



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

DISCUSSIÓ



28. DISCUSSIÓ

Al llarg dels darrers anys, la concepció de les estructures de membrana conegudes com *lipid rafts*, així com dels seus components entre els quals trobem Flotillin-1, ha evolucionat considerablement.

De la primera accepció com a proteïna estructural emprada per definir regions característiques de membrana plasmàtica, s'evolucionà a una molt més dinàmica en la qual Flotillin-1 participava dels diferents processos de reclutament de molècules senyalitzadores o adaptadores dins del nou concepte de **plataforma senyalitzadora de membrana** amb que s'anomenaven els *rafts* lipídics. Aquesta visió permeté relacionar Flotillin-1 amb nombroses vies de senyalització que tenien el seu origen en receptors de membrana plasmàtica.

El següent avenç en el coneixement de la proteïna es produí amb l'increment del seu espectre de localitzacions subcel·lulars. Tot i ser el constituent principal dels *lipid rafts* no caveolars, la seva presència s'ha associat de forma paral·lela a les caveoles amb fenòmens d'endocitosi, transport i *sorting* intracel·lular.

El treball previ realitzat en el nostre laboratori permeté afegir la localització nuclear a les anteriorment descrites, obrint un ventall de noves possibilitats de funció per a Flotillin-1. S'observà també un paper clau en afavorir la proliferació de diferents línies cel·lulars. D'aquesta manera, quedava confirmada la transició de Flotillin-1 de "proteïna estructural" a "funcional".

En base a aquests antecedents l'objectiu del treball fou esbrinar per quines vies de senyalització i sobre quines fases del cicle Flotillin-1 exercia aquest control sobre la proliferació cel·lular.

29. PAPER DE FLOTILLIN-1 EN LA VIA REGULADA PER NOTCH1

29.1 Influència funcional de Flotillin-1 sobre Notch1. Punt de la ruta on es localitza aquesta influència.

La via de senyalització regulada per Notch1 tradicionalment s'ha pogut subdividir en tres estadis en funció dels processos que hi tenen lloc i de la localització subcel·lular on aquests es duen a terme:

- Membrana: processat del receptor. La forma S1 (heterodímer de membrana) pateix consecutivament l'acció de la metal·loproteasa TACE i del complex γ -secretasa originant-se les formes ΔE (S2) i ICN (S3).

- Citoplasma: Notch1-ICN ha d'ésser transportat des del punt de processat pel complex de les presenilines fins a nucli. Els processos endocítics i de transport es troben, a dia d'avui, poc elucidats.
- Nucli: reclutament de coactivadors i acció com a factor de transcripció, en molts casos, de gens que al seu torn també actuaran com a factor de transcripció. D'aquesta manera exerceix un control sobre els processos de desenvolupament, determinació i diferenciació cel·lulars, proliferació i apoptosi, etc.

Es dissenyà un sistema fent servir el *reporter gene* luciferasa fusionat al promotor del gen Hes1 (construcció cedida per la Dra. Anna Bigas), el qual es troba sota el control del complex transcripcional de Notch1. El sistema s'activà de forma exògena mitjançant la transfecció transitòria de les formes Notch1- ΔE o ICN i s'analitzaren els efectes de pèrdua o guany de funció de Flotillin-1. Els canvis en l'expressió de luciferasa confirmen la presència de Flotillin-1 en el sistema Notch1, amb una acció positiva sobre aquest doncs la inhibició de Flotillin-1 implica un descens en l'activitat transcripcional (figura 22). La comparació entre les formes S2 i S3 mostra una acció de Flotillin sobre Notch1- ΔE però no sobre Notch1-ICN permetent situar l'acció de Flotillin-1 en un moment previ a l'entrada de Notch1 a nucli (figures 22 i 23) però posterior a la unió entre receptor i lligand i al tall proteolític dut a terme per la metal·loproteasa TACE. Els agents disruptors del colesterol funcionen com un sistema alternatiu per disminuir els nivells d'expressió de Flotillin-1 i mostren el descens en l'activitat transcripcional de Notch1. Aquest resultat confirma l'acció de Flotillin-1 sobre Notch1 en el sistema de membranes (figura 24).

La sobreexpressió de formes exògenes afegeix noves dades al sistema. D'una banda, mitjançant el mutant Flot-HA es confirma la necessitat d'una Flotillin-1 amb capacitat per translocar a nucli perquè el sistema de Notch1 actuï. De l'altra, GFP-NLS-Flot1 planteja noves possibilitats.

La major presència de Flotillin-1 nuclear afavoreix la transcripció de Hes1-luciferasa, però aquesta forma no és capaç de rescatar el fenotip d'inhibició de Flotillin-1 endògena. Les formes fusionades a la seqüència NLS de l'antigen T del virus SV40 presenten taxes molt elevades d'entrada a nucli així com un temps de permanència major que altres seqüències conegudes (Hu et al, 2005) i per aquest motiu el fenotip observable de la forma GFP-NLS-Flot1 és totalment nuclear i no té un comportament comparable a la proteïna endògena. D'altra banda, el fet que no puguem recuperar el

fenotip originat per la supressió de Flotillin-1 endògena indica que no té la mateixa funcionalitat i únicament en el cas que la proteïna endògena es troba present, és capaç de generar un augment de la transcripció. Una hipòtesi per explicar aquest resultat seria un efecte artificial provocat per l'epítop fusionat a Flotillin-1, el qual generaria un canvi estructural anòmal en la proteïna o emmascararia un possible domini d'unió a les molècules coactivadores del procés de transcripció, funcionant únicament a nivell de transport. En conjunt, aquests resultats permeten el plantejament de dues hipòtesis de funció, no excloents entre elles:

- (i) Flotillin-1 permet el processat i transport de Notch1 des de la membrana plasmàtica a nucli i l'entrada en aquest.
- (ii) Flotillin-1 realitza una funció dins del complex activador de la transcripció.

29.2 Interacció de Flotillin-1 amb Notch1

Demostrada la influència que exerceix Flotillin-1 sobre la via de senyalització de Notch1 s'estudià si aquesta es donava de forma directa o indirecta. Exemples de regulació directa són els que realitzen els exemples ja coneguts com Deltex, proteïna que s'uneix a Notch1 en el seu recorregut citoplasmàtic amb efectes positius o negatius sobre la via en funció del model animal o cel·lular estudiat (Fuwa et al, 2006). D'altra banda, la relació de Notch1 amb diferents vies senyalitzadores es pot donar també per la regulació que executen a través de molècules intermediàries. Per exemple, Hes1 s'associa amb JAK2 i STAT3 activant-se d'aquesta manera el sistema JAK/STAT, essencial en el manteniment de les cèl·lules radials de la glia i la diferenciació dels astròcits en el desenvolupament del sistema nerviós regulat Notch (Kamakura et al, 2004).

