



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.

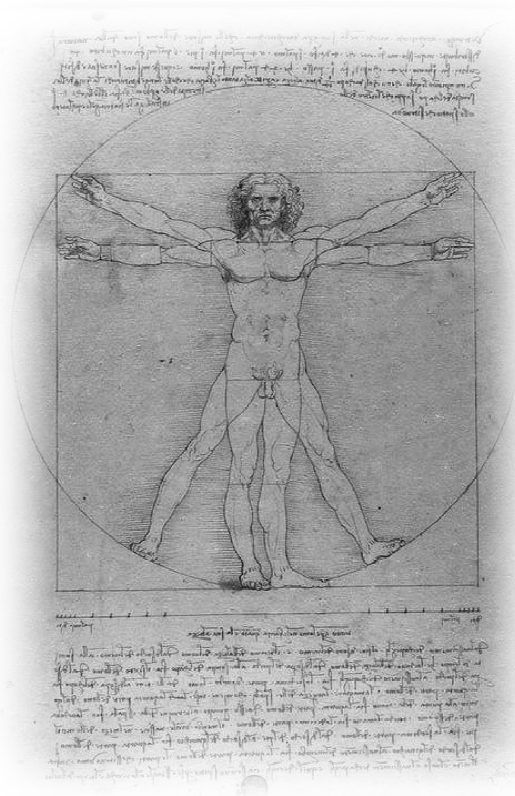
Dra. Rosanna Paciucci
directora de tesi

Dra. Adela Mazo
tutora de tesi

Valentí Gómez
autor

Barcelona, Abril de 2009

INTRODUCCIÓ



0. PRÒLEG

Flotillin-1 és una proteïna característica de membrana plasmàtica i més concretament, de les regions conegudes com *lipid rafts*, les quals es consideren regions de membrana especialitzades principalment en el reclutament de receptors i l'inici de rutes de senyalització intracel·lulars. El nostre grup d'investigació ha aportat noves dades al coneixement que es té d'aquesta proteïna (tesi de la Dra. Anna Santamaría) fent canviar el concepte sobre el seu paper. S'observà una marcada localització nuclear de Flotillin-1, així com la correlació directa entre els nivells de proteïna presents a les cèl·lules i l'estat proliferatiu de les mateixes.

Preses en conjunt, i d'acord amb les suggerències aportades per les dades presents a la bibliografia sobre el paper de Flotillin-1 en altres processos com l'endocitosi i el transport intracel·lular, s'arriba a la conclusió que la funció de Flotillin-1 s'ha de considerar d'una forma més global i no restringir-la a una actuació exclusiva en membrana plasmàtica.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral es aclarir els processos tant citoplasmàtics com nuclears en què pren part Flotillin-1, amb el propòsit d'aconseguir determinar la funció concreta que està duent a terme i classificar-la en el grup adequat (proteïna enzimàtica, adaptadora, receptora, factor de transcripció, ...).

1. LIPID RAFTS

El model clàssic de membrana plasmàtica cel·lular proposa la bicapa lipídica com un solvent tridimensional per a les proteïnes ancorades en ella, sense influència en aquestes i amb funció purament estructural. Actualment, ha quedat demostrat que aquest concepte es troba obsolet i que la membrana plasmàtica juga un paper clau en la regulació dels diferents processos que engloben l'acció cel·lular. Els *lipid rafts* constitueixen unes estructures lipídiques diferenciades dins de l'estructura general. Es troben formades per un ensamblatge dinàmic de colesterol i esfingolípids en la cara exoplàsmica de la membrana plasmàtica. El full intern en canvi és ric en fosfolípids, amb àcids grassos saturats (p.ex.: fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina) i colesterol (Simons & Toomre, 2000). Els esfingolípids s'associen lateralment uns amb altres, probablement a través d'interaccions dèbils per mitjà dels caps de carbohidrats. Els espais lliures són omplerts per les molècules de colesterol (Simons & Ikonen, 1997).

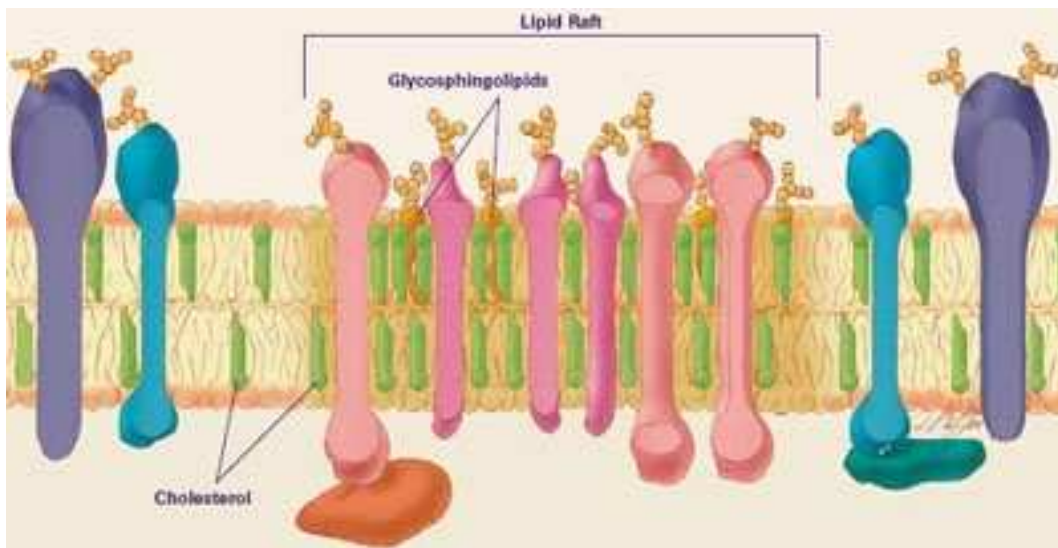


Fig 1. Estructura i composició dels *lipid rafts*. Es mostra l'enriquitament en esfingolípids i colesterol i la presència de diferents tipus proteics integrals de membrana o amb associacions a la cara interna (NIGMS)

Una de les raons per les que ha sigut tan difícil resoldre aquestes estructures és per la seva mida mínima que impossibilita la seva visualització en microscopis estàndard. En fibroblasts, mitjançant el *cross-linking* dels seus components amb anticossos, s'ha

arribat a concloure que un *raft* pot assolir mides al voltant de 50 nm (unes 3500 molècules d'esfingolípids), amb la variabilitat associada a les interaccions dins o entre estructures lipídiques. El nombre de proteïnes pot oscil·lar entre 10-30 sempre tenint en compte els diferents graus d'empaquetament observats. La distribució i freqüència d'aquestes proteïnes no és aleatòria, sinó que pateixen una agrupació clau en l'exercici posterior de les seves funcions (Pralle et al, 2000).

Bioquímicament els *lipid rafts* foren definits com aquelles regions insolubles en el detergent Tritó X-100 a 4°C, rebent el nom de DRMs (*detergent resistant membranes*); també anomenats DIGs per ser complexos insolubles en detergent i enriquits en glicolípid. Degut al seu elevat contingut lipídic aquestes estructures suren a la fracció de baixa densitat quan s'aplica una centrifugació en gradient (Brown & Rose, 1992).

Encara que la major part de molècules de superfície es troben en les regions més líquides i desordenades, l'estructura i composició d'aquests microdominis permet la unió de diferents proteïnes: proteïnes associades a glicofosfatidilinositol (GPI-proteïnes) (Brown & Rose) a la capa externa; proteïnes transmembrana; i proteïnes associades a la capa interna via una doble acilació (palmitoilació i mirostoilació) com és el cas de la família de les Src-cinases o les subunitats α de les proteïnes G heterotrimèriques (Resh, 1999). Aquestes proteïnes són incorporades als dominis DIG després de la seva síntesi i transport a través del reticle endoplasmàtic (ER) fins a l'aparell de Golgi (AG) (Janes et al) on romanen insolubles. Aquest retard en la unió es deu a l'absència dels complexos esfingolípids-colesterol en el reticle i l'ensamblatge dels *rafts* lipídics a les proteïnes es produiria en l'AG on té lloc la síntesi de la fracció esfingolípídica (Simons & Ikonen, 1997). El trànsit de membranes i molècules associades que se'n deriva d'aquest orgànu permetria la distribució diferencial (*sorting*) de lípids i proteïnes a les diferents regions de la membrana plasmàtica (Simons & Ikonen, 1997).

1.1 Tipus de *lipid rafts*

***Lipid rafts* caveolars** S'anomenen d'aquesta manera a les fraccions DRMs que contenen com a principal component estructural les proteïnes Caveolines. Aquesta proteïna permet la formació d'unes estructures invaginades, sense recobriment i en forma de flascó d'uns 50 a 90 nm de grandària, anomenades **caveoles**. Es coneix que aquestes formacions estan implicades en processos de transcitosi, endocitosi, transport de colesterol i transducció de senyals. També actuen com a centres de senyalització per

proteïnes associades a GPI què han sofert un procés d'activació. La seva presència en membranes es dependent del tipus cel·lular concret de cada teixit. Per exemple, trobem que les caveoles són molt abundants en cèl·lules glials però es troben absents de neurones i limfòcits (Stuermer et al, 2001).

Les Caveolines són proteïnes petites (approx. 22 KDa) però tenen la capacitat de formar oligòmers d'elevada massa molecular. Aquests oligòmers són estructures filamentoses què s'auto-associen per establir la membrana de les caveoles definint així la seva forma i mida (Fernandez et al, 2002). S'han descrit fins al moment 3 proteïnes Caveolines. Caveolin-1 (Cav-1) fou identificada com a substrat per a v-Src-cinasa en fibroblasts transformats pel virus del sarcoma de Rous (Rothberg et al, 1992). Caveolin-1 i Caveolin-2 es coexpressen habitualment i són abundants en cèl·lules diferenciades com pneumòcits, fibroblasts, adipòcits o cèl·lules de múscul llis. Caveolin-3 comparteix una homologia de seqüència amb Cav-1 superior a la què presenta Cav-2. En canvi, l'expressió de Cav-3 es troba restringida a múscul (Tang et al, 1996). Totes tres isoformes estan constituïdes per un domini central hidrofòbic inserit a la membrana i ambdós dominis N i C-terminal citosòlics. Tres llocs de palmitoilació en la regió C-terminal contribueixen al seu ancoratge a la membrana (Salanueva et al, 2007).

Cav-1 se sintetitza com una proteïna integral de membrana i comença a oligomeritzar al reticle endoplasmàtic (ER). Es transporta a través del complex de Golgi on s'associa a colesterol i altres components de DRM's (Parton et al, 2006). En aquest punt s'organitza en oligòmers què formaran el *pool* característic de Caveolin. A la sortida del Golgi el complex continua amb el procés d'oligomerització i associació a glicoesfingolípid i colesterol formant un "transportador exocític caveolar" què migra a la membrana plasmàtica en un procés què requereix de la proteïna SNARE Syntaxin-6. Tot i la localització predominant en caveoles aquestes proteïnes també es poden trobar en adhesions focals o secretades com a proteïnes solubles (Parton & Simons, 2007).

Les caveoles mostren una mobilitat i dinàmica reduïdes en condicions basals, però la interacció amb lligands específics com el virus SV40 o la toxina colèrica (CTx) provoquen la seva ràpida internalització amb la col·laboració d'un embolcall de Dinamin-2, Src cinases, proteïna cinasa C i el reclutament de filaments d'actina (Pelkmans et al, 2001; Pelkmans et al, 2002; Tagawa et al, 2005). Després de la internalització, les caveoles es fusionen al citosol amb estructures preexistents:

caveosomes (de forma RAB-5 independent) o endosomes primerencs (de forma RAB-5 dependent) (Pelkmans et al, 2004).

L'abundància de proteïnes senyalitzadores en les caveoles permeten presentar la hipòtesi de la seva funcionalitat com plataformes per al processat de senyals extracel·lulars. Altres estudis mostren Caveolina com una proteïna adaptadora capaç de concentrar proteïnes en les caveoles i d'aquesta manera guiar les seves interaccions i activitats (Salanueva et al, 2007). Caveolin inhibeix l'acció de diverses proteïnes com per exemple, Src cinases, EGFR, òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) o H-Ras (Okamoto et al, 1998). En canvi s'ha observat activació per al receptor d'insulina (Yamamoto et al, 1998). Moltes de les molècules regulades per Caveolina són importants en la progressió del cicle cel·lular i la seva desregulació està molt relacionada també amb aquelles vies implicades tradicionalment en càncer (Salanueva et al, 2007).

