



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Generación de una línea transfectante de mieloma múltiple humano que sobreexpresa la proteína anti-apoptótica Mcl-1

Generation of a human multiple myeloma transfectant line that overexpresses the anti-apoptotic protein Mcl-1

Autor:

Manuel Ene Ordorica

Directores:

Isabel Marzo Rubio

José Javier Naval Iraberri

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

2018/2019



Universidad
Zaragoza

Dra. Isabel Marzo Rubio, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Dr. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Generación de una línea transfectante de mieloma múltiple humano que sobreexpresa la proteína anti-apoptótica Mcl-1” ha sido realizado por Manuel Ene Ordorica en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado (TFG) y que cumple los objetivos recogidos en las directrices del TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Junio 2019

Fdo: Isabel Marzo Rubio

Fdo: José Javier Naval Iraberri

ÍNDICE

0. RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. MIELOMA MÚLTIPLE	2
1.1.1. TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....	2
1.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS	3
1.2.1. VÍAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.....	4
1.3. FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS BCL-2	5
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. CULTIVOS CELULARES	7
3.2 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	8
3.2.1. VECTORES EMPLEADOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE LA LÍNEA RPMI 8226.....	8
3.2.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	9
3.2.3. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS TRANSFORMADAS.....	9
3.2.4. ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.....	10
3.3. TRANSFECCIÓN RETROVIRAL DE LA LÍNEA RPMI 8226	10
3.3.1. GENERACIÓN DE SOBRENADANTES RETROVIRALES.....	10
3.3.2. INFECCIÓN DE CÉLULAS RPMI 8226 CON SOBRENADANTES RETROVIRALES.....	11
3.4. TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE LA LÍNEA RPMI 8226	12
3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 MEDIANTE WESTERN-BLOT	13
3.5.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LISADOS CELULARES.....	13
3.5.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS EXTRACTOS CELULARES.....	13

3.5.3. SEPARACIÓN DE PROTÉINAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF...	14
3.5.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 POR WESTERN-BLOT Y FORMACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS.....	15
3.6. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DINACICLIB MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. COMPROBACIÓN DE VECTORES EN GELES DE AGAROSA.....	16
4.2. TRANSFECCIÓN RETROVIRAL.....	17
4.3. TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN.....	19
4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 MEDIANTE WESTERN-BLOT.....	20
4.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MCL-1 FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON DINACICLIB.....	21
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	23

ANEXOS

0. RESUMEN

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer hematológico caracterizado por la proliferación maligna y acumulación de células B plasmáticas en la médula ósea. Aunque las nuevas terapias han mejorado de manera significativa la tasa de supervivencia de los pacientes, el mieloma múltiple sigue siendo una enfermedad incurable.

Mcl-1 es una proteína multidominio antiapoptótica de la familia de las proteínas Bcl-2 que se encuentra frecuentemente sobreexpresada en múltiples tumores, incluyendo el mieloma múltiple. Por esto, Mcl-1 podría ser una diana terapéutica para el tratamiento del mieloma. Por otra parte, entre las nuevas estrategias terapéuticas en desarrollo se encuentran los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), las cuales juegan un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular y en otros procesos, como la transcripción. En este contexto, se ha descrito una molécula conocida como dinaciclib que actúa como inhibidor de varias Cdks. La inhibición de Cdk9 provoca una regulación negativa de la transcripción de proteínas de vida media corta, como Mcl-1, disminuyendo su expresión e induciendo apoptosis.

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha pretendido generar una línea de mieloma múltiple que sobreexpresara dicha proteína antiapoptótica. De esta manera, se podría disponer de un modelo celular de resistencia a la apoptosis *in vitro* para estudiar el efecto de posibles fármacos anti-tumorales cuya diana sea esa proteína. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la sobreexpresión de Mcl-1 disminuye los niveles de apoptosis inducidos por el dinaciclib.

ABSTRACT

Multiple myeloma is a type of haematological cancer characterized by a malignant proliferation and accumulation of B plasma cell in the bone marrow. Although new therapies have significantly improved patients' survival rate, multiple myeloma is still an incurable disease.

Mcl-1 is a multidomain antiapoptotic protein of the Bcl-2 family of proteins that is frequently overexpressed in multiple tumours, including multiple myeloma. Therefore, Mcl-1 may be a therapeutic target for myeloma treatment. Moreover, among the new therapeutic strategies under development for myeloma treatment we find cyclin-dependant kinases (Cdks) inhibitors. Cyclin-dependant kinases play an important role in the regulation of cell cycle progression and in other processes, like transcription. In this context, a new molecule known as dinaciclib, which inhibits several Cdks, has been discovered. Cdk9 inhibition causes down-regulation of short-lived proteins transcription, like Mcl-1, reducing its expression and inducing apoptosis.

In the present *Degree Thesis*, we aim to generate a multiple myeloma cell line that overexpresses this antiapoptotic protein. In this way, an apoptosis resistance cellular model would be available to study the effects of candidate drugs whose target is that protein. Our results suggest that Mcl-1 overexpression reduces apoptosis levels induced by dinaciclib.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de cáncer hematológico que se caracteriza por la proliferación maligna y acumulación de células B plasmáticas con bajo índice proliferativo en la médula ósea, a causa de una expansión clonal (1). Esta situación conduce a la aparición de citopenias, resorción ósea y la producción, en la mayoría de los casos, de una inmunoglobulina monoclonal llamada proteína M, detectable en el suero o en la orina. La presencia de esta proteína puede causar daños en órganos (principalmente en riñón) debido a su acumulación y al paso por ellos, así como causar la inducción de una respuesta autoinmune (2) (3).

El desarrollo del MM comienza con un aumento en un número limitado de clones de células B plasmáticas, dando lugar a un estado premaligno que recibe el nombre de gammapatía monoclonal benigna de significado incierto (GMSI o MGUS, por sus siglas en inglés) (4). En la progresión del estadio MGUS a MM intervienen múltiples eventos genéticos. En la patogénesis temprana suelen producirse alteraciones genéticas tales como translocaciones e hiperploidías; mientras que en los casos más avanzados se presentan deleciones en genes como p53 y alteraciones en factores de transcripción como NF- κ B (5). Es frecuente que la translocación de cromosomas produzca que determinados oncogenes, como las ciclinas D1 y D3 o los receptores de factores de crecimiento, queden bajo el control de regiones reguladoras de la transcripción de inmunoglobulinas (6). Durante la evolución del mieloma también tienen lugar cambios en el microambiente de la médula ósea, que favorecen la inducción de angiogénesis, la supresión de la inmunidad mediada por células y la desregulación de la señalización paracrina en la que participan citoquinas como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF (7) (8).

La etiología del MM continúa sin ser conocida por completo. Se cree que la exposición a radiaciones ionizantes, así como a contaminantes ambientales (herbicidas, pesticidas y dioxinas) y una estimulación antigénica crónica, son factores importantes en el desarrollo de la enfermedad (4).

1.1.1 TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

A pesar de que las nuevas terapias han permitido aumentar la supervivencia de los pacientes de 3 a 5 años, en la actualidad el MM continúa siendo una enfermedad incurable (7). Durante muchos años el tratamiento del mieloma se basó principalmente en el uso de glucocorticoides, como la prednisona, que actúan como agentes antiinflamatorios inespecíficos y la administración de agentes alquilantes, principalmente melfalán (1). La administración combinada de ambos compuestos era el tratamiento convencional para pacientes mayores de 65 años, mientras que en pacientes jóvenes se administraban altas dosis de melfalán junto con trasplantes autólogos de células madre (9).

Los avances en el conocimiento de las interacciones microambientales entre las células plasmáticas malignas y el nicho de la médula ósea, así como su papel en la progresión de la enfermedad y la resistencia a terapias, han permitido el desarrollo de nuevos fármacos como los inhibidores del proteasoma (PIs) y fármacos inmunomoduladores (IMiDs), los cuales han

incrementado la tasa de respuesta y supervivencia de manera notoria en los últimos años. Los IMiDs son análogos de la talidomida que presentan propiedades antiangiogénicas, antiinflamatorias y antiproliferativas y actúan disminuyendo la producción de citoquinas implicadas en supervivencia y proliferación además de estimular la actividad de células T y NK (10). Por su parte, los PI3 impiden el recambio proteico necesario en las células de MM, las cuales se caracterizan por una alta síntesis de inmunoglobulinas. Al inhibir la actividad del proteasoma se genera una situación de estrés celular y acaba induciéndose la apoptosis celular (11).

Sin embargo, estas nuevas terapias no son capaces de erradicar por completo los clones de células malignas, provocando que la gran mayoría de los pacientes recaigan eventualmente y sea necesario volver a tratarlos (12).

Otra posible línea de actuación contra el MM son los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). El ciclo celular es un proceso muy preciso que está regulado por la activación coordinada de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y por varios puntos de control, lo que asegura la correcta transmisión del genoma a las células hijas. Las Cdks son serin-treonin quinasas, reguladas por ciclinas y por inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas. Al activarse, las Cdk permiten el paso de una fase a otra del ciclo celular y que la célula se divida. Debido a esto, las alteraciones en estas proteínas afectan en gran medida al correcto funcionamiento del ciclo celular, pudiendo favorecer la aparición de cáncer (13) (14) (15).

Dentro de esta nueva serie de fármacos inhibidores de Cdk encontramos el dinaciclib, una pequeña molécula que inhibe selectivamente a Cdk1, Cdk2, Cdk5 y Cdk9. La inhibición de Cdk1 y Cdk2 provoca la parada del ciclo celular, favoreciendo la posibilidad de que tenga lugar posteriormente el proceso de apoptosis. Por otra parte, la inhibición de Cdk5 podría aumentar la sensibilidad del mieloma al ser administrado junto a fármacos inhibidores del proteasoma. Finalmente, la inhibición de Cdk9 afecta a la RNA polimerasa II interrumpiendo su actividad transcripcional, provocando de este modo un descenso en los niveles de proteínas de vida media corta, como Mcl-1, que requieren una alta tasa de síntesis (16) (17).

1.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo fisiológico fundamental para el mantenimiento de la homeostasis en organismos pluricelulares, que se realiza a partir de una serie de acontecimientos moleculares que inducen la muerte celular. Existen diversos estímulos extracelulares e intracelulares que pueden desencadenar la apoptosis: unión de ligandos a receptores específicos, daño al DNA, inducción de estrés físico-químico debido a agentes quimioterápicos o radiaciones ionizantes, alteraciones de temperatura u osmolaridad, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), falta de nutrientes, oxígeno o factores de crecimiento, etc. Sin embargo, la apoptosis puede tener también lugar sin necesidad de que hayan ocurridos daños en la célula, en procesos fisiológicos como el desarrollo y el envejecimiento cuando una célula ha dejado de cumplir su función y ya no es útil para la comunidad (18).

Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis interviene en el correcto modelado de los tejidos, siendo de especial importancia en el sistema nervioso y en el sistema inmune. Junto con

la mitosis y la proliferación celular, actúa como un mecanismo homeostático para controlar las poblaciones celulares en los tejidos de los individuos adultos. Además, es necesaria para que el sistema inmune pueda eliminar las células infectadas por patógenos o aquellas que puedan interferir con la función normal.

No obstante, es necesario que se mantenga un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular ya que la ruptura de dicho equilibrio puede conllevar la aparición de enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas o cáncer (19).

