



**Universidad**  
Zaragoza



**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**

# Efecto de la PI3K y de mTOR sobre los niveles y actividad del proteasoma en células de mieloma.

---

Role of PI3K and mTOR on levels and activity  
of proteasome in multiple myeloma cells

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Autor: David Giraldos Jiménez**

**Directores: José Javier Naval Iraberri e Isabel Marzo Rubio**

*Grupo de Investigación “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular*

*Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza*

*Curso académico 2016-2017*



## **INDICE**

Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Mieloma múltiple .....	3
1.1.1. Características generales.....	3
1.1.2. Patogénesis.....	3
1.1.3. Tratamiento .....	4
1.1.4. Líneas celulares de MM humanos y su importancia .....	5
1.2. Posibles dianas moleculares .....	6
1.2.1. Ruta PI3K/Akt/mTOR.....	6
1.2.1.1. PI3K .....	6
1.2.1.2. Inhibidores de PI3K: BYL-719 .....	8
1.2.1.3. mTOR.....	8
1.2.1.4. Inhibidores de mTORC1 y mTORC2: OSI-027 y PP-242.....	9
1.2.2. Proteasoma.....	10
1.2.2.1. Características generales .....	10
1.2.2.2. Estructura y subunidades.....	11
1.2.2.3. Relación con el cáncer.....	13
1.2.2.4. Inhibidores del proteasoma.....	14
1.2.2.4.1. Bortezomib .....	14
1.2.2.4.2. Carfilzomib .....	15
1.3. Respuesta a proteínas desplegadas .....	16
1.4. Autofagia.....	16
1.5. Muerte celular programada o apoptosis .....	18
1.6. Antecedentes .....	20
2. Hipótesis y objetivos .....	21
3. Materiales y Métodos .....	22
3.1. Cultivos celulares .....	22
3.1.1. Materiales y medios de cultivos celulares .....	22
3.1.2. Líneas celulares .....	22
3.1.3. Mantenimiento de los cultivos .....	23
3.1.4. Congelación y descongelación de los cultivos.....	23

3.1.5. Detección de micoplasmas.....	24
3.2. Estudio de la proliferación y apoptosis celular .....	24
3.2.1. Recuento y determinación de la densidad y viabilidad celular .....	24
3.2.2. Citometría de flujo.....	25
3.2.2.1. Determinación del potencial mitocondrial .....	25
3.2.2.2. Análisis de los niveles de expresión de Noxa.....	26
3.3. Análisis de la expresión de las subunidades del proteasoma y su funcionalidad. ....	28
3.3.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.....	28
3.3.2. Determinación de los niveles del proteasoma 20S/26S mediante ELISA.....	29
3.3.3. Ensayo fluorimétrico de la actividad del proteasoma 20S.....	30
3.3.4. Determinación de la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma .....	31
3.3.4.1. Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF.....	31
3.3.4.2. Análisis de proteínas por <i>Western blotting</i> .....	32
3.4. Análisis estadístico .....	33
4. Resultados y discusión .....	34
4.1. Efecto de la combinación de inhibidores del proteasoma y de mTOR.....	34
4.1.1. Efecto de la combinación de carfilzomib con inhibidores de mTOR .....	34
4.1.2. Efecto de la combinación de bortezomib con inhibidores de mTOR.....	36
4.2. Efecto de la combinación de inhibidores del proteasoma y de PI3K .....	39
4.3. Determinación de los niveles del proteasoma 20S/26S .....	41
4.4. Ensayo de la actividad del proteasoma 20S .....	43
4.5. Análisis de la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma.....	46
4.6. Análisis de los niveles de expresión de la proteína Noxa.. .....	49
5. Conclusiones.....	54
6. Conclusions .....	54
7. Bibliografía.....	55
Anexo	

## **RESUMEN**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B en la que las células plasmáticas malignas proliferan de manera anormal y se acumulan en la médula ósea. Estas células tumorales pueden presentar una gran variedad de alteraciones citogenéticas, la mayoría de las cuales afectan a los genes de las inmunoglobulinas, de forma que su producción se ve aumentada.

Dada la gran cantidad de inmunoglobulinas que se acumulan en las células de MM, éstas sufren un elevado estrés intracelular que debe ser mitigado mediante la degradación de las proteínas acumuladas. La degradación se realiza principalmente mediante el proteasoma, un complejo multiprotéico que se encuentra en el citoplasma.

A pesar de los diversos tratamientos que existen, el MM sigue siendo actualmente una patología incurable a menos que se realice un trasplante alogénico. Debido a ello se siguen buscando nuevos fármacos dirigidos a dianas moleculares definidas. Una de estas dianas ha sido el proteasoma, ya que el exceso de proteínas sin degradar puede inducir la muerte por apoptosis. Recientemente se ha propuesto que la inhibición de la quinasa mTOR, principal responsable de la supervivencia celular, aumenta los niveles del proteasoma.

En este trabajo se ha analizado si los inhibidores de mTOR reducen la eficacia del tratamiento con inhibidores del proteasoma debido al incremento en los niveles de proteasomas. Para ello, se ha analizado el efecto de la combinación de inhibidores del proteasoma con inhibidores de mTOR o de la quinasa apical de la ruta, PI3K, sobre su capacidad de inducir apoptosis en células de mieloma múltiple humano. Se ha estudiado además su efecto sobre la modulación de los niveles y la actividad de los proteasomas, así como de sus principales subunidades catalíticas.

Los resultados obtenidos no han demostrado un aumento ni en la cantidad ni en la actividad de los proteasomas en las células tratadas con ambos tipos de inhibidores, aunque indican que los inhibidores de mTOR podrían también inhibir parcialmente la actividad del proteasoma. La disminución de la apoptosis inducida por los inhibidores del proteasoma en presencia de los inhibidores de mTOR se correlaciona con un menor aumento en la expresión de la proteína solo-BH3 Noxa, principal reguladora de la apoptosis inducida por estos fármacos.

## **ABSTRACT**

Multiple myeloma (MM) is a B-cell neoplasia characterized by the proliferation and accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. These tumoral cells are associated with several cytogenetic alterations, most of which involve immunoglobulin genes and result in an increased production of these proteins. The abnormal accumulation of immunoglobulins in MM cells results in intracellular stress. Stress can be alleviated by elimination of the accumulated immunoglobulins. The main protein degradation mechanism is the proteasome, a multiprotein complex located in the cytoplasm.

In spite of improvements in treatments, multiple myeloma is still lethal unless allogeneic transplantation. Inhibition of proteasome functionality results in enhanced protein accumulation which in turn leads to the onset of apoptosis, as a result from the increased intracellular stress. Therefore the proteasome has been proposed as a new pharmacological target for treating this disease.

Attempts have been made now to combine proteasome inhibitors with drugs targeting other proteins. mTOR inhibitors which targets the PI3K/Akt/mTOR pathway, main responsible for regulation of MM cell survival seems to be a suitable target. However, preliminary work from our lab indicates that the combined inhibition was less efficient in triggering cell death than administration of proteasome inhibitors alone. Recently, mTOR inhibition has been linked to up-regulation of the proteasome.

In this project we intended to analyze whether the reduced efficiency of combined treatments with proteasome and mTOR inhibitors was due to the up-regulation of proteasome levels or activity, induced upon mTOR inhibition. Therefore, the effect of proteasome inhibitors, alone and in combination with mTOR and PI3K inhibitors, on cell death in human myeloma cells was analysed. In all cases, the amount and activity of proteasomes and their main catalytic subunits were also analysed.

Our results show no increase in the studied parameters between the differently treated cells, although they show an effect of partial inhibition of proteasome activity by mTOR inhibitors. This improductive inhibition will hamper the apoptosis-inducing ability of carfilzomib and bortezomib. The apoptosis inhibition in presence of mTOR inhibitors agrees with lower increase of Noxa BH3-only protein, the main regulator of apoptosis induced by these drugs.

## **1. Introducción**

### **1.1. Mieloma múltiple**

#### **1.1.1. Características generales**

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de cáncer hematológico, en concreto una neoplasia de células B [1]–[3]. Se caracteriza por la expansión clonal y la acumulación latente de células plasmáticas malignas secretoras con un bajo índice proliferativo y un ciclo de vida extenso [1], [2].

Dichas células B se acumulan inicialmente en la médula ósea causando anemia, trombocitopenia y neutropenia; y posteriormente destrucción del hueso, produciendo potencialmente dolor, hipercalcemia y parálisis [4]. Otras manifestaciones clínicas pueden ser pancitopenia, hiperproteinemia e inmunodeficiencia [1], [3].

Una característica de las células B plasmáticas malignas es que, en la mayoría de los casos, producen de forma continua y elevada una inmunoglobulina (Ig) concreta [3], [5]. Esa proteína monoclonal característica puede provocar a su vez daños en órganos (por ejemplo disfunción renal) debido a su paso o deposición en ellos o por desarrollar actividad como auto-anticuerpo [5].

En cuanto a su incidencia, el MM es el segundo cáncer hematológico más común tras el linfoma no-Hodgkin [4], y supone alrededor de 1% de todos los tumores y el 10% de las neoplasias hematológicas. Su incidencia está condicionada por la edad, el sexo y la raza [6].

#### **1.1.2. Patogénesis**

Aunque el proceso de patogénesis no se conoce aún por completo, gracias a la continua investigación se sabe que una característica común a los MM es la presencia de alteraciones citogenéticas. La mayoría de los MM presenta un cariotipo anormal con alteraciones en el número o la estructura de los cromosomas [1].

En el MM se suelen producir reordenamientos de los cromosomas que implican a los segmentos que codifican los genes de las Ig, de ahí que se altere su producción [1]. De hecho, en el MM la alteración cromosómica más común afecta al locus 14q32, en el que se localiza la cadena pesada de las Ig [1], [3], [7].

Dicho segmento suele estar implicado en translocaciones, siendo las tres principales  $t(4;14)(p16;q32)$ ;  $t(11;14)(q13;q32)$  y  $t(14;16)(q32;q23)$  [3], [7]. La primera de ellas afecta al receptor 3 del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR3), el cual se ve desregulado [7]. La segunda de ellas, que corresponde a casi un 25% de las translocaciones, afecta a la ciclina D1, que regula la entrada en el ciclo celular que también se ve por ello alterado [1], [7]. Por último, la tercera de ellas, que ocurre en un 25% de los mielomas, afecta al oncogen c-maf y resulta en su sobreexpresión [7].

Maf (codificado por c-maf) es un factor de transcripción implicado en procesos de proliferación y diferenciación en respuesta a la interleuquina 6 (IL-6) [7], de la cual dependen la mayoría de los MM para su crecimiento y supervivencia [1], [2], [8]. Eso se debe a que IL-6 es el principal factor de crecimiento para los mielomas [2].

Además de las translocaciones indicadas, en el MM hay una gran variedad de otras posibles anormalidades cariotípicas, incluyendo por ejemplo la pérdida de un alelo del cromosoma 14, reordenamientos de los cromosomas 8, 16 y 21, y translocaciones del cromosoma 3 al 6 [7].

Otras proteínas que pueden tener su expresión o función alterada en algunos MM son Bcl-2 y Bcl-xL, proteínas antiapoptóticas de la membrana mitocondrial externa encargadas de la supervivencia celular, que se sobreexpresan en algunos MM como en la línea U266 [2], [9]; y Stat3, que activa la transcripción de genes en respuesta a IL-6 y se encuentra activado constitutivamente en la línea U266 de MM [2].

### **1.1.3. Tratamiento**

Pese a que actualmente existen numerosos tratamientos del MM, ninguno de ellos suele curar la enfermedad (frenan la progresión, mejoran la calidad de vida, etc.). La enfermedad es progresiva y letal a menos que se realice un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de un donante compatible [1], [6]. La razón es que debido a la inestabilidad genética de este tipo de cáncer aparece resistencia a la mayoría de fármacos existentes, con lo que la supervivencia media tras el diagnóstico es de 5-7 años [4].

En las décadas de 1970 y 1980, el MM se trataba con vincristina, adriamicina (doxorubicina) y dexametasona (VAD), consiguiéndose una respuesta entre el 50 y 60% de los casos [7]. Actualmente, aunque aún se utilizan fármacos quimioterápicos



clásicos, tales como el melfalán (un agente alquilante), la prednisona (un glucocorticoide anti-inflamatorio que induce la expresión de genes apoptóticos) [10], y la vincristina (un alcaloide que impide la adición de tubulina a los microtúbulos, deteniendo la mitosis), se combinan con nuevos tratamientos basados en fármacos dirigidos, como los inhibidores del proteasoma y los inmunomoduladores [6].

Los inmunomoduladores (IMiDs, derivados de la talidomida como la lenalidomida, pomalidomida), poseen propiedades antiangiogénicas, anti-inflamatorias y antiproliferativas, disminuyen la producción de citoquinas implicadas en la supervivencia y estimulan el sistema inmune (células T y células NK) [11]. Los inhibidores del proteasoma se detallarán más adelante.

#### **1.1.4 Líneas celulares de MM humanos y su importancia**

Las líneas celulares de MM han sido difíciles de establecer en cultivo continuo [1]. La mayoría se derivaron de muestras obtenidas en recaídas o fases terminales de la enfermedad [1]. Las líneas de MM suelen crecer en suspensión, principalmente como células sueltas (aunque a veces en pequeños grupos), y rara vez se adhieren al frasco de cultivo [1].

Las líneas de MM presentan morfología redondeada con núcleos excéntricos, nucleolos prominentes, un citoplasma con vacuolas, abundantes mitocondrias y un retículo endoplásmico (RE) y un aparato de Golgi bien desarrollado [1], [7].

Al ser células B maduras, suelen tener tiempos de duplicación más largos (~54h) que otros tipos de células hematopoyéticas. Su densidad máxima de crecimiento también suele ser baja [1].

Debido a la capacidad de este tumor para adquirir resistencia a los tratamientos, se han desarrollado nuevas líneas y sublíneas de MM para tratar de estudiar la acción y resistencia de los fármacos, la proliferación y muerte celular [7]. Aunque son importantes como sistemas modelo para el desarrollo de nuevas terapias e identificación de nuevas dianas moleculares [7], es necesario tener precaución a la hora de obtener conclusiones solo a partir de estos modelos [1].

## 1.2. Posibles dianas moleculares

### 1.2.1. Ruta PI3K/Akt/mTOR

La ruta PI3K/Akt/mTOR regula numerosas actividades celulares como la transcripción y traducción de componentes celulares esenciales para el crecimiento, proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia [12]. También está implicada en la regulación del metabolismo, migración e invasión celular, angiogénesis y actividad del sistema inmunitario [12].

Además, interviene en procesos de señalización cruzada junto con otras rutas de transducción de señal [12]. Las principales proteínas de esta ruta son a las que debe su nombre:

- Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, de sus siglas en inglés: *phosphoinositide 3-kinase*) [12].
- Proteína quinasa Akt (es una serina/treonina quinasa, también conocida como PKB, de sus siglas en inglés: *protein kinase B*) [12].
- Quinasa mTOR (una serina/treonina quinasa cuyo nombre está basado en su denominación inglesa: *mammalian target of rapamycin*) [12].

Las células tumorales presentan frecuentemente alteraciones en esta ruta [13], y numerosas investigaciones indican que esta cascada de señalización es quizá la ruta más frecuentemente sobreactivada en cánceres humanos e implicada en su generación y progresión [12]. Por todo ello las principales proteínas reguladoras de esta ruta son dianas terapéuticas de gran interés y se han desarrollado pequeñas moléculas inhibidoras de estas proteínas.

#### 1.2.1.1. PI3K

Las proteínas PI3K son quinasas lipídicas, lo cual les permite ser reclutadas a la membrana citoplasmática y asociarse con su cara interna [14]. Están expresadas de forma habitual en las células y funcionan como transductores de señales de los receptores de superficie de factores de crecimiento hacia el interior de las células y como reguladores de las funciones celulares anteriormente comentadas [13]. Su acción se lleva a cabo mediante la fosforilación de diversos tipos de fosfatidil inositol en la posición 3 del anillo de inositol. Esto lleva a su vez a la activación de efectores

posteriores (como Akt, por ejemplo) a través de su unión a fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3, de su nombre en inglés: *phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate*) [12].

La familia de la PI3K consta de 8 isoenzimas organizadas en 3 clases (I-III), según su homología de secuencia [12], [13]. Las de tipo II son monómeros, carecen de subunidades reguladoras, y su papel aún no está del todo claro. Las de tipo III son heterodímeros formados por una subunidad reguladora (p150) y una subunidad catalítica (Vps34) y están implicadas en la autofagia y el tráfico endocítico [12].

Las de tipo I son las mejor conocidas. Son heterodímeros formados por una subunidad catalítica y otra reguladora. Según su conexión con las subunidades reguladoras y su mecanismo de activación, se pueden clasificar en las subfamilias IA y IB [12]. Las de clase IA pueden ser activadas por receptores tirosina quinasa (RTK, de sus siglas en inglés *receptor tyrosine kinase*), mientras que las de IB son exclusivamente activadas por receptores asociados a proteínas G [12].

En las células humanas hay tres subunidades catalíticas de clase IA distintas: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , codificadas por los genes PIK3CA, PIK3CB y PIK3CD respectivamente. En cambio sólo hay una subunidad catalítica de clase IB: p110 $\gamma$ , codificada por el gen PIK3CG [12]–[14].

Las proteínas PI3K $\alpha$  y PI3K $\beta$  (denominadas así según su subunidad catalítica) están expresadas ubicuamente y están implicadas en la regulación de procesos como la homeostasis de la glucosa, la señalización de la insulina, etc. Por su parte, la PI3K $\delta$  y PI3K $\gamma$  se expresan en leucocitos y tienen un papel en la respuesta inmune y en la inflamación [13], [14].

La desregulación de la ruta de señalización de PI3K está implicada en varios cánceres humanos. Dicha desregulación puede producirse por la inactivación del gen supresor de tumores PTEN (que revierte las fosforilaciones de la PI3K), la amplificación o sobreexpresión o mutaciones activadoras de algunos RTK (por ejemplo EGFR), y la amplificación de regiones genómicas que contienen los genes de Akt o PIK3CA. Además, PIK3CA puede estar mutado somáticamente, lo cual ocurre con bastante frecuencia en algunos cánceres [13], [14].

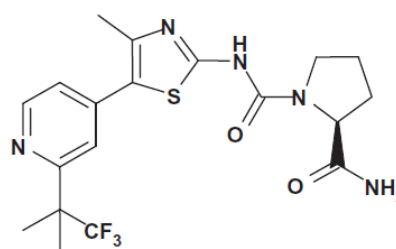
La mayoría de las mutaciones conocidas que afectan a la p110 $\alpha$ , la activan constitutivamente. El 80% de las mutaciones en PIK3CA lo constituyen 3 mutaciones

distintas, cuyo efecto es la ganancia de función de la PI3K manifestado como incremento de la actividad quinasa lipídica, activación de Akt independiente de factores de crecimiento, transformación celular y generación de tumores [13]. Estos hechos sugieren que la PI3K $\alpha$  podría ser una buena diana para el desarrollo de fármacos [13], [14].

### 1.2.1.2. Inhibidores de PI3K: BYL-719

El fármaco BYL-719 (también conocido como Alpelisib) es un inhibidor selectivo de la PI3K $\alpha$ , desarrollado a partir de la estructura de la molécula de 2-aminotiazol [13], [14]. Su diseño y optimización se realizó de manera racional, por modelización de sus interacciones con el bolsillo de ATP del dominio quinasa [14]. Su estructura química se puede observar en la *Figura 1*.

Su alta selectividad se debe a un residuo (Q859) presente en la isoforma  $\alpha$  que no se encuentra conservado en la familia [14]. Además tiene una alta capacidad inhibidora, siendo igual de potente contra la proteína *wild type* que contra la proteína con mutaciones somáticas [13]. Entró en ensayos clínicos en 2010, en los que se ha constatado una eficacia dosis-dependiente significativa en modelos así como un buen perfil farmacocinético [13], [14].



