



Programa de Doctorat de Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Bienni 2005-2007

NOVES FUNCIONS DE LA PROTEÏNA FLOTILLIN-1 EN LA REGULACIÓ DEL PROCÉS DE MITOSI I DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DEL RECEPTOR NOTCH1

Memòria presentada per

Valentí Gómez Martínez

per optar al grau de

Doctor

per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Rosanna Paciucci, a la Unitat de Recerca Biomèdica de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

Tesi doctoral adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, sota la tutoria de la Dra. Adela Mazo.

Dra. Rosanna Paciucci
directora de tesi

Dra. Adela Mazo
tutora de tesi

Valentí Gómez
autor

Barcelona, Abril de 2009

ÍNDEX



Índex de figures	_____	pàg 17
Índex de taules	_____	pàg 20
Llistat d'abreviatures	_____	pàg 21
Introducció		
0. Pròleg	_____	pàg 31
1. <i>Lipid rafts</i>	_____	pàg 32
1.1. Tipus de <i>lipid rafts</i>	_____	pàg 33
1.2. Funcions dels <i>lipid rafts</i>	_____	pàg 36
2. Flotillin-1	_____	pàg 41
2.1. Introducció. Aspectes evolutius	_____	pàg 41
2.2. Família SPFH	_____	pàg 41
2.3. Flotillin-2/Reggie-1	_____	pàg 42
2.4. Flotillin-1/Reggie-2	_____	pàg 44
2.4.1. Descripció del gen i la proteïna	_____	pàg 44
2.4.2. Relacions entre Flotillin-1 i Flotillin-2	_____	pàg 46
2.4.3. Síntesi i localització de Flotillin-1	_____	pàg 47
2.4.4. Funcions de Flotillin-1	_____	pàg 49
3. Notch1	_____	pàg 53
3.1. Introducció	_____	pàg 53
3.2. Descripció de la família Notch1	_____	pàg 54
3.3. Ruta de transducció regulada per Notch1	_____	pàg 57
3.4. Expressió gènica regulada per Notch1	_____	pàg 61
3.5. Mecanismes reguladors de la via de transducció de senyals de Notch1.	_____	pàg 63
3.6. Senyalització Notch dependent/ CSL independent	_____	pàg 65

4. Evidències de la participació de Flotillin-1 en la via de senyalització de Notch	pàg 68
5. Cicle cel·lular i mitosi	pàg 70
5.1. Introducció	pàg 70
5.2. Fases del cicle	pàg 71
5.3. Mitosi	pàg 72
5.4. Mecanismes reguladors de la mitosi	pàg 74
5.4.1. Fosforilació. Aurora cinases.	pàg 74
5.4.2. Ubiquitinació. Complex APC/C.	pàg 78
5.5. Check-points del cicle cel·lular	pàg 81
6. Objectius	pàg 87

Materials i mètodes

7. Cultius cel·lulars	pàg 91
7.1. Línies cel·lulars	pàg 91
7.2. Manteniment de cultius cel·lulars	pàg 91
7.3. Transfecció cel·lular	pàg 92
7.4. Transducció cel·lular	pàg 94
7.5. Tractaments cel·lulars	pàg 95
7.6. Cicle cel·lular	pàg 97
8. Manipulació de RNA	pàg 97
8.1. Extracció de RNA	pàg 97
8.2. Electroforesi d'àcids nucleics	pàg 98

8.3. RT-PCR (<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>)	pàg 98
8.4. Real Time PCR (RTqPCR)	pàg 99
8.5. Mecanismes de <i>knock-down</i> gènic. siRNAs i shRNAs	pàg 103
9. Manipulació de DNA	pàg 107
9.1. Vectors i constructes	pàg 107
9.2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	pàg 109
9.3. Clonatge de DNA	pàg 111
9.3.1. Digestió	pàg 111
9.3.2. Purificació	pàg 112
9.3.3. Lligació	pàg 113
9.3.4. Bacteris competents.	pàg 113
9.3.5. Preparació DNA plasmídic	pàg 115
9.3.6. Seqüenciació	pàg 115
9.4. Mutagènesi dirigida	pàg 116
10. Proteïna	pàg 117
10.1. Extracció de proteïna	pàg 117
10.1.1. Total	pàg 117
10.1.2. Fosforilada	pàg 118
10.1.3. Separació fracció nuclear/ no nuclear	pàg 118
10.1.4. Gradient de densitat de sacarosa	pàg 119
10.1.5. Immunoprecipitació	pàg 120
10.2. Quantificació de proteïna	pàg 121
10.3. Anàlisi de proteïnes per SDS-PAGE i <i>Western Blot</i>	pàg 121
10.4. Coimmunoprecipitació	pàg 129
10.5. <i>Pull-down</i>	pàg 130