Debido a la apoptosis aparecen en la célula una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos. En un primer momento las células preapoptóticas se separan de sus vecinas, adquieren una morfología más redondeada y reducen su tamaño. La cromatina se condensa y se distribuye de forma marginal en el núcleo. La membrana plasmática se mantiene íntegra pero se produce la translocación de fosfatidilserina desde la semicapa interna a la externa. Posteriormente el DNA es fragmentado por la acción de endonucleasas. Finalmente, se producen burbujas en la membrana plasmática (proceso conocido como *blebbing*), el citoplasma se fragmenta y se producen cuerpos apoptóticos que son reconocidos por las células fagocíticas a través de la señalización producida por la fosfatidilserina expuesta en el exterior celular. La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos evita que se libere el contenido celular al medio, por lo que no se desencadena una respuesta inflamatoria (20).

1.2.1 VÍAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

Las caspasas son cisteín proteasas con especificidad de corte en aspártico cuya actividad proteolítica es la responsable del desmantelamiento celular que culmina con la apoptosis celular. Las caspasas pueden activarse a través de dos vías (Figura 1): la vía extrínseca y la vía intrínseca.

La vía extrínseca (Figura 1) se inicia en respuesta a estímulos externos por la activación de receptores de muerte como TRAILR o FAS tras la unión de sus ligandos específicos (TRAIL y FasL, respectivamente). La unión del ligando provoca la dimerización del receptor mediada por proteínas adaptadoras como FADD, a través de la cual se reclutan a las caspasas iniciadoras en su forma de zimógenos (procaspasa 8 y procaspasa 10). Éstas se activan por autoproteólisis y cortan a las caspasas ejecutoras (caspasa 3 y caspasa 7) para activarlas, llevando a cabo los procesos apoptóticos (19).

La vía intrínseca (Figura 1) se desencadena en respuesta a señales intracelulares variadas como daños en el DNA, infecciones virales, estrés metabólico... Esta vía también recibe el nombre de vía mitocondrial ya que el principal proceso que tiene lugar es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Las señales intracelulares generadas propician la activación de las proteínas con dominio BH3, las cuales inhiben a las proteínas antiapoptóticas y favorecen la acción de las proteínas BAX y BAK que generan poros en la membrana mitocondrial externa a través de los cuales salen al citoplasma la proteína SMAC (*Second Mitochondria-derived Activator*) y el citocromo C. El citocromo C interacciona con APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) produciendo su oligomerización y dando lugar a un complejo conocido como

apoptosoma. Este complejo activa a la caspasa 9, la cual activa a las caspasas ejecutoras (caspasas 3 y 7), convergiendo con la vía extrínseca y produciendo la apoptosis (19).

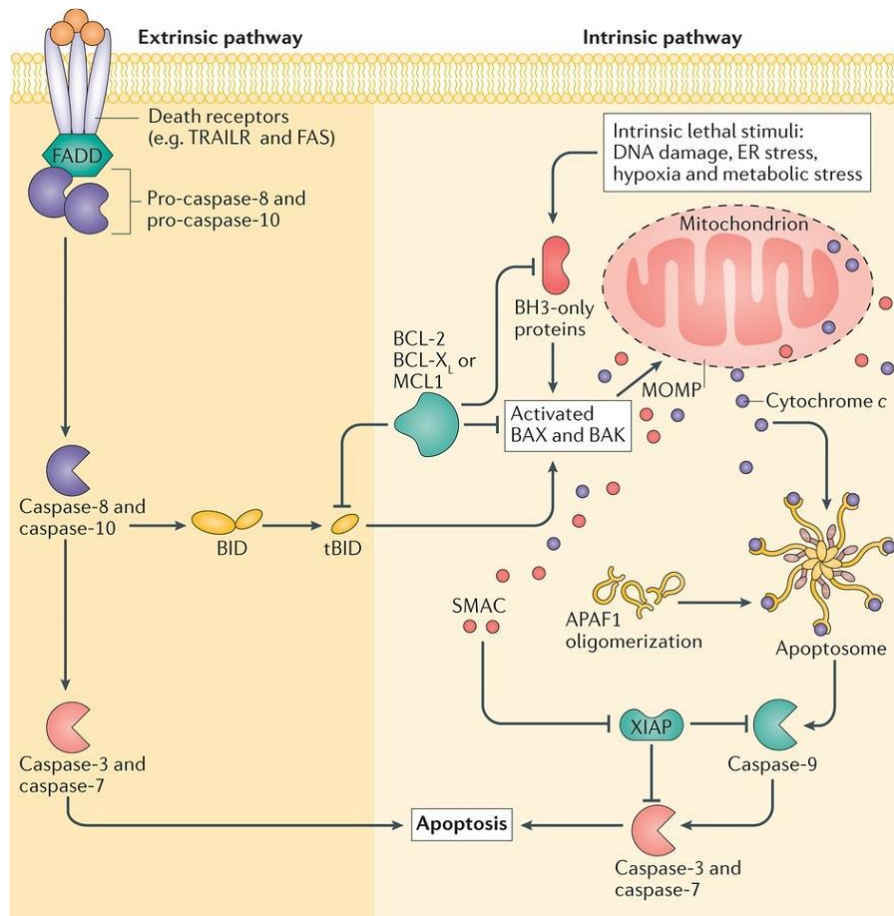


Figura 1: Inducción de la apoptosis. Representación esquemática de las proteínas que participan en la inducción de la apoptosis a través de las vías extrínseca e intrínseca. Imagen adaptada (19)

1.3. FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS BCL-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis gracias a su capacidad de modificar la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial.

Los miembros de esta familia se pueden clasificar atendiendo a su función en dos grupos: proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas. Por otra parte, las proteínas de la familia Bcl-2 se caracterizan por presentar en su estructura dominios de homología con Bcl-2 (dominios BH: BH1, BH2, BH3, BH4). En base a esto, se pueden dividir en 3 subfamilias en función del tipo y número de dominios BH que presentan (Figura 2) (21).

Dentro de las **proteínas multidominio antiapoptóticas** encontramos a las siguientes proteínas: Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, BCL2A1, BCL-W y BCL-B. Todas ellas poseen los 4 dominios de homología BH. La estructura tridimensional de sus dominios BH1, BH2 y BH3 genera una cavidad hidrofóbica a través de la cual interaccionan con una hélice alfa anfipática de las proteínas solo-BH3. No obstante, las proteínas antiapoptóticas no establecen interacciones con todas las proteínas solo-

BH3. Por ejemplo, la mayoría de ellas interactúa con las proteínas BID y BIM; mientras que solo algunas de ellas lo hacen con NOXA. Gracias a esta interacción, cumplen su función antiapoptótica al impedir la oligomerización de las proteínas BAX y/o BAK en la membrana mitocondrial externa, inducida por las proteínas BH3. Esta oligomerización sería la responsable de la formación de los poros a través de las cuales saldrían al citoplasma el citocromo C y otras proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria. Además, poseen un dominio transmembrana (TM) que les permite anclarse a las membranas de orgánulos, principalmente a la externa de la mitocondria, pero también a la nuclear y a la del retículo endoplasmático (22) (23).

La subfamilia de **proteínas multidominio proapoptóticas** está formada por proteínas que poseen todos los dominios BH, a excepción del BH4. Los principales miembros son BAK y BAX, que de manera constitutiva se encuentran inactivas en forma de monómeros. Cuando se inicia la apoptosis, BAX se trasloca desde el citosol a la membrana externa mitocondrial, donde se encuentra anclada BAK, y se activan mediante cambios conformacionales que producen su oligomerización. Al activarse, generan los poros que provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial (24).

La subfamilia de **proteínas solo-BH3** constituye un grupo de proteínas estructuralmente diversas que solo presentan el dominio de homología BH3. En mamíferos comprende 8 miembros: BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA, HRK y BMF. Todas estas proteínas promueven la apoptosis cuando están sobreexpresadas. La transcripción de estas proteínas está regulada positivamente por p53, por lo que su síntesis aumenta cuando se producen daños en el DNA.

Al menos algunas de las proteínas solo-BH3, BID y BIM en particular, pueden unirse tanto a las proteínas multidominio antiapoptóticas como a las proapoptóticas (BAX y BAK); mientras que otras como BAD y BIK solo se unen a las antiapoptóticas. En base a esto, se ha propuesto que las proteínas BID y BIM, (y también Puma y Noxa), actuarían como iniciadores directos de la apoptosis, mientras que BAD y BIK sensibilizan a la célula frente a los estímulos que inducen la apoptosis al unirse y reducir los niveles "libres" de proteínas antiapoptóticas (25).

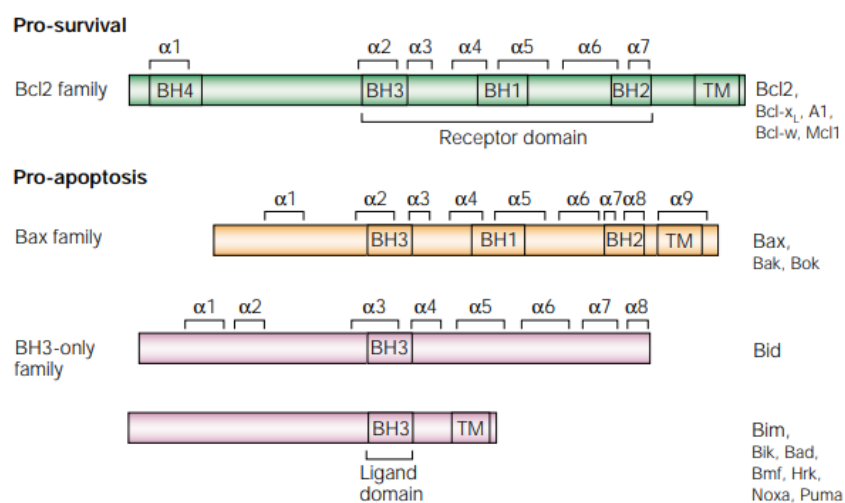


Figura 2: Subfamilias de las proteínas de la familia Bcl-2. Las proteínas se clasifican según su función antiapoptótica o proapoptótica. Se representan esquemáticamente los distintos dominios de homología BH1-BH4 que caracterizan a cada subfamilia. Imagen adaptada (26).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Al igual que ocurre en otros tipos de cáncer, el mieloma múltiple se caracteriza por la desregulación en los niveles de expresión de algunas proteínas anti o proapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2. En particular, la proteína multidominio antiapoptótica Mcl-1 está sobreexpresada frecuentemente en el MM. Aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados y más del 75% de pacientes que han sufrido recaída sobreexpresan Mcl-1 (27).

Por tanto, Mcl-1 representa una potencial diana terapéutica para el tratamiento del MM. En el presente Trabajo Fin de Grado se ha pretendido generar una línea transfectante que sobreexpresa la proteína antiapoptótica Mcl-1 empleando para ello dos técnicas distintas: transfección mediada por retrovirus y electroporación. Esta línea podría ser utilizada posteriormente en el mismo laboratorio como modelo experimental *in vitro* para estudiar el efecto de posibles fármacos cuya diana sea dicha proteína.

Los objetivos que nos planteamos se resumen en los siguientes:

1. Generar una línea transfectante de mieloma humano que sobreexpresa la proteína antiapoptótica Mcl-1.
2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 en la viabilidad de las células transfectadas al ser tratadas con el fármaco dinaciclib.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

Para la generación de la línea transfectante de mieloma múltiple humano se empleó la línea celular RPMI 8226. Se trata de una línea celular de linfocitos B establecida en 1966 a partir de sangre periférica de un varón de 61 años (28).