*Figura 1. Estructura química de BYL-719, tomada de [14].*

### 1.2.1.3. mTOR

La proteína mTOR es una serina/treonina quinasa citosólica que puede unirse a otras dos proteínas diferentes para formar dos complejos funcionales distintos. Por un lado se une a Raptor, una proteína asociada reguladora con la que forma el complejo 1 de mTOR (mTORC1); y por el otro a Rictor, con la que forma el complejo 2 de mTOR (mTORC2) [12].

mTORC1 es un regulador posterior de la ruta activada por Akt. Este complejo es susceptible a la inhibición por rapamicina (inhibidor alostérico) [12]. mTORC1 estimula el crecimiento y la proliferación celular por el incremento del inicio de la traducción dependiente de Cap, modula la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de al

menos dos dianas (4E-BP1 y S6K1), y promueve la supervivencia a través del control de la traducción del mRNA de Mcl-1 [12]. mTORC1 también interviene en el control de la iniciación de la autofagia [15], [16].

mTORC2, en cambio, es un regulador anterior de Akt [12]. mTORC2 fosforila a Akt, SGK1 y PKC para producir sus correspondientes efectos subsiguientes. Sin embargo los reguladores anteriores de mTORC2 se desconocen [12].

La proteína mTOR se descubrió en la década de 1990 al investigar el mecanismo de acción de la rapamicina, un antibiótico del tipo macrólido producido por el microorganismo *Streptomyces hygroscopicus* [12]. El nombre de esta proteína se debe a su identificación como la diana molecular de la rapamicina. Sin embargo, la rapamicina actúa indirectamente como inhibidor alostérico de mTOR vía Raptor y no inhibe a mTORC2 [12].

Debido al potencial terapéutico de la rapamicina, fue evaluada como agente terapéutico contra varios cánceres. Sin embargo, la rapamicina no inhibía a mTORC2 que contiene el adaptador Rictor en vez de Raptor [12]. Por ello se han desarrollado con posterioridad inhibidores enzimáticos directos de mTOR [12].

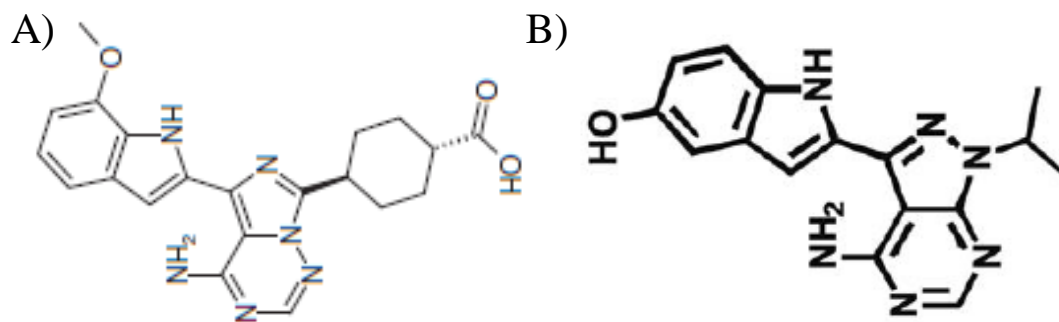
#### **1.2.1.4. Inhibidores de mTORC1 y mTORC2: OSI-027 y PP-242**

OSI-027 y PP-242 (también conocido como torkinib) son inhibidores competitivos (compiten con el co-factor ATP de la enzima) de mTOR. Por lo tanto, a diferencia de la rapamicina y sus análogos, inhiben catalíticamente a los dos complejos proteicos que forma mTOR: mTORC1 y mTORC2 [12], [17].

Ambos inhibidores tienen una gran selectividad por mTOR respecto a otras quinasas relacionadas de la ruta de la PI3K (OSI-027 más de 100 veces, y PP-242 entre 10 y 100 veces mayor selectividad) [15]. Ambos inhiben la activación de Akt, aunque no de la misma forma. La inhibición de mTOR por OSI-027 resulta en la pérdida de fosforilación en los dos residuos de activación de Akt (T308 y S473), mientras que la inhibición por PP-242 causa sólo la pérdida de fosforilación en S473, a menos que se utilicen concentraciones altas [15], [18].

Estos dos inhibidores tienen mayor eficacia que la rapamicina, así como claros efectos antiproliferativos. También inducen autofagia (ya que mTOR es un regulador

negativo de dicho proceso), y además pueden inducir la muerte celular [15], [18]. El inhibidor OSI-027 inhibe la expresión de la ciclina D1 [15], y PP-242 es más efectivo que la rapamicina inhibiendo la traducción dependiente de Cap [18]. Otro punto de acción de OSI-027 y PP-242 es la inhibición de la fosforilación de los sustratos de mTORC1, 4E-BP1 y S6K1 [15], [18]. La estructura de ambos inhibidores se puede consultar en la *Figura 2*.



*Figura 2. A) Estructura química de OSI-027. Imagen tomada de [15]. B) Estructura química de PP-242. Imagen tomada de [18].*

## 1.2.2. Proteasoma

### 1.2.2.1. Características generales

Con el paso del tiempo, las células acumulan proteínas oxidadas y/o proteínas recién sintetizadas que no llegan a alcanzar su conformación nativa o su localización adecuada y deben ser eliminadas. La degradación de esas proteínas así como de aquellas con una vida media corta y/o que ya han cumplido su función tiene lugar mediante un proceso selectivo en un compartimento aislado [19].

El principal sistema de degradación de proteínas en las células es el proteasoma, un complejo multiprotéico que se encuentra en el citoplasma. En los organismos eucariotas existen diferentes configuraciones de complejos de proteasoma. Todos los complejos tienen una partícula central (proteasoma 20S, denominado así por su coeficiente de sedimentación), pero difieren en el número de partículas reguladoras asociadas (proteasoma 19S). Aunque tengan una o dos partículas reguladoras, ambas isoformas capaces de degradar las proteínas se suelen denominar como proteasoma 26S [19], [20]. En los mamíferos además de esa forma estándar, existe el inmunoproteasoma. Esta otra forma se diferencia en unas pocas subunidades y se encarga de generar péptidos para la presentación de antígenos [19], [21].

Se estima que el 80-90% de las proteínas intracelulares son degradadas en él, en pequeños péptidos (3-25 residuos) [19], [20]. En este caso, el compartimento aislado es la cavidad proteolítica de su partícula central, que tiene varios centros peptidasa responsables de la hidrólisis. La selección de sustratos de proteólisis está asegurado por el hecho de que el acceso al proteasoma 20S está restringido y sólo las proteínas que tienen una “etiqueta” especial pueden entrar [19]. La poli-ubiquitina juega este papel de etiqueta de degradación (cadenas ramificadas en el residuo Lys48) [19], [20].

Este proceso de degradación es el considerado como canónico y se conoce como degradación proteica dependiente de ubiquitina [19]. Aparte de este mecanismo hay evidencias de que existen otros dos no canónicos: una forma de degradación independiente de ubiquitina, y otra que podría modular la función de las proteínas procesadas [19].

#### **1.2.2.2. Estructura y subunidades**

El proteasoma 20S o partícula central, de unos 700 kDa, consiste en 28 subunidades. En eucariotas se compone de dos copias de 7 subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) y dos copias de 7 subunidades  $\beta$  diferentes ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ) [19], [20]. La principal diferencia entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es una  $\alpha$ -hélice adicional en el extremo amino-terminal (N-terminal) de las subunidades  $\alpha$  [19].

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  forman cada una de ellas dos anillos de 7 miembros (heptámeros) que se apilan uno sobre otro para dar una partícula con forma de barril. Los anillos externos contienen únicamente subunidades  $\alpha$ , y los internos  $\beta$ , con una configuración final  $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ , tal y como se puede ver en la *Figura 3* [19], [20].

Es reseñable que la posición individual de cada subunidad en la estructura final del proteasoma maduro está perfectamente definida a través de un complejo mecanismo de ensamblaje [19], [22], [23]. De hecho, el inmunoproteasoma, cuyo ensamblaje se produce tras la estimulación con el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), consta de tres subunidades alternativas diferentes. Esas tres subunidades,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y  $\beta 5i$ , se colocan en la posición en la que se encontrarían sus equivalentes  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  [19], [21].

Las subunidades  $\beta$  son las subunidades catalíticas, de manera que los centros activos se encuentran en la cavidad formada por ambos anillos  $\beta$  de cara al interior [19]. El proteasoma está asignado a la clase de hidrolasas NTN (de su nombre en inglés,

*N-terminal nucleophilic hydrolases*). La treonina N-terminal de las subunidades  $\beta$  es esencial para la catálisis. En eucariotas, tres de las siete subunidades  $\beta$  tienen centros catalíticos treonina-proteasa con especificidad por diversos sustratos. La  $\beta 1$  tiene actividad similar a caspasa, la  $\beta 2$  tiene actividad similar a tripsina, mientras que la  $\beta 5$  tiene actividad similar a quimotripsina [19].

A pesar de esos tres tipos principales de centro catalítico, hay otros dos descritos. Uno para hidrolizar el enlace peptídico tras un aminoácido ramificado, y otro para hidrolizar el enlace peptídico tras pequeños aminoácidos neutros [19].

Las subunidades  $\alpha$  en cambio son responsables de que el sustrato pueda acceder a través del espacio formado por los anillos  $\alpha$  [19]. Normalmente los anillos  $\alpha$  se encuentran en una conformación cerrada [20]. En eucariotas, sólo se abren durante la activación del proteasoma [19]. El modelo de apertura se basa en reajustes conformacionales de las regiones N-terminales de las subunidades  $\alpha$ . Dichos cambios de conformación pueden ocurrir por interacción con las partículas reguladoras (proteasoma 19S), por interacción con el sustrato, y por tratamiento con bajas concentraciones de SDS [19].

El proteasoma 19S o partícula reguladora, de unos 900 kDa consiste en al menos 17 subunidades repartidas en dos subcomplejos (la base y la tapa), tal y como se puede ver en la *Figura 3* [19], [20]. La base consta de 6 subunidades ATPasas homólogas, denominadas Rpt, y 4 subunidades reguladoras no ATPasa, denominadas Rpn [20]. El resto de subunidades (Rpn) constituyen la tapa [19], [20]. A diferencia del proteasoma 20S, el ensamblaje del proteasoma 19S no está completamente elucidado [22], [23].

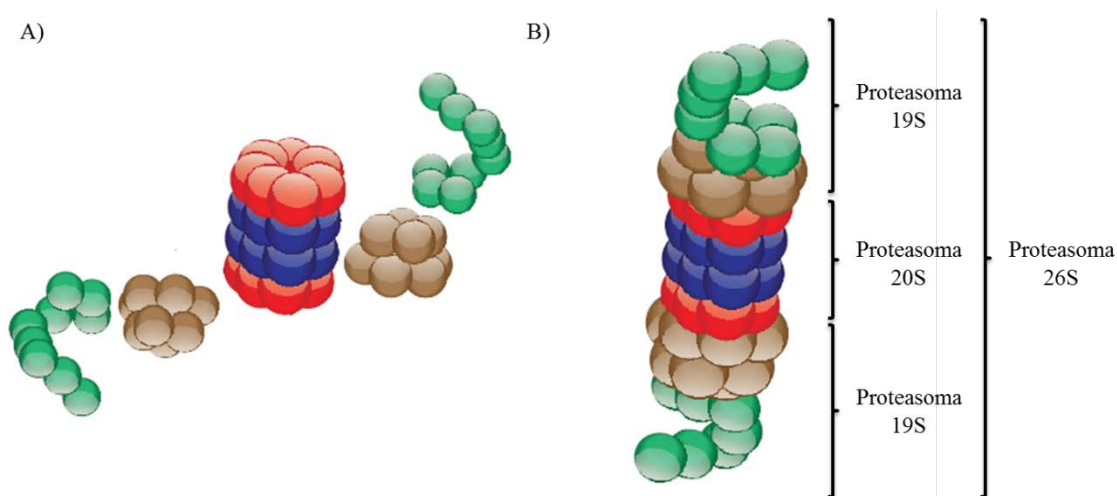
Los 6 miembros Rpt de la base de la partícula reguladora están adyacentes al anillo  $\alpha$  de la partícula central. Son responsables de la hidrólisis de ATP necesaria para inducir el cambio conformacional de las subunidades  $\alpha$ , así como para la unión y despliegue del sustrato y su translocación a la cavidad del centro activo [19], [20]. En cuanto a los miembros Rpn, unas reconocen y unen la cadena poli-ubiquitina y otras liberan las unidades de ubiquitina de las cadenas de la proteína diana antes de que sean degradadas [19], [20].

Como ya se ha comentado, el proteasoma 19S puede acoplarse al 20S tanto por uno como por ambos extremos, formando el proteasoma 26S. Hay dos teorías acerca de



su posible ensamblaje: el proteasoma 19S se ensambla por separado mediante subunidades individuales y una vez formado se une al 20S; o el proteasoma 19S es ensamblado sobre el propio 20S. Últimamente hay varias evidencias que apuntan a la segunda posibilidad, en la que la base del proteasoma 19S se formaría sobre el anillo  $\alpha$  del 20S, y luego se colocaría la tapa formada aparte [19].

Al igual que el proteasoma 19S puede unirse al 20S por uno o ambos extremos, también puede haber proteasoma 20S sin 19S. En mamíferos el ratio de 19S es menor que de 20S, por lo que las células contienen una cantidad significativa de 20S libre (con actividad latente, los sustratos no pueden acceder al centro catalítico) [19].



*Figura 3. Estructura y subunidades del proteasoma. 3A) Componentes por separado. Se puede apreciar la forma de barril de la partícula central. 3B) Proteasoma completo con las distintas partículas indicadas. En ambos casos aparecen representadas en rojo las subunidades  $\alpha$ , en azul las subunidades  $\beta$ , en marrón las subunidades de la base, y en verde las subunidades de la tapa. Imagen adaptada de [22].*

### 1.2.2.3. Relación con el cáncer

La degradación dependiente de ubiquitina es un proceso regulador clave en muchas rutas moleculares. El proteasoma no sólo elimina proteínas anormales que estén mal plegadas, desplegadas, envejecidas o dañadas por oxidación, sino que también regula la vida media de proteínas de vida corta tales como las ciclinas y reguladores de la transcripción. El papel del proteasoma en la degradación de proteínas de oncogenes, proteínas supresoras de tumores, factores de transcripción y moléculas señalizadoras hace que su función sea de enorme importancia en estudios moleculares del cáncer [4].

Algunos ejemplos de proteínas degradadas por el proteasoma e implicadas en la carcinogénesis son: ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk)

(regulación del ciclo celular); AIF (apoptosis independiente de caspasas); Bcl-2, Bax, Bik, tBid (apoptosis); p53 (supresor de tumores); p14 y p16 (supresores de tumores); c-Jun, c-Fos y NF $\kappa$ B (factores de transcripción), etc...[4].

En particular, la progresión del ciclo celular está regulada por el proteasoma en las transiciones G1/S y G2/M ya que los Cdk p21 y p27 son degradados por el proteasoma. La inhibición del proteasoma estabiliza a los inhibidores deteniendo la proliferación celular e induciendo, eventualmente, apoptosis como el caso del MM [4].

Además, muchos estudios han mostrado que, en relación a los altos niveles de estrés oxidativo de las células tumorales, éstas tienen mayores niveles de proteasoma comparados con sus equivalentes normales. Esas diferencias en la cantidad y actividad de proteasoma entre células normales y cancerosas sugieren que el proteasoma podría ser una prometedora diana para la terapia del cáncer [4].

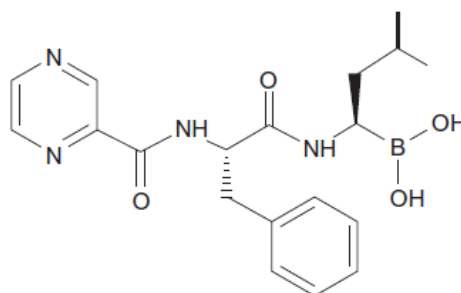
Ya que el proteasoma está implicado en muchas rutas importantes para el desarrollo, progreso, y metástasis del cáncer, se están evaluando varios inhibidores del proteasoma en estudios pre-clínicos y ensayos clínicos para distintos tipos de cáncer [4].

#### 1.2.2.4. Inhibidores del proteasoma

##### 1.2.2.4.1. Bortezomib

Bortezomib (Velcade®), un dipéptido del ácido borónico, es un inhibidor reversible selectivo del proteasoma 20S [24]. En condiciones fisiológicas inhibe preferentemente el sitio activo de la subunidad  $\beta$ 5, y con algo menos de afinidad el de la subunidad  $\beta$ 1. Sobre la subunidad  $\beta$ 2 apenas tiene efecto [25].

Fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) como tratamiento para el MM, en el año 2003 [4], [24]. Su estructura química se recoge en la *Figura 4*. El bortezomib tenía efectos antitumorales directos y también aumentaba la sensibilidad a la radioterapia [4]. Además al combinarlo con agentes quimioterápicos estándar incrementaba la apoptosis del tumor y disminuía su proliferación.



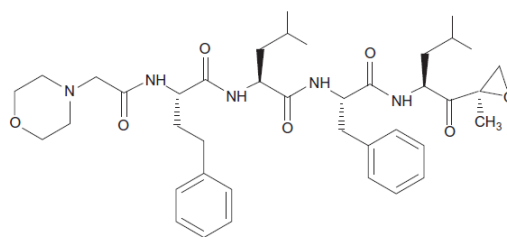
*Figura 4. Estructura química de bortezomib. Imagen tomada de [24].*

Sin embargo, pese a ser muy selectivo y tener una buena respuesta terapéutica, con el tiempo se desarrollaba resistencia al tratamiento. Las células adaptadas resistentes a bortezomib presentan tasas de transcripción incrementadas, actividades enzimáticas aumentadas, y niveles más altos de las subunidades  $\beta 5$ , y de las  $\beta 2$  también. La sobreexpresión de la subunidad  $\beta 5$  es el mecanismo de resistencia a bortezomib más importante [24], [26], [27].

En cuanto a los efectos adversos, el bortezomib puede producir algo de fiebre, fatiga, trombocitopenia, diarrea, anemia, y alguno más grave como neuropatía periférica [24]. Debido a los efectos adversos del bortezomib y la adquisición de resistencia se han desarrollado inhibidores del proteasoma de segunda generación. Uno de ellos es el carfilzomib.

#### 1.2.2.4.2. Carfilzomib

Carfilzomib (PR-171), una epoxicetona peptídica (cuya estructura se puede observar en la *Figura 5*), es un inhibidor irreversible de alta especificidad del proteasoma 20S [24], [28]. El carfilzomib inhibe preferentemente la subunidad  $\beta 5$  del proteasoma y la  $\beta 5i$  del inmunoproteasoma. Su efecto sobre la actividad quimotripsina ( $\beta 5$ ) es similar al del bortezomib, pero tiene menor potencia sobre las actividades caspasa ( $\beta 1$ ) y tripsina ( $\beta 2$ ) [24].



*Figura 5. Estructura química de carfilzomib. Imagen tomada de [24].*

El carfilzomib fue aprobado de manera acelerada por la FDA en 2012 para el tratamiento de pacientes con MM en los que hubieran fracasado otras terapias [24], [28]. El carfilzomib inhibe la proliferación e induce apoptosis en las células de MM, y a diferencia del bortezomib, no afecta a las células mononucleares de sangre periférica [24]. Ha mostrado mayor eficacia que bortezomib y actividad en pacientes resistentes a bortezomib [24], [28].

Los efectos secundarios más comunes que produce son náuseas, diarrea, fatiga, similares a los del bortezomib. Sin embargo, el carfilzomib tiene la ventaja de no producir neuropatía periférica [24].

### 1.3. Respuesta a proteínas desplegadas

El procesamiento y plegamiento de proteínas tiene lugar en eucariotas en el retículo endoplasmático (RE), gracias a la combinación de proteínas como las chaperonas, y lectinas [29]. La capacidad y funcionalidad del RE puede verse comprometida por distintos factores, lo que lleva a la acumulación de proteínas dañadas, mal plegadas, que causan estrés en el RE [29].

En esas circunstancias, las proteínas implicadas se degradan para mantener la homeostasis celular. Para ello, se retrotranslocan al citoplasma para poder ser procesadas por el proteasoma en el sistema dependiente de ubiquitina [29]. Sin embargo, si la acumulación continua y persiste el estrés del RE se induce la respuesta a proteínas desplegadas o UPR (de sus siglas en inglés: *Unfolded Protein Response*) [29].