11. Immunofluorescència	_____	pàg 132
12. Assajos de luciferasa	_____	pàg 136
13. Assajos d'apoptosi (TUNEL)	_____	pàg 137
14. Immunoprecipitació de cromatina	_____	pàg 138
15. Assajos de proliferació	_____	pàg 143
Resultats		
A. Sobreexpressió i <i>knock-down</i> de Flotillin-1		
16. Sobreexpressió de Flotillin-1. Caracterització de les diferents formes mutants sobreexpressades	_____	pàg 147
17. <i>Knock-down</i> de Flotillin-1. Especificitat d'acció	_____	pàg 148
B. Paper de Flotillin-1 en la regulació de Notch1		
18. Flotillin-1 regula l'activitat transcripcional de Notch1	_____	pàg 150
18.1. Efecte de la inhibició de Flotillin-1	_____	pàg 150
18.2. Efecte de la disrupció de <i>lipid rafts</i>	_____	pàg 152
18.3. Efecte de la sobreexpressió de formes exògenes de Flotillin-1	_____	pàg 153
18.4. Efecte de l'estratègia combinada: inhibició de Flotillin-1 endògena i sobreexpressió de formes exògenes de Flotillin-1	_____	pàg 153
19. Interacció entre Flotillin-1 i Notch1	_____	pàg 155
19.1. Coimmunoprecipitació	_____	pàg 155
19.2. Colocalització	_____	pàg 156
19.3. Cosedimentació en gradient de densitat	_____	pàg 158
20. Flotillin-1 regula la localització subcel·lular de Notch1	_____	pàg 158

20.1. Inhibició de Flotillin-1 i localització subcel·lular de Notch1	pàg 159
20.2. Sobreexpressió de formes mutants de Flotillin-1	pàg 162
21. Paper de Flotillin-1 a nucli	pàg 163
21.1. Presència de Flotillin-1 en els promotors dels gens regulats per Notch1 (Hes1 i Hey1)	pàg 163
21.2. Presència de Flotillin-1 en el promotor de Hey1 formant complex amb Notch1	pàg 164
C. Paper de Flotillin-1 en el control d'Aurora cinasa B i la progressió del cicle cel·lular	
22. Localització de Flotillin-1 al llarg de la progressió de la mitosi	pàg 165
22.1. Colocalització amb cinetocors	pàg 166
22.2. Colocalització amb microtúbuls	pàg 166
23. Efectes fenotípics de la depleció de Flotillin-1	pàg 168
23.1. Figures mitòtiques aberrants	pàg 169
23.2. Temps de mitosi i distribució de fases mitòtiques	pàg 170
23.3. Apoptosi	pàg 172
23.4. Activació de proteïnes del <i>checkpoint</i> mitòtic	pàg 173
24. Comparació dels efectes fenotípics de les inhibicions de Flotillin-1 i Aurora cinasa B	pàg 174
25. Interacció de Flotillin-1 amb proteïnes del complex CPC	pàg 175
25.1. Colocalització de Flotillin-1 amb Aurora B	pàg 175
25.2. Coimmunoprecipitacions	pàg 177
25.3. <i>Pull-down</i>	pàg 179

25.4. Cosedimentació en gradient de densitat	pàg 180
26. Regulació dels nivells i activitat d'Aurora cinasa B	pàg 181
26.1. Depleció de Flotillin-1	pàg 181
26.2. Sobreexpressió de Flotillin-1	pàg 184
27. Regulació de la degradació d'Aurora cinasa B per la via del proteasoma	pàg 185
Discussió	
28. Discussió	pàg 189
29. Paper de Flotillin-1 en la via regulada per Notch1	pàg 189
29.1. Influència funcional de Flotillin-1 sobre Notch1. Punt de la ruta on es localitza aquesta influència	pàg 189
29.2. Interacció de Flotillin-1 amb Notch1	pàg 191
29.3. Flotillin-1 regula el transport citoplasmàtic de Notch1	pàg 193
29.4. Flotillin-1 en el complex transcripcional	pàg 195
30. Paper de Flotillin-1 sobre la funció d'Aurora cinasa B	pàg 198
30.1. Relació de Flotillin-1 amb el complex CPC	pàg 198
30.2. Interacció entre Flotillin-1 i Aurora B	pàg 199
30.3. Regulació de Flotillin-1 sobre Aurora B	pàg 201
31. Discussió final. Funció de Flotillin-1	pàg 203
Conclusions	pàg 209
Bibliografia	pàg 213

