



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

## RESULTATS

---





**A. SOBREEXPRESSION I *KNOCK-DOWN* DE FLOTILLIN-1**

**16. SOBREEXPRESSION DE FLOTILLIN-1. CARACTERITZACIÓ DE LES DIFERENTS FORMES MUTANTS SOBREEXPRESSADES.**

Per a la realització dels diferents estudis funcionals i bioquímics sobre la funció de Flotillin-1 tant en el procés de mitosi com en la regulació de la via de transducció de senyal de Notch1 s'utilitzà la sobreexpressió transitòria de formes exògenes de la proteïna. Aquestes formes es troben fusionades a diferents *tags*, i en funció del lloc d'inserció d'aquest epítop o de la modificació de la seqüència nucleotídica, presenten característiques fenotípiques i de localització subcel·lular diferents en comparació amb la proteïna endògena (es comprovaren per immunofluorescència, figura 19).

- a) **HA-Flotillin-1 (HA-Flot1)/GFP-Flotillin-1 (GFP-Flot1):** la modificació de Flotillin-1 en l'extrem N-terminal no afecta a la funcionalitat i característiques de la proteïna. La seva localització és ubiqua i la sobreexpressió estimula la proliferació basal de les cèl·lules, comprovat en la línia PC-3 mitjançant comptatges de l'antigen de proliferació Ki67 (Santamaria et al, 2005).
  
- b) **Flotillin-1-HA (Flot-HA)/Flotillin-1-Flag (Flot-Flag)/HA-Flotillin-1  $\Delta$ C:** la modificació en C-terminal, per alteració de l'estructura conseqüència de la inserció d'un epítop (Flot-HA) o bé per deleció (HA-Flot  $\Delta$ C), incapacita la proteïna per assolir la seva localització nuclear així com per estimular la proliferació cel·lular (Santamaria et al, 2005). Aquest fenomen seria degut al canvi conformacional que provocaria la inclusió de l'epítop en l'estructura de la proteïna, emascarant els dominis responsables de l'entrada a nucli. La localització de Flot-HA és exclusivament de membrana plasmàtica, mentre que la forma  $\Delta$ C roman en una localització submembranosa o citoplasmàtica principalment. Aquestes formes no es poden considerar dominants negatius clàssics doncs no reverteixen el fenotip de la proteïna endògena i la seva sobreexpressió no ocasiona una reducció de la proliferació cel·lular (els comptatges de Ki67 no mostraren variació respecte la condició control) (Santamaria et al, 2005).

- c) **GFP-NLS-Flotillin-1 (NLS-Flot1)**: l'addició d'una seqüència consens de localització nuclear coincident amb la de l'antigen T del virus SV40 confereix a la forma exògena de Flotillin-1 una localització completament nuclear.

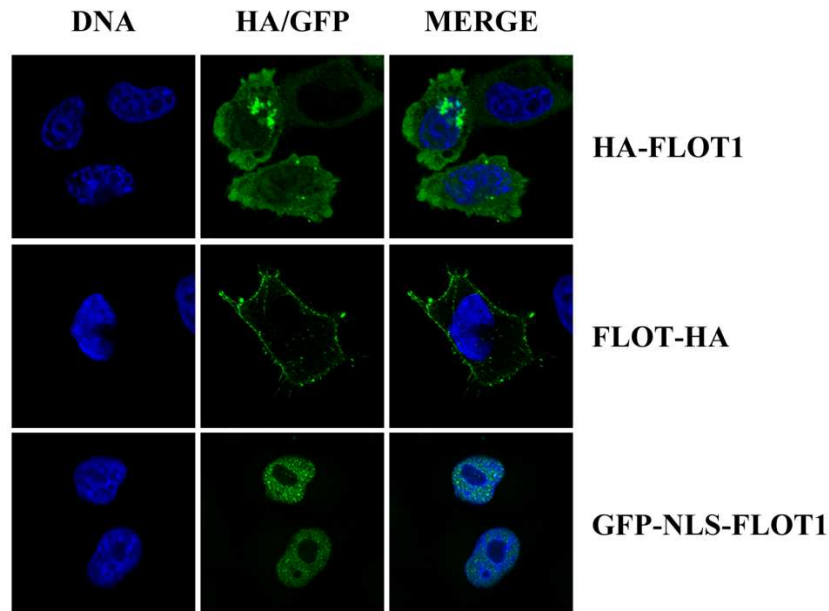


Fig 19. Exemplificació de la localització subcel·lular dels diferents constructes de Flotillin-1. La línia cel·lular HeLa es transfectà transitòriament amb: a) HA-Flot1 com a exemple de modificació en N-terminal i localització general; b) Flot-HA, modificació en C-terminal i localització de membrana o submembrana, c) GFP-NLS-Flot1, localització exclusiva nuclear. Es realitzà immunofluorescència per HA (o directament GFP) acompanyat de marcatge de Hoechst33342 per mostrar el nucli.

### 17. **KNOCK-DOWN DE FLOTILLIN-1. ESPECIFITAT D'ACCIÓ.**

De forma paral·lela a la sobreexpressió de Flotillin-1 es procedí a la seva anul·lació mitjançant tècniques de RNA d'interferència, siRNA i shRNA.

En el cas dels siRNA s'utilitzaren seqüències dirigides contra el transcrit de Flotillin-1 ja comprovades amb anterioritat (Santamaria et al, 2005) (tesi de la Dra. Anna Santamaría) així com unes noves seqüències contra la zona 3'UTR del gen. Aquestes zones no formen part de les seqüències clonades en les construccions que se sobreexpressaran mitjançant transfecció de DNA exogen, i per tant, els siRNA contra aquestes regions només tenen capacitat inhibidora sobre la proteïna endògena. Aquesta estratègia permet la utilització de forma simultània de tècniques de sobreexpressió i *knock-down*.

L'eficàcia de la depleció de Flotillin-1 es comprovà per *Western Blotting* obtenint una reducció variable dels nivells de proteïna en funció de la seqüència utilitzada així com de l'eficiència de transfecció concreta de cada experiment. Només es tingueren en compte aquells experiments en què s'obtingué una reducció de Flotillin-1 igual o superior al 70% dels nivells totals de proteïna en els *blots* efectuats en paral·lel a cada experiment (figura 20, panell superior).

En segon lloc, el *knock-down* provocat per l'ús de shRNA es comprovà també per *Western Blot* aplicant-se els mateixos criteris que en el cas anterior. D'altra banda es realitzaren experiments funcionals observant-se una reducció en la proliferació basal de les cèl·lules HeLa (figura 20, panell inferior) similar als efectes ja coneguts dels siRNA sobre la proliferació de línies cel·lulars model d'adenocarcinoma prostàtic (Santamaria et al, 2005).

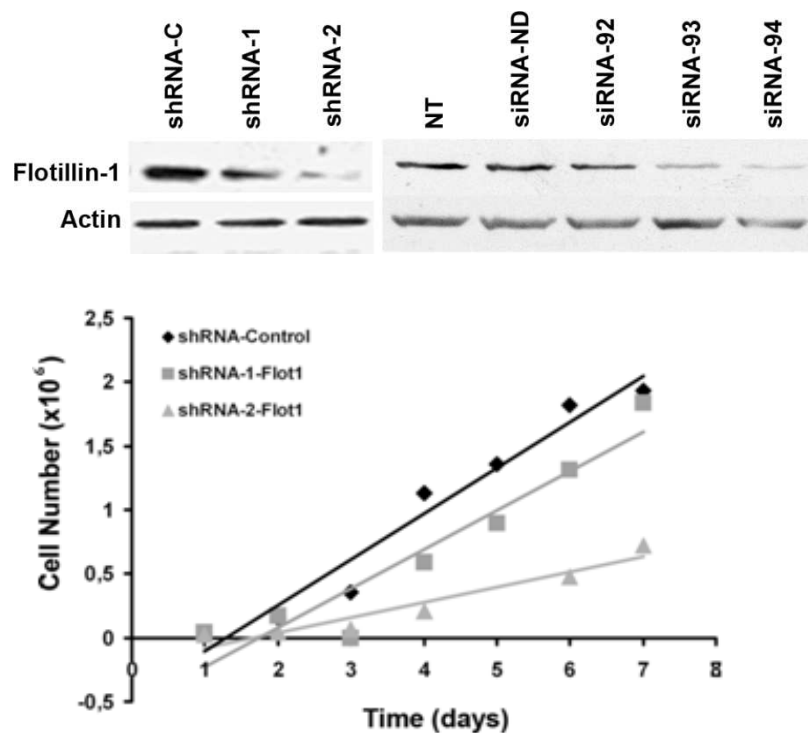


Fig 20. *Panell superior*. Reducció dels nivells de Flotillin-1 per incorporació a les cèl·lules de RNA d'interferència. 92, 93 i 94 són 3 seqüències independents de siRNA contra la regió 3'UTR de Flotillin-1 endògena. *Panell inferior*. Experiment de proliferació. Comptatge del nombre total de cèl·lules al llarg de 7 dies consecutius en condicions de depleció de Flotillin-1 per shRNA.

**B. PAPER DE FLOTILLIN-1 EN LA REGULACIÓ DE NOTCH1**

En base al conjunt d'evidències que proposen, d'una banda, la participació de les estructures lipídiques de membrana en la via de senyalització de Notch1, i de l'altra, la interacció entre ambdues proteïnes (Introducció, apartat 4); ens plantejarem la possibilitat d'incorporar Flotillin-1 com un element regulador més de la via de transducció de senyals dependent de Notch1.

**18. FLOTILLIN-1 REGULA L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE NOTCH1**

El primer objectiu fou testar si la pèrdua o guany de funció de Flotillin-1 exercia algun tipus d'influència funcional sobre la activitat transcripcional de Notch1. Es dissenyà un sistema *in vitro* basat en l'expressió del *reporter gene* luciferasa sota el control del promotor del gen Hes1, una de les principals dianes la transcripció de les quals es troba sota el control directe de Notch1. S'utilitzà la línia cel·lular HeLa que compta amb una activitat basal mínima de la transducció de senyals regulada per Notch1 per fer més evidents les diferències d'expressió de luciferasa en el seguiment de l'activitat d'aquest promotor.

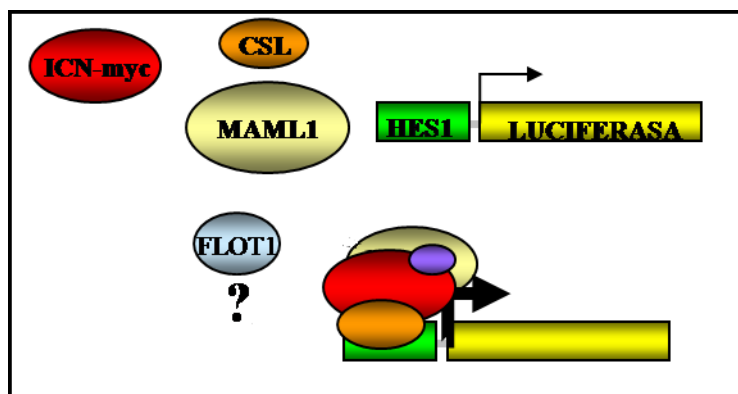


Fig 21. Disseny dels experiments de luciferasa. El *reporter gene* es troba sota el control d'un promotor d'un gen diana de Notch1.

**18.1. Efecte de la inhibició de Flotillin-1**

Es comprovaren els efectes de la depleció de Flotillin-1 mitjançant tècniques d'RNA d'interferència (siRNA i shRNA) sobre la via de senyalització de Notch1, la qual s'activà mitjançant la sobreexpressió de dues formes de Notch1:  $\Delta E$  Notch1 i ICN-

Notch1. La primera forma precisa per a la seva activació d'un processat proteolític per part del complex  $\gamma$ -secretasa i se li pressuposa una necessitat d'assolir les zones de la membrana plasmàtica on es troba localitzat aquest complex. La segona forma, en canvi, ja ha sofert aquest procés de proteòlisi S3 i és activa de forma constitutiva (Mumm & Kopan, 2000).

L'absència de Flotillin-1 és capaç de provocar una reducció significativa en la transcripció del gen luciferasa, fusionat al promotor Hes1, la qual es pot interpretar com un descens en l'activitat transcripcional de Notch1 (Figura 22). Aquest fenomen s'observà quan la via es trobava activada amb la forma  $\Delta E$ , mentre que la forma ICN és independent de la presència o absència de Flotillin-1 (Figura 23), fins al punt d'observar-se un augment en l'expressió de luciferasa en les cèl·lules que han incorporat el shRNA per Flotillin-1, si bé aquesta variació no és estadísticament significativa. Aquests resultats suggereixen la necessitat de la presència de Flotillin-1 en la via de senyalització de Notch1, duent a terme una funció en un moment posterior a la unió receptor-ligand, però previ al processat S3 dut a terme pel complex  $\gamma$ -secretasa.

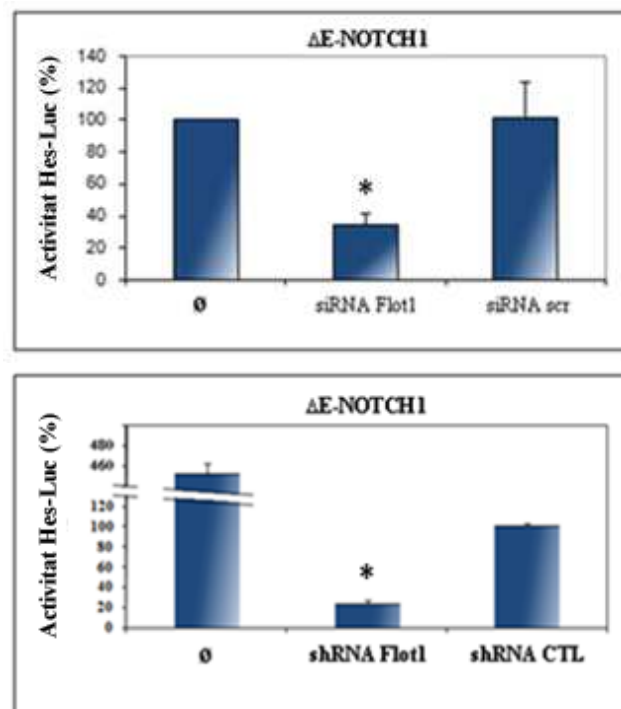


Figura 22. *Panell superior.* Descens de l'activitat transcripcional de Notch1 $\Delta E$  (mesurada com expressió de luciferasa) com a conseqüència de la inhibició de Flotillin-1 per el siRNA F19. siRNA scr és un control sintetitzat mitjançant la generació aleatòria d'una seqüència que no hibrida amb el gen d'interès i per tant, no produeix cap efecte sobre la cèl·lula. Tots els siRNA s'utilitzen a concentració 100 nM. *Panell inferior.* Resultats idèntics obtinguts mitjançant la interferència per shRNA.



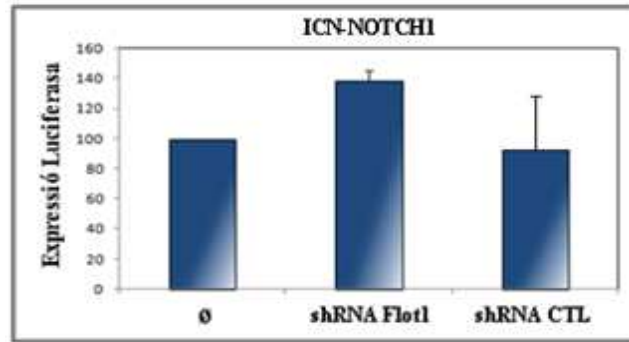
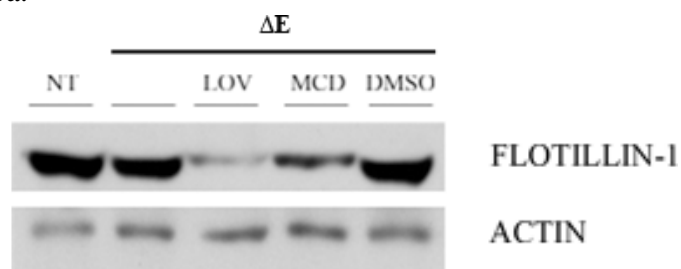


Fig 23. L'activitat transcripcional generada per la forma ICN-Notch1 no es veu afectada per la depleció de Flotillin-1 mitjançant shRNAs.

