



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Construcción y evaluación de vectores pBiFC para el estudio de las interacciones entre las proteínas Bim, PUMA y Noxa y otras proteínas de la familia Bcl-2 y estudio del potencial terapéutico de compuestos miméticos de BH3

Construction and evaluation of pBiFC vectors for the study of the interactions between Bim, PUMA and Noxa and other Bcl-2 family proteins and study of the therapeutic potential of BH3 mimetic compounds

Autora

Andrea Benedí Visiedo

Directores

Isabel Marzo Rubio
Oscar Gonzalo Martínez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias
2017

Índice

Resumen/Abstract.....	1
1 Introducción.....	2
1.1 Muerte celular	2
1.2 Rutas de señalización de la apoptosis	3
1.3 Proteínas de la familia Bcl-2 y miméticos BH3	5
1.3.1 Familia de proteínas Bcl-2	5
1.3.2 Modelos de activación de Bax y Bak	6
1.3.3 Miméticos BH3	7
1.4 Métodos de estudio de las interacciones entre proteínas.....	9
1.5 Fármacos antimitóticos	11
2 Hipótesis y objetivos.....	12
3 Materiales y métodos.....	14
3.1 Líneas celulares.....	14
3.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares.....	14
3.1.2 Recuento de las células con una cámara de Neubauer	15
3.1.3 Criopreservación de las líneas celulares.....	15
3.2 Estudio de las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 mediante BiFC	15
3.2.1 Construcción de los vectores pBiFC	16
3.2.1.1 Diseño de los oligonucleótidos.....	16
3.2.1.2 Amplificación de los cDNA de Bcl-2, Mcl-1, Bim, PUMA y Noxa.....	17
3.2.1.3 Digestión de vectores VN/VC-A.....	18
3.2.1.4 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de vectores e insertos.....	18
3.2.1.5 Digestión y purificación de los insertos abiertos.....	19
3.2.1.6 Ligación de los insertos en los vectores pBiFC.....	19
3.2.2 Transformación de bacterias competentes, selección y comprobación de transformantes	19
3.2.2.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	19
3.2.2.2 Transformación de bacterias Escherichia coli competentes y selección de bacterias transformantes.....	20
3.2.2.3 Extracción de DNA plasmídico y comprobación mediante gel de agarosa al 1 %.....	20
3.2.3 Mutagénesis dirigida.....	21
3.2.4 Transfección de células HeLa	22
3.3 Microscopía confocal de fluorescencia	24

3.4	Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V	24
3.5	Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo de reducción del MTT	25
3.6	Análisis de proteínas por Western Blot.....	26
3.6.1	Extracción y fraccionamiento de extractos celulares.....	26
3.6.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	26
3.6.3	Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	27
3.6.4	Análisis de proteínas por Western Blot y detección de los inmunocomplejos	27
4	Resultados y discusión	28
4.1	Estudio de las interacciones entre las proteínas anti-apoptóticas y las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa.....	28
4.1.1	Análisis del nivel de expresión de las proteínas de fusión.....	28
4.1.1	Interacciones entre la proteína “solo-BH3” Bim y las proteínas anti-apoptóticas	29
4.1.2	Interacciones entre la proteína “solo-BH3” PUMA y las proteínas anti-apoptóticas.....	33
4.1.3	Interacciones entre la proteína “solo-BH3” Noxa y las proteínas anti-apoptóticas	36
4.2	Estudio del papel de las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa en la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak.....	39
4.3	Análisis del efecto de los nuevos inhibidores de Bcl-X _L (A-1155463) y Mcl-1 (A-1210477) sobre las interacciones entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas multidominio y las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa	44
4.4	Estudio del efecto de distintos miméticos BH3 en células A549 y en células de mieloma múltiple	48
4.5	Estudio de la combinación de los miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477 con diferentes fármacos antimetabólicos en la línea celular A549.....	51
4.6	Análisis de la expresión Bcl-X _L , Mcl-1 y Bim en la línea celular A549 mediante Western Blot	52
5	Conclusiones/Conclusions	55
6	Bibliografía.....	57

Resumen

Las interacciones que se producen entre las proteínas de la familia Bcl-2 desempeñan un papel importante en la regulación de la ruta intrínseca de la apoptosis. A pesar de que todavía existe cierta polémica respecto al mecanismo exacto mediante el cual se regula la activación de las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax y Bak, se sabe que las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” son esenciales en este proceso. Según los resultados obtenidos en este trabajo, las proteínas Bim, PUMA y Noxa son capaces de formar complejos tanto con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 como con Bax/Bak en la mitocondria, aunque Bim y PUMA parecen unirse con mayor afinidad a las proteínas anti-apoptóticas, particularmente a Bcl-2, mientras que Noxa muestra una especificidad similar por Bcl-2 y Bak. Además, el presente trabajo demuestra que estas interacciones se modifican en presencia de los nuevos miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477, inhibidores selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1, respectivamente. Por otra parte, también se ha evaluado el potencial terapéutico de los miméticos BH3 ABT-737, ABT-199, A-1155463 y A-1210477 como agentes únicos en la línea celular A549, observándose un efecto pro-apoptótico moderado en el caso de ABT-737, una eficacia mínima de ABT-199 y A-1210477 y una acción intermedia de A-1155463. No obstante, se observó un efecto sinérgico al combinar A-1155463 con dos inhibidores de la familia Aurora (barasertib y alisertib) y con dos agentes anti-microtúbulos clásicos (vincristina y docetaxel), todos ellos englobados dentro de la categoría de fármacos antimitóticos; en cambio, A-1210477 no mostraba sinergia al combinarse con ninguno de estos compuestos. Además, se evaluó el potencial terapéutico de A-1155463 y A-1210477 en las líneas celulares de mieloma múltiple RPMI 8226, U266 y MM.1S y, de acuerdo con nuestros resultados, el primer compuesto muestra un efecto citotóxico mayor en las células RPMI 8226 y MM.1S, mientras que las células U266 son más sensibles al segundo.

Abstract

Interactions among proteins of the Bcl-2 family play an important role in the regulation of the intrinsic apoptotic pathway. Despite current controversy regarding the exact mechanism that regulates activation of pro-apoptotic multidomain proteins Bax and Bak, it is known that pro-apoptotic “BH3-only” are essential in this process. According to the results obtained in this work, Bim, PUMA and Noxa are able to form complexes with both the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 and Bax/Bak in the mitochondria, although Bim and PUMA seem to bind with higher affinity to the anti-apoptotic proteins, particularly to Bcl-2, whereas Noxa shows a similar specificity for Bcl-2 and Bak. Moreover, this work demonstrates that these interactions change in the presence of the new BH3 mimetics A-1155463 and A-1210477, selective inhibitors of Bcl-X_L and Mcl-1, respectively. On the other hand, the therapeutic potential of ABT-737, ABT-199, A-1155463 and A-1210477 as single agents was also evaluated in A549 cell line, with a moderate pro-apoptotic effect with ABT-737, a minimal efficacy of ABT-199 and A-1210477 and an intermediate action of A-1155463. Nevertheless, a synergistic effect was observed when combining A-1155463 with two Aurora family inhibitors (barasertib and alisertib) and with two classic anti-microtubule agents (vincristine and docetaxel), all of which fall within the antimitotic drugs category; in contrast, A-1210477 showed no synergy when combining with any of these compounds. In addition, the therapeutic potential of A-1155463 and A-1210477 was evaluated in the multiple myeloma cell lines RPMI 8226, U266 and MM.1S and, according to our results, the first compound shows a greater cytotoxic effect in the RPMI 8226 and MM.1S cells while U266 cells are more sensitive to the second inhibitor.

1 Introducción

1.1 Muerte celular

La muerte celular es un proceso fisiológico que puede tener como objetivo la renovación celular, o bien puede ser el resultado de diferentes situaciones de estrés a las que se ven sometidas las células, como pueden ser lesiones localizadas, distintas enfermedades o la muerte del organismo del que forman parte^[1]. Las células pueden morir de forma “accidental” cuando se exponen a estímulos físicos, químicos o mecánicos intensos que inducen la pérdida de la integridad estructural de forma inmediata sin que esté implicada ninguna maquinaria codificada genéticamente. Alternativamente, la muerte celular puede considerarse un proceso “regulado” cuando interviene un mecanismo molecular específico con el fin de preservar la homeostasis celular. En este caso, la intervención de una maquinaria molecular codificada genéticamente hace que la muerte celular tarde en producirse y, por otra parte, permite actuar sobre componentes clave de dicho mecanismo mediante fármacos o manipulación genética^[2]. Independientemente del tipo de muerte celular, se considera que una célula está muerta cuando su membrana plasmática se ha permeabilizado de forma irreversible o cuando la célula se ha fragmentado completamente (incluido el núcleo), dando lugar a cuerpos apoptóticos^[2,3].

En la actualidad se conoce la existencia de varios tipos de muerte celular, siendo los principales la apoptosis, la necrosis y la muerte con autofagia^[3]. Según diversos estudios realizados durante la pasada década, estos tres procesos podrían estar frecuentemente regulados por vías de señalización análogas, involucrarían orgánulos y sitios subcelulares comunes, e incluso compartirían moléculas iniciadoras y efectoras^[4].

Uno de los procesos biológicos más estudiados es la **apoptosis** (del griego antiguo *ἀπόπτωσης*, que significa “desprenderse de algo”), descrita por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para referirse a un tipo de muerte celular en el que intervienen mecanismos bioquímicos dependientes de energía y cuyas características morfológicas difieren de las observadas en la necrosis clásica^[2,5-7]. La apoptosis tiene un papel vital en procesos como la renovación celular, el desarrollo embrionario o el desarrollo y el correcto funcionamiento del sistema inmunitario^[6]. Además, el equilibrio entre apoptosis y proliferación celular, asociado también a la autofagia, es necesario para mantener la homeostasis celular, tisular y del organismo^[8,9]. Sin embargo, además de su importante papel en condiciones fisiológicas, la apoptosis también desempeña una labor esencial en la patogénesis de muchas enfermedades. En el caso de trastornos como los degenerativos, la apoptosis se produce de forma desmesurada, mientras que en enfermedades como el cáncer, este proceso tiene lugar de forma limitada, lo que da lugar a células malignas que no son capaces de sucumbir^[5].

Las células apoptóticas sufren importantes alteraciones morfológicas y bioquímicas. Desde el punto de vista morfológico, las células reducen su volumen celular, la cromatina se condensa, el núcleo se fragmenta y se forman evaginaciones en la membrana plasmática que, finalmente, dan lugar a cuerpos apoptóticos, los cuales son engullidos por fagocitos adyacentes cuando este proceso tiene lugar *in vivo*. Por otra parte, los eventos bioquímicos más relevantes observados incluyen la activación de las caspasas y proteínas pro-apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, la ruptura oligonucleosomal del DNA, la exposición de la fosfatidilserina en la semicapa externa de la membrana plasmática, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la caída del potencial transmembrana de las mitocondrias^[3].

Por otro lado, la **necrosis** se ha considerado tradicionalmente como un mecanismo de muerte celular accidental desencadenado por agentes externos, entre los que se incluyen el daño mecánico, toxinas o infecciones^[3,9]. A nivel morfológico, se observa un aumento del volumen celular y del tamaño de orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico, así como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, favoreciendo la liberación del contenido intracelular, mientras que, en gran medida, el núcleo permanece intacto^[3,4]. Además, la necrosis no se suele relacionar con la activación de las caspasas y, habitualmente, estimula una respuesta inflamatoria^[4]. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito una vía de necrosis regulada, denominada **necroptosis**, que puede ser inducida *in vivo* por excitotoxinas, alquilación del DNA y la unión de determinados ligandos a sus respectivos receptores mortales^[10]. Este tipo de muerte celular regulada es bastante común en respuesta a lesiones físicas, aunque también interviene en situaciones patológicas como infecciones, isquemia y varias enfermedades neurodegenerativas^[4].

Por su parte, la **autofagia** es un proceso catabólico altamente conservado en el que proteínas de vida media larga y orgánulos intracelulares dañados se disponen en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, que terminan fusionándose con lisosomas para dar lugar a autolisosomas, en los que el material capturado es degradado finalmente por la acción de hidrolasas ácidas específicas. Por lo tanto, cuando este proceso tiene lugar a nivel basal en respuesta a señales de estrés metabólico como hipoxia, falta de nutrientes y disminución de factores de crecimiento, se promueve la renovación de las moléculas y estructuras mencionadas, lo que proporciona energía y moléculas simples a las células para mantener el metabolismo celular, favoreciendo así el crecimiento y la supervivencia celulares. No obstante, en determinadas circunstancias, un exceso de autofagia durante el desarrollo normal o la activación de la autofagia en algunas enfermedades pueden conducir a la muerte celular^[4].

1.2 Rutas de señalización de la apoptosis

Los mecanismos que conducen a la apoptosis celular son muy complejos y sofisticados, y en cada uno de ellos interviene una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. Hasta ahora se han descrito varias vías apoptóticas, siendo las principales la **vía extrínseca o de receptores mortales** y la **vía intrínseca o mitocondrial**, entre las que se establece una conexión y, por lo tanto, las moléculas de una de las vías pueden intervenir en la otra^[6]. No obstante, también se conocen dos rutas apoptóticas adicionales: la vía de perforina/granzima, que es específica de linfocitos citotóxicos (CTL y NK) y la apoptosis puede ser inducida por la granzima A o la granzima B; y la vía intrínseca del retículo endoplásmico, de la que todavía no se tiene mucha información^[5,6]. Pese a que cada ruta activa su propia cascada de señalización, las vías intrínseca, extrínseca y aquella en la que interviene la granzima B convergen en la activación de una de las principales proteínas ejecutoras de la apoptosis, la caspasa 3^[6].

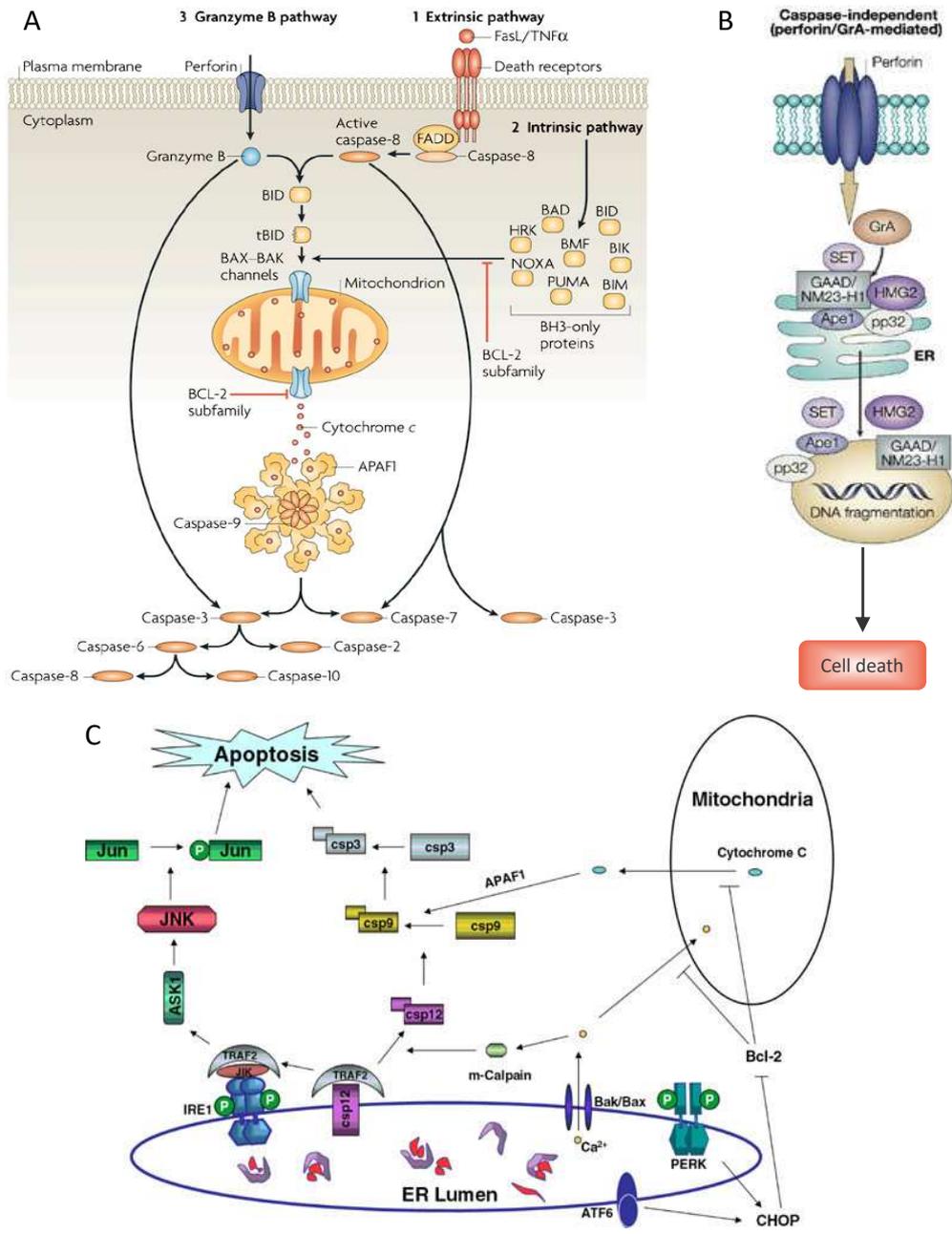


Figura 1.1. Rutas de activación de la apoptosis. A. Vías extrínseca e intrínseca y vía de perforina/granzima B^[11]; **B.** Vía perforina/granzima A^[12]; **C.** Vía intrínseca del retículo endoplásmico^[13].

La vía extrínseca (Fig. 1.1A) se inicia cuando determinados ligandos solubles de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) se unen a receptores específicos localizados en la superficie celular, los cuales forman una estructura trimérica, se activan y transmiten la señal apoptótica al interior celular. Los ligandos mejor caracterizados que están implicados en esta vía son Fas/CD95 ligando (FasL/CD95L), TRAIL y TNF α , que se unen a los receptores Fas/CD95, DR-4/DR-5 y TNFR-1, respectivamente^[14]. Estos receptores contienen un “dominio mortal” citoplasmático conservado (DD) que recluta proteínas que poseen este dominio, las cuales se unen principalmente a la pro-caspasa 8, aunque también pueden unirse a la pro-caspasa 10, dando lugar a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC, “death-inducing signaling complex”), que regula la activación de estas caspasas iniciadoras^[10,14]. Finalmente, estas caspasas en su forma activa escinden las pro-caspasas efectoras 3, 6 y 7, que adoptan

su conformación activa, provocando la degradación celular que tiene lugar en la fase final de la apoptosis^[14].

Por otra parte, la vía intrínseca (Fig. 1.1A) puede ser desencadenada por diferentes estímulos intracelulares, como son la hipoxia, el estrés oxidativo, la privación de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, daño en el DNA, altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico o infecciones virales entre otros, que terminan induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y la liberación de factores apoptogénicos al citosol desde el espacio intermembrana de la mitocondria^[5,6,14]. Una de las moléculas liberadas es el citocromo c, que se une a Apaf-1 (“apoptotic protease-activating factor 1”), iniciando así la formación del apoptosoma, un complejo multi-proteína fundamental para el reclutamiento de la pro-caspasa 9 y su posterior activación. Una vez activada esta caspasa iniciadora, es capaz de activar la pro-caspasa 3, la cual promueve la ejecución de la apoptosis^[14]. Otros factores liberados son HtrA2 (“high temperature requirement protein A2”)/Omi y Smac/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspase”/“direct IAP-binding protein with low pI”), que proteolizan o se unen a los inhibidores de proteínas apoptóticas (IAP), respectivamente, bloqueando su actividad; y el factor inductor de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG), que se translocan al núcleo y llevan a cabo la fragmentación del DNA a gran escala a través de un mecanismo independiente de caspasas^[5,10,14].

En cuanto a los linfocitos T citotóxicos (CTL), aunque estos son capaces de actuar a través de la vía apoptótica de receptores mortales, principalmente gracias a la interacción de Fas ligando y el receptor de Fas (FasL/Fas), este tipo de linfocitos y las células “natural killer” (NK) disponen, además, de la vía de perforina/granzima para hacer frente a células tumorales e infectadas por virus. En primer lugar, los linfocitos secretan perforina, que forma poros transmembrana en las células diana y, posteriormente, son liberadas dos serín-proteasas, la granzima A y la granzima B, que se localizan en el interior de los gránulos citoplásmicos de las células efectoras y se introducen en las células diana a través de los poros generados por la perforina. El mecanismo de inducción de la apoptosis de ambas granzimas es diferente, ya que la granzima A (Fig. 1.1B) actúa por una vía independiente de caspasas mediante la cual el DNA termina degradándose, mientras que la granzima B (Fig. 1.1A) es capaz de activar las pro-caspasas 3 y 10 y, además, puede participar en la vía mitocondrial al procesar Bid e inducir la liberación del citocromo c, amplificando así la señal de muerte^[6].

Más recientemente se ha propuesto la existencia de una nueva vía que llevaría a las células a la apoptosis, la vía intrínseca del retículo endoplásmico (Fig. 1.1C), la cual sería dependiente de la caspasa 12 e independiente de la mitocondria. Cuando el retículo es sometido a formas de estrés como hipoxia, radicales libres o la privación de glucosa, las proteínas se despliegan, la síntesis proteica se reduce y el factor 2 asociado al receptor de TNF se disocia de la pro-caspasa 12, favoreciendo la activación de esta cisteín-proteasa^[5].

1.3 Proteínas de la familia Bcl-2 y miméticos BH3

1.3.1 Familia de proteínas Bcl-2

Un grupo de proteínas que desempeñan un papel regulador esencial en la vía mitocondrial de la apoptosis es el constituido por las proteínas de la familia Bcl-2, ya que controlan la integridad de la membrana mitocondrial externa e inducen o evitan la liberación de factores apoptogénicos desde el espacio intermembrana mitocondrial^[15-17]. Todos los miembros de esta familia poseen al menos uno de los 4

dominios de homología Bcl-2 (BH) (BH1-BH4), cada uno de ellos constituido por un motivo α -helicoidal conservado, y muchos de ellos disponen de un segmento C-terminal hidrofóbico que les permite interactuar con la membrana nuclear, el retículo endoplásmico y la membrana mitocondrial externa^[14,18]. Atendiendo a su función, es posible distinguir entre proteínas anti- y pro-apoptóticas, y estas últimas, a su vez, pueden clasificarse en proteínas pro-apoptóticas multidominio y pro-apoptóticas “solo-BH3”^[17].

La mayoría de las proteínas anti-apoptóticas de esta familia, entre las que se incluyen Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w, contienen los cuatro dominios BH, a excepción de Mcl-1 y Bfl-1/A1, que carecen del dominio N-terminal BH4^[15,19]. Sin embargo, todas ellas adoptan una estructura globular en la que 7 hélices α anfipáticas se disponen alrededor de una hélice central hidrofóbica, dando lugar a la formación de un bolsillo hidrofóbico entre los dominios BH1, BH2 y BH3 capaz de interactuar con el dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas^[20]. En concreto, esta interacción se produce fundamentalmente en la membrana mitocondrial externa, ya que esta es la localización habitual de las proteínas anti-apoptóticas y, además, constituye el punto de anclaje para muchos de los otros miembros de la familia durante la apoptosis^[18]. Estas proteínas inhiben la apoptosis mediante su unión a las proteínas “solo-BH3” y a los miembros pro-apoptóticos multidominio, inactivándolos^[15,21].

Las proteínas pro-apoptóticas multidominio, cuyos principales representantes son Bax y Bak, poseen tres de los dominios BH^[15]. En su estado inactivo adquieren una conformación muy similar a la que adoptan las proteínas anti-apoptóticas, mientras que durante la apoptosis experimentan importantes cambios conformacionales que les permiten formar poros o asociarse con proteínas que los formen en la membrana mitocondrial externa, induciendo así la permeabilización de la misma y la liberación de moléculas apoptogénicas, que terminan activando las caspasas^[4,17,21].

Por otra parte, las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” como Bim, Noxa, PUMA, Bid, Bad y Bik entre otras, actúan como “sensores” del daño celular y se caracterizan por contener únicamente el dominio BH3^[15]. A diferencia de los miembros anteriores, este grupo de proteínas posee una estructura intrínsecamente desordenada en condiciones fisiológicas, pero su dominio BH3 adopta una conformación de hélice α anfipática cuando interactúa con las proteínas anti-apoptóticas^[17,20]. No obstante, Bid es una excepción, ya que los residuos de su dominio BH3 están ocultos en su estado inactivo, quedando expuesto al generarse la forma truncada activa^[20].

1.3.2 Modelos de activación de Bax y Bak

Las proteínas “solo-BH3” están implicadas en la iniciación de la vía intrínseca de la apoptosis al inducir la activación de Bax y Bak (Fig. 1.1); sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual se regula dicha activación. Tradicionalmente, se han propuesto dos modelos para explicar las interacciones que tienen lugar entre los miembros de esta familia: el modelo directo y el modelo de desplazamiento^[22]. Según el modelo directo (Fig. 1.2A), Bax y Bak se activarían mediante su unión directa a determinadas proteínas “solo-BH3”, que se clasifican en activadoras o sensibilizadoras^[21]. Así, las activadoras incluirían tBid, Bim y posiblemente PUMA, y estas se unirían tanto a las proteínas anti-apoptóticas como a las pro-apoptóticas multidominio, mientras que las sensibilizadoras, donde se incluyen Bik, Bad, Noxa, Hrk, Bmf y Bnip3, interactuarían con las proteínas anti-apoptóticas, liberando así a las proteínas “solo-BH3” activadoras, que promoverían la permeabilización de la membrana mitocondrial externa^[20,21]. Por otra parte, en el modelo indirecto o de desplazamiento (Fig. 1.2B), Bax y Bak serían activos de forma constitutiva, por lo que estarían inhibidos por las proteínas anti-apoptóticas para

garantizar la supervivencia celular. Sin embargo, al iniciarse la apoptosis, las proteínas “solo-BH3” neutralizarían a las anti-apoptóticas, favoreciendo así la liberación de Bax y Bak y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa^[20,21].

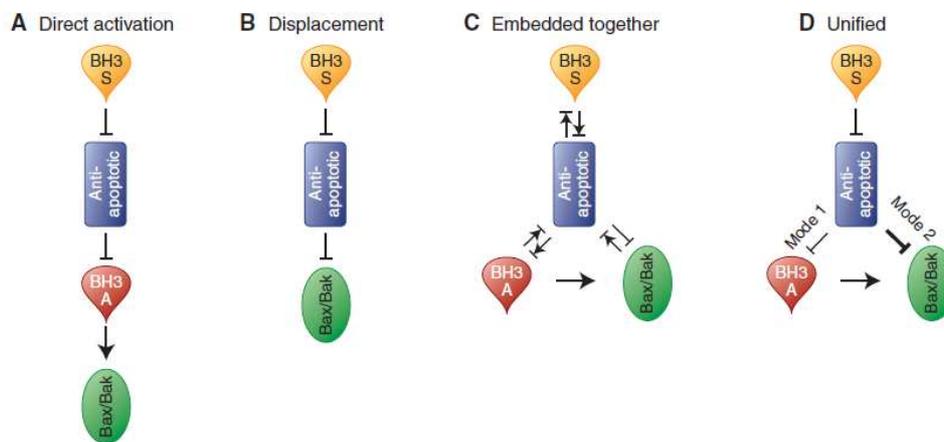


Figura 1.2. Modelos propuestos para la regulación de la activación de Bax y Bak. A. Modelo directo; **B.** Modelo indirecto o de desplazamiento; **C.** Modelo “embedded together”; **D.** Modelo unificado^[21].

Más recientemente han surgido dos nuevos modelos de regulación, conocidos como modelo “embedded together” y modelo unificado. A diferencia de los anteriores, el modelo “embedded together” (Fig. 1.2C) otorga un papel activo a la membrana mitocondrial, aunque incorpora las principales características de los modelos anteriormente descritos. En concreto, las proteínas “solo-BH3” sensibilizadoras neutralizarían la doble función de las proteínas anti-apoptóticas al interrumpir su unión con las proteínas “solo-BH3” activadoras y las formas activadas de Bax y Bak, de manera que estas últimas podrían oligomerizar e inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa gracias a su interacción con las proteínas “solo-BH3” activadoras. Además, estas proteínas activadoras también serían capaces de unirse a las proteínas anti-apoptóticas y promover su inserción en la membrana mitocondrial, aunque estas no podrían unirse a las proteínas pro-apoptóticas multidominio, por lo que las proteínas activadoras actuarían como sensibilizadores^[21]. Por último, el modelo unificado (Fig. 2D) se basa en el modelo anterior y, además, tiene en cuenta la dinámica mitocondrial. En este caso, las proteínas anti-apoptóticas actuarían de dos formas distintas: bloqueando a las proteínas “solo-BH3” activadoras (modo 1) y uniéndose a Bax y Bak activados (modo 2). Sin embargo, aunque ambos procesos tendrían lugar de forma simultánea en la célula, la inhibición de la apoptosis a través del modo 1 sería menos eficiente para este modelo y, por lo tanto, a las proteínas “solo-BH3” sensibilizadoras les resultaría más fácil evitar la inhibición de la apoptosis a través de esta vía. A pesar de que ambos modelos tienen en cuenta el papel de la mitocondria en las interacciones y las proteínas anti-apoptóticas llevan a cabo una doble función en los dos escenarios, la diferencia entre ellos reside en que, en el modelo “embedded together”, las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 estarían determinadas por equilibrios competitivos, mientras que el modelo unificado no los contemplaría^[21].