Introducció

Figura 1. Estructura i composició dels <i>lipid rafts</i> _____	pàg 32
Figura 2. Diferències estructurals entre els s tipus de <i>lipid rafts</i> _____	pàg 36
Figura 3. Estructura genòmica del gen de Flotillin-1 humana _____	pàg 44
Figura 4. Dominis estructurals de Flotillin _____	pàg 46
Figura 5. Estructura de Notch _____	pàg 55
Figura 6. Activació del complex transcripcional per la via de senyalització de Notch1 _____	pàg 60
Figura 7. Via de senyalització de Notch1 _____	pàg 61
Figura 8. Relació entre les vies de Notch i Ras _____	pàg 66
Figura 9. Cicle cel·lular _____	pàg 71
Figura 10. <i>Chromosome passenger proteins</i> _____	pàg 75
Figura 11. Complex APC/C _____	pàg 79
Figura 12. <i>Checkpoint</i> mitòtic _____	pàg 82

Materials i mètodes

Figura 13. Fases d'amplificació per PCR _____	pàg 97
Figura 14. Corbes d'amplificació _____	pàg 99
Figura 15. Estratègies de silenciament gènic _____	pàg 102
Figura 16. Muntatge de la transferència- <i>Western Blot</i> _____	pàg 122
Figura 17. Reacció de luciferasa _____	pàg 134
Figura 18. Immunoprecipitació de cromatina _____	pàg 137

Resultats

Figura 19. Localització subcel·lular dels constructes de Flotillin-1 _____	pàg 146
Figura 20. <i>Knock-down</i> de Flotillin-1 _____	pàg 147
Figura 21. Disseny experimental dels experiments de luciferasa _____	pàg 148
Figura 22. Efecte dels siRNA sobre l'activitat transcripcional de Notch1- ΔE _____	pàg 149
Figura 23. Efecte dels siRNA sobre l'activitat transcripcional de Notch1-ICN _____	pàg 150

Figura 24. Efecte de la disrupció de <i>lipid rafts</i> sobre l'activitat transcripcional de Notch1- Δ E	pàg 151
Figura 25. Efecte de la sobreexpressió de Flotillin-1 sobre l'activitat transcripcional de Notch1- Δ E	pàg 152
Figura 26. Efecte de la sobreexpressió de Flotillin-1 i la inhibició de Flotillin-1 endògena sobre l'activitat transcripcional de Notch1- Δ E	pàg 153
Figura 27. Coimmunoprecipitació entre Flotillin-1 i Notch1	pàg 154
Figura 28. Colocalització entre Flotillin-1 i Notch1- Δ E	pàg 155
Figura 29. Colocalització entre Flotillin-1 i Notch1-ICN	pàg 155
Figura 30. Cosedimentació en gradient de densitat de Flotillin-1 i Notch1	pàg 156
Figura 31. Fraccionaments cel·lulars i expressió de Notch1 en situació d'interferència de Flotillin-1	pàg 157
Figura 32. Exemples de localització subcel·lular de Notch1	pàg 158
Figura 33. Localització subcel·lular de Notch1 en absència de Flotillin-1	pàg 159
Figura 34. Localització subcel·lular de Notch1- Δ E en presència de Flotillin-1 exògena i amb presència o absència de Flotillin-1 endògena	pàg 160
Figura 35. Localització subcel·lular de Notch1-ICN en absència de Flotillin	pàg 161
Figura 36. ChIP de Hes1 i Hey1 amb Flotillin-1 i Notch1	pàg 162
Figura 37. ReChIP de Hey1 amb Flotillin-1 en combinació amb Notch1	pàg 163
Figura 38. Immunofluorescència de Flotillin-1 i CREST	pàg 165
Figura 39. Immunofluorescència de Flotillin-1 i tubulina	pàg 166
Figura 40. Aberracions cromosòmiques provocades per l'absència de Flotillin-1	pàg 168
Figura 41. Índex mitòtic i distribució de fases de la mitosi	pàg 169
Figura 42. Seqüència de divisió d'una cèl·lula interferida per Flotillin-1	pàg 170
Figura 43. Anàlisi de TUNEL de cèl·lules inhibides per Flotillin-1	pàg 171
Figura 44. Immunofluorescència de MAD2 i CREST en cèl·lules inhibides per Flotillin-1	pàg 172
Figura 45. Comparació dels efectes de les inhibicions de Flotillin-1 i Aurora B	pàg 173