Lipid rafts no caveolars La presència de *lipid rafts* caveolars es troba restringida a un determinat nombre de tipus cel·lulars. En canvi, l'existència de fraccions membranoses amb característiques pròpies de DRMs mostra un espectre molt més ampli. Mitjançant tècniques de microscòpia electrònica (Baumann et al, 2000) i *confocal laser scanning microscopy* (LSM) s'ha pogut observar també la formació d'aquestes regions a la membrana plasmàtica de línies cel·lulars que no expressen Caveolins i per tant, no presenten formació de caveoles (Stuermer et al, 2001). Com a marcadors d'aquestes regions s'utilitzen unes proteïnes anomenades Flotillin-1 i Flotillin-2 (Bickel et al, 1997) o Reggie-2 i Reggie-1 respectivament (Schulte et al, 1997). Amb anticossos específics contra aquestes proteïnes es demostrà la seva localització a la cara interna de la membrana plasmàtica en cèl·lules gials i neurones. Presenten un patró puntejat i defineixen aquests microdominis on també s'ensamblen proteïnes associades a GPI després de la seva activació mitjançant *cross-linking* amb anticossos (Lang et al, 1998). En astròcits, cèl·lules amb formacions caveolars conegudes, Flotillin-1 i -2 es localitzen separadament de Caveolin-1 formant els seus propis microdominis i faciliten l'ancoratge de proteïnes específiques com la proteïna tirosin cinasa Fyn o les proteïnes de superfície Thy-1 i F3. Ambdues proteïnes s'han detectat també en endolisosomes i altres cossos vesiculars en cèl·lules neuronals o limfocitàries, demostrant la seva participació de processos endocítics i de transducció de senyals en una línia similar però

ahora diferenciada dels processos en què es troben implicats els *lipid rafts* caveolars (Stuermer et al, 2001).

1.2 Funcions dels *lipid rafts*

Un avantatge de l'organització lateral de les membranes cel·lulars és el confinament de proteïnes involucrades en diferents processos en uns dominis molt concrets de la cèl·lula. D'aquesta manera, aquests microdominis poden actuar com a plataformes adaptadores per executar funcions com el trànsit i endocitosi de membranes, transducció de senyals i polarització cel·lular (Rajendran & Simons, 2005).

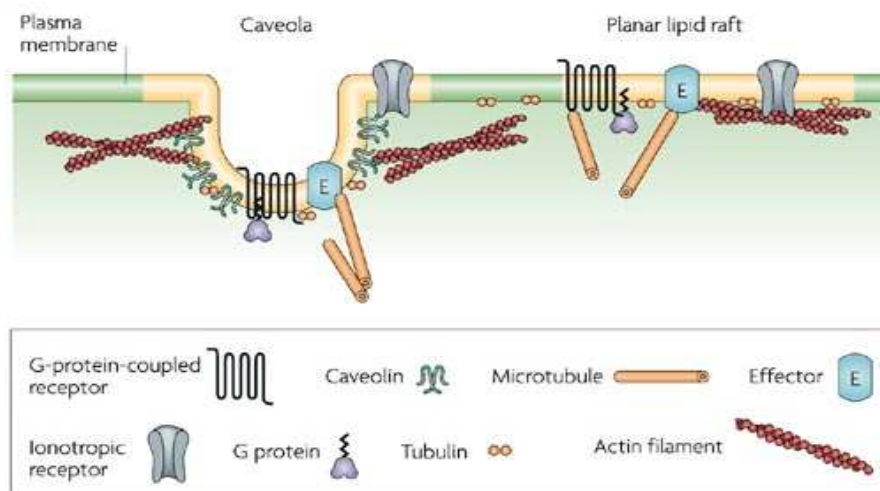


Fig 2. Diferències estructurals i de composició entre els diferents tipus de *lipid rafts* (Allen et al 2007)

Transducció de senyals. Els DRMs poden actuar com sistemes per receptors individuals activats per la unió a lligand extracel·lular. Aquest complex resta protegit de l'acció d'enzims no pertanyents al complex. Per tant, la senyalització en el microambient es troba subjecta a l'acció de les cinases, fosfatases, interaccions proteïques, etc. de totes aquelles proteïnes reclutades específicament per formar part dels DRMs (Simons & Toomre, 2000). La primera evidència fou la senyalització de la immunoglobulina E durant la resposta del sistema immune al·lèrgic. La unió de la IgE al seu receptor FcεRI resta associada als glicerolípid i esfingolípid de la fase externa. Al seu torn, a la capa interna es troben les tirosin-cinases acilades de la família Src (Fyn, Lyn). Davant la presència d'antigen, els complexos IgE- FcεRI s'agreguen i la presència

lipídica permet el reclutament de la cinasa Lyn i l'inici del procés de transducció de senyal que ha de dur a una resposta a l'alergen en mastòcits i basòfils (Sheets et al, 1999).

La transducció de senyals en els mecanismes de resposta immune afavorida per aquests microdominis lipídics és freqüent. El receptor de cèl·lules T (TCR) reconeix un antigen presentat pel complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe I o II de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC). Aquesta activació permet l'acumulació en *lipid rafts* de TCRs amb altres molècules coreceptores com LFA-1 i ICAM-1 formant el *clúster* d'activació supramolecular (SMAC) o sinapsi immunològica. Les Src tirosin cinases LCK, Fyn i PKC θ també es troben localitzades en aquest domini podent iniciar així els diferents processos de fosforilació i transducció de senyals. L'exclusió d'aquests dominis de fosfatases com CD45 permet una activació mantinguda del senyal i l'actuació d'altres molècules implicades en processos diferents (p.ex.: fosfolipasa C, Ras/ERK, etc.) (Janes et al, 2000).

Troben altres exemples d'activació de la transducció de senyals fora del sistema immunològic. La translocació del receptor tirosin cinasa RET a *lipid rafts* és conseqüència de la unió del coreceptor GFR α 1 al factor GDNF (el coreceptor GFR α 1 es troba en aquests dominis mitjançant un ancoratge GPI). Aquesta translocació permet la seva activació i l'inici d'un *pathway* d'activitat cinasa (Ras/Akt entre d'altres) (Tansey et al, 2000). Els receptors tirosin cinasa presenten en el seu conjunt una àmplia regulació per la seva localització en aquestes regions de la membrana. La unió d'insulina al seu receptor causa la fosforilació d'una de les proteïnes estructurals més importants de *lipid rafts* com és Caveolin-1, fet que habilita posteriors rutes de senyalització. Aquest efecte és específic del receptor d'insulina i no es mimetitza per l'acció d'altres similars com EGFR o PDGFR (Mastick et al, 1995).

No obstant els receptors tirosin cinasa es troben àmpliament regulats, l'acció senyalitzadora dels rafts lipídics és més àmplia. La GTPasa Ras és una altra mostra de regulació. Existeixen tres gens Ras (H-, N- i K-Ras) amb diferents isoformes generades per *splicing* diferencial. Els tres gens presenten diferències en el seu patró d'expressió en funció del teixit i de l'etapa del desenvolupament estudiada. D'altra banda, K-Ras i H-Ras difereixen en característiques com poden ser les modificacions post-traduccionals. H-Ras és susceptible de ser palmitoilada i conseqüentment, d'unir-se als

lipid rafts pel full intern de la membrana plasmàtica. La depleció del colesterol o la sobreexpressió d'un dominant negatiu per Caveolin (d'ambdues maneres obtenint-se una disrupció en l'estructura dels *rafts*) anul·len la transducció de senyals mediada per Raf (serin treonin cinasa) i iniciada per H-Ras però sense veure's afectada la via iniciada per K-Ras (Roy et al, 1999).

Sonic hedgehog (Shh) és una altra de les proteïnes senyalitzadores regulades per *lipid rafts*. Presenta modificacions com l'addició de molècules de colesterol o palmitoilacions que assegurin la seva unió als *rafts*. En aquest context Shh s'uneix a la proteïna Patched permetent l'alliberament d'una segona proteïna Smoothed que serà l'activadora de la cascada senyalitzadora (Incardona & Eaton, 2000). La presència del colesterol en Shh és necessària per a la seva localització en membrana i confereix a la proteïna una capacitat d'acció restringida (la seva deslocalització suposaria una pèrdua de la regulació i l'actuació en un espectre més ampli del desitjable) (Burke et al, 1999); però també és bàsica perquè la proteïna realitzi la seva funció (substitucions del colesterol per un altre tipus d'ancoratge tipus GPI assegurin la presència de Shh en *lipid rafts* però s'anul·la la realització de les funcions conegudes en desenvolupament).

Trànsit de vesícules. La distribució i transport intracel·lular han estat estudiats en aquelles línies cel·lulars amb una polarització evident com poden ser les cèl·lules epitelials. En la línia MDCK s'observà una ruta de transport de proteïnes GPI i altres proteïnes característiques de la membrana apical mitjançant l'ús de N-glicans o O-glicans com a senyals de distribució (Scheiffele et al, 1995). Aquestes proteïnes glicosilades s'uneixen a lectines associades a *lipid rafts* o també poden contenir dominis d'unió transmembrana a DIGs i viatjar plegades a les regions de la membrana apical de la cèl·lula. Es creu que els dominis PDZ també estarien implicats en les associacions transmembrana i el *sorting* apical (Schuck & Simons, 2004). En canvi, el direccionament de components de la membrana basolateral està basat en altres senyals com poden ser motius dileucina o motius tirosina que s'uneixen directament a receptors components de vesícules recobertes de clatrina. Com que les proteïnes dirigides a aquesta regió també es troben glicosilades es creu que la unió lligand-receptor té una afinitat més elevada que la que succeeix entre els N-glicans i els seus putatius punts d'ancoratge localitzats en *lipid rafts* (Scheiffele et al, 1995; Schuck & Simons, 2004).

Endocitosi. El procés d'endocitosi comprèn múltiples mecanismes que permeten a la cèl·lula la internalització tant de macromolècules com de partícules mitjançant el seu transport en vesícules derivades de la membrana plasmàtica. Aquests mecanismes d'entrada a la cèl·lula actuen de forma coordinada i juguen un paper clau en multitud de processos cel·lulars (Nichols, 2003). De tots ells el més conegut és la internalització via vesícules recobertes de clatrina (*clathrin mediated endocytosis, CME*). Es tracta d'un procés comú a totes les cèl·lules de mamífer que permet l'adquisició de nutrients i molècules essencials com per exemple, la LDL (*low density lipoprotein*) o la transferrina unida al seu receptor. La CME involucra la concentració de receptors transmembrana units als seus lligands en unes estructures de la membrana plasmàtica (*coated pits*) aconseguides per l'acció de diferents proteïnes citosòliques, la més destacada de les quals és la clatrina. Aquestes estructures s'invaginen formant unes vesícules endocítiques recobertes per un embolcall poligonal de clatrina (Conner & Schmid, 2003). En el complex participen altres components com són les proteïnes adaptadores de l'ensamblatge (APs) (Kirchhausen, 1999) o la GTPasa Dinamin (Hinshaw, 2000).

L'abolició o la inutilització dels diferents components implicats en la CME provoquen a la cèl·lula l'absència de formació de *coated pits* però, malgrat tot, la internalització de molècules es continua produint. Aquest fet porta a parlar de l'**endocitosi independent de clatrina**. Entre aquestes molècules internalitzades per aquest procés mai trobem aquelles molècules paradigma de CME com la LDL o el receptor de transferrina. En canvi un elevat rang dels substrats endocitats es troben localitzats en *lipid rafts*, com demostra l'anul·lació de la seva endocitosi amb fàrmacs destructors del colesterol. Entre els diferents exemples trobem subunitats de toxines que s'uneixen a proteoglicans, virus (SV40) o interleucines (IL-2) (Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001).

En les caveoles s'ha demostrat la presència de Dinamin als colls de l'estructura i com l'activitat GTPasa és bàsica per a la seva formació (Oh et al, 1998). La inhibició d'aquesta activitat mitjançant l'ús d'anticossos antidinamina o un dominant negatiu que expressa una Dinamin mutant K44A elimina la internalització mediada per caveoles de diverses molècules però no en la seva totalitat (Pelkmans et al, 2001). Els experiments amb siRNA per Caveolin-1, component principal de les caveoles, suggereixen que aquesta proteïna no és necessària per a la internalització d'un ampli nombre de substrats (Lamaze et al, 2001). Com a conseqüència d'aquests experiments parlem d'endocitosi

dependent o independent de clatrina i en aquest segon grup, d'endocitosi mediada o independent de caveoles/caveosomes. Els caveosomes són estructures separades dels endosomes primerencs o finals (*early-recycling endosomes*) que es nodreixen de les vesícules recobertes de clatrina. Els caveosomes faciliten el transport i distribució de molècules de membrana com és el cas del virus SV40 a RE o el transport d'esfingolípid i proteïnes associades a GPI a l'AG (Nichols, 2003).

La internalització per caveoles està facilitada per la disrupció del citoesquelet d'actina, anul·lada pels inhibidors de cinases estaurosporina i genisteïna i augmentada pels inhibidors de fosfatases àcid ocaidaic i vanadat (Nabi & Le, 2003). El virus SV40 s'uneix al seu receptor a la superfície de la cèl·lula i desencadena una sèrie de reaccions basades en l'activitat tirosin cinasa que permet el reclutament de Dinamin II i la seva entrada a la cèl·lula conjuntament amb Caveolin (Pelkmans et al, 2002). La unió de l'albumina al seu receptor Gp60 només es pot dur a terme mitjançant una interacció prèvia entre Caveolin i Gp60 i l'entrada d'albumina no és possible en cèl·lules deficientes per Caveolin (Minshall et al, 2000).

S'ha demostrat que, tot i que Caveolin permet la formació i/o estabilització de les estructures invaginades, la capacitat per formar-les és intrínseca als *lipid rafts*. D'aquesta manera s'han descrit també rutes d'internalització alternatives a la presència de Caveolin. Existeix una sèrie de proteïnes GPI que són internalitzades als *recycling endosomes* ignorant la via dels *early endosomes* per mitjà d'una nova organel·la anomenada *GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment* (GEEC). Aquesta via és dependent de la Rho GTPasa Cdc42 (Sabharanjak et al, 2002). La interleucina 2 (IL-2) és un factor de creixement essencial per a limfòcits que s'internalitza per un procés dependent de Dinamin però independent de caveoles (Lamaze et al, 2001).