1.3.3 Miméticos BH3

El hecho de que las proteínas “solo-BH3” puedan ser un factor decisivo en la vía mitocondrial de la apoptosis ha favorecido la aparición de una nueva aproximación para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales basada en la reproducción de la actividad pro-apoptótica de estas proteínas. Concretamente, se han desarrollado compuestos orgánicos de pequeño tamaño que pretenden imitar los

dominios BH3 de dichas proteínas, conocidos como **miméticos BH3**, ya que son capaces de unirse de forma específica al bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, activando así la apoptosis de forma directa en las células tumorales^[15-17].

Hasta ahora, son varios los miméticos BH3 desarrollados, pero uno de los mejor caracterizados y sobre el que se han realizado numerosos ensayos clínicos es ABT-737 (ver estructura en Anexo 1)^[15]. Esta molécula, desarrollada por la farmacéutica estadounidense Abbot Laboratories, se une con gran afinidad a Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w ($K_i \leq 1$ nM) pero débilmente a Mcl-1 y Bfl-1/A1 ($K_i > 1$ μ M), y actúa como mimético funcional del dominio BH3 de la proteína “solo-BH3” Bad^[15,16]. En concreto, ABT-737 sustituye a las proteínas “solo-BH3” propias de las células, que de esta manera pueden unirse a Mcl-1 y A1, e incluso algunas de ellas interaccionan con Bax/Bak, desencadenando la muerte de las células tumorales por un mecanismo dependiente de la vía de Bax/Bak^[17]. Este compuesto es tóxico para varias líneas celulares, ya que muestra una fuerte actividad frente a varias líneas procedentes de leucemias y linfomas y frente a células primarias obtenidas de pacientes; además, si se combina con otros fármacos antitumorales, muestra un efecto sinérgico en linfomas, leucemias y tumores sólidos, ya que potencia su efecto citotóxico^[15,16]. Asimismo, se ha visto que es capaz de inducir la apoptosis de forma selectiva en células de mieloma múltiple, sin afectar a las células normales, y que muestra actividad como agente único en xenoinjertos de leucemia linfoblástica aguda^[16]. Sin embargo, pese a todas estas características, su utilización en clínica es limitada debido a su mala biodisponibilidad y a su baja solubilidad en medio acuoso. Por ello, se ha desarrollado ABT-263 (o navitoclax), un análogo de ABT-737 que mantiene la selectividad por las mismas dianas y la eficacia antitumoral, el cual presenta la ventaja de poder administrarse por vía oral y que actualmente se encuentra en fases I y II de ensayos clínicos^[15].

No obstante, ambos compuestos afectan a las células normales, ya que inducen trombocitopenia debido a que las plaquetas dependen de Bcl-X_L para sobrevivir^[16]. Esto ha provocado la aparición de otro mimético BH3 derivado de ABT-263, ABT-199 (o venetoclax), que es altamente específico para Bcl-2 ($K_i < 0,01$ nM), mientras que muestra una baja afinidad por Bcl-X_L y Bcl-w. Según los modelos preclínicos, este compuesto presenta una eficacia similar a los fármacos anteriores para promover la muerte de células tumorales dependientes de Bcl-2 pero no induce trombocitopenia. Actualmente, se están llevando a cabo multitud de ensayos clínicos con venetoclax en distintos tipos de cáncer, como leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin entre otros, algunos de los cuales se encuentran en fases de estudio muy avanzadas. Además, ABT-199 se convirtió en 2016 en el primer mimético BH3 en ser aprobado por la FDA (“Food and Drug Administration”, EE.UU.) para el tratamiento de pacientes con leucemia linfocítica crónica que porten la delección p17 y que hayan recibido previamente una terapia antitumoral como mínimo^[15].

Por otra parte, algunos miméticos BH3 desarrollados recientemente son WEHI-539, que muestra una alta especificidad por Bcl-X_L, al igual que A-1155463, aunque este último compuesto tiene un efecto considerablemente más potente en líneas celulares dependientes de Bcl-X_L. En concreto, la afinidad de A-1155463 por Bcl-X_L está en el rango picomolar ($K_i < 0,01$ nM), mientras que su afinidad por Bcl-2, Bcl-w y Mcl-1 es más baja ($K_i = 80$ nM; $K_i = 19$ nM; $K_i = 440$ nM, respectivamente). Este fármaco se ha ensayado en ratones, en los que provocaba una trombocitopenia reversible, y en xenoinjertos procedentes de la línea H146 (cáncer de pulmón de células pequeñas), inhibiendo el crecimiento tumoral de los xenoinjertos tras administrar varias dosis^[23]. Por otra parte, existen algunos compuestos poco potentes contra Mcl-1 que solo se utilizan en ensayos *in vitro*, pero todavía no se han conseguido

inhibidores de esta proteína que sean efectivos en clínica, a pesar de que esta está sobreexpresada en varios cánceres, entre los que se incluye la leucemia mieloide aguda, distintos tipos de linfomas, el mieloma múltiple y determinados cánceres de mama. No obstante, en los últimos años se han desarrollado algunos inhibidores selectivos y de potencia variable, como son S63845^[24] y A-1210477^[25]. Mientras que S63845 es un inhibidor muy potente de Mcl-1 ($K_i = 1,2$ nM), A-1210477 tiene una afinidad por Mcl-1 aproximadamente 20 veces menor; además, la potencia mostrada por este inhibidor en la línea celular de mieloma múltiple H929 es alrededor de 1000 veces menor que la que muestra S63845. Esta diferencia de potencia puede deberse a la menor afinidad que tiene A-1210477 por Mcl-1 en comparación con el otro inhibidor, y a que este compuesto se une a las proteínas séricas, limitando así su biodisponibilidad. Por otra parte, el potencial terapéutico de S63845 se extiende a diversos modelos de tumores sólidos, ya sea actuando como agente único o combinado con inhibidores de quinasas oncogénicas^[24].

Actualmente, existen muchos ensayos clínicos en los que se está estudiando la combinación de diferentes miméticos BH3 con otros compuestos quimioterápicos convencionales en diversos tipos de cáncer, por lo que esta aproximación podría considerarse una estrategia antitumoral interesante^[15].

1.4 Métodos de estudio de las interacciones entre proteínas

Las interacciones que se producen a nivel molecular constituyen un mecanismo esencial para la integración y la transferencia de información en las células^[26]. Concretamente, las interacciones que se establecen entre proteínas conforman una red molecular que coordina las funciones celulares, por lo que dichas interacciones se han convertido en el objeto de estudio de una nueva disciplina, la interactómica^[26-28]. En concreto, en el caso de las proteínas de la familia Bcl-2, las interacciones que se establecen entre ellas son clave en la regulación de la apoptosis^[16], como se ha visto en el apartado anterior. Debido a la valiosa información que pueden aportar estas interacciones acerca de la regulación de muchos procesos biológicos, entre ellos la apoptosis, se han desarrollado multitud de métodos que permiten estudiarlas, ya sea de forma directa o en células vivas y organismos modelo^[27,29]. La mayoría de las técnicas que permiten detectar estas interacciones de manera directa, como son los ensayos de precipitación por afinidad y de co-purificación, precisan la extracción de las proteínas de su entorno nativo; sin embargo, la visualización de las interacciones en células vivas puede realizarse directamente sin apenas alterar el entorno natural en el que se producen^[27].

Existen varias estrategias para visualizar las interacciones entre proteínas en células vivas, aunque las más comunes son la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), basada en la transferencia de energía de excitación entre dos fluoróforos que se encuentran próximos en el espacio y que poseen orientaciones relativas permisivas, y la técnica BiFC (“Bimolecular Fluorescence Complementation”), que ha ganado popularidad en los últimos años y es la metodología en la que se basa este trabajo^[27].

La técnica BiFC está basada en la complementación estructural entre los fragmentos N- y C-terminales no fluorescentes de una proteína fluorescente, cada uno de los cuales se encuentra fusionado a una de las proteínas de estudio. Si estas proteínas interactúan, ambos fragmentos se aproximan dando lugar a la formación de la proteína fluorescente intacta (Fig. 1.3)^[29]. Para que se reconstituya esta proteína, es necesario que los fragmentos dispongan de la flexibilidad dinámica suficiente que les permita moverse de forma independiente, por lo que las proteínas de interés y los fragmentos suelen estar unidos mediante conectores^[27]. En la actualidad, existe una gran variedad de proteínas fluorescentes con propiedades

físico-químicas y espectrales diferentes; sin embargo, solo algunas de ellas son útiles para los ensayos de complementación de la fluorescencia^[29]. De todas ellas, Venus es la proteína más ampliamente utilizada, ya que es la proteína fluorescente más brillante que se ha identificado y los fragmentos que la constituyen generan la mayor intensidad de fluorescencia observada al producirse la complementación^[26]. Además, se ha visto que la fluorescencia de fondo emitida por esta proteína es muy baja en comparación con el resto de las combinaciones realizadas^[29].

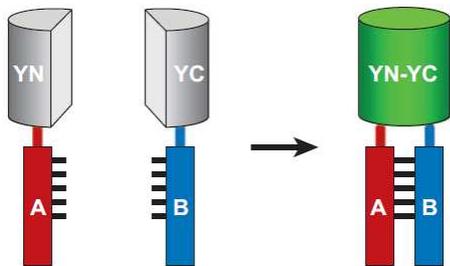


Figura 1.3. Representación esquemática de los complejos BiFC^[27].

Un aspecto importante en este tipo de ensayos es la incorporación de los controles adecuados. En concreto, se utilizan tres controles: uno negativo, que permite determinar si la interacción a estudiar es específica; uno positivo para confirmar que se puede detectar una interacción conocida; y un control interno con el fin de normalizar las diferencias en las eficiencias de transfección, así como los niveles de expresión en células individuales^[27,30]. El control negativo ideal consiste en la introducción de una mutación o la delección de una pequeña región de la superficie de interacción de una de las dos proteínas de estudio, mientras que el control positivo lo constituye una proteína de fusión cuya interacción es conocida^[27,29]. Por otra parte, se utiliza como control interno una proteína fluorescente completa cuyas características espectrales difieran de las que se observan en la complementación^[31].

Esta técnica permite la visualización de interacciones proteicas tanto débiles como transitorias o estables de forma simple y directa, sin la necesidad de poseer un conocimiento estructural previo sobre la interacción de las proteínas de estudio^[27,32]. Además, es la técnica más utilizada para determinar la localización subcelular en la que se producen dichas interacciones, lo que proporciona información sobre las funciones biológicas de los complejos formados y de la regulación de su localización^[30,32]. Por otra parte, se pueden realizar análisis cualitativos del nivel de expresión de las proteínas de fusión generadas mediante ensayos de Western Blot, y de la localización subcelular de las interacciones a través de microscopía invertida de fluorescencia o de microscopía confocal de barrido láser; no obstante, también es posible realizar un análisis cuantitativo utilizando citometría de flujo^[28-30].

Sin embargo, este método también presenta algunas limitaciones. Una de ellas es que los fluoróforos necesitan un tiempo de maduración, por lo que no es posible detectar cambios rápidos o a tiempo real en las interacciones^[27]. Por otra parte, la mayoría de los fragmentos tienden a asociarse de forma espontánea independientemente de la interacción que exista entre las proteínas a las que están fusionados^[28,32]. Esto, unido a la formación de complejos irreversibles, hace que los falsos positivos se acumulen con el tiempo^[28]. Además, esta complementación irreversible no facilita el estudio de interacciones dinámicas aunque supone una gran ventaja para el estudio de interacciones transitorias o débiles^[29].

1.5 Fármacos antimitóticos

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la división y la muerte celular; sin embargo, esta situación de estabilidad se pierde durante el desarrollo del cáncer^[5]. Una de las causas de este desequilibrio es la mayor tasa de proliferación que presentan las células tumorales en comparación con las células normales, por lo que algunos de los tratamientos actuales se basan en el uso de fármacos antimitóticos^[33].

Un evento de especial relevancia durante la mitosis es la reorganización de los microtúbulos, ya que se encarga de la reorganización de los centrosomas y de la correcta distribución de las cromátidas hermanas en las células hijas^[33]. Actualmente, existen varias familias de compuestos que inhiben la dinámica de los microtúbulos y activan el punto de control de la mitosis (SAC, “Spindle Assembly Checkpoint”), el cual bloquea el paso de la metafase a la anafase^[34]. Esto hace que las células entren en un estado de detención prolongado, denominado “arresto mitótico”, aunque pueden escapar de él a través de un proceso conocido como “deslizamiento mitótico” (en inglés, “mitotic slippage”), que puede ir seguido de la muerte celular, la entrada a un estado de senescencia o el inicio de un nuevo ciclo de división que conduce a un estado de poliploidía (endorreduplicación). Dos familias de este tipo de compuestos, los alcaloides de la vinca y los taxanos, se clasifican como agentes anti-microtúbulos (MTA) clásicos e interactúan con la misma diana, la β -tubulina. Sin embargo, los efectos que provocan son diferentes: los alcaloides de la vinca, entre los que se incluye vincristina (ver estructura en Anexo 1), impiden la polimerización de los microtúbulos, mientras que taxanos como docetaxel (ver estructura en Anexo 1) estabilizan los microtúbulos preexistentes, previniendo así la formación del huso mitótico. A pesar de que ambas clases de fármacos se utilizan hoy en día en el tratamiento de varios tipos de tumores, entre ellos el cáncer de mama, de pulmón, el linfoma no Hodgkin y la leucemia aguda, su eficacia como agentes únicos es limitada y, además, provocan importantes efectos secundarios, como neurotoxicidad y neutropenia. Por lo tanto, estas limitaciones han favorecido la búsqueda de nuevos fármacos específicos de la mitosis más potentes y cuyos efectos secundarios sean mínimos. Así, en los últimos años se han desarrollado diversos inhibidores que tienen como dianas las proteínas motoras de los microtúbulos y distintas quinasas específicas de la mitosis (Fig. 1.4)^[33].

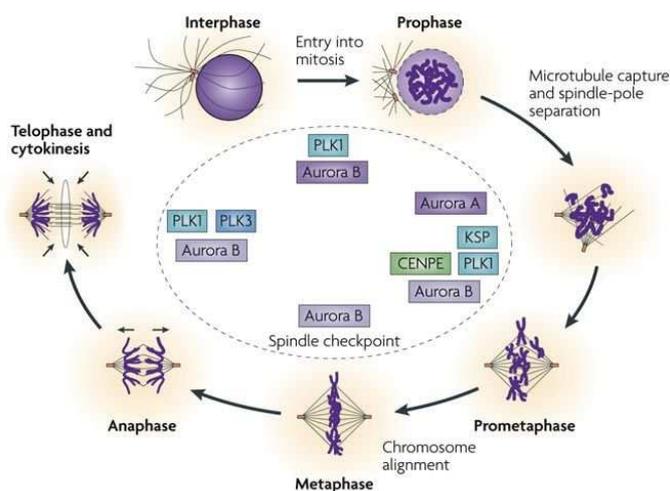


Figura 1.4. Fases de la mitosis y varias proteínas reguladoras de este proceso que pueden actuar como dianas de distintos fármacos antimitóticos^[35].

Una pequeña familia de serín/treonín quinasas que se expresan durante la división celular y que intervienen en el control de dicho proceso es la familia Aurora, compuesta por tres isoformas en células de mamífero (Aurora A, B y C), que difieren en la localización subcelular en la que se encuentran y en las funciones que llevan a cabo^[36]. En concreto, Aurora quinasa A controla la entrada en mitosis, la

maduración de los centrosomas y su separación, el ensamblaje del huso mitótico y el correcto alineamiento cromosómico en la metafase, mientras que Aurora quinasa B es el componente catalítico del CPC (“chromosomal passenger complex”), el cual interviene en la fosforilación de la histona H3, la segregación cromosómica y la citocinesis^[37-39]. Por lo tanto, al tratarse de proteínas con funciones clave en la división celular, su desregulación tiene importantes consecuencias intracelulares, lo que las convierte en dianas interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos antimitóticos^[36]. Dos ejemplos de este tipo de compuestos son alisertib y barasertib (ver estructuras en Anexo 1), los cuales se encuentran actualmente en distintas fases de ensayos clínicos^[38]. En concreto, alisertib es un inhibidor de segunda generación potente y selectivo de Aurora A que puede administrarse por vía oral^[38]. Este inhibidor induce la formación defectuosa del huso mitótico y aumenta las alteraciones en la alineación cromosómica^[40]. Además, actúa sobre una gran diversidad de tumores, como el cáncer de mama, de páncreas y la leucemia entre otros, induciendo la parada del ciclo celular en la fase G2/M, poliploidía, aneuploidía, catástrofe mitótica y la muerte celular a través de la vía apoptótica mitocondrial^[38]. No obstante, se han observado varios efectos adversos, como anemia, alopecia y varios trastornos intestinales, aunque el efecto secundario más frecuentemente detectado es la neutropenia^[41]. Por su parte, barasertib es un inhibidor altamente potente y selectivo de Aurora B ($K_i = 1 \text{ nM}$) en comparación con Aurora A ($K_i = 1,4 \text{ }\mu\text{M}$), aunque también muestra una alta especificidad por otras 50 quinasas^[36,39]. *In vitro*, esta molécula induce la desalineación cromosómica e inhibe la citocinesis en las células tumorales, permitiendo, sin embargo, la endorreduplicación, que da lugar a células gigantes multinucleadas con una dotación cromosómica superior a $4n$. Por lo tanto, todo esto afecta a la viabilidad celular y promueve la apoptosis^[36,39]. Por otro lado, en las primeras fases de ensayos clínicos en pacientes con leucemia mieloide aguda, se ha observado respuesta en el 19-25 % de los pacientes al utilizar barasertib como agente único; sin embargo, su aplicación en tumores sólidos no parece efectiva debido a la aparición de neutropenia^[39].

2 Hipótesis y objetivos

Las interacciones que se establecen entre las proteínas de la familia Bcl-2 constituyen un elemento esencial en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis^[16]. Más concretamente, intervienen en la regulación de la activación de las proteínas Bax y Bak, capaces de oligomerizar y permeabilizar la membrana mitocondrial externa, liberándose así distintos factores apoptogénicos que desencadenan la activación de las caspasas^[4,21,42]. Hasta la fecha, se han descrito cuatro modelos distintos que podrían explicar el mecanismo de regulación de la activación de las proteínas pro-apoptóticas multidominio, proponiendo cada uno de ellos diferentes interacciones entre los miembros de esta familia^[21]. No obstante, a pesar de los diferentes estudios que se han realizado, todavía no se ha esclarecido el mecanismo concreto por el que se regula dicha activación, así como el papel de los miembros pro-apoptóticos “solo-BH3” en este proceso como activadores y/o sensibilizadores^[21,22].

Por otra parte, el continuo desarrollo de compuestos con potencial antitumoral basados en la imitación del dominio BH3 de las proteínas “solo-BH3” ha supuesto una nueva línea de investigación en el tratamiento del cáncer, ya que estas moléculas pueden inducir la muerte por apoptosis en las células tumorales uniéndose específicamente al bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas^[15-17]. No obstante, el estudio con otros compuestos, como los fármacos antimitóticos, no se ha abandonado, e incluso se ha comenzado a evaluar el potencial terapéutico de la combinación de ambos tipos de compuestos^[43-45], una estrategia que ha arrojado resultados prometedores en el tratamiento antitumoral.

Todo esto ha hecho que el grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer” se haya adentrado en los últimos años en estudio de estas interacciones en células intactas mediante la técnica BiFC (“Bimolecular Fluorescence Complementation”), utilizando proteínas de fusión compuestas por las proteínas de la familia Bcl-2 y los fragmentos N- y C- terminales no fluorescentes de la proteína fluorescente Venus, en las que se modificaba la localización de estos fragmentos para determinar la configuración que permitiera detectar una mayor interacción entre las proteínas de estudio. Los resultados que obtuvieron en varios trabajos demuestran la interacción directa de las proteínas anti-apoptóticas con las proteínas “solo-BH3”, así como la interacción de ambas con Bax y Bak, sugiriendo que las proteínas “solo-BH3” pueden actuar como activadoras y sensibilizadoras, y que su activación se produce a través de un modelo que aúna las principales características de los modelos directo y de desplazamiento, como pueden ser el modelo “embedded together” o el modelo unificado.

Dada la trascendencia de estas interacciones en la vía apoptótica mitocondrial, en uno de estos estudios se evaluó el efecto que tenían sobre ellas los miméticos BH3 ABT-737 (inhibidor de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w) y ABT-199 (inhibidor específico de Bcl-2), observándose una menor interacción entre las proteínas “solo-BH3” y las dianas de cada compuesto excepto en el caso de PUMA, así como una mayor afinidad de los miembros anti-apoptóticos por Bax y Bak, lo que indicaría que estas últimas interacciones se producen a través de una superficie alternativa al bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas.

Por otra parte, en trabajos de este mismo grupo se han ensayado varios fármacos antimitóticos y miméticos BH3 sobre distintas líneas celulares, las cuales han mostrado una eficacia variable en función de la diana farmacológica y de la línea celular. Asimismo, también se han realizado combinaciones con compuestos de ambas familias que, en algunos casos, inducían un efecto sinérgico.

Así pues, teniendo en cuenta todo esto, son varias las hipótesis que se plantean en este trabajo. Por una parte, las proteínas “solo-BH3” actuarían como activadoras y sensibilizadoras al evaluar sus interacciones con demás miembros de la familia, y que, en presencia de los nuevos miméticos BH3 A-1155463 (inhibidor selectivo de Bcl-X_L) y A-1210477 (inhibidor específico de Mcl-1), las interacciones de los miembros “solo-BH3” con las proteínas anti-apoptóticas se interrumpirían, mientras que se potenciarían las interacciones con Bax/Bak. Además, ambos compuestos ejercerían un efecto citotóxico en aquellas células que sobreexpresaran Bcl-X_L o Mcl-1. Asimismo, las células A549 mostrarían una sensibilidad variable a ABT-737 y ABT-199. Finalmente, la combinación de los nuevos miméticos BH3 con los fármacos antimitóticos barasertib (inhibidor de Aurora quinasa B), alisertib (inhibidor de Aurora quinasa A), vincristina (alcaloide de la vinca) y docetaxel (taxano) induciría sinergia.

De esta forma, se pretenden estudiar, por una parte, las interacciones que se establecen entre las proteínas de la familia Bcl-2 en presencia y en ausencia de los miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477. Por otro lado, se busca evaluar el potencial terapéutico de ABT-737, ABT-199 y de los nuevos miméticos BH3, así como de la combinación de estos últimos con los fármacos antimitóticos señalados anteriormente. Para ello, los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Construir vectores pBiFC para las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa fusionadas en su extremo amino a los fragmentos VN- y VC- de Venus y estudiar las interacciones que establecen el resto de las proteínas de la familia Bcl-2 mediante la técnica BiFC.

2. Analizar el efecto de los nuevos miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477 sobre estas interacciones mediante la misma técnica en células HeLa.
3. Evaluar el efecto citotóxico de los miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477 en las líneas celulares de mieloma múltiple RPMI 8226, U266 y MM.1S, y en el caso de las células A549, también el de ABT-737 y ABT-199.
4. Estudio del potencial terapéutico derivado de la combinación de A-1155463 y A-1210477 con barasertib, alisertib, vincristina y docetaxel en la línea celular A549.

3 Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares

En este trabajo se han utilizado varias líneas celulares. Por un lado, las células **U266**, **RPMI 8226** (cedidas por Martine Amiot; CRCINA, Nantes) y **MM.1S** (cedidas por Atanasio Pandiella; CIC, Universidad de Salamanca) proceden de sangre periférica de pacientes con mieloma múltiple. Todas ellas son linfocitos B que producen y secretan distintos tipos de inmunoglobulinas, concretamente IgE y la cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas (células U266), la cadena ligera lambda (células RPMI 8226) e inmunoglobulinas del isotipo IgA-lambda (células MM.1S). Puesto que todas ellas son células procedentes del torrente sanguíneo, estas crecen en suspensión, aunque las células MM.1S también pueden formar una ligera monocapa sobre el sustrato^[46-48]. Por otra parte, se utilizaron las líneas celulares **A549** y **HeLa**. La línea A549 procede de un adenocarcinoma de pulmón humano y fue establecida en 1972 por D. J. Giard y otros a partir de explantes de tejido carcinomatoso pulmonar de un paciente^[49]. Por su parte, las células HeLa proceden de un adenocarcinoma de cuello de útero de una mujer afroamericana. Esta línea celular fue establecida en 1952, por lo que constituye la primera línea celular tumoral continua de origen humano y, además, es una de las líneas más utilizadas en laboratorios de cultivos celulares^[50]. Tanto las células A549 como las células HeLa tienen una morfología de tipo epitelial y son células adherentes que crecen en monocapa.

El cultivo de las células en suspensión se realizó en medio RPMI 1640 completo (en inglés, “Roswell Park Memorial Institute”) y el de las células adherentes en medio DMEM completo (en inglés, “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”). Estos medios consistían en medio RPMI 1640 o DMEM comercial, suplementados en ambos casos con suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich*) al 10 % (v/v), GlutaMAX™ (*Gibco*) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml, *Sigma-Aldrich*).

3.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares

La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical (*Telstar Bio-II-A/P*), y los cultivos se mantenían en un incubador termostatzado (Heraeus Heracell 150i, *Thermo*) a 37 °C, con un 5 % de CO₂ y aire saturado de humedad. Se realizaron subcultivos de forma periódica en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen final de 5 ml) o de 75 cm² (volumen final de 10 ml). En el caso de las células adherentes (A549 y HeLa), la densidad celular en la fase de confluencia era aproximadamente de 10⁵ células/cm², mientras que para las células en suspensión (RPMI 8226, U266 y MM.1S), esta densidad era de entre 8·10⁵ y 10⁶ células/ml.

En cuanto al establecimiento de subcultivos, el protocolo varía en función de las características de cada línea celular. En el caso de las células adherentes, estas se trataron con 1,5 ml (frasco de 25 cm²) o 2,5 ml (frasco de 75 cm²) de una preparación comercial de tripsina (*Gibco*; Anexo 2) y se mantuvieron de 5 a 15 minutos en el incubador termostatzado. Pasado este tiempo, se añadió medio DMEM completo

para neutralizar la acción de la tripsina, se determinó la cantidad de células totales en cada cultivo, así como su viabilidad (según se indica en el siguiente apartado), y se iniciaron nuevos subcultivos con $2 \cdot 10^5$ o $5 \cdot 10^5$ células totales en función del tamaño del frasco de cultivo y del tiempo previsto hasta el siguiente pase. Por su parte, el mantenimiento de las células en suspensión solo requería la determinación de la densidad y la viabilidad celulares y la iniciación de nuevos subcultivos con $3 \cdot 10^5$ células/ml.

3.1.2 Recuento de las células con una cámara de Neubauer

La densidad y la viabilidad de los cultivos se determinaron mediante el recuento con azul Trypan siempre que se realizaban subcultivos o se iniciaba cualquier experimento. Este colorante puede introducirse en aquellas células cuya membrana plasmática está dañada, de manera que estas se observan azules al microscopio óptico. En cada recuento se mezclaron 50 μ l de la suspensión celular con el mismo volumen de azul Trypan (Anexo 2), se dispuso parte del volumen final de la mezcla en una cámara de Neubauer (o hemocitómetro) y se llevó al microscopio óptico para realizar el recuento.

La densidad celular se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Densidad celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Donde 10^4 es el factor de corrección del volumen del hemocitómetro.

3.1.3 Criopreservación de las líneas celulares

Tras la tripsinización y la determinación de la densidad y viabilidad, las células A549 ($5,5 \cdot 10^6$ células totales) se centrifugaron a 330xg durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 800 μ l de medio DMEM completo con DMSO al 10 % (crioprotector cuyo objetivo es minimizar el daño celular durante la congelación). El volumen se trasvasó a un vial de congelación y se llevó rápidamente al congelador de -80 °C. Finalmente, pasadas 24 horas, el vial se introdujo en un contenedor de nitrógeno líquido (-196 °C), donde permaneció hasta su utilización.

Para descongelar las células, el vial se recogió en una caja con hielo y se preparó un tubo de fondo cónico con 10 ml de medio DMEM completo, a partir del cual se tomaron pequeños volúmenes que se añadieron lentamente al criotubo hasta descongelar su contenido para diluir el DMSO. La suspensión celular se centrifugó a 110xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 10 ml de medio completo y se inició un nuevo cultivo en un frasco de cultivo de 75 cm^2 con todo el volumen de la nueva suspensión celular.

3.2 Estudio de las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 mediante BiFC

En trabajos anteriores del laboratorio “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”, se han estudiado las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2^[22,31,51]. En dichos trabajos, las construcciones pBiFC fueron diseñadas de tal forma que la proteína de fusión generada tuviera el fragmento amino o carboxilo de la proteína fluorescente verde Venus (Venus-VN173 y Venus-VC155, respectivamente) fusionado al extremo carboxilo de la proteína de la familia Bcl-2 de interés (A-VN/VC). No obstante, los resultados obtenidos indicaban que la fusión de los fragmentos de Venus en el extremo carboxilo de algunas de las proteínas de la familia Bcl-2 podía afectar a su localización subcelular^[31,51]. De este modo, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido evaluar la influencia de la configuración de las fusiones usadas para BiFC en las interacciones entre las proteínas “solo-BH3” y el resto de las proteínas de la familia. Para ello, se han obtenido y evaluado los vectores pBiFC que dan lugar a las fusiones de los fragmentos

de Venus en el extremo amino de las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 (Fig. 3.1).



