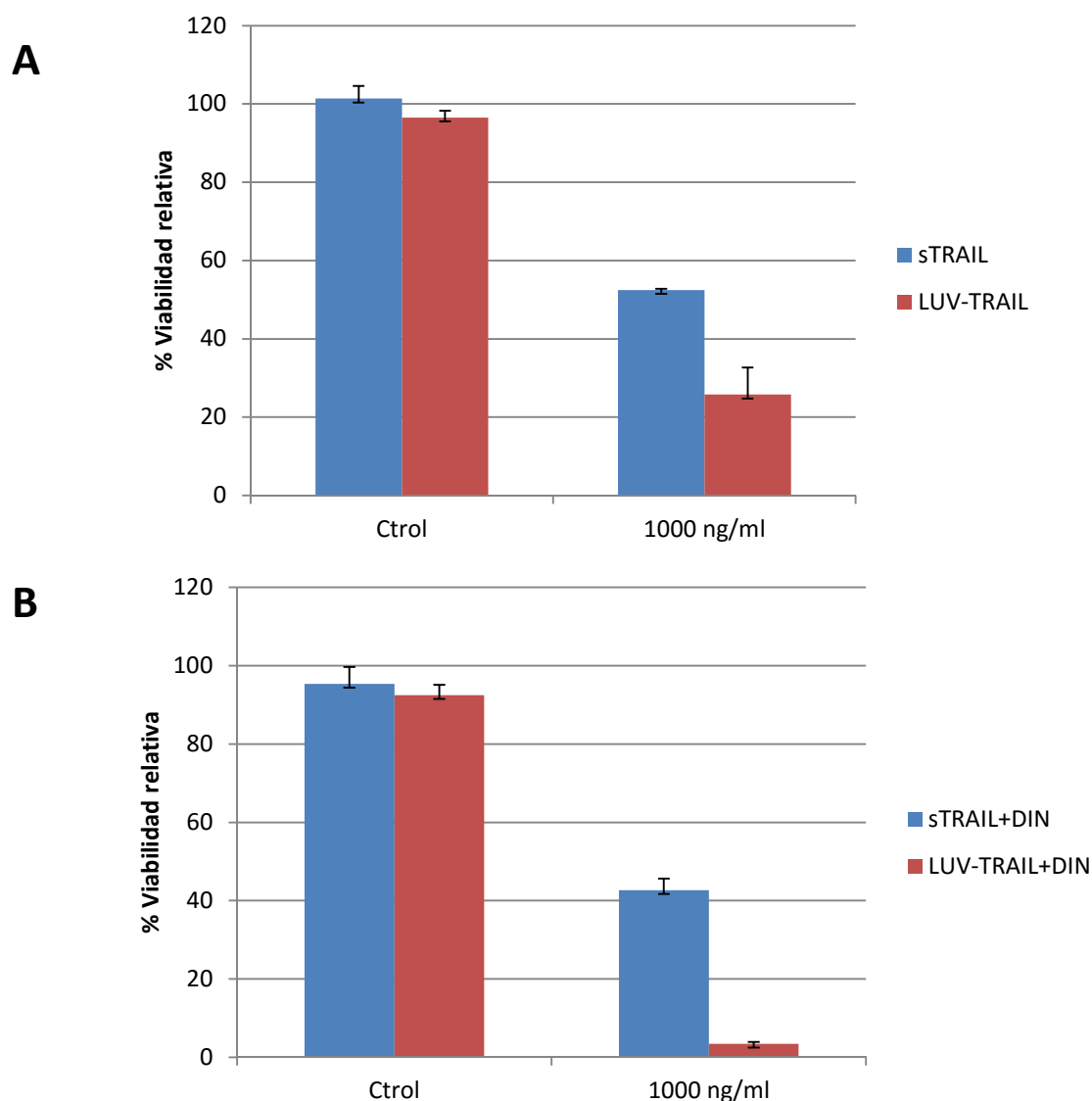


Figura 7. Ensayo de citotoxicidad de la combinación Dinaciclib y TRAIL en la línea celular RPMI 8226. Ensayo de combinación del fármaco Dinaciclib (DIN) a una concentración de 0,8 nM y TRAIL en forma soluble (sTRAIL) y adosado a nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL) a una concentración de 1000 ng/ml. La determinación de la inhibición de la proliferación se ha llevado a cabo mediante el ensayo de reducción del MTT. Las células RPMI 8226 a una densidad de 300000 cél/ml fueron preincubadas durante una hora con Dinaciclib en el caso del estudio en combinación. **A)** Representación de la viabilidad celular en células RPMI 8226 en ausencia o presencia de s-TRAIL y LUV-TRAIL. **B)** Representación de la disminución de la viabilidad celular tras el tratamiento con la combinación de fármacos Dinaciclib y TRAIL en ambas formulaciones, sTRAIL y LUV-TRAIL.