Para la transfección mediada por retrovirus se hizo uso de células HEK-293T a modo de células empaquetadoras de virus. Constituye una línea de células embrionarias de riñón humano establecida en 1973 a partir de un feto (29).

Las células RPMI 8226 se cultivaron en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL, Sigma) para prevenir posibles contaminaciones. El medio RPMI 1640 GlutaMAX™ una vez suplementado de esta forma se denominó medio completo. Por su parte, las células 293T se cultivaron en medio completo DMEM GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con los mismos componentes que en el caso del medio RPMI 1640.

Ambas líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² (TPP) en función de la cantidad de células necesarias. Todas las manipulaciones de células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P) y los cultivos se mantuvieron en un incubador termostático (Heraeus Heracell 150i, Thermo) a 37°C, con un 5% de CO₂ y aire saturado de humedad.

Rutinariamente se comprobó el estado de los cultivos evaluando, principalmente, la morfología celular empleando un microscopio invertido (Nikon). Cada 2-3 días, se realizaban subcultivos de los mismos para mantenerlos a una densidad y viabilidad celular adecuadas que no comprometiesen su crecimiento. Estos parámetros se determinaban mediante el conteo en cámara de Neubauer (hemocitómetro) con azul Trypan, un colorante capaz de introducirse en aquellas células cuya membrana plasmática está dañada; de modo que al observarlas al microscopio óptico las células muertas se observan azules mientras que las vivas quedan blancas.

Para calcular la densidad del cultivo se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular (células/mL)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

En este caso, el factor 10^4 es el factor de corrección del volumen del hemocitómetro y el factor de dilución es 2, dado que se mezclaban 50 μL de suspensión celular con 50 μL de azul Trypan. Una vez calculada la densidad del cultivo inicial se diluían las células en el medio completo correspondiente para dejarlas a una densidad celular entre $5 \cdot 10^4$ y $7,5 \cdot 10^4$ células/mL.

Hay que tener en cuenta que para el conteo y dilución de las células 293T era necesario tripsinizarlas previamente durante 5-10 minutos en estufa para favorecer que se despegaran de la superficie del frasco. Posteriormente se neutralizaba la acción de la tripsina añadiendo el mismo volumen de medio completo DMEM.

En cuanto a la viabilidad celular, ésta se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales}} \cdot 100$$

3.2. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

3.2.1. VECTORES EMPLEADOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE LA LÍNEA RPMI 8226

El cDNA de las proteínas Mcl-1 o EYFP se encontraba previamente clonado en el vector pBabe. Este plásmido está diseñado para realizar transfecciones retrovirales en células de mamífero y contiene un marcador de selección en procariontes (resistencia a ampicilina) y otro marcador de selección para eucariotes (resistencia a puromicina).

Para la generación de las partículas virales en células empaquetadoras 293T para la posterior infección de células RPMI 8226 se emplearon los siguientes vectores (*sus mapas quedan recogidos como material suplementario en el Anexo I*):

- pBabe: plásmido pBabe sin inserto, empleado a modo de control
- pBabe-EYFP: con la proteína fluorescente EYFP, empleado a modo de control
- pBabe-Mcl-1: plásmido pBabe con el gen de la proteína Mcl-1 clonado
- pNVUL-MLV-gag-pol: contiene las secuencias que codifican la retrotranscriptasa viral y las proteínas de la cápside vírica
- pMDG-VSV: contiene las secuencias codificantes de las proteínas de la envuelta del virus

En el laboratorio se disponían de cantidades suficientes previamente preparadas de cada vector para realizar los experimentos; a excepción del vector pNVUL-MLV-gag-pol, por lo que fue necesario transformar bacterias y realizar extracción de DNA plasmídico para obtener la cantidad necesaria, siguiendo los protocolos descritos en los siguientes apartados.

3.2.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

En la transformación de las bacterias se empleó el método por choque térmico, para lo cual se descongeló en hielo una alícuota de 400µL de bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue. A continuación se añadieron 100 ng del vector pNVUL-MLV-gag-pol y se incubó durante 5-10 minutos en hielo y seguidamente 1,5 minutos a 42°C en baño húmedo. Inmediatamente, se llevó al baño de hielo durante 2 minutos, tras lo cual se diluyó la alícuota con 1 mL de medio LB estéril y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se centrifugó el eppendorf 5 minutos a 2095xg, se descartó parte del sobrenadante y se resuspendieron las bacterias ya transformadas en el volumen restante. Finalmente, se sembraron en una placa de Petri de LB-Agar con el antibiótico de selección ampicilina a 100 µg/mL. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se seleccionaron varias colonias de la placa, transfiriendo cada una a un tubo estéril con 10 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección (100 µg/mL). Esta operación se realizó con un asa de cultivo esterilizada en llama tomando cada una de las colonias y rozando con el asa las paredes del tubo para asegurar la correcta resuspensión de las bacterias. Las suspensiones bacterianas se incubaron a 37°C durante 24 horas en un agitador orbital a 200 rpm. Posteriormente se conservaron a -80°C alícuotas de las bacterias transformadas en eppendorfs con glicerol (1 mL de suspensión bacteriana y 500 µL de glicerol). A partir de estas alícuotas se prepararon las expansiones bacterianas para obtener un número adecuado de bacterias para realizar la extracción de DNA plasmídico.

3.2.3. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

En un primer momento, para realizar la extracción del DNA plasmídico se empleó el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade* (MACHEREY-NAGEL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está diseñado para extraer DNA plasmídico de un volumen de partida pequeño (hasta 20 mL de suspensión bacteriana) y las cantidades de plásmido que se obtuvieron fueron insuficientes ya que el plásmido pNVUL-MLV-gag-pol se caracteriza por un bajo número de copias y ser difícil de cultivar.

Por esta razón fue necesario realizar una extracción empleando el kit comercial *NucleoBona® Extra Midi EF* (MACHEREY-NAGEL) para volúmenes grandes de suspensión bacteriana. Se prepararon 4 erlenmeyers de suspensión bacteriana con un volumen total de 400 mL y el antibiótico de selección a 100 µg/mL y cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica adecuada ($OD_{600} = 2$) se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico siguiendo el protocolo del fabricante.

Las eluciones del plásmido extraído se realizaron en 500 µL de H₂O libre de endotoxinas incluida en el kit y la concentración del plásmido se midió en alícuotas de 2 µL con el espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare, Amersham).

3.2.4. ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

Una vez obtenidos todos los vectores a usar en las transfecciones se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la integridad y grado de pureza de los mismos.

El gel se preparó a un porcentaje del 1% en agarosa, fundiendo 0,3 gramos de agarosa en 30 mL de tampón TAE (Tampón Tris-Acetato-EDTA, Invitrogen). A la mezcla se le añadió SYBER-Safe (1:10000, Invitrogen) para teñir el DNA y se vertió en los moldes para su gelificación.

A continuación se prepararon las muestras para cargar al gel: cada una contenía 150 ng del vector, 2 μ L de tampón de carga 6x (para poder visualizar el avance del frente durante la electroforesis) y se completó con H₂O destilada hasta un volumen total de 18 μ L. Se emplearon marcadores de peso molecular de 1kb (TrackIt 1 kb ladder, Biotools) para estimar, por comparación, el peso de los plásmidos. Cada mezcla se cargó en el gel de agarosa y la electroforesis se realizó a 90V, 400 mA durante 60-90 minutos.

Por último, la visualización del gel se realizó en un transiluminador (GelDoc 2000, Bio-Rad; programa de análisis Quantity One v.4.6.5).

3.3. TRANSFECCIÓN RETROVIRAL DE LA LÍNEA RPMI 8226

3.3.1. GENERACIÓN DE SOBRENADANTES RETROVIRALES

Una vez obtenidos todos los vectores descritos se procedió a la generación de las correspondientes partículas virales para la posterior infección de las células RPMI 8226. Se empleó la línea celular 293T como empaquetadora de los virus. Estas células se transfectaron con tres vectores distintos: pBabe con el inserto correspondiente, pNVUL-MLV-gag-pol y pMDG-VSV.

En total se realizaron tres transfecciones en las que variaba la naturaleza del vector pBabe:

- En una de ellas se empleó el vector pBabe con el inserto de Mcl-1 para generar la línea que sobreexpresara dicha proteína
- En otra se utilizó el vector pBabe vacío, sin ningún inserto. Esta línea se generó a modo de control para comprobar si la mera presencia del vector producía algún efecto sobre la expresión de Mcl-1.
- La última contenía el vector pBabe con el inserto de la proteína fluorescente EYFP (λ_{ex} = 513 nm; λ_{em} = 527 nm). Esta línea se empleó a modo de control de seguimiento para comprobar que las transfecciones se estaban llevando a cabo adecuadamente. La presencia de la proteína fluorescente se observaba de forma rápida y simple por visualización directa en el microscopio de fluorescencia.

En primer lugar, se sembraron $3,8 \cdot 10^6$ células 293T en 10 mL de medio DMEM completo en placas de 10 cm (una placa por transfección) y se incubaron durante 24 horas en estufa. A continuación, se retiró el medio de las placas y se añadieron 2,5 μ L de cloroquina en 10 ml de medio OptiMEM 10% SFB agitando suavemente. Se incubaron las placas durante al menos 30 minutos. La cloroquina es un agente potenciador de la transfección que actúa inhibiendo las enzimas lisosomales para evitar la degradación del DNA exógeno adquirido (30).

Mientras se incubaban las placas se prepararon las mezclas de transfección en un volumen final de 500 μ L cada una, completando a este volumen con medio OptiMEM sin SFB ni antibiótico (el suero fetal bovino puede interferir en el proceso de transfección):

a. Eppendorf con DNA

- 10 μ g de vector pBabe con el inserto correspondiente o vacío:
 1. pBabe vacío (347 ng/ μ l)
 2. pBabe-Mcl1 (508 ng/ μ l)
 3. pBabe-EYFP (493 ng/ μ l)
- 3 μ g pMDG-VSV (287 ng/ μ l)
- 10 μ g pNVUL-MLV-gag-pol (110 ng/ μ l)

b. Eppendorf con polietilenimina (PEI)

- 92 μ g PEI (Stock 1mg/ml)

La polietilenimina es un polímero orgánico de carga positiva que se une a los grupos fosfato del DNA, cargados negativamente, y favorece la entrada de los complejos a las células (31).

Una vez preparadas, se dejaron reposar las mezclas de transfección durante 5 minutos y a continuación cada mezcla de vectores se mezcló con una alícuota de PEI. Se homogenizaron mediante volteo suave y se incubaron durante 15-20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos.

A continuación, se añadió gota a gota la alícuota correspondiente a cada placa de células 293T con pipeta de 1 mL. Se agitaron suavemente las placas y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo se cambió el medio de transfección por 10 mL de OptiMEM 10% SFB. Tras incubar durante 48 horas, se observaron las células transfectadas con la proteína fluorescente EYFP en el microscopio de fluorescencia para comprobar que las células habían sido transfectadas. Se recolectaron los sobrenadantes de las placas donde se encontraban las partículas virales empaquetadas, se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para eliminar posibles restos celulares de 293T se filtraron los sobrenadantes mediante jeringuilla con filtro de 0,45 μ m (Acrodisc).

3.3.2. INFECCIÓN DE CÉLULAS RPMI 8226 CON SOBRENADANTES RETROVIRALES

Para cada infección se emplearon 3 mL del sobrenadante viral correspondiente para resuspender directamente $5 \cdot 10^5$ células RPMI 8226 totales, previamente centrifugadas, que se sembraron en placas de 12 pocillos. Una vez sembradas, se añadió polibreno (Sigma) a una concentración final de 10 μ g/mL con el fin de incrementar la eficiencia de la infección. El mecanismo por el cual el polibreno favorece la infección no está del todo claro pero se ha demostrado que la presencia de este polímero catiónico mejora la adsorción de los virus a la membrana plasmática de la célula y esta mejora parece ser independiente de receptores y envoltura virales (32).

