



Universidad de Salamanca
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
(USAL-CSIC)

**La vía de ERK5-MEF2 en Mieloma Múltiple:
Implicaciones terapéuticas**

Stela Álvarez Fernández

2012



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “La vía de ERK5-MEF2 en Mieloma Múltiple: Implicaciones terapéuticas” presentada por la licenciada Dña. Stela Álvarez Fernández ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 11 de Octubre de 2012.

**A todos los que amo,
a los que me aman.**

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 15 |
| Introducción | 27 |
| Mieloma Múltiple: Generalidades | 27 |
| Epidemiología | 28 |
| Mieloma Múltiple: Los orígenes | 28 |
| Hematopoyesis..... | 28 |
| Linfopoyesis | 28 |
| Linfopoyesis B | 29 |
| Las gammapatías monoclonales..... | 32 |
| Fisiopatología del Mieloma Múltiple..... | 35 |
| Manifestaciones clínicas y criterios diagnósticos del MM | 35 |
| El desarrollo de la célula mielomatosa | 36 |
| Características citogenéticas | 37 |
| Traslocaciones frecuentes en MM | 38 |
| Otras alteraciones genéticas frecuentes en MM | 39 |
| Clasificación y tratamiento del MM | 39 |
| Clasificación de los MMs..... | 39 |
| Tratamientos..... | 41 |
| Nuevas terapias | 44 |
| Proteínas quinasas | 47 |
| Clasificación | 48 |
| Activación | 48 |
| Quinasas y cáncer | 49 |
| CDKs | 49 |
| CDKs y ciclo celular | 50 |
| CDKs y cáncer | 53 |
| CDKs y hematopoyesis | 54 |
| MAPKs | 55 |
| Clasificación | 55 |
| Activación..... | 56 |

| | |
|--|----|
| MAPKs en hematología | 57 |
| ERK1/2..... | 57 |
| JNK | 58 |
| p38..... | 58 |
| ERK3..... | 59 |
| ERK7..... | 59 |
| NLK | 59 |
| ERK5..... | 60 |
| Dominios funcionales | 60 |
| Activación de ERK5..... | 61 |
| Sustratos de ERK5..... | 62 |
| Papel biológico de ERK5..... | 62 |
| ERK5 en proliferación | 63 |
| ERK5 en supervivencia celular..... | 63 |
| ERK5 en tumorigénesis | 64 |
| ERK5 en el sistema inmune y en tumores hematológicos | 64 |
| Los factores de transcripción MEF2..... | 66 |
| Muerte celular y cáncer | 69 |
| Apoptosis | 69 |
| Caspasas | 70 |
| Vía extrínseca o de receptores de muerte | 72 |
| Vía intrínseca o mitocondrial | 73 |
| La familia BCL-2..... | 73 |
| Hipótesis y Objetivos | 81 |
| Material y Métodos | 85 |
| Reactivos y equipamiento | 85 |
| Anticuerpos | 86 |
| Cultivos celulares | 88 |
| Extracción de proteínas e inmunoprecipitación | 89 |
| Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot | 91 |
| Extracción de ARN total | 91 |
| Síntesis de ADNc a partir de ARN: RT-PCR | 92 |

| | |
|--|-----|
| Amplificación de ADNc mediante PCR | 92 |
| PCR cuantitativa o en tiempo real | 95 |
| Ensayo fosfatasa in vitro | 96 |
| Inmunofluorescencia | 96 |
| Transfección y Transducción | 97 |
| Transfección con fosfato cálcico | 97 |
| Transfección con JetPEI™ | 98 |
| Transfección por electroporación | 99 |
| Proliferación y viabilidad celular | 99 |
| Análisis del ciclo celular | 100 |
| Análisis de muerte celular por citometría | 101 |
| Fragmentación del ADN | 102 |
| Detección de pérdida de potencial de membrana | 102 |
| Fraccionamiento subcelular | 103 |
| Ensayo quinasa in vitro | 103 |
| Modelo de xenoinjerto de MM en ratones | 104 |
| Análisis estadístico | 105 |
| Resultados | 109 |
| Expresión de los factores de transcripción MEF2 en MM | 109 |
| Análisis de la localización subcelular de MEF2C y MEF2D | 119 |
| Estado de fosforilación de MEF2C en las células de MM | 120 |
| Efecto de diferentes terapias anti-mieloma sobre MEF2..... | 125 |
| Papel biológico de MEF2 en las células de mieloma | 126 |
| Inhibición multiquinasa con TG02: Estrategia terapéutica en MM | 131 |
| Efecto de TG02 sobre las líneas celulares de MM | 132 |
| Efecto de TG02 sobre muestras de pacientes de MM: ensayos ex vivo ... | 138 |
| Caracterización del mecanismo de acción de TG02 sobre la línea celular MM1S | 139 |
| Efecto de las citoquinas y las células estromales sobre la potencia de acción de TG02..... | 139 |
| Efecto de TG02 en combinación con otros fármacos | 142 |
| Efecto de TG02 sobre el ciclo celular | 142 |
| Efecto de TG02 sobre la inducción de apoptosis | 142 |