### 18.2. Efecte de la disrupció de *lipid rafts*

Per confirmar la participació en el procés de senyalització de Notch1 per part de la fracció membranosa de Flotillin-1, es procedí a l'alteració de les estructures lipídiques on aquesta es troba localitzada. La lovastatina és un agent que impedeix la síntesi de colesterol, destruint els *lipid rafts* per un període llarg de temps, a la pràctica de forma permanent. La ciclodextrina en canvi, segresta el colesterol provocant la supressió temporal d'aquestes estructures. Els efectes es visualitzen de forma molt més ràpida (15-30 min.) però duren un temps limitat (24 h. aproximadament). El tractament de les cèl·lules amb lovastatina provocà uns efectes molt més importants en la reducció de l'expressió de Flotillin-1 (figura 24, panell superior). Aquests efectes s'observaren mínimament en el cas del tractament amb ciclodextrines. Quan la reducció en l'expressió de Flotillin-1 és prou important (cas del tractament amb lovastatina) es correlaciona amb un descens en l'activitat transcripcional generada per  $\Delta E$ -Notch1 (figura 24, panell inferior). No s'observà un descens equivalent en el cas del tractament amb ciclodextrines perquè la proteïna Flotillin-1 que roman a les cèl·lules és suficient perquè el sistema funcioni amb normalitat. Aquest resultat corrobora la necessitat de la presència de Flotillin-1 en les etapes de la via de senyalització de Notch1 que tenen lloc a la membrana plasmàtica.



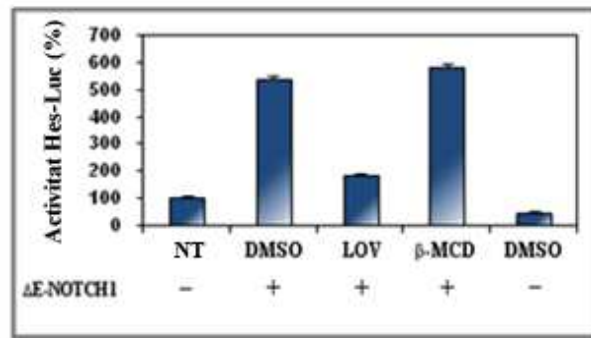


Figura 24. *Panell superior*. Afectació de l'expressió de Flotillin-1 causada per l'eliminació dels complexos estructurals dels *rafts* lipídics. *Panell inferior*. Descens en l'activitat transcripcional de Notch1 com a conseqüència d'aquesta disrupció dels *lipid rafts*. NT: cèl·lules no tractades LOV: tractament amb lovastatina O/N 5 μM; β-MCD: tractament amb β-metil ciclodextrina 15 min 10 mM. DMSO: control negatiu, solvent dels fàrmacs.

### 18.3. Efecte de la sobreexpressió de formes exògenes de Flotillin-1

Paral·lelament als efectes de la depleció de Flotillin-1 es procedí a comprovar l'efecte invers. Se sobreexpressaren les diferents formes exògenes de Flotillin-1 observant-se un augment significatiu de l'activitat transcripcional de Notch1 quan s'afavorí la presència de Flotillin-1 a nucli mitjançant l'expressió de la forma GFP-NLS-Flot1 (figura 25). L'ús de les formes HA-Flot1 o Flot-HA no ocasionen canvis destacables en la transcripció del gen luciferasa, que es troba sota el control del promotor Hes1. Tot i no ser estadísticament significatiu, la forma Flot-HA, la qual té el fenotip més extrem de localització en membrana plasmàtica i incapacitat d'assolir el nucli, si presenta una reducció en l'activació del promotor HES1 (un 35% respecte el control, cèl·lules sense sobreexpressió de Flotillin-1). La forma HA-Flot1 en canvi, no presenta variacions respecte les cèl·lules control. D'aquest resultat se'n deriva la conclusió que la localització de Flotillin-1 afecta a la via de senyalització de Notch1, complementant d'aquesta manera els estudis fets amb els RNA d'interferència.

### 18.4. Efecte de l'estratègia combinada: inhibició de Flotillin-1 endògena i sobreexpressió de formes exògenes de Flotillin-1

En l'apartat anterior, les sobreexpressions de HA-Flot1, HA-Flot1 ΔC o Flot-HA no mostraven efectes significatius sobre l'activitat transcripcional de Notch1. Això pot ser

provocat perquè la presència de Flotillin-1 endògena estigui emmascarant els efectes de les formes exògenes. Per tal de maximitzar els efectes de la deslocalització de Flotillin-1, es repetí el mateix experiment afegint la inhibició de la proteïna endògena. El siRNA contra la regió 3'UTR de Flotillin-1 provoca el mateix descens en l'expressió de Hes1-luciferasa que el mostrat en l'apartat 18.1 (per les cèl·lules transfectades amb  $\Delta E$ -Notch1), confirmant-se el resultat mostrat en aquell apartat per una segona seqüència de siRNA. En aquestes condicions, s'observa un descens d'activitat transcripcional més acusat en la condició Flot-HA, mentre que la sobreexpressió de Ha-Flot1 no és capaç de revertir l'efecte del siRNA. D'altra banda, la forma GFP-NLS-Flot1, que en condicions normals pel que fa a l'expressió de Flotillin-1 endògena si produïa l'augment de la transcripció de Hes1-Luciferasa, no és capaç en aquest nou model de generar el mateix fenotip, recuperant les cèl·lules de l'efecte causat per el siRNA de Flotillin-1 endògena (figura 26).

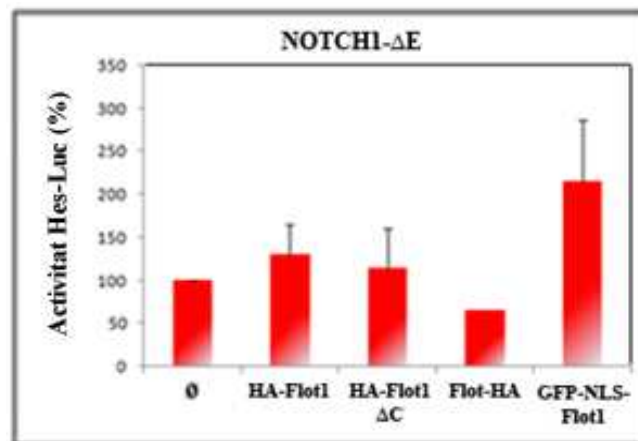


Fig 25. Variació en l'activitat de Notch1- $\Delta E$  en funció de la sobreexpressió de diferents constructes de Flotillin-1 amb localització i característiques diferencials. GFP-NLS-Flot1 genera un augment en la transcripció de Hes1-luciferasa, que es manté invariable en presència de les altres construccions de Flotillin-1

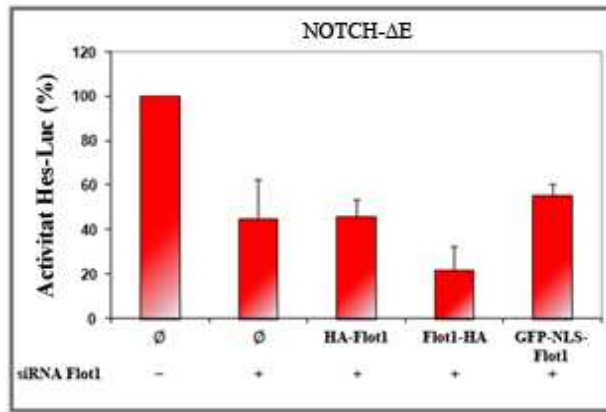


Fig 26. Variació en l'activitat de Notch1-ΔE en funció de la sobreexpressió dels constructes de Flotillin-1 (HA-Flot1, Flot-HA i GFP-NLS-Flot1), en combinació amb la depleció de Flotillin-1 endògena mitjançant l'acció d'un siRNA contra la regió 3'UTR del gen (F94). Concentració siRNA = 100 nM

## 19. INTERACCIÓ ENTRE FLOTILLIN-1 I NOTCH1

S'utilitzaren diferents estratègies per comprovar si la regulació exercida per Flotillin-1 sobre la capacitat transcripcional de Notch1 és deguda a una interacció física entre ambdues, la qual podria ser l'explicació de l'acció directa que Flotillin-1 exerceix sobre l'activitat transcripcional de Notch1.

### 19.1. Coimmunoprecipitació

La primera aproximació fou la coimmunoprecipitació de les proteïnes endògenes en una línia cel·lular derivada d'adenocarcinoma prostàtic (PC-3) que presenta una elevada expressió de Notch1. S'aconseguí l'activació de la via deixant proliferar les cèl·lules fins assolir una confluència del 100%. D'aquesta manera es permet la interacció entre lligand i receptor, ambdós presents a la cèl·lula en forma de molècules transmembrana. S'utilitzà un anticòs contra Flotillin-1 per immunoprecipitar la proteïna endògena i mitjançant *Western Blotting* amb anticossos contra Notch1 s'analitzà la possible interacció. Flotillin-1 coimmunoprecipita amb una fracció del total de proteïna Notch1 present a la cèl·lula i ho fa amb la forma activada del receptor (ICN). Aquesta conclusió es pot afirmar perquè el *Western Blot* es realitzà utilitzant un anticòs contra un epítoc de Notch (Val 1744), el qual només queda exposat després del processat pel complex  $\gamma$ -secretasa (S3) i l'alliberament de la forma ICN, completament proteolitzada (figura 27, panell superior).

La utilització de l'anticòs contra la forma activa final de Notch1 no permet esbrinar en quin punt s'inicia aquesta interacció. L'anticòs contra un epítoc situat en l'extrem C-

terminal de Notch1 tampoc ajuda a resoldre aquest dubte (reconeix tant la forma S3 activa com les formes prèvies S1 i S2). L'estratègia per tractar de discernir en quin punt de la via es dóna aquesta interacció fou transfectar la línia cel·lular HeLa amb les formes  $\Delta E$  o ICN conjuntament amb HA-Flot1. Ambdós constructes de Notch1 es troben fusionats a l'epítoc myc (1 i 6 *myc tags* respectivament), el qual s'utilitza per immunoprecipitar les proteïnes. Tant  $\Delta E$  com ICN coimmunoprecipitaren amb HA-Flot1 confirmant la interacció prèviament observada amb les proteïnes endògenes (figura 27, panell inferior).

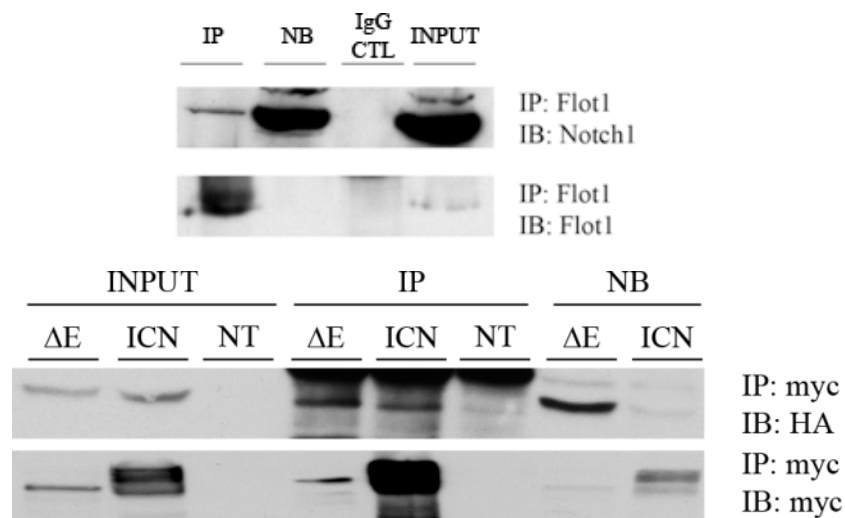


Fig 27. *Panell superior.* Interacció de les proteïnes Flot1 i Notch endògenes demostrada per immunoprecipitació de Flotillin-1. El WB de Notch es realitza amb l'anticòs contra ICN (Abcam). *Panell inferior.* Coimmunoprecipitació recíproca entre les proteïnes exògenes myc- $\Delta E$  o myc-ICN amb HA-Flot1. (Input: 10% extracte proteic total; IP: extracte immunoprecipitat; NB: *not bound* o sobrenedant de la immunoprecipitació)

## 19.2. Colocalització

Una vegada comprovada l'associació bioquímica *in vitro*, es pretengué analitzar la localització subcel·lular on es dóna aquesta interacció. Es transfectaren les cèl·lules HeLa amb els constructes  $\Delta E$ -Notch1 i les diferents construccions de Flotillin-1. Es realitzà la immunofluorescència amb un anticòs anti-myc per detectar  $\Delta E$ -Notch1, i amb HA per detectar Flotillin-1 exògena (excepte en el cas GFP-NLS-Flot1 que es visualitza directament la proteïna verda GFP). El resultat revelà una coincidència parcial entre ambdues proteïnes, fent-se més manifesta en el cas dels mutants que localitzen Flotillin-1 en compartiments cel·lulars concrets (Flot-HA en membrana i GFP-NLS-Flot1 en

nucli), ja que ambdós constructes provocaven un canvi en la localització normal de  $\Delta E$ -Notch (figura 28).

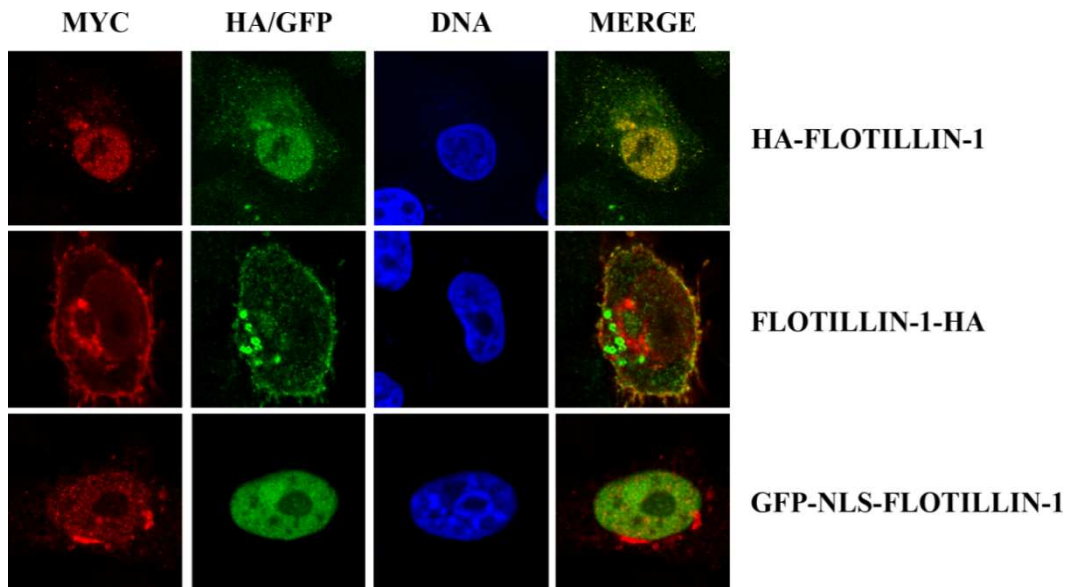


Fig 28. Colocalització entre myc-Notch1  $\Delta E$  (vermell) i les tres formes mutants de Flotillin-1 (verd).

En segon lloc es comprovà la localització amb el constructe Notch1-ICN. En aquest cas, Notch1 es troba constitutivament activat i per tant, la seva localització és nuclear en pràcticament la totalitat de casos, independentment de la forma de Flotillin-1 transfectada (figura 29).

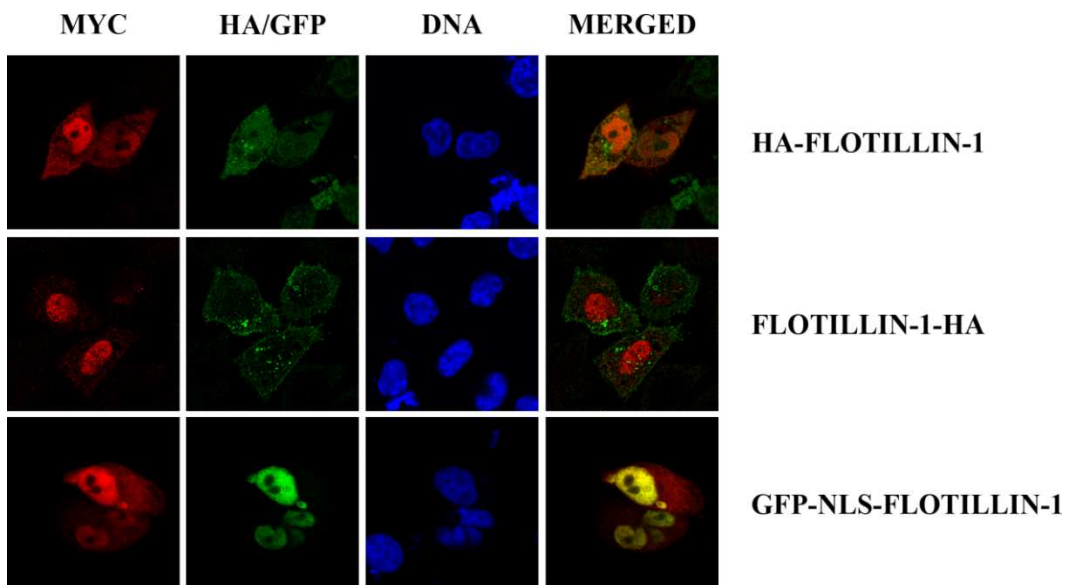


Fig 29. Colocalització entre myc-Notch ICN (vermell) i les tres formes de Flotillin-1 (verd)

19.3. **Cosedimentació en gradient de densitat**

Amb la finalitat d'establir un possible inici de la relació Flotillin-1-Notch1 en membrana plasmàtica, i concretament, en les regions corresponents a *lipid rafts*, es realitzà un fraccionament cel·lular per sedimentació en gradient de densitat de sacarosa de les proteïnes endògenes. Mentre Flotillin-1 localitza majoritàriament en la fracció de baixa densitat del 20% en la que es troben els *lipid rafts* així com en la corresponent a la fracció nuclear, Notch1 localitza en la fracció on es recullen totes les proteïnes solubles (40%) i en nucli, no presentant coincidència amb la expressió de Flotillin-1 en la fracció del 20% (figura 30). Per tant, no podem afirmar que la interacció s'estigui donant en la regió corresponent als *rafts* lipídics., tot i semblar clar que té lloc en les etapes inicials de la via i, per tant, en membrana plasmàtica.