Figura 3.1. Representación esquemática de las proteínas de fusión generadas para los estudios de BiFC con los fragmentos de Venus-VN173 y Venus-VC155 fusionados al extremo amino de las proteínas de estudio A y B. A: Bim, PUMA y Noxa; B: Bcl-2, Mcl-1, Bim, PUMA y Noxa.

En general, el clonaje del cDNA de estas proteínas consta de dos fases principales. En primer lugar, se construyeron los vectores pBiFC, en los que las secuencias codificantes para estas proteínas se localizaban justo detrás del cDNA de los fragmentos VN173 y VC155 de la proteína fluorescente Venus, y una vez obtenidos, se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* competentes, capaces de generar grandes cantidades de los vectores de interés.

3.2.1 Construcción de los vectores pBiFC

Los plásmidos pBiFC de interés se generaron utilizando como molde otros vectores construidos en trabajos previos, los cuales poseían la secuencia codificante para el fragmento amino o carboxilo de la proteína fluorescente Venus fusionada en el extremo amino al cDNA que codifica para la proteína en cuestión^[31,51]. En concreto, los vectores pBiFC VN-A contienen la secuencia de cDNA codificante para los 173 primeros aminoácidos de la proteína Venus, mientras que los vectores pBiFC VC-A poseen la secuencia que codifica desde el aminoácido 155 hasta el final de la proteína. A continuación, estas construcciones incorporan una secuencia espaciadora o “linker”, que varía en función del tipo de vector y aporta flexibilidad, favoreciendo el correcto plegamiento de los dos fragmentos que constituyen la proteína de fusión. En particular, la secuencia espaciadora en los plásmidos pBiFC VN-A se corresponde con la de los aminoácidos RSIAT, mientras que la secuencia que poseen los vectores pBiFC VC-A es la correspondiente a la cadena aminoacídica RPACKIPNDLKQKVMNH. Finalmente, detrás del “linker” se encuentra el sitio de clonaje múltiple, que permite insertar las secuencias de interés. Por lo tanto, todo esto hace posible la generación de proteínas de fusión, compuestas por el fragmento carboxilo de la proteína fluorescente verde Venus y las proteínas Bcl-2 y Mcl-1, o el fragmento amino o carboxilo de Venus y Bim, PUMA y Noxa (Fig. 3.1).

Para la construcción de los vectores pBiFC VCBcl-2, VCMcl-1, VN/VCBim, VN/VCPUMA y VN/VCNoxa, se llevaron a cabo varios pasos que se describen a continuación.

3.2.1.1 Diseño de los oligonucleótidos

Los cebadores utilizados para amplificar las distintas secuencias a clonar incorporaban los sitios de restricción de las enzimas adecuadas para que, posteriormente, estas secuencias pudieran introducirse en sus respectivos vectores a través de estos sitios de corte. Por ello, estos oligonucleótidos se diseñaron con la ayuda de los programas informáticos NEBcutter y Oligo 7. El primero de ellos ayudó a comprobar que las enzimas utilizadas no cortaban dentro de las secuencias codificantes para las proteínas de estudio, mientras que el segundo permitió establecer el número de bases necesarias para que las características de los cebadores fueran las óptimas para el proceso de amplificación.

Para clonar el cDNA de Bcl-2, Mcl-1, Bim, PUMA y Noxa en el vector pBiFC VN-A se diseñaron un par de oligonucleótidos para cada proteína que incluían los sitios de restricción de las enzimas *NheI* y

KpnI delante del codón de inicio (extremo 5') y detrás del codón de parada (extremo 3'), respectivamente. Por otra parte, para el clonaje de estas secuencias en el vector pBiFC VC-A, los oligonucleótidos diseñados poseían el sitio de restricción de la enzima *ClaI* en el extremo 5' y el de la enzima *BglIII* en el extremo 3'. Además, en el extremo 5' de cada cebador, delante de los sitios de corte, se introdujo la misma secuencia de bases aleatorias para favorecer la unión de la enzima de restricción, ya que estas reconocen mejor su sitio de corte si este está flanqueado por otras secuencias (Anexo 3).

Puesto que los oligonucleótidos se adquirieron en estado liofilizado, estos se disolvieron en agua Milli-Q estéril para conseguir una disolución stock a 100 µM de cada uno de ellos, a partir de las cuales se prepararon diluciones 1:10 (10 µM) en un volumen final de 25 µl, y fueron estas últimas soluciones las que se utilizaron para el clonaje.

3.2.1.2 Amplificación de los cDNA de *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bim*, *PUMA* y *Noxa*

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se amplificaron los diferentes cDNA de interés mediante PCR utilizando como molde varios plásmidos generados en un trabajo previo^[31] donde la orientación de los componentes era la adecuada. En concreto, los moldes utilizados fueron los plásmidos pBiFC VNBcl-2, pBiFC VNMcl-1, pBiFC BimVN, pBiFC PUMAVC y pBiFC NoxaVN. En el caso de los dos primeros vectores, solo se llevó a cabo una amplificación, mientras que para el resto se realizaron dos amplificaciones de cada inserto, utilizando en cada una de ellas los pares de oligonucleótidos adecuados. El cDNA del inserto se consiguió amplificar correctamente a partir del plásmido molde en todos los casos, a excepción de la secuencia de PUMA, ya que para amplificarla fue necesario digerir el plásmido molde con las enzimas adecuadas (*ClaI* y *BglIII*) y purificar el inserto para utilizar este como molde, ya que la amplificación directa en el plásmido daba lugar a amplificaciones inespecíficas, posiblemente debido a que los cebadores utilizados hibridaban en otras regiones del vector distintas a la secuencia de PUMA.

En todas las reacciones de PCR realizadas se utilizó la polimerasa de alta fidelidad de *Thermococcus kodakarensis* ("AccuPrime™ Pfx SuperMix", *Invitrogen*) para evitar la introducción de mutaciones en los productos de amplificación. Con respecto a la mezcla de la reacción, esta contenía 22,5 µl de "AccuPrime™ Pfx SuperMix", una mezcla que, además de contener la DNA polimerasa, también incluía MgSO₄ y desoxinucleótidos, entre otros componentes, y a la que se añadió 1 µl de cada oligonucleótido (Directo y Reverso) a una concentración de 10 µM, 100 o 200 ng de DNA molde y agua Milli-Q estéril hasta alcanzar un volumen de 25 µl. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (2720 Thermal Cycler, *Applied Biosystem*) bajo el programa de PCR representado en la Tabla 3.1.

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
"Hot Start"	95	0,5	1
Desnaturalización	95	1	35
Hibridación	55-65	1	
Extensión	72	1,5	
Extensión final	72	5	1

Tabla 3.1. Programa de PCR utilizado para amplificar los cDNA de las proteínas de interés. Todas las temperaturas, el tiempo de duración de cada fase y el número de ciclos se mantienen constantes independientemente de la secuencia a amplificar, a excepción de la temperatura de hibridación, ya que esta varía en función de los oligonucleótidos diseñados para cada secuencia. En este caso, la temperatura de hibridación de las proteínas de estudio es: *Bcl-2*, 64,6 °C; *Mcl-1*, 62,4 °C; *Bim*, 58,8 °C; *PUMA*, 68,4 °C; *Noxa*, 57,8 °C.

3.2.1.3 Digestión de vectores VN/VC-A

De forma simultánea a la amplificación de las secuencias de interés, se realizó la digestión de los vectores pBiFC VNBax K21E/Trp139Ala y VCBak His164Ala, construidos en un trabajo previo^[31], con las enzimas adecuadas, de manera que los insertos originales se eliminaron y los plásmidos se linealizaron para introducir, posteriormente, los productos de PCR, dando lugar a los vectores pBiFC deseados.

Cada vector se incubó con la mezcla de digestión correspondiente en la estufa a 37 °C durante 3 horas. Ambas mezclas finales contenían 1 µl de las enzimas de restricción adecuadas (10 U/µl) para linealizar cada plásmido (*NheI/KpnI* para el vector pBiFC VNBax K21E/Trp139Ala y *ClaI/BglIII* para el plásmido pBiFC VCBak His164Ala; *Takara*), 2 µl del tampón de reacción óptimo para cada combinación de enzimas (tampón M 10x para *NheI/KpnI* y tampón H 10x para *ClaI/BglIII*; *Takara*), 5 µg de cada plásmido, y agua Milli-Q estéril para completar hasta un volumen de 20 µl. Además, previamente a la digestión, se comprobó que la combinación de enzimas en el tampón de reacción utilizado no presentaba la denominada “actividad estrella”, que se define como la alteración de la especificidad de reconocimiento en la secuencia diana debido a la modificación de las condiciones óptimas de la reacción (cambio de pH, de la fuerza iónica o de la cantidad de enzima necesaria, presencia de compuestos o disolventes orgánicos, o un tiempo prolongado de actuación de las enzimas, entre otras).

3.2.1.4 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de vectores e insertos

Tras la linealización de los plásmidos y la amplificación de los insertos, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1 % para separar los insertos y vectores de interés con el fin de purificarlos seguidamente. Para preparar cada gel, se fundieron 0,3 g de agarosa (*Sigma-Aldrich*) en 30 ml de tampón TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA, *Gibco*; Anexo 2). Posteriormente, se añadió SYBR[®] Safe (1:10000, *Invitrogen*) para teñir el DNA y la mezcla se vertió en un molde de metacrilato donde se dejó gelificar. Por otra parte, se añadió tampón de carga 10x (*Takara*) a las muestras digeridas y los productos de amplificación, y se utilizaron los marcadores de pesos moleculares “1 kb DNA ladder” y “100 pb DNA ladder” (*Biotoools*), a los que se les añadió tampón de carga 6x (*Thermo Scientific*), para estimar el peso de los vectores linealizados y de los insertos amplificados, respectivamente, por comparación. Una vez solidificados los geles, se cargó la mayoría del volumen de las muestras en los carriles centrales y un pequeño volumen en los extremos de los geles, junto con los marcadores de pesos moleculares. Las electroforesis se realizaron en cubetas de electroforesis horizontal (Mini-Sub[®] Cell GT, *Bio-Rad*), que se llenaron de tampón TAE 1x, a unas condiciones de 90 V y 400 mA durante 35 minutos.

Finalizadas las electroforesis, los geles se llevaron a un transiluminador UV (Vilber Lourmat TFX-20M, *Sigma-Aldrich*) para observar cómo había ido la separación y cortar las bandas correspondientes a los insertos amplificados y los vectores linealizados. Para visualizar las bandas, solo se expusieron al transiluminador los carriles exteriores de los geles, que contenían un pequeño volumen de muestra, mientras que la mayor parte de la muestra se encontraba en los carriles interiores adyacentes, lo que permitió identificar las bandas de interés sin exponer la mayoría de la muestra, ya que la luz UV puede inducir mutaciones en el DNA. Una vez localizadas las bandas correspondientes a los insertos amplificados y los vectores linealizados, estas se cortaron con un bisturí estéril. Finalmente, los fragmentos de DNA aislados se purificaron utilizando el “Illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (*GE Healthcare*), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se determinaron las

concentraciones y las relaciones de pureza de todas las muestras con un espectrofotómetro NanoVue (*GE Healthcare*), utilizando alícuotas de 2 μ l.

3.2.1.5 Digestión y purificación de los insertos abiertos

A continuación, se digirieron los productos de PCR purificados para eliminar los extremos romos y dejarlos abiertos (cohesivos). En este caso, la composición de las mezclas de digestión y el volumen final en el que se llevó a cabo fueron los mismos que los descritos en el apartado 3.2.1.3, a excepción de la cantidad de DNA digerido, ya que esta vez se digirió todo el DNA obtenido en las purificaciones (300-1000 ng, aproximadamente). Tras la digestión, se realizó un nuevo proceso de purificación utilizando el mismo kit que el indicado en el apartado 3.2.1.4 y se determinaron nuevamente las concentraciones y relaciones de pureza de los insertos purificados.

3.2.1.6 Ligación de los insertos en los vectores pBiFC

Por último, para obtener los vectores pBiFC con los insertos de interés, se ligaron los plásmidos linealizados con los insertos purificados gracias a que todos ellos poseían extremos cohesivos. Concretamente, la relación molar vector:inserto utilizada fue 1:5, y cada mezcla de ligación contenía 100 ng de plásmido linealizado, una cantidad de inserto (ng) equivalente a 5 veces los moles de plásmido, 2 μ l de tampón de ligasa 10x (*Thermo Scientific*), 1 μ l de ligasa T4 (5 U/ μ l, *Thermo Scientific*) y agua Milli-Q estéril hasta alcanzar un volumen de 20 μ l. Finalmente, las mezclas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.

3.2.2 Transformación de bacterias competentes, selección y comprobación de transformantes

Una vez finalizadas las ligaciones, se transformaron bacterias *E. coli* XL1-Blue competentes con dichos vectores, ya que estas son capaces de incorporar DNA exógeno presente en su entorno^[52,53], con el objetivo de obtener un elevado número de copias de los plásmidos en un intervalo corto de tiempo.

3.2.2.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos

El medio LB líquido se preparó a partir de 10 g de triptona (*Scharlau*), 5 g de extracto de levadura (*Scharlau*) y 5 g de NaCl (*PanReac AppliChem*), que se disolvieron en 1 litro de agua destilada. El contenido se repartió en dos botellas de vidrio de 500 ml y estas se autoclavaron para esterilizar su contenido. Tras el autoclavado, las botellas se dejaron atemperar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Por otra parte, para preparar placas de LB-agar, se disolvieron 3,5 g de “Plate Count Agar” (*Sigma-Aldrich*) en 200 ml de agua destilada. Esta mezcla se vertió en una botella de vidrio de 500 ml, la cual se autoclavó y, posteriormente, se dejó atemperar a temperatura ambiente. Una vez alcanzada dicha temperatura, se añadió el antibiótico de selección (ampicilina) a 100 μ g/ml bajo campana de flujo laminar vertical (*Cruma*). Se agitó suavemente la botella para homogeneizar el contenido y, bajo estas condiciones de esterilidad, se vertió la mezcla en varias placas de Petri de tamaño mediano. Las placas se dejaron semiabiertas durante 30-45 minutos hasta que el LB-agar solidificó y, finalmente, las placas se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

A partir de este punto, la manipulación del medio autoclavado, las placas de cultivo y las bacterias competentes se realizó en el ambiente estéril creado en torno a la llama de un mechero de alcohol.

3.2.2.2 Transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes y selección de bacterias transformantes

La metodología utilizada para transformar bacterias competentes fue el choque térmico, uno de los métodos más utilizados para la transformación bacteriana. Esta transformación se lleva a cabo en presencia de cloruro de calcio, que genera un ambiente rico en iones calcio necesarios para neutralizar las cargas negativas del plásmido a introducir y de la pared bacteriana. Esto hace que la repulsión electrostática se disipe y la pared celular se debilite, de manera que al exponer las bacterias a un aumento repentino de la temperatura, se genera una diferencia de presión entre el exterior y el interior celular que favorece la formación de poros en la membrana celular bacteriana, a través de los cuales se introduce el DNA plasmídico superenrollado. Finalmente, una vez que se alcanzan de nuevo temperaturas normales, la pared bacteriana se restablece^[53].

En una caja con hielo se descongeló una alícuota de bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue para cada transformación. Pasados 10 minutos, cuando las alícuotas estaban descongeladas, se añadió a cada una de ellas un producto de ligación y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se incubaron durante un minuto y medio a 42 °C en un bloque térmico sin agitación (*Eppendorf*) y, seguidamente, se dejaron en hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadió a cada alícuota 1 ml de medio LB líquido estéril y se incubaron a 37 °C en el bloque térmico con agitación durante una hora como mínimo para que las bacterias transformadas expresaran el marcador de selección (resistencia a ampicilina). Tras este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 460xg durante 5 minutos, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y los pellets se resuspendieron en el sobrenadante restante (50-100 µl). Finalmente, las nuevas suspensiones se sembraron en placas de LB-agar que contenían el antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/ml) con un asa de cultivo esterilizada a la llama y estas se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se seleccionaron algunas colonias de cada placa con una punta estéril amarilla, y cada una de ellas transfirió a un tubo de fondo cónico estéril de 50 ml que contenía 10 ml de medio LB líquido estéril suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Los nuevos cultivos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (*Kühner AG*) durante 24 horas y las placas se guardaron selladas con parafilm a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 700 µl de los cultivos que habían crecido, se mezclaron con 500 µl de glicerol autoclavado (*PanReac AppliChem*) dispuestos en distintos tubos *eppendorf* y estos se guardaron a -80 °C, lo que permite disponer de estas bacterias en el caso de que fuera necesario expandirlas para obtener los plásmidos en un futuro.

3.2.2.3 Extracción de DNA plasmídico y comprobación mediante gel de agarosa al 1 %

A continuación, se centrifugaron 10 ml de cada cultivo a 1250xg durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y, a partir de aquí, se utilizó el kit “NucleoSpin® Plasmid EasyPure” (*Macherey-Nagel*), que permite extraer pequeñas cantidades de plásmido, siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó en 50 µl del tampón de elución que proporciona el kit (Anexo 2). Finalmente, se determinaron las concentraciones y relaciones de pureza de cada extracción con 2 µl de cada una de ellas en el espectrofotómetro NanoVue.

Tras esto, se comprobó que las colonias seleccionadas inicialmente contenían los plásmidos de interés mediante digestión y electroforesis en gel de agarosa. Se preparó una mezcla de digestión que contenía 2,8 µl de las enzimas de restricción correspondientes a cada plásmido (10 U/µl; *NheI/KpnI* para los vectores pBiFC VN-A y *ClaI/BglIII* para los plásmidos pBiFC VC-A), 7 µl del tampón de reacción

adecuado para cada combinación de enzimas (tampón M 10x para *NheI/KpnI* y tampón H 10x para *ClaI/BglII*) y 50,4 μ l de agua Milli-Q estéril. Estas preparaciones se resuspendieron y se tomaron 9 μ l de cada una de ellas, a las que se adicionó 1 μ l del plásmido adecuado para cada mezcla. Las digestiones se incubaron en la estufa a 37 °C durante 3 horas y, tras este tiempo, se realizaron varias electroforesis en geles de agarosa al 1 % según el protocolo descrito en el apartado 3.2.1.4. En este caso, a diferencia de lo descrito anteriormente, cada muestra se cargó en un único pocillo, los geles completos se expusieron a la luz UV en un transiluminador (GelDoc 2000, *Bio-Rad*) y se visualizaron con el programa de análisis Quantity One v4.6.5, ya que solo se pretendía observar los productos de digestión y, por lo tanto, verificar que las colonias seleccionadas habían incorporado los plásmidos de interés.

Por último, para confirmar de forma definitiva que las bacterias seleccionadas inicialmente poseían los plásmidos pBiFC deseados, las secuencias de todos los clonajes realizados se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

3.2.3 Mutagénesis dirigida

En el diseño del oligonucleótido reverso para la construcción del vector pBiFC VCBim se introdujo una G en lugar de una C (base original) en la posición señalada en negrita y en cursiva en el Anexo 2, haciendo que el codón codificante en los productos de PCR se modifique de TGG a TCG. En este caso, esta variación también implica un cambio en el aminoácido codificado, ya que el codón original (TGG) codifica para un triptófano, mientras que el mutado (TCG) lo hace para una serina. Por lo tanto, para recuperar la secuencia original de Bim se decidió utilizar la técnica de mutagénesis dirigida sobre el plásmido pBiFC VCBim extraído de una de las colonias seleccionadas, ya que esta tecnología permite introducir mutaciones puntuales en las posiciones deseadas de una cadena de DNA.

En primer lugar, se diseñaron un par de oligonucleótidos característicos para este proceso (Anexo 4), ya que la base a modificar estaba incluida dentro de la secuencia de Bim y, además, ambos cebadores hibridaban en la misma región en cada una de las hebras de DNA.

Al igual que en el apartado 3.2.1.1, los cebadores se disolvieron en agua Milli-Q estéril, quedando a una concentración de 100 μ M, y a partir de esta solución se preparó una dilución 1:10 (10 μ M) de cada uno de ellos en un volumen final de 25 μ l, las cuales se utilizaron para el clonaje.

A continuación, se amplificó el cDNA de Bim mediante PCR a partir del plásmido pBiFC VCBim extraído de una de las colonias obtenidas tras la ligación, utilizando los nuevos oligonucleótidos y la misma polimerasa de alta fidelidad empleada en las amplificaciones anteriores. En este caso, la mezcla de reacción se componía de 22,5 μ l de “AccuPrime™ *Pfx* SuperMix”, 1 μ l de cada oligonucleótido (Directo y Reverso), 200 ng de DNA molde, y agua Milli-Q estéril para completar hasta un volumen de 25 μ l. La amplificación se realizó en el termociclador bajo las condiciones de trabajo expuestas en la Tabla 3.2.

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
“Hot Start”	95	0,5	1
Desnaturalización	95	0,5	16
Hibridación	55	1	
Extensión	68	1,5	
Extensión final	68	5	1

Tabla 3.2. Programa de PCR utilizado en la mutagénesis dirigida para amplificar la secuencia de Bim. Todas las temperaturas, el tiempo de duración de cada fase y el número de ciclos se mantienen constantes independientemente de la secuencia a amplificar.

Finalizada la PCR, se adicionaron a la muestra 1 μ l de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/ μ l, *Fisher BioReagents*), 3 μ l de tampón de reacción 10x (OPTIMIZE™ Buffer 4 10x, *Fisher BioReagents*) y agua Milli-Q estéril hasta alcanzar un volumen de 30 μ l, y esta preparación se incubó en la estufa a 37 °C durante una hora. La enzima *DpnI* es capaz de degradar DNA metilado procedente de cepas de *E. coli* Dam metilasa positivas, en las que esta enzima metila la adenina de la secuencia GATC (G^mATC), mientras que *DpnI* no es capaz de actuar sobre la secuencia GATC no metilada. Por lo tanto, esta enzima de restricción degrada el molde utilizado en la PCR, el cual está metilado debido a que las bacterias *E. coli* XL1-Blue de las que proceden poseen actividad Dam metilasa, de manera que el producto de PCR, cuyas secuencias no están metiladas, se mantiene intacto.

Una vez digerido el molde, se transformaron bacterias *E. coli* XL1-Blue competentes con el producto de PCR íntegro mediante choque térmico. En esta ocasión, no es necesario realizar la ligación porque las bacterias son capaces de reparar la mella derivada de la amplificación. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en una placa de LB-agar (apartado 3.2.2.2); pasadas 24 horas, se seleccionaron algunas de las colonias crecidas y se sembraron en 10 ml de medio LB líquido (apartado 3.2.2.2); transcurridas otras 24 horas, se guardaron alícuotas (apartado 3.2.2.2) y se extrajeron los plásmidos de cada uno de los cultivos (apartado 3.2.2.3); se comprobó que las colonias seleccionadas poseían el plásmido deseado mediante digestión y electroforesis en gel de agarosa al 1 % (apartado 3.2.2.3); y, finalmente, las secuencias de los clonajes se verificaron mediante secuenciación (apartado 3.2.2.3).

3.2.4 Transfección de células HeLa

La transfección transitoria con los diferentes vectores pBiFC generados se llevó a cabo en células HeLa mediante la técnica de lípidos catiónicos, utilizando lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Reagent, *Invitrogen*), un reactivo catiónico basado en liposomas^[54]. La transfección mediante lípidos catiónicos es una de las estrategias más utilizadas para introducir material genético exógeno en células de mamífero tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que es un método simple, altamente reproducible y, además, permite la expresión estable y transitoria del DNA introducido^[55,56]. Esta técnica se basa en la unión de los lípidos al DNA, fundamentalmente debido a las interacciones electrostáticas que se establecen entre ambas moléculas^[55]. En concreto, al poner en contacto el DNA con liposomas generados a partir de lípidos catiónicos, se produce la fusión de las membranas de los liposomas y el DNA colapsa en el interior de las vesículas lipídicas fusionadas, lo que hace que el DNA adopte estructuras condensadas^[55,57]. Finalmente, estos complejos DNA/lípido se introducen en las células, probablemente por endocitosis^[55].

En función de la técnica utilizada para analizar la formación de los complejos, el número de células sembradas y las placas utilizadas fueron diferentes (Tabla 3.3). No obstante, independientemente del ensayo realizado, las células HeLa se sembraron a la densidad adecuada para que estas se encontraran en un estado de confluencia en torno al 80 % a las 24 horas de la siembra, lo que garantiza una buena transfección y minimiza la citotoxicidad. Además, el medio de cultivo utilizado (OPTIMEM® I, GlutaMax™ I, Gibco) se suplementó con suero fetal bovino al 10 % pero no se le adicionaron antibióticos, con el fin de evitar una posible inducción de toxicidad durante la transfección, ya que la permeabilidad celular aumenta mientras tiene lugar este proceso.

Técnica de análisis	Densidad celular (nº células/pocillo)	Tamaño de placas
Citometría de flujo	25000	48
Microscopía confocal	50000	24
Western-Blot	100000	12

Tabla 3.3. Densidad celular y tamaño de placa utilizada en función del ensayo BiFC realizado.

Transcurridas 24 horas desde la siembra, se procedió a transfectar las células con varias combinaciones de distintos constructos (Tabla 3.4), por duplicado. En todos los casos, se añadió el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-[O-metil]-fluorometilcetona, Bachem) a cada pocillo a una concentración final de 30 μ M al menos 45 minutos antes de la transfección para retrasar la muerte celular producida por la sobreexpresión de las proteínas pro-apoptóticas. La relación entre el número de células y la cantidad del vector a transfectar debe ser la adecuada para evitar un nivel de expresión demasiado elevado con el fin de impedir la formación de interacciones inespecíficas, pero suficiente a su vez para detectar los posibles complejos formados. Por lo tanto, en base a esto y a trabajos previos del laboratorio^[31,51], la relación de transfección aplicada fue de 150 ng de cada vector por cada 10^5 células.

VNBcl-2	VCBim VCPUMA VCNoxa	VCBcl-2	VNBim VNPUMA VNNoxa
VNBcl-X _L		VCBcl-X _L	
VNMcl-1		VCMcl-1	
VNBax		VCBax	
VNBak		VCBak	

Tabla 3.4. Combinaciones de los constructos utilizadas en la transfección de células HeLa.

Además, de forma simultánea a la transfección con estos constructos, todas las células se co-transfectaron con la misma cantidad del vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L (cedido por José Alberto Carrodeguas; BIFI, Universidad de Zaragoza), que contenía una secuencia de localización mitocondrial y el cDNA de la proteína mRFP completa (proteína fluorescente roja monomérica), la cual posee unas características espectrales distintas a las observadas en la complementación. Este vector actuaba como control interno, lo que facilitó la evaluación de la eficiencia de la transfección y la estandarización de los resultados obtenidos mediante la normalización de las diferencias en la eficacia de la transfección y los niveles de expresión proteica en cada célula^[30].

Por otra parte, la relación DNA:lipofectamina fue optimizada en un trabajo anterior^[51], de manera que la relación utilizada en las transfecciones fue 1 μ g DNA:3 μ l lipofectamina. Tanto las construcciones

como la lipofectamina se diluyeron en medio de cultivo libre de suero fetal bovino y antibióticos (OPTIMEM® I, GlutaMax™ I, *Gibco*). Estas soluciones se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y media y, por último, la mezcla de DNA y lipofectamina se adicionó a las células gota a gota.

Finalmente, transcurridas 24 horas desde la transfección, se analizaron la formación de los complejos mediante citometría de flujo (FACSCalibur™, *BD Biosciences*) y microscopía confocal de fluorescencia, y se determinó el nivel de expresión de cada constructo mediante Western Blot. En cuanto a los resultados obtenidos por citometría de flujo mediante el programa informático CellQuest Pro, estos se analizaron con los programas FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 5.

3.3 Microscopía confocal de fluorescencia

La microscopía confocal, desarrollada por Marvin Minsky en 1955, permite crear planos virtuales a varios micrómetros de profundidad en el interior de un tejido a partir de imágenes ópticas, lo que proporciona imágenes muy detalladas y de gran calidad. Además, también es posible reconstruir imágenes tridimensionales virtuales del tejido al combinar múltiples secciones^[58].

En cuanto a la microscopía confocal de fluorescencia, se suelen añadir fluoróforos a las muestras para identificar estructuras subcelulares como las mitocondrias, el retículo endoplásmico o el núcleo, entre otros. El microscopio confocal posee un orificio en una pantalla delante del detector que impide el paso de la luz dispersada y las imágenes obtenidas se pueden reconstruir punto por punto^[58].

Gracias a esta tecnología se pudieron visualizar de forma directa los complejos BiFC formados, lo que facilitó el estudio de su localización celular. En este caso, la siembra se realizó en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos secos de 13 mm de diámetro previamente sumergidos en etanol para mantener las condiciones de esterilidad. Transcurridas 24 horas, las células se transfectaron según lo descrito en el apartado 3.2.4 y, tras otras 24 horas, los núcleos se tiñeron con la sonda Hoechst 33342 a una concentración final de 2 µg/ml. Transcurridos 10 minutos, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y se fijaron con paraformaldehído (*Merck*) al 4 % durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, se lavaron de nuevo dos veces con 1 ml de PBS, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos, se colocaron sobre una gota de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*) depositada sobre un portaobjetos, y finalmente, las preparaciones se guardaron a 4 °C.