Figura 46. Immunofluorescència de Flotillin-1 i Aurora B _____	pàg 174
Figura 47. Coimmunoprecipitacions entre Flotillin-1 i les proteïnes del complex CPC: Aurora B, INCENP, survivin i borealin _____	pàg 175
Figura 48. Sincronització de la línia HeLa i coimmunoprecipitacions entre Aurora B i Flotillin-1 en les diferents fases _____	pàg 176
Figura 49. GST- <i>pull down</i> entre Aurora B i Flotillin-1 _____	pàg 178
Figura 50. Cosedimentació d'Aurora B i Flotillin-1 en gradient de densitat de sacarosa _____	pàg 179
Figura 51. Efectes de la inhibició de Flotillin-1 sobre l'expressió i l'activitat d'Aurora B _____	pàg 181
Figura 52. Immunofluorescència d'Aurora B i CREST en absència de Flotillin-1 _____	pàg 182
Figura 53. Efectes de la sobreexpressió de Flotillin-1 en l'expressió d'Aurora B _____	pàg 183
Figura 54. Efectes de la inhibició del proteasoma sobre l'expressió d'Aurora B _____	pàg 184
 Discussió	
Figura 55. Model hipotètic sobre el paper de Flotillin-1 en la via de senyalització de Notch1 _____	pàg 194
Figura 56. Dominis estructurals de les proteïnes de la família Aurora cinasa _____	pàg 199
Figura 57. Dominis estructurals i modelatge 3D de Flotillin _____	pàg 202
Figura 58. Dominis PDZ _____	pàg 203

Taula 1. Complexos Cdk-ciclina _____	pàg 70
Taula 2. Quantitats i volums de transfecció amb TransIT [®] -HeLaMONSTER [®] Transfection Kit _____	pàg 91
Taula 3. Quantitats i volums de transfecció amb Lipofectamine [™] Plus Reagent _____	pàg 92
Taula 4. <i>Primers</i> utilitzats en RTqPCR _____	pàg 101
Taula 5. Seqüències utilitzades en la síntesi i transfecció de siRNA _____	pàg 104
Taula 6. Seqüències utilitzades en la transducció de shRNA _____	pàg 105
Taula 7. Vectors utilitzats per a la síntesi de proteïnes recombinants _____	pàg 107
Taules 8a i 8b. Solucions utilitzades en la preparació de gels de poliacrilamida _____	pàg 121
Taula 9. Anticossos primaris per <i>Western Blot</i> _____	pàg 125
Taula 10. Anticossos secundaris per <i>Western Blot</i> _____	pàg 126
Taula 11. Anticossos primaris per immunofluorescència _____	pàg 132
Taula 12. Anticossos secundaris per immunofluorescència _____	pàg 133
Taula 13. <i>Primers</i> utilitzats en les PCRs corresponents als experiments d'immunoprecipitació de cromatina _____	pàg 141

AG – aparell de Golgi

Ala – alanina

ANKR – repeticions anquirina

APC – cèl·lules presentadores d'antigen

APC/C - *Anaphase promoting complex/cyclosome*

APP – proteïna β -amiloide

APs – proteïnes adaptadores d'ensamblatge

ATCC - *American Type Culture Collection*

bHLH – *basic helix-loop-helix*

BIND - *Biomolecular Interaction Network Database*

bp – *base pair*

BSA – albúmina sèrica bovina

Bub - *Budding uninhibited by benzimidazole*

°C – graus centígrads

Cav- Caveolin

CDK – cinasa dependent de ciclina

cDNA – DNA còpia

ChIP – immunoprecipitació de cromatina

CIP - *Cdk inhibitory protein*

CIR - *CBF interacting repressor*

CKIs - proteïnes inhibidores de ciclin-cinases

CME – *clathrin mediated endocytosis*

CTx – toxina colèrica

CPC - *Chromosome passenger complex*

CREST - calcinosi, fenomen de Raynaud, dismotilitat esofàgica, esclerodactília i telangectàsia

CSC-1 - *Chromosome segregation and cytokinesis defective-1*

CSL - *C-promoter binding factor 1*

Ct - *cycle threshold*

CTL - *control*

Cyc – *ciclina*

Cys – *cisteïna*

Da - *dalton/s*

ΔE – *Notch ΔE*

D-box - *destruction box*

DHRs - *Discs-large homology regions*

DIGs – *detergent insoluble glycolipids*

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO - *dimethyl sulfoxide*

DNA – *àcid desoxiribonucleic*

DRMs – *detergent resistant membranes*

Dsh – *Dishevelled*

DSL – *Delta/Serrate ligands*

DTT - *ditiotreitòl*

Dx – *Deltex*

EA – *repeticions d'àcid glutàmic i alanina*

EDTA - *ethylene diamine tetra acetate*

EGF-like/ ELRs - *epidermal growth factor-like repeats*

EGFR – *Epithelial growth factor receptor*

EGTA - *Ethylene glycol-bis(2 -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*