La immunoprecipitació de Flotillin-1 mostrà una interacció amb Notch1, conclouent que ambdues proteïnes es troben localitzades en el mateix complex. La coimmunoprecipitació recíproca fent servir les formes Notch1- ΔE i Notch1-ICN (positiva en ambdós casos per HA-Flot1) confirma que Flotillin-1 és present en el complex des del processat del receptor immediatament posterior a la unió a lligand (figura 27). Els assajos d'immunofluorescència amb la forma HA-Flot confirmen per un segon mètode aquesta associació (figura 28).

La colocalització de les formes ΔE i ICN amb els diferents constructes de Flotillin-1 presenta diferències. Mentre que la forma ΔE tendeix a colocalitzar amb Flotillin-1 en les regions on aquesta es troba dirigida per les diferents alteracions, bé sigui membrana o nucli, la forma ICN presenta una localització independent d'aquests constructes (figures 28 i 29). ICN és una forma constitutivament activa, de localització exclusivament nuclear o perinuclear (Hooper et al, 2007). Per tant, no requereix del contacte amb el complex γ -secretasa i d'una etapa de localització en membrana. No obstant, el fet que Notch-ICN-myc i HA-Flot1 coimmunoprecipitin en extractes cel·lulars de la línia HeLa es pronunciaria a favor de la hipòtesi que contempla Flotillin-1 com un element regulador del complex transcripcional o com un element necessari per al procés concret de translocació nuclear (encara que no han estat descrits senyals de localització nuclear en la seqüència de Flotillin-1). No s'ha de descartar la possibilitat que aquesta interacció sigui un element artefactual provocat per l'elevada quantitat d'ambdues proteïnes a la cèl·lula transfectada.

La dependència de Flotillin-1 mostrada per la forma Notch- ΔE posa de manifest la necessitat de situar l'etapa inicial de la regulació que Flotillin-1 exerceix sobre la via de senyalització de Notch1. La localització tant de Flotillin-1 com dels components del complex γ -secretasa en *lipid rafts* (Urano et al, 2005) feu pensar en la incorporació de Flotillin-1 al sistema en aquest punt de transformació del receptor de la forma S2 a S3. Per demostrar la importància que els *lipid rafts* poden exercir sobre la via de senyalització de Notch1 es realitzà en *C.elegans* una cerca de molècules reguladores del *pathway* de LIN-12 (homòleg de Notch) obtenint-se un resultat positiu per al gen bre-5, homòleg al seu torn del gen de *Drosophila* Brainiac. Bre-5/Brainiac catalitza una etapa en la síntesi de glicoesfingolípid, components bàsics de *lipid rafts*. Reduint l'activitat dels gens involucrats en aquesta síntesi, i per tant, reduint la capacitat d'ensamblatge de les plataformes senyalitzadores que constitueixen els *rafts* lipídics, s'aconseguia suprimir els efectes de l'activitat constitutiva de LIN-12 (Katic et al, 2005).

Existeixen nombroses evidències més que relacionen aquestes estructures de membrana plasmàtica amb la via de senyalització de Notch. L'afectació de la composició, estructura i també funcionalitat (endocitosi) dels *lipid rafts* caveolars en cèl·lules deficientes per presenilina confirmen la presència del complex γ -secretasa en aquest tipus d'estructures de membrana (Wood et al, 2005). La mateixa forma Notch1-ICN activada

per interacció amb β -integrines assoleix el nucli mitjançant un sistema endocític dependent de Caveolin en cèl·lules ES derivades de sistema nerviós central (Campos et al, 2006). Addicionalment, les subunitats del complex γ -secretasa Nicastrin i APH-1 presenten modificacions per palmitoilació, tret característic d'aquelles proteïnes vinculades a *lipid rafts* (de forma reversible) (Cheng et al, 2009).

No obstant, existeixen també mostres de localització en altres regions de membrana plasmàtica de les proteïnes presenilines així com de les unitats reguladores, i també de les diferents formes de la proteïna Notch1. L'aplicació de protocols d'activació o inhibició de la ruta provoquen canvis en l'expressió d'aquestes variants de Notch1 però en regions diferents als *rafts* lipídics (Vetrivel et al, 2005). Mutants de la proteïna Nicastrin contenint senyals de direccionalització a reticle endoplasmàtic, trans-Golgi *network*, lisosomes o membrana plasmàtica han mostrat activitat γ -secretasa en les diferents localitzacions i amb diferències en els substrats i productes generats, suggerint que el microambient compartimental juga un paper important en l'activitat i especificitat d'acció del complex (Morais et al, 2008). S'ha arribat a observar la presència del complex actiu en compartiments cel·lulars tan diversos com en els centres organitzadors de microtúbuls (MTOCs) o centrosomes (Nizzari et al, 2007), així com en diferents compartiments de la ruta endocítica: endosomes, cossos multivesiculars i lisosomes (Pasternak et al, 2003).

Els resultats del nostre propi fraccionament per centrifugació en gradient de densitat no mostren coincidència en la localització de Notch1 i Flotillin-1 (figura 30) en la fracció corresponent a *lipid rafts*. La línia cel·lular HeLa presenta diferències en la localització al llarg de la membrana plasmàtica de Flotillin-1 i Caveolin-1, constituint respectivament microdominis de membrana independents i amb funcions diferenciades (Frick et al, 2007), així com exemples d'internalització de substrats Clatrina i Caveolin-independents (Huang et al, 2008). Per tant, com a conclusió d'aquest grup de resultats es pot hipotetitzar que l'associació entre Flotillin-1 i Notch1, així com la pròpia activació de Notch1- ΔE a Notch1-ICN, esdevindria en algun punt de la ruta endocítica i no necessàriament en membrana plasmàtica.