| | |
|--|-----|
| Efecto de TG02 sobre el daño al ADN | 149 |
| Efecto de TG02 sobre las vías de quinasas | 150 |
| Actividad antitumoral de TG02 in vivo | 154 |
| Discusión | 161 |
| Expresión de los factores MEF2 en células de MM | 161 |
| Papel biológico de los factores MEF2 en células de MM | 163 |
| Inhibición multiquinasa con TG02: estrategia terapeutica en MM | 168 |
| Conclusiones | 183 |
| Bibliografía | 187 |
| Agradecimientos | 219 |

ABREVIATURAS

Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AIF: *Apoptosis inducing factor* (factor inductor de apoptosis).

AL: Amiloidosis de cadenas ligeras o amiloidosis primaria.

AML: *Acute myeloid leukemia* (leucemia mieloide aguda).

AMPc: *Adenosine monophosphate cyclic* (adenosín monofosfato cíclico).

AMPK: *AMP activated protein kinase* (quinasa activada por AMP).

APAF-1: *Apoptosis activating factor 1* (factor activador de proteasas de apoptosis).

APC-C: *Anaphase promoting complex-cyclosome* (complejo promotor de la anafase-ciclosoma).

Apo2L: Ligando de Apo2.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AS: Antisentido.

ATF-1/2: *Activating transcription factor 1/2* (factor de transcripción activante 1/2).

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated* (Ataxia telangiectasia mutada).

ATO: *Arsenic trioxide* (trióxido de arsénico).

ATP: *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina).

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein* (proteína relacionada con Rad3 y ataxia telangiectasia).

BAD: *BCL2 antagonist of cell death* (antagonista de BCL2 de muerte celular).

Bax: *BCL2 associated protein X* (proteína X asociada a BCL2).

BCL2: *B-cell lymphoma-2* (linfoma 2 de células B).

BCR: *B-cell receptor* (receptor de célula B).

BCR/ABL: *Breakpoint cluster region/Abelson murine leukemia viral oncogene*.

bFGF: *Basic fibroblast growth factor* (factor básico de crecimiento de fibroblastos).

BH: BCL-2 homólogo.

BID: *BCL-2 interacting domain* (dominio de interacción con BCL-2).

BID-t: BID truncado.

BIM: *BCL2 interacting mediator of cell death* (mediador de interacción de BCL-2 de muerte celular).

BIR: *Baculovirus IAP repeat* (dominio IAP repetido de baculovirus).

β₂M: Beta 2 microglobulina.

BMK1: *Big-MAPK 1* (gran MAPK 1).

Borte: Bortezomib.

BRCA: *Breast cancer susceptibility protein* (proteína susceptible de cáncer de mama).

BrdU: *5-Bromo 2'-Deoxy-Uridine* (5-Bromo 2'-Deoxi-Uridina)

BSA: *Bovine serum albumine* (albumina sérica bovina)

CAD: *Caspase-activated deoxyribonuclease* (desoxirribonucleasa activada por caspasas).

CAK: *CDK-activating kinase* (quinasa activadora de CDKs).

CaMK: Quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina.

CARD: *Caspase recruitment domain* (dominio reclutador de caspasas).

CBP: *CREB-binding protein* (proteína de unión a CREB).

CD: *Cluster of differentiation* (grupo de diferenciación).

CDC: *Cell division cycle protein* (proteína de ciclo celular).

CDR: *Complementarity determining region* (region determinante de complementariedad).

CDK: *Cyclin-dependent kinase* (quinasa dependiente de ciclina).

CE: Célula estromal.

C/EBP: *CCAAT/enhancer binding protein* (proteína intensificadora de la unión a CCAAT).

CHK: *Checkpoint kinase* (proteína quinasa del checkpoint).