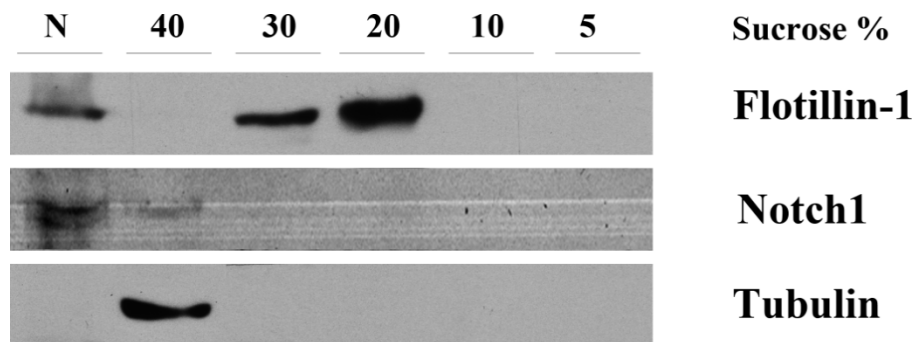


Fig 30. Expressió de Notch1 i Flotillin-1 en un gradient de densitat de sacarosa. Tubulin actua com a marcador de la fracció citoplasmàtica soluble i la seva absència indica també la puresa de l'extracció de la fracció nuclear.

20. **FLOTILLIN-1 REGULA LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE NOTCH1**

Demostrada l'influència de Flotillin-1 sobre els processos de transcripció regulats per Notch1, i la interacció i colocalització que presenten les formes exògenes modificades d'ambdues proteïnes plantejarem dues hipòtesis:

- i) Flotillin-1 determina la localització subcel·lular i regula l'entrada a nucli de Notch1.
- ii) Flotillin-1 participa de la regulació de la transcripció formant part dels complexos activadors.

A fi de testar la primera hipòtesi es quantificà la localització subcel·lular de Notch1 mitjançant assajos d'immunofluorescència i *Western Blot*.

20.1. **Inhibició de Flotillin-1 i localització subcel·lular de Notch1**

S'eliminà l'expressió de Flotillin-1 mitjançant la incorporació a les cèl·lules d'un siRNA específic (F19), alhora que es transfectaren amb la forma Notch1- $\Delta E$ . Es realitzà un fraccionament subcel·lular (dividint entre fraccions nuclear i no nuclear) i s'analitzà l'expressió de les diferents proteïnes per *Western Blot*. En absència de Flotillin-1 hi ha un augment de l'expressió de Notch1- $\Delta E$  a la fracció no nuclear que s'acompanya amb una desaparició de la proteïna a la corresponent fracció nuclear (figura 31, panell superior). Sobre la proteïna Notch1 endògena i aplicant un fraccionament per sedimentació en gradient de densitat (en cèl·lules inhibides per Flotillin-1), es determinà que aquesta acumulació de Notch1 es donava al percentatge del 40% de sacarosa corresponent a la fracció soluble citosòlica (figura 31, panell inferior).

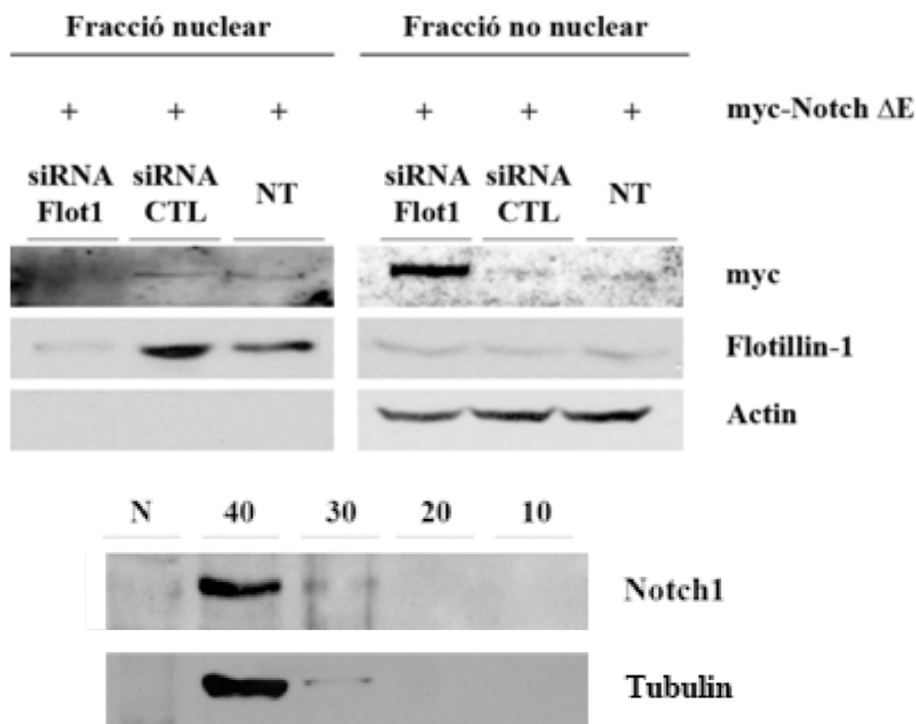


Fig 31. *Panell superior*. Fraccionament cel·lular i anàlisi de l'expressió de Notch1 en cèl·lules tractades amb siRNA de Flotillin-1, siRNA inespecífic (ND) i cèl·lules no tractades (NT). *Panell inferior*. Fraccionament per gradient de densitat de sacarosa i anàlisi de l'expressió de Notch1 en les cèl·lules inhibides per Flotillin-1



Els efectes de la inhibició de Flotillin-1 sobre la localització de Notch1 foren analitzats també mitjançant tècniques d'immunofluorescència. Prèviament es realitzà una tinció de les cèl·lules HeLa per  $\Delta E$ -Notch1 expressat de forma transitòria a fi d'establir uns patrons diferenciats sobre el que es considera localització nuclear o localització citoplasmàtica. Aquesta forma de Notch1 presenta una gradació que parteix d'una forma predominantment citoplasmàtica (figura 32, a) fins a una forma exclusivament nuclear (figura 32, c) passant per figures intermèdies de localització ubiqua no definida, amb agregats perinuclears i marcatge puntual de membrana plasmàtica (figura 32,b).

Resultats similars s'obtingueren per la immunofluorescència de Notch1 endogen, com es pot observar també en la figura 33 (en aquest cas sobre cèl·lules PC-3 que presenten major expressió).

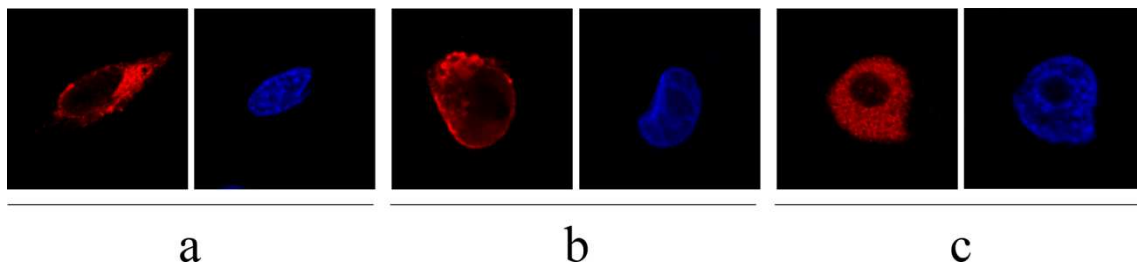


Figura 32. Exemples de localització subcel·lular de  $\Delta E$ -Notch en la línia cel·lular HeLa. Canvi gradual de localització extranuclear (a) a nuclear (c) i formes intermèdies en les que s'observen una tinció general amb presència d'agregats perinuclears (b). En vermell s'observa la tinció de l'epítip myc i en blau el marcatge nuclear amb Hoechst 332.

Degut al dubte i a la subjectivitat que poden provocar els experiments de comptatge de cèl·lules, es tingueren en compte únicament els dos fenotips més extrems els quals anomenarem:

- A) **Localització no nuclear:** citoplasmàtica i puntualment, de membrana
- B) **Localització nuclear.**

La primera aproximació es realitzà amb Notch1 endogen. Es transfectaren cèl·lules PC-3 amb siRNA de Flotillin-1, considerant-se interferides aquelles que eren verdes per expressió de la proteïna GFP (els siRNA havien estat cotransfectats amb el plasmidi pEGFP-C<sub>1</sub> en una proporció siRNA:pEGFP de 10:1). En les cèl·lules transfectades amb el siRNA control s'observa una proporció de cèl·lules amb marcatge nuclear pràcticament del 100%. En canvi, el tractament de les cèl·lules amb el siRNA específic de Flotillin-1 altera les proporcions entre totes dues formes, augmentant significativament fins a 10 vegades la proporció de la forma no nuclear (figura 33).

L'elevat percentatge de tinció nuclear s'explica perquè l'experiment fou realitzat sobre cèl·lules que havien assolit una confluència del 100%, de manera que tenien la via de senyalització de Notch1 constitutivament activada.

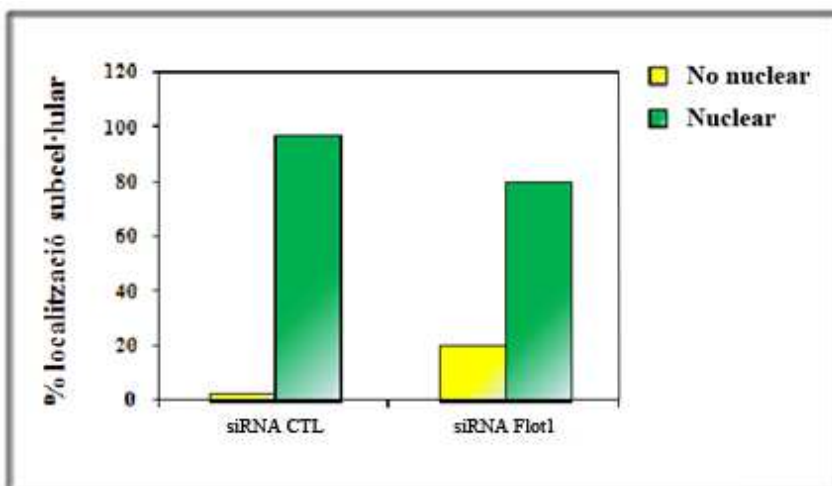
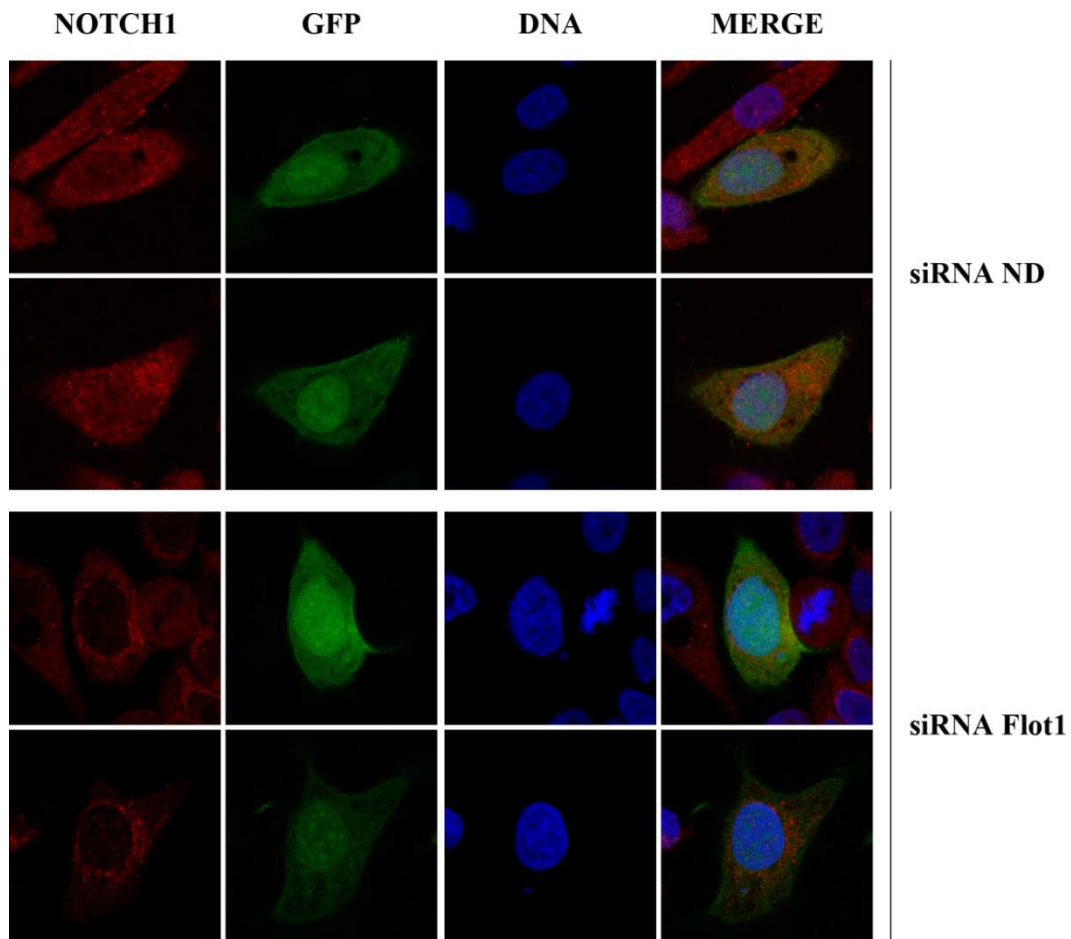


Fig 33. *Panell superior.* Exemples de localització de la proteïna Notch1 en cèl·lules interferides per Flotillin-1 vs. siRNA control. Es mostren 2 exemples del canvi de localització que pateix Notch1 en absència de Flotillin-1. *Panell inferior.* Comptatge de la localització subcel·lular de Notch1 en les condicions anteriors.

20.2. **Sobreexpressió de formes mutants de Flotillin-1**

Comprovada anteriorment la colocalització entre les formes exògenes de Flotillin-1 (Figura 28) i  $\Delta E$ -Notch1, s'analitzà quantitativament quina era la influència exacta de la localització de Flotillin-1 sobre la de  $\Delta E$ -Notch1. Cèl·lules transfectades amb myc-Notch1- $\Delta E$  i HA-Flot1, Flot-HA o GFP-NLS-Flot1 foren marcades pels respectius *tags* i sobre les cèl·lules positives per myc i HA/GFP es feu el recompte de la localització de Notch1, descartant igualment les formes intermèdies o poc clares. El resultat mostrà una tendència a la localització nuclear de Notch quan transfectàrem les cèl·lules amb HA-Flot1 i GFP-NLS-Flot1 mentre que la forma Flot-HA presentava proporcions similars al control, 60% no nuclear - 40% nuclear aproximadament (es feu servir GFP com a control per evitar tenir en compte una acció artefactual per part d'aquesta proteïna, la qual s'ha vist que pot presentar una localització nuclear per si mateixa, tot i que no s'ha detectat aquest comportament en els nostres experiments). Els resultats, tot i ser consistents, no presentaven significació estadística (figura 34, esq), probablement per la presència de Flotillin-1 endògena que emmascararia en part els resultats. Per corroborar-ho es realitzà el mateix experiment de sobreexpressió combinat amb la inhibició de Flotillin-1 endògena. El posterior comptatge demostrà com els efectes es repetien de forma més accentuada i amb significació estadística: mitjançant la sobreexpressió de Flotillin-1 nuclear s'aconsegueix l'entrada massiva de Notch1 a nucli i, de forma contrària, la retenció de Flotillin-1 a membrana plasmàtica redueix la presència nuclear de Notch1 (figura 34 dreta).