29.3 Flotillin-1 regula el transport citoplasmàtic de Notch1

El *knock-down* de Flotillin-1 incapacita Notch1- ΔE o Notch1 endogen per assolir la seva localització nuclear (figures 31 i 33 respectivament), fenomen que es fa més

evident quan es combina aquesta inhibició amb la sobreexpressió de la forma Flot1-HA, la qual és capaç de retenir una fracció de Notch1- ΔE en membrana plasmàtica (figura 34). No contemplem Flot-HA com un dominant negatiu que s'oposi a l'acció de Flotillin-1 endògena. Per exemple, en experiments de proliferació les línies cel·lulars que sobreexpressen Flot-HA mostren taxes de creixement similars al control i no menors (Santamaria et al, 2005).

En canvi, de nou la forma ICN mostra la seva independència respecte els nivells o la localització de Flotillin-1 (figura 35). D'altra banda, la forma GFP-NLS-Flot1 és capaç d'augmentar la proporció de Notch1- ΔE a nucli. Com s'ha comentat en el primer apartat de la discussió, aquest Notch no seria transcripcionalment actiu, necessitant de la presència de Flotillin-1 endògena per dur a terme la seva funció. El conjunt de resultats posa de manifest la necessitat que Notch1 té de Flotillin-1 en el seu trànsit intracel·lular des del seu processat fins a l'entrada en nucli.

Actualment, els processos d'endocitosi de Notch1 presenten un escenari poc definit per la multitud d'elements que s'ha demostrat que intervenen. Obviant el reciclatge constant a que es veu sotmès el receptor no unit a lligand mitjançant endocitosi i degradació lisosomal (Lu & Bilder, 2005), ens centrarem en el control de la regulació del receptor unit a lligand. En primer lloc, l'addició de molècules glicosilades als dominis EGF-like extracel·lulars per acció de glicosiltransferases. O-fucosiltransferasa 1 afecta al plegament, la interacció amb els lligands i l'endocitosi del receptor, i es necessària tant l'activitat catalítica com la no catalítica (Okajima et al, 2008). En segon terme, la ubiquitinació del receptor així com la pròpia endocitosi dels lligands afecten al procés senyalitzador (Le Borgne et al, 2005). En aquest treball, Le Borgne i col·laboradors recullen com a punt important la necessitat d'endocitosi de la forma Notch1- ΔE per que es dugui a terme el processat S3 per acció del complex presenilina. Aquest procés s'ha plantejat tant en *Drosophila* (Vaccari et al, 2008) com en mamífers, on seria necessària la monoubiquitinació del receptor en un residu lisina per direccionar Notch1 cap a les vesícules endocítiques. El procés d'endocitosi es descriu en aquest cas dependent de Dinamin i Rab5, presents en l'acció sobre vesícules recobertes de clatrina (Gupta-Rossi et al, 2004). Nichols i col·laboradors fan extensiu aquest plantejament al processat S2 (Nichols et al, 2007), partint de la certesa que les proteases de la família ADAM també es poden localitzar en *early* endosomes i lisosomes (Soond et al, 2005).

Sobre el mecanisme d'endocitosi del receptor Notch es tenen poques dades. De la

participació de la GTPasa Dinamin no es plantegen dubtes (Seugnet et al, 1997), la qual tradicionalment havia estat vinculada a l'endocitosi mediada per clatrina. Existeixen evidències de la presència de Dinamin en altres tipus d'endocitosi independent de clatrina, bé sigui per acció de Caveolin, de Flotillin o d'una acció conjunta d'ambdues (Payne et al, 2007). També és destacable la plasticitat que presenten les cèl·lules a l'hora d'internalitzar substrats, podent presentar diferents mecanismes per un mateix substrat o l'aparició d'un mecanisme nou per tal de substituir un que hagi quedat bloquejat. Per exemple, s'ha proposat dos models per a la formació, transport i reciclatge de les vesícules sinàptiques, mecanismes necessaris per al manteniment d'una bona eficàcia en la transmissió nerviosa. El primer és comparable a l'endocitosi mediada per clatrina, involucrant la proteïna adaptadora AP2, i es realitza directament a partir de la formació de vesícules derivades de la membrana plasmàtica. En el segon intervé l'adaptador AP3 i té lloc a partir del compartiment endosomal en un sistema conegut com a "*kiss and run*", un sistema de formació i alliberament molt ràpid de vesícules degut a que aquestes no compten amb cap tipus de recobriment proteic (Morgan et al, 2002). El transportador VGLUT1 (*Vesicular glutamat transporter*) interacciona directament amb Endofilin, un component del sistema de clatrina. En absència d'aquesta interacció s'observa com el reciclatge de VGLUT1 s'alenteix, implicant-se el sistema AP3 (Voglmaier et al, 2006).

En definitiva, Flotillin-1 pot ser una molècula que defineixi un sistema d'endocitosi pel receptor Notch1 en la seva forma ΔE . Aquest sistema pot actuar com a principal o complementari dels sistemes d'endocitosi dependents de clatrina o Caveolin, així com participar de mecanismes de compensació d'endocitosi en cas d'anulació d'un dels sistemes anteriors. La presència i activitat dels diferents sistemes endocítics pot ésser determinada pel tipus cel·lular, teixit, estat quiescent-proliferatiu de la cèl·lula, senyals extracel·lulars, etc. i necessita del seu estudi en profunditat per establir unes bases més sòlides sobre les etapes intermèdies entre l'activació del receptor i la seva acció nuclear.

29.4 **Flotillin-1 en el complex transcripcional**

La demostració de la participació de Flotillin-1 en els processos d'internalització i transport de Notch1 no descarten la segona hipòtesi, la qual planteja una funció de Flotillin-1 a nucli, en el complex que Notch1 forma amb els coactivadors CSL i

Mastermind i les acetiltransferases CBP, p300 o PCAF. A partir dels experiments de ChIP podem deduir que Flotillin-1 s'uneix a les regions promotores dels gens bHLH, dianes directes del complex transcripcional de Notch1. Els experiments de ReChIP, que també esdevingueren positius, demostren que Notch1 i Flotillin-1 es troben de manera simultània en aquestes regions, i per tant, formant part del mateix complex, concretament en la regió promotora del gen Hey1. Amb l'objectiu de proposar una funció de Flotillin-1 en els complexos reguladors transcripcionals però davant l'absència d'evidències que la relacionen amb els processos de transcripció, cal centrar-se en la resta de proteïnes de la família SPFH, amb les quals Flotillin-1 comparteix l'estructura i les característiques pròpies del domini conegut també com SPFH (Browman et al, 2007) i, per tant, amb les que podria estar compartint característiques funcionals. Dels diferents membres d'aquesta família, Prohibitin és l'únic que s'ha relacionat amb diferents processos de regulació a nivell transcripcional. Tradicionalment associada a processos adaptadors en l'ensamblatge dels diferents complexos que formen la cadena respiratòria mitocondrial (Nijtmans et al, 2000), s'ha demostrat la seva implicació en processos d'apoptosi, senescència, senyalització per Ras-Raf, migració cel·lular, etc. (Browman et al, 2007).