CIP/KIP: *CDK interacting protein/kinase inhibitory protein* (proteína de interacción con CDKs/proteína inhibidora de quinasas).

c-Fos: *Protooncogene c-Fos* (protooncogén c-Fos).

CK1: *Casein kinase 1* (caseína quinasa 1).

c-Kit/SCFR: *protooncogene c-Kit/stem cell growth factor receptor* (protooncogén c-Kit/receptor del factor de crecimiento de las células madre).

CKI: *Cyclin-dependent kinase inhibitor* (inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas).

CLK: *CDC-like kinase* (quinasa de tipo CDC).

c-MYB: *Cellular myeloblastosis* (mieloblastosis celular).

c-Myc: *Cellular myelocytomatosis* (mielomatosis celular).

- CM:** Componente monoclonal.
- CP:** Célula plasmática.
- CT:** *Threshold cycle* (ciclo umbral).
- CTD:** *Carboxyl-terminal domain* (dominio carboxilo terminal).
- CX43:** Conexina 43.
- CyBorD:** Ciclofosfamida, bortezomib, dexametasona.
- DED:** *Death-effector domain* (dominio efector de muerte).
- DEPC:** Dietilpirocarbonato.
- Dexa:** Dexametasona.
- DISC:** *Death-inducing signalling complex* (complejo inductor de muerte).
- DMEM:** *Dulbecco modified eagle medium* (medio de eagle modificado por dulbecco).
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DN:** Dominante negativo.
- dNTP:** *Deoxynucleotides triphosphate* (deoxinucleótidos trifosfato).
- DR:** *Death receptor* (receptor de muerte).
- DSBs:** *Double strand breaks* (rupturas de cadena doble).
- EDTA:** *Ethylenediaminetetracetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético).
- EEM:** Error estándar de la media.
- EGF:** *Epidermal Growth Factor* (factor de crecimiento epidérmico).
- EndoG:** Endonucleasa G.
- EPO:** Eritropoyetina.
- ErbB2:** *Erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog 2* (homólogo 2 del oncogén de la leucemia eritroblástica).
- ERK:** *Extracellular signal-regulated kinase* (quinasa regulada por señales extracelulares).
- ETS-1:** *Ets transcription factor 1* (factor de transcripción ETS1).
- E2F:** *Transcription factor E2F* (factor de transcripción E2F).
- FACS:** *Fluorescence-activated cell sorter* (separador de células activadas por fluorescencia).
- FADD:** *Fas-associated protein with death domain* (proteína con dominio de muerte asociado a Fas).
- FasL :** *Fas ligand* (ligando de Fas).
- FGF-2:** *Fibroblast growth factor 2* (factor de crecimiento fibroblástico de tipo 2).

- FGFR3:** *Fibroblast growth factor receptor 3* (receptor del factor de crecimiento fibroblástico de tipo 3).
- FISH:** *Fluorescence in situ hybridization* (hibridación fluorescente in situ).
- FITC:** *Fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína).
- FLT3:** *Fms-like tyrosine kinase 3* (tirosina quinasa similar a Fms-3).
- GAPDH:** *Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase* (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa).
- G-CSF:** *Granulocyte colony-stimulating factor* (factor estimulador de colonias en granulocitos).
- GFP:** *Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente).
- GM-CSF:** *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos).
- GMPc:** *Guanosine monophosphate cyclic* (guanosín monofosfato cíclico).
- GMSI:** Gammapatía monoclonal de significado incierto.
- GSK3:** *Glycogen synthase kinase* (quinasa sintetasa de glucógeno 3).
- GTPases:** *Guanine nucleotide triphosphatases* (trifosfatasa de guanosina).
- H:** *Heavy* (pesada).
- HA:** Hemaglutinina.
- HBS:** *HEPES-buffered saline* (tampón salino de HEPES).
- HDAC:** Histona deacetilasa.
- HIRA:** *Histone cell cycle regulation defective homolog A* (histona reguladora de defectos del ciclo homóloga A).
- H-MM:** Mieloma múltiple hiperdiploide.
- HRP:** *Horse radish peroxidase* (peroxidasa de rábano).
- HSCs:** *Hematopoietic stem cells* (células madre hematopoyéticas).
- HSP70:** *Heat shock protein 70* (proteína de choque térmico 70).
- HSSB:** *Human single-stranded DNA binding protein* (proteína de unión al ADN de cadena simple).
- IAP:** *Inhibitor of apoptotic protein* (proteína inhibidora de la apoptosis).
- IC:** Índice de combinación.
- IC₅₀:** *Inhibitory concentration 50* (concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular).