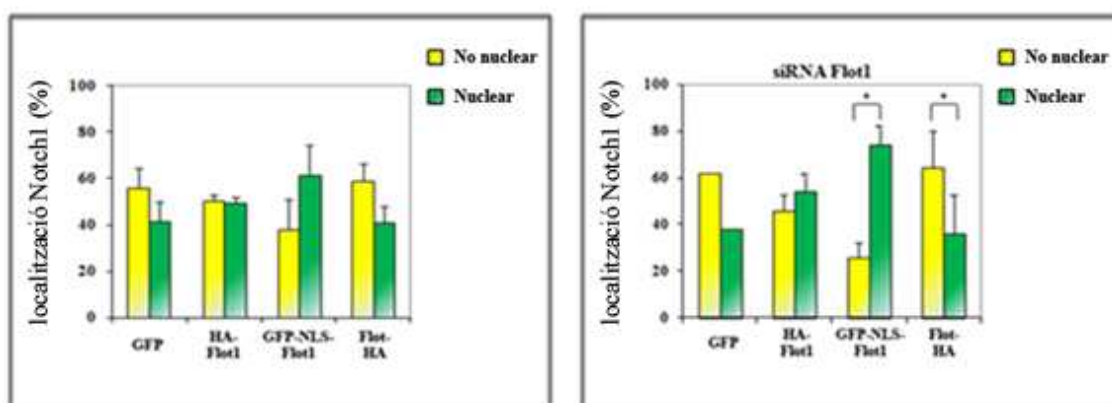


Fig 34. *Panell esquerre.* Influència de les diferents formes exògenes de Flotillin-1 sobre la localització subcel·lular de Notch1- $\Delta E$  en funció de la seva pròpia localització. *Panell dret.* Mateix experiment associant la depleció de Flotillin-1 endògena, de manera que es maximitzen els efectes de les formes transfectades sobre la localització de Notch1. Les barres grogues i verdes mostren els percentatges de cèl·lules amb marcatge de Notch1 no nuclear i nuclear respectivament

Finalment es realitzà una prova per corroborar la independència de la localització de ICN-Notch1 respecte Flotillin-1, de la mateixa manera que la seva activitat transcripcional no es trobava regulada per la presència o absència de Flotillin-1 (figures 23 i 29). Es cotransfectaren els constructes ICN-Notch1 amb HA-Flot1 o amb Flot-HA, observant-se com la localització de ICN era predominantment nuclear i no variava en funció de la localització subcel·lular de Flotillin-1 (figura 35).

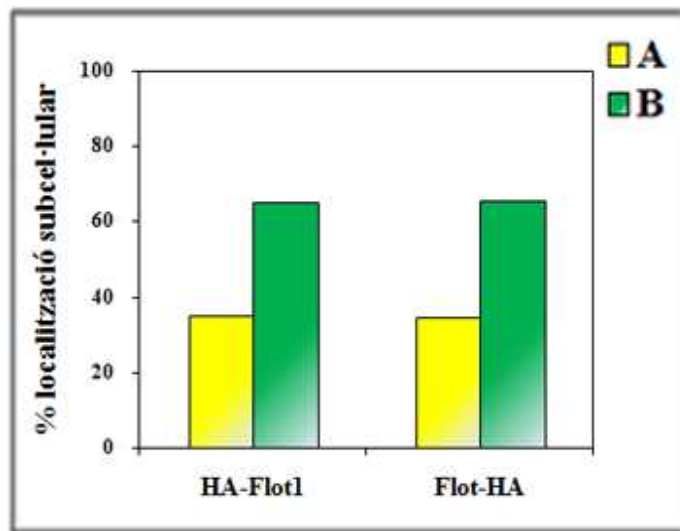


Fig 35. Localització subcel·lular de myc-Notch ICN en cèl·lules transfectades amb HA-Flot1 o Flot1-HA respectivament. A) localització citoplasmàtica; B) localització nuclear.

## 21. PAPER DE FLOTILLIN-1 A NUCLI

La segona hipòtesi plantejada contempla Flotillin-1 com un coregulador de la transcripció. Això implicaria la seva presència en els complexos associats als promotors dels gens directament controlats per Notch1. Per testar-ho es dugueren a terme assajos de CHIP i ReCHIP.

### 21.1. Presència de Flotillin-1 en els promotors dels gens regulats per Notch1 (HES1 i HEY1)

En primer lloc es testà la capacitat de Flotillin-1 per unir-se i, per tant, immunoprecipitar les seqüències promotores dels gens Hes1 i Hey1, ambdós conegudes dianes directes del receptor Notch1. Com a control positiu de l'experiment s'utilitzà un anticòs contra Notch1 i, com a control negatiu, una barreja d'immunoglobulines inespecífiques de ratolí, conill i cabra.

En el cas del promotor del gen Hes1, la PCR derivada de la immunoprecipitació de cromatina amb l'anticòs contra Flotillin-1 esdevingué positiva, mentre que no s'obtingueren senyals per les IgGs o per Notch1.

En canvi, per al promotor de Hey1 si s'obtingué el senyal esperat per al control positiu Notch1, de la mateixa manera que fou detectada la presència de Flotillin-1 (figura 36).

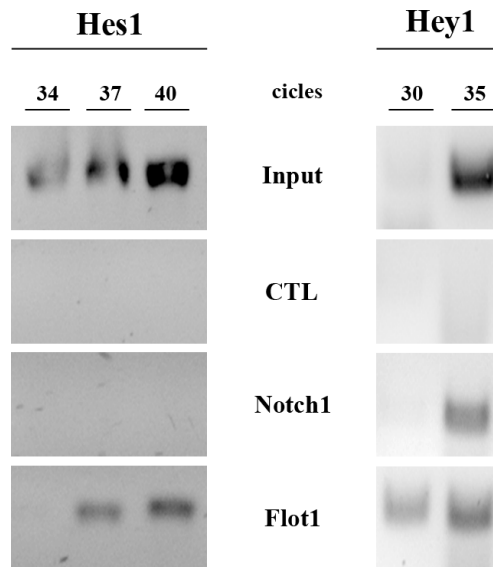


Fig 36. Resultat de la PCR a diferents cicles pels promotors dels gens Hes1 (esquerra) i Hey1 (dreta). La primera mostra és un Input o extracte total de DNA mentre que les següents corresponen a la immunoprecipitació de cromatina amb l'anticòs indicat.

### 21.2. Presència de Flotillin-1 en el promotor de HEY1 formant complex amb Notch1

L'experiment de ChIP demostra com una o més proteïnes es troben en la regió promotora d'un gen, però no que es troben formant un complex entre elles. Per esbrinar si Flotillin-1 i Notch1 poden ésser situades en el mateix complex unit a cromatina es procedí a la realització d'un assaig de ReChIP.

Sobre l'immunoprecipitat de Flotillin-1 o IgGs CTL es realitzà una segona immunoprecipitació amb Notch1, obtenint-se un resultat positiu en el cas de la immunoprecipitació inicial de Flotillin-1. Aquest resultat positiu es comprovà mitjançant el protocol revers. Sobre la primera immunoprecipitació de Notch1 només s'obtingué novament resultat positiu per Flotillin-1 confirmant-se la presència conjunta de Notch1 i Flotillin-1 en la regió promotora del gen Hey1.

Per tant no podem descartar cap de les dues hipòtesis plantejades, doncs es confirma la presència i el conseqüent efecte funcional de Flotillin-1 tant en els processos de transport de Notch1, com en els complexos que regulen la transcripció dels gens diana de la família bHLH.

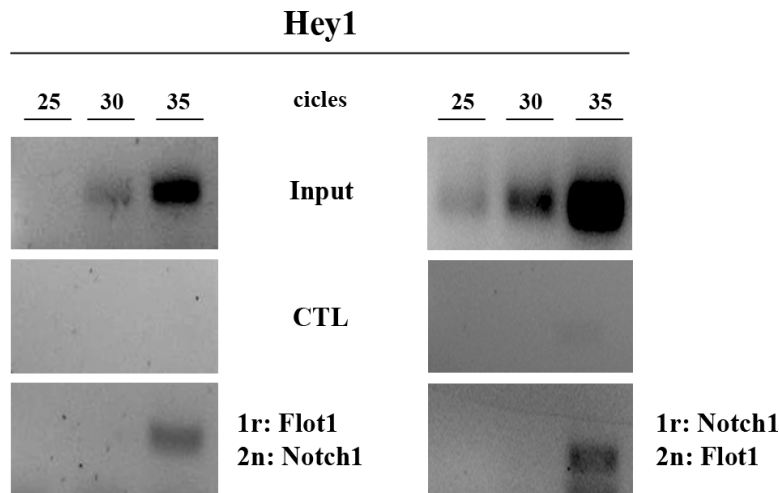


Fig 37. Resultat de la PCR a diferents cicles pel promotor del gen Hey1. A l'esquerra es mostra la immunoprecipitació seqüencial Flot1/CTL + Notch1. A la dreta, la immunoprecipitació recíproca Notch1 + Flot1/CTL per confirmar la interacció anteriorment descrita.

### 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

Amb les evidències observades sobre la correlació entre la localització nuclear de Flotillin-1 i l'estímul de la proliferació basal de les cèl·lules (Santamaria et al, 2005) es pretengué observar amb més detall la localització de Flotillin-1 al llarg de la progressió del cicle cel·lular. A tal efecte, s'utilitzà la línia cel·lular HeLa donada la característica de curta durada del seu cicle, fet que facilita enormement aquest tipus d'estudi. D'altra banda, l'elevat nombre de cèl·lules mitòtiques permeté observar una localització característica i diferencial de Flotillin-1 al llarg de les diferents etapes de la mitosi. Amb l'objectiu de caracteritzar millor aquesta localització es procedí a la realització de diferents immunofluorescències de marcadors de progressió mitòtica. De forma simultània al marcatge amb Flotillin-1 s'utilitzaren:

- CREST: el síndrome de CREST (calcinosi, fenomen de Raynaud, dismotilitat esofàgica, esclerodactília i telangectàsia) és una malaltia classificada dins d'un heterogeni grup d'esclerodermes. Una de les causes és la generació pel propi pacient d'anticossos contra proteïnes presents en el complex centròmer-cinetocor (Meyer, 2002). Un sèrum d'un pacient de CREST (cedit pel Dr. Timothy Thomson) ens permeté el marcatge d'aquestes estructures cinetocòriques per analitzar la presència de Flotillin-1 en elles.
- Tubulin: permeté analitzar la localització de Flotillin-1 en les estructures formades i organitzades per microtúbuls al llarg de la progressió de la mitosi: fus i pont mitòtic, centres organitzadors de microtúbuls, ...

### 22.1. Colocalització amb cinetocors

Flotillin-1 se situa parcialment sobre la zona del DNA en les fases inicials de la mitosi, on presenta una colocalització lleu amb el marcatge per CREST. Posteriorment, en metafase, abandona aquesta localització presentant-se de forma més definida en la regió que envolta els cromosomes. Un cop es dona la separació de les cromàtides germanes Flotillin-1 ocupa la zona central entre les dues agrupacions cromosòmiques fins que es completa el procés mitòtic, moment en que Flotillin-1 recupera el marcatge habitual de les cèl·lules en interfase, on presenta una localització ubiqua de membrana, citoplasma i nucli sense destacar en estructures concretes (figura 38).

### 22.2. Colocalització amb microtúbuls

La localització de Flotillin-1 a la zona pericromosòmica i a la placa equatorial de la cèl·lula en metafase i anafase respectivament condugueren a l'anàlisi d'una possible colocalització amb Tubulin, concretament amb els microtúbuls que originen el fus mitòtic. Aquesta es confirmà mitjançant la immunofluorescència per ambdues proteïnes, observant-se un augment gradual de colocalització en metafase i primeres etapes de l'anafase (figura 39). Amb l'avenç en la finalització de la mitosi, i la conseqüent desestabilització dels microtúbuls que formen el fus mitòtic, Tubulin perd la localització definida en aquestes estructures, i, amb ella, la colocalització amb Flotillin-1.

En base a les diferents observacions sobre els experiments d'immunofluorescència, es conclou que la localització de Flotillin-1 pateix una translocació des de la regió dels

cinetocors a la zona central del fus mitòtic en el moment previ a que succeeixi la transició metafase-anafase.

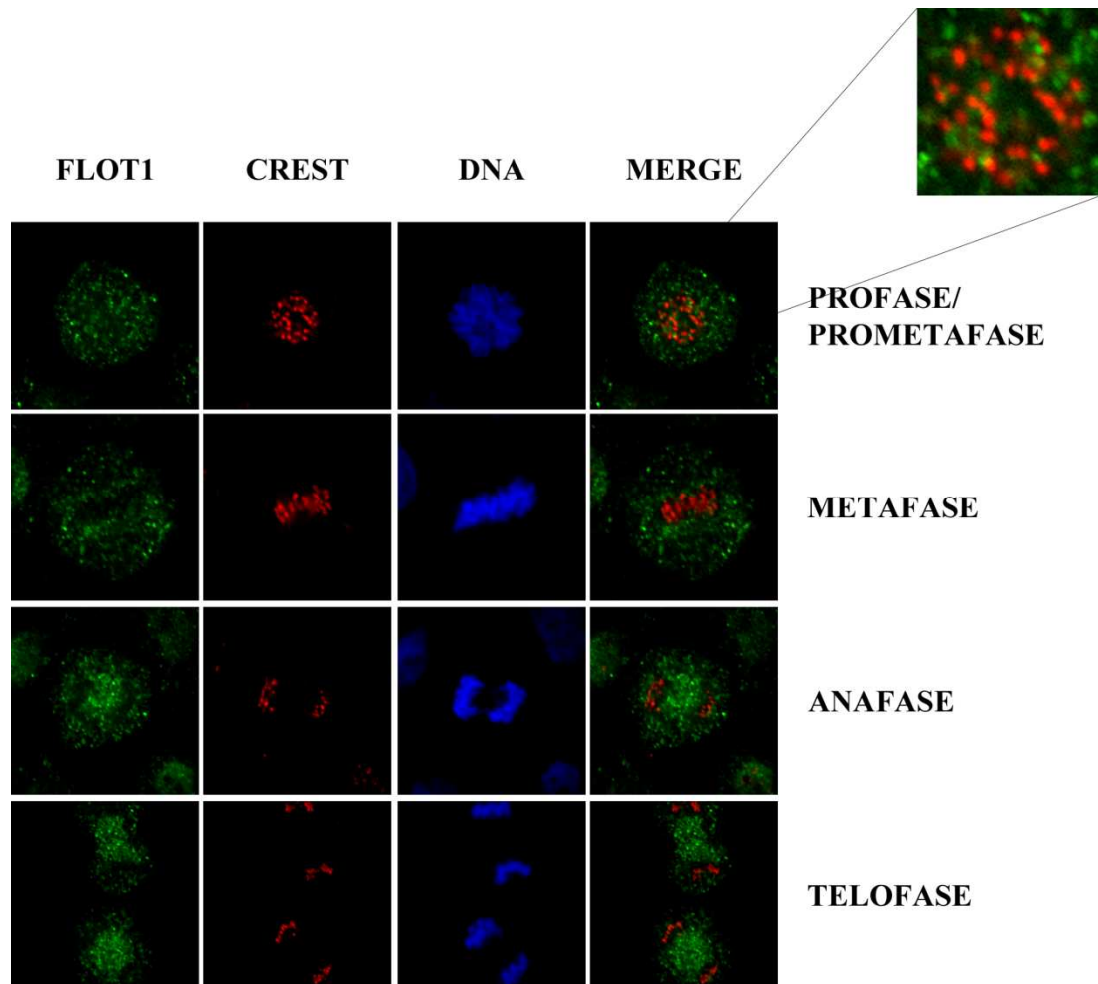


Fig 38. Immunofluorescència per Flotillin-1 (verd) i CREST (vermell) al llarg de les fases de la mitosi per mostrar la colocalització parcial en profase de Flotillin-1 amb el complex cinetocòric. S'utilitzà el marcador Hoechst 332 per la tinció del DNA, en base a la qual es determina l'etapa mitòtica en que es troba la cèl·lula.