Per tots aquests processos esmentats s'ha observat un paper de Prohibitin en diferents complexos transcripcionals. Interacciona directament amb el factor E2F regulant-lo negativament, mentre que té la capacitat per augmentar la capacitat transcripcional de p53, col·laborant al control sobre gens tan diversos com Caspasa-7 o la β -galactosidasa associada a senescència (Joshi et al, 2007; Rastogi et al, 2006) i considerant-se un possible gen supressor de tumors. És capaç de reclutar *in vitro* corepressors generals implicats en múltiples vies com NCoR o HDAC1 (Wang et al, 2002) presents també en la senyalització Notch1 dependent. En línies cel·lulars derivades d'adenocarcinoma prostàtic, Prohibitin és capaç d'inhibir la transcripció mediada pel receptor d'andrògens (AR) i el creixement cel·lular androgen-dependent. Ho aconsegueix d'una forma independent d'histona deacetilases (tot i interaccionar amb aquestes) per competició amb el coactivador de la via SRC1 i en un procés regulat al seu torn per andrògens, els quals provoquen una *down*-regulació de la transcripció de Prohibitin (Gamble et al, 2007).

En conjunt, les nostres dades suggereixen un paper de Flotillin-1 en l'endocitosi d'una fracció del receptor Notch1 en la seva forma ΔE (probablement per una via independent de clatrina i involucrant el sistema endosomal, la proteïna Dinamin i les proteïnes de la

família Rab) de manera que possibilitaria el contacte amb el complex γ -secretasa i el processat últim a la forma activa. Està demostrat que Presenilina-1 *full length* s'estabilitza en presència de les formes reguladores nicastrin i APH-1, mentre que PEN-2 és crítica per a la proteòlisi i estabilització dels fragments de Presenilina-1. Tot i això, en situacions de sobreexpressió de presenilines i subunitats reguladores, els productes de l'acció proteolítica de γ -secretases (Notch intracel·lular, AICD, ...) no es veuen augmentats. S'evidencia així la necessitat d'altres cofactors per a l'activació d'aquest complex i la generació de la forma intracel·lular de Notch1 (Kim et al, 2003).

Aquest sistema d'endocitosi facilitaria seguidament el transport de Notch1 i la seva translocació a nucli, afavorint-se en darrer terme l'activitat transcripcional del sistema.

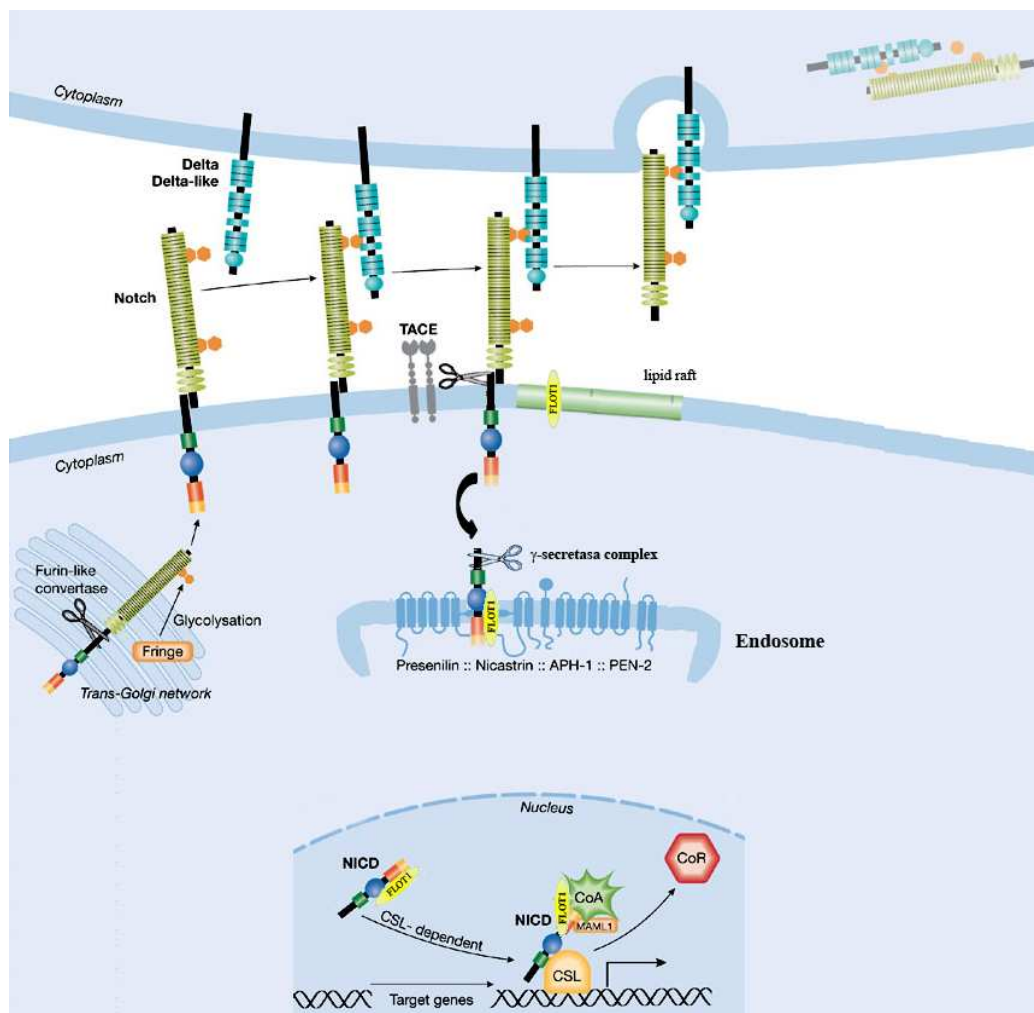


Fig 55. Esquema que mostra la hipotètica participació de Flotillina-1 en la ruta de transducció de senyal mediada per Notch1. Flotillina-1 s'uniria a Notch en la membrana plasmàtica, possibilitant la seva endocitosi i processat. Participaria també de l'entrada de Notch a nucli, on romandria dins del mateix complex activador de la transcripció (*modificat de Radke et al, EMBO Rep. 2005*).