La UPR es un complejo mecanismo de señalización que trata de mitigar el estrés y restablecer la homeostasis del plegamiento a través de su fase de adaptación. En ella se detiene la síntesis general de proteínas e induce la expresión selectiva de chaperonas [29], [30]. Simultáneamente se incrementa la translocación al citoplasma de las proteínas para ser degradadas por el proteasoma [29], [30].

Si la UPR se prolonga en el tiempo, se pasa a la fase de alarma en la que se desbloquea la traducción y se regula negativamente la expresión y actividad de factores pro-supervivencia como la proteína Bcl-2. En última instancia, si la UPR falla en su propósito debido a un exceso de estrés, irreparable o prolongado, las células afectadas inician mecanismos de autofagia y apoptosis [29], [30].

Las terapias que utilizan inhibidores del proteasoma buscan impedir la degradación de las proteínas acumuladas e inducir la apoptosis a través del estrés del RE y la UPR.

### 1.4. Autofagia

La autofagia es una ruta celular conservada evolutivamente en la que proteínas, macromoléculas y orgánulos presentes en el citoplasma son degradados para reciclar sus componentes básicos [16], [29]–[31]. Aunque inicialmente se consideraba una ruta de supervivencia activada en respuesta a la falta de nutrientes y otros estímulos estresantes,

existe un debate acerca de si la autofagia puede potencialmente conducir a la muerte celular degradando componentes esenciales del citoplasma [16], [31].

El término autofagia se usa para describir a los procesos que conducen los elementos citoplasmáticos a los lisosomas para su degradación, [30], [31]. De manera general, las estructuras que van a ser degradadas son secuestradas en vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas [29], [30], [32]. La formación del autofagosoma es seguida por la fusión con lisosomas generando un autolisosoma. En ese punto la membrana interna se degrada haciendo que el material capturado entre en contacto con el medio ácido lisosomal y sea procesado por las hidrolasas ácidas, enzimas catabólicas específicas [29]–[32].

Normalmente, la autofagia está presente a bajos niveles en la célula para mantener la homeostasis regulando la tasa de recambio de proteínas de vida larga y orgánulos completos (eliminando los que estén demasiado dañados, envejecidos, etc.) que se acumulan [31], [32]. A pesar de que algunos componentes del citoplasma son engullidos inespecíficamente, se cree que la mayoría son dirigidas específicamente a los autofagosomas vía interacciones con proteínas adaptadoras [31]. En el caso de las proteínas, cuyo principal sistema de degradación es el proteasoma, son dirigidas a los autofagosomas debido a un patrón de ubiquitinización distinto (un monómero de ubiquitina o cadenas ramificadas en residuos distintos a Lys48) [30].

Además de su función basal, la autofagia es rápidamente inducida en respuesta a la falta de nutrientes, falta de oxígeno, estrés metabólico, estrés del RE, u otros para proveer al menos temporalmente una fuente interna de energía y mantener la viabilidad [16], [30]–[32]. Si no se puede reparar el daño, el exceso de autofagia y/o la apoptosis se encargan de destruir la célula [30]. Debido a los altos niveles de estrés del RE, las células de MM presentan unos niveles basales de autofagia más altos de lo normal [33].

La autofagia se inhibe por la actividad de mTORC1. Si hay disponibilidad de nutrientes y presencia de factores de crecimiento, la vía PI3K/Akt/mTOR está activa y estimula la supervivencia celular a la vez que suprime la autofagia [16], [29]. Al contrario, la falta de nutrientes inhibe dicha vía, permitiendo la inducción de autofagia. Además, la apoptosis también suprime, de forma definitiva, la autofagia [31], [32], aunque la apoptosis y la autofagia interactúan entre sí de forma compleja [32]. Por ejemplo, la proteína Beclina 1 (proteína necesaria para la formación de los

autofagosomas) puede interaccionar con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL [32].

De acuerdo con lo anterior, se ha descrito que la inhibición de PI3K de clase I, (PI3K de clase III forma un complejo funcional con Beclina-1), Akt y/o mTOR induce autofagia [31], [32]. Un estudio reciente sugiere que la señalización por mTOR se inhibe durante el inicio de autofagia, pero se reactiva tras un tiempo prolongado de falta de nutrientes. Como consecuencia, mTOR reactivada atenuaría la autofagia y restablecería la homeostasis de los lisosomas. Esta retroalimentación negativa asegura la reversión de autofagia ante la recuperación de nutrientes y prevenir un exceso de vacuolización que podría llevar las células a la muerte [32].

Además de la inhibición del eje PI3K/Akt/mTOR, la inhibición del proteasoma también conduce a la regulación positiva de la autofagia para compensar la pérdida de función proteasomal [30], [33]. Entonces las proteínas marcadas con poli-ubiquitina en Lys48 son conducidas a los autofagosomas cuando se empiezan a acumular [30]. Dicha inducción de autofagia en respuesta a la inhibición del proteasoma es mediada a través de la UPR, la cual es inducida por el estrés en el RE provocado por la acumulación de proteínas por la inhibición del proteasoma [30].

### **1. 5. Muerte celular programada o apoptosis**

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo estrechamente controlado de muerte celular regulada activada para eliminar células no necesarias o con fallos irreparables [16]. Mediante este proceso las células pueden inducir su propia muerte ante una gran variedad de estímulos. La gran importancia de la apoptosis es que no ocurre solamente ante algún tipo de estrés o daño celular, sino también durante procesos biológicos como el desarrollo, la homeostasis de los tejidos, el envejecimiento y diversas enfermedades [32].

La muerte por apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Algunos de ellos son la condensación de la cromatina, fragmentación ordenada del núcleo y del DNA, condensación del citoplasma y reducción del volumen celular, formación de burbujas en la membrana plasmática, caída del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), exposición de fosfatidil serina (PS), y eventual desintegración celular en pequeños cuerpos apoptóticos [32], [34], [35].

Una característica distintiva de la apoptosis es la activación de las caspasas (cisteína proteasas con especificidad de corte después de residuos de Asp). En las dos vías existentes de apoptosis, las caspasas rápidamente dismantelan el citoesqueleto y las proteínas de los orgánulos celulares mediante roturas proteolíticas específicas resultando en la muerte de la célula [29], [32]. Las caspasas son activadas de su forma zimógeno (procaspasas) en respuesta a las señales mortales (estrés, daño celular, o la interacción de los receptores mortales con sus ligandos).

Primero, las caspasas iniciadoras (8 y 9) son activadas en respuesta a esas señales mortales. Esto es seguido por la activación de las caspasas ejecutoras tales como 3, 6 y 7. Estas últimas al activarse procesan varios sustratos definidos causando la muerte celular [29].

La apoptosis puede iniciarse por dos vías de señalización, dependiendo del origen del estímulo [31]. Por un lado, la vía extrínseca o de los receptores mortales (Fas, DR4, DR5) responde a estímulos externos (FasL, Apo2L/TRAIL). En este caso, los receptores mortales de la membrana plasmática se activan debido a la unión de sus respectivos ligandos [29], [32]. Por el otro lado, la vía intrínseca se inicia ante señales intracelulares tales como daños irreparables o elevado estrés celular (por ejemplo, daño al DNA, elevado estrés del RE, etc.) [29], [32].

En particular, los casos de apoptosis que se han ido mencionando en este trabajo corresponden a la vía intrínseca. Esta vía está muy bien caracterizada. Está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales desempeñan funciones clave en la inducción o inhibición de la apoptosis mediante interacciones entre ellas [29]. Las proteínas de esta familia poseen entre uno y cuatro dominios de homología Bcl-2 o BH (BH1, BH2, BH3 y BH4). En función de qué dominios tengan y su papel en la apoptosis, los miembros de la familia se clasifican en tres subfamilias:

- Proteínas antiapoptóticas: poseen los cuatro dominios BH. Se encargan de inhibir la apoptosis secuestrando a las proteínas proapoptóticas multidominio por interacción con ellas. Los miembros de esta subfamilia son Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w y A1 [36].
- Proteínas proapoptóticas multidominio: poseen los tres primeros tipos de dominio BH (BH1-BH3). Inducen la apoptosis al quedar libres y oligomerizar

causando la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. Los miembros de esta subfamilia son Bax y Bak [36].

- Proteínas proapoptóticas sólo-BH3: presentan sólo el dominio BH3. Tienen un papel crucial ya que ante los distintos tipos de estrés celular se unen a las proteínas antiapoptóticas permitiendo el desplazamiento y liberación de las proapoptóticas multidominio. Los miembros de esta subfamilia son Noxa, Bim, Bid, Bik, Bad, Bmf, Puma y Hrk [36].

En la vía intrínseca, las señales de estrés causan la oligomerización de las proteínas pro-apoptóticas multidominio, que normalmente están secuestradas en la membrana mitocondrial externa por las proteínas antiapoptóticas. Una vez que oligomerizan, la membrana mitocondrial pierde su integridad, de manera que el citocromo c del espacio intermembrana sale al citoplasma e inicia la ruta de activación de la caspasa 9 mediante el adaptador Apaf-1, desencadenando una cascada de activación de caspasas y la ejecución de la apoptosis [29], [36].

## 1.6. Antecedentes

Dado que la relación entre autofagia y apoptosis es aún un tema de controversia, la evaluación conjunta de estos procesos celulares ha sido objeto de numerosos estudios. En uno de ellos, realizado en este mismo Departamento, se trató de comprender el papel de la autofagia en la muerte inducida por carfilzomib [37]. Para ello se evaluó el efecto de los inhibidores de mTOR, OSI-027 y PP-242, sobre la apoptosis inducida por el inhibidor del proteasoma carfilzomib en líneas celulares de MM [37]. Los resultados no fueron concluyentes, por lo que se decidió estudiar más a fondo este efecto, lo cual ha sido el objetivo principal del presente trabajo.

Estudios recientes han sugerido el hallazgo de una ruta conservada evolutivamente implicada en la homeostasis de los proteasomas. Según dichos estudios, la inhibición de mTOR tanto por condiciones ambientales como por sus respectivos inhibidores, induciría un aumento de la expresión de los proteasomas para reajustar los niveles de proteínas a las necesidades celulares [38], [39]. Para comprobar esta posibilidad y estudiar más a fondo las interrelaciones entre los efectos de la inhibición de mTOR y la del proteasoma, se han realizado los estudios que se detallan en el presente trabajo.



## 2. Hipótesis y objetivos

Datos recientes de la literatura sugieren la posible regulación del proteasoma a través de la proteína mTOR [38], [39]. En un trabajo anterior de nuestro laboratorio, se estudió la influencia de la inhibición de mTOR sobre la apoptosis inducida por los inhibidores del proteasoma en células de MM, sin llegar a resultados concluyentes [37].

Por ello, se ha decidido estudiar este problema en el presente trabajo de una forma más detallada. La hipótesis de este trabajo sería que la inhibición de mTOR produciría un aumento compensatorio de los niveles de proteasoma, disminuyendo así la sensibilidad de las células a una determinada dosis de inhibidores del proteasoma y haciéndolas más resistentes a la subsiguiente apoptosis.

Para llevar a cabo este trabajo y tratar de demostrar la hipótesis se han establecido los siguientes objetivos:

- Analizar el efecto sobre la viabilidad y la apoptosis de los inhibidores del proteasoma de forma individual y en combinación con inhibidores de mTOR ó PI3K, en células de MM.
- Determinar el efecto del tratamiento con inhibidores de mTOR ó PI3K sobre la cantidad de proteasomas en las células de MM tratadas con dichos inhibidores.
- Evaluar el efecto del tratamiento con inhibidores de mTOR ó PI3K sobre la actividad enzimática de los proteasomas en las células de MM tratadas con dichos inhibidores.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Cultivos celulares**

##### **3.1.1 Materiales y medios de cultivos celulares.**

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo son células en suspensión y para su cultivo se utilizó el medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Barcelona) suplementado con un 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco), glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Sigma). El medio una vez suplementado se denominó como medio completo.

Los frascos de cultivo empleados, así como el resto del material de plástico (placas de 6, 48 o 96 pocillos, tubos de fondo cónico, pipetas, tubos criogénicos, etc.) fueron estériles. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical, Telstar (España). Por su parte, las células fueron cultivadas en un incubador de CO<sub>2</sub> termostatzado (Heracell, Thermo Fisher).

El material de vidrio, así como las puntas de micropipetas, tubos de microcentrífuga (tubos Eppendorf) y cualquier otro material usado en la manipulación de las células fueron esterilizados previamente en un autoclave (Autester 4376, Selecta, España) durante 20 – 30 min a 1,2 atm de presión.

Se han utilizado las siguientes centrífugas:

- Microfuge 16 (Beckman Coulter): para tubos Eppendorf, a temperatura ambiente.
- Eppendorf Centrifuge 5417R: para tubos Eppendorf, a temperatura controlada.
- Allegra X-15R (Beckman Coulter): para tubos de fondo cónico de 15 y 50 ml de volumen y tubos para citometría (5 ml).

##### **3.1.2 Líneas celulares**

Las dos líneas de mieloma múltiple humano empleadas para llevar a cabo este trabajo han sido:

- U266: establecida en 1968 a partir de células plasmáticas de sangre periférica de un varón de 53 años. Esta línea produce IgEλ [40].

- MM.1S: establecida en 2003 a partir de la línea celular MM.1, establecida a su vez en 1986 a partir de sangre periférica de una mujer de 45 años. Su característica diferencial respecto a la línea MM.1 es su sensibilidad a glucocorticoides. Esta línea produce IgA $\lambda$ . Además de en suspensión, algunas células tienen la capacidad de adherirse moderadamente a la superficie del frasco de cultivo [7].

### 3.1.3. Mantenimiento de los cultivos

Las líneas celulares utilizadas se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup>, en función de la cantidad de células que fueran a ser necesarias. Las células se sembraron a una densidad mínima entre  $2 \cdot 10^5$  y  $3 \cdot 10^5$  células/ml dependiendo de la cantidad requerida.

Las células fueron cultivadas en un incubador termostatzado a una temperatura de 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los subcultivos se realizaron normalmente cada 2 ó 3 días de cultivo, dejándolos de nuevo a una densidad mínima apropiada a cada momento. Rutinariamente, se comprobó el estado de los cultivos observándolos frascos o placas en un microscopio invertido (Nikon)

### 3.1.4. Congelación y descongelación de los cultivos

Para congelar los cultivos, se recogió el volumen correspondiente a aproximadamente  $6 \cdot 10^6$  células de cada línea celular en tubos de fondo cónico de 15 ml y se centrifugaron durante 5 min a 524 x g. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1,5 ml de medio completo conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Las alícuotas se trasvasaron a un criotubo de congelación estéril, introduciéndolas lo más rápido posible en un congelador a -80 °C. Transcurridas un mínimo de 24 h, los criotubos se guardaron en un contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) hasta el momento de descongelarlos.

Para descongelar los cultivos, los criotubos extraídos del N<sub>2</sub> líquido se transportaron en hielo hasta la campana de flujo laminar, y su contenido se vertió gota a gota dónde estaba preparado un tubo de fondo cónico de 15 ml conteniendo 10 ml de medio completo. Tras la descongelación se centrifugó el tubo de fondo cónico durante 5 min a 524 x g.

Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 5-10 ml de medio completo dependiendo del número de células congeladas. Una vez determinada la viabilidad celular (test del azul Trypan), las células se sembraron a la densidad habitual.

### **3.1.5. Detección de micoplasmas**

Durante el transcurso de este trabajo, se realizó rutinariamente en el laboratorio una comprobación periódica por PCR de la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares. Los cultivos utilizados en este trabajo estuvieron siempre libres de micoplasmas.

## **3.2. Estudio de la proliferación y apoptosis celular**

### **3.2.1. Recuento y determinación de la densidad y viabilidad celular**

Ambos parámetros se determinaron mediante un recuento con el colorante azul Trypan (Sigma). Este colorante tiene la capacidad de penetrar en las células cuya membrana plasmática ha perdido su integridad, tiñéndolas de color azul.

De esa manera, al observar en el microscopio óptico (Optiphot, Nikon) se distingue entre células azul Trypan negativas (sin teñir) y positivas (teñidas). Las primeras serían las células vivas o viables, mientras que las segundas serían células necróticas. No obstante, las células apoptóticas tampoco se tiñen.

Para llevar a cabo el recuento, se mezclaron volúmenes iguales (50  $\mu$ l) de la muestra de suspensión celular y de la solución de azul Trypan (al 0,4% en NaCl 0,15 M). La mezcla resultante se colocó en una cámara de Neubauer que se observó con un microscopio óptico para establecer las cantidades de cada tipo celular. Los valores obtenidos en cada conteo se utilizaron en las siguientes fórmulas:

Fórmula para determinar la densidad celular:

$$\text{Densidad celular} \left( \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo  $10^4$  el factor de corrección correspondiente al volumen de la cámara, y siendo el factor de dilución 1:2.

Ecuación para determinar la viabilidad celular:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas viables}}{N^{\circ} \text{ de células contadas totales}} \cdot 100$$

Todos los experimentos de este trabajo fueron realizados partiendo de células con una viabilidad celular de, como mínimo, el 90%.

### 3.2.2. Citometría de flujo

Durante este trabajo se utilizó un citómetro FACScalibur (BD Biosciences). Este instrumento posee un láser de 488 nm y otro de 633 nm, así como cuatro canales de detección de fluorescencia (FL1-4), además del *Forward Scatter* (FSC) y el *Side Scatter* (SSC).

La excitación de las muestras con el primero de los láseres permite recoger información del FSC (tamaño celular), SSC (granulosidad), FL1 (fluorescencia verde,  $530 \pm 15$  nm), FL2 (fluorescencia amarilla,  $585 \pm 21$  nm) y FL3 (fluorescencia roja, 670 nm). En cambio, al excitar con el segundo láser sólo se recoge información del FL4 (fluorescencia naranja,  $661 \pm 8$  nm).

#### 3.2.2.1. Determinación del potencial mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es generado por el gradiente de protones ( $H^+$ ) entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). El potencial mitocondrial de las células en condiciones normales es alto y constante ( $\sim 140$  mV), pero disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias [41].

Para la medida de este potencial se utilizó la sonda fluorescente roja lipofílica tetrametilrodamina metil éster (TMRE,  $\lambda_{\text{abs}} = 549$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 574$  nm) que está cargada positivamente, por lo que se acumula en la matriz mitocondrial de las células viables [42]. Cuando desciende el valor del potencial, es decir, en las primeras etapas de la apoptosis, desciende la cantidad de sonda retenida en la matriz, disminuyendo la fluorescencia recogida en el canal FL2.

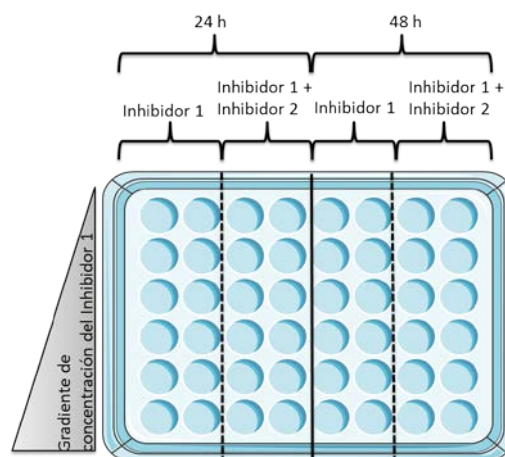
En estos experimentos, se sembraron  $3 \cdot 10^5$  células/ml en placas de 48 pocillos (300  $\mu$ l/pocillo), siempre con la misma disposición que se muestra en la *Figura 6* (una placa por cada línea celular y por cada experimento). Una vez sembradas se añadió el Inhibidor 2 (inhibidor de PI3K o mTOR) en los pocillos correspondientes a una concentración final fija (1  $\mu$ M) y se preincubó durante 1 h a 37 °C.