El conjunt de resultats demostra que el procés d'endocitosi a través de DIGs és d'una elevada complexitat i intervenen gran nombre de factors (expressió de Caveolin, activitats fosforilases i GTPases, tipus cel·lular, etc.) però presenta també certs graus de plasticitat que permeten la realització del procés d'endocitosi d'un substrat per vies alternatives quan la principal ha estat neutralitzada.

2. FLOTILLIN

2.1 Introducció. Aspectes evolutius.

La família de proteïnes Flotillin/Reggie fou descoberta de forma independent i simultània l'any 1997. D'una banda, per anàlisi de microseqüències de pèptids continguts en fraccions de dominis de membrana enriquits en Caveolin-1 i purificats de teixit pulmonar de ratolí. En aquests experiments es va poder observar com tant Flotillin-1 com Flotillin-2 copurifiquen amb Caveolin-1 en adipòcits 3T3-L1 tractats amb protocols de purificació basats en detergents (Bickel et al, 1997).

De l'altra, mitjançant un *screening* per proteïnes regulades positivament en cèl·lules ganglionars retinals durant el procés de regeneració axonal posterior a una lesió provocada en el nervi òptic en *Carassius auratus* (Schulte et al, 1997).

Flotillin-1 i -2 són proteïnes altament conservades, amb aproximadament un 64% d'homologia entre *Drosophila melanogaster* i *Homo sapiens*. També trobem expressió de proteïnes *Flotillin-like* en bacteris, plantes i fongs (Langhorst et al, 2005). L'extensa distribució evolutiva de Reggie/Flotillin i diferents *Reggie-like proteins* plantegen la necessitat d'una funció bàsica ancestral. Les anàlisis filogenètiques de les bases de dades de metazous classifiquen Flotillin-1 i Flotillin-2 com a *clústers* monofilètics. L'observació estructural mostra una distribució estrictament conservada dels diferents dominis proteics en les proteïnes de la família Flotillin en metazous. L'estudi de les taxes de substitució molecular també confirmen Flotillin com una família gènica extremadament conservada mantinguda per selecció negativa (Rivera-Milla et al, 2006).

2.2 Família SPFH

La subfamília Flotillin/Reggie ha estat englobada per similituds estructurals dins de la família coneguda com SPFH. El nom prové dels seus components principals: 1) Stomatin, una de les principals proteïnes integrals de membrana en eritròcits humans; 2) Prohibitin, membre d'una família de proteïnes mitocondrials implicada en regulació de la senescència i supressió de tumors (Steglich et al, 1999); 3) Flotillin i 4) HflK/C, una proteïna estructural de bacteris. A aquest domini se li atribueixen funcions en l'afavoriment de la formació de complexos de proteases associades a membrana, encara que els residus concrets mediadors d'aquestes interaccions encara no han estat definits (Tavernarakis et al, 1999). En Flotillin-1 i -2 el domini SPFH consisteix en una

estructura compacta, de forma elipsoide-globular què conté 5 hèlix alfa i 6 fulls beta (Langhorst et al, 2005).

És important l'existència d'un domini EA (rep el nom per estar constituït de repeticions d'àcid glutàmic i alanina). Aquest domini s'ha demostrat tenir un paper important en la oligomerització de la proteïna Stomatin (Snyers et al, 1998).

2.3 Flotillin-2/Reggie-1

El gen què codifica per a la proteïna Flotillin-2 està localitzat en la zona pericentromèrica del cromosoma 17 (17q11-12). És un gen de còpia única consistent en 11 exons què donen lloc a la proteïna de 47 KDa. En humans s'han proposat diferents formes variants de *splicing* basades en la cerca en bases de dades de ESTs (*expressed sequence tags*) però no s'ha trobat expressió d'aquestes formes variants. En *Drosophila* en canvi, si s'han descrit dues variants què difereixen en 39 bp corresponents a un exó originat per un *splicing* alternatiu molt curt. Aquestes dues variants es troben expressades de forma diferencial durant el desenvolupament, amb la forma llarga present preferentment en els estadis embrionari i larvari, mentre que la forma curta s'expressa en la mosca adulta (Langhorst et al, 2005).

Flotillin-2 presenta al seu extrem N-terminal un residu objecte de miristoïlació (Gly2) a més de diversos llocs de palmitoïlació (Cys4 principalment i de forma secundària, Cys19 i Cys20). Aquests processos d'acilació són els responsables de l'ancoratge al full citoplasmàtic de la membrana, doncs Flotillin-2 no presenta cap domini transmembrana i tant l'extrem N-terminal com el C-terminal es troben orientats cap al citosol (Neumann-Giesen et al, 2004). El procés de miristoïlació és un procés cotranslacional i irreversible, què acostuma a tenir lloc com és el cas, en un residu de glicina immediatament després del codó iniciador de la traducció. Aquest fet explica la localització predominant en membrana plasmàtica de la proteïna (Neumann-Giesen et al, 2004). Flotillin-2 presenta també dos dominis hidrofòbics què corresponen als fragments d'aminoàcids 14-35 i 134-150. Aquests dominis no tenen suficient força hidrofòbica per constituir un domini integral de membrana però contribueixen a aquest ancoratge estable de la proteïna a la membrana plasmàtica. La presència de residus triptòfan (W) apolars són els principals responsables d'aquesta capacitat (Rivera-Milla et al, 2006).

Flotillin-2 s'expressa de forma constitutiva en totes les línies cel·lulars (Langhorst et al, 2005). Els seus nivells es mantenen relativament constants tot i que presenten regulació en processos de diferenciació. Es regula positivament durant la diferenciació *in vitro* de mioblasts esquelètics C2C12 (Volonte et al, 1999) entre d'altres línies cel·lulars.

A Flotillin-2 se li atribueixen les funcions clàssiques de les proteïnes associades a *lipid rafts*. L'ampli espectre de proteïnes què hi interaccionen li confereixen activitat en trànsit de vesícules, reordenació del citoesquelet i transducció de senyals. La coimmunoprecipitació amb el receptor de trombina PAR-1 en línies cel·lulars de melanoma suggereix la seva intervenció en la senyalització per receptors acoblats a proteïnes G (Hazarika et al, 2004).

En relació a la reordenació del citoesquelet s'ha demostrat com la sobreexpressió de Flotillin-2 indueix la formació de filopodis i estructures semblants en diversos tipus cel·lulars (Neumann-Giesen et al, 2004) i també la interacció de proteïnes adaptadores de citoesquelet com les de la família Vinexin -mitjançant l'acció d'un domini SoHo (*Sorbin homology*) (Kimura et al, 2001)-. La capacitat d'estructuració dels filaments citoesquelètics afavoreix el reclutament de diferents complexos proteics què impliquen a la família Flotillin en un ampli ventall de processos cel·lulars. També juga un paper important en l'activació de les cèl·lules T permetent la senyalització perllongada un cop s'ha produït l'activació del *T cell receptor (TCR)*. Aquesta funció la pot dur a terme mitjançant les associacions amb les Src cinases Lck i Fyn (Stuermer et al, 2001; Stuermer et al, 2004) i la proteïna adaptadora LAT (Slaughter et al, 2003). En aquestes cèl·lules Flotillin-2 presenta una polarització i immobilització en uns *caps* preformats on es duen a terme les diferents interaccions, posant de manifest la rellevància de les estructures de membrana (Stuermer et al, 2004). Recentment s'ha demostrat que Flotillin-2 és diana transcripcional dels factors de la família p53 (Sasaki et al, 2008) i diferents connexions entre l'alteració de la seva expressió i la progressió tumoral: alts nivells de Flotillin-2 correlacionen amb la progressió del melanoma (Doherty et al, 2006), mentre que els receptors de factors de creixement HER (HER-1, -2 i -3), implicats en càncer de mama, colocalitzen amb Flotillin-2 en *lipid rafts* (Marquez et al, 2006).

2.4 Flotillin-1/Reggie-2

2.4.1 Descripció del gen i la proteïna.

Flotillin-1 està codificada per un gen de còpia única localitzat en el cromosoma 6 (6p21.3). Es troba en una regió destinada al complex major d'histocompatibilitat de classe I (MHC I). Entre el segon i el quart exó es troba codificat el gen *Immediate Early Response-3* en la mateixa cadena i el gen de la tubulina β -1 en la cadena complementària. El gen de Flotillin-1 té 15 kb de llarg sent codificat per 13 exons. Hi ha una regió d'illa CpG (75% GC) que s'estén al llarg de tota la regió no codificant de l'exó 1. La recerca bioinformàtica mostra un promotor excel·lent amb l'inici de transcripció 139 bp *upstream* de l'extrem 5' del cDNA clonat. No obstant, aquest promotor manca d'una seqüència consens TATA *box* o CCAAT. Un segon promotor potencial amb una caixa TATA predita es troba localitzat *downstream*, dins de l'intró 1, encara que només un 4% dels ESTs semblen utilitzar aquest promotor (Edgar & Polak, 2001). El mRNA humà fou identificat per primera vegada en un experiment de *differential display* orientat a l'anàlisi de l'expressió gènica implicada en l'enfisema pulmonar. Dels clons obtinguts, dos tenien seqüències homòlogues al 3'UTR del cDNA de Flotillin-1 murina. La seqüència completa de 1839bp del cDNA de Flotillin-1 humana fou clonada per RACE PCR a partir de cDNA de pulmó. La pauta oberta de lectura codifica per una proteïna de 427 residus aminoacídics. Hi ha dos senyals alternatius de poliadenilació; el primer amb la seqüència ATTA AAA localitzada en 1716-1721 amb el lloc de poliadenilació en 1734, i el segon amb la seqüència AATA AAA en 1805-1810. La recerca en bases de dades de seqüències EST humanes mostra que el primer senyal de poliadenilació és el més prevalent, adenilant el 79% dels trànscrits. El primer codó iniciador de la transcripció, situat entre els nucleòtids 165-168, és una seqüència amb un context relativament dèbil comparativament amb les seqüències consens d'iniciació. En canvi el segon codó, entre els nucleòtids 195-197, és una seqüència més apropiada, la qual cosa suggereix que tots dos codons poden ser utilitzats per la maquinària de transcripció (Edgar & Polak, 2001).

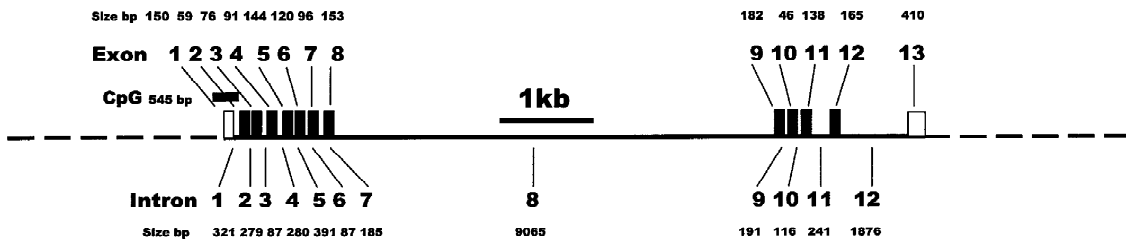


Fig 3. Estructura genòmica de Flotillin-1 humana. Representació esquemàtica de l'estructura exó-intró. Els exons es mostren com caixes negres (no a escala, la longitud es marca a sota) i les regions 5' i 3' UTR com caixes blanques. Es mostren també les illes CpG (Edgar AJ, Polak JM, 2001).

La proteïna *full-length* té una predicció de massa molecular de 47355 Da i un punt isoelèctric (pI) 7.08; i 46257 Da i un pI de 7.69 per a la proteïna formada a partir del segon codó iniciador. La proteïna humana presenta un 98.1% d'identitat i un 99.2% de similitud amb la proteïna murina. Les característiques del promotor (riquesa de GCs i absència de caixa TATA) combinat amb el fet que la proteïna s'expressa de forma general en totes les línies cel·lulars estudiades confereixen a aquest gen propietats de *housekeeping*. De totes maneres, l'expressió és regulada d'una forma teixit-dependent, presentant una elevada expressió en cervell (recordem que Flotillin-1 és important en la regeneració neuronal) i baixa en fetge (Edgar & Polak, 2001).

Flotillin-1 presenta una orientació citoplasmàtica en la membrana amb els dos extrems N i C-terminal encarats cap a l'interior cel·lular. A diferència d'altres proteïnes de la família SPFH, Flotillin-1 manca d'un domini prou hidrofòbic per constituir un domini transmembrana, tot i que pot actuar com a senyal per a la inserció en el reticle endoplasmàtic com també succeeix amb Caveolin (Morrow et al, 2002).

És important també el rol de l'acilació en l'associació de Flotillin-1 a la membrana plasmàtica. Presenta una cisteïna ben conservada en posició 34 que si pateix mutacions, s'aboleix la capacitat d'incorporació de palmitat i d'unió de Flotillin-1 al *raft* lipídic. Existeixen dos potencials residus extra de palmitoilació en Cys5 i Cys17 (Morrow et al, 2002).