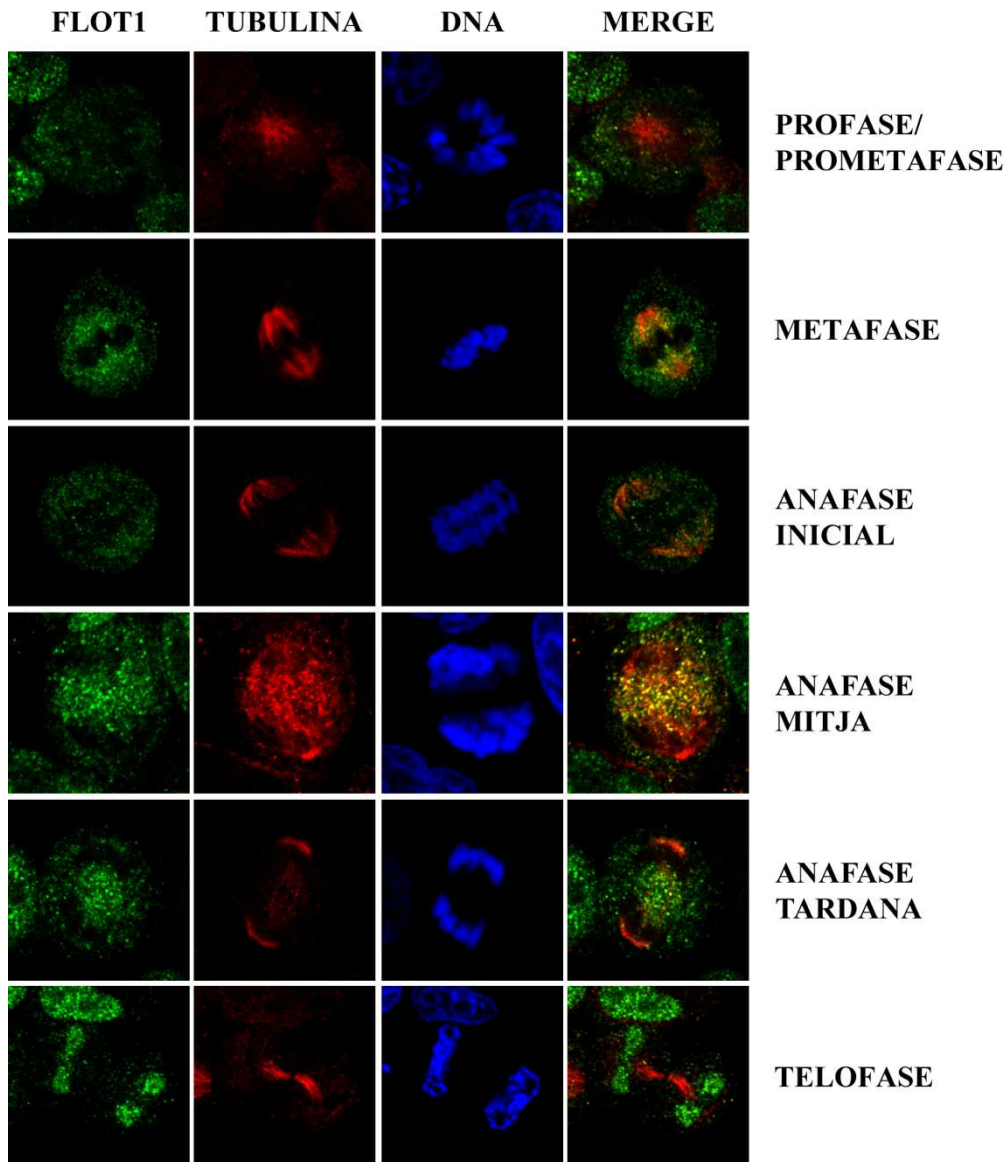


Fig 39. Immunofluorescència per les proteïnes Flotillin-1 (verd) i tubulina (vermell) que mostra colocalització de Flotillin-1 amb el fus mitòtic en la transició metafase-anafase de les cèl·lules.

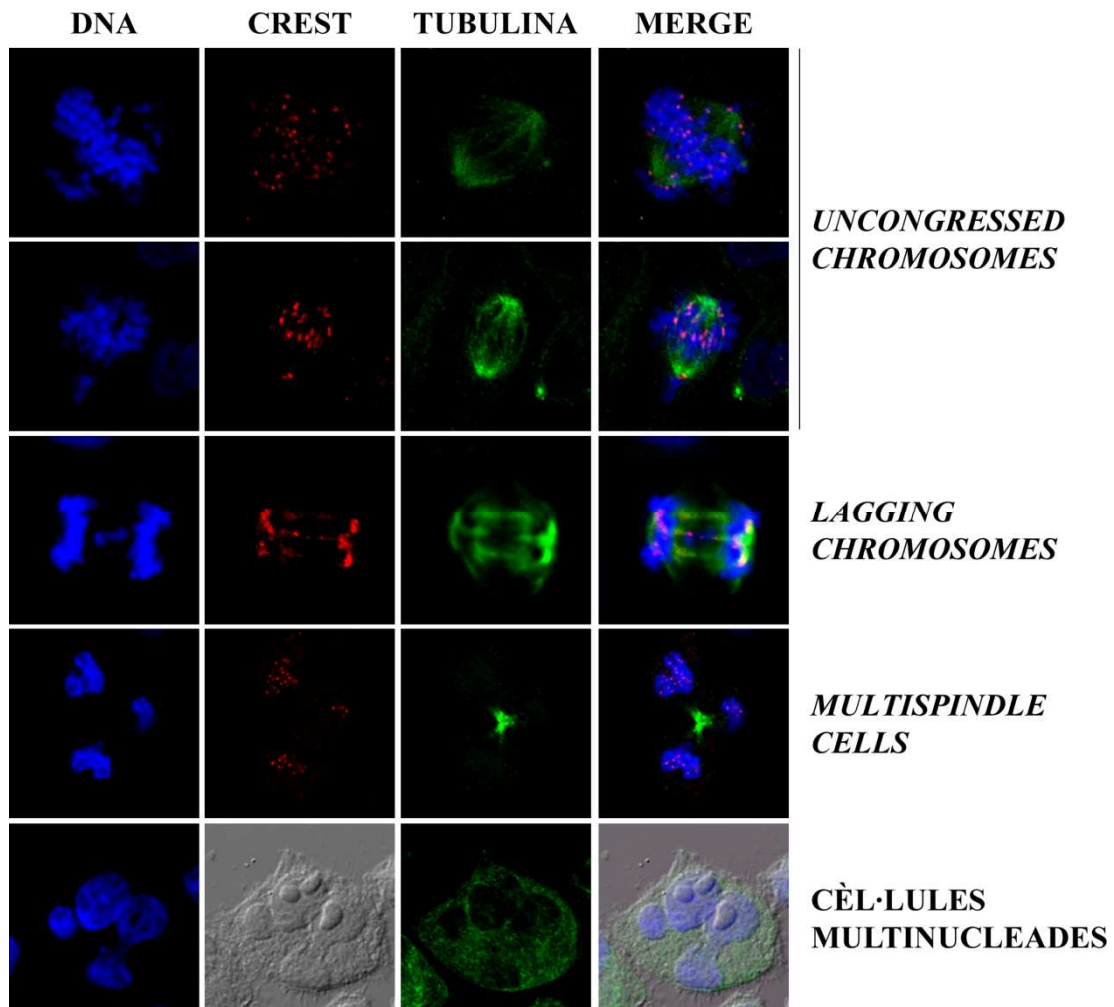
### 23. EFECTES FENOTÍPICS DE LA DEPLECIÓ DE FLOTILLIN-1

Un cop definida la localització de Flotillin-1 durant la mitosi, la qual suggereix un paper d'aquesta al llarg de la progressió de la fase M, l'objectiu fou esbrinar la funció que estava duent a terme. Aquesta anàlisi es realitzà a partir dels efectes fenotípics observats com a producte de la pèrdua de funció mitjançant les diferents tècniques d'interferència de Flotillin-1.

23.1. **Figures mitòtiques aberrants**

La depleció de Flotillin-1 provoca l'aparició de diferents tipus d'aberracions mitòtiques o cromosòmiques (figura 40, panell superior). Podem associar cada anormalitat a una fase del cicle mitòtic:

- *uncongressed chromosomes*: cromosomes mal alineats a la placa equatorial durant la metafase.
- *lagging chromosomes*: cromàtides que no se separen correctament durant l'anafase i resten al centre del pla equatorial.
- *mitotic multispindle*: quan el fus mitòtic no és bipolar i genera més de dos grups de cromàtides germanes que conduiran a la formació de cèl·lules multinucleades.



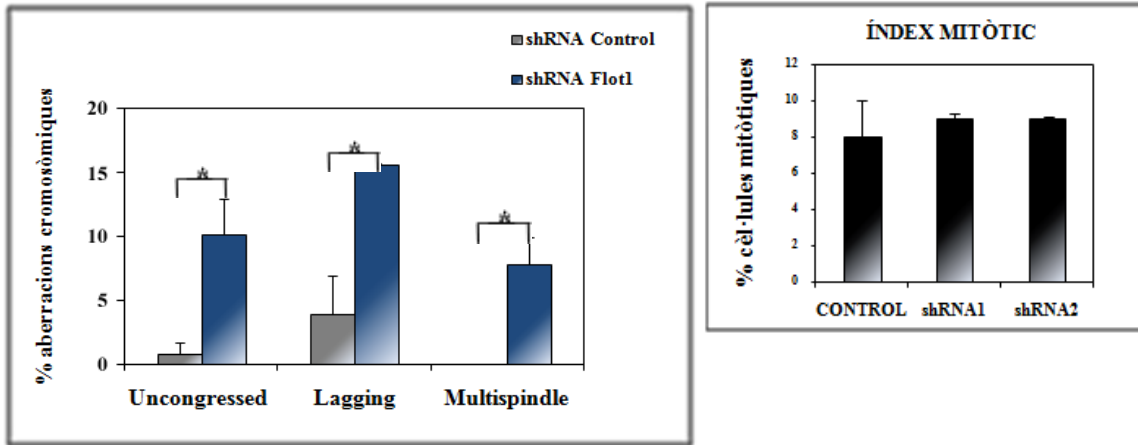


Fig 40. *Panell superior.* Exemplificació de les diferents aberracions cromosòmiques fruit de la inhibició de Flotillin-1 observades en les diferents etapes de progressió mitòtica. *Panell inferior esquerre.* Quantificació d'aquestes aberracions. *Panell inferior dret.* Índex mitòtic

L'observació d'aquestes aberracions es realitzà mitjançant immunofluorescències per CREST i Tubulin, així com pel marcatge del DNA amb Hoechst en cèl·lules deplecionades de Flotillin-1 en comparació a les tractades amb siRNA control. Es comptaren les cèl·lules mitòtiques presents en metafase, anafase i citocinesi i el nombre de *uncongressed*, *lagging* i *multispindle* respectivament en cada una de les tres fases, establint així el percentatge d'aberracions per cada fase mitòtica. El recompte demostra com l'aparició d'aquestes figures és clarament superior en les cèl·lules interferides per Flotillin-1 respecte el control (figura 40, panell inferior esquerre). L'índex mitòtic similar en tots els casos (figura 40, panell inferior dret) descarta que l'augment en el nombre d'aberracions es pugui explicar per una proporció diferent de cèl·lules mitòtiques, sinó que s'ha de fer per la problemàtica que presenten aquestes cèl·lules per completar correctament la mitosi.

### 23.2. Temps de mitosi i distribució de fases mitòtiques

Una explicació a l'aparició d'aberracions cromosòmiques és la pèrdua dels mecanismes de control sobre la localització i segregació dels cromosomes al llarg de la progressió mitòtica. El *checkpoint* de control de la transició metafase-anafase impedeix la progressió del cicle quan la orientació i la tensió de la unió dels cromosomes als microtúbuls del fus mitòtic no és la correcta. Si es perden aquests mecanismes de control, la progressió vers l'anafase té lloc en distribucions cromosòmiques anòmales i s'observen les aberracions anteriorment descrites. Una prova de la pèrdua d'aquests

mecanismes de control pot observar-se per la reducció del temps que les cèl·lules triguen a completar el procés. S'utilitzà la tecnologia de microscòpia *in vivo* per calcular el *temps de mitosi* -temps que triguen les cèl·lules a completar la mitosi-, el qual s'establí com a constant en tots els casos estudiats (cèl·lules HeLa infectades amb partícules lentivirals codificants per un shRNA control i dos clons de cèl·lules HeLa inhibits per Flotillin-1 mitjançant dues seqüències de shRNA diferents) (Figura 41, panell esquerre).

Si que s'observa un canvi en la distribució de les cèl·lules en les diferents fases. Les cèl·lules interferides per Flotillin-1 s'acumulen en les fases prèvies a la metafase, disminuint considerablement el percentatge de cèl·lules en anafase i telofase (Figura 41, panell dret).

En conjunt, aquests dos resultats demostren com l'aturada parcial en metafase es produeix per l'acció dels mecanismes de control en cèl·lules que pateixen problemes per a l'orientació i segregació cromosòmiques. No obstant (si el temps de mitosi total no varia), un cop superat (o ignorat) aquest punt, les cèl·lules realitzen les fases finals a major velocitat, generant-se noves possibilitats de producció d'aberracions cromosòmiques. A la figura 42 es pot observar una seqüència de divisió anòmala en una cèl·lula interferida per Flotillin-1; que condueix a la formació d'un fus mitòtic multipolar i l'aparició d'una cèl·lula binucleada.

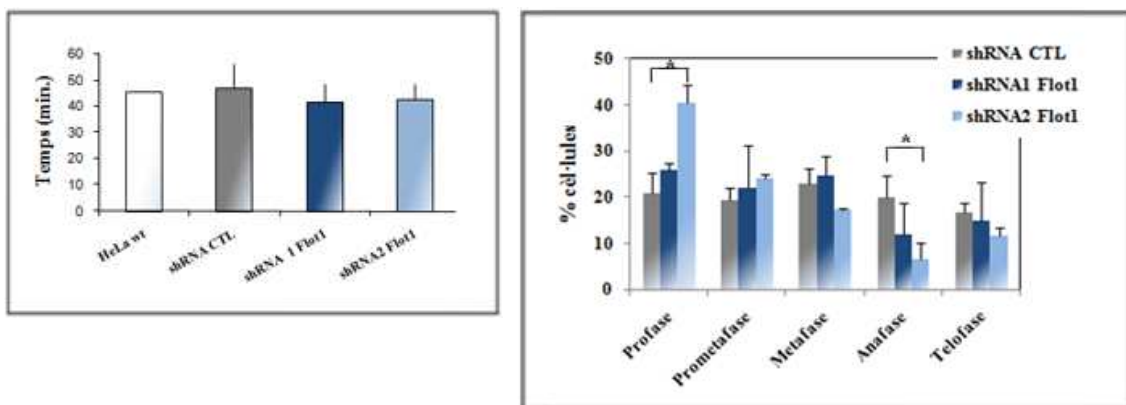


Fig 41. *Panell esquerre* Temps de mitosi (temps que necessita una cèl·lula per completar la fase M). *Panell dret*. Recompte del percentatge de cèl·lules presents en cada fase mitòtica en els casos anteriors (n=300 cèl·lules/condició) (\* = p<0.05)

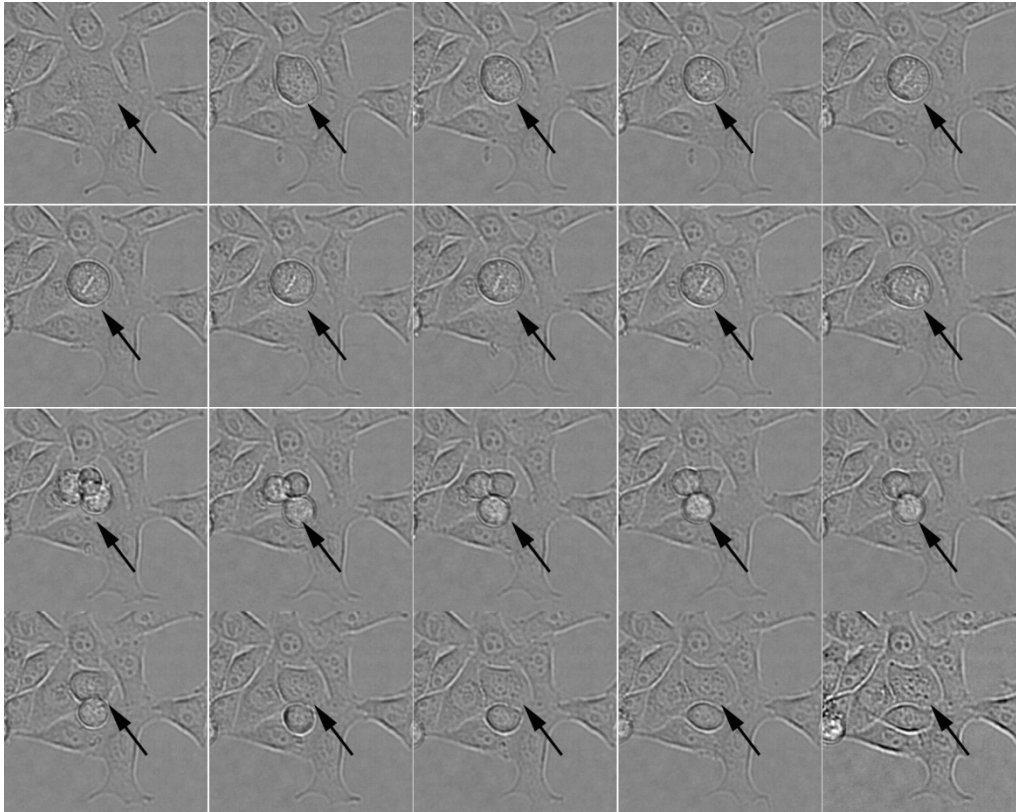


Fig 42. D'esquerra a dreta i de dalt a baix, seqüència mitòtica d'una cèl·lula interferida per Flotillin-1. S'observa com la metafase és més llarga de l'habitual i com la cèl·lula forma un fus mitòtic multipolar que origina una cèl·lula filla normal i una de binucleada. Cada fotografia parteix d'un lapse de temps de 5 min. respecte de l'anterior

### 23.3. Apoptosi

La progressió anormal d'una mitosi, que condueix a la formació i presència d'estructures anòmales, implica al seu torn una pèrdua de viabilitat de la cèl·lula que ha sofert aquest procés. Com a resposta, aquesta mateixa cèl·lula pot activar el programa gènic que conduirà a un procés d'apoptosi final. Es realitzà un assaig de TUNEL sobre cèl·lules interferides per Flotillin-1 observant-se un augment de cèl·lules apoptòtiques a les 72 i, especialment, a les 96 hores en comparació amb aquelles cèl·lules transfectades amb un siRNA control (figura 43). Encara que es tracta d'un augment considerable, no explica per si sol el descens proliferatiu descrit per les cèl·lules transfectades amb els RNA d'interferència de Flotillin-1 (figura 20). S'ha d'entendre doncs, que Flotillin-1 influencia altres mecanismes cel·lulars diferents de l'apoptosi per exercir el control sobre la proliferació basal de les cèl·lules, i que la pèrdua de viabilitat cel·lular és una conseqüència de l'alteració dels mecanismes de control sobre la progressió del cicle cel·lular que provoca la manca de Flotillin-1.