Pasado ese tiempo se añadió el Inhibidor 1 (inhibidor del proteasoma) a todos los pocillos (excepto en los controles) y se dejó incubar el tiempo pertinente antes de proceder a determinar el potencial de membrana mitocondrial. La mitad de las muestras de la placa se recogieron en tubos de citometría y analizaron a las 24 h, mientras que el resto fueron analizadas del mismo modo al alcanzar las 48 h de incubación.

Una vez recogidas en tubos de citometría, las células se centrifugaron 2 min a 2850 x g y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una disolución 25 nM de TMRE en PBS (del inglés *phosphate-buffered saline*, tampón fosfato potásico 0,01 M pH 7,4). Se incubaron como mínimo 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se añadieron 200  $\mu$ l de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se realizaron todas las combinaciones posibles entre los inhibidores del proteasoma (carfilzomib o bortezomib) y los de PI3K o mTOR (BYL-719 y PP-242 u OSI-027, respectivamente), y al menos, por duplicado. Los resultados de citometría obtenidos se trataron utilizando los programas informáticos *Cell Quest* y *FlowJo 7.6.1*.

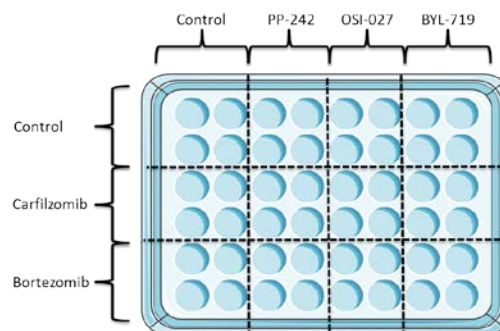
### 3.2.2.2. Análisis de los niveles de expresión de Noxa

Para determinar los niveles intracelulares de esta proteína proapoptótica durante el tratamiento con los distintos inhibidores (del proteasoma y de PI3K o de mTOR), se utilizó la técnica de marcaje intracelular con anticuerpos conjugados a fluorocromos, seguido de su análisis por citometría de flujo.



*Figura 6: Diseño de las placas. Cada fila corresponde a una concentración distinta del Inhibidor 1, siendo la de menor concentración el control (0 nM). Cada condición contaba con un duplicado.*

Para estos experimentos, se sembraron  $3 \cdot 10^5$  células/ml de cada línea celular en placas de 48 pocillos (300  $\mu$ l/pocillo), con la distribución de la *Figura 7* (una placa por cada línea celular y por cada experimento). Una vez sembradas se añadieron los inhibidores de PI3K o de mTOR en los pocillos correspondientes a la concentración final de 1  $\mu$ M. Tras preincubar durante 1 h a 37 °C, se añadieron los inhibidores del proteasoma y se dejó incubar durante 24 h.



*Figura 7: Diseño de las placas. En este experimento en vez de un rango sólo hay una concentración de cada inhibidor del proteasoma. Cada condición contaba con 4 réplicas.*

Una vez completado ese tiempo, las células se recogieron en tubos de citometría, y se centrifugaron 5 min a 930 x g. El medio de cultivo se eliminó por decantación y los pellets celulares se resuspendieron en 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 1% en PBS durante 15 min a 4 °C para fijar las células.

A continuación se centrifugaron 5 min a 930 x g y se eliminó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una solución de PBS que contenía saponina al 0,1% y suero de cabra al 5%. Se les añadió un volumen de anticuerpo primario específico contra Noxa (clone 114C307, Abcam) según lo recomendado por la casa comercial (1  $\mu$ g por cada  $1 \cdot 10^6$  células) o el volumen equivalente de una IgG de ratón como control de isotipo (para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo).

Se dejó incubar con los anticuerpos primarios durante 30 min a temperatura ambiente, y después se centrifugaron 5 min a 930 x g. Tras eliminar el sobrenadante, se lavaron los pellets celulares con 100  $\mu$ l de saponina al 0,03% en PBS. A las suspensiones resultantes se les añadió el volumen adecuado de anticuerpo secundario (dirigido contra el primario) conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras la incubación, se centrifugó 5 min a 930 x g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente los pellets celulares se resuspendieron en 100-200  $\mu$ l de PBS.

Simultáneamente se determinó la viabilidad de las células en muestras replicadas. Para ello se determinó el potencial de membrana mitocondrial en dichas muestras, que fueron tratadas de la misma forma descrita anteriormente.

Una vez realizado el marcaje en todas las muestras se procedió a su análisis en un citómetro de flujo (FACScalibur). Los resultados obtenidos se analizaron con los programas informáticos *Cell Quest* y *FlowJo 7.6.1*.

*Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como sus datos y diluciones empleadas se pueden consultar en la Tabla A1 del Anexo.*

### **3.3. Análisis de la expresión de las subunidades del proteasoma y su funcionalidad**

#### **3.3.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares**

Para los experimentos relativos al estudio de los niveles y actividad del proteasoma fue necesario obtener lisados de células totales. Las células a analizar fueron sembradas en placas de 6 pocillos ( $10^6$  células por pocillo, en un volumen de 2,5 ml por pocillo), utilizando tantas placas como fueran necesarias para conseguir la cantidad de células requeridas para el experimento. Seguidamente, las células se dejaron incubar con los inhibidores elegidos a las concentraciones determinadas para cada experimento, durante 24 h (en el caso de combinar inhibidores del proteasoma con inhibidores de PI3K o de mTOR se preincubó con estos últimos durante 1 h).

Transcurrido el tiempo de incubación, las células se recogieron en tubos de fondo cónico de 15 ml y se centrifugaron 5 min a 524 x g. Se eliminó el medio y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS. Dicho volumen se trasvasó a tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron 5 min a 166 x g. Se eliminó el PBS y en este momento los pellets se resuspendieron con el tampón de lisis, que fue distinto según el experimento.

- Preparaciones para la determinación de los niveles del proteasoma 20S/26S y la actividad del proteasoma 20S: se utilizó el tampón proporcionado en el kit comercial ( $100 \mu\text{l}/10^6$  células): Tris HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; NP-40 al 0,5%.

Una vez añadido el tampón de lisis, las muestras se vortexaron brevemente y se incubaron 15 min a 4 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron 5 min a 7378 x g a temperatura ambiente. Posteriormente los



sobrenadantes se trasvasaron a nuevos tubos Eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

- Preparaciones para el análisis de la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma por Western blotting: se utilizó un tampón de distinta composición (20  $\mu$ l/10<sup>6</sup> células): Tritón-X100 al 1%; NaCl 150 mM; Tris/HCl 50 mM, pH: 7,6; glicerol al 10% v/v; EDTA 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; pirofosfato sódico 10 mM; leupeptina 10  $\mu$ g/ml; fluoruro de sodio 10 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM.

Una vez añadido el tampón de lisis, las muestras se vortexaron brevemente y se incubaron 30 min en hielo. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron 15 min a 10600 x g a 4 °C. Posteriormente, los sobrenadantes se trasvasaron a nuevos tubos Eppendorf.

Se añadió el volumen oportuno de tampón de carga 3x (Tris/HCl 150 mM pH: 7,4; SDS al 3%; molibdato de sodio 0,3 mM; pirofosfato sódico 30 mM; fluoruro de sodio 30 mM; glicerol al 30% v/v;  $\beta$ -mercaptoetanol al 30% v/v y azul de bromofenol al 0,06%, p/v) para que quedase a una concentración final 1x. Las muestras se utilizaron a continuación o se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### **3.3.2. Determinación de los niveles del proteasoma 20S/26S mediante ELISA**

Se empleó el kit comercial *20S/26S Proteasome ELISA Kit* de Enzo Life Sciences y los reactivos proporcionados, según las indicaciones del proveedor.

Inicialmente se preparó una placa de 96 pocillos incubándola durante la noche a 4 °C con una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal de captura dirigido contra la subunidad  $\alpha 6$  (100  $\mu$ l por pocillo). Tras una serie de 5 lavados con el tampón proporcionado en el kit (solución salina tamponada con Tris que además contiene detergentes), se bloqueó la placa durante 2 h con 300  $\mu$ l por pocillo de una solución de proteínas en PBS. Después de una nueva serie de lavados, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una dilución 1:500 de la muestra correspondiente de lisado celular (cada muestra se analizó por triplicado), y se dejó incubar durante 1 h en un agitador de placas (Bioblock) a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de las muestras, se realizó una serie de 5 lavados y se añadieron 100 µl por pocillo de una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal de detección dirigido contra el proteasoma 20S. Se dejó incubar 1 h en las mismas condiciones que con la muestra, y se volvió a lavar antes de añadir 100 µl por pocillo de una dilución 1:100 del anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, de su nombre en inglés: *Horseradish peroxidase*). Nuevamente se incubó durante 1 h en las mismas condiciones anteriormente descritas, y pasado ese tiempo se realizó una nueva serie de lavados antes de añadir 100 µl por pocillo de TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidina) y peróxido de hidrógeno, el sustrato de la HRP.

Las placas se dejaron incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 30 min, al final de los cuales se detuvo la reacción por adición a cada pocillo de 100 µl de solución Stop (ácido clorhídrico 1N). Además de detenerla, se produce un cambio de color del producto de la reacción de azul a amarillo. Seguidamente se realizó la lectura de la densidad óptica a 450 nm (longitud de onda correspondiente al color amarillo) en un lector de microplacas (Multiskan Ex, Thermo).

*Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como sus datos y diluciones empleadas se pueden consultar en la Tabla A2 del Anexo.*

### **3.3.3. Ensayo fluorimétrico de la actividad del proteasoma 20S**

Se empleó el kit comercial *20S Proteasome Activity Assay Kit* de Chemicon y los reactivos proporcionados, según las indicaciones del proveedor.

Para determinar la actividad enzimática (de tipo quimotripsina) de los proteasomas se hizo uso de la detección del fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC), una vez liberado del péptido sustrato marcado, LLVY-AMC, gracias a la acción enzimática del proteasoma.

En una placa de 96 pocillos se cargó, por triplicado, el volumen de muestra correspondiente a 10 µg de los lisados celulares preparados y se incubó entre 1~2 h a 37 °C en presencia del sustrato de la reacción (LLVY-AMC) y del tampón de ensayo (HEPES 25 mM, pH 7,5; EDTA 0,5 mM; NP-40 al 0,05%; SDS al 0,001% (p/v)), que contenía SDS para permitir la entrada del péptido a la cavidad proteolítica del proteasoma. Finalmente se midió la intensidad de fluorescencia a 380 nm (excitación) y 460 nm (emisión) en un fluorímetro de placas (Synergy HT, BioTek).

### 3.3.4. Determinación de la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma

#### 3.3.4.1. Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF

Para la separación de las proteínas en función de su peso molecular durante la electroforesis se utilizaron geles verticales discontinuos de acrilamida/bisacrilamida. Tanto el gel concentrador (*stacking gel*) como el gel separador (*resolving gel*) se prepararon en el laboratorio, cuyas composiciones se recogen en la *Tabla 1*. Debido a las pequeñas diferencias de peso entre las distintas subunidades catalíticas del proteasoma, se decidió hacer el gel separador al 14% de poliacrilamida.

Componentes	<i>Stacking Gel</i>	<i>Resolving Gel (14%)</i>
<b>30% Acrilamida/Bis, BioRad</b>	325 $\mu$ l	2,3 ml
<b>0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (<i>Stacking Gel</i>)</b>	630 $\mu$ l	-
<b>1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (<i>Resolving Gel</i>)</b>	-	1,25 ml
<b>10% SDS</b>	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>Agua destilada</b>	1,5 ml	1,37 ml
<b>10% APS, Sigma</b>	200 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>T.E.M.E.D., Sigma</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>Total</b>	2,5 ml	5 ml

*Tabla 1. Composición de los distintos geles empleados en la electroforesis.*

Los geles se montaron en cubetas de electroforesis verticales (Hoefer), y éstas se rellenaron con el tampón de electroforesis o *Running Buffer* (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS al 0,01 %). Los lisados celulares preparados anteriormente se calentaron durante 5 min a 95 °C en un baño seco (Selecta), y se cargó en los carriles asignados el volumen correspondiente a  $5 \cdot 10^5$  células. También se cargó en cada gel en un carril aparte 3  $\mu$ l del marcador de peso molecular (BlueStar Plus Prestained Protein Marker, Nippongenetics).

La electroforesis se realizó durante 2-2,5 h aproximadamente, a 200 V y 20 mA/gel. Posteriormente se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) o de PVDF (GE Healthcare), esta última previamente activada por incubación durante 30 s en metanol.

Para ello se realizó un montaje tipo sandwich de manera que se colocaron la membrana y el gel entre papeles de filtro Whatman (GE Healthcare) humedecidos previamente con tampón de transferencia (Tris/HCl 48 mM pH 8,3; glicina 39 mM; 0,037 % SDS; 20 % metanol). La electrotransferencia semiseca se realizó en un equipo Bio-Rad conectado a una fuente de electroforesis (Bio-Rad) para transferir las proteínas durante 1 h 15 min a 20 V y 400 mA.

Al finalizar la electrotransferencia, se recuperaron las membranas y se comprobó que ésta se había producido correctamente sumergiéndolas en una solución de Rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético al 0,05%. Esta solución colorea de manera reversible las bandas proteicas, de forma que se puede ver si las proteínas se han transferido a la membrana o siguen en el gel. Después se procedió al bloqueo de la membrana con leche desnatada al 5% en tampón B (Tris/HCl 10 mM pH 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 0,1%; timerosal 0,1 g/L) durante 1 h.

#### **3.3.4.2. Análisis de proteínas por *Western blotting***

Una vez bloqueadas, las membranas se lavaron en tampón B tres veces durante 10 min con agitación. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario específico para las subunidades catalíticas del proteasoma, a la concentración recomendada por el proveedor (diluido en tampón B con 5 % BSA y 0,05 % azida de sodio), durante toda la noche a 4 °C con agitación.

Tras este tiempo se procedió al lavado del anticuerpo primario (3 lavados de 10 min cada uno con tampón B en agitación) y a la incubación del anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación, a la concentración indicada por el fabricante (diluido en tampón B con 2,5 % de leche desnatada). Los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de las proteínas estaban conjugados a la HRP.

El lavado del anticuerpo secundario se realizó en las mismas condiciones que el lavado del anticuerpo primario, tras lo cual se procedió a revelar la membrana por quimioluminiscencia (ECL, de su nombre en inglés: *Electrochemiluminescence*). Esta técnica está basada en la detección de luz emitida tras la oxidación de un sustrato quimioluminiscente. La membrana se incubó durante 2 min con el sustrato apropiado para la HRP (Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate, Thermo).

Pasado este tiempo, la membrana se transfirió a una funda de plástico transparente encajada dentro de un *cassette* de revelado radiológico y se eliminó el exceso de sustrato. En un cuarto oscuro con iluminación para revelado fotográfico, se colocó una película fotográfica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sobre la funda que contenía la membrana, y se expuso durante un tiempo determinado. Las exposiciones fueron, en general, de 5 min, excepto en el caso de la subunidad  $\beta 1$  para la que se utilizaron tiempos más largos.

A continuación, la película se reveló mediante inmersión en líquido revelador (100 ml revelador, 350 ml agua destilada), agua destilada y líquido fijador (100 ml fijador, 400 ml agua destilada) (Kodak). Tras el revelado, la película se secó al aire y se digitalizó con un escáner. Las bandas de proteínas se analizaron por densitometría con el software *Image J* utilizando la banda de la proteína actina como control de carga.

*Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como sus datos y diluciones empleadas se pueden consultar en la Tabla A3 del Anexo.*

### **3.4. Análisis estadístico**

El análisis, interpretación y representación de los resultados obtenidos en todos los anteriores experimentos se realizó con los programas informáticos Excel y *GraphPad Prism 6.01*. Se realizó la prueba t de Student desapareada, considerando los distintos grados de significancia como:

- \* si el p valor es  $< 0,05$ .
- \*\* si el p valor es  $< 0,01$ .
- \*\*\* si el p valor es  $< 0,001$ .
- \*\*\*\* si el p valor es  $< 0,0001$ .

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Efecto de la combinación de inhibidores del proteasoma y de mTOR**

#### **4.1.1. Efecto de la combinación de carfilzomib con inhibidores de mTOR**

En primer lugar, se analizó el efecto de la concentración y del tiempo de incubación con carfilzomib, solo o en combinación con los inhibidores de mTOR (PP242 u OSI-027), sobre la muerte celular. Para ello se utilizaron concentraciones de carfilzomib de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 nM para ambas líneas de MM (MM.1S y U266)

Para evaluar la influencia del tiempo de incubación, se analizó el efecto de las combinaciones de fármacos a las 24 h y 48 h. Los inhibidores de mTOR, se utilizaron a una concentración fija (1  $\mu$ M), la misma que se empleó en el estudio preliminar [37], tanto en el caso de PP-242 como en el de OSI-027.

La primera combinación ensayada fue la de carfilzomib con PP-242, cuyos resultados se encuentran recogidos en la *Figura 8*. En ella se puede observar como aumenta de forma progresiva la apoptosis (considerando células apoptóticas aquellas que presentan un potencial mitocondrial bajo) según aumenta la concentración de carfilzomib tanto solo como combinado con los inhibidores de mTOR.

Sin embargo, en ambas líneas celulares, tras 24 h de tratamiento, la combinación del inhibidor del proteasoma carfilzomib y con PP-242 produjo menos muerte celular que la debida al carfilzomib solo. Es de señalar que a la mayor concentración ensayada (25 nM) parece que esa diferencia empieza a reducirse, sobre todo en el caso de las células U266, en las que deja de haber diferencias significativas.

En las células tratadas durante 48 h, se puede observar en la misma figura cómo va disminuyendo la tendencia a una menor muerte celular con la combinación de inhibidores. En ambas líneas celulares las diferencias entre la tasa de muerte producida por carfilzomib solo o en combinación con PP-242 se reducen. En concreto, en las U266 a las concentraciones más elevadas las diferencias van disminuyendo y en las MM.1S los valores se igualan en casi todos los puntos. Además, también se aprecia que a las 48 h PP-242 induce un ligero aumento de la muerte en MM.1S.

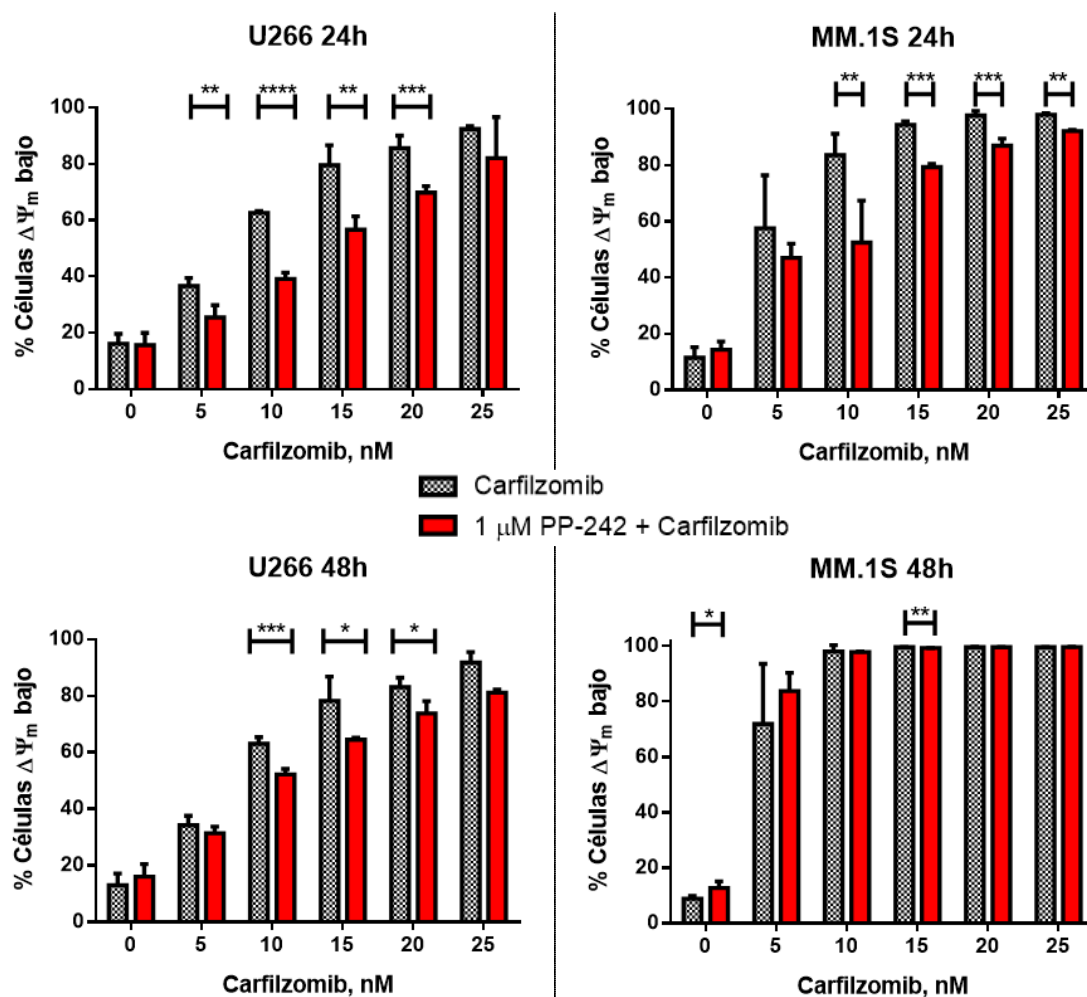


Figura 8. Efecto de la combinación de PP-242 y carfilzomib. Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de carfilzomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

También se analizó el efecto de la combinación de carfilzomib con OSI-027, cuyos resultados se encuentran recogidos en la Figura 9. En ella se puede ver que las gráficas de los resultados presentan un perfil bastante similar a las obtenidas con carfilzomib y PP-242. Nuevamente el tratamiento combinado con los inhibidores durante 24 h produjo una disminución de la muerte celular respecto a la producida por carfilzomib únicamente. La diferencia volvió a ser mayor en las U266. En las MM.1S se puede apreciar que la diferencia es menor cuanto mayor es la concentración de carfilzomib.