Figura 8. Ensayo de citotoxicidad de la combinación Dinaciclib y TRAIL en la línea celular MM.1S

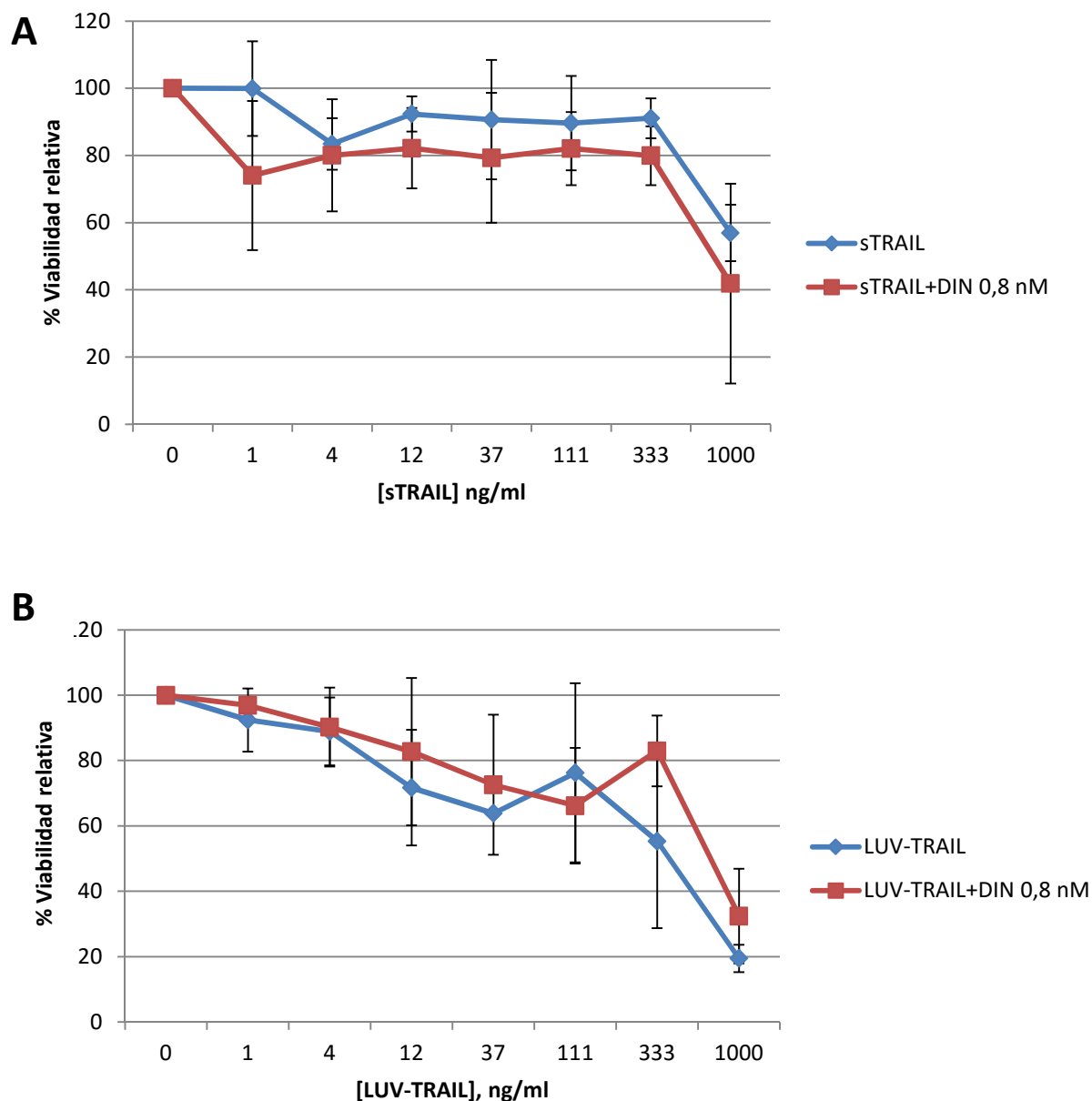


Figura 8. Ensayo de citotoxicidad de la combinación Dinaciclib y TRAIL en la línea celular MM.1S. Experimentos tipo dosis-respuesta para el estudio de la combinación de Dinaciclib (DIN) a una concentración de 0,8 nM y las dos formulaciones de TRAIL, TRAIL soluble (sTRAIL) y en nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL). Las células MM.1S a una densidad de 300000 cél/ml se preincubaron o no durante una hora con Dinaciclib 0,8 nM en estufa y posteriormente se añadió el volumen necesario de TRAIL para llegar a las concentraciones finales determinadas. El ensayo de combinación se dejó incubando durante 24 horas. La capacidad citotóxica se analizó posteriormente mediante el ensayo de reducción del MTT. En la representación se muestra la media \pm SD de cuatro experimentos independientes.