A continuación se procedió a centrifugar la placa durante dos horas a 1450xg a temperatura ambiente para favorecer la entrada de las partículas virales a las células. Después de esto, se

cambió el sobrenadante por medio RPMI 1640 completo y se incubó la placa en estufa unas 48 horas para permitir que las células se recuperaran del proceso de infección.

La selección de las células infectadas por los retrovirus que contenían los vectores pBabe se realizó por resistencia al antibiótico puromicina, ya que el vector retroviral confiere resistencia a las células que lo hayan incorporado a su genoma.

Para ello, se realizó un ensayo de dosis-respuesta a puromicina en placa de 12 pocillos con concentraciones crecientes del antibiótico: 0, 1, 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este ensayo se analizaron las 3 líneas transfectadas así como células RPMI 8226 wild-type para determinar la concentración de puromicina que elimina a las células no transfectadas. De este modo se seleccionaron los pocillos que contenían 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina, se centrifugaron las células a 700 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron las células seleccionadas en medio completo RPMI 1640 y se sembraron de nuevo en placa de 12 pocillos.

En los días siguientes se mantuvieron los cultivos para permitir la recuperación y expansión de las células seleccionadas y se observaba de forma rutinaria su morfología en el microscopio invertido para evaluar su desarrollo.

3.4. TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE LA LÍNEA RPMI 8226

Además de realizar la transfección retroviral de la línea celular RPMI 8226, se decidió probar a transfectar las células mediante electroporación. Para ello, se tomaron 3 alícuotas del cultivo de células RPMI wild-type, cada una con $2 \cdot 10^6$ células totales, y se centrifugaron a 90 xg durante 10 minutos. A continuación, se retiraron los sobrenadantes cuidadosamente con una pipeta y se resuspendieron las células en 100 μL del medio de electroporación presente en el Kit empleado. Se pasó cada suspensión a un eppendorf y se añadió a cada una 2 μg de DNA a transfectar:

1. pBabe-Mcl-1
2. pBabe vacío
3. pBabe-ZsGreen

En este caso no se empleó la proteína fluorescente EYFP a modo de control; en su lugar se utilizó la proteína ZsGreen ($\lambda_{\text{ex}} = 496$; $\lambda_{\text{em}} = 506$).

Una vez añadido el DNA, se trasvasó el contenido de los eppendorfs a cubetas de electroporación, que se introdujeron en el electroporador (Nucleofector, Amaxa) y se seleccionó el programa indicado para la línea celular RPMI 8226. Tras la electroporación, se añadieron 500 μL de medio completo RPMI 1640 atemperado a 37°C a cada cubeta y finalmente se pasó el contenido de las mismas a los pocillos de una placa de 12 pocillos, a cada uno de los cuales se habían añadido previamente 1,5 mL de medio completo atemperado.

Después de 24 horas de incubación en estufa, se procedió a comprobar la eficiencia de la transfección. Se empleó el citómetro de flujo para analizar la fluorescencia verde que aportaba la proteína fluorescente ZsGreen en aquellas células que hubieran incorporado el DNA.

Del mismo modo que en la transfección retroviral, la selección de las células transfectadas por electroporación se realizó mediante un ensayo de dosis-respuesta a puromicina y se mantuvieron los cultivos seleccionados.

3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 MEDIANTE WESTERN-BLOT

3.5.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LISADOS CELULARES

Para analizar la sobreexpresión de la proteína Mcl-1 en las líneas transformadas fue necesario obtener lisados celulares. Se contaron los cultivos correspondientes y se recogieron $3 \cdot 10^6$ células en tubos de fondo cónico de 15 mL. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de PBS. Posteriormente, dicho volumen se trasvasó a un eppendorf estéril y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos.

Se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendieron los pellets obtenidos en tampón de lisis (20 μ L de tampón por cada 10^6 células). La composición del tampón de lisis era la siguiente: Tritón-X100 al 1%, (Sigma); NaCl 150 mM, (Merck); Tris/HCl 50 mM, pH: 7.6, (Sigma); glicerol al 10% v/v, (Scharlau); EDTA 1 mM, (Sigma); ortovanadato sódico 1 mM, (Sigma); pirofosfato sódico 10 mM, (Sigma); leupeptina 10 μ g/mL, (Sigma); fluoruro de sodio 10 mM, (Sigma); fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, (Sigma). Una vez añadido el tampón de lisis, se incubaron las muestras durante 30 minutos en hielo. Seguidamente, éstas se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Finalmente se recuperaron los sobrenadantes (donde se encuentran las proteínas celulares a analizar) y se trasvasaron a nuevos tubos eppendorf. Se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

3.5.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS EXTRACTOS CELULARES

Para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS que se realizaría posteriormente, en primer lugar fue necesario determinar la cantidad de proteína total en cada uno de los extractos realizados.

Para ello, se empleó el método de BCA (BCA: *Bicinchoninic Acid*; Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) basado en un ensayo colorimétrico muy sensible que no interacciona ni con los detergentes iónicos ni con los no iónicos. La reacción colorimétrica que se lleva a cabo se basa en la formación de un complejo proteína-Cu²⁺ en condiciones alcalinas, seguido de una reducción del Cu²⁺ a Cu⁺ por la capacidad de los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina de reducir dicho ion. Por tanto, la cantidad de proteína es proporcional a la cantidad de reducción.

Esta reducción es cuantificable debido a la formación de un complejo estable de color azulado-morado entre BCA y el Cu⁺ con absorbancia a 562 nm, que se midió en lector de placas ELISA. Finalmente, la concentración de proteína en las muestras se calculó extrapolando el valor de absorbancia de las mismas en una recta patrón de albúmina (Sigma). Los datos de la BCA se analizaron con el programa informático Microsoft Excell 2013 gracias al cual se obtuvo el volumen de extracto necesario para tener 60 μ g de proteína en cada muestra a analizar.

3.5.3. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF

La composición de las muestras preparadas para cargar en la electroforesis fue la siguiente:

- 60 µg del extracto proteico correspondiente
- 5 µL de tampón de carga 3x (Tris/HCl 150 mM, pH: 7.4; dodecilsulfato sódico (SDS) al 3%; molibdato de sodio 0,3 mM; pirofosfato sódico 30 mM; fluoruro de sodio 30 mM; glicerol al 30% v/v; β-mercaptoetanol al 30% v/v; azul de bromofenol al 0,06%, p/v)
- Agua Mili-Q hasta alcanzar un volumen final de muestra de 15 µL

Una vez preparadas, las muestras se calentaron a 95°C durante 10 minutos en bloque térmico sin agitación para favorecer la desnaturalización de las proteínas y se les dio un pulso de centrifuga a 11500 xg durante 30 segundos.

Por otra parte, se prepararon los geles de poliacrilamida al 15% a los que se les adicionó SDS. Las composiciones del gel concentrador (*stacking gel*) y del gel separador (*resolving gel*) están indicadas en la Tabla 1. Se cargaron las muestra preparadas en los geles, habiendo sido éstos previamente colocados en cubetas de electroforesis (Sub-Cell GT, Bio-Rad) llenas de *Running Buffer* (Trizma 19 mM, Sigma; glicina 1,9, Panreac; SDS al 0,01%, Merck). En primer lugar, la electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 80 V y 20 mA con el fin de que se produjera un correcto alineamiento de las muestras a lo largo del *stacking gel*, y, posteriormente, se dejó que recorrieran el *resolving gel* durante 1h 30 minutos a 180 V y 20 mA.

Tabla 1: Composición de los geles de poliacrilamida-SDS empleados en la electroforesis.

Componentes	Stacking gel ($\cong 2\%$)	Resolving gel (15%)
Acrilamida/Bis 40%, Bio-Rad	0,5 mL	1,9 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 mL
SDS 10%	50 µL	50 µL
APS 10% (p/v), Sigma	150 µL	100 µL
TEMED, Sigma	15 µL	10 µL
Agua destilada	3 mL	1,7 mL
Total	5 mL	5 mL

Una vez terminada la electroforesis se procedió a transferir las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) previamente activada durante 30 segundos en metanol. La electrotransferencia se realizó en un montaje tipo sándwich (evitando la formación de burbujas que afectarían a la transferencia) de manera que se colocaron la membrana y el gel entre papeles de filtro Whatman (GE Healthcare) humedecidos previamente con tampón de transferencia o *Transfer Buffer* (Tris/HCl 48 mM pH: 8,3, (Sigma); glicina 39 mM, (Sigma); SDS al 0,037%, (Merck); 20% metanol grado HPLC, (Panreac)) dentro de un equipo de transferencia semiseca (Bio-Rad) conectado a una fuente de electroforesis (Bio-Rad) durante 1 h 15 minutos a 20 V y 400 mA.

Finalizada la electrotransferencia, se recuperaron las membranas de PVDF del montaje y se procedió al bloqueo de las mismas introduciéndolas en cubetas que contenían una disolución

de leche desnatada al 5% (p/v) en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH: 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 al 0,1%; timerosal 0,1 g/L) durante aproximadamente 1 h, a T^a ambiente y en agitación. El bloqueo de la membrana evita las posibles uniones inespecíficas que podrían producirse al añadir los anticuerpos utilizados para el Western-blot.

3.5.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 POR WESTERN-BLOT Y FORMACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS

Tras el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B bajo agitación moderada para eliminar los restos de leche. Finalizados los lavados, se añadió el anticuerpo primario anti-Mcl-1 monoclonal producido en ratón (dilución 1:250, Santa Cruz Biotech.) y se incubó a 4°C durante toda la noche en un agitador.

Tras la incubación se dejaron las membranas en agitación durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos en tampón B y en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron en una mezcla al 5% de leche diluida en tampón B durante 1 h en agitación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa; se trata de un anticuerpo policlonal obtenido en cabra (anti-IgG de ratón, dilución 1:20000, Sigma).

Finalizado este tiempo, se eliminó el anticuerpo secundario y las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B en agitación. Seguidamente, las membranas se incubaron durante 2 minutos y en un volumen de 1 mL por membrana con el sustrato de la enzima peroxidasa (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Cada membrana se colocó en una funda de plástico transparente y se llevó a cabo su revelado en el equipo Amersham™ Imager 600 (GE Life Sciences).

Como control de carga se empleó la α -tubulina en cada uno de los Western-Blot realizados. Para ello, se utilizó el anticuerpo primario anti- α -tubulina monoclonal obtenido en ratón (dilución 1:10000, Sigma) en una solución de tampón B al 2,5% de leche; como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo frente a IgG de ratón (dilución 1:20000, Sigma) obtenido en cabra y conjugado con peroxidasa.

3.6. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DINACICLIB MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en las líneas generadas se realizó un ensayo dosis-respuesta con el fármaco dinaciclib (procedente de Sellekchem), el cual induce la apoptosis. Se trataron con este fármaco las siguientes líneas celulares:

- RPMI 8226 wild-type
- RPMI 8226 transfectadas por electroporación con pBabe sin inserto y seleccionadas a una concentración de puomicina de 0,5 μ g/mL
- RPMI 8226 transfectadas por electroporación con pBabe-Mcl1 y seleccionadas a una concentración de puomicina de 0,5 μ g/mL

Paralelamente se analizaron también dos líneas celulares que ya estaban generadas en trabajos anteriores en el laboratorio. Una de ellas había sido transfectada únicamente con el plásmido pLZR y la otra con el plásmido pLZR con el inserto de Mcl-1.