De nuevo, a las 48 h de incubación se reducen las diferencias observadas, llegando prácticamente a desaparecer a casi todas las concentraciones ensayadas.

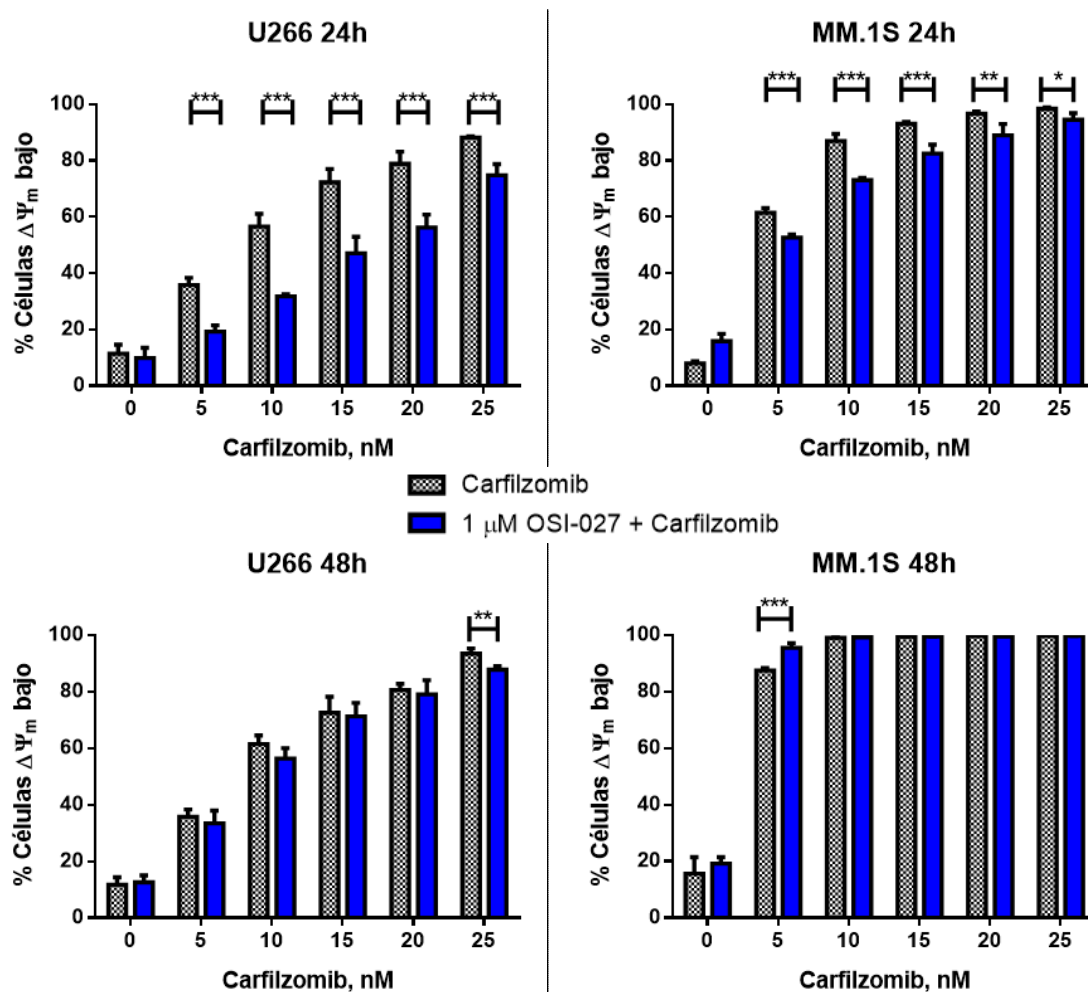


Figura 9. Efecto de la combinación de OSI-027 y carfilzomib. L Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de carfilzomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

#### 4.1.2 Efecto de la combinación de bortezomib con inhibidores de mTOR

Para comprobar que lo observado hasta ahora no se debía al caso particular del carfilzomib sino que era válido para otros inhibidores del proteasoma, se combinaron los inhibidores de mTOR (PP242, OSI-027) con otro inhibidor del proteasoma, bortezomib.

En la línea celular MM.1S se utilizó el mismo rango de concentración de bortezomib que con carfilzomib. En cambio, para U266 y para evitar una muerte celular excesiva que impidiera un correcto análisis, se redujo el rango de concentraciones. El rango utilizado varió en función del experimento.



Se realizó primero la combinación de bortezomib con PP-242, y los resultados aparecen recogidos en la *Figura 10*.

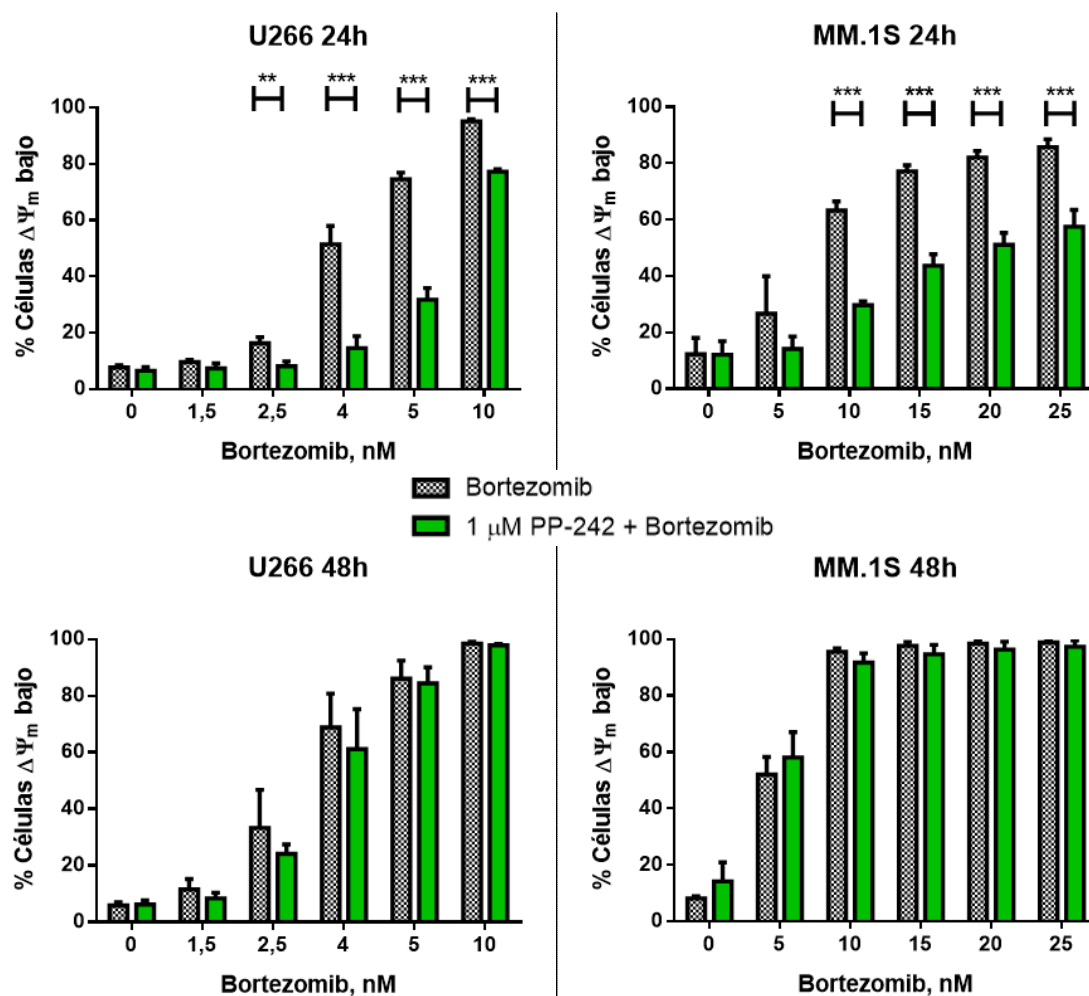


Figura 10. Efecto de la combinación de PP-242 y bortezomib. Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de bortezomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Se puede comprobar que los resultados obtenidos en las combinaciones con carfilzomib se repiten también con bortezomib. Aunque existe una diferencia significativa en la muerte celular producida por el co-tratamiento durante 24 h, esta desaparece a las 48 h, al igual que en los experimentos anteriores.

La última combinación realizada fue la de bortezomib con OSI-027. Para este experimento, se modificaron ligeramente las concentraciones de bortezomib utilizadas para las U266.

Los resultados correspondientes se muestran en la *Figura 11* y se caracterizan de nuevo por una disminución de la muerte celular en las células incubadas 24 h con la combinación de inhibidores respecto al bortezomib solo. Aunque con esta combinación se observan mayores diferencias a las 24 h, tras 48 h de incubación la muerte observada con bortezomib y OSI-027 solo tiende a igualarse a la observada con bortezomib. Así mismo, el inhibidor de mTOR OSI-027 comienza a ser ligeramente tóxico a las 48 h.

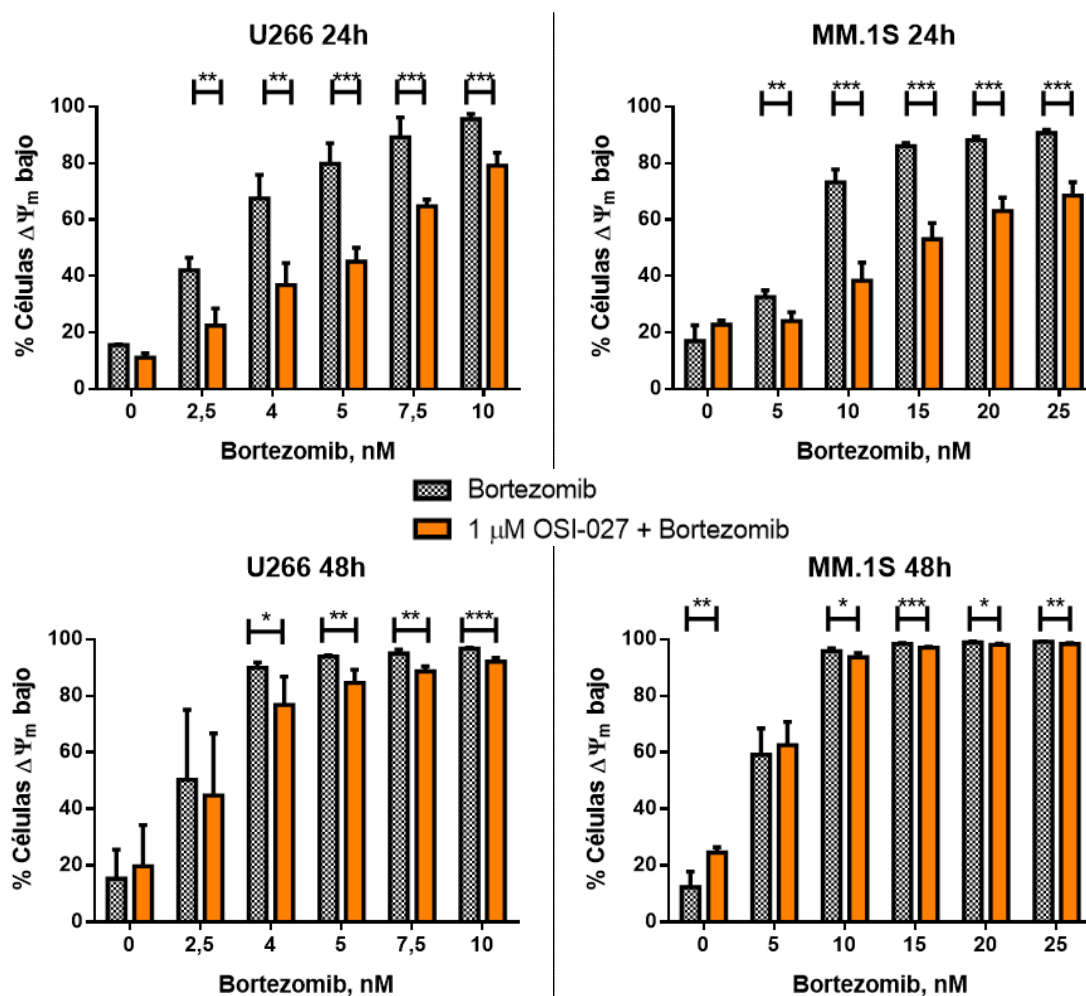


Figura 11. Efecto de la combinación de OSI-027 y bortezomib. Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de bortezomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

El conjunto de estos resultados indica que la menor muerte celular observada en todas las combinaciones frente al tratamiento individual con el inhibidor del proteasoma se reduce a mayores tiempos de incubación o mayores concentraciones de inhibidor.

## 4.2. Efecto de la combinación de inhibidores del proteasoma y de PI3K

Para estudiar si estos resultados dependen únicamente de la actividad de mTOR o también de la actividad de una etapa de señalización anterior, se realizó el mismo tipo de experimentos combinando los inhibidores del proteasoma con un inhibidor de la PI3K $\alpha$ , la isoforma más importante en las células de MM. Para ello, se combinaron carfilzomib y bortezomib con BYL-719 y se analizó su efecto sobre la muerte celular.

En primer lugar, se analizó la combinación de carfilzomib con BYL-719, cuyos resultados se muestran en la *Figura 12*. En ella se ve que, a diferencia de las combinaciones con los inhibidores de mTOR, en este caso la combinación con el inhibidor de PI3K $\alpha$  no produce una menor muerte celular tras 24 h de incubación.

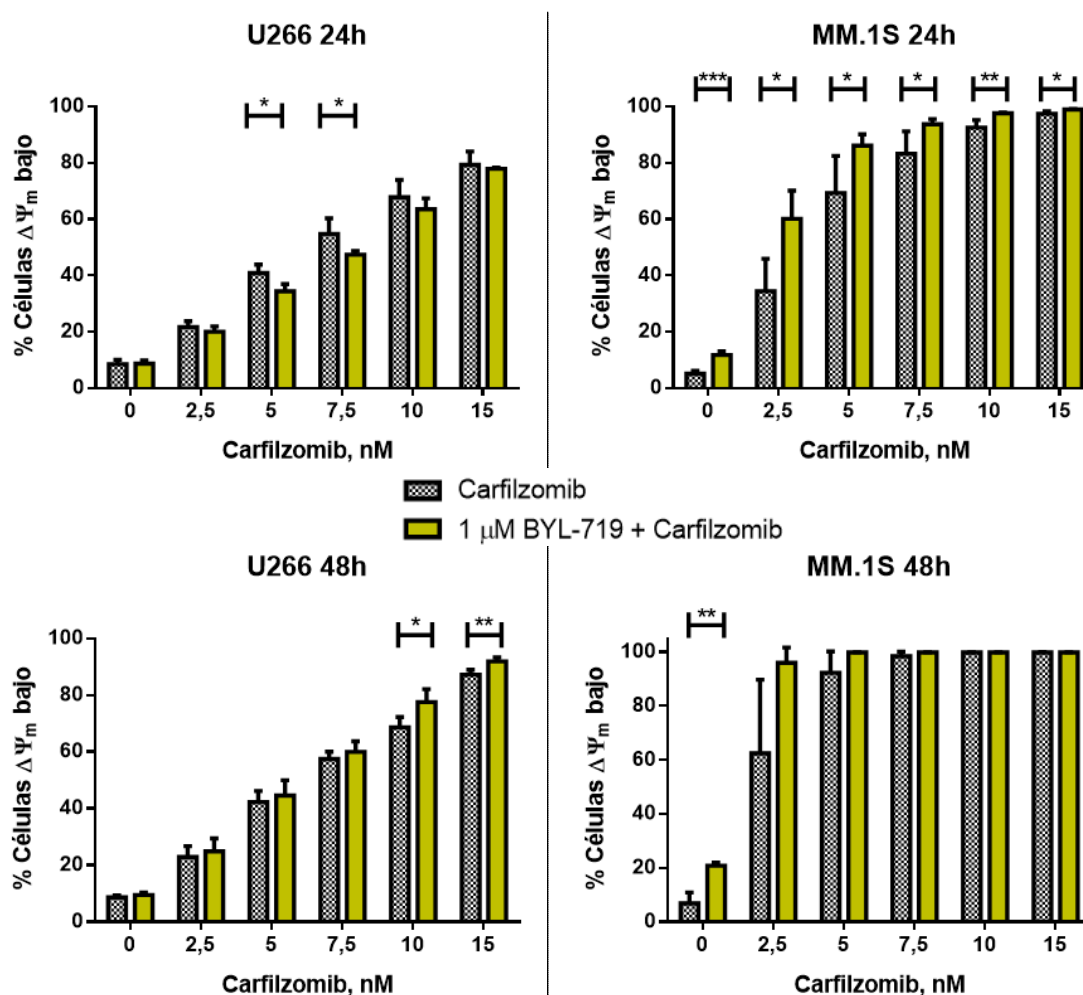


Figura 12. Efecto de la combinación de BYL-719 y carfilzomib. Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de carfilzomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

No obstante, los resultados varían ligeramente según la línea celular. En la línea U266, la toxicidad de la combinación es parecida a la observada si se tratan las células sólo con carfilzomib. Sólo hay una pequeña diferencia a las concentraciones bajas de carfilzomib (5 y 7,5 nM). En cambio, en MM.1S se encontró el efecto opuesto a lo observado anteriormente, ya que la combinación de ambos inhibidores aumenta la cantidad de apoptosis. Además, es interesante resaltar que a la concentración utilizada del inhibidor de PI3Kα BYL-719 (1 µM, la misma que la empleada para los inhibidores de mTOR), éste tiene una ligera capacidad de inducción de apoptosis *per se*.

Tras 48 h de incubación, la línea U266 muestra unos resultados parecidos en los experimentos de combinación. Sólo a las concentraciones más altas de carfilzomib (10 y 15 nM), la combinación con BYL-719 causa un pequeño aumento de la muerte celular respecto al inhibidor del proteasoma solo. En las MM.1S se observa un aumento de la apoptosis en la combinación realizada a dosis bajas de carfilzomib (2,5 nM) que no llega a ser significativa.