Por último, las preparaciones se visualizaron en el microscopio confocal FluoView FV10i (*Olympus*), disponible en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras con un objetivo de inmersión de 60x, un “line average” de 4, una apertura confocal de una unidad de Airy Disc y un tamaño de imagen de 1024x1024 píxeles. Finalmente, las imágenes se analizaron con el programa de análisis FV10-ASW 3.1 Viewer.

3.4 Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V

Uno de los eventos que tienen lugar al inicio de la apoptosis es la translocación del fosfolípido fosfatidilserina desde la semicapa interna a la externa de la membrana plasmática, que en condiciones fisiológicas, emite señales de fagocitosis a las células adyacentes^[3]. Una forma de medir la translocación de la fosfatidilserina es el marcaje celular con Anexina V, una molécula que se une con una elevada afinidad a este fosfolípido^[59] y que puede conjugarse con diferentes fluoróforos, como FITC

($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), PE ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$), DY634 ($\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$) o APC ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$).

Estos ensayos se realizaron en células A549 y en las líneas de mieloma múltiple RPMI 8226, U266 y MM.1S. Para las células A549 se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en $500 \mu\text{l}$ de medio DMEM completo en dos placas de 24 pocillos. Tras 24 horas, se añadieron los miméticos BH3 ABT-199, ABT-737, A-1155463 y A-1210477 a concentraciones crecientes a distintos pocillos de una misma fila (0, $1 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ para todos los compuestos excepto para A-1155463, para el que se añadió la dosis de $0,5 \mu\text{M}$ y se eliminó la más elevada), dejando 4 pocillos como control en una misma placa, de los que dos contenían únicamente las células sembradas y a los otros dos se les añadió la cantidad de DMSO equivalente a la que contenía la mayor dosis utilizada y que, posteriormente, permitió normalizar los resultados. Por su parte, las células de mieloma se sembraron a una densidad de entre 10^5 y $1,5 \cdot 10^5$ células por pocillo en dos placas de 48 pocillos, a las que se añadieron a continuación los compuestos A-1155463 y A-1210477 por duplicado a las siguientes concentraciones: 0, $0,1 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $2,5 \mu\text{M}$ para el primer compuesto y 0, $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ para el segundo, dejando dos pocillos por línea celular como control en cada placa. Los compuestos se dejaron actuar durante 48 horas y, tras este tiempo, los sobrenadantes de los pocillos se recogieron en distintos tubos de citómetro y, en el caso de las células A549, estas también se tripsinizaron y se añadieron a sus respectivos sobrenadantes. Los tubos se centrifugaron a $230 \times g$ durante 5 minutos y, posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes. Durante la centrifugación, se preparó una dilución de ABB 1x en agua Milli-Q estéril a partir de una solución de ABB 10x (“Annexin Binding Buffer”, Anexo II) para cada ensayo, a la que se adicionó $1 \mu\text{l}$ de Anexina V-APC. La mezcla se agitó en un vórtex y de ella se tomaron $100 \mu\text{l}$ para resuspender cada pellet con ayuda del vórtex. Finalmente, las muestras se dejaron incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos, se analizó el nivel de mortalidad inducido por cada mimético BH3 mediante citometría de flujo y los datos se obtuvieron y procesaron con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 5.

3.5 Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo de reducción del MTT

El efecto de los miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477 se evaluó mediante el ensayo de reducción del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo], un método desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado por Denizot y Lang en 1986 que permite cuantificar cambios en la tasa de proliferación o muerte celular^[60-62].

En este caso, se sembraron $8 \cdot 10^3$ células HeLa totales por pocillo en $50 \mu\text{l}$ de medio DMEM completo en una placa de 96 pocillos de fondo plano, dejando la última columna para el blanco, que consistió en $100 \mu\text{l}$ de medio DMEM completo. Pasadas 24 horas, se añadieron distintas concentraciones de los compuestos A-1155463 y A-1210477 ($1,25 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$) por sextuplicado, quedando un volumen final de $100 \mu\text{l}$ en cada pocillo. Tras otras 24 horas, se añadieron $10 \mu\text{l}$ de una disolución de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pocillo y se incubó la placa durante 2 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, tiempo tras el cual los cristales eran visibles. Transcurrido este tiempo, la placa se centrifugó a $3720 \times g$ durante 5 minutos, se retiraron $50 \mu\text{l}$ de sobrenadante de cada pocillo para reducir las interacciones del disolvente orgánico con el medio y acelerar la disolución de los cristales, y se añadieron $100 \mu\text{l}$ de una mezcla de isopropanol/HCl $0,05 \text{ M}$. A continuación, se resuspendió el contenido de cada pocillo para favorecer la disolución de los cristales, los cuales terminaron de disolverse en un agitador de placas (*Bioblock*) y,

finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan EX, *Thermo Scientific*).

3.6 Análisis de proteínas por Western Blot

La expresión de diferentes proteínas de la familia Bcl-2 se evaluó en dos situaciones distintas mediante ensayos de Western Blot. Por una parte, se determinó la expresión de las proteínas Bcl-X_L, Mcl-1 y Bim en las células A549 tratadas con diferentes antimetabólicos (barasertib, vincristina y docetaxel), el mimético BH3 ABT-737 y combinaciones de este último con los anteriores; y por otra parte, se evaluó el nivel de expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bim, PUMA y Noxa en células HeLa transfectadas con las nuevas construcciones (VCBcl-2, VCMcl-1, VNBim, VCBim, VNPUMA, VCPUMA, VNNoxa y VCNoxa) y con el constructo VCBcl-X_L, que todavía no había sido evaluado.

3.6.1 Extracción y fraccionamiento de extractos celulares

En cuanto a las células A549, dispuestas en un frasco de cultivo de 75 cm², estas se tripsinizaron, se contaron y se sembraron 10⁶ células totales en 5 ml en 8 frascos de cultivo de 25 cm². Transcurridas 24 horas, se añadieron los compuestos a los distintos frascos, dejando uno como control, a las siguientes concentraciones finales: barasertib 5 μM, vincristina 1 μg/ml, docetaxel 5 μM y ABT-737 5 μM, concentraciones que se mantuvieron en las combinaciones de cada uno de los antimetabólicos con el mimético BH3.

En el caso de las células HeLa, se sembraron 10⁵ células por pocillo en 1 ml de medio OPTIMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino en placas de 12 pocillos. Pasadas 24 horas, se transfectaron la mitad de los pocillos, cada uno de ellos con uno de los constructos mencionados anteriormente según se indica en el apartado 3.2.4, y se dejaron los pocillos restantes como controles, uno para cada transfección.

Tras 24 horas desde la adición de los fármacos o la transfección, se obtuvieron los extractos celulares de cada ensayo. Para ello, se tripsinizaron todas las células, se contaron y se centrifugaron a 520xg durante 5 minutos. Se desecharon los sobrenadantes, cada pellet se lavó con 1 ml de PBS y se pasó el contenido procedente de los frascos de cultivo y de las placas a tubos eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 460xg durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes, los pellets se pusieron en hielo y se resuspendieron en el volumen de tampón lisis 1x (Anexo 2) correspondiente según la relación 5 · 10⁴ células/μl para extraer las proteínas citoplasmáticas. Estas preparaciones se dejaron incubar entre 30 minutos y una hora en hielo y, a continuación, se centrifugaron a 20800xg durante media hora a 4 °C. Finalmente, los sobrenadantes donde se encontraban las proteínas celulares se transfirieron a nuevos tubos eppendorf y estos se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

3.6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Se determinó la cantidad de proteína total presente en cada extracto celular para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo de los geles mediante el método del BCA (ácido bicinonónico; “Micro BCA™ Protein Assay Kit”, *Thermo Scientific*), un método colorimétrico muy sensible que no interacciona con los detergentes iónicos y no iónicos.

Una vez conocido el volumen necesario de cada extracto para cargar 75 μg (células A549) o 100 μg (células HeLa) de proteína en cada pocillo, se añadieron 5 μl de tampón de carga concentrado 3x (Anexo 2). A continuación, los extractos celulares se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en el bloque térmico sin agitación y se les dio un pulso de centrífuga a 11500xg durante 30 segundos.

Por otra parte, se prepararon geles de poliacrilamida al 10 % y 14 % para las células A549 y del 12 % para las células HeLa, a los que se adicionó SDS (docecilsulfato sódico) y en los que se separaron las proteínas extraídas de las células A549 y HeLa según su peso molecular (composición en Anexo 2).

Se cargaron 15 µl de los extractos de las células A549 y 10 µl de los de las células HeLa por pocillo, 4 µl de marcador de peso molecular (“BlueStar Plus Prestained Protein Marker”, *Nippon Genetics*) y 5 µl de tampón de carga concentrado 3x en los pocillos donde no se cargó muestra para controlar que el frente avanzaba recto. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas “Hoefer miniVE” (*GE Healthcare*) y “Mini Protean 3” (*Bio-Rad*) para las células HeLa y A549, respectivamente, a unas condiciones de 180 V y 20 mA por gel con tampón de electroforesis (Anexo 2).

3.6.3 Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF (polifluoruro de vinilideno) utilizando un tampón de transferencia (Anexo 2), aunque en el caso de las membranas de PVDF, es necesario activar las membranas previamente sumergiéndolas en metanol durante 5 minutos. Para cada transferencia, se dispusieron 2 hojas de papel Whatman, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otras 2 hojas del mismo papel, todos ellos impregnados en tampón de transferencia, en equipos de transferencia semisecos (*Bio-Rad*), evitando la formación de burbujas y teniendo en cuenta el sentido de la corriente eléctrica para que las proteínas se transfirieran de los geles a las membranas (geles en el cátodo y membranas en el ánodo). Todas las transferencias se llevaron a cabo a 20 V y 400 mA durante una hora y cuarto. Pasado este tiempo, las membranas se recuperaron y se tiñeron con rojo Ponceau (*Merck*; Anexo 2) para comprobar cómo se habían desarrollado las transferencias.

3.6.4 Análisis de proteínas por Western Blot y detección de los inmunocomplejos

Las proteínas transferidas a las membranas se analizaron utilizando anticuerpos específicos y los marcadores de peso molecular relativos detectados. Tras la tinción con rojo Ponceau, las membranas se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de colorante y se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) disuelta en tampón B (solución de lavado, Anexo 2) durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B bajo agitación moderada para eliminar los restos de leche. Finalizado el lavado, se añadieron los anticuerpos primarios adecuados en función de la proteína que se quisiera detectar (Tabla 3.5), y se incubaron a 4 °C durante toda la noche en un agitador.

Nombre	α-Especie	Dilución	Casa comercial
Bcl-2	Mouse mc	1:250	<i>Abcam</i>
Bcl-X_L	Rabbit mc	1:1000	<i>Cell Signalling</i>
Mcl-1	Rabbit pc	1:1000	<i>Abcam</i>
α-Bim (internal epitope)	Rabbit pc	1:1000	<i>Merck Millipore</i>
PUMA	Rabbit pc	1:1000	<i>Abcam</i>
Noxa	Mouse mc	1:250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

Tabla 3.5. Relación de los anticuerpos primarios específicos utilizados en los ensayos de Western Blot. Las abreviaciones “mc” y “pc” se refieren a monoclonal y policlonal, respectivamente. La dilución de los anticuerpos se realizó en tampón “Antibody solution” (Anexo 2).

Tras la incubación, se recuperaron los anticuerpos y se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con tampón B y en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante una hora en

agitación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (“Rabbit/Mouse IgG-Peroxidase”, *Sigma-Aldrich*) o fosfatasa alcalina (“Rabbit/Mouse IgG-Alkaline Phosphatase”, *Sigma-Aldrich*), todos ellos policlonales, obtenidos en cabra y diluidos 1:20.000 en una mezcla compuesta por la disolución de leche utilizada para el bloqueo y tampón B a partes iguales.

Finalizado este tiempo, se eliminó el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con los sustratos de la peroxidasa (kit “Pierce™ ECL Western Blotting Substrate” (normal) o kit “Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate” (fuerte), *Thermo Scientific*) o de la fosfatasa alcalina (“PhosphoGLO™ AP Substrate”, *KPL*), en función del anticuerpo secundario utilizado. Se utilizó el volumen necesario de sustrato para cubrir las membranas y estas se incubaron 2 minutos con el sustrato normal de la peroxidasa o 5 minutos con el sustrato fuerte de la peroxidasa y con el de la fosfatasa alcalina. Tras la incubación, se eliminó el sustrato y las membranas se colocaron en una funda de plástico transparente encajada en un “cassette” de revelado, donde se eliminaron las burbujas que podían haber quedado presionando con un trozo de papel. Finalmente, en una habitación con luz adecuada para el revelado, se colocó un fragmento de una película fotográfica (“CL-Xposure™ Film”, *Thermo Scientific*) sobre la región de la funda donde se encontraba cada membrana y se expuso durante 5 minutos inicialmente. Cuando no se obtuvieron resultados, dichos tiempos se prolongaron entre 30 minutos y una hora. Pasado el tiempo de exposición, cada película se reveló sumergiéndola en revelador, agua destilada y fijador, por este orden.

De forma análoga a la detección de las proteínas de interés, se realizó un control de carga revelando la β -actina o la α -tubulina en cada Western Blot. Para ello, se utilizaron los anticuerpos anti- β -actina o anti- α -tubulina monoclonales obtenidos en ratón (*Sigma-Aldrich*) a una dilución 1:10000 y el anticuerpo secundario “anti-mouse” IgG conjugado con peroxidasa, así como el sustrato normal.

4 Resultados y discusión

4.1 Estudio de las interacciones entre las proteínas anti-apoptóticas y las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa

Como ya se ha indicado anteriormente, las interacciones que se producen entre las proteínas de la familia Bcl-2 son fundamentales en la regulación de la apoptosis^[16]. Más concretamente, son las proteínas “solo-BH3” las que intervienen en el inicio de la vía intrínseca de la apoptosis, activando a las proteínas Bax y Bak^[22]. Por ello, en este bloque y en el siguiente se van a estudiar las interacciones que Bim, PUMA y Noxa establecen tanto con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, como con las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax y Bak.

4.1.1 Análisis del nivel de expresión de las proteínas de fusión

Un aspecto importante en el estudio de estas interacciones mediante la técnica BiFC es el nivel de expresión que alcanzan las proteínas de fusión en el sistema biológico de estudio, en este caso, células HeLa. Por ello, en primer lugar se verificó que estas proteínas de fusión se expresaban a niveles comparables entre ellas. (Fig. 4.1).

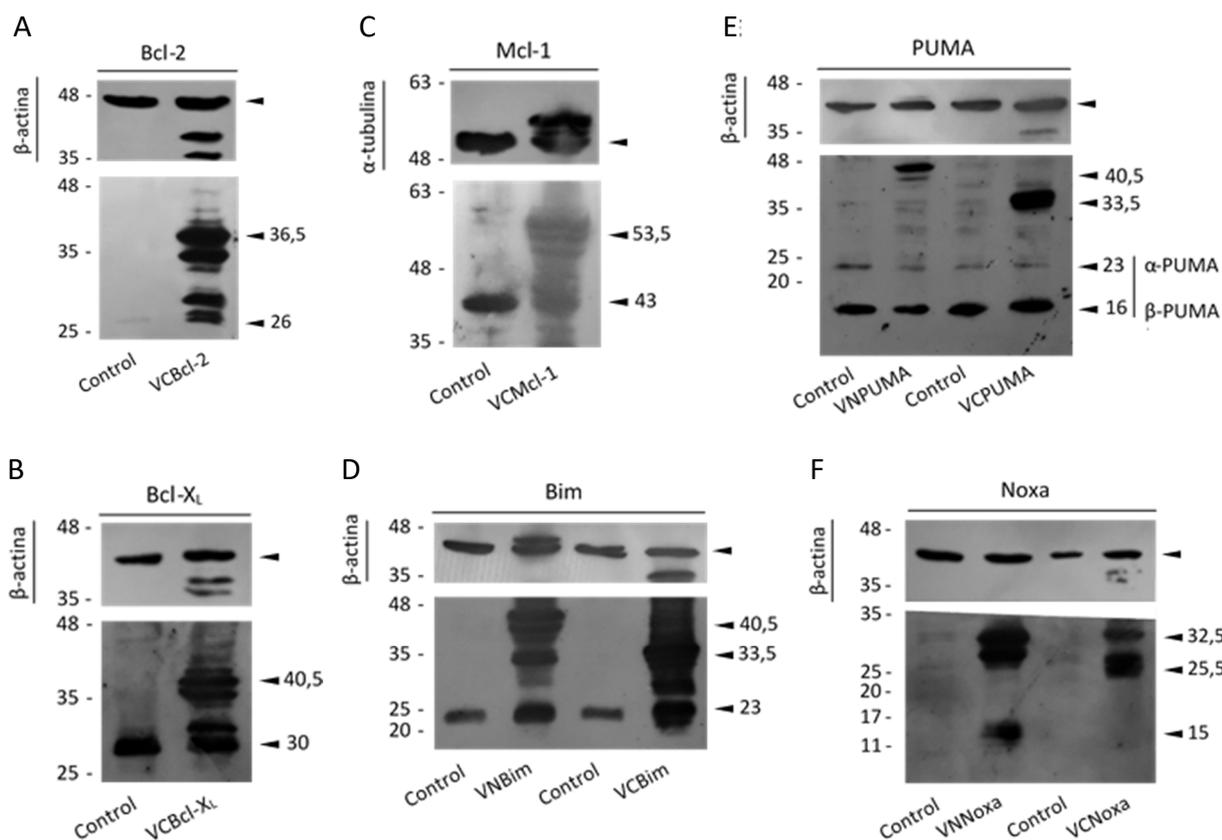


Figura 4.1. Expresión de las proteínas de fusión VCBcl-2 (A), VCBcl-X_L (B), VCMcl-1 (C), VN/VCBim (D), VN/VCPUMA (E) y VN/VCNoxa (F) en células HeLa. Estas células se transfectaron con los vectores que portaban dichas construcciones, se realizaron extractos celulares de células control y transfectadas y, finalmente, se analizó la expresión de las proteínas de fusión y de las proteínas endógenas de interés de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.6 de Materiales y métodos. Los pesos moleculares de referencia y el peso molecular de las proteínas endógenas y las fusiones (suma del peso molecular de la proteína endógena y del fragmento de Venus correspondiente: VN ~ 17,5 kDa; VC ~ 10,5 kDa) (kDa) se indican en la margen izquierda y derecha de las imágenes, respectivamente. Se utilizó la β -actina (A, B, D-F) o la α -tubulina (C) como control de carga.

Estos resultados confirman que las proteínas de fusión se expresaban a niveles equiparables en todas las transfecciones realizadas en las células HeLa, teniendo en cuenta que la cantidad de proteína cargada en cada caso es similar. No obstante, si se quisiera realizar un análisis más exhaustivo, sería necesario cuantificar la cantidad de proteína presente en cada banda de interés por densitometría. Por lo tanto, una vez comprobada dicha expresión, se estudiaron las interacciones que establecen las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con los miembros anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 (apartados 4.1.2-4.1.4), así como con las proteínas multidominio Bax y Bak (apartado 4.2).

4.1.1 Interacciones entre la proteína “solo-BH3” Bim y las proteínas anti-apoptóticas

Por una parte, se analizó la capacidad de interacción de Bim con las distintas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Fig. 4.2), ya que, en general, se considera que esta proteína es un potente inductor de la apoptosis que se une con gran afinidad a todos los miembros anti-apoptóticos, haciendo que su efecto pro-apoptótico quede neutralizado^[15,21]. Para ello, tanto Bim como las proteínas anti-apoptóticas se fusionaron en su extremo amino terminal con los fragmentos VN- y VC- de Venus con el objetivo de determinar la fusión que permite detectar una mejor complementación de la fluorescencia.

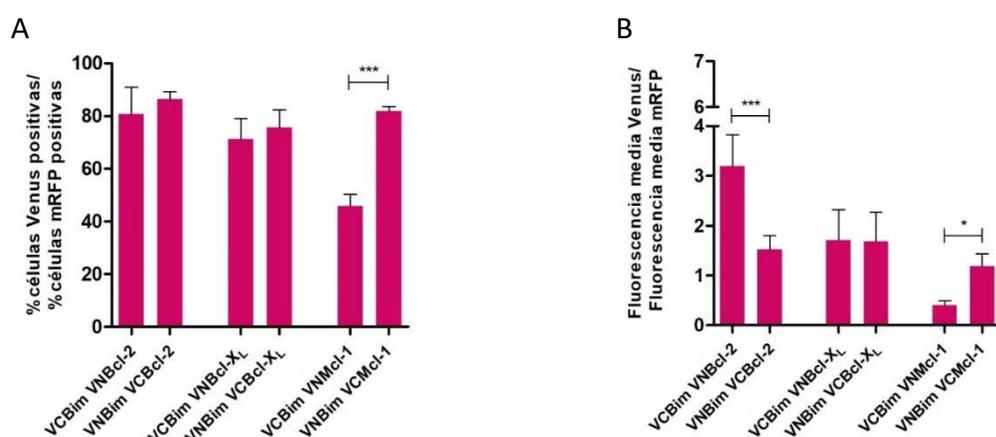


Figura. 4.2. Análisis mediante BiFC y citometría de flujo de las interacciones entre Bim y las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1. Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células HeLa en placas de 48 pocillos, las cuales se transfectaron a las 24 horas con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones adecuadas para obtener las proteínas de fusión de interés, de acuerdo a lo explicado en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Finalmente, pasadas otras 24 horas, se determinó el porcentaje de células Venus positivas/porcentaje de células mRFP positivas (A) y la relación entre la intensidad de fluorescencia media de Venus y mRFP (B). Los resultados son media \pm SD de 2 a 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados indican que Bim es capaz de asociarse con las tres proteínas anti-apoptóticas indicadas en un porcentaje elevado de células (superior al 70 %), exceptuando la combinación VCBim VNMcl-1 (en torno al 50 %) (Fig. 4.2A), en la que la fusión del fragmento VC- de Venus con Bim podría indicar la existencia de algún tipo de impedimento, ya que el nivel de expresión de VNMcl-1 se determinó en un trabajo previo y se vio que este era comparable al de las demás construcciones^[31]. Por otra parte, el nivel de intensidad de fluorescencia emitida al producirse la complementación entre los fragmentos de Venus, calculada respecto a la señal derivada de la proteína mRFP, que actúa como control interno, muestra niveles de intensidad notables en la mayoría de las combinaciones. No obstante, si se tienen en cuenta las fusiones estudiadas, se observan diferencias importantes en el nivel de intensidad de fluorescencia emitido por Bcl-2 y Mcl-1, cuyo máximo lo alcanzan con las combinaciones VCBim/VNBcl-2 y VNBim/VCMcl-1, respectivamente, mientras que la interacción de Bcl-X_L con Bim es prácticamente idéntica con ambas combinaciones. La menor señal de fluorescencia registrada para las combinaciones VNBim/VCBcl-2 y VCBim/VNMcl-1 parece indicar que existe algún tipo de impedimento estérico al utilizar estas parejas de combinaciones, que impediría la interacción de los fragmentos de Venus. No obstante, estos impedimentos estéricos se solventarían, si no totalmente, al menos parcialmente, al intercambiar la fusión de los fragmentos de Venus (Fig. 4.2B).

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en trabajos previos del laboratorio, en los que se utilizaron fusiones diferentes a las aquí utilizadas (VN- y VC- fusionados en el extremo carboxilo de las proteínas anti-apoptóticas y “solo-BH3” (Fig. 4.3A), así como VN- fusionado a las proteínas anti-apoptóticas en el extremo amino y VC- fusionado a las proteínas “solo-BH3” en el extremo carboxilo (Fig. 4.3B)), se observan cambios tanto en el porcentaje de células que poseen complejos como en la señal de fluorescencia derivada de su formación. En general, la fusión de los fragmentos de Venus al extremo carboxilo en las dos proteínas de fusión de cada combinación (Fig. 4.3A) implica una disminución en el porcentaje de células que expresaban complejos con respecto al observado en este trabajo, mientras que la intensidad de fluorescencia registrada con dichas fusiones es considerablemente

mayor a las detectadas en el presente trabajo^[51]. Esto puede ser debido a que las configuraciones de las proteínas de fusión utilizadas en estos estudios impiden que estas proteínas se localicen en la membrana mitocondrial externa, haciendo que sean más abundantes en el citosol y que, por lo tanto, las interacciones que se produzcan entre ellas sean más aleatorias. Por lo tanto, esto puede indicar que, aunque la cantidad de células capaces de formar complejos fluorescentes con estas fusiones sea menor, las proteínas de fusión interactúan más frecuentemente o con mayor afinidad. Sin embargo, la fusión de VN- al extremo amino de las proteínas anti-apoptóticas y de VC- al extremo carboxilo de las proteínas “solo-BH3” (Fig. 4.3B) muestran un menor porcentaje de células en las que se forman complejos (entre un 30 % y un 70 %)^[31] y, además, la intensidad de fluorescencia observada para las combinaciones de Bim con Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 es inferior a la detectada en este trabajo, lo que indicaría que estas configuraciones presentan algún tipo de impedimento en su estructura que dificulta tanto la interacción de las proteínas de estudio como la complementación de los fragmentos de Venus.

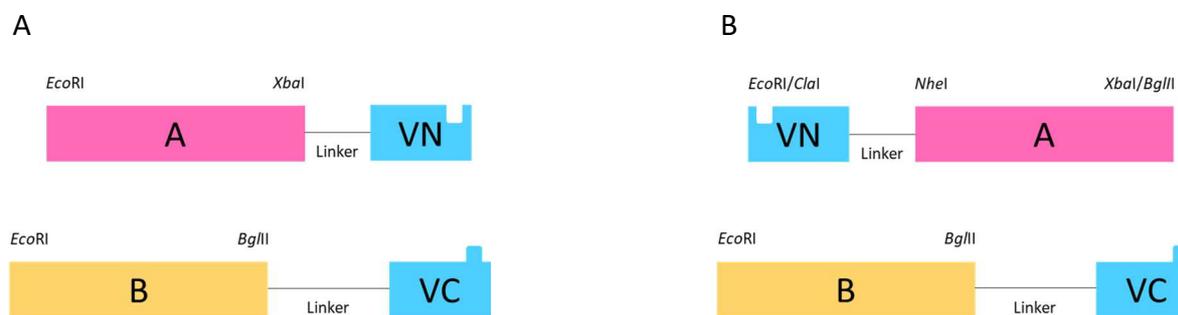


Figura 4.3. Representación esquemática de las proteínas de fusión utilizadas en trabajos anteriores para los estudios de BiFC. A. A y B: Bcl-X_L, Mcl-1, Bim, PUMA y Noxa. **B.** A: Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1; B: Bim, PUMA y Noxa.

Por lo tanto, con los datos obtenidos hasta ahora, parece que las combinaciones con las que se registra una mayor señal fluorescente son VCBim/VNBcl-2, Bcl-X_LVC/BimVN y Mcl-1VN/BimVC. Esto implicaría que, en el primer caso, a pesar de formarse más complejos, las interacciones entre las fusiones son menos frecuentes, mientras que en el segundo caso, se generan menos interacciones pero las que se producen son más frecuentes. No obstante, para confirmar de forma definitiva que estas combinaciones son las que proporcionan una mayor señal fluorescente, serían necesarios más ensayos con las fusiones y combinaciones que faltan por analizar, aunque el conjunto de los tres trabajos parece indicar que las construcciones con los fragmentos de Venus en el extremo amino son las que menos afectan a la localización de las proteínas y, por lo tanto, ofrecen una visión más real de su comportamiento. En cuanto a la afinidad de Bim por las proteínas anti-apoptóticas, los resultados obtenidos en este trabajo confirman los resultados previos con las construcciones BimVC/VN, ya que en ambos casos, Bim muestra mayor especificidad de unión por Bcl-2. Por otra parte, los resultados aquí recogidos también concuerdan con los observados en el primer trabajo del laboratorio en el que todas las construcciones poseían los fragmentos VN- y VC- fusionados en el extremo carboxilo. En dicho trabajo se compararon las interacciones establecidas con Bcl-X_L y Mcl-1, y en este caso, se observó una mayor interacción con la primera. Por lo tanto, en conjunto, a pesar de las diferencias en los porcentajes y en las intensidades, los tres trabajos coinciden en que la mayor interacción tiene lugar con Bcl-2, seguido de Bcl-X_L y, finalmente, de Mcl-1. Por consiguiente, el hecho de que Bim interactúe con los tres miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 implicaría que su efecto pro-apoptótico quedaría neutralizado,

principalmente por la unión a Bcl-2, ya que parece mostrar una mayor especificidad de unión por esta proteína.

Para completar el estudio, los complejos formados como consecuencia de la interacción de Bim con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, así como su localización subcelular y la morfología nuclear, se visualizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fig. 4.4). Todas las imágenes de microscopía confocal que se muestran en este trabajo pertenecen a las combinaciones con las que se detectó una mayor señal de fluorescencia mediante el análisis por citometría de flujo.