Todas las líneas celulares analizadas con esta metodología fueron sembradas a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células/mL en 1 mL de medio completo RPMI 1640, por duplicado y en placas de 24 pocillos. A continuación se añadió el fármaco a cada pocillo en concentración creciente: 0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM; y se incubaron las placas durante 24 horas.

Posteriormente se analizó el nivel de apoptosis inducida por dinaciclib. Un evento característico que tiene lugar una vez que la célula entra en apoptosis es la translocación de fosfatidilserina desde la semicapa interna de la membrana plasmática a la externa, favoreciendo de este modo la fagocitosis de la célula apoptótica. Una forma de evaluar este proceso es mediante el marcaje celular con Anexina V, una molécula que se une con una afinidad elevada a este fosfolípido. Además, la Anexina V puede conjugarse con diferentes fluoróforos. Para este ensayo se empleó Anexina V conjugada con DY634 ($\lambda_{ex} = 635$ nm; $\lambda_{em} = 658$ nm) para evitar que la fluorescencia generada por la proteína *reporter* GFP ($\lambda_{ex} = 490$; $\lambda_{em} = 510$) incluida en los vectores pLZR de las líneas usadas como control positivo interfiriese con la producida por el fluoróforo; ya que, si por ejemplo se hubiese empleado anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) ($\lambda_{ex} = 490$ nm; $\lambda_{em} = 525$ nm), las fluorescencias de ambas moléculas se hubieran solapado.

Transcurrido el tiempo de incubación se recogieron las células en tubos de citometría, los cuales se centrifugaron durante 5 minutos a 250 xg y, posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes por decantación. Al mismo tiempo, se preparó una dilución de ABB 1x (ABB: *Annexin Binding Buffer*; Hepes/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 nM) en agua Mili-Q estéril a partir de una solución de ABB 10x, a la que se le adicionó 0,02 μ L de Anexina V-DY634 por cada tubo de citometría. Se añadieron 100 μ L de esta disolución en cada pellet celular y se resuspendió con ayuda de un vórtex. Las muestras se dejaron incubar durante 20 minutos en oscuridad y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences). Los resultados obtenidos se procesaron y analizaron con los programas informáticos FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPROBACIÓN DE VECTORES EN GELES DE AGAROSA

Antes de realizar el proceso de infección viral se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) de los vectores que iban a ser utilizados para comprobar su integridad y grado de pureza (Figura 3). En esta electroforesis se cargó también el plásmido pBabe con el inserto de la proteína Bcl-x_L, pues inicialmente se pensó generar también una línea de células RPMI 8226 que sobreexpresara esta proteína; finalmente, se decidió sobreexpresar Mcl-1 únicamente. La presencia de una única banda en cada carril (Figura 3A) indica que los vectores se encuentran íntegros y con un grado de pureza alta. El ratio A_{260}/A_{280} fue medido con el espectrofotómetro NanoVue, obteniendo valores para todos los vectores en torno a 1,8. Sus concentraciones también fueron medidas con un equipo NanoVue (Figura 3B).

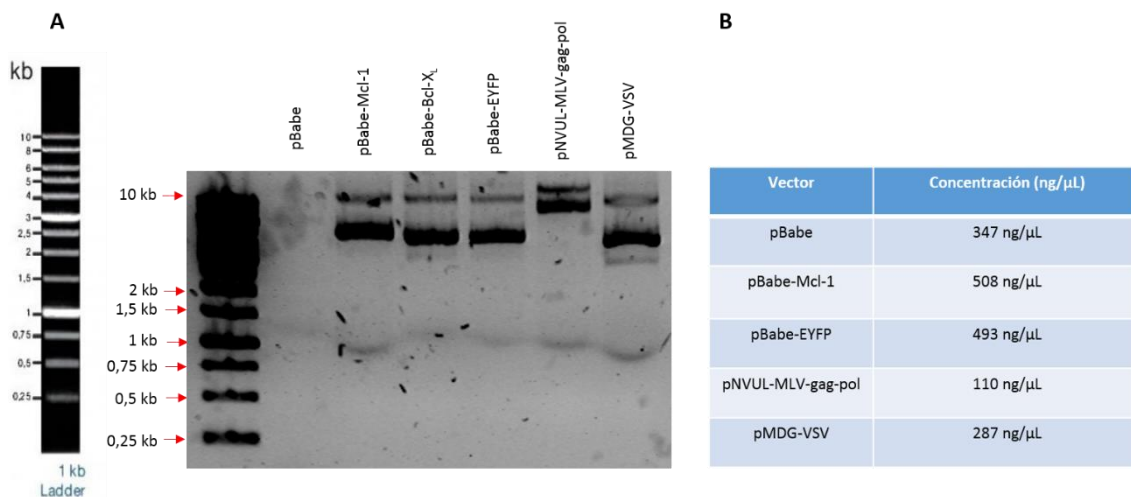


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los vectores a utilizar en la transfección retroviral. (A) Resolución del gel, se empleó el marcador de peso molecular TrackIt 1kb ladder (Biotools) y se cargaron 150 ng de cada vector en el carril correspondiente. **(B)** Concentraciones de cada vector medidas con espectrofotómetro NanoVue.

No obstante, en el carril correspondiente al plásmido pBabe sin inserto (carril 1) no se observó ninguna banda a lo largo del gel ni en el pocillo de carga. Posteriormente se realizó una electroforesis independiente para este vector en la que se confirmó su buen estado (imagen no disponible).

Por otra parte, la baja resolución de las bandas del marcador de peso (2-10kb) dificultó la asignación de pesos moleculares a los plásmidos por comparación. Sin embargo, el plásmido pBabe presenta un peso de 5169 pb, por lo que teniendo en cuenta la longitud de los insertos de cDNA (Mcl-1 = 1053 pb, EYFP = 720 pb) se dedujo que los vectores pBabe se resolvieron en el gel, aproximadamente, a la altura correspondiente de 6 kb. Por su parte, los plásmidos pNVUL-MLV-gag-pol y pMDG-VSV presentan unos pesos de 8922 y 5822 pb, respectivamente, lo que se correspondió con sus posiciones en el gel. (Ver Anexo I con mapas de cada vector).

4.2. TRANSFECCIÓN RETROVIRAL

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 se realizó la transfección de las células 293T empaquetadoras de las partículas virales. Para comprobar que el proceso se había llevado a cabo correctamente se observaron en el microscopio las células que habían sido transfectadas con la proteína fluorescente EYFP a modo de control (Figura 4). En la Figura 4 podemos diferenciar las células 293T que han sido transfectadas de las que no, ya que las primeras expresan la proteína EYFP por lo que al observarlas en el microscopio de fluorescencia presentan fluorescencia verde. A simple vista podemos apreciar que un gran número de células han sido transfectadas, siendo la eficiencia de la transfección de aproximadamente un 50%.

Se recogieron los sobrenadantes de las placas de transfección (a las 48 horas), donde se encuentran las partículas virales con los vectores empaquetados en su interior, y se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 para infectar con ellos a las células RPMI 8226.

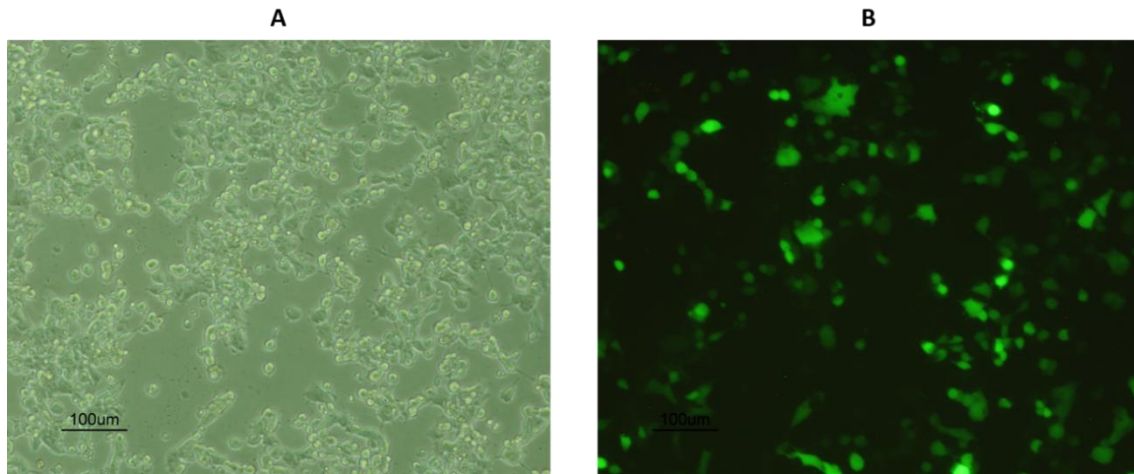


Figura 4: Transfección de células 293T con los vectores retrovirales. Mediante microscopía se observó el estado de las células 293T pasadas 48 horas de haber sido transfectadas con el plásmido pBabe-EYFP, de modo que las células transfectadas presentan fluorescencia verde producida por la proteína EYFP. **(A)** Visualización de las células en campo claro. **(B)** Visualización de las células en microscopio de fluorescencia.

A las 72 horas después de realizar la infección, y del mismo modo que con las células 293T, se procedió a detectar la fluorescencia de EYFP en las células RPMI 8226, pero el resultado fue negativo. Debido a esto, se realizó una segunda infección sobre las mismas células con sobrenadantes virales de 72 horas para aumentar la carga viral y favorecer el proceso de infección. Dado que el proceso de infección puede afectar a la viabilidad celular y en base a experiencias anteriores del grupo de investigación del laboratorio, se sabía que las células necesitaban un tiempo para recuperarse antes de comenzar a mostrar fluorescencia. Se observaron las células al microscopio de fluorescencia a las 24, 48 y 72 horas tras la segunda infección, pero no se detectó fluorescencia en ningún caso. No obstante, se decidió seguir con la selección de las posibles células transfectadas por si el problema de la detección de EYFP se debía a un bajo nivel de expresión. Se realizó el ensayo dosis-respuesta con puromicina y se seleccionaron las células de los pocillos que contenían una concentración de puromicina de 2 µg/mL y 3 µg/mL.

Se mantuvieron los cultivos generados durante varios días, pero las células fueron incapaces de recuperarse del tratamiento con puromicina. Al observarlas al microscopio mostraron una morfología irregular y un pequeño tamaño. Mediante tinción con azul Trypan se determinó una baja viabilidad (<1%) y un alto grado de muerte celular, por lo que se desecharon los cultivos. Sin embargo, se decidió realizar la extracción de proteínas de los *pools* de líneas transfectadas que se habían cultivado previamente a la selección por puromicina para comprobar, mediante Western blot, si se había producido la sobreexpresión de Mcl-1 (los resultados de este experimento se mostrarán más adelante).