Para validar los resultados obtenidos combinando BYL-719 y carfilzomib, se analizó también el efecto de la combinación con bortezomib. Los resultados obtenidos, presentados en la *Figura 13*, son en gran medida semejantes a los obtenidos con carfilzomib. Tras 24 h de tratamiento no se apreciaba una gran disminución de la muerte celular al combinar los dos inhibidores, que es lo que ocurría al combinar con los inhibidores de mTOR. Aunque en la línea U266 a las concentraciones más altas de bortezomib (5, 7,5 y 10 nM) la apoptosis disminuye ligeramente al combinar con BYL-719, la diferencia es mínima respecto a lo observado con los inhibidores de mTOR. Para el resto de concentraciones, así como en la línea MM.1S, los resultados son similares a los encontrados en la combinación entre BYL-719 y carfilzomib.

En las incubaciones con los inhibidores durante 48 h, en el caso de las U266 no había diferencias de apoptosis entre ambos tratamientos. En la línea MM.1S se encontró un resultado similar aunque en este caso, de nuevo, BYL-719 induce *per se* una cierta apoptosis.

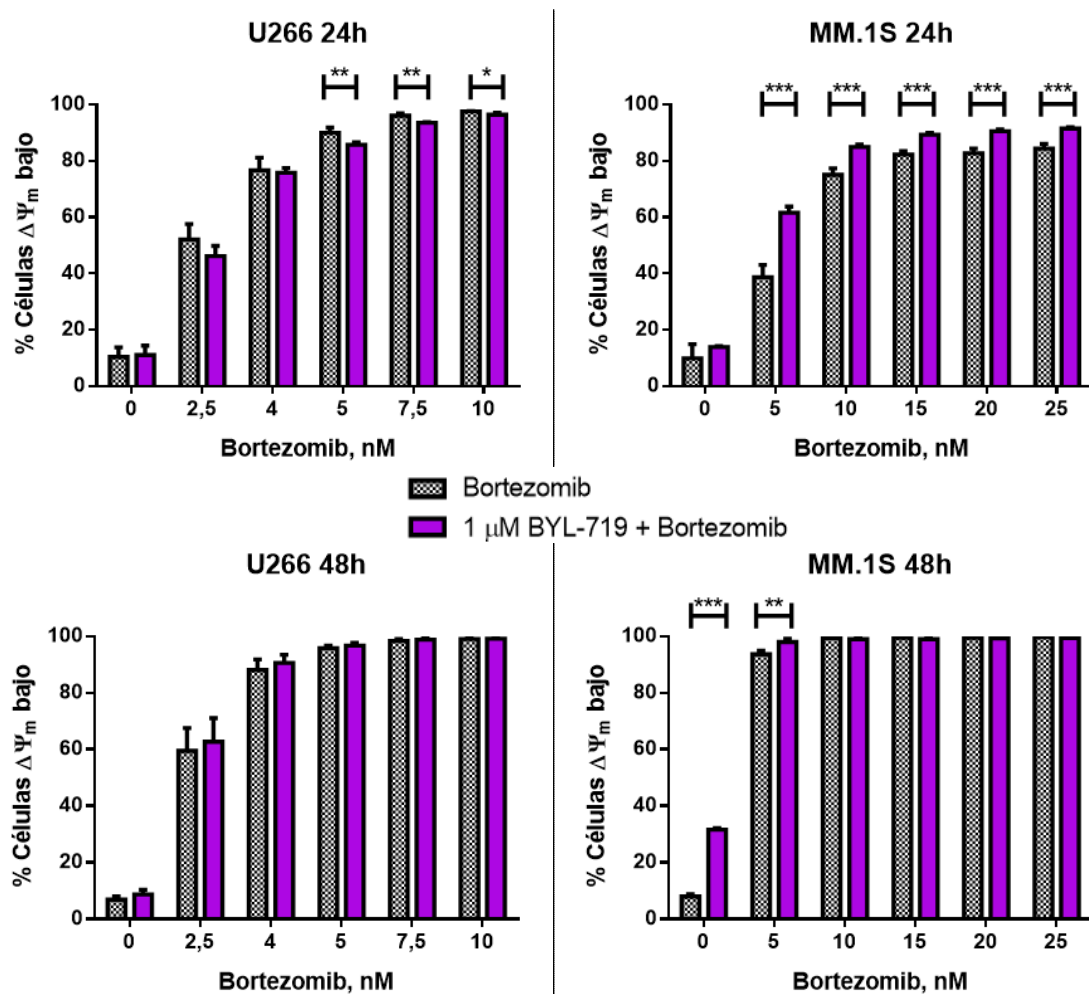


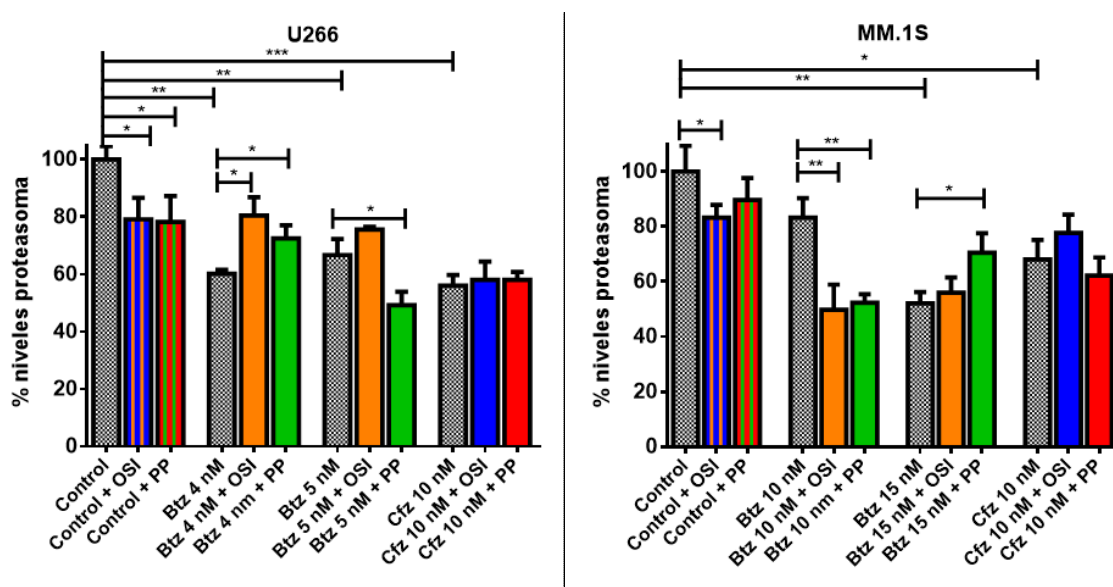
Figura 13. Efecto de la combinación de BYL-719 y bortezomib. Las líneas U266 y MM.1S se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se analizó la muerte celular, mediante el porcentaje de células que han sufrido una caída en su potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En el eje de abscisas se indican las concentraciones de bortezomib utilizadas. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD (desviación estándar) de cuatro repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Estos resultados nos llevan a concluir que la inhibición de la apoptosis inducida por inhibidores del proteasoma en células de MM al combinar con inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR depende de la señalización de mTOR y no de la de PI3K $\alpha$ .

#### 4.3. Determinación de los niveles del proteasoma 20S/26S

Para investigar si la disminución de la apoptosis inducida por los inhibidores del proteasoma observada al co-incubar con inhibidores de mTOR se debía al aumento de la cantidad de proteasomas intracelulares [38], se determinó la cantidad de proteasomas celulares mediante la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Se eligieron varias concentraciones de inhibidores del proteasoma dentro de los rangos empleados anteriormente, en los que se habían observado diferencias. Los resultados se normalizaron respecto a los valores de las células control, no tratadas con ningún inhibidor, tal y como se resume en la *Figura 14*.



*Figura 14. Niveles celulares del proteasoma 20S/26S. En placas de 6 pocillos se sembraron  $10^6$  células de MM en 2,5 ml de medio completo por pocillo, y una alícuota del lisado celular obtenido se utilizó para determinar los niveles de proteasoma mediante la técnica de ELISA, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos para las células control, cultivadas en ausencia de inhibidores, se establecieron como el 100%. Los resultados están agrupados según la combinación y la concentración de inhibidor de proteasoma ensayada. Bortezomib (Btz), carfilzomib (Cfz), PP-242 (PP), OSI-027 (OSI). En la representación gráfica, para los datos del efecto de la combinación de los inhibidores se ha utilizado el mismo código de colores que en los análisis del potencial mitocondrial: rojo carfilzomib y PP-242, azul carfilzomib y OSI-027, verde bortezomib y PP-242, naranja bortezomib y OSI-027, y el cuadrículado blanco y negro para los inhibidores del proteasoma por separado. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD de tres repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .*

Lo primero que se aprecia en los gráficos es que las células tratadas con inhibidores del proteasoma tienen, en general, menor cantidad de proteasomas que las células control. Así mismo, se puede apreciar que las células tratadas solo con los inhibidores de mTOR (OSI-027, PP-242) también sufren una pequeña reducción significativa de los niveles de proteasoma respecto a las células control.

Si analizamos los resultados agrupándolos en función de las distintas concentraciones de inhibidores del proteasoma empleadas, en algunos casos, como por ejemplo los obtenidos con bortezomib 4 nM en las células U266, se ajustarían a la

hipótesis de trabajo, ya que las células tratadas además con PP-242 o con OSI-027 presentan unos niveles mayores de proteasomas que las tratadas solo con bortezomib.

Sin embargo, en otras muchas condiciones ensayadas, los niveles de proteasomas fueron similares, o en algún caso inferiores al tratar conjuntamente con los inhibidores de mTOR. Por ello, se puede concluir que el tratamiento con los inhibidores de mTOR no suele aumentar los niveles de proteasomas en las células de MM.

Podría pensarse que no se observara un aumento en los niveles de proteasomas en las células tratadas con la combinación de inhibidores debido a que la cantidad de células vivas (capaces de haber aumentado sus niveles de proteasoma) es mucho menor que en el control (células sin tratar). Esto no se puede calcular directamente ya que al realizar la determinación en lisados celulares de la población total, también estarían incluidos los proteasomas de las células apoptóticas.

Si se calculasen los ratios de proteasomas por células vivas, el ratio para las escasas células supervivientes tratadas con los inhibidores del proteasoma sería mucho mayor que en los controles. Sin embargo, esto falsearía los resultados, porque adjudicaríamos a estas células los proteasomas de las células apoptóticas. Además, es conocido que las células capaces de resistir a esas concentraciones lo son por sobreexpresar las subunidades proteasómicas [27].

#### **4.4. Ensayo de la actividad del proteasoma 20S**

Otra posibilidad a tener en cuenta sería que al inhibir mTOR aumentase la actividad enzimática de los proteasomas en las células, permitiendo así una mayor resistencia a los inhibidores del proteasoma y una mayor supervivencia. Para analizar esta posibilidad, se analizó la actividad catalítica (de tipo quimotripsina) de los proteasomas de células tratadas en las mismas condiciones que el experimento anterior, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados, al igual que en el caso anterior, se normalizaron a los valores correspondientes a los controles sin tratar con ningún inhibidor, tal y como se puede ver en la *Figura 15*.

En la *Figura 15A* se puede ver claramente que no se produjo un incremento de la actividad de los proteasoma, sino un importante descenso.



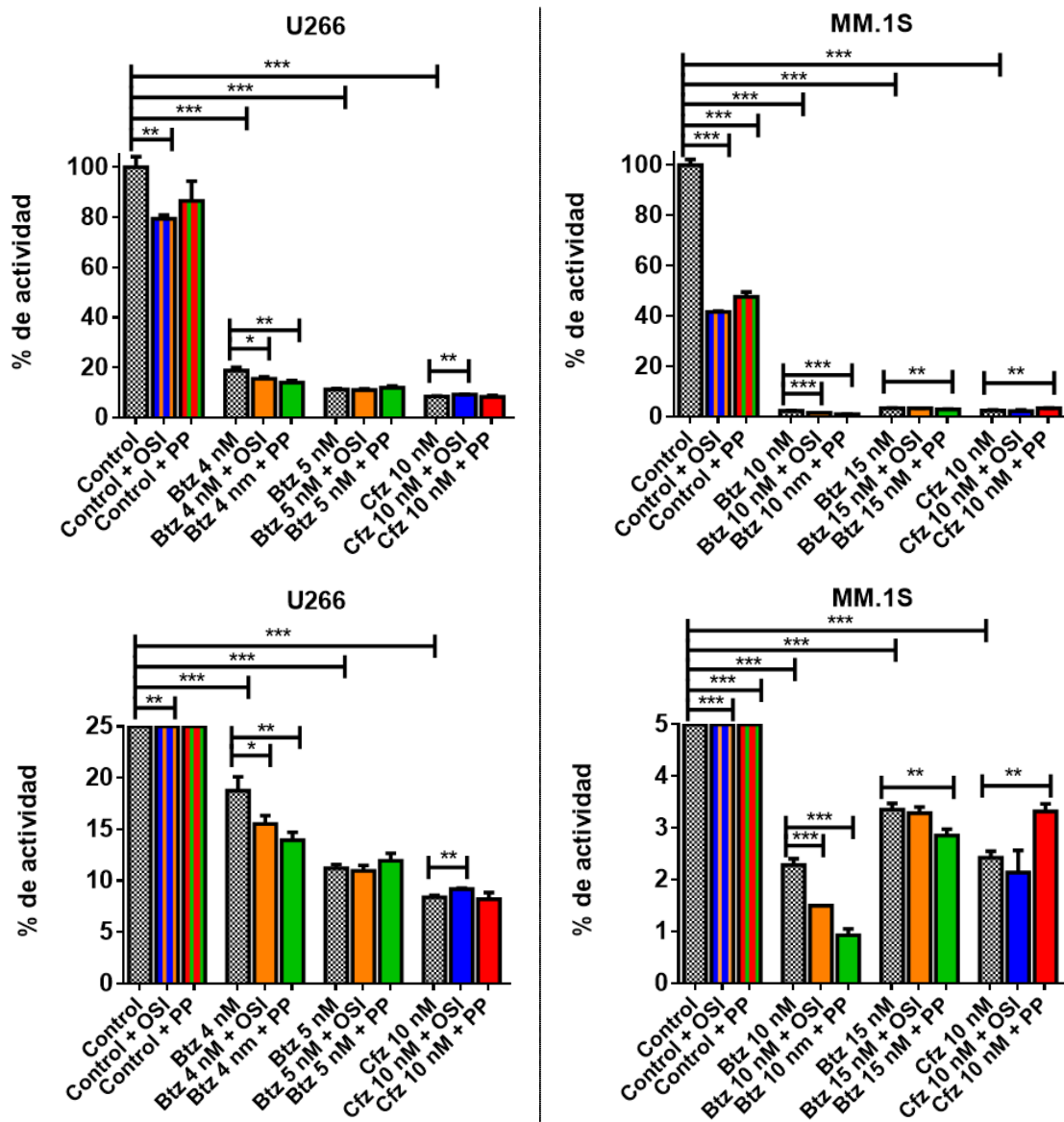


Figura 15. Niveles de actividad del proteasoma 20S. A) Resultados globales. B) Ampliación del rango inferior del eje Y para que se aprecien mejor las diferencias en las células tratadas con los dos inhibidores. En placas de 6 pocillos se sembraron  $10^6$  células de MM en 2,5 ml de medio completo por pocillo, y 10  $\mu$ g del lisado celular obtenido se utilizaron para determinar la actividad quimotripsina del proteasoma mediante un ensayo fluorimétrico, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos para las células control, cultivadas en ausencia de inhibidores, se establecieron como el 100%. Los resultados están agrupados según la combinación y la concentración de inhibidor de proteasoma ensayada. Bortezomib (Btz), carfilzomib (Cfz), PP-242 (PP), OSI-027 (OSI). En la representación gráfica, para los datos del efecto de la combinación de los inhibidores se ha utilizado el mismo código de colores que en los análisis del potencial mitocondrial: rojo carfilzomib y PP-242, azul carfilzomib y OSI-027, verde bortezomib y PP-242, naranja bortezomib y OSI-027, y el cuadrícula blanco y negro para los inhibidores del proteasoma por separado. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD de tres repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .



Por un lado se comprobó que, a las dosis empleadas, el carfilzomib y el bortezomib están inhibiendo con gran eficacia la actividad de los proteasomas de las células, sobre todo en el caso de MM.1S. Más llamativo es el hallazgo de que los inhibidores de mTOR también inhiben la actividad del proteasoma, hecho que se puede apreciar tanto en las células incubadas solo con inhibidores de mTOR, como en las células incubadas con inhibidores del proteasoma y de mTOR.

Es sobre todo destacable el caso de las células MM.1S en las que los inhibidores de mTOR reducen la actividad de los proteasomas a aproximadamente la mitad. A este efecto, encontrado tanto con OSI-027 como con PP-242, podría deberse el aumento de apoptosis que se observa en las células incubadas 48 h solo con los inhibidores de mTOR. Estos resultados contradicen por tanto la hipótesis propuesta y sugieren que la inhibición de la actividad del proteasoma producida por los inhibidores de mTOR no conlleva la inmediata inducción de apoptosis.

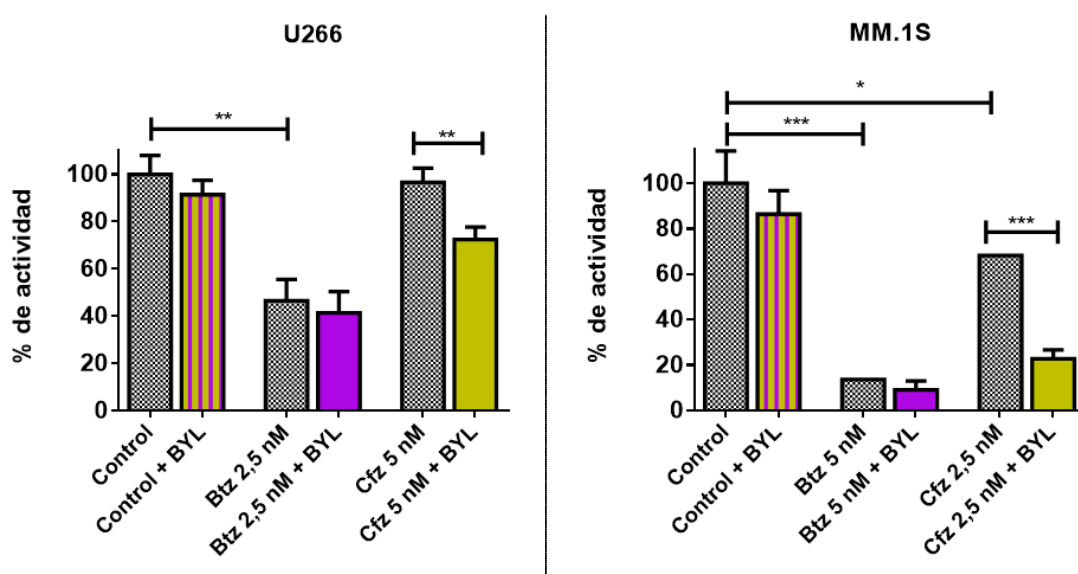


Figura 16. Niveles de actividad del proteasoma 20S. En placas de 6 pocillos se sembraron  $10^6$  células de MM en 2,5 ml de medio completo por pocillo, y 10  $\mu$ g del lisado celular obtenido se utilizaron para determinar la actividad quimotripsina del proteasoma mediante un ensayo fluorimétrico, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos para las células control, cultivadas en ausencia de inhibidores, se establecieron como el 100%. Los resultados están agrupados según la combinación y la concentración de inhibidor de proteasoma ensayada. Bortezomib (Btz), carfilzomib (Cfz), BYL-719 (BYL). En la representación gráfica, para los datos del efecto de la combinación de los inhibidores se ha utilizado el mismo código de colores que en los análisis del potencial mitocondrial: verde pistacho Carfilzomib y BYL-719, morado Bortezomib y BYL-719, y el cuadriculado blanco y negro para los inhibidores del proteasoma por separado. Los resultados se han representado como las medias  $\pm$  SD de tres repeticiones. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

De forma complementaria, se analizó también la actividad de los proteasomas en las células de MM incubadas con el inhibidor de PI3K $\alpha$  BYL-719. En este caso, como se indica en la *Figura 16*, las células tratadas sólo con BYL-719 no ven inhibida de forma significativa la actividad del proteasoma, aunque la actividad inhibidora de carfilzomib parece potenciarse en presencia de BYL-719.