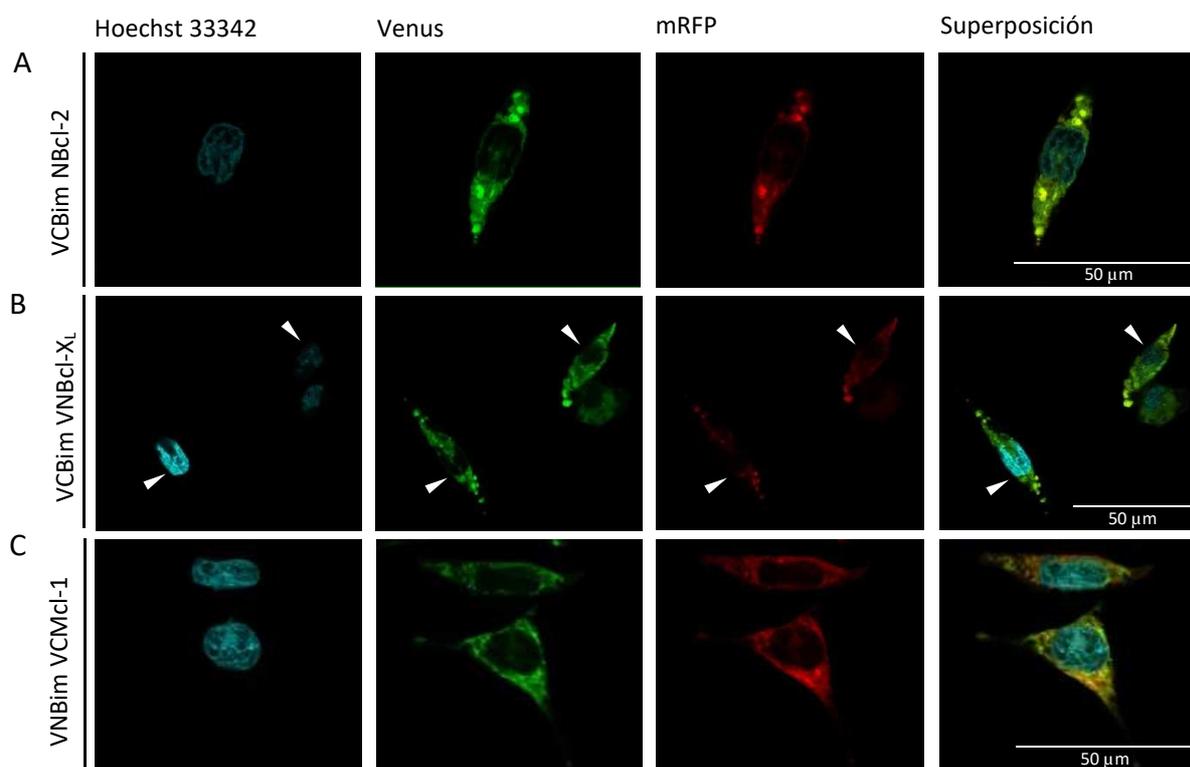


Figura 4.4. Localización subcelular de los complejos formados entre las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B) y Mcl-1 (C) y la proteína “solo-BH3” Bim. Para cada combinación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HeLa por pocillo en tres placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de 13 mm. Tras 24 horas, las células se transfectaron con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones que daban lugar a las proteínas de fusión de interés, según se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Transcurridas otras 24 horas, los núcleos se marcaron con la sonda Hoechst 33342, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos y se colocaron sobre portaobjetos que contenían una gota de Fluoromount-G. Finalmente, se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia FluoView FV10i. Escala: 50 μm.

Las imágenes obtenidas muestran que la mayoría de los núcleos celulares presentan una morfología normal (Fig. 4.4 Hoechst 33342), salvo en la en la última combinación estudiada (Fig. 4.4C), donde se observa que uno de los núcleos tiene una morfología nuclear más alargada e irregular que el resto. Por lo tanto, esto parece indicar que, en general, las células se encontraban en buen estado cuando se fijaron.

Por otra parte, en todos los casos se puede observar que los complejos formados al interaccionar ambas proteínas de cada pareja presentan una distribución en forma de gránulos (Fig. 4.4 Venus), que coincide con la observada al co-transfectar con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L (Fig. 4.4 mRFP) y, además, ambos marcajes co-localizan prácticamente a la perfección en todas combinaciones (Fig. 4.4 superposición). Por lo tanto, tanto el patrón punteado como la co-localización de ambos marcajes, indican que estas

interacciones tienen lugar en la mitocondria, ya que el vector codifica para la proteína fluorescente roja monomérica fusionada a la región transmembrana de Bcl-X_L, por lo que esta proteína de fusión se localiza en la membrana externa mitocondrial. En las imágenes (Fig. 4.4 Venus, mRFP y superposición), esta localización pone de manifiesto la distribución de las mitocondrias por toda la célula, por lo que es posible observar la morfología de aquellas células que se han transfectado.

El patrón punteado observado cuando se produce la interacción entre las proteínas de estudio, indicativo de que este fenómeno tiene lugar en las mitocondrias, también se identificó en los trabajos realizados anteriormente en este laboratorio^[31,51] aunque de manera parcial, a excepción de la combinación de Bcl-X_LVC y Mcl-1VC con BimVN^[51], las cuales se producían en el citosol. Esta localización podría deberse a que la fusión de los fragmentos de Venus en el extremo carboxilo dificultaría la translocación de Bim, Bcl-X_L y Mcl-1 a la mitocondria, ya que según algunos autores, Bcl-X_L en su forma inactiva se encuentra en el citosol, al igual que Mcl-1 cuando Noxa no se expresa, y Bim se encuentra en el citoplasma asociado a proteínas del citoesqueleto en condiciones fisiológicas^[17,63,64].

4.1.2 Interacciones entre la proteína “solo-BH3” PUMA y las proteínas anti-apoptóticas

Un segundo bloque de interacciones interesantes de estudiar son las que establece PUMA con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 (Fig. 4.5), ya que existe una cierta controversia en cuanto al papel de PUMA en el modelo directo de activación porque se ha visto en distintos estudios que puede actuar como activadora, uniéndose tanto a las proteínas anti-apoptóticas como a las pro-apoptóticas multidominio, y también como sensibilizadora, pudiendo unirse a las proteínas anti-apoptóticas para desplazar a las “solo-BH3” activadoras y promover la permeabilización de la membrana mitocondrial externa^[21]. Para ello, al igual que sucedía con Bim, tanto PUMA como las proteínas anti-apoptóticas se fusionaron a los fragmentos VN- y VC- de Venus a través de su extremo amino para determinar la combinación que permitía detectar una mayor interacción entre las proteínas de estudio.

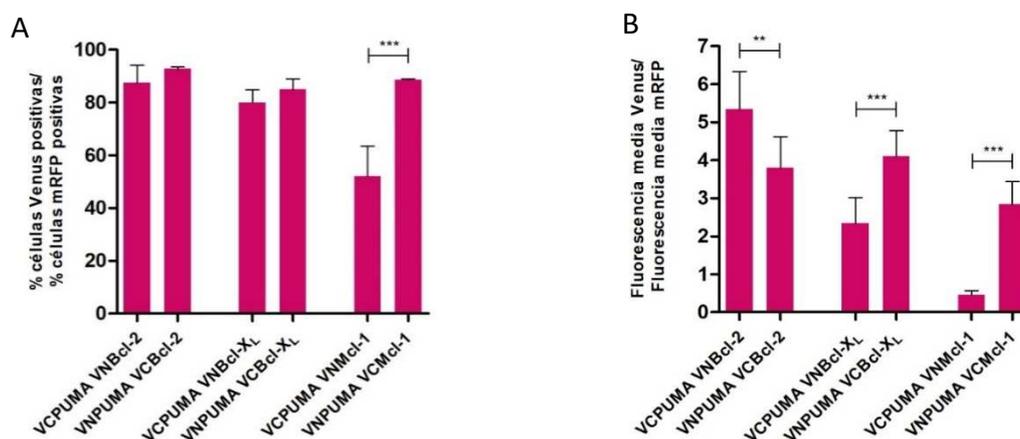


Figura 4.5. Análisis mediante BiFC y citometría de flujo de las interacciones entre PUMA y las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1. Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células HeLa en placas de 48 pocillos, las cuales se transfectaron a las 24 horas con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones adecuadas para obtener las proteínas de fusión de interés, según se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Por último, tras otras 24 horas, se determinó el porcentaje de células Venus positivas/porcentaje de células mRFP positivas (A) y la relación entre la intensidad de fluorescencia media de Venus y mRFP (B). Los resultados son media \pm SD de 2 a 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Al igual que sucedía con Bim, el porcentaje de células que albergan complejos entre PUMA y las proteínas anti-apoptóticas es muy elevado en todos los casos, salvo para la combinación VCPUMA/VNMcl-1 (Fig. 4.5A), en cuyo caso parece que la fusión del fragmento VC- de Venus con PUMA fomenta la aparición de algún tipo de impedimento. En cuanto a los niveles de intensidad de fluorescencia, estos son notablemente más altos que los detectados en el apartado anterior, a excepción de la combinación VCPUMA/VNMcl-1, que muestra una señal similar a la registrada con Bim para esta misma configuración. Con respecto a las combinaciones de fusiones utilizadas, se observa que, en el caso de Bcl-2, la mayor señal fluorescente se obtiene con la combinación VCPUMA/VNBcl-2, mientras que para Bcl-X_L y Mcl-1 el nivel de intensidad de la señal es mayor al combinar las fusiones VNPUMA/VCBcl-X_L y VNPUMA/Mcl-1. Por lo tanto, esto indicaría que estas proteínas de fusión favorecen la interacción de los fragmentos de Venus, a diferencia de la combinación con las fusiones complementarias, que presentarían algún impedimento estérico que impediría la complementación de dichos fragmentos. En consecuencia, todo esto denota que PUMA puede unirse con bastante afinidad, incluso superior a la detectada con Bim, a las tres proteínas anti-apoptóticas, aunque tiene mayor afinidad por Bcl-2, seguido de Bcl-X_L y, finalmente, de Mcl-1 (Fig. 4.5B).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los trabajos previos de este laboratorio a los que se ha hecho alusión en el apartado anterior^[31,51], se vuelve a observar que la unión de VN- y VC- al extremo carboxilo de las proteínas anti-apoptóticas y “solo-BH3” hace que los complejos se formen en un porcentaje menor de células (valores entre el 30 % y el 70 %) pero que, sin embargo, la intensidad de la señal emitida sea mayor que la detectada en el presente trabajo^[51], lo que indicaría una mayor frecuencia de interacción de estas fusiones. Esta mayor frecuencia de interacción puede ser debida a que, como se ha señalado anteriormente, con la disposición de los fragmentos de Venus en el extremo carboxilo, las proteínas se localizan predominantemente en el citosol en lugar de en la mitocondria, por lo que las interacciones entre ellas pueden ser más aleatorias. Por otra parte, cuando se fusionaba VN- al extremo amino de las proteínas anti-apoptóticas y VC- al extremo carboxilo de PUMA, estas proteínas formaban complejos en un porcentaje de células similar al observado en el otro estudio, aunque la intensidad de la señal fluorescente detectada es inferior a la registrada en el presente trabajo^[31], lo que implicaría una menor frecuencia de interacción debido a que algún tipo de impedimento estérico obstaculizaría la complementación de los fragmentos de Venus.

En relación a la especificidad de unión, PUMA también muestra una mayor afinidad por Bcl-2 en dos de los trabajos analizados, incluido este, mientras que en el estudio restante, PUMA interaccionaba más específicamente con Bcl-X_L, aunque en dicho trabajo no se evaluó la interacción de PUMA con Bcl-2. Por lo tanto, PUMA interacciona con mayor afinidad que Bim con Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, quedando inhibido así su efecto pro-apoptótico, mayoritariamente debido a su unión con Bcl-2 según los resultados de este trabajo.

Por otra parte, se visualizaron los complejos con los que se detectó una mayor señal mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fig. 4.6), pudiendo observar la morfología celular y determinar el lugar en el que se producen estas interacciones en el interior de las células.

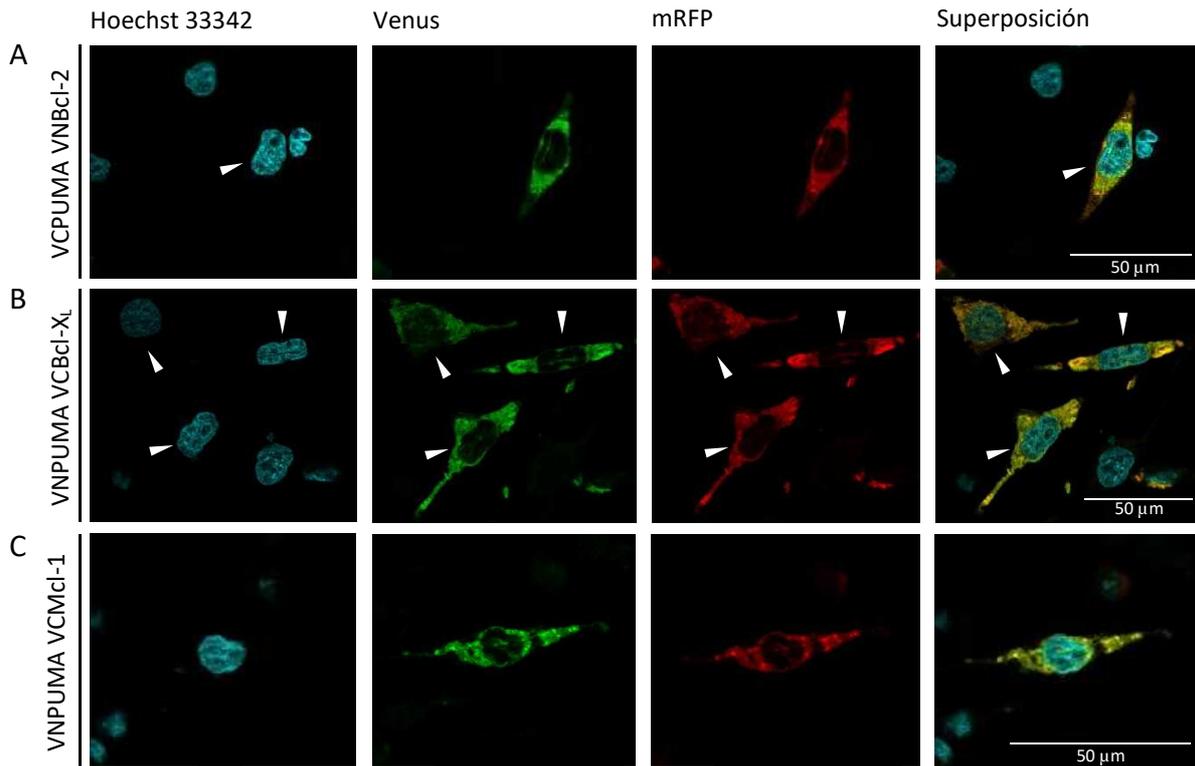


Figura 4.6. Localización subcelular de los complejos formados entre las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B) y Mcl-1 (C) y la proteína “solo-BH3” PUMA. Para cada combinación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HeLa por pocillo en tres placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de 13 mm. Pasadas 24 horas, las células se transfectaron con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones que daban lugar a las proteínas de fusión de interés, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Tras otras 24 horas, los núcleos se marcaron con la sonda Hoechst 33342, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos y se colocaron sobre portaobjetos que contenían una gota de Fluoromount-G. Finalmente, se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia FluoView FV10i. Escala: 50 μ m.

Al igual que sucedía en el caso anterior, las imágenes indican que, en general, la morfología de los núcleos es la que suelen presentar las células que se encuentran en buen estado (Fig. 4.6 Hoechst 33342).

En cuanto a los complejos formados en esta ocasión, se observa, de nuevo, una distribución siguiendo un patrón punteado por toda la célula (Fig. 4.6 Venus), que parece coincidir con la expresión de la mRFP (Fig. 4.6 mRFP). Por lo tanto, la co-localización de la señal de la mRFP y la fluorescencia de Venus (Fig. 4.6 superposición) indica que los complejos formados por PUMA y las proteínas anti-apoptóticas se localizan en la mitocondria.

El patrón punteado derivado de la localización de las interacciones también se observó en los estudios previos, aunque de manera parcial en el caso de la combinación de PUMAVC con VNBcl-2 y VNBcl-X_L. Puesto que PUMA se encuentra en el citosol en condiciones fisiológicas^[65], el hecho de que la interacción con esta combinación se produzca de manera parcial en la mitocondria implicaría que su translocación a la membrana podría estar obstaculizada por la fusión del fragmento VC- de Venus al extremo carboxilo de PUMA.

4.1.3 Interacciones entre la proteína “solo-BH3” Noxa y las proteínas anti-apoptóticas

Por último, también resulta de gran interés conocer las interacciones que establece Noxa con las proteínas anti-apoptóticas (Fig. 4.7), ya que esta proteína se ha considerado tradicionalmente como una proteína sensibilizadora en el marco del modelo directo de activación, que liberaría a las proteínas “solo-BH3” activadoras de la unión con las anti-apoptóticas al interaccionar con estas; sin embargo, recientemente también se ha propuesto que actuaría como una proteína activadora, capaz de interaccionar tanto con las proteínas anti-apoptóticas como con Bax/Bak^[21,22]. Además, también existe un cierto debate acerca de las interacciones que establece Noxa con las proteínas anti-apoptóticas, ya que tradicionalmente se pensaba que Noxa interaccionaba únicamente con Mcl-1 y A1, pero estudios recientes también proponen su unión con Bcl-2 y Bcl-X_L^[15]. Por lo tanto, en primer lugar se fusionaron los fragmentos VN- y VC- de Venus al extremo amino de Noxa y las proteínas anti-apoptóticas, al igual que en los casos anteriores, para evaluar la capacidad de interacción de Noxa con dichas proteínas e identificar la combinación que permitía una mayor complementación de la fluorescencia de dichos fragmentos.

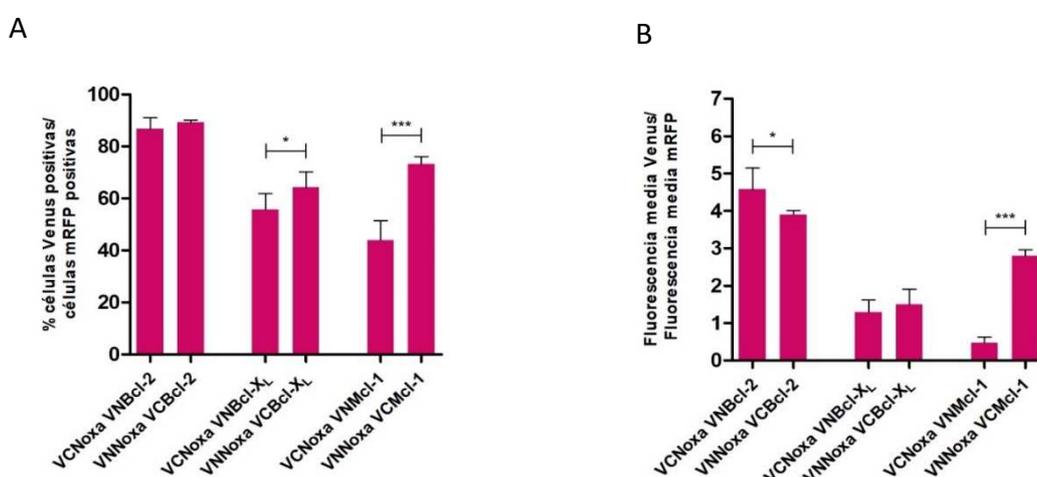


Figura 4.7. Análisis mediante BiFC y citometría de flujo de las interacciones entre Noxa y las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1. Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células HeLa en placas de 48 pocillos, las cuales se transfectaron a las 24 horas con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones adecuadas para obtener las proteínas de fusión de interés, según se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Finalmente, transcurridas otras 24 horas, se determinó el porcentaje de células Venus positivas/porcentaje de células mRFP positivas (A) y la relación entre la intensidad de fluorescencia media de Venus y mRFP (B). Los resultados son media \pm SD de 2 a 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Siguiendo el mismo comportamiento que las otras dos proteínas “solo-BH3”, Noxa también puede formar complejos con las tres proteínas anti-apoptóticas en un porcentaje relativamente alto de células, a excepción de las combinaciones de VCNoxa con VNBcl-X_L y VNMcl-1 (Fig. 4.7A). Por lo tanto, la fusión del fragmento VC- de Venus con Noxa en estos casos induciría algún tipo de impedimento. Respecto a las intensidades de fluorescencia, las señales obtenidas para las combinaciones de Noxa con Bcl-2 y Mcl-1 son muy semejantes a las observadas en el caso de PUMA; sin embargo, el nivel de fluorescencia registrado para Bcl-X_L es el menor de los detectados con las tres proteínas “solo-BH3” (Fig. 4.7B). Por lo tanto, todo esto indica que Noxa interacciona con las tres proteínas anti-apoptóticas, aunque se une preferentemente a Bcl-2 y, en menor medida, a Mcl-1. En cuanto a las configuraciones utilizadas, la fusión del fragmento VC- de Venus a Noxa registra una mayor señal con Bcl-2, mientras que es la fusión del segmento VN- a esta proteína “solo-BH3” la que induce una mayor señal

fluorescente en el caso de Mcl-1 y, más discretamente, con Bcl-X_L. Por consiguiente, esta disposición de los fragmentos de Venus respecto a las proteínas de estudio fomentaría, una vez más, la complementación de los fragmentos de Venus, mientras que la fusión del fragmento VC- a Noxa implicaría la aparición de algún tipo de impedimento estérico que dificultaría dicha complementación.

En los trabajos previos de este laboratorio se volvió a observar que la fusión de los fragmentos VN- y VC- al extremo carboxilo de Noxa y las proteínas anti-apoptóticas dificulta la formación de algunos complejos (NoxaVN/Mcl-1VC y NoxaVC/Bcl-X_LVN) en un porcentaje elevado de células (valores entre el 30 % y el 70 %); sin embargo, la señal de fluorescencia obtenida con esta configuración es superior a la observada en el presente trabajo, lo que sugiere que la fusión de los fragmentos de Venus al extremo carboxilo de Noxa favorece la interacción entre esta proteína “solo-BH3” y las proteínas anti-apoptóticas^[51]. Por su parte, la fusión de VN- al extremo amino de las proteínas anti-apoptóticas, y la localización de VC- en el extremo carboxilo de Noxa permite la formación de complejos en un porcentaje de células similar al anterior, pero la baja intensidad de fluorescencia detectada implica que estas interacciones se producen con menor frecuencia, probablemente debido a impedimentos estéricos^[31].

Así pues, con estos resultados se puede deducir a nivel general que la unión de los fragmentos de Venus al extremo amino de Noxa y las proteínas anti-apoptóticas favorecen la formación de complejos en una mayor proporción de células, aunque las combinaciones con las que se observa una señal de fluorescencia máxima son VCNoxa/VNBcl-2, VNNoxa/VCBcl-X_L y VCNoxa/VNMcl-1. Además, estas interacciones son las que se producirían con mayor frecuencia. Una diferencia entre el presente estudio y los anteriores es que los resultados obtenidos aquí indican que Noxa muestra mayor afinidad por Bcl-2, seguido de Mcl-1, mientras que según los otros trabajos, Mcl-1 es la proteína anti-apoptótica que muestra menor afinidad por Noxa. Asimismo, en uno de los trabajos se detectó una mayor afinidad de Noxa por Bcl-2, mientras que en segundo esta interacción no se estudió, observándose una interacción predominante de Noxa por Bcl-X_L^[31,51]. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo encajan con lo observado por otros grupos mediante técnicas de inmunoprecipitación^[66,67]. No obstante, estas diferencias en los resultados obtenidos indican que es necesario evaluar todas las posibles configuraciones de las fusiones con la técnica BiFC.

En general, según los resultados de este trabajo, Noxa muestra una afinidad intermedia por los miembros anti-apoptóticos en comparación con Bim y PUMA, por lo que estas uniones, especialmente con Bcl-2, inhiben el efecto pro-apoptótico de Noxa. El hecho de detectar interacción entre Noxa y Bcl-2 y Bcl-X_L contrasta con la convicción tradicional de que esta proteína “solo-BH3” se unía de forma específica a Mcl-1 y A1, mientras que, por otro lado, secundan los resultados obtenidos en estudios recientes en los que se observa que Noxa es capaz de interactuar con Bcl-2 y/o Bcl-X_L^[15].

Finalmente, al igual que en las anteriores ocasiones, los complejos que registran una mayor intensidad de fluorescencia, la morfología nuclear y la localización subcelular en la que se originan estos complejos se visualizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fig. 4.8).

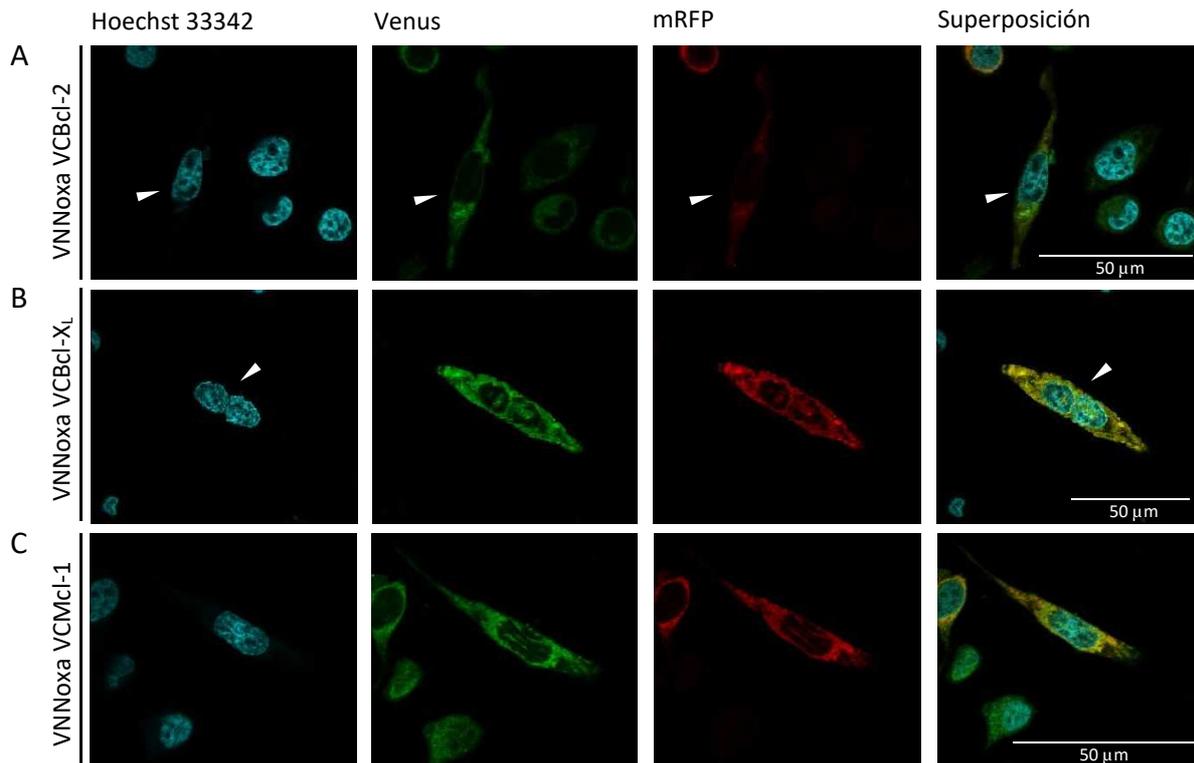


Figura 4.8. Localización subcelular de los complejos formados entre las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (A), Bcl-X_L (B) y Mcl-1 (C) y la proteína “solo-BH3” Noxa. Para cada combinación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HeLa por pocillo en tres placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de 13 mm. Tras 24 horas, las células se transfectoron con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones que daban lugar a las proteínas de fusión de interés, de acuerdo a lo explicado en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Pasadas otras 24 horas, los núcleos se marcaron con la sonda Hoechst 33342, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos y se colocaron sobre portaobjetos que contenían una gota de Fluoromount-G. Finalmente, se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia FluoView FV10i. Escala: 50 μ m.

Análogamente a lo observado en los complejos en los que intervienen Bim y PUMA, estas imágenes muestran que la morfología nuclear es la típica para las células que se encuentran en buen estado (Fig. 4.8 Hoechst 33342), aunque alguna presenta una morfología más irregular, por ejemplo, en la combinación de VNBcl-2 VCNoxa (Fig. 4.8A). Por consiguiente, esta característica parece indicar que las células se encontraban, en general, en buen estado antes de ser fijadas, e incluso en fases tardías de la división celular, como se observa en la combinación de VCBcl-X_L/VNNoxa (Fig. 4.8B), donde parecen vislumbrarse dos núcleos en división.

Con respecto a los complejos que se forman entre Noxa y las proteínas anti-apoptóticas, se sigue observando una distribución en forma de gránulos a lo largo de toda la célula (Fig. 4.8 Venus) y que comparte localización con la mRFP (Fig. 4.8 mRFP) si se superponen ambos marcajes (Fig. 4.8 superposición), indicando que un buen nivel de co-localización entre la proteína mRFP y los complejos. Por lo tanto, al igual que ocurría con Bim y PUMA, los complejos formados por Noxa y las proteínas anti-apoptóticas tienen lugar principalmente en la membrana externa de las mitocondrias, las cuales se reparten por toda la célula.

A diferencia de los trabajos referidos anteriormente, en los se observaba una distribución parcial del patrón punteado en la célula^[31,51], en el presente trabajo se observa que el patrón punteado coincide con

la localización de las mitocondrias. Esta co-localización parcial puede deberse a que la fusión del fragmento VC- de Venus en el extremo carboxilo terminal de las proteínas “solo-BH3” dificulta su translocación a la mitocondria o a que estas interacciones tienen lugar en otras localizaciones subcelulares, como el retículo endoplásmico, en cuya membrana se ha detectado la presencia de las tres subfamilias de proteínas de la familia Bcl-2^[68].