La proteïna presenta dos dominis principals. En N-terminal el domini conegut com SPFH comú a Flotillin-2, Stomatin, etc. que permet incorporar aquesta proteïna dins de la família del mateix nom. Aquest domini també es coneix com PHB (*Prohibitin homology domain*). L'estructura d'aquest domini que comprèn els residus 43-173 és compacta, en forma elipsoide-globular amb 4 o 5 hèlix α i 6 fulls β (Langhorst et al, 2005).

En C-terminal es troba un domini només comú a les dues proteïnes Flotillin. Es caracteritza per contenir diversos dominis EA. Aquestes repeticions d'àcid glutàmic i alanina són elements clau en l'oligomerització de proteïnes. L'estructura terciària d'aquest domini encara no ha estat resolta però per anàlisi de seqüències s'endevina la presència d'estructures *coiled coil*, les quals també són afavoridores de l'associació proteica. Aquesta oligomerització ha estat suggerida com un procés necessari per establir l'associació de proteïnes acilades a la membrana plasmàtica (Field et al, 1995). L'extracció de proteïnes de *lipid rafts* amb N-octylglucoside (detergent que permet obtenir la fracció proteica però no destrueix les associacions de proteïnes) permet observar la formació de complexos que corresponen a dímers, trímers i estructures superiors (Neumann-Giesen et al, 2004).

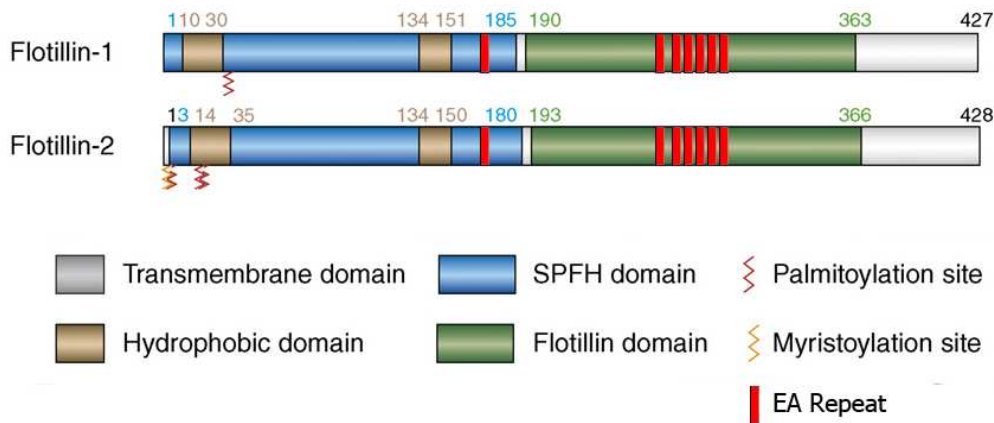


Fig 4. Dominis estructurals de les proteïnes Flotillin-1 i Flotillin-2. Es mostren els dominis SPFH i Flotillin així com els diferents residus que poden ser objecte de modificacions per acilació. En vermell es ressalten les repeticions EA, principals responsables dels fenòmens d'oligomerització. El domini transmembrana (marcat en gris) és una predicció feta en base a la composició aminoacídica (Browmann et al 2007).

2.4.2 Relacions entre Flotillin-1 i Flotillin-2

L'oligomerització de Flotillin és necessària per a l'organització dels microdominis lipídics en membrana plasmàtica. Aquestes interaccions es donen en forma d'homo- o heterodímers, demostrat pel fet que ambdues proteïnes coimmunoprecipiten *in vitro* i colocalitzen parcialment (Stuermer et al, 2001), assolint una estructura final tetramèrica. L'oligomerització és responsabilitat dels extrems C-terminal de les proteïnes però

sembla que el domini SPFH és el responsable de restringir aquesta associació a la formació dels tetràmers. D'aquesta manera, s'ha observat com formes mutants mancades del domini N-terminal produeixen multitud de formes multimèriques diferents mentre que la coexpressió dels fragments C-terminal i N-terminal restableixen la formació única de tetràmers (Solis et al, 2007).

L'ensamblatge d'aquestes dues proteïnes indueix la curvatura de la membrana plasmàtica, així com la formació d'invaginacions morfològicament similars a les caveoles i l'acumulació de vesícules intracel·lulars (Frick et al, 2007).

Aquesta associació entre les dues proteïnes Flotillin també té implicacions en la seva pròpia regulació dels nivells d'expressió. Mitjançant mutants de *Drosophila* ha quedat demostrat que l'estabilitat de Flotillin-1 requereix de Flotillin-2 i que quan l'expressió d'aquesta és abolida, els nivells de mRNA de Flotillin-1 resten inalterats però els de proteïna experimenten una abrupta disminució. No succeeix igual en l'experiment oposat, on s'aconsegueix expressió de Flotillin-2 independentment dels nivells de Flotillin-1 (Hoehne et al, 2005). Aquest mateix fenomen té lloc amb altres proteïnes relacionades amb els *lipid rafts*. Per exemple, el ratolí *K.O.* per Caveolin-1 experimenta una reducció dels nivells de Caveolin-2 (Drab et al, 2001) però no a l'inversa.

En cèl·lules humanes s'ha demostrat també que Flotillin-1 pateix degradació via sistema del proteasoma en absència de Flotillin-2 (bloquejant el sistema mitjançant inhibidors del proteasoma s'aconsegueix una recuperació de Flotillin-1 en absència del seu *partner* (Solis et al, 2007).

2.4.3 Síntesi i localització de Flotillin-1

Ha estat àmpliament demostrada la ruta biosintètica dels *lipid rafts* seguint la via tradicional ER-Golgi, orgànul on es duen a terme modificacions com poden ser les glicosilacions, acoblament de lípids, etc. És coherent doncs, el plantejament que tant Flotillin-1 com Flotillin-2 segueixen aquesta ruta vers la seva localització final en aquests compartiments lipídics. No obstant, al voltant d'aquest plantejament i de quina és la localització real de Flotillin hi ha una certa controvèrsia,

En diferents tipus cel·lulars (NRK, CHO i HeLa) s'ha demostrat com Flotillin-1 es localitza en l'aparell de Golgi (a més de la observació per immunofluorescència) : a) aïllant membranes de l'aparell de Golgi (GICs) s'ha observat un enriquiment en l'expressió de Flotillin-1 respecte la resta de compartiments cel·lulars; b) el tractament

amb agents que destrueixen el colesterol com la ciclodextrina no permeten solubilitzar Flotillin-1 en cèl·lules intactes quan es tracten amb Tritó X-100 mentre si que ho fan en GICs; c) la longitud del fragment “transmembrana” (18 aminoàcids) correlaciona més acuradament amb les proteïnes característiques de l’aparell de Golgi que amb les de membrana plasmàtica (Gkantiragas et al, 2001). No obstant, aquest argument perd transcendència un cop va quedar demostrada que l’associació de Flotillin-1 a membrana plasmàtica es troba produïda per les modificacions acilades.

D’altra banda, treballs realitzats sobre cèl·lules BHK i Vero demostren resultats oposats. El domini SPFH de Flotillin-1 fusionat amb la proteïna GFP permet direccionar aquesta cap a la membrana plasmàtica sense dirigir-se a l’aparell de Golgi en cap moment d’aquest trànsit. Fent servir agents bloquejants d’AG (Brefeldina A desestabilitza l’ensamblatge de les seves diferents unitats impossibilitant el transport) o un dominant negatiu de la GTPasa Sar1 que inhibeix la ruta de transport ER-AG s’observà com el trànsit i la localització de Flotillin-1 es veien inalterats, concloent d’aquesta manera que la seva ruta biosintètica i de direccionalització era independent de l’aparell de Golgi (Morrow et al, 2002).

El conjunt de dades sembla indicar que la localització subcel·lular de Flotillin-1 és dependent del tipus cel·lular. Per exemple, en cèl·lules Jurkat (limfoma), ambdues Flotillins colocalitzen amb Thy-1 i Fyn en orgànuls intracel·lulars que derivaran en endolisosomes (Stuermer et al, 2001). En macròfags Flotillin-1 s’ha trobat en fagosomes (Garin et al, 2001).

Un altre factor que influeix aquesta localització és el procés de diferenciació cel·lular. En cèl·lules PC12 Flotillin-1 s’observa en AG, però un cop s’indueix la seva diferenciació mitjançant NGF (*Nerve growth factor*) es trasllada a la superfície cel·lular (Liu et al, 2005). Un cop demostrada la presència d’estructures similars o relacionades amb *lipid rafts* també en les membranes dels orgànuls interns (Gkantiragas et al, 2001) es postula que la diferenciació cel·lular pot induir la incorporació de Flotillin-1, i altres proteïnes associades, a la membrana plasmàtica, les quals estaven prèviament segregades en la membrana dels compartiments intracel·lulars (Liu et al, 2005).

Fins i tot es contempla la possibilitat que el procés d’ancoratge a la membrana sigui diferent en funció del tipus cel·lular. En adipòcits, la palmitoilació de la cisteïna 34 no sembla jugar un paper important, doncs la seva mutació no afecta a la localització de la proteïna. En canvi, el segon domini hidrofòbic si que tindria rellevància en el procés

d'abandonament de les membranes internes i inclusió en la membrana plasmàtica (Liu et al, 2005).

Finalment, cal fer esment d'una característica fonamental que diferencia Flotillin-1 de Flotillin-2 com és la capacitat de la primera de translocar a nucli (Santamaria et al, 2005). Aquesta localització nuclear és dependent de cicle cel·lular, produint-se a l'inici de la fase S, de forma simultània amb la proteïna PTOV1, de funció desconeguda encara que hi ha evidències que la presenten com un membre de complexos reguladors de la transcripció (Mittler et al, 2003). La funció de Flotillin-1 a nucli no es troba esclarida però la seva sobreexpressió té un efecte mitogènic en la línia cel·lular PC-3, que deriva d'una metàstasi de tumor prostàtic en os (Santamaria et al, 2005).

En conclusió, el fenomen de palmitoilació permet a Flotillin-1 un ancoratge reversible a la membrana plasmàtica (a diferència del procés de miristoilació que és irreversible en Flotillin-2). Aquesta capacitat facilita el trànsit de Flotillin-1 entre membrana plasmàtica, orgànuls membranosos citoplasmàtics i nucli, augmentant el nombre de processos cel·lulars en els que pot intervenir.

2.4.4 Funcions de Flotillin-1

La funció molecular exacta de Flotillin-1 no ha estat determinada en l'actualitat. De forma paral·lela i en ocasions, conjunta amb Flotillin-2, se l'ha associat amb processos senyalitzadors a través de receptors de membrana, fenòmens d'endocitosi i fagocitosi així com la reordenació del citoesquelet i la regeneració del sistema nerviós. El conjunt d'accions concretes és extremadament ampli degut al sempre creixent nombre de molècules amb les que es troba interacció. Per aquest motiu, es proposa Flotillin-1 com una proteïna adaptadora (*scaffold*) per a proteïnes associades a uns microdominis molt concrets de la membrana cel·lular (Rajendran et al, 2003). Proposem alguns dels exemples més rellevants:

a) Flotillin-1 en la senyalització per insulina. En adipòcits, l'estimulació del transport de glucosa en resposta a insulina és una acció complexa, amb diferents etapes que inclouen el moviment vers la membrana plasmàtica i posterior fusió de vesícules que contenen el receptor GLUT4. L'activació de PI3K i els seus efectors Akt i/o PKC són necessaris en aquest procés. No obstant, l'activació d'aquesta ruta és insuficient per induir el transport de glucosa. La presència d'altres factors que poden activar PI3K/Akt no té efecte en la translocació de GLUT4. El segon senyal que coopera en la iniciació

d'aquesta via és la fosforilació de Cbl i la seva segregació als *lipid rafts*. Aquest procés requereix de la presència de la proteïna adaptadora CAP. En aquesta fosforilació intervé la Src cinasa Fyn, la qual interacciona amb Flotillin-1. De la mateixa manera, el reclutament a membrana plasmàtica de CAP-Cbl succeeix per la interacció entre CAP i Flotillin-1 (mitjançant un domini *sorbin homology* –SoHo- de CAP i el segon domini hidrofòbic de Flotillin-1), sent clau doncs, el seu rol en la incorporació de glucosa en adipòcits (Baumann et al, 2000).

b) Regulació de processos de transducció de senyals per unió a proteïnes associades a GPI. Existeix un elevat nombre de treballs que associen les proteïnes que s'uneixen a la membrana plasmàtica mitjançant un ancoratge per una molècula de glicofosfatidilinositol i les proteïnes característiques de *lipid rafts*. Flotillin-1 interacciona amb Thy-1 (també Flotillin-2) formant unes estructures característiques en la membrana plasmàtica. Aquesta associació provoca l'inici de la cascada de fosforilacions mediada per MAPK en una forma dependent de Ca^{2+} (Stuermer et al, 2004). El segon gran grup de proteïnes GPI com són les Src cinases (Lck, Fyn,) també es troben involucrades en aquest *pathway*.