Paralelamente, se realizó nuevamente el proceso de transfección retroviral, obteniendo nuevas células 293T empaquetadoras y realizando dos infecciones independientes de células RPMI 8226 con sobrenadantes virales obtenidos a distintos tiempos: (1) 48 horas + reinfección 24 horas; (2) 96 horas. En ninguno de los casos se consiguió observar fluorescencia en las células RPMI 8226. La ausencia de fluorescencia podría deberse a que el proceso de empaquetamiento de los vectores en las células 293T no se llevó a cabo correctamente, debido por ejemplo a errores en la señal de empaquetamiento incluida en el plásmido. En este caso estas células sí que

expresarían fluorescencia pero las partículas virales que se generasen no contendrían el plásmido empaquetado, por lo que la infección de las células RPMI 8226 no sería eficaz. Sin embargo, en trabajos anteriores en el laboratorio habían empleado estos mismos vectores retrovirales consiguiendo transfectar otras líneas celulares. Por tanto, el problema parecía recaer en las propias células RPMI 8226. Por alguna razón desconocida estas células presentaban resistencia al proceso de infección retroviral. De esta manera se explicaría que las células transfectadas no soportasen el tratamiento con puromicina, ya que es el marcador de selección incluido en el vector pBabe.

4.3. TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN

En base a los resultados obtenidos mediante la transfección retroviral, se decidió llevar a cabo una transfección transitoria mediante electroporación siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4. A diferencia de la transfección retroviral, la electroporación no favorece la integración de los plásmidos en el genoma por lo que, conforme pasa el tiempo y las células se dividen, los plásmidos se pierden en la mayoría de las células y únicamente una pequeña fracción de las mismas podría integrarlo y generar transfectantes estables.

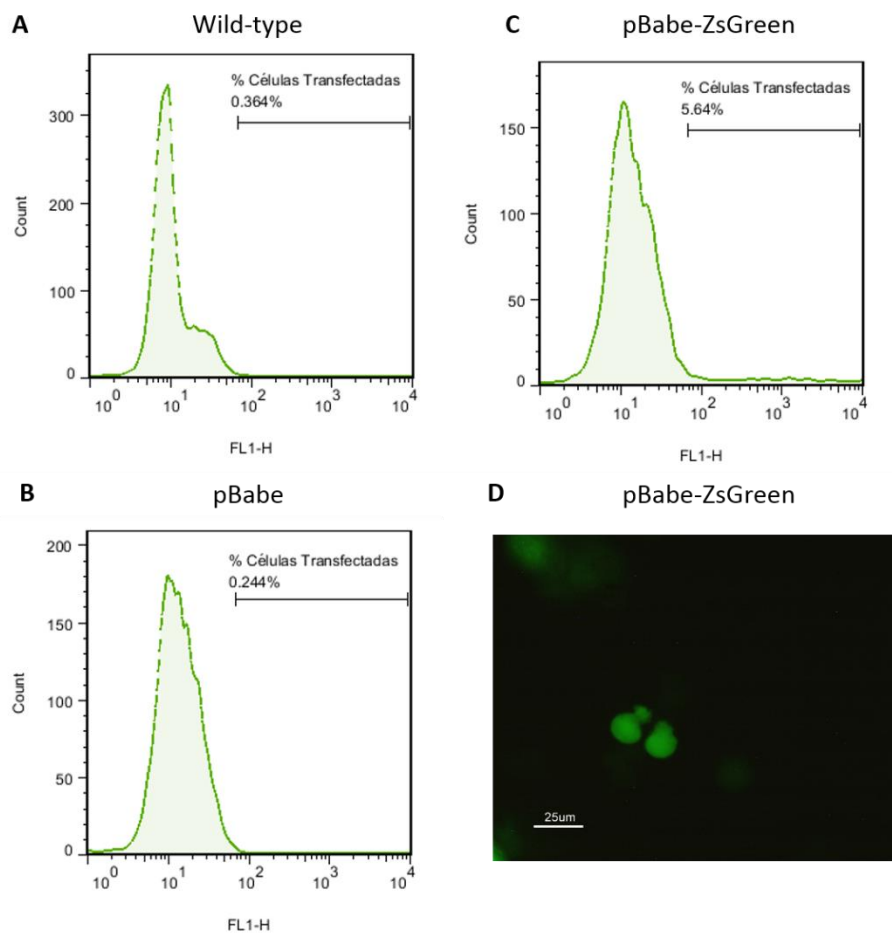


Figura 5: Análisis de la transfección por electroporación de células RPMI 8226. Se analizó el porcentaje de transfección mediante la medida de la fluorescencia emitida por las células mediante citometría de flujo (canal FL1) obteniendo los siguientes histogramas en los que se representa el número de eventos frente a la intensidad de fluorescencia detectada: **(A)** células RPMI 8226 wild-type no transfectadas; **(B)** células RPMI 8226 transfectadas con

el plásmido pBabe; (C) células RPMI 8226 transfectadas con el plásmido pBabe-ZsGreen (indicador de la eficacia de la transfección por electroporación). (D) Microscopía de fluorescencia de las células transfectadas con pBabe-ZsGreen.

Pasadas 24 horas de la electroporación, se analizó la eficacia de la transfección mediante citometría de flujo empleando para ello la fluorescencia que aportaban las células transfectadas con la proteína fluorescente ZsGreen (Figura 5).

En la Figura 5 (A y B) observamos que, tanto las células RPMI 8226 wild-type como las transfectadas con pBabe sin inserto, presentaban una fluorescencia basal muy baja (0,36% y 0,24%, respectivamente). Por su parte, en las células transfectadas con ZsGreen se detectó un 5,64% de células fluorescentes (Figura 5C). Por tanto, podemos relacionar este valor con la eficacia de transfección mediante electroporación. Además, se observaron las células en el microscopio de fluorescencia para confirmar los datos obtenidos por citometría (Figura 5D). Dado que se obtuvo un valor de eficiencia muy bajo, se mantuvieron las líneas durante unos días para que crecieran y se recuperaran del proceso de electroporación. A continuación, se realizó un ensayo dosis-respuesta con puromicina para seleccionar las células transfectadas. De este modo se seleccionaron las células cultivadas a una concentración de puromicina de 0,5 µg/mL, se mantuvieron en cultivo (*evolución de los cultivos en Anexo II*) y se realizó la extracción de proteínas.

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MCL-1 MEDIANTE WESTERN-BLOT

Para comprobar si las transfecciones realizadas habían sido realmente efectivas y resultaban en la sobreexpresión de Mcl-1, se realizó un Western-blot para cuantificar los niveles de expresión de Mcl-1 en las distintas líneas generadas (Figura 6). Para ello se siguieron los protocolos explicados en el apartado 3.5.

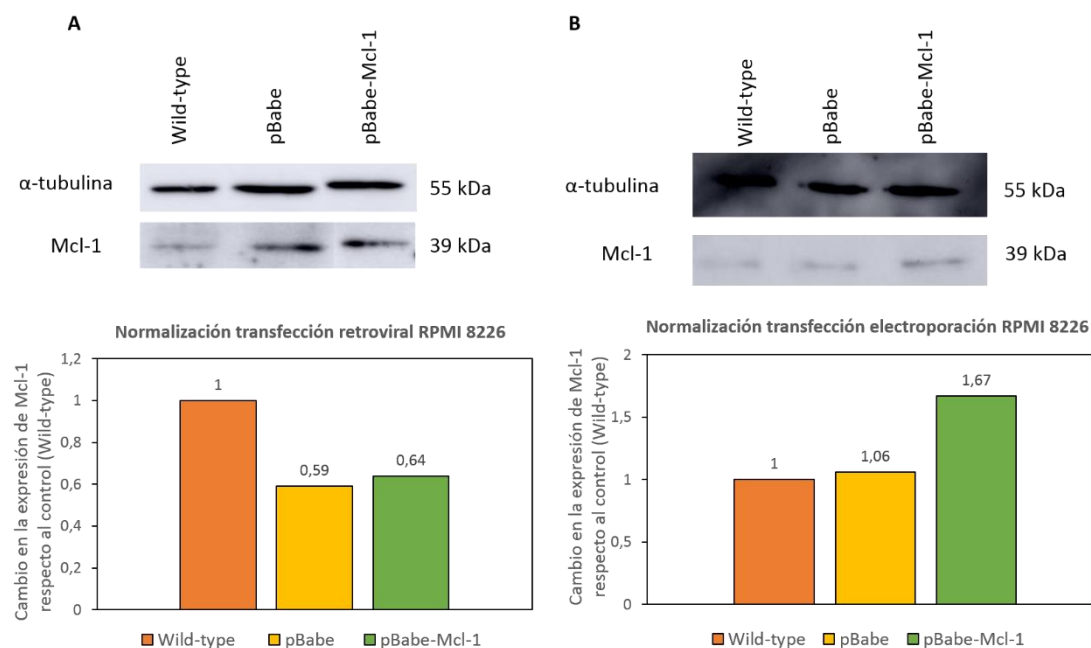


Figura 6: Análisis de la sobreexpresión de Mcl-1 tras transfección retroviral (A) o transfección por electroporación (B) de la línea RPMI 8226. Se realizaron extractos proteicos de cada línea para cada tipo de transfección (wild-type, transfectada con pBabe y transfectada con pBabe-Mcl-1), se cuantificaron mediante el método de BCA y se emplearon

60 µg de cada extracto para la realización del Western-blot. Como control de carga se analizaron los niveles de α -tubulina en las mismas membranas, para diferenciar si el aumento en el grosor de las bandas obtenidas se debe a sobreexpresión de Mcl-1 respecto al control (wild-type), o a que simplemente se ha cargado mayor cantidad de proteína total. Los valores se normalizaron respecto al ratio α -tubulina/Mcl-1 obtenido en las muestras control, se utilizó para ello el software ImageJ.

Respecto a la transfección mediada por retrovirus (Figura 6A), podemos observar que tanto las líneas transfectadas con pBabe como las pBabe-Mcl-1 mostraban una disminución en la expresión de Mcl-1 con respecto al control (0,59:1 y 0,64:1, respectivamente). Se apreció una ligera mayor expresión de Mcl-1 en las transfectadas con pBabe-Mcl-1 versus pBabe, pero probablemente no puede considerarse significativa.

La razón de la disminución de expresión de Mcl-1 en las líneas transfectantes con respecto al control podría deberse a la combinación de dos factores. En primer lugar, para la realización del Western se emplearon extractos de proteínas de los distintos *pools* de líneas transfectadas previos a su selección por puomicina; ya que, como se comenta en el apartado 4.2, el tratamiento con puomicina afecta en gran medida a la viabilidad de los cultivos e impedía su recuperación. Debido a esto, la mayor parte de las células de estos *pools* serían no transfectantes, por lo que en el mejor de los casos, expresarían Mcl-1 a niveles basales comparables a los de wild-type. En segundo lugar, el propio proceso de infección con sobrenadantes retrovirales puede afectar a la viabilidad de las células. En este caso, si las células se encontraban en el proceso apoptótico inducido por la infección, sería de esperar que los niveles de Mcl-1 se vieran disminuidos para aumentar el ratio de proteínas proapoptóticas y favorecer la apoptosis.

Por otra parte, en la transfección por electroporación sí que se observó, en la Figura 4 (B), una sobreexpresión significativa de Mcl-1 en la línea pBabe-Mcl-1 respecto al control, 1,67:1. Además, la línea pBabe sin inserto presentó valores similares a la línea control, 1,06:1; por lo que la presencia del plásmido vacío no influía en la expresión basal de Mcl-1. En base a esto, podemos afirmar que la sobreexpresión de Mcl-1 se debía a la presencia del inserto, que produce un aumento en su expresión del 67% respecto al control. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el método de electroporación produce una expresión transitoria, por lo que conforme transcurra el tiempo es previsible que esta expresión vaya disminuyendo en la mayor parte de las células a medida que éstas se dividan y pierdan el plásmido (evento que incluso podría haber empezado a tener lugar previamente a la realización del Western-Blot).