30. PAPER DE FLOTILLIN-1 SOBRE LA FUNCIÓ D'AURORA CINASA B

30.1 Relació de Flotillin-1 amb el complex CPC

La localització subcel·lular de Flotillin-1 varia al llarg de la progressió del cicle cel·lular, corresponent la seva localització nuclear als períodes compresos entre la fase S i la finalització del cicle (Santamaria et al, 2005). De manera més acurada s'intentà definir aquesta localització en les cèl·lules en fase M. La immunofluorescència conjunta tant de cinetocors com de microtúbuls amb Flotillin-1 revela el canvi de localització d'aquesta. La seqüència espacial i temporal de la localització de Flotillin-1 (cromosoma en les etapes inicials de la mitosi, microtúbul en les etapes posteriors) manté un paral·lelisme significatiu amb la localització de les proteïnes que formen el complex *chromosome passenger proteins* (CPC), les quals duen a terme un conjunt de funcions al llarg de les diferents etapes que fa necessari aquest canvi d'ubicació (Vader et al, 2006): modificació d'histones de la cromatina, correcció de les unions del centròmer i regulació del paper del fus mitòtic durant la citocinesi. Per descartar la coincidència "casual" de la localització de Flotillin-1 amb l'estructura mitòtica es comprovaren els efectes del *knock-down*. La depleció de Flotillin-1 provoca efectes idèntics a la inhibició dels diferents components del complex CPC (Adams et al, 2001; Carvalho et al, 2003; Gassmann et al, 2004; Lens et al, 2003) (exemplificats en els nostres resultats amb la inhibició d'Aurora B) i que, seguint un possible ordre cronològic es poden resumir en:

- Canvi en la distribució de les fases de la mitosi malgrat no existir variació en el temps global que dura l'etapa. Per tant, aquest fenomen s'ha d'explicar com un retard en la transició metafase-anafase, fet que provoca un augment del percentatge de cèl·lules en les etapes prèvies (profase principalment) i una posterior recuperació progressant en l'anafase a major velocitat de l'habitual.
- El retard en la transició metafase-anafase s'explica per l'existència de problemes en la formació del complex que possibilita la unió cinetocor-microtúbul i que culminen en una deficient disposició dels cromosomes a la placa metafàsica (aparició d' *uncongressed chromosomes*). Conseqüència d'això, s'activen les proteïnes del *checkpoint* exemplificades en Mad2.
- Malgrat l'activació del *checkpoint* mitòtic, la seva funcionalitat també es veu afectada. Les cèl·lules superen aquest punt de forma aberrant, produint-se l'aparició de *lagging chromosomes* i fusos mitòtics multipolars (*multispindle*) durant l'anafase.

- Aquestes aberracions cromosòmiques condueixen a la formació de cèl·lules amb dotacions cromosòmiques anormals, amb un percentatge elevat de bi- o multinucleacions. La seva viabilitat es veu compromesa i el nombre de cèl·lules apoptòtiques augmenta.

30.2 Interacció entre Flotillin-1 i Aurora B

Les proteïnes del complex CPC presenten una cooperació i regulació molt íntima entre les 3 subunitats reguladores (INCENP, Survivin i Borealin) i la subunitat catalítica Aurora B. El *knock-down* de qualsevol dels membres provoca la deslocalització i la desestabilització d'un o més entre la resta de components provocant en conseqüència l'alteració de la progressió mitòtica (Ruchaud et al, 2007). Aquest fet impossibilita relacionar Flotillin-1 amb un o diversos membres concrets del complex CPC en base únicament a les alteracions observades mitjançant la reducció dels nivells de Flotillin-1 i fa necessària la realització d'experiments *in vitro* per tal de definir aquestes relacions. Flotillin-1 i Aurora cinasa B interaccionen físicament tal i com mostren els experiments de coimmunoprecipitació, colocalització i *pull-down* (figures 46, 47 i 49). Es mostra també interacció entre Flotillin-1 i INCENP però els resultats foren negatius pel que fa referència a la presència de Borealin o Survivin en el complex.

L'estructura, localització i funcionalitat de cada un dels membres del complex és clau per a l'estabilitat i localització de la resta dels seus companys i per a l'execució de les diferents tasques al llarg de la mitosi, degut a que cada component aporta informació diferent per a la localització del complex en les diferents etapes (Honda et al, 2003). El complex CPC s'ha anat definint amb els avenços en les tecnologies de resolució d'estructures tridimensionals: INCENP, Borealin i Survivin formen el *core* al qual s'afegirà posteriorment Aurora cinasa B, mitjançant la unió a INCENP per un domini anomenat *IN-box* (Honda et al, 2003; Ruchaud et al, 2007). Survivin i Borealin no interaccionen directament amb Aurora B. L'estructura 1:1:1:1 no és completament rígida i es pot veure modificada per enriquiments d'un dels components, ensamblatges i oligomeritzacions (Honda et al, 2003; Kelly et al, 2007). En sentit contrari, es coneixen mostres de subcomplexos en els que no participen tots els components (Aurora B associada a INCENP és capaç de fosforilar Histona H3 en absència de Survivin o Borealin (Gassmann et al, 2004)) i indicis d'altres elements reguladors. Per exemple, la proteïna Cdc37, una proteïna generalment associada a la *heat shock protein* Hsp90 i la regulació de diferents vies de cinases, modula l'acció d'Aurora B i els efectes fenotípics