4.2 Estudio del papel de las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa en la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak

Como se ha indicado en la Introducción, hasta la fecha se han propuesto varios modelos de activación para Bax y Bak en los que las proteínas “solo-BH3” parecen desempeñar un papel importante. Los resultados obtenidos en el bloque anterior, en los que se ha visto que las proteínas “solo-BH3” establecen interacciones con las proteínas anti-apoptóticas, podría ser un camino para la activación de Bax y Bak, los cuales serían activos de manera constitutiva pero se encontrarían inhibidos por su unión a las proteínas anti-apoptóticas hasta que las proteínas “solo-BH3” interrumpieran estas uniones y neutralizaran a los miembros anti-apoptóticos, liberando a Bax y Bak activados, que podrían llevar a cabo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (modelo de desplazamiento)^[20,21]. No obstante, también se ha descrito que algunas de las proteínas “solo-BH3” también son capaces de interaccionar con los miembros pro-apoptóticos multidominio, distinguiendo así entre proteínas “solo-BH3” activadoras, que podrían interaccionar tanto con las proteínas anti-apoptóticas como con Bax/Bak, y las “solo-BH3” sensibilizadoras, que únicamente interaccionarían con los miembros anti-apoptóticos para liberar a las activadoras y que estas se unieran a Bax/Bak para impulsar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (modelo directo)^[20,21].

Por lo tanto, con el fin de ayudar a definir el mecanismo mediante el cual se activan las proteínas pro-apoptóticas multidominio, se examinó la capacidad de interacción de Bim, PUMA y Noxa con las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax y Bak mediante la técnica BiFC, utilizando las proteínas de fusión que poseían el fragmento VN- o VC- de Venus asociado al extremo amino de Bim, PUMA, Noxa, Bax y Bak (Fig. 4.9).

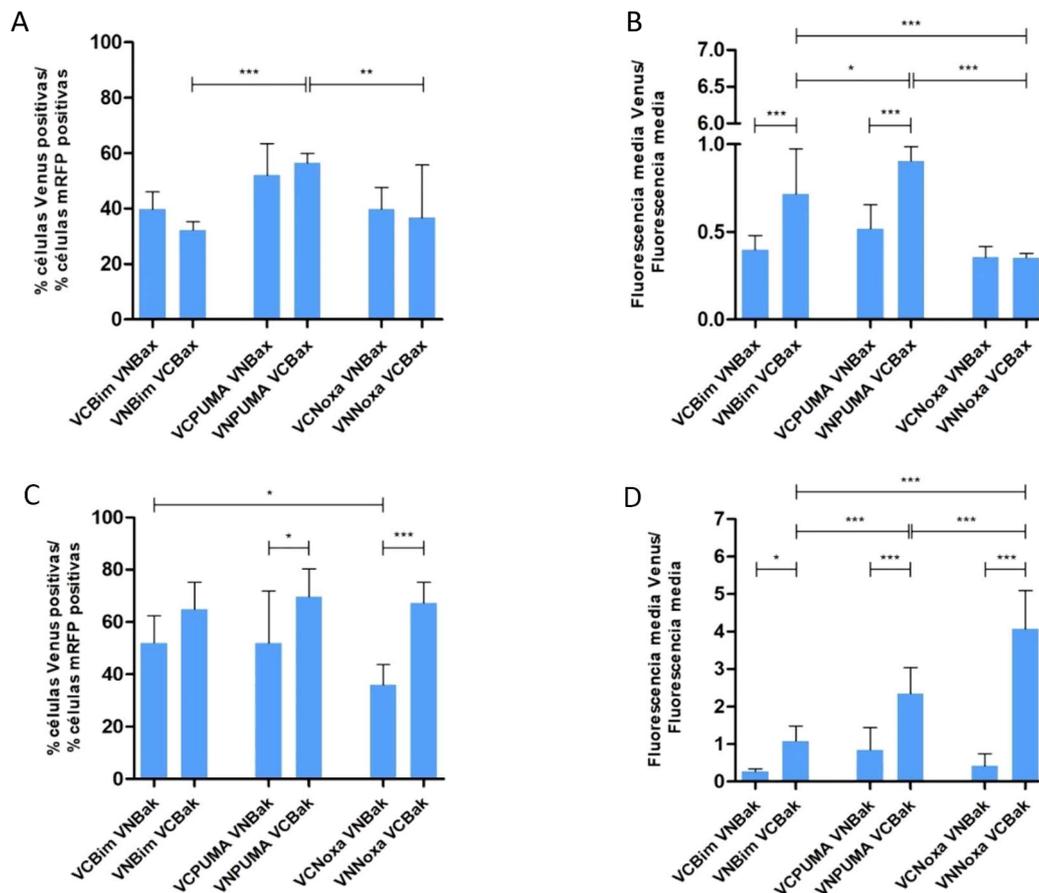


Figura 4.9. Análisis mediante BiFC y citometría de flujo de las interacciones entre las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa, y las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax (A y B) y Bak (C y D). Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células HeLa en placas de 48 pocillos, las cuales se transfectaron a las 24 horas con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones adecuadas para obtener las proteínas de fusión de interés, según se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Por último, tras otras 24 horas, se determinó el porcentaje de células Venus positivas/porcentaje de células mRFP positivas (A y C) y la relación entre la intensidad de fluorescencia media de Venus y mRFP (B y D). Los resultados son media \pm SD de 4 a 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados reflejan que las tres proteínas “solo-BH3” utilizadas en este trabajo son capaces de formar complejos en un porcentaje moderado de células con las dos proteínas pro-apoptóticas multidominio, Bax y Bak. No obstante, parece que estos complejos son más abundantes cuando estas proteínas interactúan con Bak, ya que la proporción de células que los contienen es mayor que las que poseen complejos con Bax (40-80 % frente a 35-65 %) (Fig. 4.9A y C). Por otra parte, la proporción de células que albergan complejos y la intensidad de fluorescencia emitida varían entre las combinaciones estudiadas según la disposición relativa de los fragmentos VN- y VC- de Venus respecto a las proteínas de estudio, un factor limitante que también se ha detectado en las combinaciones de las proteínas “solo-BH3” con las proteínas anti-apoptóticas. Estas diferencias son más acusadas cuando se evalúa la señal fluorescente emitida por cada pareja de combinaciones, llegando a registrar valores casi 10 veces superiores (Fig. 4.9D) en algunos casos. En concreto, en el caso de las combinaciones con Bak, la fusión del fragmento VN- a Bim, PUMA y Noxa facilita la formación de complejos en una mayor proporción de células y una frecuencia de interacción de las proteínas superior a la detectada con la combinación de las proteínas “solo-BH3” fusionadas al segmento VC- de Venus (Fig. 4.9C y D). Por su parte, la combinación de estas proteínas con Bax muestra algunas variaciones, ya que la fusión de Bim y Noxa

al fragmento VN- y la unión de PUMA al fragmento VC- son las configuraciones que permiten detectar una mayor proporción de complejos; sin embargo, la fusión de VN- a Bim y PUMA es la que permite detectar una mayor señal fluorescente, mientras que esta es muy similar cuando se utilizan ambas configuraciones de Noxa, siendo algo mayor la señal emitida por la combinación de VCNoxa/VNBax (Fig. 4.9A y B). Por lo tanto, las fusiones complementarias a las nombradas para cada combinación son menos eficientes en la formación de complejos y en la frecuencia de interacción de las proteínas, probablemente debido a la manifestación de impedimentos estéricos que obstaculizan la interacción entre las proteínas de estudio o la complementación de la fluorescencia de los dos segmentos de Venus. No obstante, no se observan diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia emitida a la hora de fusionar el fragmento VN- o VC- a Noxa.

Las tres proteínas “solo-BH3” interaccionan más específicamente con Bak cuando estas se fusionan al fragmento VN- de Venus, siendo Noxa la que se une con mayor afinidad a esta proteína pro-apoptótica multidominio, tal y como indican las intensidades de fluorescencia detectadas; sin embargo, en el caso de Bax, parece que PUMA muestra una mayor afinidad por ella que el resto de proteínas “solo-BH3” (Fig. 4.9B y D). Por lo tanto, esta preferencia de interacción por Bak se podría relacionar con una frecuencia de interacción superior a la que puede darse con Bax.

Tras el análisis por citometría, los complejos formados que emiten una mayor señal fluorescente, la morfología de los núcleos y la zona en el que tienen lugar estas interacciones en el interior celular se observaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fig. 4.10 y 4.11).

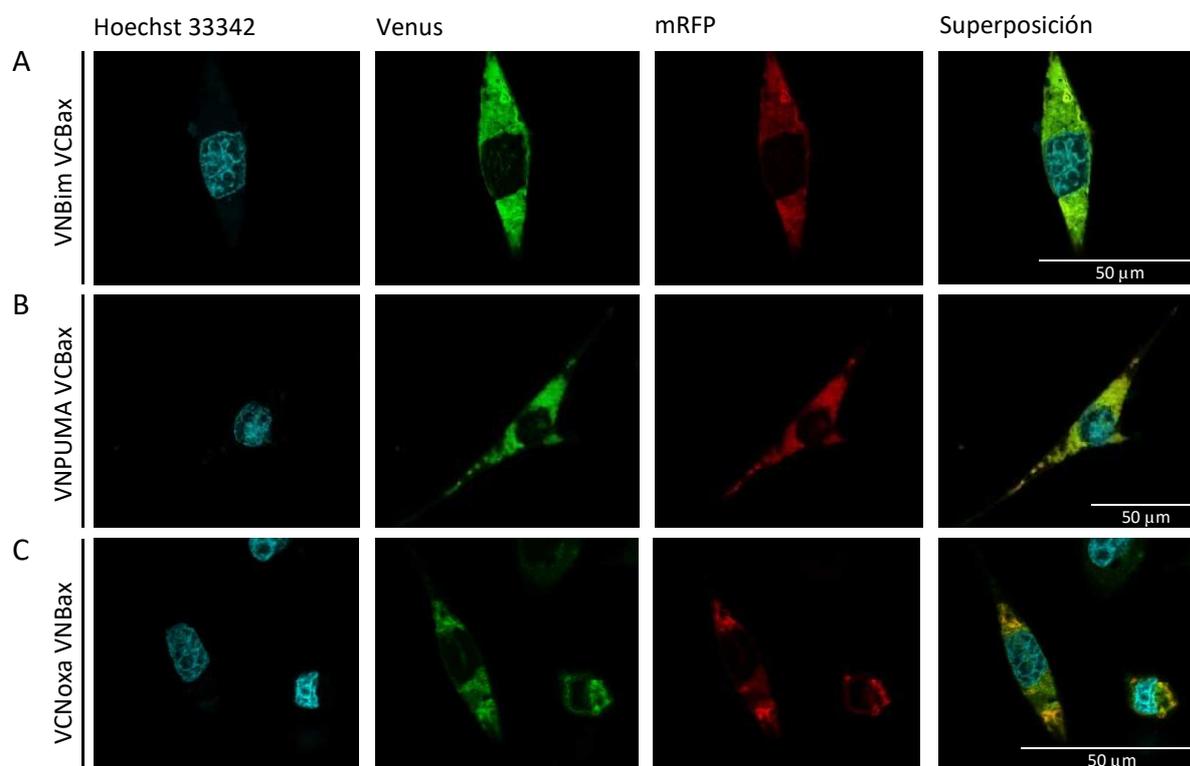


Figura 4.10. Localización subcelular de los complejos formados entre la proteína pro-apoptótica Bax y las proteínas “solo-BH3” Bim (A), PUMA (B) y Noxa (C). Para cada combinación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HeLa por pocillo en tres placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de 13 mm. Transcurridas 24 horas, las células se transfectaron con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones que daban lugar a las proteínas de fusión de interés, según se indica en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Tras otras 24 horas, los núcleos se marcaron con la sonda Hoechst 33342, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos y se colocaron sobre portaobjetos que

contenían una gota de Fluoromount-G. Finalmente, se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia FluoView FV10i. Escala: 50 μm .

Una vez más, las imágenes de microscopía confocal muestran que las células observadas se encuentran en buen estado, ya que la morfología de sus núcleos es normal (Fig. 4.10 Hoechst 33342). En cuanto a los complejos formados entre las proteínas “solo-BH3” y las proteínas pro-apoptóticas multidominio, estos presentan una distribución siguiendo un patrón punteado por toda la célula (Fig. 4.10 Venus), lo que sugiere una localización mitocondrial si se compara con la distribución de la mRFP (Fig. 4.10 mRFP), ya que la superposición de ambas señales (Fig. 4.10 superposición) indica una buena co-localización de ambas señales.

En uno de los trabajos previos realizados en este laboratorio, observaron que las interacciones de PUMA y Bax tenían lugar en la mitocondria, de acuerdo a su distribución punteada en las células, mientras que Noxa mostraba una localización parcial en la mitocondria. Por su parte, en el caso de Bim, la interacción con Bax se producía predominantemente en el citosol^[51]. Por otra parte, en el otro trabajo, se observó una distribución preferentemente mitocondrial para todos los complejos^[31]. Las diferencias en la localización de los complejos entre estos trabajos y el presente puede deberse a la disposición relativa de los fragmentos de Venus con respecto a las proteínas de estudio.

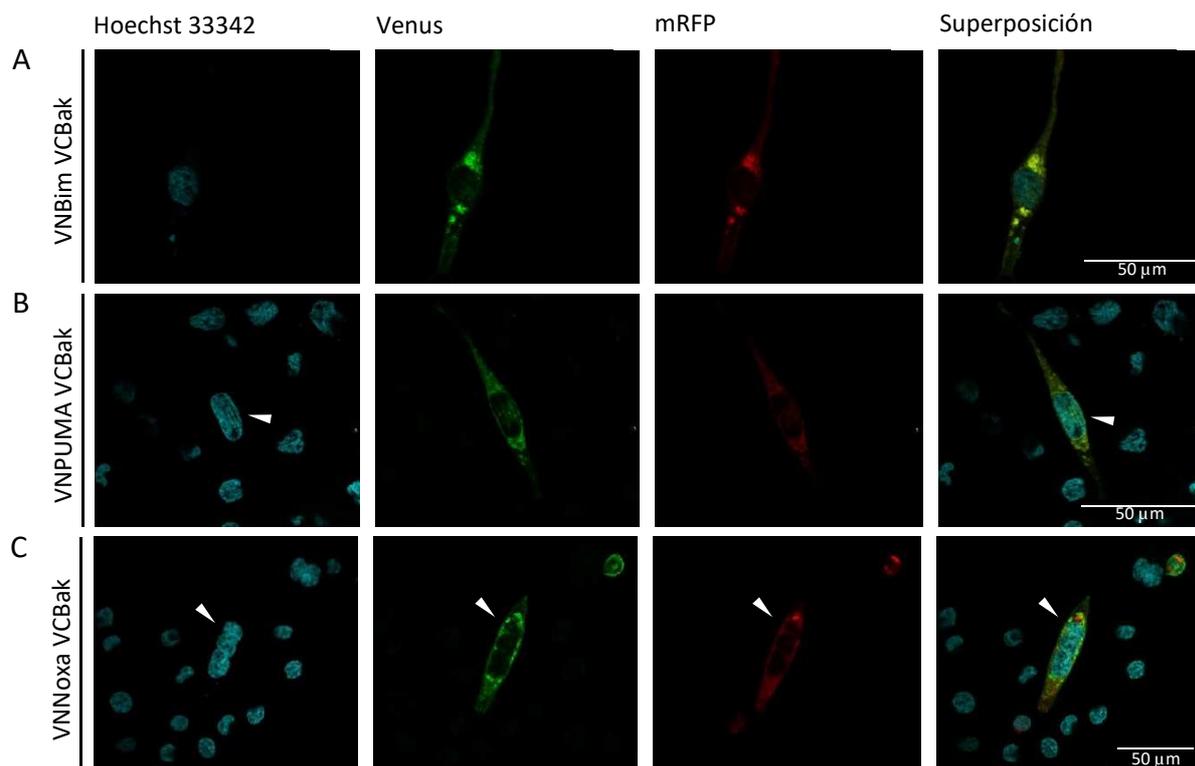


Figura 4.11. Localización subcelular de los complejos formados entre la proteína pro-apoptótica Bak y las proteínas “solo-BH3” Bim (A), PUMA (B) y Noxa (C). Para cada combinación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HeLa por pocillo en tres placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de 13 mm. Pasadas 24 horas, las células se transfectaron con el vector pmRFP-TMD-Bcl-X_L y las construcciones que daban lugar a las proteínas de fusión de interés, de acuerdo a lo explicado en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. Transcurridas otras 24 horas, los núcleos se marcaron con la sonda Hoechst 33342, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos y se colocaron sobre portaobjetos que contenían una gota de Fluoromount-G. Finalmente, se tomaron imágenes de distintos campos de las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia FluoView FV10i. Escala: 50 μm .

Por lo general, las células en las que se estudió la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Bak también mostraban una morfología nuclear normal (Fig. 4.11 Hoechst 33342), indicativa de que estas células se encontraban en buen estado antes de su fijación. De nuevo, los complejos formados se distribuyen por toda la célula siguiendo un patrón punteado (Fig. 4.11 Venus), que sugiere una localización mitocondrial de los mismos al comparar esta distribución con la observada para la proteína mRFP (Fig. 4.11 mRFP), detectándose una co-localización muy buena de ambas señales (Fig. 4.11 superposición).

Si estos resultados se comparan con los obtenidos en los estudios realizados anteriormente en este laboratorio^[31,51], en todos ellos se identifica un patrón punteado para la localización de estos complejos, que coincide con la distribución de las mitocondrias en la célula, lo que sugiere que las interacciones de las proteínas “solo-BH3” con Bak tienen lugar en este orgánulo.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo solo es posible conocer la localización subcelular en la que tienen lugar las interacciones estudiadas; sin embargo, no es posible determinar si la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Bax/Bak induce algún evento apoptótico temprano. Además del marcaje con MitoTracker Red, que podría indicar que las células se encuentran en estadios iniciales de la apoptosis, tal y como refleja la caída del potencial de membrana mitocondrial en los dos trabajos anteriores, en los que se utilizó esta sonda para identificar las mitocondrias, también es posible estudiar si se ha desencadenado la muerte celular mediante el análisis de los niveles de apoptosis en ausencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk, o bien a través del marcaje del citocromo c, que informaría sobre su localización subcelular cuando se producen estas interacciones, localizándose en las mitocondrias cuando estas mantienen su integridad, o saliendo al citosol como consecuencia de la formación de poros en la membrana mitocondrial externa debido a la actuación de Bax/Bak activos.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en trabajos previos en este laboratorio^[31,51], a los que se ha hecho referencia en varias ocasiones, se observa que Bim, PUMA y Noxa también son capaces de interactuar con Bax y Bak, aunque forman complejos en un porcentaje inferior de células en comparación con el presente trabajo (valores entre el 10 % y el 60 %). Por lo tanto, de estos trabajos se concluye que estas tres proteínas “solo-BH3” pueden actuar como activadoras y sensibilizadoras. No obstante, en uno de estos trabajos se observó que estas proteínas preferían interactuar con Bak en lugar de con Bax, aunque en conjunto, Bim interactuaba principalmente con estas proteínas, mientras que PUMA, y en menor medida Noxa, lo hacían con las proteínas anti-apoptóticas, lo que indicaba que la función principal de Bim era la de activadora, a diferencia de PUMA y Noxa, que actuaban preferentemente como sensibilizadoras^[31]. Por el contrario, en el segundo trabajo, se vio que las tres proteínas “solo-BH3” formaban complejos más eficazmente con Bax que con Bak, aunque a nivel global, Bim mostraba una especificidad similar por las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas multidominio, lo que implicaría que desempeña un papel de proteína activadora y sensibilizadora de forma equitativa; sin embargo, PUMA y Noxa mostrarían una mayor preferencia por actuar como proteínas sensibilizadoras^[51].

Por otra parte, en dichos trabajos también se evaluaron las interacciones que establecían las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 con Bax y Bak, siendo esta una característica distintiva entre el modelo directo y el de desplazamiento, ya que el primero de ellos no contempla estas interacciones. De este modo, observaron que las proteínas anti-apoptóticas, aunque interactúan con Bax y Bak, muestran una mayor afinidad por las proteínas “solo-BH3”.

Los resultados obtenidos en este trabajo, comparados con los obtenidos en el bloque anterior, ponen de manifiesto la formación de complejos con Bax y Bak en un menor porcentaje de células que con las proteínas anti-apoptóticas. Sin embargo, a pesar de que la intensidad de fluorescencia detectada para Bim y PUMA muestra una mayor afinidad por las proteínas anti-apoptóticas, especialmente por Bcl-2, en el caso de Noxa, aunque parece que en general también se une de forma más específica a las proteínas anti-apoptóticas, la afinidad por Bcl-2 y Bak es similar. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las tres proteínas “solo-BH3” pueden actuar como activadoras y sensibilizadoras, ya que son capaces de establecer interacciones con los miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos multidominio, aunque se deduce que el papel principal de Bim y PUMA es el de proteínas sensibilizadoras, neutralizando a las proteínas anti-apoptóticas, mientras que Noxa actuaría preferentemente como activadora según este trabajo. Estos datos parecen contrastar con varios estudios previos en los que Bim se considera como una proteína activadora, mientras que coinciden en que PUMA y Noxa, las cuales se han considerado inicialmente como proteínas sensibilizadoras, pueden unirse a los miembros pro-apoptóticos multidominio, otorgándoles el papel de proteínas activadoras^[15,21].

En conjunto, la amplia variedad de resultados obtenidos entre los tres trabajos puede deberse a la disposición relativa de los fragmentos de Venus respecto a las proteínas de estudio utilizada en cada caso. Por otra parte, aunque faltan por evaluar algunas combinaciones diferentes a las utilizadas en estos tres trabajos, la existencia de interacciones entre las proteínas “solo-BH3” y las proteínas anti-apoptóticas y Bax/Bak, así como las interacciones (menos frecuentes) de las proteínas anti-apoptóticas con las pro-apoptóticas multidominio, sugieren que la activación de Bax y Bak puede tener lugar a través de un modelo que aúne características del modelo directo y del de desplazamiento, como pueden ser el modelo “embedded together” o el modelo unificado.

En conclusión, las interacciones que se establecen entre las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 y las proteínas pro-apoptóticas multidominio se han estudiado en presencia de z-VAD-fmk, un inhibidor general de caspasas que retrasa la muerte celular. Por lo tanto, sería interesante estudiar las mismas interacciones cuando este compuesto está ausente con el objetivo de obtener información acerca de cómo interaccionan estas proteínas entre sí y de determinar el papel de cada una en la apoptosis.

4.3 **Análisis del efecto de los nuevos inhibidores de Bcl-X_L (A-1155463) y Mcl-1 (A-1210477) sobre las interacciones entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas multidominio y las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa**

Puesto que las interacciones estudiadas en el apartado anterior constituyen uno de los procesos clave en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis, se ha analizado la forma en la que estas interacciones se ven afectadas cuando las células se tratan con dos nuevos miméticos BH3: A-1155463 y A-1210477, inhibidores selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1, respectivamente.

En primer lugar, se realizaron ensayos de curvas dosis-respuesta con estos fármacos en las células HeLa con el fin de determinar las concentraciones a utilizar en el estudio de las interacciones, según se indica en el apartado 3.5 de Materiales y métodos. De todas las dosis testadas, se eligió 10 µM para ambos compuestos, ya que a esta concentración no se observa un efecto citotóxico importante, lo que todavía permitiría la detección de interacciones.

Tras esto, los experimentos de BiFC con estos compuestos se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores, pero en este caso, cada fármaco se adicionó por duplicado a cada combinación, dejando controles para cada una de ellas. Por último, se determinó la relación relativa entre la intensidad de fluorescencia media de Venus y mRFP en cada combinación con el inhibidor correspondiente respecto a las células control, a las que se ha asignado un valor de intensidad relativa de 1 (Fig. 4.12).

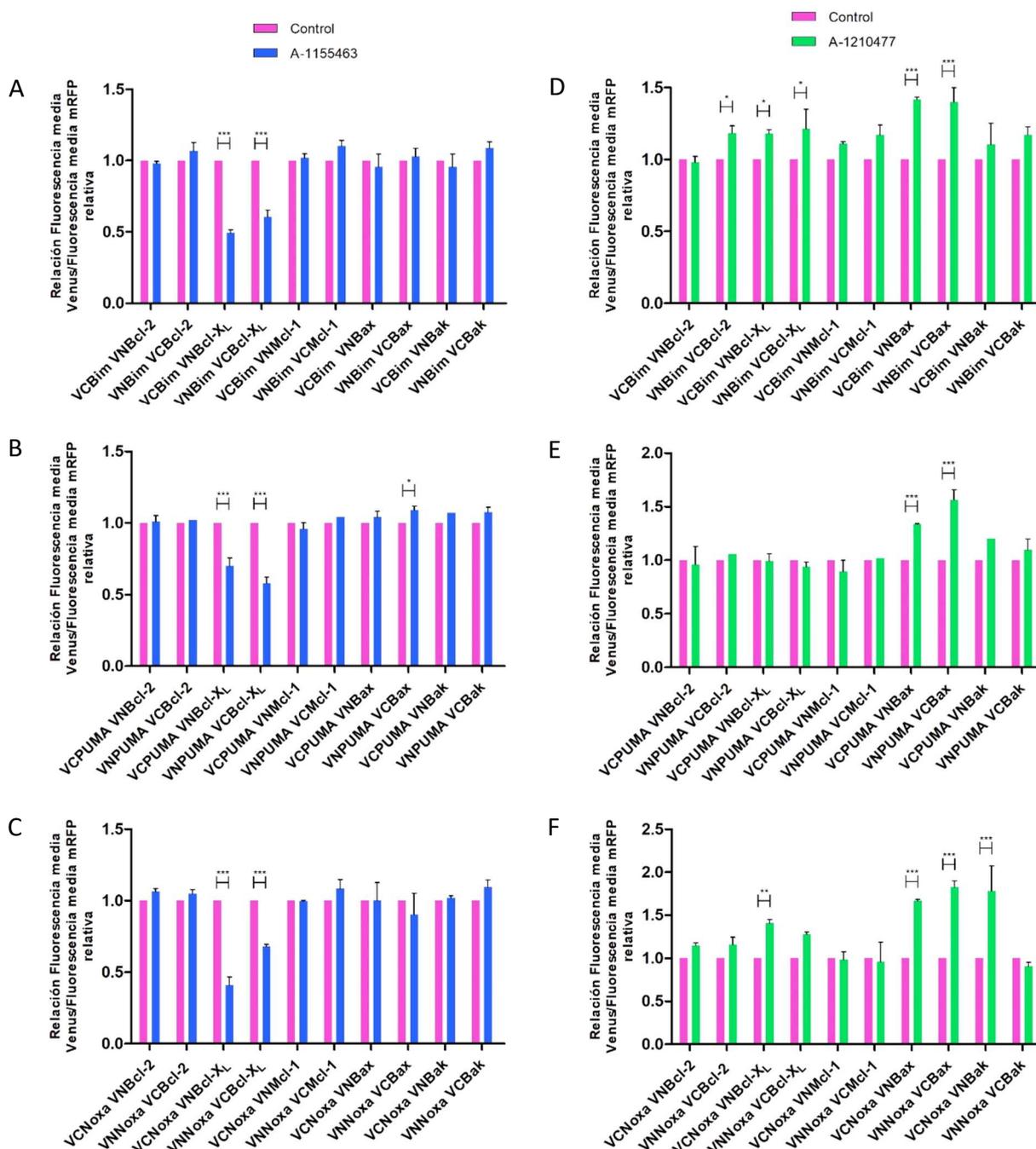


Figura 4.12. Análisis del efecto de los inhibidores selectivos de Bcl-XL (A-C) y Mcl-1 (D-F) en la formación de complejos BiFC entre las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas multidominio. Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 48 pocillos y, pasadas 24 horas, se transfectaron, con el vector pmRFP-TMD-Bcl-XL y las construcciones adecuadas para obtener las proteínas de fusión de interés, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.4 de Materiales y métodos. A continuación, se añadieron ambos inhibidores a una concentración de $10 \mu\text{M}$ por duplicado y se dejaron actuar durante 24 horas. Finalmente, se determinó la relación relativa entre la intensidad de fluorescencia media de Venus

y mRFP, asignando a las células control un valor de intensidad relativa de 1. Los resultados son media \pm SD de 2 experimentos independientes por cada proteína “solo-BH3”. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A la vista de estos resultados, se puede verificar que el inhibidor de Bcl-X_L es específico de esta proteína, ya que la señal de fluorescencia emitida por los complejos formados entre las proteínas “solo-BH3” y VN/VCBcl-X_L cae aproximadamente a la mitad, mientras que no es capaz de impedir la interacción de las “solo-BH3” con el resto de las proteínas anti-apoptóticas. El hecho de que la interacción de Bcl-X_L con las proteínas “solo-BH3” se reduzca en presencia de este inhibidor implica que Bcl-X_L interacciona con ellas a través de su dominio BH3. Por otra parte, cabría esperar que las proteínas “solo-BH3” aumentaran su interacción con Bax y/o Bak cuando se bloquea su unión con Bcl-X_L, un fenómeno que se deduce del aumento importante en la señal fluorescente para la combinación de las proteínas “solo-BH3” con Bax/Bak. Sin embargo, este incremento no es estadísticamente significativo con ninguna de las configuraciones, exceptuando la combinación VNPUMA/VCBax, para la que sí se observa un aumento significativo en dicha señal. Por lo tanto, esto sugiere que PUMA interviene en la vía apoptótica a través de la activación de Bax cuando su interacción con Bcl-X_L es interrumpida. Por otra parte, la ausencia de un aumento en la señal fluorescente puede deberse a la unión de las proteínas “solo-BH3” libres y las multidominio endógenas con las fusiones de Bax/Bak y las proteínas “solo-BH3”, respectivamente, compitiendo con las fusiones que complementan la fluorescencia. Si esto fuera así, podría existir un incremento en las interacciones entre las proteínas “solo-BH3” y Bax/Bak que no se estuviera detectando mediante la técnica BiFC, ya que las proteínas endógenas no tienen fusionado el fragmento de Venus correspondiente.