Un tercer membre d'aquesta família és la cinasa Lyn. És una proteïna també localitzada en DRMs iniciadora de processos de senyalització posteriors a l'activació d'un receptor. En mastòcits, la unió del receptor IgE al seu lligand produeix la seva translocació als *rafts*, on el receptor es fosforila en residus tirosina per l'acció de Lyn. En cèl·lules deplecionades de Flotillin-1 es troba inhibit tant l'alliberament de les reserves de calci com l'activació de les proteïnes ERK. Aquest efecte és conseqüència de la interacció entre Flotillin-1 i Lyn necessària per a la seva activitat (Kato et al, 2006). Aquest fenomen també havia estat descrit en altres tipus cel·lulars com limfòcits T i cèl·lules neuronals (Stuermer et al, 2001) demostrant-se d'aquesta manera la generalitat del procés.

c) Regulació de processos de transducció de senyals per unió a receptors de proteïnes G heterotrimèriques. Les proteïnes reguladores heterotrimèriques unides a GTP (proteïnes G) són capaces de transduir un elevat nombre de senyals extracel·lulars com hormones, neurotransmissors, fotons, etc. a través dels seus receptors heptahèlix transmembrana (GPCRs) cap a molècules senyalitzadores intracel·lulars. Consten de 3 subunitats: monòmers α i dímers $\beta\gamma$. Les subunitats α consten d'uns 20 membres classificats en 4 subgrups ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ i $G\alpha_{12/13}$) en funció de la seqüència

d'aminoàcids i dels efectors *downstream*. La subfamília G α q activa principalment la fosfolipasa C β (PLC β), la qual hidrolitza molècules de fosfatidilinositol-4-5 bifosfat, alliberant-se dos segons missatgers, diacilglicerol (DAG) i inositoltrifosfat. No obstant, s'han trobat més candidats efectors i reguladors d'un sistema que a més, és teixit dependent.

Flotillin-1 i Flotillin-2 interaccionen amb G α q independentment de l'estat d'unió a nucleòtids de guanina d'aquest. L'abolició de l'expressió de Flotillins permet modificar diferents *pathways* de senyalització. Un exemple és atenuar l'activació mediada per aquest receptor de la ruta de p38 MAPK però sense afectar ERK 1/2. Aquesta cascada de senyalització també es veu inhabilitada quan es destrueixen els microdominis lipídics mitjançant agents disruptors del colesterol com les ciclodextrines. p38 MAPK es troba relacionada amb processos d'inflamació, apoptosi, regulació del cicle cel·lular, diferenciació, etc., fent palesa la rellevància de les proteïnes Flotillin com a elements reguladors de processos de senyalització (Sugawara et al, 2007).

d) Flotillin-1 defineix una nova via d'endocitosi independent de clatrina en cèl·lules de mamífer. Amb aquest treball, Glebov i col·laboradors amplien la visió que fins el moment s'havia tingut sobre el procés d'endocitosi. Fins aquest moment, es parla d'un mecanisme principal amb participació del recobriment de clatrina com a element regulador del citoesquelet i un d'alternatiu basat en *lipid rafts* i caveosomes. Flotillin-1 no colocalitza amb el receptor de transferrina (marcador d'endocitosi per clatrina) i tampoc amb Caveolin-1, posant de manifest un tercer mecanisme independent tant de clatrina com de la formació de cossos caveolars. Una altra tret és la independència d'aquesta tercera forma d'endocitosi de l'activitat GTPasa de la proteïna Dinamin. La presència dels diferents tipus de vesícules varia en funció del tipus cel·lular estudiat, indicant que poden ser sistemes complementaris, tot i que hi ha evidències que demostren que no són excloents. S'ha comprovat la internalització per aquest sistema de diferents substrats, com la toxina colèrica o diferents GPI-proteïnes (Glebov et al, 2006).

e) Flotillin-1 regula el processat de la proteïna APP. La malaltia d'Alzheimer és caracteritzada per la deposició de plaques amiloides extracel·lulars i malles neurofibril·lars intracel·lulars. El principal constituent de la placa amiloide és el pèptid A β , el qual deriva de la proteïna precursora amiloide mitjançant dos talls proteolítics. Aquesta acció és duta a terme per una β -secretasa (BACE) i una γ -secretasa

(presenilines), totes dues concentrades en *lipid rafts*. Flotillin-1 i APP interaccionen en assajos de *yeast two-hybrid* o *GST-pull down* (Chen et al, 2006). L'endocitosi d'APP és essencial per al seu processat. Les dues proteïnes de la família Flotillin promouen el reclutament del pèptid i estimulen la seva endocitosi per un procés dependent de clatrina en aquest cas (Schneider et al, 2008).

3. NOTCH1

3.1 Introducció

La formació d'un organisme des d'una cèl·lula única fins a una estructura tridimensional d'una forma i mida determinades és el resultat d'una acció gènica coordinada que regeix el destí de cèl·lules individuals durant el desenvolupament. L'assoliment d'aquest destí ve determinat per la intervenció coordinada de processos de proliferació, migració, creixement, diferenciació i apoptosi. Factors intrínsecs i autònoms de la cèl·lula, així com senyals extracel·lulars d'estret o ampli espectre guien les cèl·lules en les diferents vies de desenvolupament. Freqüentment, un organisme fa servir el mateix *pathway* senyalitzador en diferents contextos cel·lulars de cara a assolir un objectiu únic.

La via de senyalització mediada per Notch1 és un mecanisme conservat evolutivament, emprat per metazous per controlar la determinació cel·lular a través d'interaccions cel·lulars locals (Artavanis-Tsakonas et al, 1999). Aquesta via participa d'un petit conjunt d'elements senyalitzadors que han sigut considerats els *essencials* en l'assoliment dels objectius desenvolupamentals: *wingless (Wg/Wnt)*, *Hedgehog*, *Transforming Growth Factor- β (TGF- β)*, *Receptor Tyrosin Kinase/Posphatase (RTK/P)* i *Notch* (Mumm & Kopan, 2000).

En el desenvolupament d'organismes multicel·lulars complexos Notch participa guiant dos processos bàsics. D'una banda, l'*especificació lateral* és un fenomen que té lloc entre dues entitats cel·lulars equivalents permetent a una cèl·lula o grup de cèl·lules esdevenir una unitat diferenciada d'aquelles que l'envolten. De l'altra, la *senyalització inductiva* opera entre cèl·lules no equivalents. En aquest cas, la cèl·lula senyalitzadora i la receptora inicien el procés amb característiques diferents, incloent el seu repertori de receptors i lligands de superfície. L'expressió concreta d'aquests així com el *timing* d'interacció entre les dues cèl·lules en un instant concret del procés de desenvolupament, converteix a la cèl·lula receptora en un tipus diferent de l'original, acostant-se o allunyant-se morfològicament i/o funcional a la cèl·lula inductora (Artavanis-Tsakonas et al, 1995).

El terme Notch deu el seu nom a l'origen del descobriment del gen. En *Drosophila melanogaster* s'observà com unes femelles presentaven unes incisions (*notches* en anglès) en els marges de les ales, producte de l'haploinsuficiència per un gen no identificat fins aquell moment, el qual estava lligat al cromosoma X i s'heretava de

forma dominant (Mohr, 1919). El seu coneixement s'amplià amb experiments clàssics d'anàlisi de mutacions letals per pèrdua de funció en embrions (Poulson, 1937). Aquestes mutacions produïen un fenotip neurogènic, on cèl·lules destinades a l'epidermis canviaven el seu destí permetent el creixement desmesurat del teixit neural (Artavanis-Tsakonas et al, 1999). En humans, es descobrí que en la translocació cromosòmica t(7;9)(q34;q34.3) provinent d'un cas clínic de leucèmia limfocitària aguda de cèl·lules T (T-ALL), el gen afectat en el locus del cromosoma 9 era un homòleg al gen Notch de *Drosophila*. Els trànscrips d'aquest gen eren presents tant en teixits fetals com en adults de ratolí i humà. El punt de trencament de la translocació tenia lloc en una seqüència intrònica de 100 bp originant trànscrips truncats d'aquest gen (Ellisen et al, 1991).

3.2 Descripció de la família Notch.

Els gens Notch codifiquen per als membres d'una família altament conservada de receptors que regulen esdeveniments de senyalització de curt espectre (regulació auto o paracrina). El gen i la proteïna prototípics de Notch són els descrits per a *Drosophila melanogaster*. Lin-12 a *Caenorhabditis elegans* i Notch1-4 en mamífers representen variacions o combinacions dels diferents dominis funcionals que conformen Notch permetent el guany o la pèrdua d'algunes de les seves capacitats.

El gen Notch deriva en un receptor d'aproximadament 300 KDa amb una única regió transmembrana (receptor transmembrana de tipus I). El seu domini extracel·lular està format per una sèrie de repeticions en tàndem d'uns dominis anomenats *epidermal growth factor-like repeats* (EGF-like o ELRs) que varien en nombre de 10 fins a 36 en el Notch de *D.melanogaster* o Notch1 humà (Wharton et al, 1985). La comparació de seqüències aminoacídiques revela que aquests ELRs de forma individual tenen més similitud a d'altres posicionats de manera idèntica en espècies homòlogues que no a d'altres ELRs de la mateixa molècula demostrant la presència d'un ancestre comú predecessor del gen Notch de *Drosophila* i que els membres de Notch que contenen menor nombre de repeticions han patit processos de possibles modificacions d'aquests dominis per deleció i mutació.

Les repeticions 11 i 12 són necessàries i suficients per dirigir la interacció amb aquelles cèl·lules que expressen els lligands (Delta i Serrate en el cas de *Drosophila*). Aquestes dues repeticions tenen seqüències consens per la unió a calci, consistent amb la necessitat de calci de les interaccions lligand-receptor. La resta de repeticions ELR no

es troben tan ben conservades en les diferents espècies, fet què les associa amb un paper no tan determinant en la interacció, sinó amb efectes moduladors d'aquesta mateixa interacció (Fleming, 1998).

En C-terminal es troben tres repeticions ELR alterades què contenen residus cisteïna, anomenades repeticions LNG (Lin-12, Notch, Glp-1), implicades en el manteniment de l'estabilitat del domini extracel·lular, així com d'un domini intracel·lular quiescent mentre no es produeix l'activació (Heitzler & Simpson, 1993).

Entre les repeticions esmentades i el domini transmembrana trobem dues regions importants en el processament i la regulació de Notch. La primera, anomenada S2 és un domini extracel·lular susceptible de proteòlisi per la metal·loproteasa TACE/ADAM17 (Brou et al, 2000). La segona, és un *link* no covalent entre residus de cisteïna, sensible a agents reductors com el DTT, què funciona com a domini d'heterodimerització.

Les regions intracel·lulars de Notch també tenen una sèrie de regions altament conservades amb funcionalitat molt concreta. La primera és un residu de valina objecte de proteòlisi (S3) en el moment què es produeix la unió lligand-receptor. S'allibera així el fragment ICN (*intracellular Notch*) o NICD (*Notch intracellular domain*). ICN pot interaccionar amb un elevat nombre de molècules mitjançant dos dominis: RAM23 i les repeticions anquirina (ANKR). Entre aquestes molècules destaquen els factors de transcripció com la família CSL (CBF1 en vertebrats, Su(H) en *Drosophila* i Lag-1 en *C.elegans*), enzims ubiquitin-ligases, coactivadors transcripcionals, etc. A partir d'aquestes interaccions, Notch1 participa en tots els processos reguladors de proliferació, diferenciació, etc. coneguts fins al moment (Fleming, 1998).

En sentit C-terminal trobem les regions menys conservades i què presenten majors diferències entre els diferents receptors. Una seqüència forta de transactivació es troba present tant en la proteïna Notch de *Drosophila* com en Notch1 de mamífers (TAD, *transactivation domain*) mentre que Notch2 té un senyal molt més dèbil i tant Notch3 com Notch4 manquen d'aquesta capacitat transcripcional (Allman et al, 2002). A continuació una seqüència de poliglutamina anomenada OPA es troba en *Drosophila*, però apareix dèbilment conservada en Notch1 i no es troba en la resta de receptors de mamífer. La seva funció actualment roman desconeguda (Weinmaster et al, 1992). Finalment, es troba una seqüència PEST què possibilita l'acció de proteïnes ubiquitin-ligases, de manera que permet una ràpida degradació del receptor i el descens en l'activitat senyalitzadora de la via. Es destaquen també dos dominis NLS (*nuclear*

localization signal) què permeten l'entrada d'ICN a nucli on durà a terme les diferents funcions (Weinmaster et al, 1992).