derivats de la inhibició de Cdc37 són indistingibles dels provocats per l'absència d'Aurora B (Lange et al, 2002). Survivin i Aurora B interaccionen amb la cinasa mTOR i les proteïnes de la corresponent via de senyalització p70S6k i 4E-BP1 formant un complex actiu que controla la progressió del cicle cel·lular en la transició G1-S en limfòcits T (Song et al, 2007). Aquesta evidència reforça la teoria per la qual Aurora B té una funció que va més enllà del control d'events mitòtics i concorda amb l'expressió cicle cel·lular dependent. Aurora B augmenta la seva expressió a mida que es va donant la transició G₁-S, és màxima en les fases G₂-M per tornar a disminuir amb la finalització del cicle i l'entrada de nou en fase G₁ (Honda et al, 2003). La relació de Flotillin-1 amb Aurora B pot tenir lloc en una fase concreta del cicle, en diferents fases o pot ésser permanent al llarg de tot el cicle. La immunofluorescència (figura 46) mostra una certa colocalització en les etapes mitòtiques prometafase i anafase, així com en aquelles cèl·lules en interfase amb expressió d'Aurora B, les quals podem pressuposar es troben en fase G₁-S. Les immunoprecipitacions sobre cèl·lules sincronitzades (figura 48) confirmen la regulació de l'expressió dependent de cicle cel·lular d'ambdues proteïnes, i la constant interacció entre elles al llarg de tot el cicle en forma proporcional a la pròpia expressió (màxima en M, menor en G₁ i S). La localització d'Aurora B és nuclear com demostra la seva expressió en els experiments de centrifugació en gradient de densitat de sacarosa (figura 50). Tot i que en cèl·lules en interfase una fracció d'Aurora B ha estat descrita en citoplasma (la qual també observem en els nostres experiments) i al llarg del còrtex en punts associats al citoesquelet d'actina, la fracció més important és la que es localitza en nucli (Abdullah et al, 2005).

Flotillin-1 presenta dos dominis estructurals: el domini Flotillin en C-terminal que comparteix amb Flotillin-2, amb formació d'estructures *coiled coil* i repeticions EA que permeten teoritzar sobre la capacitat d'aquest domini per formar interaccions proteiques. D'altra banda, en N-terminal conté el domini SPFH, característic de les proteïnes de la família del mateix nom, pel qual s'ha demostrat aquesta capacitat de formar interaccions proteïna-proteïna. Mitjançant la tècnica de *pull-down* combinada amb l'ús de construccions dels dos dominis de Flotillin-1 per separat, es restringí la regió d'unió a Aurora B al domini SPFH (figura 49).

En conjunt, es demostra la interacció del *pool* nuclear de Flotillin-1, mitjançant el domini estructural SPFH, amb Aurora B. Aquesta interacció es manté al llarg de la progressió del cicle cel·lular i és proporcional als nivells d'expressió d'ambdues proteïnes.

30.3 Regulació de Flotillin-1 sobre Aurora B

Les evidències mostrades fins aquest punt permeten intuir una interacció funcional entre ambdues proteïnes. De manera similar a la hipòtesi plantejada sobre Notch1, es podria concebre Flotillin-1 com una guia per a la correcta localització d'Aurora B al llarg de les diferents etapes. El sistema endosomal/vesicular es relaciona amb els events mitòtics de forma gairebé exclusiva en les darreres etapes de la telofase i durant la citocinesi, cooperant amb el citoesquelet en la formació del pont mitòtic i el remodelatge de membranes que permetran l'escissió en dues cèl·lules independents (Albertson et al, 2008; Thompson et al, 2002; Van Damme et al, 2008). Les nostres pròpies dades mostren com la localització d'Aurora B no es veu afectada per la sobreexpressió de formes modificades de Flotillin-1, fent pensar en una explicació diferent.

Els experiments d'interferència de Flotillin-1 per RNAi mostren la reducció dels nivells d'expressió d'Aurora B (figura 51). L'expressió d'INCENP disminuiria de forma paral·lela a la de Flotillin-1. Es troba ben establert el model pel qual l'activitat cinasa d'Aurora B és proporcional a la seva unió a INCENP i, conseqüentment, als nivells d'expressió d'aquesta segona proteïna (Yamamoto et al, 2008), sent lògic el seu descens en els nivells d'expressió. En canvi, l'expressió de Borealin i Survivin no es veuria afectada, afegint un argument en favor de la presència de Flotillin-1 en un subcomplex en el que participaria Aurora B sense la totalitat dels seus elements reguladors del complex CPC.

D'altra banda, la localització de la proteïna Aurora B restant no presenta alteracions en la seva localització (figura 52). El fenotip originat per la inhibició de Flotillin-1 no s'explica únicament per la manca d'Aurora B, sinó també per la pèrdua de la seva activitat enzimàtica, com es demostra pel descens en la fosforilació d'histona H3 fosforilada (Ser10) (figura 51, *Western Blot* i immunofluorescència per p-H3).

La sobreexpressió de Flotillin-1 afecta de forma molt més moderada als nivells d'Aurora B generant un petit augment en les cèl·lules transfectades amb la forma HA-Flot1, mentre que les formes modificades en C-terminal i que, per tant, no es localitzen en nucli, no provoquen cap efecte (figura 53). Aquest fet mostra una evidència més que la interacció entre ambdues proteïnes té lloc dins la fracció nuclear. Aquest dèbil increment en els nivells d'Aurora B no provoquen al seu torn un efecte sobre la fosforilació d'histona H3, de manera que aquests cèl·lules no presenten els efectes fenotípics per excés d'histona H3 fosforilada (Ota et al, 2002) similars als efectes que provoca la seva absència.

Demostrada la funció de Flotillin-1 en la regulació dels nivells d'expressió d'Aurora B, apareix el plantejament del mecanisme pel qual duu a terme aquesta funció. Els mecanismes lògics per controlar els nivells d'una proteïna són (i) regular la seva expressió i (ii) regular la vida mitja de la proteïna, estabilitzant-la o evitant la degradació de la mateixa. La interacció física entre Flotillin-1 i Aurora B és un argument en favor de la segona opció.

La degradació d'Aurora B segueix un complex mecanisme de control que permet l'avenç en diferents fases del cicle, com per exemple en la transició metafase-anafase. Conté diferents seqüències de reconeixement per les subunitats reguladores del proteasoma (A-Box, KEN-Box i D-Box) i són substrat fisiològic de les subunitats APC/C-Cdc20 i APC/C-Cdh1, associades respectivament a processos de degradació en les etapes inicials i finals de la mitosi (Nguyen et al, 2005; Stewart & Fang, 2005). El sistema del proteasoma és també un element de regulació de l'estabilitat i el *turnover* de Flotillin-1 (Solis et al, 2007).