ICAD: *Inhibitor of CAD* (proteína inhibidora de CAD).

IFN- γ : Interferón gamma.

Igs: Inmunoglobulinas.

IGF-1: *Insulin-like growth factor-1* (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1).

IGF-1R: *Insulin-like growth factor-1 receptor* (receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina).

I κ B α : *Inhibitory kappa B* (inhibidor de kappa B).

IL-2: Interleuquina 2.

IL6: Interleuquina 6.

IMiDs: Drogas inmunomoduladoras.

INK4: *Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4* (inhibidor de CDK4).

IP: Inmunoprecipitación.

IP: Ioduro de propidio.

IRF4: *Interferon regulatory factor-4* (factor regulador de interferón 4).

ISS: *International staging system* (sistema de clasificación internacional).

JAK2: *Janus kinase 2* (quinasa janus 2).

JNK: *Jun N-terminal kinase* (quinasa Jun N-terminal).

L: *Light* (ligera).

Lena: Lenalidomida.

LIF: *Leukemia inhibitory factor* (factor inhibitorio de leucemia).

LLA: Leucemia linfoblástica aguda.

LMC: Leucemia mieloide crónica.

MAC: *Mitochondrial apoptosis-induced channel* (canal mitocondrial inducido por apoptosis).

MALT: *Mucosa-associated lymphatic tissue* (tejido linfoide asociado a mucosas).

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* (proteína quinasa activada por mitógeno).

MAPKAP: *MAP kinase-activated protein* (proteína quinasa activada por MAP quinasas).

MAPKK o MKK: *MAPK kinase* (quinasa MAPK).

MAPKKK o MKKK: *MAPK kinase kinase* (quinasa quinasa MAPK).

MCL-1: *Myeloid cell leukemia factor-1* (factor leucemia mieloide celular 1).

MCM4: *Mini-chromosome maintenance protein 4* (proteína minicrosomal de mantenimiento).

- M-CSF:** *Macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulador de colonias en macrófagos).
- MDM2:** *Murine double minute 2* (doble minuto murino 2).
- MEF2:** *Myocyte enhancer factor 2* (factor potenciador de miocitos 2).
- MEK5:** *MAP/ERK kinase 5* (MAP/ERK quinasa 5).
- Mel:** Melfalán.
- miARN:** Micro-ARN.
- MK5:** *MAPK-activated protein kinase-5* (quinasa 5 activada por MAP quinasa).
- MLL:** *Mixed-lineage leukemia* (leucemia de linaje mezclado).
- MM:** *Multiple myeloma* (mieloma múltiple).
- MMLV-RT:** *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney).
- MMSET:** *Multiple myeloma SET domain* (gen para el dominio SET del MM).
- MO:** Médula ósea.
- MP:** Melfalán-prednisona.
- MPTPs:** *Mitochondrial permeability transition pores* (poros de transición de permeabilidad mitocondrial).
- mTOR:** *Mammalian target of rapamycin* (diana de la rapamicina en mamíferos).
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio.
- MUT:** Mutado.
- MUM1:** *Multiple myeloma oncogene 1* (oncogén 1 de mieloma múltiple).
- MYC:** *Myelocytomatosis* (mielocitomatosis).
- MW:** Macroglobulinemia de Waldenström.
- NAIP:** *Neuronal apoptosis inhibitory protein* (proteína inhibidora de apoptosis neuronal).
- NES:** *Nuclear export sequence* (secuencia de exportación nuclear).
- NFAT:** *Nuclear factor of activated T cells* (factor nuclear de células T activadas).
- NFkB:** *Nuclear factor-kB* (factor nuclear kB).
- NH-MM:** Mieloma múltiple no hiperdiploide.
- NK:** *Natural killer* (asesinas naturales).
- NLS:** *Nuclear localization signal* (señal de localización nuclear).
- Pλ:** *Phosphatase lambda* (fosfatasa lambda).
- PA:** *Alkaline phosphatase* (fosfatasa alcalina).