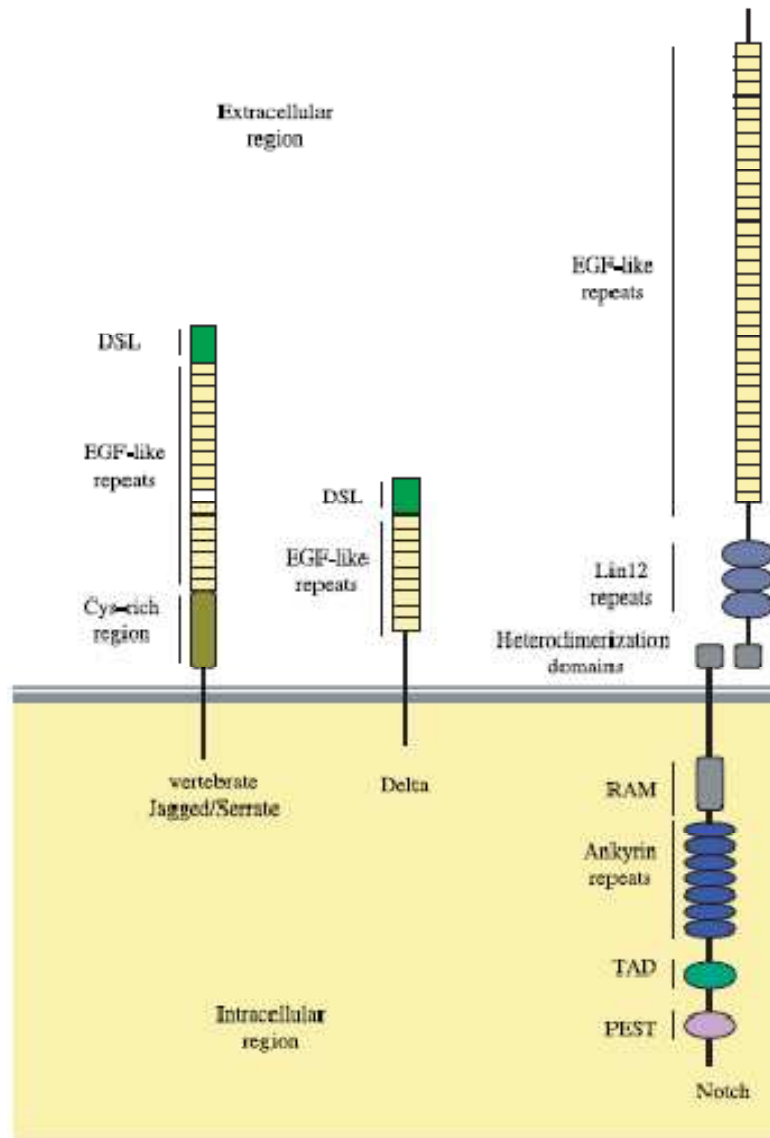


Fig 5. Estructura de la proteïna Notch i dels seus lligands Delta i Jagged/Serrate. Tots ells es caracteritzen per la presència de dominis ELR en la regió extracel·lular, responsables de la unió entre ells i amb elements moduladors. A la regió intracel·lular s'observen els dominis d'interacció amb proteïnes RAM i ANKR; el domini de transactivació (TAD) i la seqüència PEST reconeguda per les ubiquitinligases (Fiúza UM, Arias AM, 2007)

3.3 Ruta de senyalització regulada per Notch1

Associació del receptor Notch a membrana plasmàtica

La forma en que es troba Notch en membrana plasmàtica és una forma proteolitzada. Aquest procés s'inhibeix per acció de Brefeldina A o amb un descens de la temperatura a 19°C, dues evidències que demostren com el processat es duu a terme en la regió de *trans*-Golgi (Blaumueller et al, 1997). Sense aquesta proteòlisi, Notch no pot assolir la membrana plasmàtica. Es presenta en forma d'heterodímer per l'acció prèvia d'una *furin-like* proteasa en el lloc conegut com S1 que converteix la proteïna Notch *full-length* en aquest dímer format per Notch extracel·lular (N^{EC}) de 180 KDa i Notch transmembrana-intracel·lular (NTM) de 110-115 KDa. El domini d'heterodimerització de Notch extracel·lular constitueix una regió molt hidrofòbica capaç de formar un complex estable amb el domini d'heterodimerització de Notch transmembrana (ambdós en l'exterior cel·lular) (Sanchez-Irizarry et al, 2004). N^{EC} pot retenir NTM ancorat a la membrana plasmàtica per mitjà d'un procés dependent de Ca²⁺ (com es demostra per l'acció de quelants de calci, els quals permeten l'activació constitutiva de la ruta (Rand et al, 2000)).

Unió receptor-lligand

La interacció de Notch amb els seus lligands és imprescindible per provocar l'alliberament del seu domini intracel·lular. Aquesta unió pot ser inter- o intracel·lular en funció de les concentracions relatives de receptors i lligands a la cèl·lula. Els lligands de Notch són els components de la família DSL (Delta/Serrate a *Drosophila*, *Delta-like*1-3 i Jagged-1 i -2 en mamífers i Lag-2 en *C.elegans*). Jagged/Serrate es caracteritzen per un elevat nombre de repeticions *EGF-like* i una regió rica en cisteïnes propera al domini transmembrana, mentre que Delta conté un nombre menor d'aquestes repeticions i és mancat dels residus cisteïna. La regió d'unió a Notch és una segona regió rica en residus cisteïna anomenada DSL, la qual es troba en l'extrem N-terminal (Fiuza & Arias, 2007). Mutacions puntuals en els seus residus resulten en una considerable pèrdua de funció (Artavanis-Tsakonas et al, 1995).

Un cop donada aquesta associació lligand-receptor es procedeix a l'activació de Notch. Per que això succeeixi tenen lloc dos events proteolítics més. El primer succeeix en la regió extracel·lular, en el lloc anomenat S2 (p.ex. en Notch1 murí, aquest processat té lloc entre els aminoàcids Ala-1710 i Val-1711, 12-13 residus *upstream* de l'inici de la

regió transmembrana). Unes metal·loproteases de membrana (Kuzbanian o TACE – *TNF α converting enzyme*- en *Drosophila* i proteases de la família ADAM en mamífers) apareixen com les principals candidates responsables d'aquest procés (Brou et al, 2000). La forma de Notch resultant és coneguda com a Notch ΔE .

El següent tall proteolític es dona al fragment transmembrana en la regió coneguda com a S3 entre els aminoàcids Gly-1743 i Val-1744 alliberant-se d'aquesta manera la molècula coneguda com a Notch intracel·lular (ICN o NICD) (Schroeter et al, 1998). Fent servir agents bloquejants per metal·loproteases s'anul·la l'alliberament de Notch intracel·lular, evidenciant que aquesta activació ve donada per una sèrie seqüencial de, com a mínim, dos processos proteolítics, en els que la primera proteòlisi permet el rearranjament conformacional necessari per exposar el lloc d'unió del segon enzim proteolític (Mumm et al, 2000). Aquesta segona activitat és coneguda com a γ -secretasa i duta a terme per un complex de proteïnes entre les que destaquen les anomenades presenilines (Heitzler & Simpson) (també trobem altres components reguladors com Nicastrin o Aph). Aquesta família consta de PS1 i PS2, proteïnes d'un pes molecular al voltant de 20-30 KDa però que es presenten en forma d'oligòmers que oscil·len en el rang dels 100-150 KDa (Sisodia et al, 2001). Experiments realitzats amb cèl·lules deficientes en PS1 i PS2 demostren la dificultat o incapacitat d'aquestes per alliberar ICN i activar la transcripció dels seus gens diana (De Strooper et al, 1999). PS1 segueix la via secretora ER-Golgi on s'acumula i entra en contacte amb Notch1 *full-length*, podent actuar com un element regulador en la maduració d'aquest. És a la membrana plasmàtica on la interacció Notch-PS es fa més palesa, duent-se a terme el processat de la forma ΔE a ICN (Ray et al, 1999).

Translocació d'ICN a nucli. Efectors i reguladors.

En la senyalització per Notch1 no intervenen segons missatgers. Per tant, els nivells d'activitat depenen exclusivament de la concentració d'ICN en nucli. Es coneixen poques molècules que intervenen modulant la seva activitat en el trànsit membrana-citoplasma-nucli, les quals queden bàsicament reduïdes a dos participants caracteritzats en *D.melanogaster*: Deltex (Dx) i Supressor of Deltex (Su(Dx)).

Deltex és una proteïna amb un domini *zinc finger* que actua unint-se als dominis anquirina d'ICN funcionant com un regulador positiu de la via. La seva sobreexpressió provoca el mateix fenotip adult que la sobreexpressió de Notch activat. No obstant, els

individus en els que s'ha aconseguit la pèrdua de funció de D_x i el guany d'ICN mantenen un fenotip normal. Això indicaria com Notch seria capaç d'intervenir sobreposant-se a l'absència de Deltex (Matsuno et al, 1995).

En canvi, el gen Supressor of Deltex –Su(dx)- rep el seu nom perquè originàriament s'observà que era capaç de revertir l'efecte de Deltex. És un enzim E3 ubiquitin-ligasa que actua regulant negativament els nivells d'ICN. Els efectes de les mutacions que causen la pèrdua de funció de Su(dx) coincideixen amb aquells provocats pel guany de funció de Notch.

Notch a nucli. Activitat transcripcional.

El principal element d'acció de la ruta de Notch a nucli és el factor de transcripció CSL, el qual rep el seu nom per les proteïnes que l'integren en els diferents organismes: CBF1 (*C-promoter binding factor1*), RBP-jk/Su(H)/Lag-1 en mamífers, *Drosophila* i *C.elegans* respectivament. Aquest factor té la capacitat per unir-se a les diferents regions diana dels gens regulats per Notch (Fiuza & Arias, 2007).

Inicialment, les proteïnes CSL havien estat classificades com repressors transcripcionals en vertebrats i activadors en organismes model invertebrats. Aquesta paradoxa es resolgué amb la constatació que aquest sistema podia dur a terme ambdues accions per reclutament de diferents complexos corepressors o coactivadors (Lai, 2002).

En absència de Notch, CSL es troba unit a diferents elements formant un multicomplex repressor de la transcripció. En mamífers són elements destacats:

- a) SMRT (*Silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*) i N-CoR (*Nuclear receptor co-repressor*): proteïnes caracteritzades per ser capaces d'unir receptors hormonals no associats a lligand i inhibir la seva capacitat per activar la transcripció (Chen & Evans, 1995). Ambdues proteïnes tenen capacitat per interaccionar amb d'altres receptors no relacionats; com és el cas de CBF1 on actuen antagonitzant l'acció transcripcional d'ICN (Kao et al, 1998).
- b) CIR (*CBF interacting repressor*): proteïna que interacciona amb CBF i SMRT. Inhibeix la transcripció per unió directa a regions específiques de DNA (Hsieh et al, 1999).
- c) SKIP (*Ski-interacting protein*): és una proteïna adaptadora que exhibeix associacions excloents amb el complex corepressor (en contacte amb CBF1 i

SMRT) i coactivador (per interacció amb CBF1 i ICN). Funciona com l'*interruptor* que permet l'inici de l'acció transcripcional del complex (Zhou et al, 2000).

Aquest conjunt de molècules són els components essencials que permeten el reclutament d'altres fins a la formació d'un gran complex repressor. Entre les proteïnes incorporades al complex destaquen les histona deacetilases (HDACs). L'estat d'acetilació de la cromatina es correlaciona amb la seva competència transcripcional. La reducció de l'acetilació d'histones per les HDACs s'associa a un estat reprimat i transcripcionalment inactiu de la cromatina. Per contra, l'augment del nivell d'acetilació d'histones que duen a terme les histona acetiltransferases (HATs) promou l'evolució de la cromatina a un estat transcripcional actiu (Lai, 2002).

ICN un cop es transloca a nucli quan la via està activada pot interaccionar amb la proteïna SKIP. L'establiment d'enllaços entre totes dues deriva en un canvi conformacional que allibera els corepressors i permet l'entrada de nous elements afavoridors de l'activitat transcripcional (Kovall, 2007):

- a) *Mastermind-like* (MAML): família de proteïnes nuclears que contenen un domini N-terminal bàsic que possibilita la seva unió als ANKR de Notch formant un complex transcripcional estable amb CSL i ICN capaç d'activar gens diana característics de la via com els de la família HES (responsabilitat del domini C-terminal de la proteïna). Mutacions o delecions en qualsevol dels dos dominis provoquen l'abolició de la capacitat transcripcional de la via i actuen com a dominants negatius de l'expressió mediada per Notch. El paper de MAML és, per tant, crític en aquesta ruta de senyalització (Wu et al, 2002).
- b) PCAF i p300/CBP: el complex ternari ICN-CSL-MAML presenta una estructura que permet la inclusió d'aquest tipus de proteïnes. Són molècules d'acció general que presenten dues activitats; d'una banda, actuen com a proteïnes adaptadores. De l'altra, tenen activitat histona acetiltransferasa (HAT) originant un canvi conformacional de la cromatina. En tots dos casos, l'objectiu final és millorar l'accessibilitat dels factors de transcripció a les seqüències promotores i/o reguladores i, en conseqüència, afavorir l'expressió gènica (Chan & La Thangue, 2001).