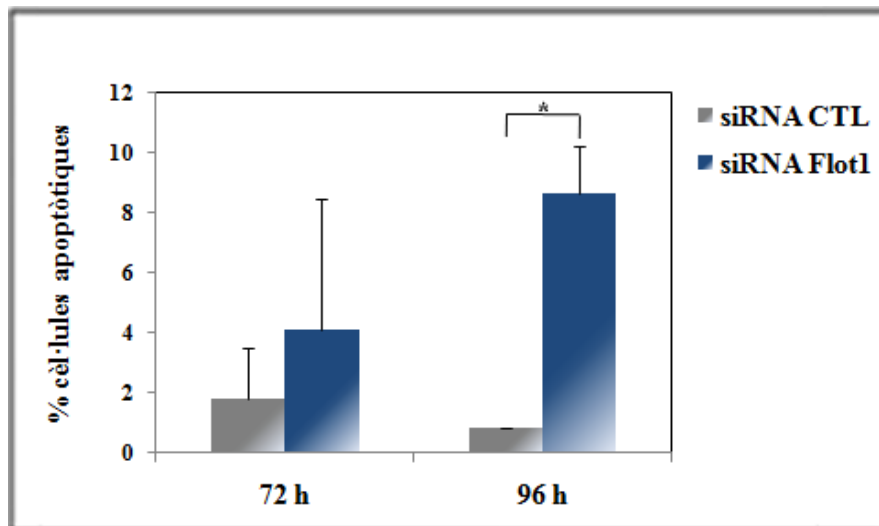


Fig 43. Anàlisi d'apoptosi per la tècnica de TUNEL en cèl·lules transfectades amb siRNAs control i Flotillin-1 respectivament. Recompte de cèl·lules que exhibeixen marcatge positiu per immunofluorescència (n = 300 cèl·lules) (\* = p<0.05)

#### 23.4. Activació de proteïnes del *checkpoint* mitòtic

Demostrada la problemàtica que presenten les cèl·lules HeLa interferides per Flotillin-1 per completar correctament la fase mitòtica; però un cop comprovada la constància en el temps global de mitosi, així com l'augment del nombre de cèl·lules en les etapes mitòtiques inicials, es pretengué comprovar la hipòtesi que la manca de Flotillin-1 activava el *checkpoint* mitòtic de la transició metafase-anafase. Un dels processos que s'observen quan aquest mecanisme de control s'activa és el reclutament de la proteïna MAD2 al complex cinetocòric (Ikui et al, 2002). Amb aquest propòsit, es realitzà una immunofluorescència amb anticossos contra MAD2 i CREST. La colocalització entre aquests dos marcadors indicaria activació d'aquest punt de control mitòtic. Es comparà la localització de MAD2 i CREST en cèl·lules interferides per Flotillin-1 en comparació amb cèl·lules control. Com a control positiu d'activació del *checkpoint* es tractaren les cèl·lules amb nocodazol, un agent que impedeix la polimerització de microtúbuls afectant a la formació del fus mitòtic i bloquejant les cèl·lules en prometafase. A la figura 44 s'observa colocalització entre MAD2 i CREST en les cèl·lules tractades amb nocodazol i en les cèl·lules amb inhibició de Flotillin-1, demostrant-se l'activació del *checkpoint* degut a un procés anormal en la transició metafase-anafase. En canvi, en les cèl·lules control no hi ha reclutament de MAD2 a la regió del cinetocor, confirmant que aquestes cèl·lules no tenen cap tipus d'afectació del seu cicle.

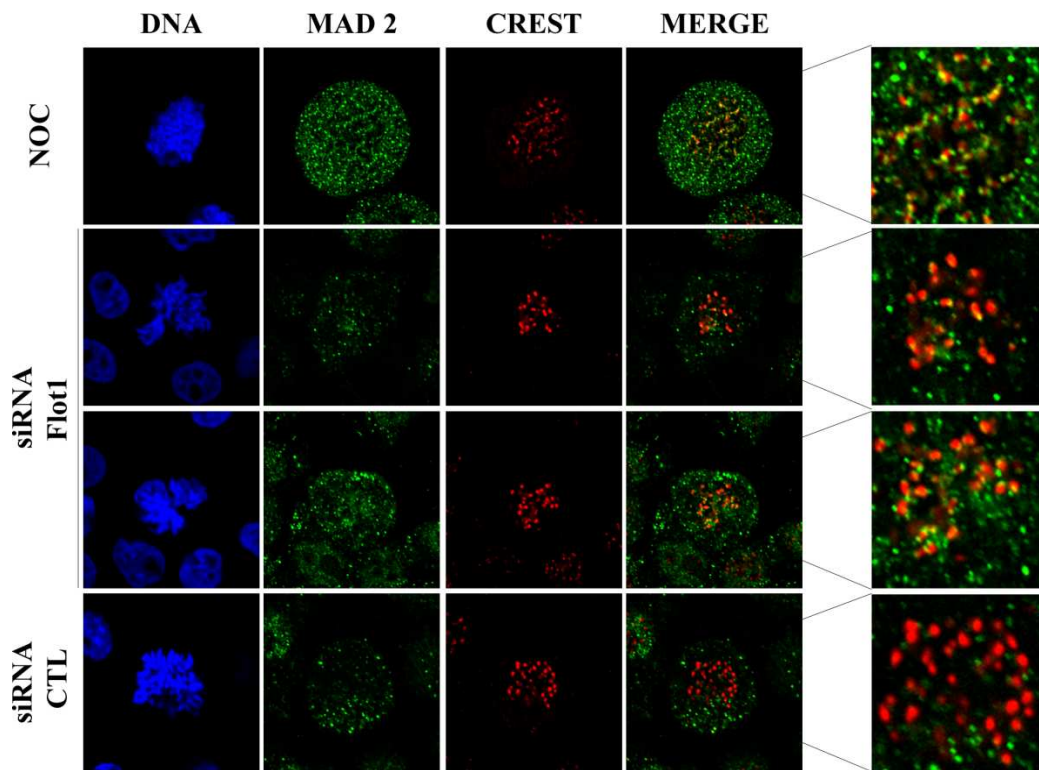


Fig 44. Immunofluorescència per MAD2 (verd) i CREST (vermell) en cèl·lules tractades amb nocodazol i transfectades amb siRNAs per Flotillin-1 i control respectivament.

#### 24. COMPARACIÓ DELS EFECTES FENOTÍPICS DE LES INHIBICIONS DE FLOTILLIN-1 I AURORA CINASA B

La localització característica de Flotillin-1 en la transició metafase-anafase així com el conjunt d'efectes fenotípics observats amb la seva depleció presentaven paral·lelismes amb els efectes descrits anteriorment per la manca de la proteïna Aurora cinasa B (Ditchfield et al, 2003; Hauf et al, 2003; Kunitoku et al, 2003), proteïna implicada en la progressió del cicle cel·lular, amb uns efectes majoritaris en les fases de la mitosi i, més concretament, en la transició metafase-anafase com l'element principal del complex que actua com a sensor de tensió de la unió cromosoma-microtúbul. Es realitzà una comparació entre els fenotips que presentaven cèl·lules inhibides per Flotillin-1 mitjançant un shRNA específic i cèl·lules inhibides per Aurora B amb l'ús de la tecnologia siRNA (figura 45). S'observa la presència de les mateixes estructures mitòtiques anòmales (*uncongressed* i *lagging chromosomes*) així com un elevat nombre de fusos mitòtics multipolars i cèl·lules multinucleades (fins a un 16% de les cèl·lules en el cas de l'absència de Flotillin-1 sent especialment significatiu el percentatge de binucleades).

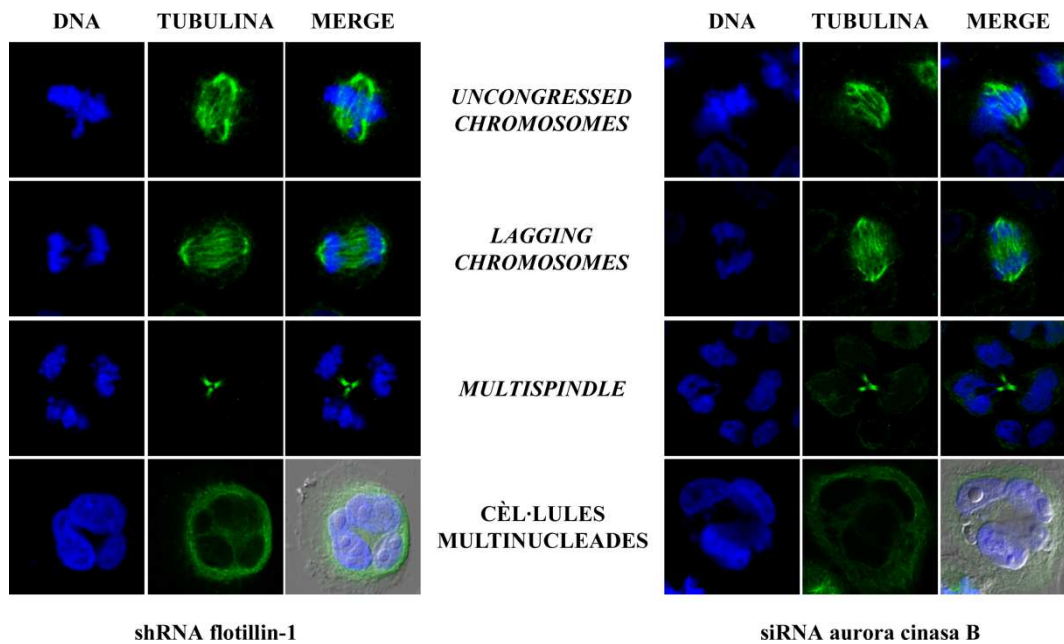


Fig 45. Comparació entre els efectes fenotípics originats per la inhibició de Flotillin-1 i Aurora cinasa B respectivament. S'observa la presència de les mateixes estructures aberrants en la reordenació dels cromosomes durant la mitosi, així com la formació de fusos defectuosos i l'aparició de cèl·lules plurinucleades.

## 25. INTERACCIÓ DE FLOTILLIN-1 AMB PROTEÏNES DEL COMPLEX CPC

En base a les similituds trobades entre els fenotips corresponents als *knock-down* per Flotillin-1 i Aurora cinasa B, es plantejà la possibilitat d'una interacció física i/o funcional entre ambdues proteïnes. Aquesta hipòtesi s'analitzà en diferents blocs d'experiments, per microscòpia funcional i per assajos bioquímics de coimmunoprecipitació i *GST-pull down*.

*Nota: els experiments de GST-pull down, així com la immunoprecipitació de la forma HA-Flotillin-1 han estat realitzats per la Dra. Marta Sesé, membre del laboratori. S'han inclòs en aquesta memòria perquè reforcen de forma significativa la interacció entre Flotillin-1 i Aurora cinasa B.*

### 25.1. Colocalització de Flotillin-1 amb Aurora B

La primera aproximació fou la immunofluorescència simultània d'Aurora B i Flotillin-1. Aurora B presenta la localització característica del complex *passenger proteins*, situant-se sobre els cinetocors dels cromosomes fins a la transició metafase-anafase, moment en que abandona aquesta estructura per situar-se sobre els microtúbuls del fus



mitòtic a la zona central, localització des d'on segueix exercint un control sobre la progressió mitòtica (Fuller et al, 2008). Flotillin-1, com s'ha comentat prèviament, presenta una localització similar, tot i que la transició cinetocor-microtúbul la realitza en un pas previ, durant la transició prometafase-metafase. D'aquesta manera, es pot apuntar una colocalització en les primeres fases de la mitosi, així com al llarg de l'anafase (figura 46). Aquesta coincidència es fa extensiva també a un percentatge de nuclis de cèl·lules en interfase, corresponents a la fase S, en la qual ambdues proteïnes veuen augmentada la seva expressió, així com la seva entrada a nucli (Santamaria et al, 2005; Terada et al, 1998). Aquest darrer resultat permet intuir que l'associació entre Flotillin-1 i Aurora B va més enllà del control sobre la progressió mitòtica i es pot fer extensiu a un control global sobre el cicle cel·lular.

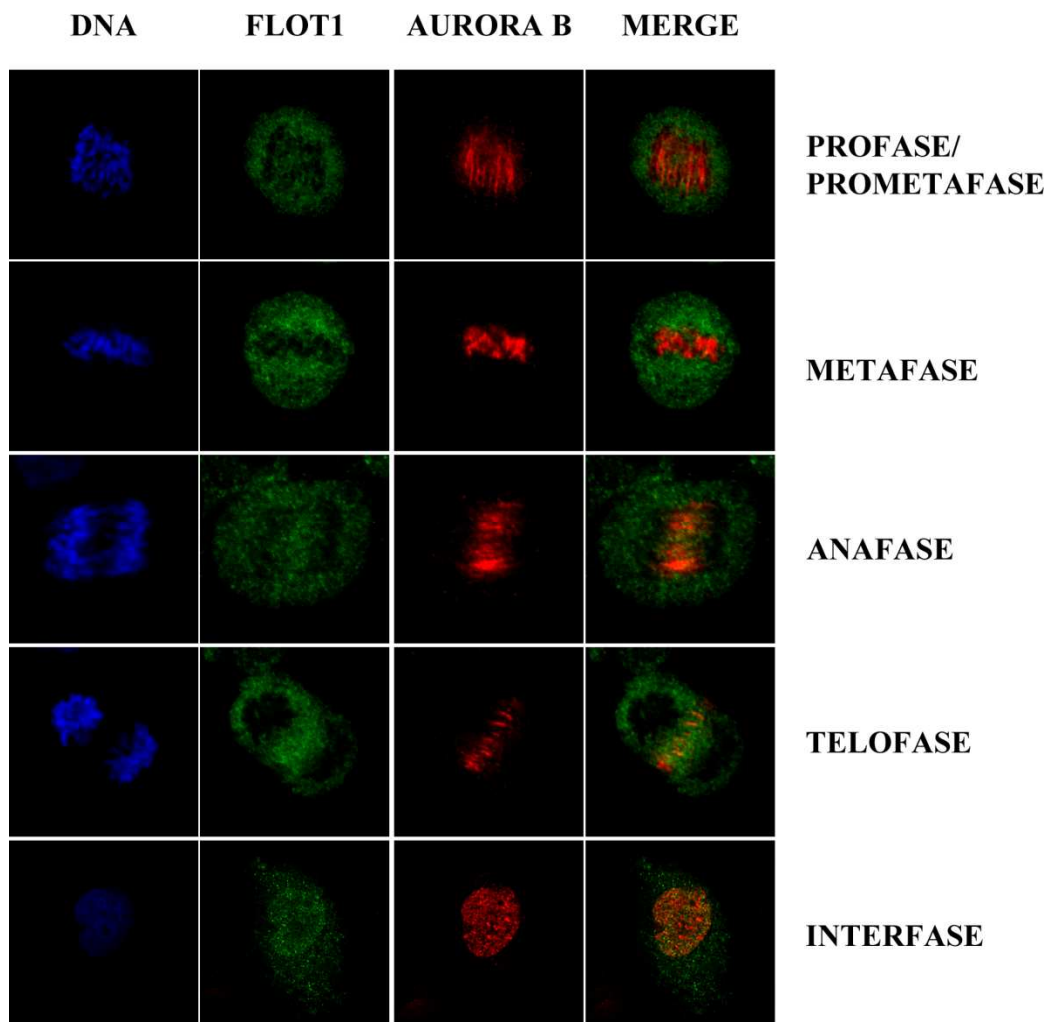


Fig 46. Immunofluorescència que mostra la colocalització entre Flotillin-1 (verd) i Aurora cinasa B (vermell) al llarg de les diferents fases de la mitosi, així com en interfase quan ambdues proteïnes es localitzen a nucli.