Analizando el conjunto de resultados obtenidos con ambos kits (cuantificación de los niveles de proteasoma y actividad enzimática), no se ha observado aumento de los niveles de proteasoma ni de su actividad, antes al contrario. En este sentido, en un estudio reciente se ha descrito la inhibición de la actividad quimotripsina del proteasoma en células U266 y MM.1S tratadas durante 24 h con un inhibidor dual de PI3K y mTOR [33]. En dicho estudio se encontró que la inhibición del proteasoma no era catalítica, sino que se producía una regulación negativa de la expresión de las subunidades del proteasoma 19S, necesarias para el correcto ensamblaje y funcionamiento del proteasoma 26S [33].

Para estudiar si la inhibición observada por el efecto de los inhibidores de mTOR utilizados ocurría sólo a nivel de las subunidades reguladoras, o si afectaban también a los niveles de las subunidades catalíticas, se decidió analizar la expresión de estas últimas mediante *Western blotting*.

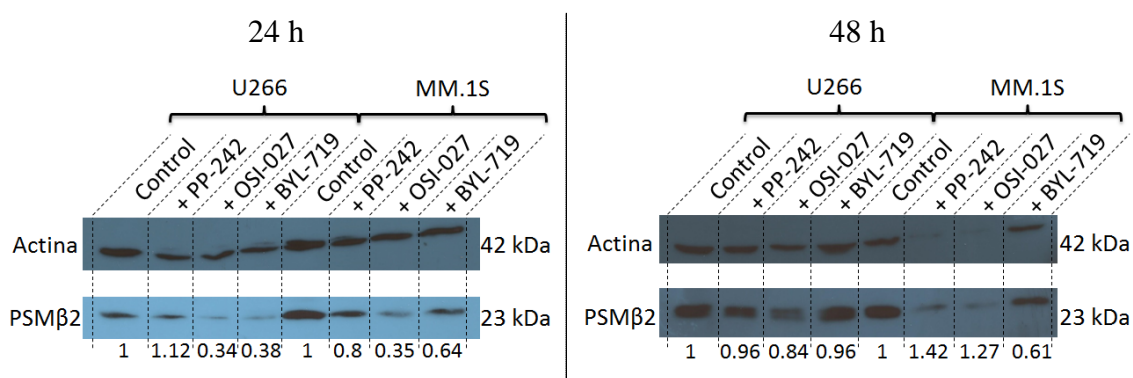
#### **4.5. Análisis de la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma**

Los niveles de las tres principales subunidades catalíticas del proteasoma 20S,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5, se analizaron por *Western blotting*, tras 24 y 48 h de incubación con los inhibidores. En el estudio citado anteriormente solo se analizó la expresión génica de los componentes del proteasoma a las 6 y 12 h de incubación con un inhibidor dual de PI3K y mTOR [33].

En primer lugar, aunque se probaron distintas concentraciones de anticuerpo y distintos tiempos de incubación, no se consiguió obtener resultados significativos en el análisis por *Western blotting* de la subunidad  $\beta$ 1, con la cantidad de células utilizadas. En cambio sí se pudieron analizar las subunidades  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5. Los anticuerpos y las concentraciones/diluciones a las que se utilizaron para estos experimentos se encuentran detallados en la *Tabla A3* del *Anexo*.

Respecto a la subunidad  $\beta 2$ , se observó que a las 24 h de incubación con PP-242, sus niveles tanto en U266 como en MM.1S se mantienen muy parecidos a los del control (mínimo aumento en U266 y ligero descenso en MM.1S, *Figura 17*). En cambio, las células tratadas con OSI-027 o con BYL-719 vieron reducidos considerablemente sus niveles prácticamente a un tercio del control en el caso de U266. En MM.1S, OSI-027 produce el mismo descenso que en U266, mientras que BYL-719 no tiene un efecto tan pronunciado (reducción a dos tercios del control).

Al analizar las células U266 incubadas 48 h (*Figura 17*), con PP-242 se observaron niveles muy similares a los del control. Además se observó que en el caso de los otros inhibidores utilizados se recuperaban los niveles de la subunidad  $\beta 2$ , de manera que casi igualaban a los del control. Esto podría tratarse de un efecto compensatorio. Dicho efecto también se observaba en las células MM.1S tratadas con PP-242 y OSI-027, en las que los niveles de la subunidad incluso sobrepasaban ligeramente a los del control. En el caso de las MM.1S tratadas con BYL-719 apenas se produjeron cambios con respecto a las 24 h.



*Figura 17. Ensayo de WB de la subunidad  $\beta 2$  en las líneas U266 y MM.1S incubadas durante 24 y 48 h con los inhibidores de mTOR (PP-242 y OSI-027) y PI3K $\alpha$  (BYL-719), en los tres casos a una concentración 1  $\mu$ M. Se cargaron en cada pocillo del gel de electroforesis 5·10<sup>5</sup> células totales. La intensidad de las bandas de proteínas se cuantificó por densitometría, y se normalizaron respecto a la banda de actina, según se muestra en la parte inferior de cada carril.*

En cuanto a la subunidad  $\beta 5$ , el efecto producido en las U266 a las 24 h es parecido al que se observó para la subunidad  $\beta 2$ . Primero, las células tratadas con PP-242 ven aumentados los niveles de la subunidad con respecto al control, aunque en este caso de manera más marcada. Segundo, las células tratadas con OSI-027 o BYL-719, ven reducidos los niveles de la subunidad  $\beta 5$  respecto al control, aunque en este caso es una disminución mucho menor. Por el contrario, en MM.1S el efecto

producido a las 24 h es diferente que en el caso de la subunidad  $\beta 2$  ya que con los tres inhibidores aumentan levemente los niveles de  $\beta 5$  respecto al control.

A las 48 h, las células U266 tratadas con PP-242 se comportan de nuevo de forma similar en relación a la subunidad  $\beta 5$  que en relación a la  $\beta 2$ , ya que después del incremento inicial a las 24 h, sus niveles descienden para equipararse al control. En el caso de las U266 tratadas con OSI-027 o BYL-719 durante 48 h se incrementan los niveles de la subunidad  $\beta 5$  a modo de compensación, pero de una manera mucho mayor que la vista en el caso de la subunidad  $\beta 2$  (llegando a duplicar los niveles del control).

Con respecto a las MM.1S no se pudieron determinar los niveles de la subunidad  $\beta 5$  en las combinaciones con PP-242 y OSI-027 debido al fallo en el control de carga (actina): al igual que en el *Western blotting* de la subunidad  $\beta 2$ , disminuyó mucho la señal de actina. En cambio, en el tratamiento con BYL-719 durante 48 h se redujeron sus niveles respecto a las 24 h hasta los dos tercios del nivel del control, al igual que se observó en el caso de  $\beta 2$ .

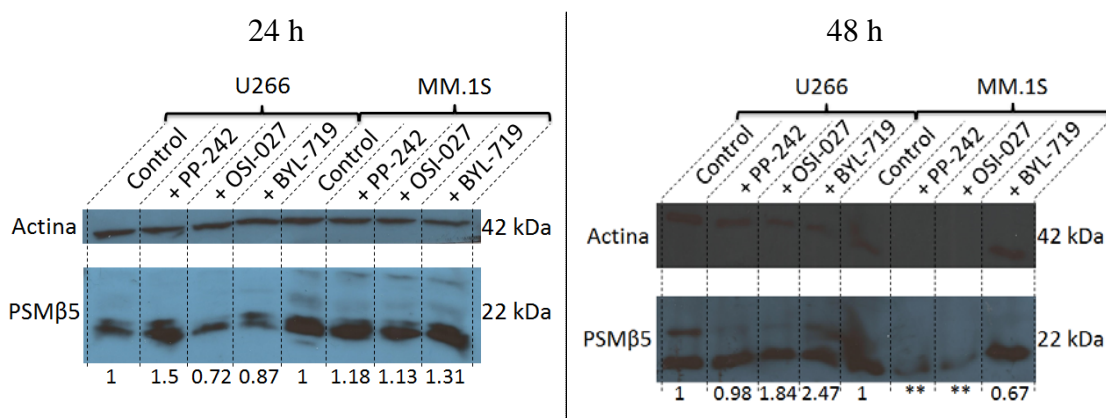


Figura 18. Ensayo de WB de la subunidad  $\beta 5$  en las líneas U266 y MM.1S incubadas durante 24 y 48 h con los inhibidores de mTOR (PP-242 y OSI-027) y PI3K (BYL-719), en los tres casos a una concentración 1  $\mu$ M. Se cargaron en cada pocillo del gel de electroforesis  $5 \cdot 10^5$  células totales. La intensidad de las bandas de proteínas se cuantificó por densitometría, y se normalizaron respecto a la banda de actina, según se muestra en la parte inferior de cada carril.

De manera paradójica, aunque PP-242 y OSI-027 produzcan a las 48 h un aumento en la cantidad de las subunidades catalíticas incluso por encima de los niveles del control, esto no evitaría la muerte de las células tras 48 h de incubación tal y como se ha visto en los resultados de medida de la apoptosis (determinación de  $\Delta\Psi_m$  por citometría de flujo) en los experimentos de combinación de inhibidores del proteasoma y de mTOR sobre la viabilidad celular.

#### 4.6. Análisis de los niveles de expresión de la proteína Noxa

El conjunto de resultados obtenidos indica que al inhibir mTOR no parece que se produzca un aumento de los niveles o de la actividad del proteasoma. En realidad, los datos indican que tanto PP-242 como OSI-027 inhiben la actividad del proteasoma. Sin embargo, esta inhibición no parece inducir apoptosis sino que reduce la apoptosis inducida por los inhibidores “profesionales” del proteasoma bortezomib y carfilzomib.

En un reciente artículo [33], encontraron que un inhibidor dual de PI3K y mTOR (PI-103) se comportaba como un inhibidor alostérico, no catalítico, del proteasoma. Nuestros resultados sugieren que este podría ser también nuestro caso y que la inhibición del proteasoma causada por los inhibidores de mTOR no sería capaz de inducir apoptosis e incluso atenuaría la señal apoptótica generada por los inhibidores “profesionales”, bortezomib y carfilzomib.

Teniendo en cuenta lo anterior y sabiendo que la apoptosis producida por los inhibidores del proteasoma produce un rápido aumento en los niveles de Noxa [43]–[45], los inhibidores de mTOR deberían atenuar el aumento en dichos niveles.

Por ello, se determinaron los niveles de Noxa por citometría de flujo, en las distintas combinaciones de inhibidores anteriormente ensayadas, utilizando un anticuerpo específico anti-Noxa. Se escogieron algunas de las concentraciones de carfilzomib y bortezomib ya ensayadas, y para los inhibidores de mTOR y PI3K se mantuvo la concentración de 1  $\mu$ M. Los datos y diluciones empleadas de los anticuerpos se encuentran detallados en la *Tabla A1* del *Anexo*.

Para el estudio con U266 la concentración elegida de carfilzomib fue 5 nM, y la de bortezomib 2,5 nM. En los resultados, recogidos en la *Figura 19*, se observó en el control que estas células tienen niveles muy bajos de Noxa. La incubación con los inhibidores de mTOR aumentó levemente la cantidad de células con señal positiva de Noxa, mientras que la incubación con el inhibidor de PI3K la aumentó considerablemente, aunque sin afectar a la viabilidad celular, ya que permanece similar a la de los controles.

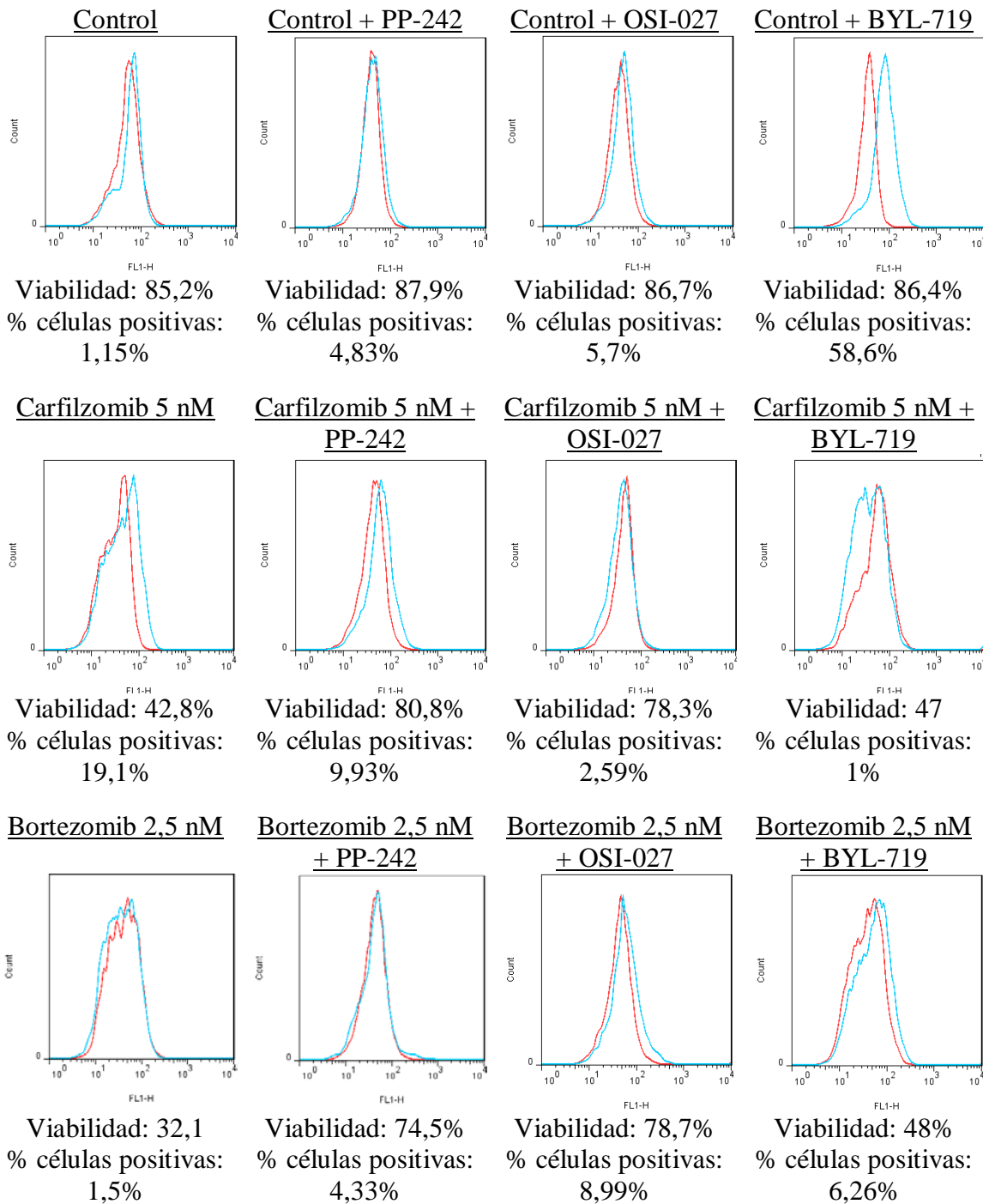
**Noxa (U266)**

Figura 19. Análisis de Noxa mediante citometría de flujo en U266. Las células se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se consideró como señal positiva de Noxa aquella que no solapara con más de un 2% de la señal del control de isotipo. En rojo se ha representado el control de isotipo, y en azul la señal de Noxa. Se ha representado el resultado más destacado de cada duplicado. La viabilidad celular se determinó mediante marcaje con TMRE.

Al utilizar Carfilzomib, las células tratadas sólo con este inhibidor ven reducida su viabilidad a la mitad a la vez que aumenta la expresión de la proteína pro-apoptótica Noxa. Si se combina con los inhibidores de mTOR, la viabilidad se mantiene similar a la de los controles, sólo decae ligeramente, y los niveles de Noxa son menores a los observados en las células tratadas únicamente con carfilzomib, de acuerdo con lo expuesto anteriormente.

Aunque el bortezomib produjo la muerte de más de la mitad de las células incubadas con él, apenas hubo células positivas para Noxa. En combinación con los inhibidores de mTOR, la viabilidad se conserva en gran medida con respecto a los controles y los niveles de Noxa son similares también a los de los controles. A pesar de producir menos muerte celular, la cantidad de células positivas para Noxa resulta ser mayor en las combinaciones entre inhibidores de mTOR y bortezomib que en las células tratadas sólo con bortezomib.

La combinación de bortezomib con BYL-719 genera también una muerte celular que se aproxima a la de bortezomib solo. Los niveles de Noxa son mayores que cuando las células fueron tratadas sólo con bortezomib, y similares a los de las combinaciones con inhibidores de mTOR. Sin embargo siguen pareciendo muy bajos teniendo en cuenta la gran mortalidad producida y el incremento de Noxa observado en el control tratado con BYL-719.

Como ya se ha comentado, los resultados obtenidos con bortezomib no son equivalentes a los conseguidos con carfilzomib. Esto es debido probablemente a una cinética de inducción de muerte más rápida en el caso del bortezomib.

En un experimento previo del mismo tipo realizado al doble de concentración de los inhibidores del proteasoma el efecto observado en U266 fue en gran medida similar al mostrado en la *Figura 19*. Los resultados a los que se hace referencia se pueden encontrar en la *Figura A1* del *Anexo*. En concreto los controles reaccionaron igual, presentando el control absoluto niveles muy bajos de Noxa, los controles con PP-242 y OSI-027 niveles algo mayores, y el control con BYL-719 niveles mucho mayores, en ningún caso resintiéndose la viabilidad celular. También se produjo aumento de Noxa al tratar sólo con carfilzomib, mientras que sólo con bortezomib los niveles se mantuvieron semejantes al control absoluto.

Los niveles de Noxa fueron inferiores en las células tratadas con combinaciones de carfilzomib y bortezomib con OSI-027 respecto a las células tratadas sólo con los inhibidores del proteasoma. En el caso de PP-242, la situación con bortezomib fue similar. Tanto en el caso de la combinación con OSI-027 como el de con PP-242 los resultados estuvieron acompañados además de una mejor viabilidad celular.

De manera simultánea al último experimento comentado, también se determinaron los niveles de Noxa en MM.1S, recogidos en la *Figura 20*. A diferencia de U266, en esta línea celular la cantidad basal es bastante mayor, llegando a un tercio de la población del control sin inhibidores. En este caso la incubación con los inhibidores de mTOR redujo la cantidad de células con señal positiva de Noxa,

En cuanto a los inhibidores del proteasoma, las células incubadas únicamente con Carfilzomib o Bortezomib tienen menores niveles de Noxa que el control a pesar de tener una viabilidad muy muy baja. Al combinar PP-242 y OSI-027 con los inhibidores del proteasoma hay más viabilidad. Aun así sus niveles de Noxa son mayores que los de los controles con PP-242 y OSI-027. Además, en el caso de las combinaciones con PP-242, sus niveles de Noxa son algo menores que los de las células tratadas sólo con los inhibidores del proteasoma, lo cual junto a la mayor viabilidad estaría de acuerdo con la nueva hipótesis planteada en este trabajo. Sin embargo, en el caso de las combinaciones con OSI-027, sus niveles de Noxa son mayores que los de las células tratadas sólo con los inhibidores del proteasoma, por lo que se deberían hacer análisis más detallados, probablemente de tipo cinético, para poder aclarar esta cuestión.

Por su parte, las combinaciones de los inhibidores del proteasoma con BYL-719 produjeron efectos similares a los observados en U266, con una gran mortalidad celular próxima a la producida por los inhibidores del proteasoma por sí solos y con niveles muy bajos de Noxa.

Una posible explicación alternativa a las discrepancias observadas podría ser que en el momento de realizar los análisis quedan tan pocas células MM.1S viables que ya no se puede apreciar el presunto incremento de Noxa. Al tratar las células únicamente con carfilzomib o bortezomib presentan mayores niveles de Noxa que U266, pero aun así la cantidad es menor que en el control de MM.1S.