eNOS – *òxid nítric sintasa epitelial*

ER – *reticle endoplasmàtic*

E(Spl) - *Enhancer of Split*

EST – *expressed sequence tag*

EtBr – bromur d'etidi

FBS – *fetal bovine serum*

Flot - Flotillin

GEEC - *GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment*

GFP – *Green fluorescent protein*

GICs – membranes de l'aparell de golgi

Gly – glicina

GPI – glicofosfatidilinositol

GST – *glutathione S-transferase*

GTP – guanosin trifosfat

h – hora

HA – hemaglutinina

HDAC - histona deacetilasa

HAT - histona acetiltransferasa

HRP - *horse radish peroxidase*

Hrt - *Hairy related*

Hsp - *Heat shock protein*

IAP - *Inhibitor of apoptosis protein*

ICN – *intracellular Notch*

Ig – immunoglobulina

IL – interleucines

INCENP - *Inner centromere protein antigens 135/155kDa*

INK4 - *Inhibitors of kinase 4*

IP - immunoprecipitat

IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

Kb – *kilobase pair*

KDa – quilodalton/s

KHz – quiloherz

K.O. – *knock out*

LB – *Luria Broth*

LDL – *Low density lipoprotein*

LNG - Lin-12, Notch, Glp-1

LSM - *confocal laser scanning microscopy*

Lys – lisina

M – *molar*

Mad - *Mitotic arrest deficient*

MAML - *Mastermind-like*

M β CD - metil-ciclodextrines

MCAK - *Mitotic centromere-associated kinesin*

MEM – *non-essential aminoacids*

MES - *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)*

μ g, μ l, μ M – microgram, microlitre , micromolar

mg, ml, mM – mil·ligram, mil·lilitre, mil·limolar

MHC – complex major d'histocompatibilitat

min – minut

MPF - *Maturation-promoting factor*

mRNA – RNA missatger

MOIs - *multiplicity of infection*

MTOC – centre organitzador de microtúbuls

NB – *not bound*

N-CoR - *nuclear receptor co-repressor*

NGF – *>Nerve growth factor*

NICD – *Notch intracellular domain*

NLS – *nuclear localization signal*

ng, nM, nm – nanogram, nanomolar, nanòmetre

NT – no transfectat

ONPG - *ortho-Nitrophenyl- β -galactoside*

PAGE – electroforesi en gel de poliacrilamida

PBS – *phosphate buffered saline*

PHB - *Prohibitin*

Plk - *Polo-like kinase*

PKA – *protein kinase A*

PCR – *polymerase chain reaction*

PDZ - PSD-95(SAP90)/Discs-large/ZO-1.

P-H3 – histona H3 fosforilada

PI – iodur de propidi

PP - proteïnes fosfatases

PS – Presenilina

PTOV1 – *Prostate tumour overexpressed 1*

PVDF - *polyvinylidene fluoride*

RISC - *RNA induced silencing complex*

RNA – àcid ribonucleic

RNAi - RNA d'interferència

RT – temperatura ambient (*room temperature*)

RTK/P - *Receptor Tyrosin Kinase/Phosphatase*

RT-PCR - *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

RTqPCR – *Real Time PCR*

s – segon

SDS – *sodium dodecyl sulfate*

Ser – serina

Shh – *Sonic hedgehog*

siRNA – *small interference RNA*

shRNA – *short hairpin RNA*

SKIP - *Ski-interacting protein*

SMAC – *cluster d'activació supramolecular*

SMC - *structural maintenance of chromosomes*

SMRT - *silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*

SoHo – *sorbin homology*

SPFH – *Stomatin-Prohibitin-Flotillin-HflK/C*

Src cinasa – proteïna cinasa del virus del Sarcoma de Rous

Su (Dx) – *Supressor or Deltex*

Su (H) – *Supressor of Hairless*

SV40 – *simian virus 40*

TACE – *TNF α converting enzyme*

T-ALL - leucèmia limfocitària aguda de cèl·lules T

TBS – *Tris buffered saline*

TBST – TBS- Tween

TCA – àcid tricloroacètic

TCR – receptor de cèl·lules T

TGF- β - *Transforming growth factor β*

Thr – treonina

TUNEL- *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*

Tyr – tirosina

Ub - ubiquitina

UTR – *untranslated region*

UV – llum ultraviolada

V – volt

Val – valina

VGLUT1 - *Vesicular glutamat transporter*

W - *vat*

WB - *Western Blot*

Wg - *Wingless*