25.2. **Coimmunoprecipitacions**

La segona aproximació fou la realització de coimmunoprecipitacions entre Flotillin-1 i Aurora cinasa B, i addicionalment, entre Flotillin-1 i la resta de proteïnes que formen el complex CPC (*chromosome passenger proteins*): Survivin, Borealin i INCENP. El *Western Blot* sobre l'immunoprecipitat de Flotillin-1 confirma la interacció entre aquesta i Aurora B (figures 47a, c). També s'observa coimmunoprecipitació amb INCENP, considerada la subunitat reguladora del complex. mentre que el resultat és negatiu per survivin i borealin (figura 47c). La bibliografia aporta evidències sobre l'existència d'un complex Aurora B-INCENP independent dels altres dos components en moments del cicle diferents de la mitosi (Gassmann et al, 2004). També es procedí a realitzar l'experiment revers, comprovant com Aurora B també és capaç d'immunoprecipitar Flotillin-1, així com es reproduïren les interaccions ja descrites amb borealin i survivin (figura 47d). Es confirmà la interacció d'Aurora cinasa B amb Flotillin-1 mitjançant la sobreexpressió transitòria de la forma HA-Flotillin-1 (figura 47b).

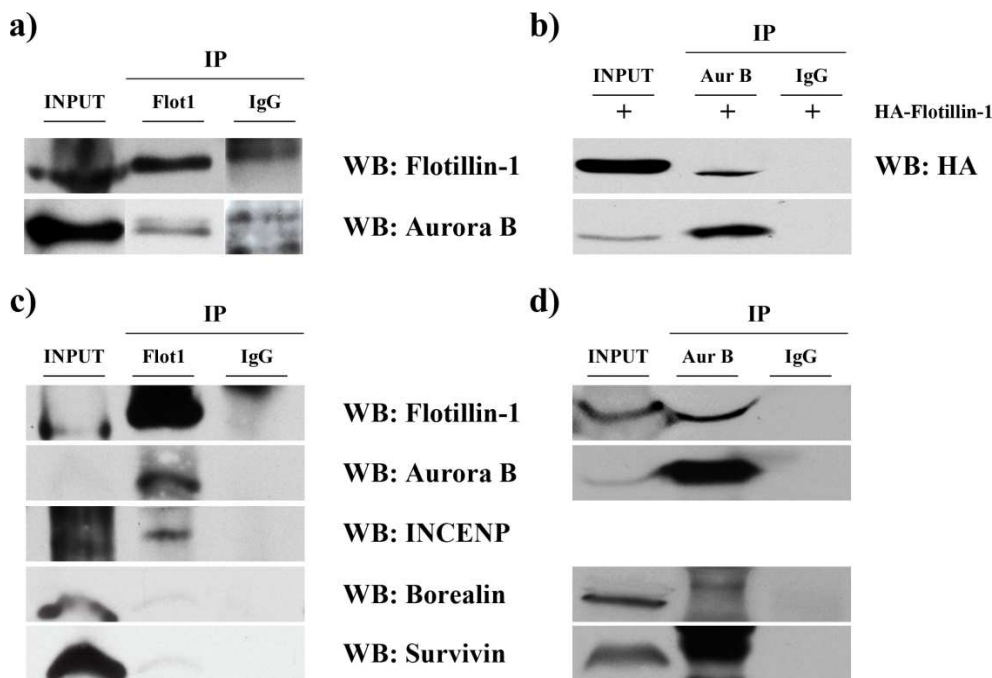


Fig 47. Coimmunoprecipitacions entre Flotillin-1 i les proteïnes del complex CPC. a) Flotillin-1 immunoprecipita Aurora B; b) immunoprecipitació reversa: Aurora B immunoprecipita HA-Flotillin-1; c) interacció Flotillin-1-*chromosome passenger proteins*; d) Aurora B interacciona amb Flotillin-1 endògena, a més de les interaccions ja descrites amb Borealin i Survivin.

D'acord amb els assajos d'immunofluorescència la relació Aurora B – Flotillin-1 no és permanent al llarg de les diferents etapes mitòtiques (figura 46) i per determinar les fases del cicle en que interaccionen, la línia cel·lular HeLa fou sincronitzada mitjançant el sistema de doble bloqueig amb timidina, recollint-se extractes als temps corresponents a les diferents etapes del cicle cel·lular (controlades per citometria de flux, figura 48, panell superior), i es repetí la coimmunoprecipitació entre ambdues proteïnes sobre els diferents extractes. Malgrat l'expressió d'Aurora cinasa B i Flotillin-1 mostra una regulació dependent de cicle cel·lular (figura 48, Inputs), essent màxima la seva expressió en fase M, la interacció entre ambdues proteïnes es manté en totes les condicions analitzades, suggerint que l'acció conjunta duta a terme pel complex Flotillin-1-Aurora B no es troba restringida a la fase mitòtica (figura 48). El resultat de la interacció entre Flotillin-1 i Survivin o Borealin és novament negatiu.

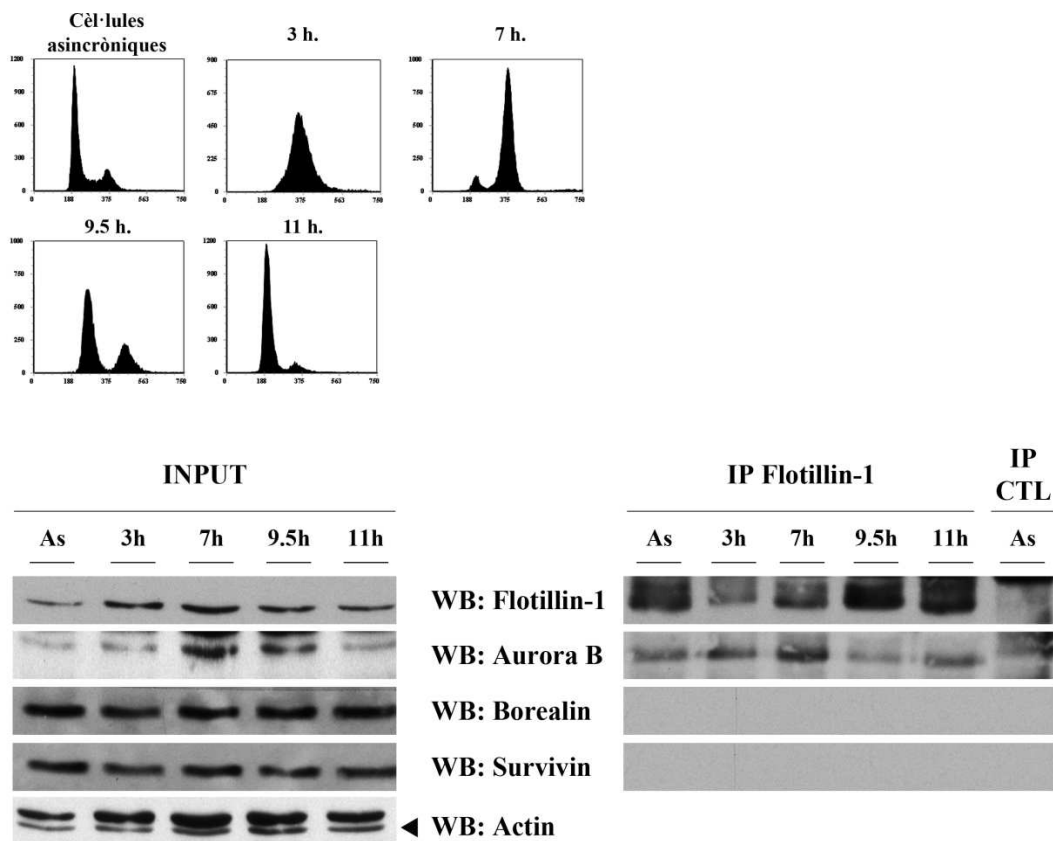
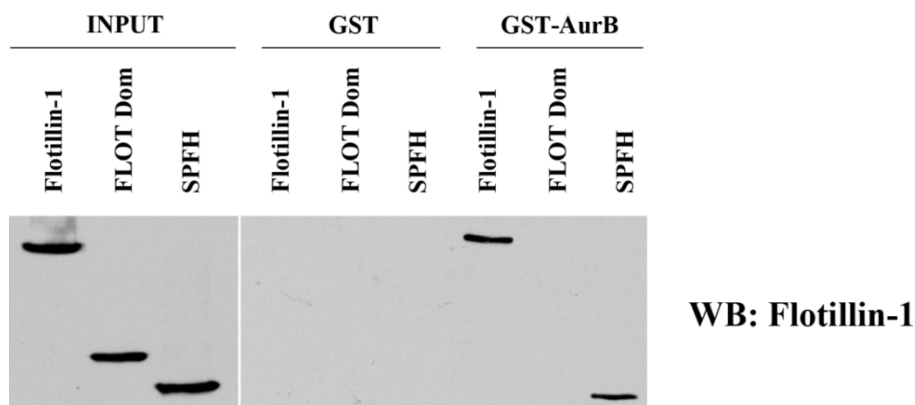
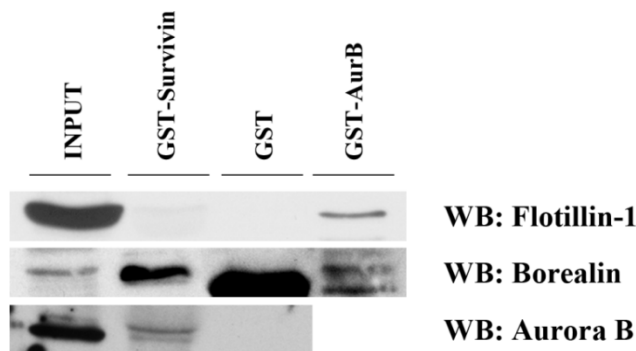


Fig 48. *Panell superior.* Sincronització de la línia cel·lular HeLa. Les cèl·lules asincròniques presenten un perfil característic amb la majoria de les cèl·lules en 2n. A les 3 hores posteriors a l'alliberament de les cèl·lules sincronitzades trobem la població en fase S. Assoleixen la fase G2/M (4n) a les 7 h. i, superat aquest punt, retornen progressivament a la fase G1 (9.5 i 11h.). *Panell inferior.* Es realitzà un assaig d'immunoprecipitació d'extractes cel·lulars recollits en cada punt de la sincronització. Els *inputs* mostren la regulació cicle-dependente dels nivells d'expressió de Flotillin-1 i Aurora cinasa B, mentre que les immunoprecipitacions mostren la interacció constant entre ambdues proteïnes.

25.3. *Pull-down*

L'expressió de les proteïnes recombinants GST- Aurora cinasa B (GST-Aur B) i GST-Survivin permeté complementar els experiments de coimmunoprecipitació. L'anàlisi per *Western Blot* de la proteïna Flotillin-1 confirma l'expressió d'aquesta únicament en aquell extracte incubat amb la proteïna GST-Aur B i no en el carril de GST-Survivin (figura 49, panell superior). Com a control positiu de la construcció GST-Survivin es realitzà també un *Blot* contra borealin que interacciona tant amb Aurora B com amb survivin.

A més, es pretengué analitzar amb major profunditat la interacció ja confirmada entre Flotillin-1 i Aurora B, esbrinant quin domini de Flotillin-1 era el responsable de la interacció amb Aurora B. Amb aquesta finalitat, es clonaren de forma independent els dominis SPFH i Flotillin (els dos dominis estructurals que formen la proteïna Flotillin-1) i es transfectaren de forma transitòria en cèl·lules HeLa. El resultat mostra interacció entre Aurora cinasa B i, de forma exclusiva, el domini SPFH de Flotillin-1 (figura 49, panell mig). Per immunofluorescència s'observa com aquest domini SPFH presenta capacitat de localització nuclear, mentre que el domini Flotillin-1 mostra una localització citoplasmàtica o de membrana, però no té capacitat per si sol d'entrar a nucli (figura 49, panell inferior).



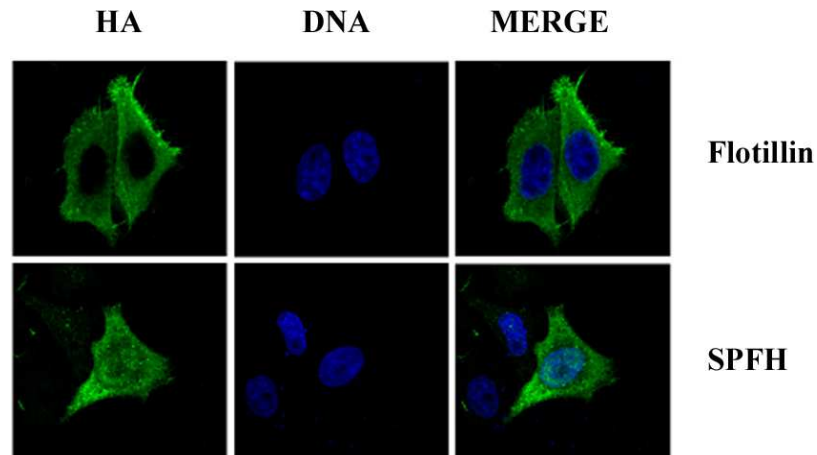


Fig 49. *Panell superior.* GST-pull-down que mostra el resultat positiu per a la interacció Flotillin-Aurora B i negatiu per Flotillin-Survivin. *Panell mig.* Anàlisi de la interacció dels dominis de Flotillin-1 amb Aurora cinasa B. El Western mostra el pull-down positiu per al domini SPFH i per la proteïna full length HA-Flot1 com a control. *Panell inferior.* Immunofluorescència per HA (verd) i DNA (blau) que mostra la localització nuclear de SPFH i citoplasmàtica/membrana pel domini Flotillin.

#### 25.4. Cosedimentació en gradient de densitat

Un cop provada la interacció entre Flotillin-1 i Aurora cinasa B, la localització nuclear d'aquesta i la seva permanència en el temps al llarg del cicle de la línia HeLa, s'analitzà la localització subcel·lular d'aquesta interacció. A tal efecte, s'aconseguí un fraccionament subcel·lular per centrifugació en gradient de densitat de sacarosa que permeté discernir entre nucli-fracció soluble-*lipid rafts*. Mitjançant aquest experiment es pretengué comprovar si la interacció podria donar-se en membrana plasmàtica i Flotillin-1 actuaria com a transportador d'Aurora B a nucli on executaria les seves funcions (una hipòtesi anàloga a la plantejada pel receptor Notch1 en el primer bloc de resultats). El marcatge de Tubulin mostra la bona qualitat del fraccionament. Flotillin-1 localitza en nucli i en les fraccions del 20-30% que correspondrien a la fracció membranosa de *lipid rafts*. Aurora B en canvi, només s'observa en nucli, descartant-se per tant, la seva localització en *lipid rafts*, suggerint-se la interacció entre Flotillin-1 i Aurora B de forma exclusiva en nucli.

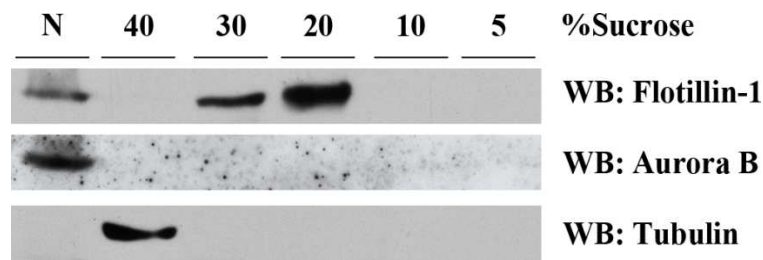


Fig 50. Localització de les diferents proteïnes en el gradient de densitat de sacarosa. N marca la fracció nuclear on es troben Aurora B i Flotillin-1. La fracció del 40% recull aquelles proteïnes solubles citoplasmàtiques com Tubulin, mentre que la fracció del 20% representa les membranes de baixa densitat on sedimenten les proteïnes associades a *lipid rafts*.

## 26. REGULACIÓ DELS NIVELLS I ACTIVITAT D'AURORA CINASA B

Demostrada la interacció entre Aurora cinasa B i Flotillin-1, així com la participació d'aquesta en els processos mitòtics regulats per Aurora B, el dubte plantejat fou la funció que estava duent a terme Flotillin-1 en els complexos reguladors de la progressió mitòtica. La primera aproximació fou estudiar l'afectació d'Aurora B i dels mecanismes regulats per ella en els casos de pèrdua o guany de funció de Flotillin-1.