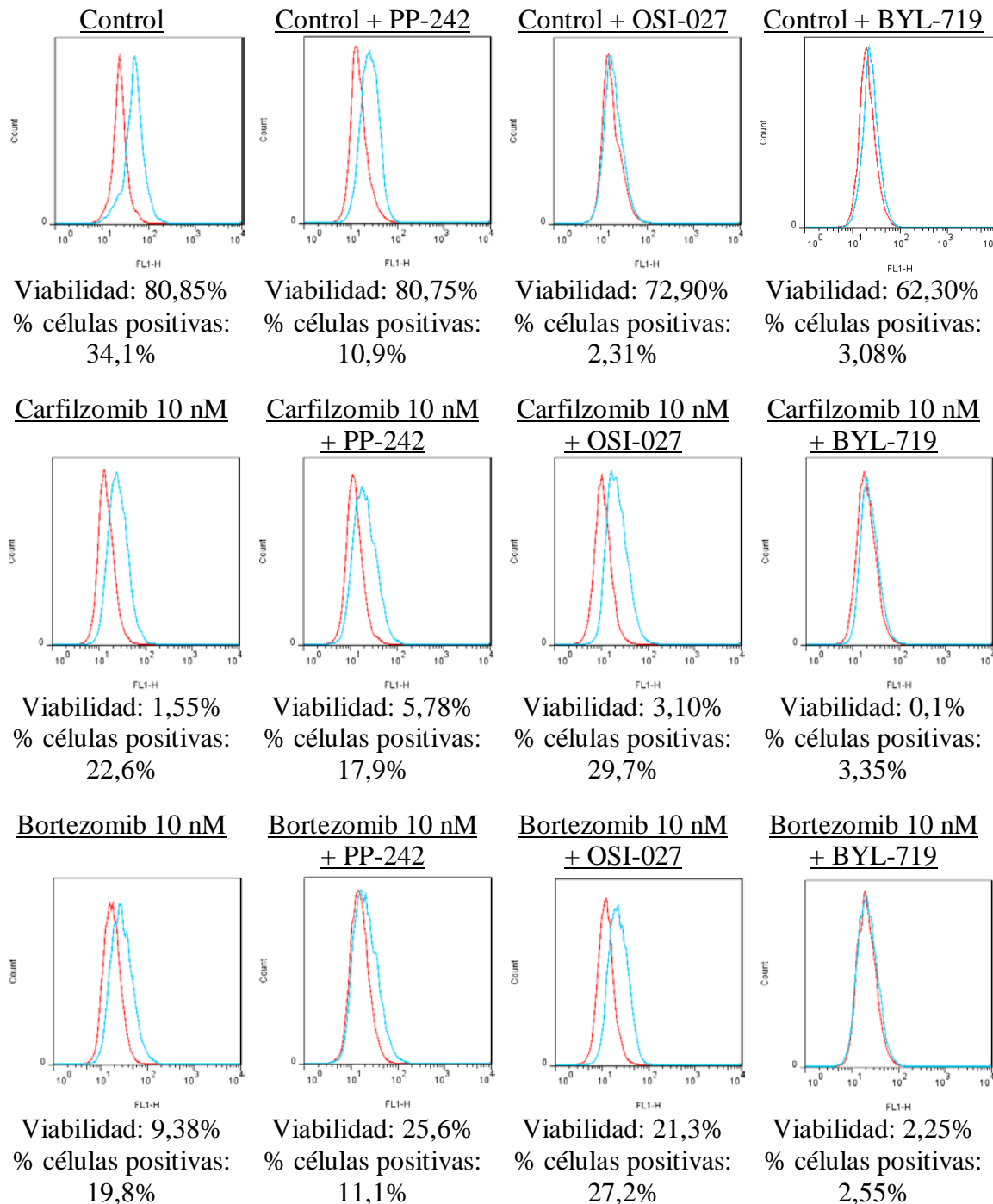
**Noxa (MM.1S)**

Figura 20. Análisis de Noxa mediante citometría de flujo en MM.1S. Las células se sembraron e incubaron según lo descrito en materiales y métodos ( $3 \cdot 10^5$  células/ml, en placas de 48 pocillos). Se consideró como señal positiva de Noxa aquella que no solapara con más de un 2% de la señal del control de isotipo. En rojo se ha representado el control de isotipo, y en azul la señal de Noxa. En este caso no hubo duplicados. La viabilidad celular se determinó mediante marcaje con TMRE.

## 5. Conclusiones

Las principales conclusiones que se han alcanzado en este trabajo han sido:

- Primera: La disminución de la apoptosis inducida por inhibidores del proteasoma en células de MM al combinarlos con inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR depende de la señalización de mTOR y no de la de PI3K $\alpha$ .
- Segunda: El tratamiento con los inhibidores de mTOR no aumenta significativamente los niveles de proteasomas en las células de MM ni su actividad tipo quimotripsina.
- Tercera: El tratamiento con los inhibidores de mTOR inhibe los proteasomas probablemente de forma no catalítica y sin inducir apoptosis en las células de MM.
- Cuarta: La inhibición de la apoptosis inducida por inhibidores del proteasoma en células de MM al combinar con inhibidores de mTOR podría deberse a un menor aumento de los niveles de la proteína proapoptótica Noxa.

## 6. Conclusions

The achieved conclusions of this project are:

- First: The reduced efficiency of combined treatments with proteasome and mTOR inhibitors in MM is due to mTOR signalling and not to PI3K $\alpha$  signalling.
- Second: mTOR inhibitors do not increase the proteasome amount or their chymotrypsin-like activity in MM.
- Third: mTOR inhibitors inhibit proteasome probably on a non-catalytic, not inducing apoptosis way in MM.
- Fourth: The reduced efficiency observed of combined treatments with proteasome and mTOR inhibitors in MM seems to be due to decreased up-regulation of proapoptotic protein Noxa.

## 6. Bibliografía

- [1] H. G. Drexler and R. A. F. MacLeod, "Malignant hematopoietic cell lines: In vitro models for the study of plasmacytoid dendritic cell leukemia," *Leuk. Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 1166–1169, Sep. 2009.
- [2] R. Catlett-Falcone *et al.*, "Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells," *Immunity*, vol. 10, no. 1, pp. 105–115, Jan. 1999.
- [3] R. Fonseca *et al.*, "International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review," *Leukemia*, vol. 23, no. 12, pp. 2210–2221, Dec. 2009.
- [4] B. Catalgol, "Proteasome and Cancer," in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 1st ed., vol. 109, Elsevier Inc., 2012, pp. 277–293.
- [5] N. W. C. J. van de Donk, T. Mutis, P. J. Poddighe, H. M. Lokhorst, and S. Zweegman, "Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, pp. 110–122, May 2016.
- [6] C. Röllig, S. Knop, and M. Bornhäuser, "Multiple myeloma," *Lancet*, vol. 385, no. 9983, pp. 2197–2208, May 2015.
- [7] S. Greenstein *et al.*, "Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines," *Exp. Hematol.*, vol. 31, no. 4, pp. 271–282, Apr. 2003.
- [8] G. Schwab, C. B. Siegall, L. Aarden, L. M. Neckers, and R. P. Nordan, "Characterization of an interleukin-6-mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266.," *Blood*, vol. 77, no. 3, pp. 587–93, Feb. 1991.
- [9] M. Pettersson *et al.*, "Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells.," *Blood*, vol. 79, no. 2, pp. 495–502, Jan. 1992.
- [10] N. López-Royuela, P. Balsas, P. Galán-Malo, A. Anel, I. Marzo, and J. Naval, "Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, no. 2, pp. 311–322, Feb. 2010.
- [11] H. Quach *et al.*, "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 24, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2010.
- [12] P. Wu and Y.-Z. Hu, "PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 35, pp. 4326–41, 2010.
- [13] C. Fritsch *et al.*, "Characterization of the Novel and Specific PI3K Inhibitor NVP-BYL719 and Development of the Patient Stratification Strategy for Clinical Trials," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 1117–1129, May 2014.
- [14] P. Furet *et al.*, "Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective

- phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 13, pp. 3741–3748, Jul. 2013.
- [15] S. V Bhagwat *et al.*, “Preclinical Characterization of OSI-027, a Potent and Selective Inhibitor of mTORC1 and mTORC2: Distinct from Rapamycin,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 8, pp. 1394–1406, Aug. 2011.
- [16] N. Chen and V. Karantza-Wadsworth, “Role and regulation of autophagy in cancer,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1793, no. 9, pp. 1516–1523, Sep. 2009.
- [17] J. Rodon, “Distinctive features of the main classes :”
- [18] M. E. Feldman *et al.*, “Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 2, p. e1000038, Feb. 2009.
- [19] a V Sorokin, E. R. Kim, and L. P. Ovchinnikov, “Proteasome system of protein degradation and processing,” *Biochem.*, vol. 74, no. 13, pp. 1411–1442, Dec. 2009.
- [20] C. Enenkel, “Proteasome dynamics,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 1, pp. 39–46, Jan. 2014.
- [21] A. M. Pickering, A. L. Koop, C. Y. Teoh, G. Ermak, T. Grune, and K. J. A. Davies, “The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes,” *Biochem. J.*, vol. 432, no. 3, pp. 585–595, Dec. 2010.
- [22] I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni, and A. Ciechanover, “The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death,” *Cell Res.*, vol. 26, no. 8, pp. 869–885, Aug. 2016.
- [23] Z. C. Gu and C. Enenkel, “Proteasome assembly,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 24, pp. 4729–4745, Dec. 2014.
- [24] B. Cvek, “Proteasome Inhibitors,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 1st ed., vol. 109, Elsevier Inc., 2012, pp. 161–226.
- [25] L. Borissenko and M. Groll, “20S Proteasome and Its Inhibitors: Crystallographic Knowledge for Drug Development,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 3, pp. 687–717, Mar. 2007.
- [26] J. Park *et al.*, “Establishment and characterization of bortezomib-resistant U266 cell line: Constitutive activation of NF- $\kappa$ B-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis,” *BMB Rep.*, vol. 47, no. 5, pp. 274–279, May 2014.
- [27] P. Balsas, P. Galán-Malo, I. Marzo, and J. Naval, “Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM $\beta$ 5 overexpression and polyploidy,” *Leuk. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 212–8, Feb. 2012.
- [28] M. Schmidt and D. Finley, “Regulation of proteasome activity in health and

- disease,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2014.
- [29] A. Chakrabarti, A. W. Chen, and J. D. Varner, “A review of the mammalian unfolded protein response,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 12, pp. 2777–2793, Dec. 2011.
- [30] D. M. Benbrook and A. Long, “Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis,” *Exp. Oncol.*, vol. 34, no. 3, pp. 286–97, Oct. 2012.
- [31] R. L. Macintosh and K. M. Ryan, “Autophagy in tumour cell death,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 344–351, Oct. 2013.
- [32] V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, and N. Tavernarakis, “Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 12, pp. 3448–3459, Dec. 2013.
- [33] L. I. Aronson, E. L. Davenport, F. Mirabella, G. J. Morgan, and F. E. Davies, “Understanding the interplay between the proteasome pathway and autophagy in response to dual PI3K/mTOR inhibition in myeloma cells is essential for their effective clinical application,” *Leukemia*, vol. 27, no. 12, pp. 2397–2403, Dec. 2013.
- [34] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics,” *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–57, Aug. 1972.
- [35] L. Portt, G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood, and M. T. Greenwood, “Anti-apoptosis and cell survival: A review,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 1, pp. 238–259, 2011.
- [36] S. Cory and J. M. Adams, “The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 647–656, 2002.
- [37] V. Jarauta Azcona, “Interrelaciones entre apoptosis y autofagia. Aplicación al tratamiento de células de mieloma con el inhibidor del proteasoma carfilzomib,” Universidad de Zaragoza, 2015.
- [38] L. Chantranupong and D. M. Sabatini, “Cell biology: The TORC1 pathway to protein destruction,” *Nature*, vol. 536, no. 7615, pp. 155–156, Jul. 2016.
- [39] A. Rousseau and A. Bertolotti, “An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis,” *Nature*, vol. 536, no. 7615, pp. 184–189, Jul. 2016.
- [40] K. Nilsson, H. Bennich, S. G. Johansson, and J. Pontén, “Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 7, no. 4, pp. 477–89, Oct. 1970.
- [41] N. Zamzami *et al.*, “Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo,” *J. Exp. Med.*, vol. 181, no. 5, pp. 1661–72, May 1995.

- [42] S. Jayaraman, “Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethylester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (,” *J. Immunol. Methods*, vol. 306, no. 1–2, pp. 68–79, Nov. 2005.
- [43] P. Gomez-Bougie *et al.*, “Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma.,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 11, pp. 5418–24, Jun. 2007.
- [44] V. Jarauta *et al.*, “Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo.,” *Cancer Lett.*, vol. 382, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2016.
- [45] P. Pérez-Galán, G. Roué, N. Villamor, E. Montserrat, E. Campo, and D. Colomer, “The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status.,” *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 257–64, Jan. 2006.

**Anexo**

<b>Anticuerpos empleados en el marcaje intracelular de proteínas</b>			
<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Tipo, especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Anti-Noxa</b>	Monoclonal, Ratón	1/1000	Abcam
<b>Control de isotipo IgG: IgG1 de ratón</b>	Monoclonal, Ratón	1/100	Invitrogen
<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Tipo, especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Anti-IgG1 de ratón conjugado a Alexa 488</b>	Policlonal, Cabra	1/100	Molecular Probe

*Tabla A1. Descripción de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el marcaje intracelular de la proteína Noxa, para su posterior análisis mediante citometría de flujo. La dilución hace referencia al anticuerpo una vez añadido sobre los 100 µl de PBS.*

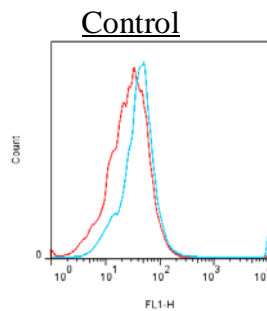
<b>Anticuerpos utilizados en el ELISA</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>Tipo, especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Diluyente</b>
<b>Anti-subunidad <math>\alpha 6</math> del proteasoma 20S</b>	Monoclonal, Ratón	1/500	Tampón de Unión
<b>Anti-proteasoma 20S</b>	Policlonal, Conejo	1/1000	Tampón ELISA
<b>Anti-IgG de conejo conjugado a HRP</b>	Policlonal, Cabra	1/100	Tampón ELISA
<b>Composición de los tampones empleados como diluyentes</b>			
<b>Tampón de Unión</b>	PBS		
<b>Tampón ELISA</b>	Solución salina tamponada con Tris, albúmina de suero bovino y detergentes		

*Tabla A2. Descripción de los anticuerpos y componentes no detallados en la sección correspondiente del kit utilizado para realizar el ELISA.*

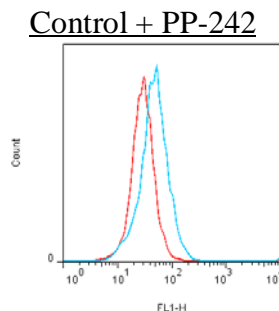
<b>Anticuerpos empleados en los <i>Western blotting</i></b>			
<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Tipo, especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Anti-subunidad <math>\beta 1</math> del proteasoma 20S</b>	Monoclonal, Ratón	1/1000 y 1/500	Enzo
<b>Anti-subunidad <math>\beta 2</math> del proteasoma 20S</b>	Monoclonal, Ratón	1/1500	Enzo
<b>Anti-subunidad <math>\beta 5</math> del proteasoma 20S</b>	Policlonal, Conejo	1/1000	Biomol
<b>Anti-actina</b>	Monoclonal, Ratón	1/10000	Sigma
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Tipo, especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
<b>anti-IgG de conejo conjugado a HRP</b>	Monoclonal, Ratón	1/20000	Sigma
<b>Anti-IgG de ratón conjugado a HRP</b>	Monoclonal, Conejo	1/20000	Sigma

Tabla A3. Descripción de los anticuerpos utilizados en los *Western blotting*.

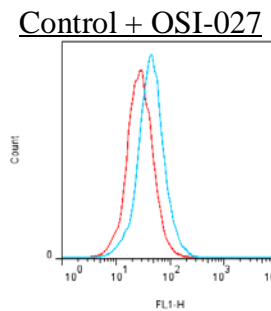


**Noxa (U266)**

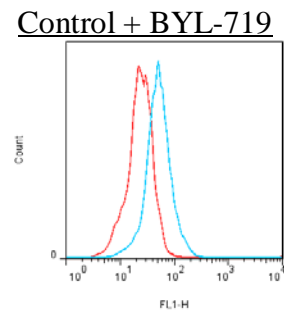
Viabilidad: 78,95%  
% células positivas: 3,92%



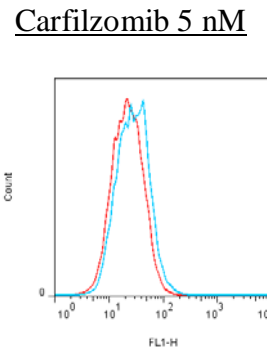
Viabilidad: 82,85%  
% células positivas: 17,1%



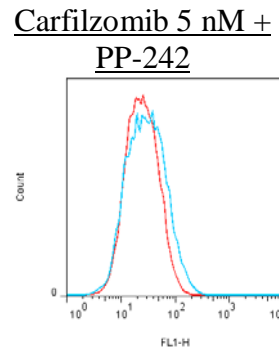
Viabilidad: 82%  
% células positivas: 9,53%



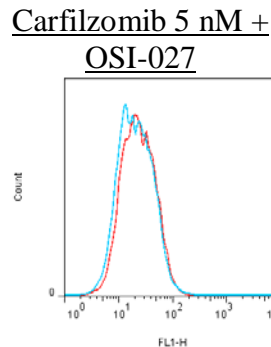
Viabilidad: 77,75%  
% células positivas: 33,4%



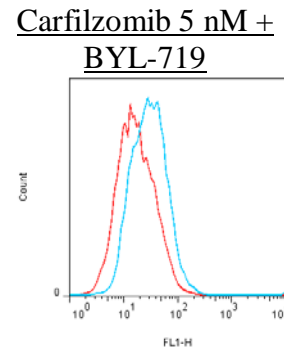
Viabilidad: 4,95%  
% células positivas: 4,72%



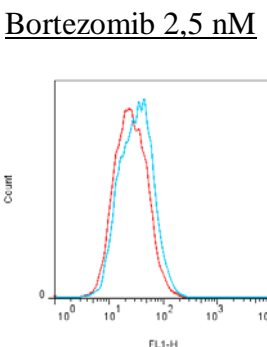
Viabilidad: 22%  
% células positivas: 7,31%



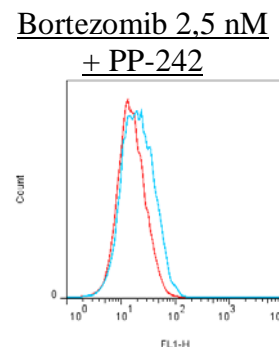
Viabilidad: 21,35%  
% células positivas: 1,64%



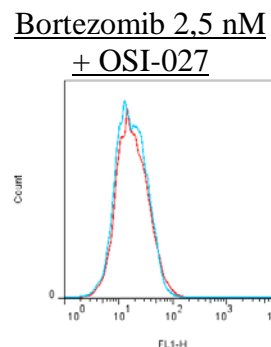
Viabilidad: 6,97%  
% células positivas: 6,47%



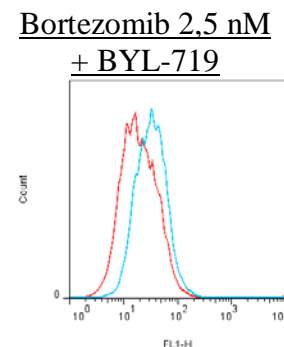
Viabilidad: 2,28%  
% células positivas: 3,98%



Viabilidad: 14,85%  
% células positivas: 8,14%



Viabilidad: 13,55%  
% células positivas: 1%



Viabilidad: 3,75%  
% células positivas: 5%

*Figura A1. Análisis de Noxa mediante citometría de flujo en U266. Se consideró como señal positiva de Noxa aquella que no solapara con más de un 2% de la señal del control de isotipo. En rojo se ha representado el control de isotipo, y en azul la señal de Noxa. En este experimento no hubo duplicados. La viabilidad celular se determinó mediante marcaje con TMRE.*