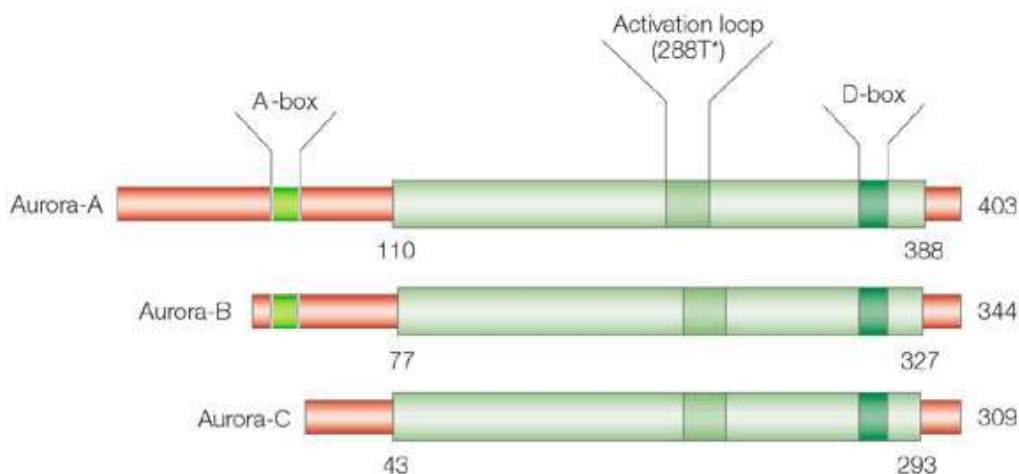


Fig 56. Esquema que mostra els diferents dominis de les proteïnes de la família Aurora. Presenten diferents regions de control de degradació per la via del proteasoma: una A-Box en el domini regulador N-terminal i una D-Box en el domini catalític C-terminal. Es mostra també el residu treonina, objecte de fosforilació que permet l'activació de la proteïna (Marumoto et al, *Nat. Rev.Cancer*, 2005)

La presència de Flotillin-1 a les cèl·lules evita la degradació d'Aurora B per la via del proteasoma (figura 54). D'aquesta manera, les cèl·lules interferides per Flotillin-1 presenten nivells menors d'Aurora B perquè aquesta es troba redirigida cap a la seva degradació. El bloqueig d'aquesta via de degradació mitjançant l'aplicació de dos

inhibidors específics (lactacistina i epoxomicina) permet la recuperació dels nivells d'Aurora B. La única evidència que prèviament relaciona Flotillin-1 amb una activitat d'aquest tipus la trobem en membrana plasmàtica: el receptor tirosina cinasa Ret actiu transloca a *lipid rafts* i es protegeix d'aquesta manera de la degradació proteasòmica i la conseqüent *down-regulació* del seu sistema de senyalització (Pierchala et al, 2006). Cal esmentar que en aquest treball no s'esmenta cap molècula que dugui a terme la funció sinó que es parla de *lipid rafts* en general, utilitzant-se Flotillin-1 com a marcador d'aquestes estructures. S'afegeix també que el treball ha estat realitzat en un model cel·lular en que les E3 ubiquitin ligases Cbl i Nedd4 no es troben presents. Aquestes molècules han estat associades tradicionalment a *lipid rafts* com a responsables de diferents processos d'ubiquitinació en aquestes estructures (Legler et al, 2003).

La ubiquitinació de proteïnes no és un procés únicament dirigit a la degradació proteica; també forma part de processos reguladors. La ubiquitinació d'Aurora B per acció de l'E3 ligasa Cul3 és el senyal pel reclutament d'enzims que permeten la dissociació d'Aurora B dels cromosomes en la transició metafase-anafase. Posteriorment, aquesta Aurora hauria de ser deubiquitinada ràpidament per evitar la seva degradació per proteasoma (Sumara & Peter, 2007). La ubiquitinació i deubiquitinació de Survivin és necessària també per l'associació dinàmica d'aquesta proteïna amb els centròmers (Vong et al, 2005).

Globalment, el conjunt de resultats d'aquest bloc permeten presentar Flotillin-1 com una proteïna que interacciona amb Aurora cinasa B al llarg de totes les etapes del cicle cel·lular, evitant la seva degradació i, per tant, afavorint la seva estabilitat allargant la seva vida mitja. Com a resultat d'aquesta funció, Flotillin-1 es converteix en un element bàsic perquè Aurora B dugui a terme les funcions habituals tant en el control de la transició G₁-S com en la progressió mitòtica i, en definitiva, en el control de la proliferació normal de les cèl·lules.

31. DISCUSSIÓ FINAL. FUNCIÓ DE FLOTILLIN-1.

En el present treball s'incorpora Flotillin-1 a dos processos intracel·lulars diferenciats: la via senyalitzadora de Notch1 i els processos de progressió del cicle cel·lular governats per Aurora cinasa B. Flotillin-1 interacciona directament amb Notch1 i Aurora B i intervé en processos tan diversos com el trànsit intracel·lular, la regulació de la transcripció i l'estabilització i protecció de la degradació per la via del proteasoma.

En base a aquestes apreciacions sembla lògic assumir una funció general de Flotillin-1 com a proteïna *scaffold* o adaptadora, amb capacitat de formar multitud de complexos proteics afavorint (i) la localització subcel·lular adequada de les proteïnes unides; (ii) les interaccions amb els efectors adequats per executar correctament les seves funcions. En aquest sentit, es fa necessari un coneixement sobre els diferents dominis que formen l'estructura de Flotillin-1, els quals proporcionaran la seva capacitat d'interacció amb d'altres proteïnes. Com s'ha comentat prèviament en apartats de la introducció i en la descripció de la interacció Notch1-Flotillin-1, aquesta presenta dos dominis diferenciats: SPFH (N-terminal) i Flotillin (C-terminal). Per ambdós dominis s'han identificat diferents repeticions glutamat-alanina (EA) que afavoreixen la interacció proteica. Els sistemes de predicció d'estructura en base a la seqüència mostren estructures *coiled coil*, les quals també actuarien possibilitant interaccions amb altres proteïnes. No obstant, les proteïnes conegudes de funció adaptadora mostren mòduls o dominis proteics millor establerts i caracteritzats, evidenciant la necessitat de resoldre amb claredat les estructures terciària i quaternària de Flotillin-1.