- PAGE:** *Poliacrilamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida).
- PARP:** *Poly-(ADP-ribose) polymerase* (polimerasa poli-ADP-ribosa).
- PBMC:** *Peripheral blood mononuclear cell* (célula mononucleadas de sangre periférica).
- PBS:** *Phosphate buffered saline* (tampón salino de fosfato).
- PBS/CM:** PBS con CaCl₂ y MgCl₂.
- PBST:** PBS suplementado con 0,1% de Tritón X-100.
- PCR:** *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).
- PI3K:** *Phosphatidyl inositol 3-kinase* (fosfatidilinositol-3-quinasa).
- PKs:** *Protein kinases* (proteínas quinasas).
- PKA/B/C:** *Protein kinase A/B/C* (proteína quinasa A/B/C).
- Pm:** Peso molecular.
- PMSF:** *Phenyl-methyl sulphonyl fluoride* (fenil-metil sulfonilfluoruro).
- PR:** *Proline rich* (rico en prolina).
- PTs:** Poros de transición.
- PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog* (fosfatasa homóloga a la tensina).
- PTP-SL:** *Protein phosphatase tyrosine step-like* (fosfatasa tipo step).
- PVDF:** *Polyvinylidene fluoride* (fluoruro de polivinilideno).
- p21:** *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1* (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1).
- p27:** *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B).
- p53:** *Tumor supresor p53* (supresor tumoral p53).
- pRb:** *Phosphorylated retinoblastoma protein* (proteína del retinoblastoma fosforilada).
- qPCR:** *quantitative PCR* (PCR cuantitativa).
- Ral:** *Ras-related protein* (proteína relacionada con Ras).
- Ras:** *Rat sarcome* (sarcoma de rata).
- Rb:** Proteína del retinoblastoma.
- Rd:** Lenalidomida más dexametasona.
- Rho:** *Ras homolog* (homólogo a Ras).
- RPMI:** *Roswell Park Memorial institute medium* (medio del instituto Roswell Park Memorial).
- RSRF:** *Related to serum response factor* (factor relacionado con la respuesta a suero).
- RSK:** *Ribosomal S6 kinase* (quinasa ribosomal S6).

RTK: *Receptor tyrosine kinase* (receptor tirosina quinasa).

RT-PCR: *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa).

S: Sentido.

SBF: Suero bovino fetal.

SCID: *Severe combined immunodeficiency* (inmunodeficiencia severa combinada).

SCF: *Stem cell factor* (factor de célula madre).

SDF-1: *Stroma-derived factor-1* (factor derivado del estroma tipo 1).

SDS: *Sodium dodecyl sulphate* (dodecil sulfato sódico).

SGK: *Serum and glucocorticoid inducible kinase* (quinasa inducible por suero y glucocorticoides).

shRNA: *Short hairpin ribonucleic acid* (ácido ribonucleico de horquilla corta).

SMAC/DIABLO: *Second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP-binding protein with low PI* (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/ Proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico).

SP: Sangre periférica.

SRC: *Protooncogene tyrosine-protein kinase sarcome* (protooncogén de la proteína quinasa del sarcoma).

SRE: *Serum response element* (elemento de respuesta a suero).

SRF: *Serum response factor* (factor de respuesta a suero).

STAT: *Signal transducer and activator of transcription* (transductor de señales y activador de transcripción).

STE: Serina-treonina quinasas homólogas a las quinasas *sterile* de levaduras.

TAE: Tris-acetato-EDTA.

TBST: *Tris-buffered saline tween-20* (tampón salino tween 20).

TCF/LEF: *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (factores de transcripción de células T y de activadores linfoides).

TCR: *T-cell receptor* (receptor de células T).

TE: Tris-EDTA.

TGF- β : *Transforming growth factor β* (factor de crecimiento transformante de tipo β).

TK: *Tyrosin kinase* (tirosina quinasa).

TKL: *Tyrosin kinase like* (similares a tirosina quinasa).

T_m: *Melting temperature* (temperatura de fusión).

TMRE: *Tetramethylrhodamine ethyl ester* (etil éster tetrametilrodamina.)

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha* (factor de necrosis tumoral alfa).

TPO: Trombopoiatina.

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF).

TYK2: *Tyrosine kinase 2* (tirosina quinasa 2).

TYRO 3: *Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3* (receptor de la proteína quinasa TIRO 3).

UFC: Unidad formadora de colonias.

UFC-B: Unidad formadora de colonias blásticas.

UFC-L: Unidad formadora de colonias linfoide.

UFC-M: Unidad formadora de colonias mieloide.

UFC-ML: Unidad formadora de colonias linfomiéloides.

UR: Unidades relativas.

UV: Ultravioleta.

V: Bortezomib.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento vascular endotelial).

VMP: Bortezomib, melfalán, prednisona.

WT: *Wild type* (tipo salvaje).

XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (proteína inhibidora de apoptosis ligada al X).

X: Cualquier aminoácido.

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial.

σ : Desviación estándar.