Figura 9. Estudio de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis por la combinación TRAIL y Dinaciclib en células MM.1S

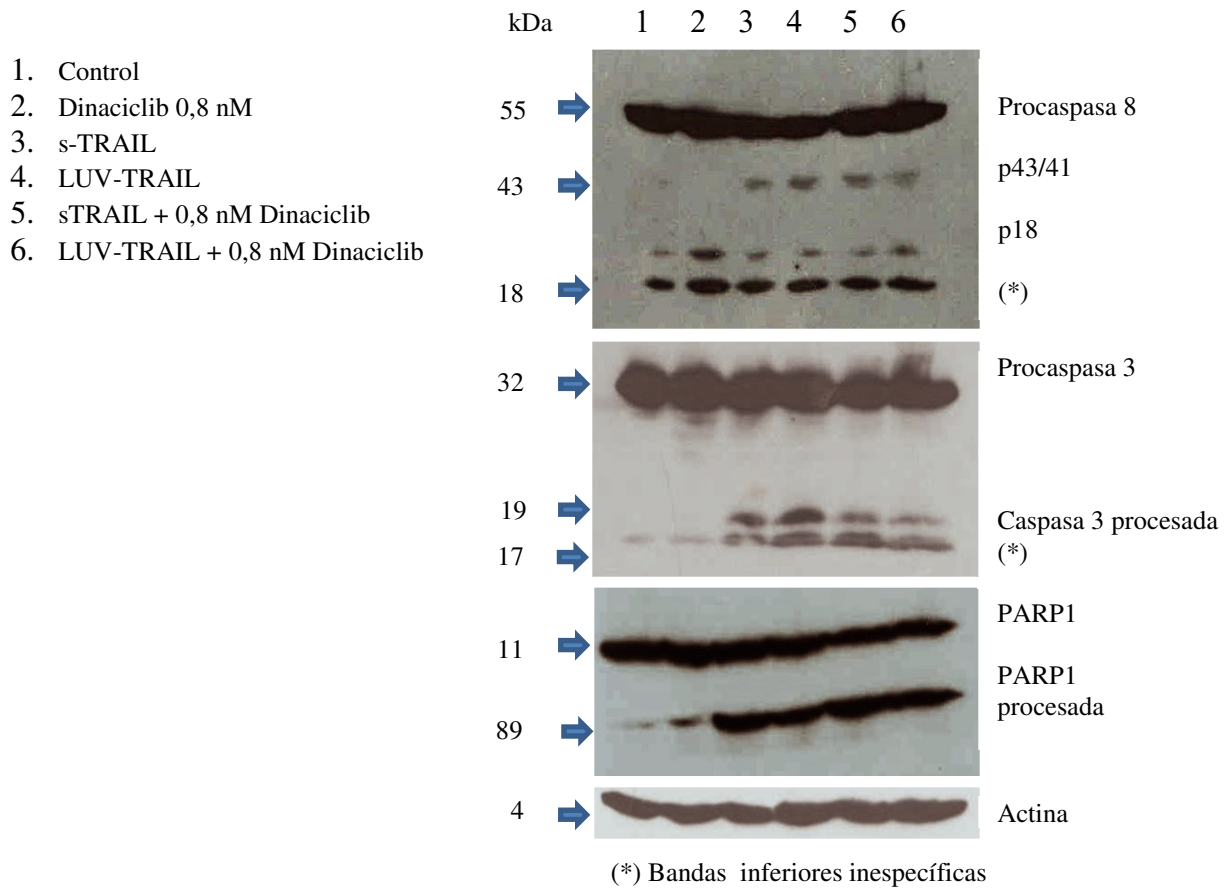


Figura 9. Estudio de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis por la combinación TRAIL y Dinaciclib en células MM.1S. Después de incubar las células MM.1S durante 24 horas con las correspondientes concentraciones de Dinaciclib, sTRAIL y LUV-TRAIL o combinaciones de los mismos se analizó la activación de las caspasas 3 y 8 así como el procesamiento de Bid y PARP1 y se usó la actina como control de carga. Las proteínas presentes en los lisados celulares fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% y posteriormente electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Esta fue incubada con anticuerpo específicos y revelada.