Por su parte, el inhibidor de Mcl-1 afecta mínimamente a la interacción de esta proteína con Bim, PUMA y Noxa, sin provocar cambios significativos, lo que parece indicar que el mimético BH3 A-1210477 no es específico para Mcl-1. Esta observación parece entrar en conflicto con el efecto teórico que provoca este fármaco, ya que cabría esperar que este inhibidor interrumpiera, en mayor o menor medida, las interacciones entre las proteínas “solo-BH3” y Mcl-1; sin embargo, con estos resultados no se puede concluir que este compuesto sea incapaz de unirse a Mcl-1. De hecho, en un estudio reciente se ha descrito que este compuesto se une con gran afinidad a esta proteína, y además, se determinó mediante un sistema de doble híbrido adaptado a células de mamífero que es capaz de interrumpir la interacción de Bim y Noxa con esta proteína anti-apoptótica^[25]. Una razón que explicaría el motivo por el que no se observan variaciones en la interacción de las proteínas “solo-BH3” con este compuesto puede ser que la unión del mimético BH3 a Mcl-1 conlleva cambios conformacionales que mantienen la interacción de esta proteína anti-apoptótica con Bim, PUMA y Noxa, haciendo que las interacciones tengan lugar a través de una región distinta al bolsillo hidrofóbico de esta proteína anti-apoptótica, e incluso las proteínas “solo-BH3” podrían interaccionar con Mcl-1 a través de una región distinta al dominio BH3. No obstante, la suposición de que las interacciones se produzcan a través de regiones distintas al dominio BH3 parece contrastar con lo descrito en un trabajo de este laboratorio, en el que se observó que la delección del dominio BH3 de Bim y PUMA implicaba una disminución en el porcentaje de células capaces de generar los complejos y en la intensidad de fluorescencia emitida por los mismos^[51]. Sin embargo, esta observación y la hipótesis planteada aquí no son excluyentes, sino que, en conjunto, pueden indicar que el dominio BH3 de las proteínas “solo-BH3” es necesario para que se produzca su interacción con Mcl-1.

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con el inhibidor de Bcl-X_L, el inhibidor de Mcl-1 potencia algunas de las interacciones de las proteínas “solo-BH3” con el resto de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, tal y como indica el aumento significativo de la señal fluorescente para la combinación de Bcl-X_L con Bim y Noxa, y también en el caso de VNBim/VCBcl-2. Además, las tres proteínas “solo-BH3” aumentan de forma considerable su interacción con Bax, y en el caso de VCNoxa, también con VNBak. Este aumento de interacciones podría deberse a la unión del inhibidor de Mcl-1 con la proteína Mcl-1 endógena, evitando que esta proteína interactúe con las proteínas “solo-BH3” de fusión, de manera que estas podrían aumentar su interacción con las proteínas anti-apoptóticas o con Bax/Bak según su afinidad. Otra posibilidad es que la inhibición de Mcl-1 indujera un incremento en la expresión de las proteínas “solo-BH3”, el cual favorecería estas interacciones, aunque en este caso, habría que verificar dicho aumento en la expresión. Estos resultados indican que Bim y PUMA prefieren actuar en la vía apoptótica a través de Bax cuando está presente A-12101477, mientras que Noxa podría intervenir uniéndose tanto a Bax como a Bak. Este incremento sería lógico si las interacciones con Mcl-1 se redujeran, ya que las proteínas “solo-BH3” quedarían libres para interactuar con Bax/Bak o con otras proteínas anti-apoptóticas.

Puesto que A-1155463 y A-1210477 son compuestos que han sido desarrollados recientemente, la evaluación de su especificidad, potencia y eficacia acaba de comenzar. De hecho, todavía no se han publicado trabajos en los que se estudie el efecto del inhibidor selectivo para Bcl-X_L en las interacciones que se producen entre las proteínas de la familia Bcl-2, mientras que sí se ha realizado algún estudio en el que se evalúan las consecuencias que conlleva el uso del inhibidor de Mcl-1 sobre estas interacciones^[25], las cuales han sido comentadas en líneas anteriores. Sin embargo, pese a la ausencia de estudios con el inhibidor de Bcl-X_L, existen algunos trabajos en los que se ha evaluado el efecto de distintos miméticos BH3 sobre las interacciones entre proteínas de esta familia. En uno de estos estudios se vio que ABT-737 inhibía de forma selectiva la unión de Bad y tBid a Bcl-X_L y Bcl-2 en las células MCF-7 (cáncer de mama), mientras que no era capaz de interrumpir la unión de Bim con estas proteínas anti-apoptóticas^[69]. Sin embargo, si se compara el efecto del inhibidor selectivo de Bcl-X_L con el efecto observado en un trabajo realizado en este laboratorio^[31], en el que se analizó, entre otros, el efecto de ABT-737 sobre las misma línea celular que en el presente trabajo, se observa que A-1155463 inhibe de forma específica a Bcl-X_L, a diferencia de ABT-737, que incluye entre sus dianas a Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w, y que además es capaz de bloquear la unión de Bcl-X_L a Bim, PUMA y Noxa, mientras que ABT-737 no era capaz de inhibir la interacción de Bcl-X_L con PUMA.

En resumen, los resultados derivados de este estudio indican que A-1155463 inhibe de forma selectiva la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Bcl-X_L a través del dominio BH3; sin embargo, al quedar libres estas proteínas, no se observa una mayor interacción de estas con ninguna de las proteínas pro-apoptóticas multidominio, exceptuando a PUMA, que aumenta su interacción con Bax. En el resto de los casos es posible que la interacción se produzca entre una de las fusiones y las proteínas endógenas pero, como se ha mencionado anteriormente, estas no pueden detectarse mediante la técnica BiFC. Por otra parte, A-1210477, lejos de inhibir la interacción de Mcl-1 con las proteínas “solo-BH3”, no muestra ningún efecto sobre dichas interacciones, lo que podría indicar que estas interacciones se producen a través de una región distinta al bolsillo hidrofóbico de Mcl-1, e incluso a través de una zona diferente al dominio BH3 de las proteínas “solo-BH3”, aunque este dominio sería necesario para que se produjeran dichas interacciones. Asimismo, la presencia de este inhibidor potencia la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Bax, y en el caso de Noxa, también con Bak, lo que indica que tanto Bim como PUMA

actuarían en la vía apoptótica a través de Bax, mientras que Noxa podría hacerlo a través de Bax y Bak. Por otro lado, también se favorece la interacción de Bim con Bcl-2 y Bcl-X_L y de Noxa con Bcl-X_L a pesar de que la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Mcl-1 no se interrumpen.

Por lo tanto, para confirmar todas las observaciones y conclusiones extraídas de estos ensayos, se deberían repetir los experimentos, y también sería oportuno realizar estos ensayos con distintos mutantes para determinar las regiones de cada proteína implicadas en las interacciones. Por otra parte, también sería necesario llevar a cabo este análisis en todas las combinaciones posibles derivadas del cambio de localización del fragmento fluorescente de Venus respecto a la proteína de estudio con el fin de minimizar los posibles impedimentos estéricos que se pudieran producir en alguna de las combinaciones, que distorsionarían el nivel real de interacción observado. Incluso se podrían estudiar estas interacciones utilizando una metodología distinta, como por ejemplo la co-inmunoprecipitación o mediante el sistema de doble híbrido aplicado en células de mamífero, que permitieran complementar los resultados obtenidos.

4.4 Estudio del efecto de distintos miméticos BH3 en células A549 y en células de mieloma múltiple

Durante los últimos años se han realizado multitud de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los que se analizaban la potencia, eficacia y toxicidad de distintos miméticos BH3 en una gran cantidad de líneas celulares tumorales y diversos modelos preclínicos, e incluso algunos de ellos están siendo evaluados actualmente para su aplicación en la clínica. De toda la familia de miméticos BH3, algunos como ABT-737 y sus análogos han sido ampliamente caracterizados, mientras que otros como A-1155463 y A-1210477, inhibidores selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1, respectivamente, han aparecido recientemente y, por lo tanto, han sido menos estudiados^[15]. Por ello, se decidió evaluar, por una parte, el potencial terapéutico de estos nuevos inhibidores en la línea celular A549 (Fig. 4.13A), el cual se comparó, en la medida de lo posible, con el que mostraban ABT-199 (inhibidor específico de Bcl-2) y ABT-737 (inhibidor de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w) en la misma línea celular. Asimismo, se ensayaron los nuevos miméticos BH3 en las líneas RPMI 8226, U266 y MM.1S, ya que se ha visto que el mieloma múltiple es un tipo de neoplasia que sobreexpresa Mcl-1 en muchos casos, mientras que otras veces son más dependientes de Bcl-2 o Bcl-X_L^[24,70,71]. Por ello, se decidió comprobar su acción pro-apoptótica en dichas líneas (Fig. 4.13B y C) y comparar los resultados obtenidos aquí con los publicados en un estudio reciente.

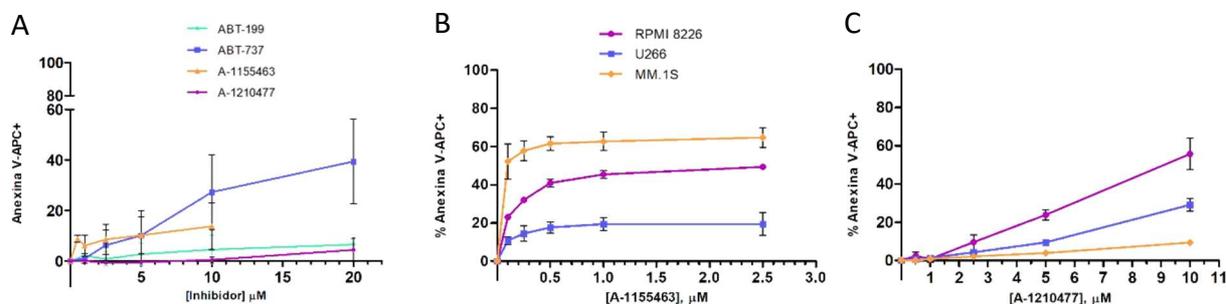


Figura 4.13. Sensibilidad de las células A549 (A) y las células RPMI 8226, U266 y MM.1S (B y C) a diferentes miméticos BH3. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células A549 por pocillo en dos placas de 24 pocillos y a las 24 horas, se añadieron los miméticos BH3 ABT-199, ABT-737, A-1155463 y A-1210477 (A) a las concentraciones señaladas en las gráficas, dejando 4 pocillos como control en cada placa y añadiendo DMSO a dos de ellos para normalizar los datos. Por otra parte, se sembraron entre 10^5 y $1,5 \cdot 10^5$ células RPMI 8226, U266 y MM.1S por pocillo en dos placas de 48 pocillos a las que se adicionaron los compuestos A-1155463 (B) y A-1210477 (C) por duplicado a

las concentraciones indicadas en las gráficas, dejando dos pocillos por línea celular como control en cada placa. Tras 48 de tratamiento, las células se marcaron con Anexina V-APC para analizar la fluorescencia emitida por citometría de flujo. Los resultados son media \pm SD de 2 experimentos independientes, pero en el caso de las células A549, estos resultados se corresponden con los datos obtenidos tras la normalización con DMSO.

En cuanto a las células A549, estos resultados muestran un escaso efecto citotóxico de ABT-199 y del inhibidor específico para Mcl-1 como agentes únicos, causando la muerte de alrededor del 10 % de las células a la concentración más elevada (20 μ M en ambos casos), mientras que ABT-737, y en menor medida, el inhibidor selectivo de Bcl-X_L, promueven la apoptosis de un porcentaje mayor de células cuando se utiliza la máxima dosis, que varía entre el 20 % y el 60 % en el caso de ABT-737 a 20 μ M, y entre el 5 y el 20 % para el inhibidor de Bcl-X_L a 10 μ M. Estos resultados sugieren que el papel de Mcl-1 en la supervivencia de la línea celular A549 es muy discreto, ya que el porcentaje de muerte celular detectado no es significativo cuando se inhibe la función anti-apoptótica de esta proteína, lo que es indicativo de que existen otras proteínas que intervienen en este proceso. En concreto, parece que las células A549 tienen una fuerte dependencia de Bcl-X_L para sobrevivir, ya que los inhibidores de esta proteína son los más tóxicos para esta línea celular. Tal y como se ha demostrado en el apartado 4.3 y en trabajos anteriores^[31], los inhibidores de Bcl-X_L impedirían su función anti-apoptótica, liberando las proteínas pro-apoptóticas que se encontraban unidas a ella, de manera que se desencadena la apoptosis^[15]. No obstante, el hecho de que la eficacia de ABT-737 sea mayor que la observada para el inhibidor de Bcl-X_L parece revelar que estas células se valen, en menor medida, de otras proteínas anti-apoptóticas para protegerse de la apoptosis, ya que si la muerte de las células dependiera únicamente de Bcl-X_L, debería observarse un efecto citotóxico similar en ambos compuestos. Puesto que ABT-737 es capaz de inhibir a Bcl-2 y Bcl-w además de a Bcl-X_L, es muy posible que una de estas dos proteínas ayude a Bcl-X_L en la protección frente a la apoptosis. En el caso de Bcl-2, su inhibición específica mediante ABT-199 no parece mostrar un efecto pro-apoptótico, mientras que al no disponer de inhibidores selectivos para Bcl-w, no se ha podido estudiar el papel de esta proteína en la apoptosis de estas células. En cualquier caso, para comprobar la implicación de estas dos proteínas en la supervivencia de las células A549, sería necesario combinar el inhibidor específico de Bcl-X_L con el de Bcl-2 y, en el caso de que existiera, con el de Bcl-w a dosis crecientes para comparar el nivel de mortalidad inducido en estos casos con el observado cuando ABT-737 actúa en solitario.

En cuanto al efecto de A-1155463 y A-1210477 en las líneas de mieloma múltiple, se observa que el nivel de muerte basal estaba en torno al 29 % en las células RPMI 8226, el 19 % en las células U266, y el 15 % en las células MM.1S. En el caso de las dos últimas líneas celulares, estos valores se incluyen dentro del nivel de muerte basal aceptable para las células en suspensión (del 15-20 %), mientras que, en el caso de las células RPMI 8226, el valor obtenido se aleja del rango indicado.

Por otra parte, respecto a la acción de los fármacos en estas líneas celulares, el inhibidor de Bcl-X_L muestra un efecto citotóxico más potente que el inhibidor de Mcl-1 a las mismas concentraciones en las tres líneas celulares (Fig. 4.13B y C). De hecho, se necesitan dosis más elevadas de este último compuesto para alcanzar niveles de muerte celular similares a los obtenidos con el inhibidor de Bcl-X_L a las dosis más elevadas. No obstante, cada línea celular responde de forma diferente a ambos compuestos. En concreto, las células RPMI 8226 muestran una sensibilidad intermedia al inhibidor de Bcl-X_L, alcanzando niveles de muerte celular cercanos al 50 % con la concentración más elevada (2,5 μ M) (Fig. 4.13B), mientras que son las células más sensibles a la acción del inhibidor de Mcl-1, con el que se observa una muerte celular de alrededor del 50 % al utilizar la dosis más alta (10 μ M)

(Fig. 4.13C). En el caso de las células U266, el efecto del inhibidor de Bcl-X_L es reducido, causando la muerte de, aproximadamente, el 20 % de las células a la dosis más elevada (Fig. 4.13B); sin embargo, esta línea celular presenta una sensibilidad intermedia al inhibidor de Mcl-1, con el que se observan niveles de muerte celular máximos de en torno al 30 % (Fig. 4.13C). Por su parte, las células MM.1S son las más sensibles al inhibidor de Bcl-X_L, ya que este provoca la muerte de alrededor del 60 % de las células cuando se utiliza la concentración más alta (Fig. 4.13B), mientras que son bastante resistentes a la acción del inhibidor de Mcl-1, que solo es capaz de inducir muerte en un 10 % de estas células a la dosis más elevada (Fig. 4.13C). Por lo tanto, estos datos solo permitieron determinar la concentración a la que estos fármacos inducían la muerte del 50 % (LC₅₀) de las células tras 48 horas de actuación en el caso del inhibidor de Bcl-X_L en la línea celular MM.1S (LC₅₀ = 0,1 μM) y del inhibidor de Mcl-1 en las células RPMI 8226 (LC₅₀ = 9,1 μM). En el resto de los casos, no se llegó a alcanzar un porcentaje de muerte celular del 50 %, por lo que estas concentraciones no se pudieron calcular.

Estos resultados se pueden comparar con los publicados en un trabajo reciente^[70] en el que, entre otras cosas, ensayaron el nuevo inhibidor selectivo de Bcl-X_L en un panel de 25 líneas celulares de mieloma múltiple y, además, probaron el novedoso inhibidor específico de Mcl-1 sobre dos líneas celulares de mieloma dependientes de esta proteína. Los ensayos en el panel de líneas celulares indicaron que las células RPMI 8226 y MM.1S, entre otras, eran muy sensibles al inhibidor de Bcl-X_L (IC₅₀ a las 48 horas de 0,1-0,5 μM y 0-0,1 μM, respectivamente), mientras que las células U266 eran resistentes a la acción de este compuesto (IC₅₀ a las 48 horas superior a 5 μM). Desde el punto de vista cualitativo, estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, pues en ambos casos se observa que la línea celular MM.1S es la más sensible al inhibidor de Bcl-X_L y que las células U266 son las menos afectadas por este fármaco, mientras que las células RPMI 8226 muestran una sensibilidad intermedia. Sin embargo, existen diferencias en el aspecto cuantitativo, ya que algunas de las concentraciones determinadas en este trabajo para inducir la muerte de la mitad de las células ensayadas no están incluidas dentro de los rangos de IC₅₀ definidos en el citado estudio para este inhibidor, como es el caso de las células RPMI 8226 (LC₅₀ > 2,5 μM frente a IC₅₀ = 0,1-0,5 μM). Esta diferencia se debe, principalmente, a que los parámetros estudiados y la metodología utilizada han sido diferentes en ambos estudios, ya que en el presente trabajo se ha analizado la muerte celular que inducían los inhibidores mediante citometría de flujo, mientras que en el estudio al que se hace referencia se ha determinado la viabilidad celular tras el tratamiento a través del ensayo “CellTiter-Glo”. Por lo tanto, los resultados no tienen por qué coincidir necesariamente, ya que mediante el análisis con anexina se determina exclusivamente la muerte celular, mientras que en otro tipo de ensayos como el “CellTiter-Glo” los resultados dependen de la inhibición del crecimiento y de la muerte celular.

Por otra parte, este estudio reveló que el inhibidor de Mcl-1 ejercía un efecto poco potente en las dos líneas celulares en las que se testó (IC₅₀ > 5 μM). Esta conclusión también se ha extraído de los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se solo se ha podido calcular la dosis necesaria para provocar la muerte del 50 % de las células en la línea celular RPMI 8226, como ya se ha indicado anteriormente.

En resumen, el efecto citotóxico de los inhibidores selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1 es directamente proporcional a la dosis ensayada y al tiempo de actuación. Concretamente, las líneas celulares RPMI 8226 y MM.1S son más sensibles al inhibidor de Bcl-X_L, lo que indica que esta proteína anti-apoptótica estaría implicada en favorecer su supervivencia. Sin embargo, las células U266 muestran una mayor sensibilidad al inhibidor de Mcl-1 a la dosis más alta, por lo que su supervivencia dependería, en mayor

medida, de esta proteína. No obstante, para confirmar la implicación de estas proteínas en la supervivencia de estas líneas celulares, sería necesario estudiar el papel de otras proteínas anti-apoptóticas en este proceso, como Bcl-2, utilizando inhibidores específicos o mediante manipulación genética. Por otra parte, estos resultados podrían constituir la base para estudiar la combinación de ambos inhibidores con otros fármacos tradicionales en distintas líneas de mieloma múltiple, estrategia que se está evaluando actualmente en ensayos clínicos para distintos miméticos BH3 en varios tipos de cáncer^[15].

Por último, si se comparan los resultados obtenidos para cada tipo de línea celular a nivel general, se observa que las tres líneas de mieloma múltiple son considerablemente más sensibles a los inhibidores de Bcl-X_L y Mcl-1 que las células A549, lo que puede interpretarse como una mayor dependencia de las células de RPMI 8226, U266 y MM.1S de Bcl-X_L y Mcl-1 para mantener su supervivencia que las células A549, en las que podrían intervenir otras proteínas de la familia Bcl-2, como Bcl-w o la propia Bcl-2, para favorecer la supervivencia de estas células, tal y como se ha explicado anteriormente.

4.5 Estudio de la combinación de los miméticos BH3 A-1155463 y A-1210477 con diferentes fármacos antimitóticos en la línea celular A549

Una vez determinada la sensibilidad de las células A549 a los nuevos inhibidores de Bcl-X_L y Mcl-1, estos se combinaron con los fármacos antimitóticos barasertib, vincristina, docetaxel y alisertib con el fin determinar si existe un efecto sinérgico al combinarlos, un fenómeno que ya se ha observado en diversos estudios al combinar estos antimitóticos con diferentes miméticos BH3 en diversas líneas celulares y en ensayos *in vivo*^[25,43–45]. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo tal y como se indica en la Fig. 4.14.

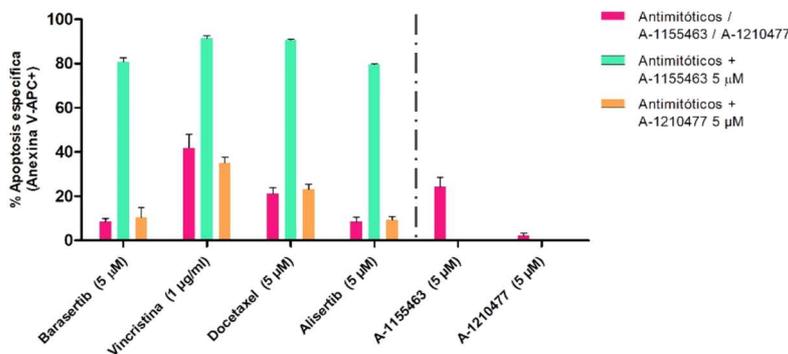


Figura 4.14. Sensibilidad de las células A549 a distintos fármacos antimitóticos y su combinación con los inhibidores selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas, se adicionaron diferentes fármacos antimitóticos y los inhibidores específicos para Bcl-X_L y Mcl-1, o bien los compuestos antimitóticos se combinaron con el primer o el segundo inhibidor a las concentraciones indicadas en las gráficas, dejando un pocillo como control. Los compuestos se dejaron actuar durante 48 horas y, finalmente, las células se marcaron con Anexina V-APC para analizar la muerte celular por citometría de flujo. El porcentaje representado es el incremento de células positivas para la Anexina V-APC respecto al control. Los resultados son media \pm SD de 2 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El análisis del marcaje con Anexina V-APC confirmó que, a las concentraciones utilizadas, tanto barasertib como alisertib inducían un bajo nivel de muerte celular (alrededor de un 10 %), que vincristina era el compuesto con el que más muerte celular se detectaba (en torno a un 40 %), seguida del inhibidor de Bcl-X_L y de docetaxel (aproximadamente, un 30 % y un 20 % de muerte celular, respectivamente), y que el efecto del inhibidor de Mcl-1 sobre las células A549 era despreciable (Fig. 4.14).

Dado que la muerte celular observada al utilizar estos compuestos como agentes únicos a las concentraciones elegidas no es demasiado elevada, se decidió combinar cada antimitótico a estas mismas concentraciones con los miméticos BH3 para determinar si existía un efecto sinérgico entre cada pareja de compuestos. Así, tras 48 horas de tratamiento con estas combinaciones se analizó el marcaje con Anexina V-APC, el cual determinó que la combinación del inhibidor de Bcl-X_L con cualquiera de los fármacos antimitóticos era muy eficaz, provocando la muerte de entre el 80 y el 90 % de las células, mientras que no se observaron diferencias significativas al combinar estos compuestos con el inhibidor de Mcl-1 (Fig. 4.14). Pese al alto porcentaje de muerte celular detectado en todas las combinaciones con el inhibidor de Bcl-X_L, parece que la estrategia más efectiva es combinar este inhibidor con vincristina y docetaxel. Esta mayor efectividad puede deberse a que estos fármacos son capaces de inducir un cierto nivel de apoptosis cuando actúan en solitario, a diferencia de barasertib y alisertib, cuya capacidad de inducción de muerte celular es bastante más reducida. Si se comparan los resultados obtenidos con el inhibidor de Bcl-X_L con los observados en un trabajo previo del laboratorio en el que se analizó la sinergia entre barasertib y ABT-737, se observa que el efecto sinérgico es más potente al combinar el inhibidor que ABT-737 (80 % de mortalidad frente al 60 %, aproximadamente)^[72]. La mayor sinergia observada con el inhibidor de Bcl-X_L indica que esta proteína es la que provoca principalmente este efecto. La menor capacidad de inducir sinergia que muestra la combinación con ABT-737 puede deberse a que este compuesto se une con una afinidad 100 veces menor a Bcl-X_L que el inhibidor específico.

En conjunto, estos resultados indican que existe un efecto sinérgico al combinar cualquiera de estos fármacos antimitóticos con el inhibidor de Bcl-X_L, ya que el nivel de mortalidad celular inducido por las combinaciones es mayor que la suma de los porcentajes de muerte celular obtenidos con los fármacos por separado. Por lo tanto, esta sinergia indicaría que Bcl-X_L es una proteína clave para la supervivencia de las células A549 cuando estas se tratan con estas combinaciones. En cambio, no se observa este efecto al combinar estos compuestos con el inhibidor de Mcl-1 a las concentraciones utilizadas, aunque cabe la posibilidad de que se produzca sinergia si se modifican las concentraciones, por lo que, para comprobarlo, se realizarían distintos ensayos de viabilidad o muerte celular en los que se utilizaran concentraciones crecientes de ambos tipos de compuestos sin que estos lleguen a inducir una elevada mortalidad cuando los fármacos se utilizan en solitario.

4.6 Análisis de la expresión Bcl-X_L, Mcl-1 y Bim en la línea celular A549 mediante Western Blot

Los resultados del apartado anterior parecen sugerir que es Bcl-X_L y no Mcl-1 la que interviene de forma crítica en la supervivencia de las células A549 cuando son tratadas con combinaciones de fármacos antimitóticos y los nuevos miméticos BH3. La dependencia de estas células por Bcl-X_L también parecía evidente al tratarlas con el mimético BH3 ABT-737 combinado con barasertib en un trabajo previo llevado a cabo en este laboratorio^[72], aunque no se llegó a determinar el nivel de expresión de esta proteína anti-apoptótica en las combinaciones. Por ello, se evaluó la expresión de Bcl-X_L, así como la de Mcl-1 y Bim en células A549 tratadas con los fármacos antimitóticos barasertib, vincristina, docetaxel, el mimético BH3 ABT-737 y con combinaciones de este último con los anteriores (Fig. 4.15), con el objetivo de conocer si la expresión de estas proteínas está relacionada con la sensibilidad de las células a estos fármacos y sus combinaciones.