4.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MCL-1 FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON DINACICLIB

Mcl-1 es una proteína de vida media corta ($t_{1/2} \approx$ 2-3 horas) (33), por lo que se requiere una maquinaria transcripcional eficiente para su síntesis *de novo*. El complejo Cdk9/ciclina T fosforila en serina (residuos 2 y 5) al dominio carboxilo-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II, permitiendo una elongación productiva y modificaciones co-transcripcionales de los transcritos necesarias para una transcripción efectiva. En un estudio anterior (34), se determinó que los fármacos inhibidores de Cdks, especialmente los que inhiben a Cdk9 como el dinaciclib, bloquean la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II. Esto provoca una regulación negativa

de la transcripción de las proteínas de vida media corta (como Mcl-1) y la consecuente disminución de su expresión, induciendo apoptosis.

En base a esto, se analizó si la sobreexpresión de Mcl-1 otorgaba una mayor resistencia a la apoptosis inducida por dinaciclib. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6, se llevó a cabo un ensayo dosis-respuesta frente a dinaciclib (Figura 7), en el que se emplearon las líneas transfectantes obtenidas por electroporación con los vectores pBabe y pBabe-Mcl-1. En este experimento se comparó también la respuesta producida por las células RPMI8226-pLZR y RPMI8226-pLZR-Mcl-1 obtenidas previamente en el laboratorio. La línea RPMI8226-pLZR-Mcl-1 sobreexpresa de forma estable las dos isoformas de Mcl-1, especialmente la de menor peso molecular.

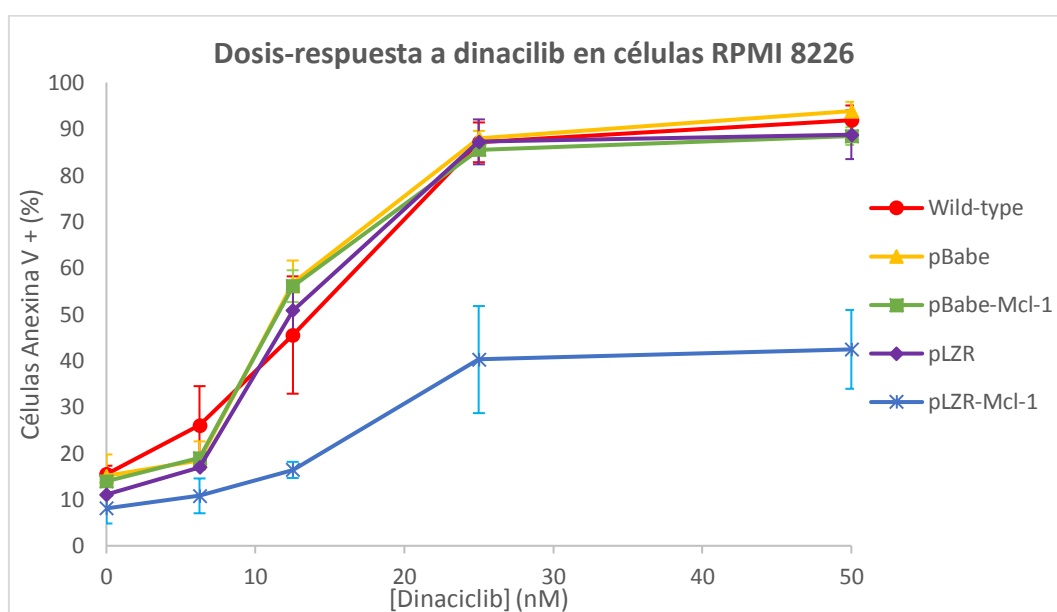


Figura 7: Ensayo dosis-respuesta tras 24 horas de exposición a distintas concentraciones de dinaciclib de líneas RPMI 8226 transfectantes. Las células se sembraron a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células/mL y se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes de dinaciclib (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM). Se evaluó la exposición de fosfatidilserina mediante marcaje con Annexina V-DY634 y análisis por citometría de flujo. Se representan los valores medios \pm SD del porcentaje de células apoptóticas frente a la concentración de dinaciclib de dos experimentos diferentes con muestras por duplicado.

Los resultados obtenidos muestran que la apoptosis aumenta con la concentración de dinaciclib en todas las líneas tratadas. Las células wild-type, pBabe, pBabe-Mcl-1 y pLZR muestran un comportamiento semejante: a una concentración de 6,25 nM empiezan a notarse los efectos del fármaco, que aumentan hasta alcanzar un máximo a una concentración de 50 nM, en el que aproximadamente el 90% de las células están apoptóticas. Parece ser que existe una subpoblación de células ($\approx 10\%$) resistentes al dinaciclib.

Por su parte, la línea transfectada con pLZR-Mcl-1 responde de diferente forma, mostrando una mayor resistencia al tratamiento con dinaciclib, tanto a bajas como a altas concentraciones. A 50 nM se alcanza el máximo efecto del fármaco, induciendo apoptosis en el 42,4% de las células. Del mismo modo que en las otras líneas celulares, se observó una subpoblación resistente a la apoptosis, pero en este caso es mucho mayor: un 57,6% de las células. La línea pLZR-Mcl-1 sobreexpresa Mcl-1 de forma estable, por lo que se confirman los resultados de los estudios anteriores. La sobreexpresión de Mcl-1 contrarresta la disminución en la transcripción basal

provocada por el bloqueo de la RNA polimerasa II a causa del dinaciclib, lo que se traduce en una disminución de la apoptosis inducida por el fármaco.

Respecto a la línea transfectada con pBabe-Mcl-1, los resultados del ensayo muestran que la sobreexpresión conseguida mediante electroporación (67% respecto al control) no es suficiente para otorgar resistencia a los efectos citotóxicos del dinaciclib, pues las células sufren los mismos efectos que las células control (wild-type y transfectadas con vectores sin inserto, pBabe y pLZR).

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La línea RPMI 8226 presenta dificultades para ser transfectada mediante el uso de vectores retrovirales.
2. Mediante electroporación, se puede conseguir un aumento del 67% en la expresión de Mcl-1 en la línea RPMI 8226. Serían necesarios estudios posteriores para establecer el tiempo en el que se mantiene la sobreexpresión. Para la obtención de una línea estable que tuviera un nivel de sobreexpresión homogéneo de Mcl-1 sería necesario llevar a cabo una dilución límite que permitiera la elección de un clon concreto de células.
3. La sobreexpresión de Mcl-1 disminuye la apoptosis inducida por dinaciclib. Al aumentar los niveles basales de la proteína, se compensa la regulación negativa en su transcripción que se produce al administrar este fármaco con este compuesto.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained from this *Degree Thesis*, the following conclusions may be drawn:

1. RPMI 8226 cell line presents difficulties to be transfected by the use of retroviral vectors.
2. A 67% increase in Mcl-1 expression can be achieved by electroporation. Further studies would be needed in order to establish how long this overexpression is held. To obtain a stable line that had a level of homogeneous overexpression of Mcl-1, it would be necessary perform a limiting dilution assay which would allow the selection of a specific clone of cells.
3. Mcl-1 overexpression decreases apoptosis induced by dinaciclib. By increasing the basal levels of this protein, transcription down-regulation due to dinaciclib treatment is compensated.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175-87.
2. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet Lond Engl*. 2015;385(9983):2197-208.

3. Donk NWCJ van de, Mutis T, Poddighe PJ, Lokhorst HM, Zweegman S. Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(S1):110-22.
4. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3:17046.
5. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
6. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996;88(2):674-81.
7. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(12):927-37.
8. Rajkumar SV, et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2002;8(7):2210-6.
9. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med*. 1996;335(2):91-7.
10. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010;24(1):22-32.
11. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(4):561-84.
12. Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, Morgan G, Richardson PG, Crowley J, et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*. 2012;26(1):149-57.
13. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005;24(17):2909-15.
14. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153-66.
15. Maes A, Menu E, Veirman KD, Maes K, Vand erkerken K, De Bruyne E. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017;8(52):90501-20.
16. Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(8):2344-53.
17. Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, Zonder J, Callander N, Fonseca R, et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(3):443-8.
18. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

19. Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(8):539-48.
20. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
21. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):189-200.
22. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):49-63.
23. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003;22(53):8590.
24. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(15):1899-911.
25. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002;2(3):183-92.
26. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-56.
27. Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*. 2005;19(7):1248-52.
28. Matsuoka Y, Moore GE, Yagi Y, Pressman D. Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1967;125(4):1246-50.
29. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-74.
30. Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. Putative Role of Chloroquine in Gene Transfer into a Human Hepatoma Cell Line by DNA/Lactosylated Polylysine Complexes. *Exp Cell Res*. 1996;225(1):186-94.
31. Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*. 2013;529:227-40.
32. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem*. 2002;97(2-3):159-72.
33. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3516-20.
34. Zhang Y, Zhou L, Leng Y, Dai Y, Orlowski RZ, Grant S. Positive transcription elongation factor b(P-TEFb) is a therapeutic target in human multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017;8(35):59476-91.

ANEXOS

ANEXO I

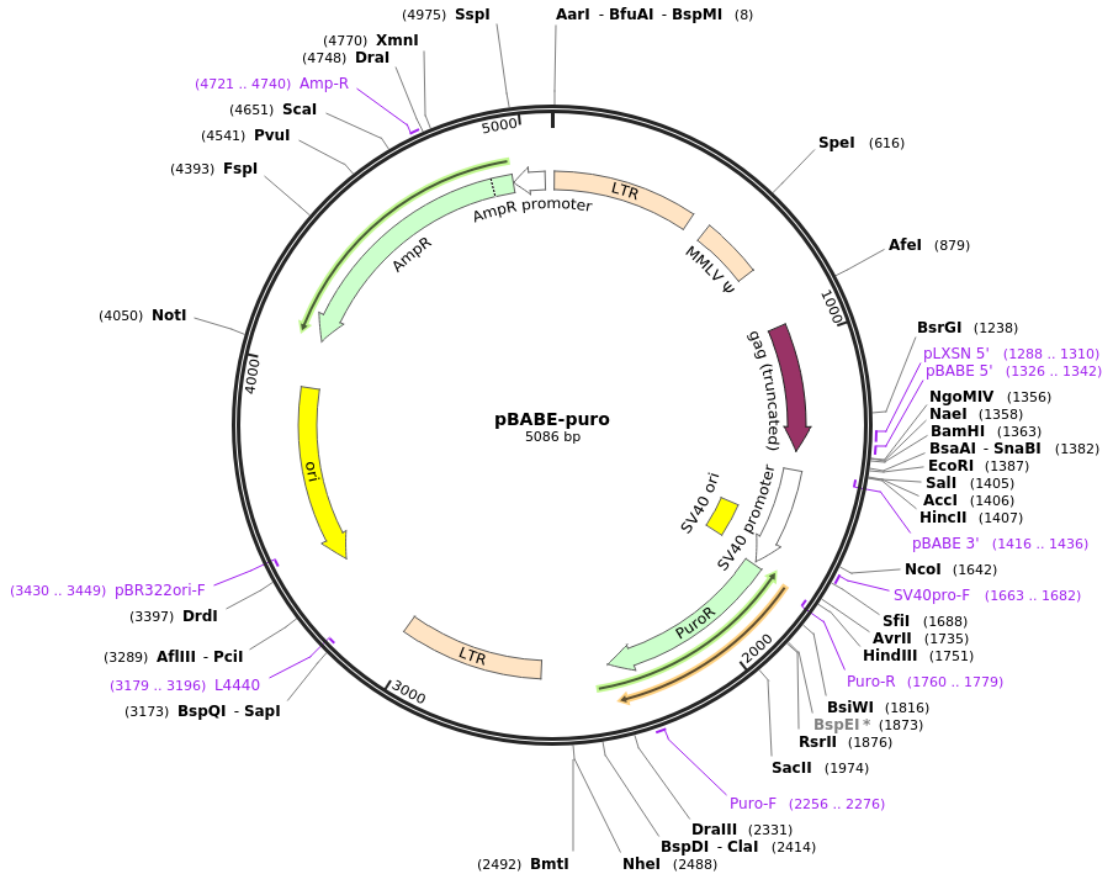


Figura A1: Mapa del vector pBabe. Imagen adaptada del catálogo de plásmidos Addgene.