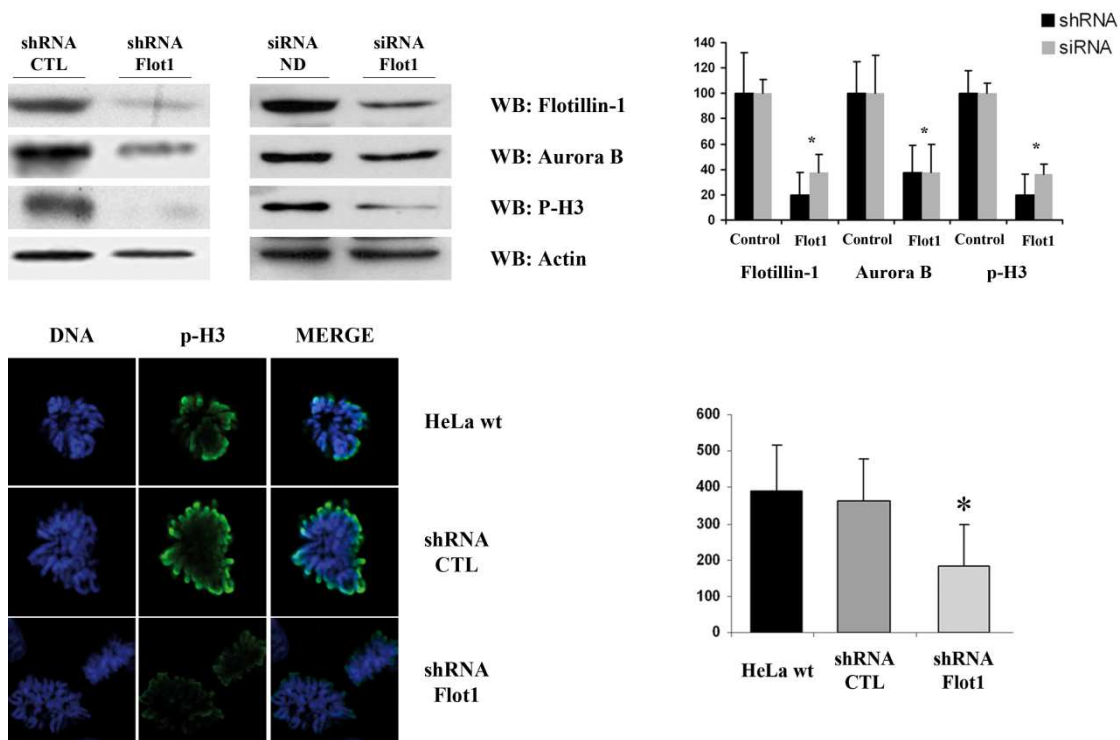
### 26.1. Depleció de Flotillin-1

Mitjançant la tecnologia shRNA i siRNA s'aconseguí la reducció dels nivells de Flotillin-1 entre un 60 i un 80% (figura 51, panell superior). Aquesta reducció provoca un descens significatiu en els nivells d'Aurora B. De la mateixa manera, s'observa una menor activitat cinasa, mesurada com els nivells de la proteïna histona H3 fosforilada (p-H3), un substrat majoritari d'Aurora B al llarg de la progressió mitòtica (figura 51, panell superior). Aquest descens d'activitat es comprovà també per mitjà d'una immunofluorescència per p-H3 on es compara el senyal que mostren les cèl·lules inhibides per Flotillin-1 respecte les que han incorporat el shRNA control o cèl·lules HeLa sense infectar. Per confirmar el descens de marcatge de p-H3 es realitzà la corresponent quantificació mitjançant un *software* d'anàlisi adient (figura 51, panell mig).

Finalment, es realitzà una anàlisi dels nivells de la resta de proteïnes del complex CPC, on no s'observaren canvis significatius en els nivells de Borealin o Survivin. Per

INCENP, en canvi, s'observà un descens paral·lel a l'observat per Aurora B (figura 51, panell inferior esquerre). Aquests resultats concordarien amb els resultats de les coimmunoprecipitacions presents a la figura 47, mostrant la presència d'un complex Aurora B – Flotillin-1 i probablement INCENP, independent del *chromosome passenger complex*.

Es realitzà també una anàlisi per RTqPCR dels nivells de mRNA d'Aurora B i Flotillin-1 per descartar un efecte de la inhibició de la proteïna Flotillin-1 sobre la transcripció d'Aurora B. La figura 51 (panell inferior dret) mostra el resultat per aquest experiment on els nivells de mRNA d'Aurora B no mostren una alteració significativa amb l'aplicació de les seqüències de shRNA de Flotillin-1. D'aquesta manera, es pot concloure que l'efecte que Flotillin-1 està duent a terme en la regulació d'Aurora B és directament sobre la proteïna i no sobre el seu transcrit.



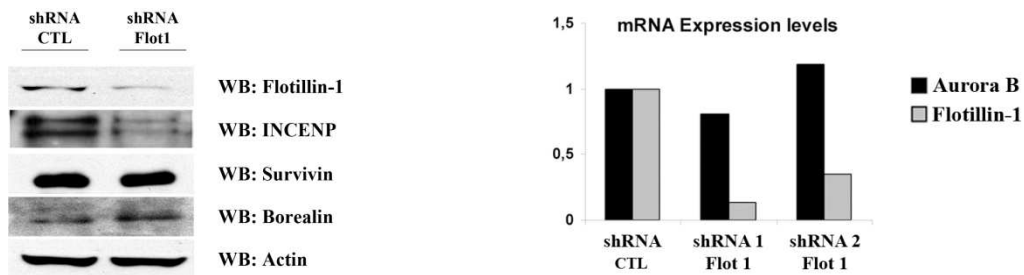


Fig 51. *Panell superior.* Anàlisi per *Western blotting* dels efectes de la depleció de Flotillin-1 sobre els nivells d'Aurora cinasa B i la seva activitat expressada com a nivells d'histona H3 fosforilada. La quantificació està expressada com la mitja més la desviació estàndard de 3 experiments independents, mostrant-se un d'ells com a exemple significatiu. *Panell mig.* Anàlisi per immunofluorescència dels efectes de la depleció de Flotillin-1 sobre l'expressió de p-H3 i quantificació d'aquesta expressió. *Panell inferior esquerra.* Anàlisi per *Western blotting* de l'expressió de la resta de proteïnes del complex CPC en absència de Flotillin-1. *Panell inferior dret.* RTqPCR que demostra l'acció nul·la de la inhibició de Flotillin-1 sobre el transcrit d'Aurora B.

A partir dels experiments detallats prèviament es pot concloure que la manca de Flotillin-1 comporta un descens en els nivells d'expressió d'Aurora B i aquest descens implica la conseqüent pèrdua de funció i l'aparició del fenotip mitòtic aberrant comentat en els apartats 19 i 20. No obstant, es volgué analitzar si la proteïna Aurora B presentava a més de la reducció de la seva expressió, algun tipus de deslocalització en cèl·lules interferides per Flotillin-1 (el que significaria que Flotillin-1 seria necessària per al direccionament d'Aurora B a les estructures mitòtiques). Aquesta hipòtesi es comprovà mitjançant immunofluorescència, degut a que la reducció ocasionada en els nivells totals de proteïna d'Aurora B no impedeix la seva visualització al microscopi confocal. Novament, s'observaren estructures anòmales però no es modificà la localització d'Aurora B, la qual es trobava adaptada a les aberracions observades (figura 52):

- En metafase, localitza sobre els cromosomes, estiguin ben alineats o no.
- En anafase se situa a la zona central del fus mitòtic tot i la presència de *lagging chromosomes*.
- En telofase i citocinesi, forma part del pont mitòtic encara que trobem fusos multipolars i divisions en més de 2 cèl·lules filles.



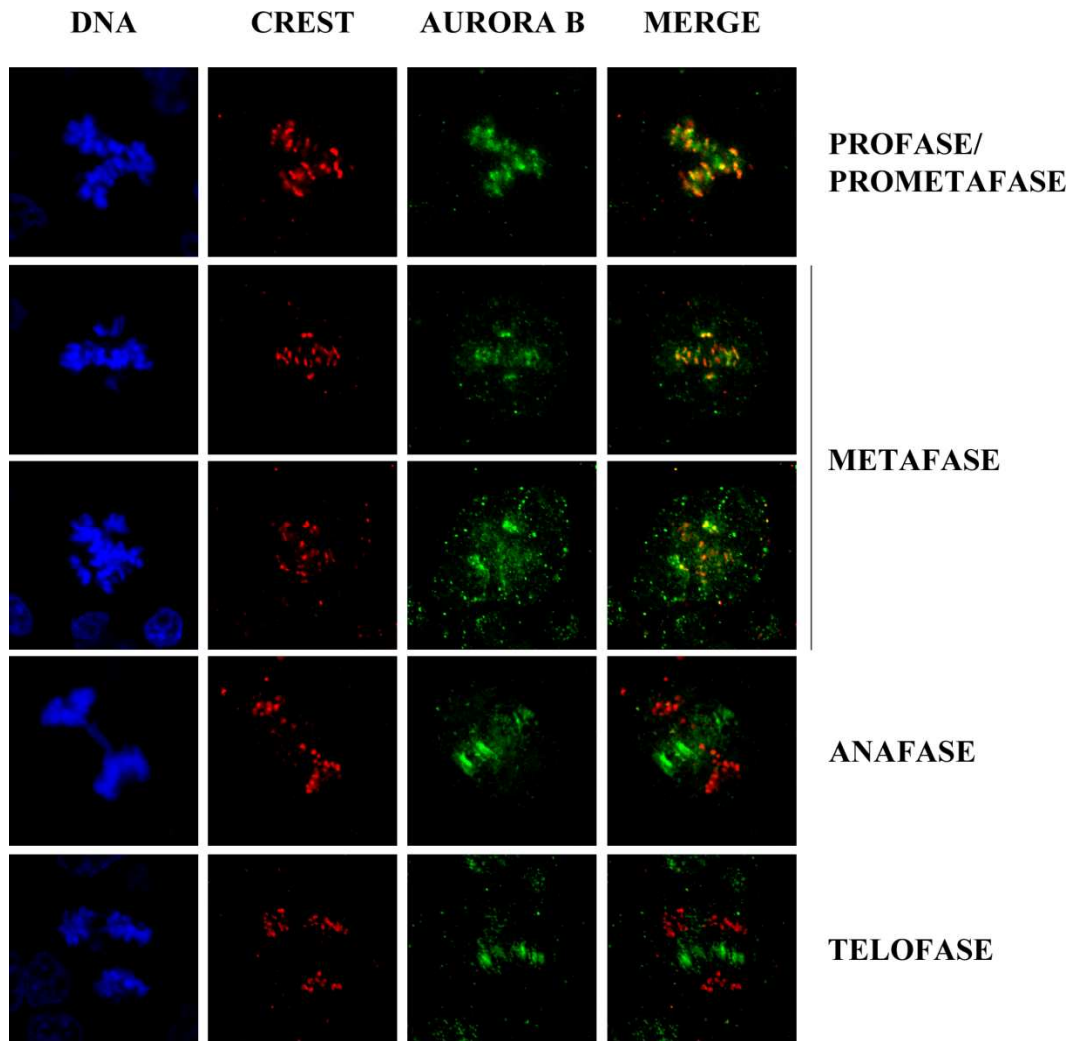


Fig 52. Diferents exemples d'estructures cromosòmiques anòmals marcats amb Hoechst 332 (DNA, blau) i CREST (cinetocors, vermell) i localització d'Aurora B (verd) en aquestes situacions.

## 26.2. Sobreexpressió de Flotillin-1

Per confirmar la hipòtesi per la qual els nivells d'Aurora B dependrien en forma directament proporcional de l'expressió de Flotillin-1, es realitzà l'experiment invers al presentat en l'apartat anterior. Se sobreexpressaren transitòriament dues concentracions de les diferents construccions HA-Flotillin1, Flotillin-HA i HA-Flotillin  $\Delta$ C amb l'objectiu d'alterar la localització de Flotillin-1, alterant també la funcionalitat de la proteïna i observant possibles anomalies sobre Aurora B. Per immunofluorescència novament no s'observaren variacions en la localització d'Aurora B (dades no mostrades). Per *Western Blot*, en canvi, s'aconsegueix un moderat augment en els

nivells d'Aurora en la condició que s'havien transfectat 4µg d'HA-Flotillin (correspon a la sobreexpressió de la forma més similar a la proteïna endògena i a la màxima concentració permesa pel mètode de transfecció emprat), confirmant d'aquesta manera la dependència dels nivells d'Aurora cinasa B respecte dels nivells de Flotillin-1 (figura 53).

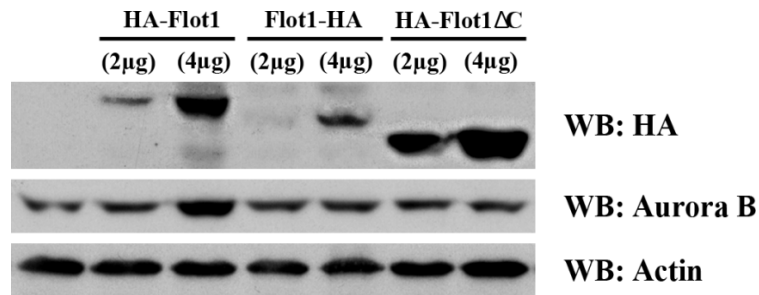


Fig 53. Variació dels nivells d'Aurora B en funció de la sobreexpressió de les formes exògenes de Flotillin-1 a dues concentracions diferents.

## 27. REGULACIÓ DE LA DEGRADACIÓ D'AURORA CINASA B PER LA VIA DEL PROTEASOMA

Demostrada la regulació dels nivells i activitat d'Aurora cinasa B per part de Flotillin-1 i coneixent-se la regulació/degradació d'ambdues proteïnes per mitjà del procés d'ubiquitinació i de la via del proteasoma (Solis et al, 2007; Stewart & Fang, 2005), es pretengué comprovar si la presència/absència de Flotillin-1 afectava a la degradació d'Aurora B per aquest sistema. S'utilitzaren cèl·lules inhibides per Flotillin-1, les quals presentaven la conseqüent reducció en els nivells d'Aurora cinasa B, tractades amb 2 inhibidors del complex proteasoma (epoxomicina i lactacistina). En els carrils on s'aplicà la droga corresponent s'observa una recuperació dels nivells d'Aurora B mentre que la recuperació de Flotillin-1 és mínima i correspon a la poca proteïna que resta sense inhibir després de la incorporació del shRNA corresponent (figura 53). Per tant, la presència de Flotillin-1 estaria evitant la degradació d'Aurora B per la via del proteasoma.

En definitiva, Flotillin-1 interacciona amb Aurora cinasa B regulant positivament els seus nivells de proteïna i, en conseqüència, la seva activitat. El mecanisme funcional pel que ho aconsegueix és l'estabilització i augment de la vida mitja d'Aurora B, impedit la seva degradació via proteasoma.

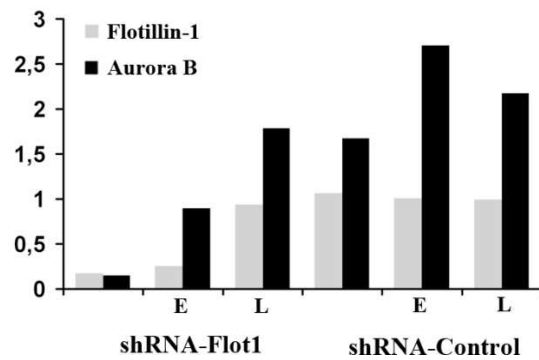
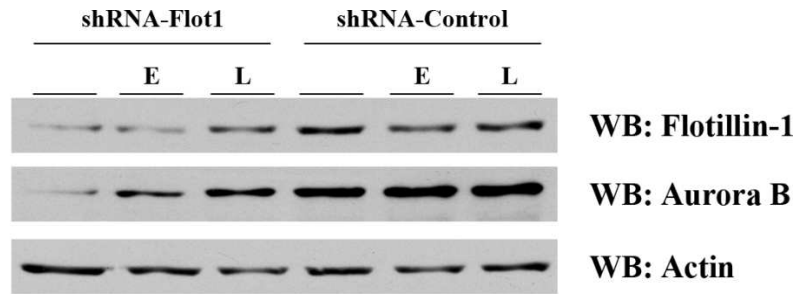


Fig 54. Tractament amb inhibidors del proteasoma (E: epoxomicina; L: lactacistina) en cèl·lules que han incorporat un shRNA per Flotillin-1 comparades a aquelles que han incorporat un shRNA control. S'observa com l'anulació de la via ubiquitina-proteasoma permet la recuperació d'Aurora B en les cèl·lules que presenten dèficit de Flotillin-1