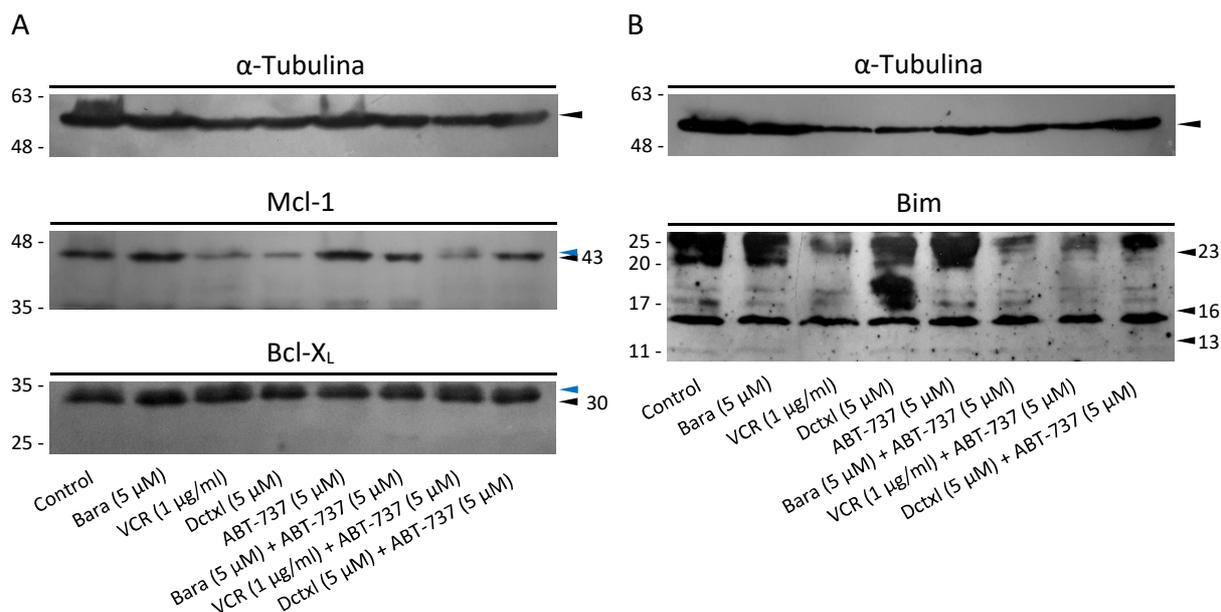


Figura 4.15. Expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-X_L y Bim en células A549 sin tratar y tratadas con distintos compuestos y combinaciones de los mismos. Se realizaron extractos celulares de células control y tratadas durante 48 horas con los fármacos antimitóticos barasertib (Bara), vincristina (VCR) y docetaxel (Dctxl), el mimético BH3 ABT-737, y con combinaciones de este último con los compuestos antimitóticos, utilizando las concentraciones indicadas en la figura y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6 de Materiales y métodos. Finalmente, se analizó la expresión de Mcl-1 (A), Bcl-X_L (B) y Bim (C), y se utilizó la α -tubulina como control de carga (D). Los pesos moleculares de referencia y el peso molecular de cada proteína (kDa) aparecen señalados en la margen izquierda y derecha de las imágenes, respectivamente. Las flechas azules hacen referencia a las formas fosforiladas de Bcl-X_L y Mcl-1.

En general, estas tres proteínas se expresan en mayor o menor medida en las células A549 bajo todas las condiciones experimentales estudiadas. Si se observa el control de carga del segundo experimento (Fig. 4.15B α -tubulina), se puede ver que su expresión disminuye en presencia de vincristina, docetaxel, ABT-737 y las combinaciones de este último con barasertib y vincristina con respecto a las control. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la carga de proteína total, aunque en el caso de vincristina, se ha visto en células neuronales que la tubulina se degrada como consecuencia de la desestabilización de los microtúbulos^[73]. Con respecto a Mcl-1, su expresión parece aumentar al tratar las células con barasertib y ABT-737 si se compara con la expresión de esta proteína en las células control; por otra parte, su presencia disminuye al exponer a las células a vincristina, docetaxel y una combinación de ABT-737 con vincristina, y en el caso de someterlas a una combinación de ABT-737 con barasertib o docetaxel, los niveles de Mcl-1 se asemejan a los observados en las células control (Fig. 4.15A Mcl-1). El hecho de que Mcl-1 sea más abundante cuando las células se tratan con barasertib y ABT-737 indicaría que es un regulador importante en la respuesta a estos fármacos; de hecho, se ha visto que la sobreexpresión de Mcl-1 en células de melanoma confiere resistencia al tratamiento con ABT-737^[74]. Por otra parte, los bajos niveles de Mcl-1 detectados al utilizar vincristina, docetaxel y la combinación de vincristina con ABT-737 pueden deberse a una degradación de esta proteína durante el arresto mitótico, ya que en un estudio se ha visto que Mcl-1 se degrada a través de un mecanismo dependiente del proteasoma en células HeLa y U2OS (osteosarcoma humano) tras sufrir un arresto mitótico durante 2 horas debido a la acción de agentes anti-microtúbulos, y que esta degradación estaría inducida por la fosforilación de Mcl-1 en su residuo Thr92. Además, esta fosforilación podría explicar la presencia de una banda en la parte superior de la combinación de vincristina con ABT-737 y, aunque

mucho más tenue y desdibujada, también parece observarse en las células tratadas con vincristina^[75]. Por lo tanto, los bajos niveles de Mcl-1 detectados en estos escenarios sugieren que esta proteína no interviene en la protección frente a la apoptosis inducida por estos fármacos.

En cuanto a Bcl-X_L, se observa una expresión elevada de esta proteína en todas las situaciones ensayadas, incluido en las células control (Fig. 4.15 Bcl-X_L), lo que indicaría que los niveles basales de Bcl-X_L en las células A549 son elevados y que esta proteína actuaría como el principal regulador en respuesta a todos los compuestos y combinaciones ensayadas. Estos elevados niveles de Bcl-X_L también se detectaron en un estudio en el que se determinó el papel de Bcl-X_L y Mcl-1 en la respuesta al tratamiento con vincristina, del que dedujeron que la elevada expresión de Bcl-X_L regulaba la respuesta celular al arresto mitótico inducido por este fármaco, ya que si esta proteína se silenciaba, las células sufrían apoptosis tras 24 horas de tratamiento con vincristina^[76]. Por otra parte, en todos los casos se observa una doble banda que indica un mayor peso molecular y se corresponde con la proteína Bcl-X_L fosforilada, aunque esta fosforilación es menos acusada en el caso de las células control. Esta fosforilación, que afecta a las proteínas anti-apoptóticas, se ha señalado que está ligada a procesos y aspectos muy diferentes, como por ejemplo la localización subcelular, la promoción o el entorpecimiento de la supervivencia celular, o el arresto mitótico como consecuencia de la actuación de compuestos antimitóticos, entre otros^[20]. En este caso, esta modificación post-traduccional podría deberse al bloqueo en mitosis cuando las células se tratan con los fármacos antimitóticos y podría favorecer la apoptosis en las células tratadas con ABT-737 y combinaciones de este con los fármacos antimitóticos.

Por último, Bim posee tres isoformas principales: BimEL, BimL y BimS, las cuales se originan por “splicing alternativo” y pueden desempeñar distintas funciones^[77]. En este caso, la expresión de Bim es variable en función del tratamiento al que son sometidas las células y de la isoforma que se quiera estudiar (Fig. 4.15 Bim). En concreto, la isoforma BimL (16 kDa) es la que muestra un mayor nivel de expresión, que es similar en todas las condiciones ensayadas, mientras que la isoforma más pequeña, BimS (13 kDa), apenas puede identificarse en la imagen en cualquiera de los escenarios. Por su parte la expresión de BimEL (23 kDa) es más variable en función del tratamiento que se les aplica a las células. En concreto, esta isoforma de Bim es abundante en las células control y en las tratadas con barasertib, docetaxel y ABT-737, mientras que su expresión disminuye considerablemente cuando las células se tratan con vincristina y las combinaciones de los fármacos antimitóticos con ABT-737. Estos resultados indican que la expresión basal de Bim es elevada, aunque su efecto pro-apoptótico estaría neutralizado, posiblemente debido a su unión con Bcl-X_L, cuyo nivel de expresión basal también es elevado. Con respecto al resto de condiciones ensayadas, se puede deducir que Bim regula la respuesta a los antimitóticos barasertib y docetaxel, así como al mimético BH3 ABT-737. Relacionado con esto, se ha visto que las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas que presentan un mayor nivel de expresión de Bim son más susceptibles a sufrir apoptosis tras el tratamiento con el taxano paclitaxel^[78]. Además, también se ha visto que ABT-737 no es capaz romper la interacción de las mayores isoformas de Bim con Bcl-X_L y Bcl-2, lo que puede explicar el elevado nivel de expresión de Bim y Bcl-X_L en este caso^[69]. Por otra parte, en aquellas condiciones ensayadas en las que el nivel de Bim es bajo, podría indicar que la respuesta a esos tratamientos depende de otras proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3”, como PUMA y Noxa, o de proteínas pro-apoptóticas multidominio, como Bax y Bak.

En todo caso, para confirmar el papel de Mcl-1, Bcl-X_L y Bim en la respuesta al tratamiento con los compuestos ensayados en las células A549 sería necesario realizar de nuevo estos experimentos, que podrían complementarse con la cuantificación de la cantidad de proteína presente en las bandas de interés por densitometría.

5 Conclusiones

Para finalizar, las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se recogen en las siguientes líneas:

1. La disposición relativa de los fragmentos de Venus respecto a las proteínas Bim, PUMA y Noxa es un factor limitante para la detección y localización mitocondrial de estas interacciones.
2. Las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” Bim, PUMA y Noxa son capaces de formar complejos en mayor o menor medida con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, así como con las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax y Bak. Esto indica que estas proteínas “solo-BH3” pueden actuar como activadoras y sensibilizadoras en la vía apoptótica mitocondrial, si bien el papel principal de Bim y PUMA sería el de sensibilizadoras, mientras que Noxa sería preferentemente activadora. Por lo tanto, la activación de Bax y Bak tendría lugar a través del modelo “embedded together” o del modelo unificado.
3. En estas mismas células, A-1155463 bloquea de forma selectiva la interacción de Bcl-X_L con las proteínas “solo-BH3” pero no fomenta de manera estadísticamente significativa la formación de complejos con Bax/Bak, aunque PUMA parece aumentar su afinidad por Bax.
4. A-1210477 no altera la interacción de Mcl-1 con estas proteínas pero sí favorece su interacción con Bax, y en el caso de Noxa, también con Bak. Además, este compuesto aumenta la afinidad de Bim y Noxa por Bcl-X_L, y en el caso de Bim, también con Bcl-2.
5. ABT-737 y en menor medida A-1155463 inducen un efecto citotóxico moderado en las células A549, a diferencia de ABT-199 y A-1210477, cuya capacidad pro-apoptótica es muy reducida. Todo esto indicaría que la supervivencia de estas células depende, principalmente, de Bcl-X_L.
6. La sensibilidad relativa a miméticos BH3 varía entre diferentes líneas de mieloma múltiple. Las células RPMI 8226 y MM.1S son más sensibles al inhibidor de Bcl-X_L, mientras que las células U266 muestran mayor sensibilidad al inhibidor de Mcl-1.
7. La combinación de A-1155463 con barasertib, alisertib, vincristina y docetaxel induce un efecto sinérgico en las células A549. Sin embargo, no se observa sinergia al combinar A-1210477 con estos compuestos antimetabólicos en la misma línea celular.
8. El tratamiento con fármacos antimetabólicos, solos o combinados con miméticos BH3, induce cambios en la expresión de Mcl-1, Bcl-X_L y Bim.

Conclusions

To close this work, here are the conclusions drawn from it:

1. The relative layout of the Venus fragments with respect to these proteins is a limiting factor for the detection and mitochondrial localization of these interactions.
2. “BH3-only” proteins Bim, PUMA and Noxa are able to form complexes to a greater or lesser extent with the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 as well as with pro-apoptotic multidomain Bax and Bak. This indicates that these “BH3-only” proteins can act as activators and sensitizers in the mitochondrial apoptotic pathway, although the main role of Bim and PUMA would be that of sensitizers, whereas Noxa would be preferably an activator. Therefore,

Bax and Bak activation would take place through the “embedded together” model or the unified model.

3. In these same cells, A-1155463 selectively blocks Bcl-X_L and “BH3-only” protein interactions but it does not statistically promote complex formation with Bax/Bak, although PUMA seems to increase its affinity for Bax.
4. A-1210477 does not modify the interactions between Mcl-1 and these proteins but favours their interaction with Bax as well as with Bak in the case of Noxa. This compound also increases the affinity of Bim and Noxa for Bcl-X_L and for Bcl-2 as well in the case of Bim.
5. ABT-737 and to a lesser extent A-1155463 induce a moderate cytotoxic effect on A549 cells, unlike ABT-199 and A-1210477, whose pro-apoptotic ability is quite reduced. All that indicates that these cells survival depends mainly on Bcl-X_L.
6. The relative sensitivity to BH3-mimetics varies between different multiple myeloma cell lines. RPMI 8226 and MM.1S cells are more sensitive to Bcl-X_L inhibitor while U266 cells show higher sensitivity to the Mcl-1 inhibitor.
7. The combination of A-1155463 with barasertib, alisertib, vincristine and docetaxel induces a synergistic effect in A549 cells. However, no synergy was observed when combining A-1210477 with these antimitotic compounds in the same cell line.
8. Treatment with antimitotic drugs alone or in combination with BH3 mimetics induces changes in the expression of Mcl-1, Bcl-X_L and Bim.

6 Bibliografía

1. Reviews, C. in *Life, Science of Biology, Volumen 1* (ed. Reviews, C. T.) (2016).
2. Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* **22**, 58–73 (2015).
3. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3–11 (2009).
4. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3448–3459 (2013).
5. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 1–14 (2011).
6. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
7. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
8. R., K. J. F., Winterford, C. M. & Harmon, B. V. Apoptosis. Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer* **73**, 2013–2026 (1994).
9. Coleman, J., Liu, R., Wang, K. & Kumar, A. in *Apoptosis Methods in Toxicology* (ed. Muganda, P. M.) 77–92 (Springer New York, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-3588-8_5
10. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107–120 (2012).
11. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
12. Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 552–565 (2003).
13. Wu, J. & Kaufman, R. J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* **13**, 374–384 (2006).
14. Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N. & Bhutia, S. K. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis* **19**, 555–566 (2014).
15. Opydo-Chanek, M., Gonzalo, O. & Marzo, I. Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochem. Pharmacol.* **136**, 12–23 (2017).
16. Marzo, I. & Naval, J. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 939–946 (2008).
17. Delbridge, A. R. D. & Strasser, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* **22**, 1071–1080 (2015).
18. Adams, J. M. & Cory, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 61–66 (2001).
19. Day, C. L. *et al.* Solution structure of pro-survival Mcl-1 and characterization of its binding by pro-apoptotic BH3-only ligands. *J. Biol. Chem.* **280**, 4738–4744 (2005).
20. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
21. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D. W. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–21 (2013).
22. Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J. & Marzo, I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J. Biol. Chem.* **288**, 4935–4946 (2013).

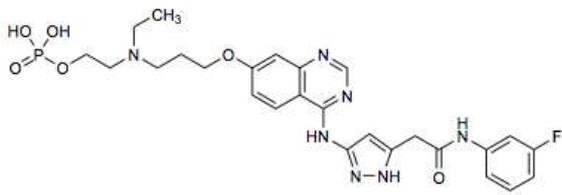
23. Tao, Z.-F. *et al.* Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1088–1093 (2014).
24. Kotschy, A. *et al.* The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* **538**, 477–482 (2016).
25. Levenson, J. D. *et al.* Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* **6**, e1590 (2015).
26. Kerppola, T. K. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2876–2886 (2009).
27. Kerppola, T. K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* **1**, 1278–1286 (2006).
28. Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W. & Grefen, C. Techniques for the Analysis of Protein-Protein Interactions in Vivo. *Plant Physiol.* **171**, 727–758 (2016).
29. Kodama, Y. & Hu, C.-D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques* **53**, 285–298 (2012).
30. Kerppola, T. K. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 465–487 (2008).
31. Gonzalo, O. Las interacciones entre proteínas de la familia BCL2 como diana en terapia antitumoral: estudio mediante la técnica BiFC y aplicación de miméticos BH3 a la leucemia linfocítica crónica. (Universidad de Zaragoza, 2017).
32. Kerppola, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein interactions in live cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2013**, 727–731 (2013).
33. Marzo, I. & Naval, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 703–710 (2013).
34. Van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E. & Joubert, A. M. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **76**, 1101–1112 (2015).
35. Jackson, J. R., Patrick, D. R., Dar, M. M. & Huang, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 107–117 (2007).
36. Sessa, F. & Villa, F. Structure of Aurora B-INCENP in complex with barasertib reveals a potential transinhibitory mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.* **70**, 294–298 (2014).
37. Lavogina, D., Enkvist, E., Viht, K. & Uri, A. Long residence times revealed by aurora A kinase-targeting fluorescent probes derived from inhibitors MLN8237 and VX-689. *ChemBioChem* **15**, 443–450 (2014).
38. Liu, Z. *et al.* Alisertib induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR-and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 845–873 (2017).
39. Schwartz, G. K. *et al.* Phase I study of barasertib (AZD1152), a selective inhibitor of Aurora B kinase, in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **31**, 370–380 (2013).
40. Manfredi, M. G. *et al.* Characterization of alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of Aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic assays. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7614–7624 (2011).
41. Melichar, B. *et al.* Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck

- squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm ph. *Lancet Oncol.* **16**, 395–405 (2015).
42. van Delft, M. F. & Huang, D. C. S. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* **16**, 203–213 (2006).
 43. Levenson, J. D. *et al.* Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, 279ra40 (2015).
 44. Chen, J. *et al.* The Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w Inhibitor, Navitoclax, Enhances the Activity of Chemotherapeutic Agents In Vitro and In Vivo. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 2340–2349 (2011).
 45. Kang, M. H. *et al.* Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 2057–2066 (2007).
 46. ATCC. U266B1 [U266] (ATCC® TIB-196™). (2016). Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-196.aspx?geo_country.
 47. ATCC. RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™). (2016). Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-155.aspx?geo_country.
 48. ATCC. MM.1S (ATCC® CRL-2974™). (2016). Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Blood/CRL-2974.aspx?geo_country=es.
 49. ATCC. A549 (ATCC® CCL-185™). (2016). Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx?geo_country=es.
 50. Rahbari, R. *et al.* A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* **46**, 277–284 (2009).
 51. Vela, L. Visualización de las interacciones entre proteínas de la familia BCL-2 mediante BiFC en células vivas. (Universidad de Zaragoza, 2013).
 52. Singh, M., Yadav, A., Ma, X. & Amoah, E. Plasmid DNA Transformation in Escherichia Coli: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *Int. J. Biotechnol. Biochem.* **6**, 561–568 (2010).
 53. Tian, Q. *et al.* Bacterial Transformation Using Heat Shock and Competent Cells | Protocol. *JoVE Science Education Database* (2017). Available at: <https://www.jove.com/science-education/5059/bacterial-transformation-the-heat-shock-method>.
 54. Dalby, B. *et al.* Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95–103 (2004).
 55. Stegmann, T. & Legendre, J.-Y. Gene transfer mediated by cationic lipids: Lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochim. Biophys. Acta* **1325**, 71–79 (1997).
 56. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 7413–7417 (1987).
 57. Fatokun, A. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2000–2016 (2014).
 58. Nwaneshiudu, A. *et al.* Introduction to Confocal Microscopy. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1–5 (2012).
 59. Moreno, E. A., Cuéllar, C. G. & González, A. D. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev. Inst. Nac. Cancerol. (Mex.)* **46**, 275–280 (2000).
 60. Sylvester, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol. Biol.* **716**, 157–168 (2011).

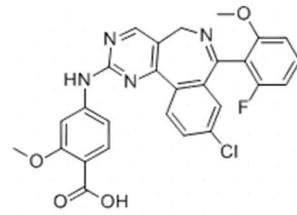
61. Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M. & Tuor, U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3727–3729 (1999).
62. Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K. & Kang, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J. Pharmacol.* **12**, 115–118 (2017).
63. Nakajima, W., Hicks, M. A., Tanaka, N., Krystal, G. W. & Harada, H. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1052 (2014).
64. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 3668–3672 (1997).
65. Ambroise, G., Portier, A., Roders, N., Arnoult, D. & Vazquez, A. Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells. *Oncotarget* **6**, (2015).
66. Rooswinkel, R. W. *et al.* Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* **123**, 2806–2815 (2014).
67. Smith, A. J. *et al.* Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 17682–17692 (2011).
68. Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M. & Shore, G. C. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**, 8608–8618 (2003).
69. Liu, Q., Leber, B. & Andrews, D. W. Interactions of pro-apoptotic BH3 proteins with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins measured in live MCF-7 cells using FLIM FRET. *Cell Cycle* **11**, 3536–3542 (2012).
70. Gong, J.-N. *et al.* Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood* **128**, 1834–1844 (2016).
71. Punnoose, E. *et al.* Expression profile of BCL-2, BCL-XL and MCL-1 predicts pharmacological response to the BCL-2 selective antagonist venetoclax in multiple myeloma models. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1132–1144 (2016).
72. Roca, A. Mecanismo de muerte inducida en células tumorales por la combinación de barasertib y compuestos miméticos de BH3. (Universidad de Zaragoza, 2015).
73. Huff, L. M., Sackett, D. L., Poruchynsky, M. S. & Fojo, T. Microtubule-disrupting chemotherapeutics result in enhanced proteasome-mediated degradation and disappearance of tubulin in neural cells. *Cancer Res.* **70**, 5870–5879 (2010).
74. Keuling, A. M. *et al.* RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737 mediated apoptosis in melanoma: Role for caspase-8-dependent pathway. *PLoS One* **4**, e6651 (2009).
75. Harley, M. E., Allan, L. A., Sanderson, H. S. & Clarke, P. P. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J.* **29**, 2407–2420 (2010).
76. Galán-Malo, P. *et al.* Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258**, 384–393 (2012).
77. Ruppert, S. *et al.* The major isoforms of Bim contribute to distinct biological activities that govern the processes of autophagy and apoptosis in interleukin-7 dependent lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1877–1893 (2012).
78. Li, R., Moudgil, T., Ross, H. J. & Hu, H.-M. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ.* **12**, 292–303 (2005).

Anexos

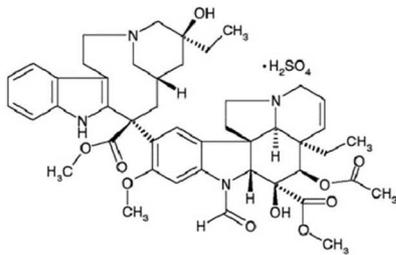
Anexo 1. Estructura de los compuestos utilizados



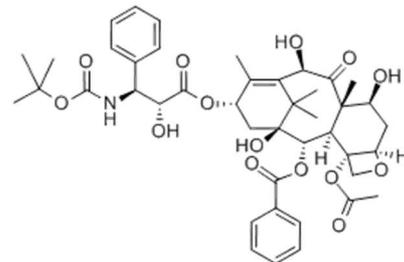
Barasertib



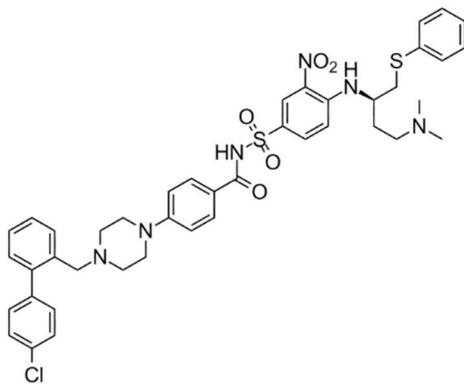
Alisertib



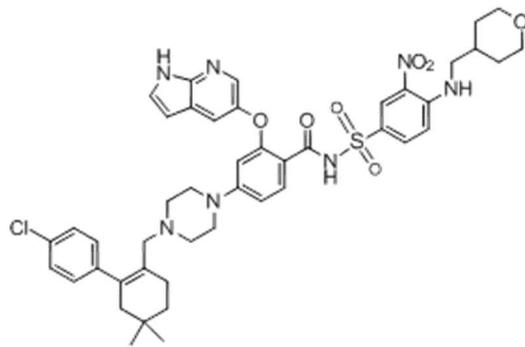
Vincristina



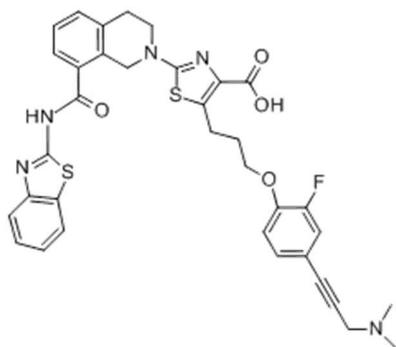
Docetaxel



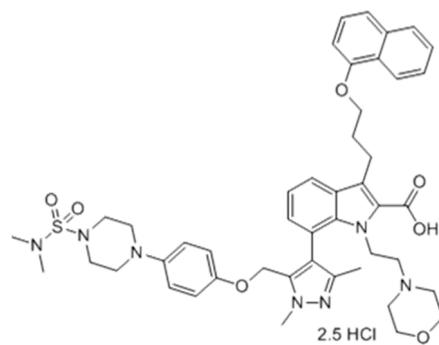
ABT-737



ABT-199



A-1155463



A-1210477

Anexo 2. Tampones y disoluciones

Tampón/Disolución	Componentes
Tripsina (<i>Gibco</i>)	Tripsina 0,25 % (w/v) 1 mM EDTA-Na ₄ en HBSS w/o Ca-Mg Rojo fenol
Azul Trypan	Azul Trypan al 0,4 % disuelto en NaCl 0,15 M
Tampón TAE 10x	Tris-Acetato 400 mM EDTA 10 mM pH 8,3
Tampón de elución (Kit “NucleoSpin® Plasmid EasyPure”, <i>Macherey-Nagel</i>)	Tris-HCl 5 mM pH 8,5
ABB 1x	HEPES/NaOH 10 Mm CaCl ₂ 140 mM NaCl 2,5 mM Ph 7,4
Tampón lisis 1x	Tritón X-100 1 % (v/v) Glicerol 10 % (v/v) NaCl 150 mM EDTA 1 mM Ortovanadato 1 mM Pirofosfato sódico 10 mM Leupeptina 10 µg/ml Fluoruro de sodio 10 mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM Tris-HCl 50 mM pH 7,6
Tampón de carga concentrado 3x	Tris-HCl 150 mM SDS 3 % (p/v) Molibdato de sodio di-anhidro 0,3 mM Pirofosfato de sodio 30 mM Fluoruro de sodio 30 mM Glicerol 30 % (v/v) β-mercaptoetanol 30 % (v/v) azul de bromofenol 0,06 % (p/v) pH 7,4
Geles de poliacrilamida (10 %, 12 % y 14 %)	Acrilamida/Bisacrilamida 30 % Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8 (solo gel concentrador) Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8 (solo gel separador) Agua destilada 10 % SDS 10 % APS (persulfato de amonio) TEMED (<i>Sigma-Aldrich</i>)
Tampón de electroforesis	Tris (hidroximteil) aminoetano 25 mM Glicina 192 mM SDS 3,5 mM

Tampón/Disolución	Componentes
Tampón de transferencia	Tris (hidroximetil) aminoetano 25 mM Glicina 192 mM SDS 3,5 mM Metanol 20 % (v/v) pH 8,3
Rojo Ponceau	Rojo Ponceau 0,1 % (p/v) disuelto en acético al 5 %
Tampón B	Disueltos en PBS: Tween-20 0,1 % (p/v) Timerosal (1 g/l) pH 7,4
Tampón "Antibody solution"	PBS-Tween-20 al 0,1 % Azida de sodio 0,05 % BSA 5 %

Anexo 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para generar los vectores pBiFC de interés

Construido	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
VCBcl-2	Directo	<u>GACTCG</u> ATCGAT ATGGCGCACGCTGGGAGAACAGGG
	Reverso	<u>GACTCG</u> AGATCT TTCACTTGTGGCCAGATAGGCACC
VCMcl-1	Directo	<u>GACTCG</u> ATCGAT ATGTTTGGCCTCAAAGAAACGCGGTA ATCGG
	Reverso	<u>GACTCG</u> AGATCT CTATCTTATTAGATATGCCAAACCAGC TCCTACTCC
VNBim	Directo	<u>GACTCG</u> GCTAGC ATGGCAAAGCAACCTTCTGATG
	Reverso	<u>GACTCG</u> GGTACCT CAATGCATTCTCCACACCAGGC
VCBim	Directo	<u>GACTCG</u> ATCGAT ATGGCAAAGCAACCTTCTGATG
	Reverso	<u>GACTCG</u> AGATCT TCAATGCATTCTCGACACCAGGC
VNPUMA	Directo	<u>GACTCG</u> GCTAGC ATGGCCCGCGCACGCCAGGA
	Reverso	<u>GACTCG</u> GGTACCT CAATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTCTG
VCPUMA	Directo	<u>GACTCG</u> ATCGAT ATGGCCCGCGCACGCCAGGA
	Reverso	<u>GACTCG</u> AGATCT TCAATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTCTG
VNNoxa	Directo	<u>GACTCG</u> GCTAGC ATGCCTGGGAAGAAGGCGCGCAA
	Reverso	<u>GACTCG</u> GGTACCT CAGGTTCTGAGCAGAAGAGTTTGG
VCNoxa	Directo	<u>GACTCG</u> ATCGAT ATGCCTGGGAAGAAGGCGCGCAA
	Reverso	<u>GACTCG</u> AGATCT TCAAGGTTCTGAGCAGAAGAGTTTGG

Las secuencias coloreadas corresponden a los sitios de corte de las enzimas de restricción que se utilizarán posteriormente (en naranja, sitio de restricción de la enzima *NheI*; en verde, sitio de corte de la enzima *KpnI*; en fucsia, sitio de restricción de la enzima *ClaI*; en azul, sitio de corte de la enzima *BglII*). Las bases subrayadas constituyen una secuencia aleatoria que

favorece la unión de las enzimas de restricción. La base en negrita y en cursiva se introdujo por error en la secuencia del oligonucleótido en lugar de introducir la base correcta (C), por lo que se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida para subsanar este error (apartado 3.2.3).

Anexo 4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida

Constructo	Cambio	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
VCBim (M.D.)	TCG:TGG	Directo	CATTGTCCGCCTGGTGT TGG AGAATGCATTG AAGATC
		Reverso	GATCTTCAATGCATTCT CC ACACCAGGCGG ACAATG

Las secuencias coloreadas representan la región en la que se introdujo el cambio y las bases resaltadas corresponden a las posiciones concretas en las que se realizaron dichas modificaciones.