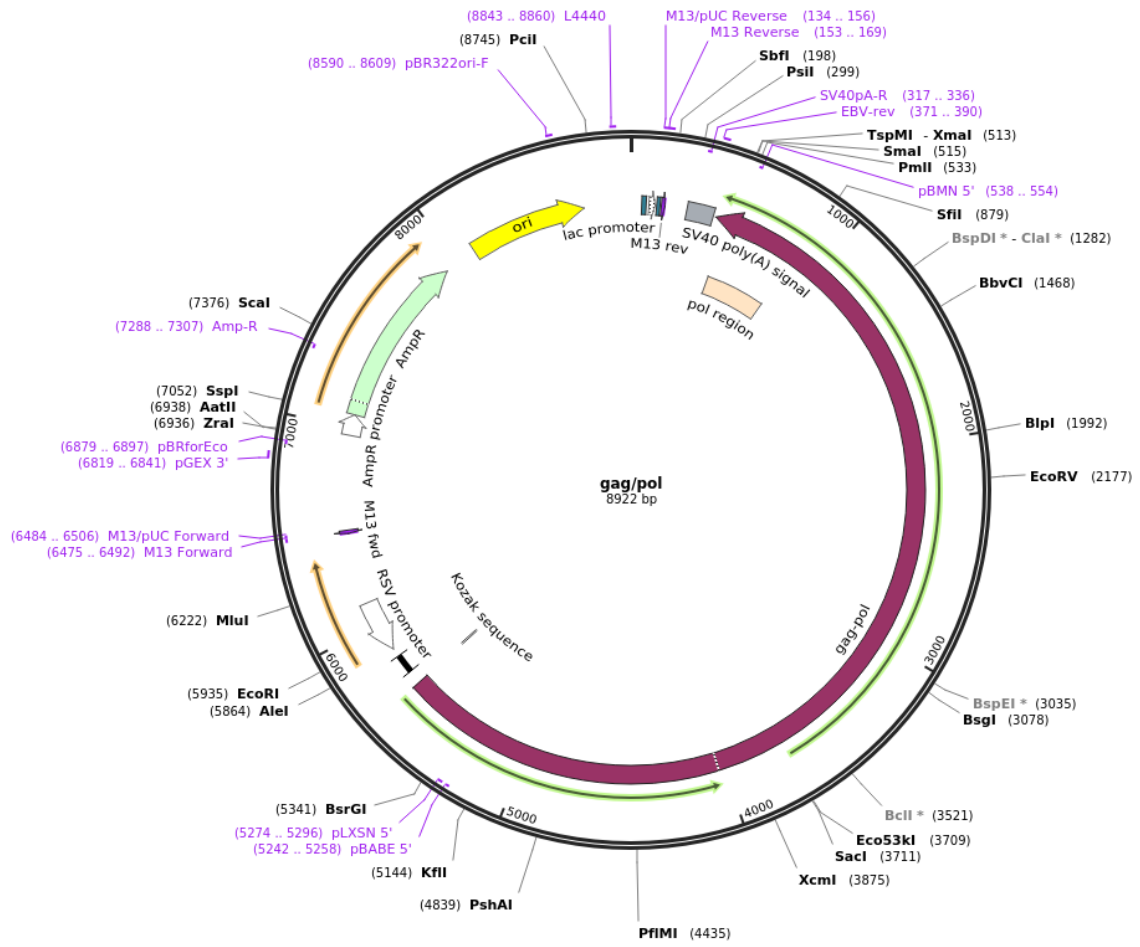


Figura A2: Mapa del vector pNUL-MLV-gag-pol. Imagen adaptada del catálogo de plásmidos Addgene.

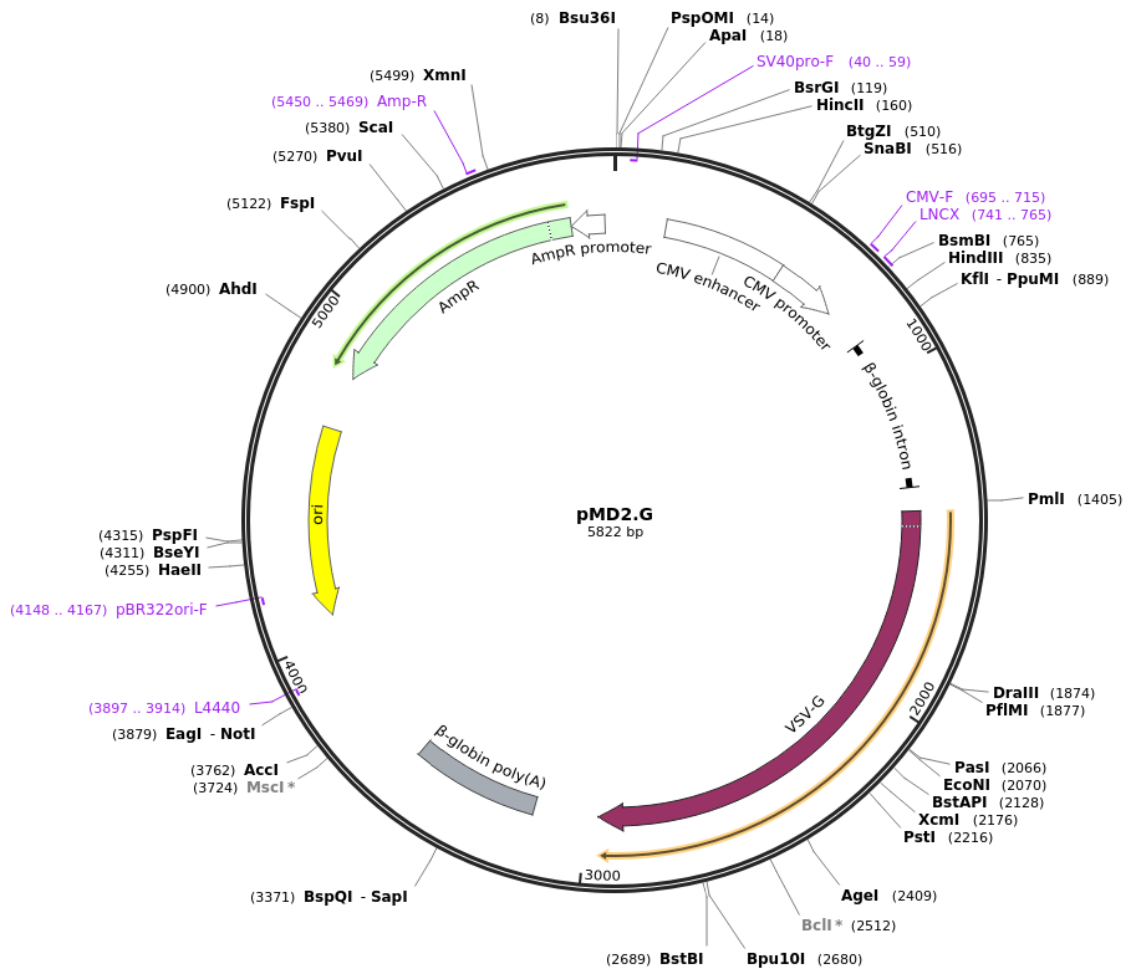


Figura A3: Mapa del vector pMDG-VSV. Imagen adaptada del catálogo de plásmidos Addgene.

ANEXO II

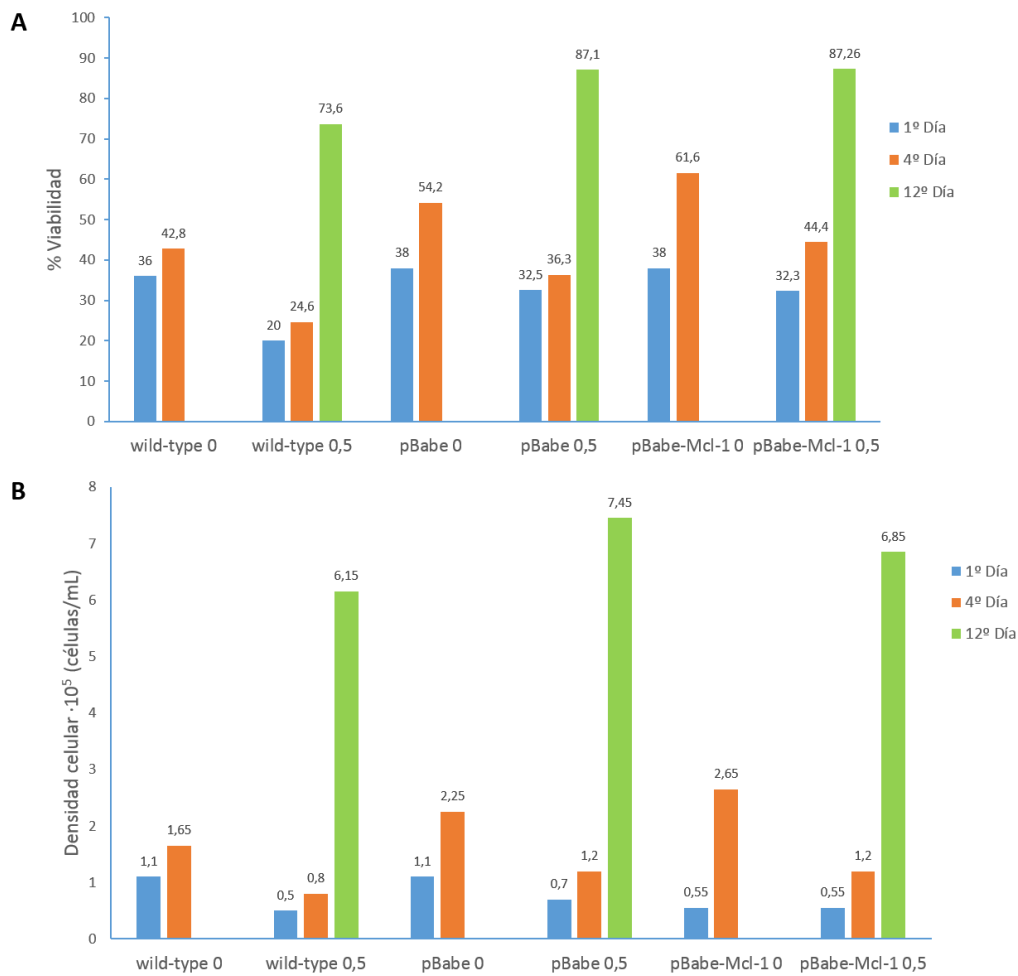


Figura A4: Recuperación de las células transfectadas por electroporación tras la selección con puromicina. Se sembraron 10^6 células/pocillo a una viabilidad alta (>90%) para el ensayo dosis-respuesta con puromicina. Se seleccionaron las células tratadas con $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina y se cultivaron para su recuperación. Durante los siguientes días se fue evaluando su viabilidad (A) y densidad celular (B).