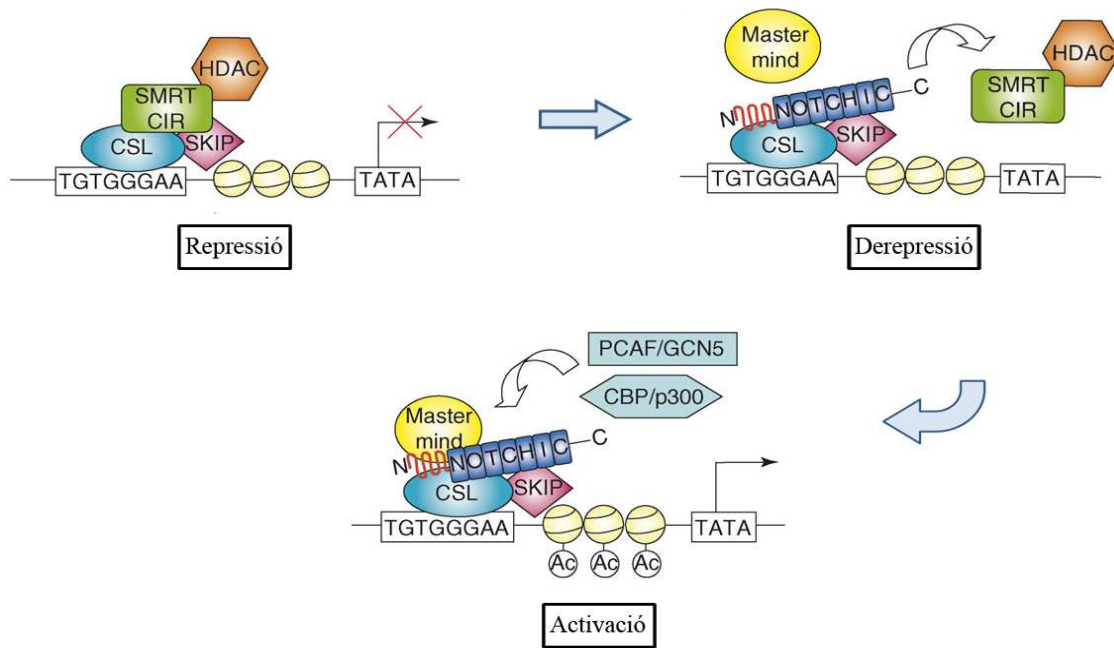


Fig 6. Activació del complex transcripcional per la via de senyalització de Notch1. En absència d'aquest el sistema roman inactiu. La unió d'ICN a SKIP provoca el desacoblament del complex corepressor format per CIR/SMRT i la unió dels coactivadors MAML (*Mastermind*) i HATs. L'acció histona acetiltransferasa final permet l'inici de la transcripció dels gens diana de Notch (*Kovall AR, 2007*)

3.4 Expressió gènica regulada per Notch1.

L'ensamblatge del complex dona com a resultat la transcripció d'un ampli grup de gens diana. El més conegut és l'anomenat *basic-helix-loop-helix* (bHLH). A *Drosophila* el constitueixen la família *Enhancer of Split* (E(Spl)) mentre que en mamífers es coneixen les famílies HEY/ Hrt (*Hairy related*) i HES principalment.

Formen una família de reguladors transcripcionals (majoritàriament funcionen com a repressors transcripcionals encara que hi ha excepcions amb funció antagonista) que duen a terme un paper clau en el desenvolupament de diferents teixits incloent sistema nerviós, teixit muscular esquelètic i cardíac, etc. Tenen un domini bàsic encarregat de la unió específica a seqüències de DNA, mentre que el domini HLH és el responsable de la dimerització d'aquestes proteïnes, imprescindible per realitzar la seva funció (Iso et al, 2003).

S'han observat seqüències sensibles a ser regulades per ICN i CSL en promotors molt diversos com poden ser gens del complex MHC I, interleucines, myc o p21. La influència d'ICN sobre aquests gens es limita a experiments de mobilitat electroforètica

o *shift*. En canvi, el gen de la ciclina D1, tot i tenir una seqüència pobre de regulació per CSL, sí es troba demostrat que és una diana directa de Notch (Ronchini & Capobianco, 2001) afegint una evidència més al control que executa Notch sobre un procés tan global com el cicle cel·lular.

Per tant, el nombre de dianes immediates de Notch és relativament baix. No obstant, al ser molts d'ells al seu torn reguladors transcripcionals, el ventall de gens l'expressió dels quals està regulada per Notch augmenta exponencialment posant de manifest la rellevància de Notch sobre els diferents processos bàsics que afecten al desenvolupament de l'organisme.

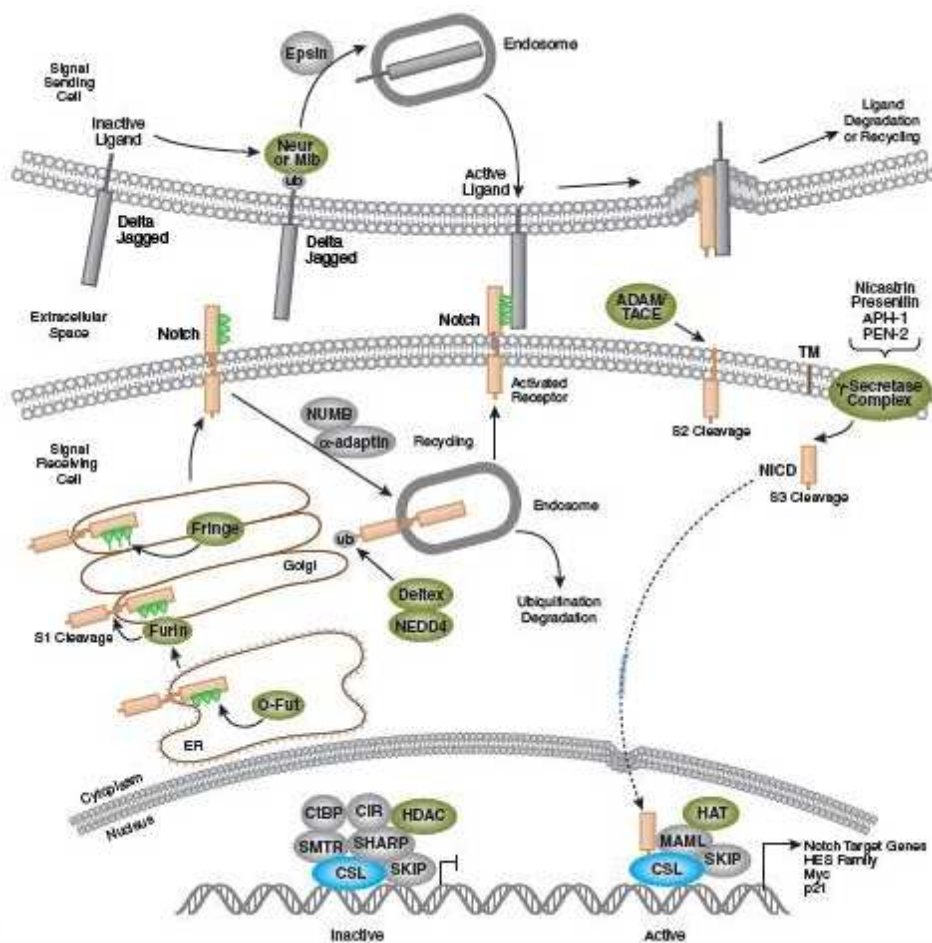


Fig 7. Via senyalitzadora de Notch. Inclou els 3 punts de proteòlisi (*furin-like* proteasa, metal·loproteasa i γ -secretasa). Notch es presenta a la membrana en forma d'heterodímer on interacciona amb el seu lligand. La forma processada resultant (ICN) transloca a nucli on activa la transcripció dels seus gens diana. Es mostren també els elements reguladors a nivell d'endocitosis, ubiquitinació i degradació (*Cell Signalling*, www.cellsignal.com)

3.5 Mecanismes reguladors de la via de transducció de senyals de Notch1.

La via de Notch no només es troba regulada pels factors intrínsecs a ella mateixa com poden ser l'expressió de lligands i receptors en funció del teixit o estat de desenvolupament, la vida mitja de totes les proteïnes de la via, etc. Existeixen una sèrie de mecanismes cel·lulars associats que permeten al sistema actuar en major o menor mesura en funció de les necessitats de l'organisme.

Glicosilació

Tant Notch com els seus lligands són glicoproteïnes i aquest procés de glicosilació té propietats reguladores sobre les seves funcions. Els gens *Fringe* codifiquen per N-acetilglucosaminiltransferases responsables d'aquesta glicosilació en les repeticions *EGF-like* i el gen *OFUT* incorpora molècules de fucosa als residus serina o treonina de les proteïnes substrat (Fiuza & Arias, 2007). La incorporació de molècules de fucosa és bàsica per a que es produeixi la interacció lligand-receptor mentre que el nivell de glicosilació dependent de *Fringe* modula la resposta als diferents tipus de lligand, incrementant la unió a Delta i inhibint la resposta enfront de la família Jagged/Serrate (Kadesch, 2004).

Ubiquitinació

La ubiquitina és una molècula de 8 KDa molt conservada, la qual pren part en múltiples esdeveniments cel·lulars. L'addició de molècules d'ubiquitina a les proteïnes es pot donar de diferents formes i implica diferents processos associats. La poliubiquitinació és l'addició de diverses molècules formant una cadena unida a un residu lisina de la proteïna. Aquesta modificació s'associa a la senyalització de la proteïna per a la seva degradació via proteasoma. En canvi, processos de monoubiquitinació o multiubiquitinació (unió d'una sola molècula a un o diversos residus Lys de la proteïna) han estat vinculats amb diferents funcions com la tolerància al dany en el DNA, la síntesi proteica ribosomal, la resposta inflammatòria i la ruta endocítica (Mukhopadhyay & Riezman, 2007).

La monoubiquitinació es dona en la molècula de Notch ΔE (concretament en el residu K1749 de Notch murí) i és un prerrequisit per al processat proteolític dut a terme per les γ -secretases (Gupta-Rossi et al, 2004).

Internalització del lligand

Un cop donada la interacció entre els lligands DSL i els receptors Notch intervenen una sèrie de gens què afavoreixen la internalització del lligand (el qual portarà unit la conseqüent regió extracel·lular de Notch) i la seva posterior degradació. Aquests gens (Neuralized i Mind bomb en invertebrats i vertebrats respectivament) pertanyen al grup d'enzims E3 ubiquitin-ligases i la prèvia ubiquitinació del lligand sembla un requisit indispensable per a l'activació del receptor Notch. L'arrossegament de Notch extracel·lular ocasionaria els canvis conformacionals necessaris a Notch transmembrana per ser accessible a l'acció de les proteases (Nichols et al, 2007). Una segona opció seria la necessitat del lligand de ser internalitzat de forma prèvia a la interacció lligand-receptor i aconseguir així el processat òptim per al posterior reconeixement.

Endocitosi i trànsit intracel·lular de Notch1.

La primera evidència que el procés d'endocitosi juga un paper clau en la senyalització per Notch prové de les anàlisis en el mutant *shibire^{ts}* de *Drosophila*. Shibire codifica per la proteïna Dinamin, una GTPasa requerida per la internalització d'un percentatge molt important dels diferents tipus de vesícules endocítiques (Seugnet et al, 1997).

La proteïna Numb no té un paper només sobre el lligand; també actua regulant el propi receptor Notch. Té la capacitat per unir la proteïna α -adaptina, implicada en la maquinària endocítica. Durant el desenvolupament Numb se segrega de forma diferencial entre les cèl·lules provinents d'una progenitora i permet la polarització d' α -adaptina. Aquesta polarització és la responsable de les diferències en els nivells de Notch capaç d'assolir el nucli cel·lular (Berdnik et al, 2002). A *Drosophila*, els mutants per la proteïna homòloga a α -adaptina presenten un fenotip similar als mutants Notch.

Aquest exemple, així com els treballs sobre l'endocitosi del propi lligand exposen una regulació positiva de la via. L'endocitosi pot ser també un sistema pel manteniment dels nivells de proteïna Notch dins dels paràmetres adequats afavorint un *turnover* de la proteïna dirigint aquesta cap a la seva degradació lisosomal. Estudis bioquímics mostren la direccionalització de Notch1 murí cap a compartiments lisosomals per a la seva degradació mitjançant la interacció amb la proteïna Cbl. Notch1 conté un domini YxxxP d'unió a Cbl, una *RING finger* E3 ubiquitin ligasa. L'addició de molècules d'ubiquitina vehiculen Notch vers la seva degradació lisosomal (Le Borgne et al, 2005).

3.6 Senyalització Notch dependent/ CSL independent

La família de factors de transcripció CSL són els principals gens reguladors a nucli de l'acció transcripcional d' ICN. No obstant, existeixen nombroses evidències que fan pensar en una via de senyalització independent de CSL. Inicialment s'observà a *Drosophila* com el fenotip ocasionat en embrions per pèrdua de funció de *Supressor of Hairless* (Su(H)) és menys sever que l'originat per mutacions en Notch. Resultats semblants s'obtenen en ratolins de la comparació entre mutants Notch i mutants CBF1 (Martinez Arias et al, 2002).

A la línia cel·lular miogènica C2C12, Notch bloqueja la diferenciació de miòcits a miotubs inhibint l'acció del factor de transcripció específic de múscul MyoD (Kopan et al, 1994). Aquesta diferenciació es troba també bloquejada quan es fan servir formes mutants de Notch que no es poden unir a CBF1 o en els casos en que es fan servir dominants negatius d'aquest. En conseqüència, Notch domina aquesta via de senyalització d'una forma independent dels factors CSL (Shawber et al, 1996). S'ha observat també com aquesta acció pot ser executada per una forma de Notch no processada en S1 i per tant, per la presència en membrana plasmàtica de la forma *full-length* del receptor. Aquest resultat estableix una nova visió en que dues isoformes de la mateixa proteïna poden coactuar en membrana plasmàtica dirigint dos processos diferenciats (Bush et al, 2001).