Solis i col·laboradors (Solis et al, 2007) mostren un element afegit a l'estructura: un domini PDZ en l'extrem C-terminal. Els dominis PDZ reben el seu nom de l'acrònim de les tres primeres proteïnes identificades: la proteïna postsinàptica PSD-95/SAP90, la proteïna d'unions intercel·lulars de *Drosophila* Discs-large i la proteïna de *tight junctions* ZO-1. També són anomenats DHRs (*Discs-large homology regions*) o *GLGF repeats* (degut a una seqüència molt ben conservada Gly-Leu-Gly-Phe). Consten d'uns 90 aminoàcids i es troben entre els dominis més comuns representats en el genoma d'organismes metazous. També s'han observat paral·lelismes significatius en els genomes de plantes i bacteris, mentre que les putatives regions PDZ de *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* mostren una similitud molt reduïda i no es troba demostrada la seva participació en processos d'interacció proteïna-proteïna (Harris & Lim, 2001). L'estructura comuna d'un domini PDZ comprèn 6 full β (β A- β F) i 2 hèlix α (α A- α B) en un plegament global de 6 *sandwich* -full β . El domini conservat Gly-Leu-Gly-Phe es troba en el *loop* que connecta els fulls β A- β B i és important per a la coordinació dels enllaços d'hidrogen del grup carboxilat (COO^-) C-terminal. Els extrems N- i C-terminal es troben localitzats molt propers l'un de l'altre formant el domini d'unió a pèptids, una característica compartida amb altres mòduls d'interacció proteica com els dominis SH₂ (Hung & Sheng, 2002).

Majoritàriament, els dominis PDZ interaccionen amb els extrems C-terminal de proteïnes que han patit algun tipus de modificació senyalitzadora com fosforilacions. Les seqüències d'unió d'aquestes proteïnes són curtes, de manera que el domini PDZ es pot associar sense alterar l'estructura i, en conseqüència, la funció dels seus lligands. En addició, els dominis PDZ poden interactuar amb seqüències internes de proteïnes que per la seva estructura mimetitzen un extrem C-terminal lliure (Hung & Sheng, 2002).

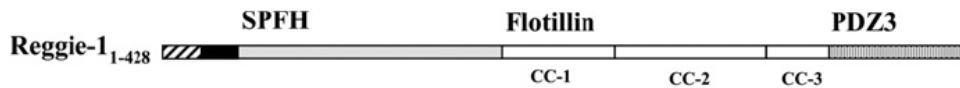


Fig 57. *Panell superior.* Estructura de Flotillin-1 on es mostren tots els elements amb capacitat per formar interaccions proteïna-proteïna (domini SPFH, regions coiled-coil i domini PDZ) (Solis GP, *Biochem J*, 2007). *Panell inferior.* Representació tridimensional d'un fragment del domini Flotillin on s'observen les estructures helicoïdals que faciliten aquestes interaccions (www.expasy.org)

In vivo, els dominis PDZ actuen organitzant complexos multiproteics implicats en l'establiment i el manteniment de la polaritat cel·lular. Aquestes funcions necessiten de la correcta localització d'un elevat conjunt de receptors i efectors en les regions perifèriques de la cèl·lula, en part associades a membrana plasmàtica. En aquesta localització permeten regular també l'activitat i el trànsit de proteïnes de membrana, demostrant un paper important dels dominis PDZ en el *targeting* de proteïnes als compartiments cel·lulars específics (Harris & Lim, 2001).

La major part de les proteïnes citosòliques que interaccionen amb els dominis PDZ de proteïnes de membrana són components de les vies de transducció de senyal: cinases, proteïnes G reguladores, fosfolipasa C i proteïnes GTPasa activadores, entre d'altres. Aquests dominis són, per tant, una bona eina per associar canals i receptors de membrana amb els elements de senyalització *downstream* (Fanning & Anderson, 1999).

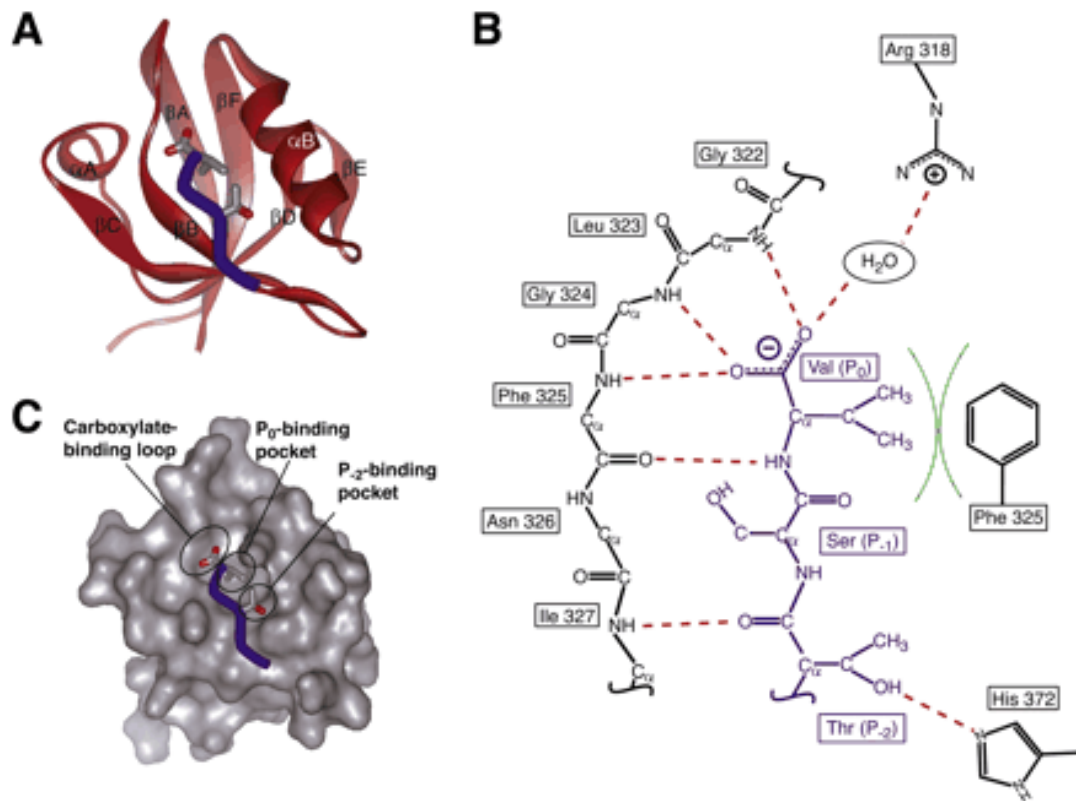


Fig 58. Estructura del domini PDZ de la proteïna PSD-95. A) Representació i nomenclatura de les diferents estructures full β i hèlix α . B) Diagrama del domini d'unió al pèptid. C) Estructura tridimensional del domini PDZ en unió a un pèptid C-terminal. (Harris BZ, *J Cell Science*, 2001).