Recentment, Notch i la seva corresponent via de transducció de senyals han estat associats a d'altres *pathways* principals posant de manifest una complicada xarxa de control dels esdeveniments cel·lulars. Alguns dels exemples més notoris:

- a) **Notch i Wnt:** els paràmetres claus de la senyalització per Wnt són l'estabilitat i la localització intracel·lular del *pool* soluble format per les proteïnes β -catenina i Armadillo en vertebrats i *Drosophila* respectivament. En absència de Wnt, aquestes proteïnes es fosforilen per acció de GSK3 β i es degraden via proteasoma. La interacció de Wnt amb els receptors Arrow/LRP a través de la proteïna Frizzled activa l'adaptador citoplasmàtic Dishevelled (Dsh) i la proteïna β -catenina/Armadillo hipofosforilada entra a nucli on interacciona amb els factors de transcripció TCF. Notch antagonitza aquesta via doncs la pèrdua de funció en *D. Melanogaster* de *wingless* (un membre de la família Wnt) o de Dishevelled es pot superar mitjançant la pèrdua de funció de Notch. Aquest

regula negativament l'expressió de β -catenina/Armadillo i també es postula una possible relació de Notch amb Axin, una nova proteïna involucrada amb GSK3 β en el complex que provoca la degradació de β -catenina/Armadillo. Recíprocament, Dsh i Armadillo tenen la capacitat d'unir-se a Notch en la regió C-terminal i reduir la senyalització via CSL independent (Hayward et al, 2005).

b) **Notch i Ras:** estudis genètics recents indiquen importants paral·lelismes entre els processos de desenvolupament controlats per Notch i l'adhesió mediada per integrines. Les integrines són glicoproteïnes heterodimèriques transmembrana que regulen les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu. Un procés clau és la seva capacitat per regular l'afinitat de la unió lligand-receptor en resposta a senyals intracel·lulars, que es coneix com activació. Són essencials per l'embriogènesi i s'involucren en processos Notch-dependents com neurogènesi, miogènesi i angiogènesi. Els receptors Notch regulen positivament l'adhesió cel·lular a una matriu de fibronectina a través de l'activació de molècules α 5 β 1-integrines regulant d'aquesta manera processos de somitogènesi i desenvolupament de la vasculatura en embrions. L'activació d'integrines s'aconsegueix per l'acció intracel·lular de la GTPasa R-Ras, antagonitzant d'aquesta manera la supressió de l'activació d'integrines duta a terme per H-Ras (Hodkinson et al, 2007). Existeixen nombrosos exemples de *cross-talk* entre les vies de senyalització de Notch i Ras degut a que tots dos efectors actuen sobre components de l'altre. Aquestes relacions poden ser:

a. **Antagonistes:** Ras promou el descens en l'expressió del receptor Notch LIN-12 en *C.elegans*. També pot bloquejar l'activitat transcripcional dels gens bHLH diana de Notch; per exemple, en *D. Melanogaster*, MAPK fosforila la proteïna Groucho, que actua com un inhibidor del gen E(spl)-Enhancer of Split. Al seu torn, Notch afavoreix la transcripció de gens inhibidors de la via de Ras (Sundaram, 2005).

b. **Agonistes:** Notch i Ras poden actuar de forma conjunta sobre el mateix promotor o sobre promotors diferents amb l'objectiu d'assolir una determinació i diferenciació cel·lulars concretes. Aquests mecanismes de cooperació són especialment importants per adquirir la capacitat de transformar cèl·lules o en el manteniment del fenotip tumoral. En tumors

de glàndules mamàries iniciats per Notch4 es troben activats els diferents elements de la via de Ras (p.ex.: MEK), els quals són crucials per al manteniment del fenotip transformat i el creixement independent d'adhesió a un suport sòlid (Fitzgerald et al, 2000). D'altra banda, en fibroblasts transformats per Ras es detecta una regulació positiva tant del receptor Notch com d'altres elements de la seva via com PS1 o Delta-1. Aquesta desregulació de Notch es un element clau en el manteniment del fenotip transformat d'aquestes cèl·lules (Weijzen et al, 2002).

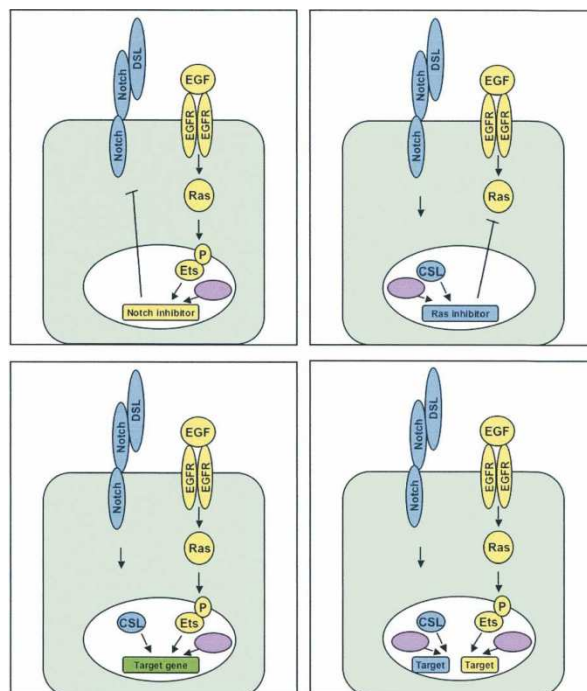


Fig 8. Exemples de la interrelació entre les vies Notch i Ras. Panell superior: regulació antagonista de Ras sobre Notch (esquerra) i de Notch sobre Ras (dreta). Panell inferior: activitat transcripcional sobre un promotor (esquerra) o sobre diferents promotors (dreta) dins d'una relació cooperativa (Sundaram MV, 2005)

- c) **Notch i PI3K-AKT:** el gen PTEN és un supressor de tumors que inhibeix la via de senyalització PI3K-Akt, establint un control sobre la proliferació en els teixits on es troba expressat. Notch controla una complexa xarxa transcripcional que disminueix l'expressió de PTEN activant el *pathway* d'Akt. Mutacions que activen constitutivament Notch o provoquen la pèrdua de funció de PTEN causen una hiperactivitat de la cinasa Akt que contribueix a la transformació

cel·lular induïda per Notch i a l'aparició d'un fenotip T-ALL (leucèmia limfocitària aguda de cèl·lules T (Palomero et al, 2007)).

4. EVIDÈNCIES DE LA PARTICIPACIÓ DE FLOTILLIN-1 EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE NOTCH

Interacció entre Flotillin-1 i Notch a *Drosophila*. Donada la vàlua del sistema de *Drosophila* com a model d'estudi de la biologia humana i la disponibilitat de la seqüència del genoma i el seu transcriptoma associat, fou realitzat un mapa d'interaccions proteiques a escala del genoma complet de l'organisme (Giot et al, 2003) mitjançant la tècnica de *yeast two-hybrid*. Aquest mapa es diposità a la base de dades BIND (*Biomolecular Interaction Network Database*). En ella, utilitzant com a sonda l'homòleg de la proteïna Flotillin-1 s'obtenia un resultat positiu per a la proteïna Notch. Aquest fet fa pensar en una possible relació entre les proteïnes humanes Flotillin-1 i Notch1, la qual és l'isoforma del receptor humà més similar a la forma de *Drosophila*.

Associació del complex γ -secretasa amb *lipid rafts*. Mitjançant experiments de sedimentació en gradient de densitat de sacarosa s'associaren els components del complex γ -secretasa (presenilines, Nicastrin madura, variants d'APH-1 i PEN-2) amb les regions lipídiques DRMs. El tractament amb agents deplecionants del colesterol com l'adició de metilciclodextrines (M β CD) traslladen aquests components a la fracció soluble com a conseqüència de la destrucció dels DRMs. Dels assajos γ -secretasa *in vitro* i de coimmunoprecipitació se'n deriva que els diferents components formen el complex γ -secretasa actiu a *lipid rafts*. No s'han trobat proves d'immunoprecipitació entre Flotillin-1 i presenilines però la localització i el trànsit vesicular d'aquestes fa plausible aquesta interacció (Urano et al, 2005).

Interacció de Flotillin-1 i el domini intracel·lular d'APP. Com s'ha comentat en l'apartat 2.4.4(e) Flotillin-1 interacciona amb la proteïna precursora amiloide en experiments de *yeast two-hybrid* i *GST-pull down* (Chen et al, 2006). Hi ha un notable paral·lelisme entre el processat d'aquesta proteïna i el de Notch (accions seqüencials de metal·loproteases i γ -secretases) i l'alliberament d'un fragment intracel·lular

(AICD/ICN); fins al punt que una construcció quimèrica de la proteïna APP que conté el fragment transmembrana de Notch pateix el mateix tipus de proteòlisi alliberant-se el fragment A β -like (Zhang et al, 2002).

En conjunt, existeixen una sèrie d'evidències que permeten pensar en un possible paper de Flotillin-1 en la via de transducció de senyals de la qual és responsable Notch.

5. CICLE CEL·LULAR I MITOSI

5.1 Introducció

Tant Notch com Flotillin-1 estableixen un control sobre la proliferació basal de les cèl·lules (Artavanis-Tsakonas et al, 1999; Santamaria et al, 2005). La proliferació cel·lular és el resultat d'una acció afavoridora sobre la progressió a través del cicle cel·lular, el procés pel qual una cèl·lula progenitora duplica el seu material genètic i es divideix en dues cèl·lules filles, iguals entre elles i idèntiques també a la cèl·lula inicial. Es tracta d'un procés que respon a factors extrínsecs, on intervien complexes xarxes moleculars de senyalització i regulació intracel·lular i amb uns mecanismes de control encarregats d'evitar errors en la transmissió del material genètic. La imperfecció del procés conduiria a guanys o pèrdues d'informació genètica que impliquen un dany irreparable i potser fatal per a la cèl·lula, i per extensió, al teixit i organisme on aquesta es troba allotjada (Harper et al, 2002).

Les transicions entre les diferents fases del cicle són el primer mecanisme utilitzat per la cèl·lula per establir l'ordre i el *timing* adequat dels esdeveniments que tenen lloc en els diferents estadis. Una transició pot tenir lloc quan es donen els canvis bioquímics adequats en l'estat de la maquinària de divisió cel·lular. Els elements responsables d'integrar els senyals intra- i extracel·lulars són els complexos **ciclina-cinasa dependent de ciclina (Cyc-CDK)**. Les ciclines actuen com les principals subunitats reguladores del complex i tenen una expressió oscil·lant al llarg del cicle cel·lular; mentre que les CDKs són les subunitats catalítiques realitzant una acció enzimàtica sobre diferents substrats. L'especificitat d'unió de determinades ciclines a determinades CDKs en moments concrets del cicle constitueixen el punt clau de control sobre la progressió d'aquest (Morgan, 1997). Els principals complexos són:

CDK	Ciclina associada	Fase del cicle
Cdk1 (Cdc2)	Ciclina B	Fase M
Cdk2	Ciclina E	G1/S
Cdk2	Ciclina A	Fase S i G2
Cdk3	?	G1
Cdk4	Ciclina D	G1

Cdk6	Ciclina D	G1
Cdk7, Cdk, 8, ...	Ciclina C, F, G	Regulació transcripcional

Taula 1. Relació dels principals complexos Cdk-ciclina presents a la cèl·lula eucariota. *Lodish et al, 1999.*

5.2 Fases del cicle

Les cèl·lules de mamífer subsistint en un medi sense factors de creixement es troben retintades amb una dotació diploide de cromosomes en el que es coneix com a fase **G₀** o **quiescència**, situació que permet derivar la cèl·lula cap a la seva especialització o vers processos de mort per apoptosi. L'addició dels factors adequats al medi provoquen l'activació de les rutes de transducció de senyals corresponents per a l'avenç de la cèl·lula a través del cicle incorporant-se a la **fase G₁**; fase de transició en que la cèl·lula guanya volum i complexitat estructural a més d'activar-se les molècules necessàries per a la replicació del DNA. Si de nou aquests factors són retirats del medi pot donar-se una dicotomia: que la cèl·lula romangui inalterada o que finalitzi un cicle complet de duplicació de material genètic i divisió. La decisió és dependent de si la cèl·lula ha avançat prou en la fase G₁ com per superar el que es coneix com a **punt de restricció**.

La primera activació que trobem és la dels gens de resposta primària (*early response genes*), els factors de transcripció dels quals es troben presents en G₀ i s'activen per modificacions post-traduccionals com fosforilacions. Aquestes proteïnes (principalment Jun i Fos) són al seu torn factors de transcripció del grup de gens de resposta tardana (*delayed response genes*), l'activació dels quals suposa la superació del punt de restricció. Entre aquests gens trobem Cdk 4/6, ciclina D i E2F. Els complexos ciclina D-Cdk 4 i ciclina D-Cdk 6 fosforilen la proteïna Rb, la qual uneix els factors E2F impeding la seva funció. Un cop fosforilada, s'inhibeix la repressió i E2F actuen com a factors de transcripció permetent l'expressió de gens com ciclina E i Cdk 2 i la pròpia expressió dels gens E2F de manera que s'aconsegueix un *loop* positiu que permet la **transició G₁-S**. En aquesta fase s'inicia la síntesi de ciclina A, que unida a Cdk2 formen el complex encarregat de l'activació dels diferents enzims que efectuaran la replicació del DNA al llarg de la **fase S**.

Posteriorment, en el cicle es troba una nova etapa de transició anomenada **fase G₂** en que la cèl·lula es prepara per a la divisió en dues entitats genèticament idèntiques entre si. Els complexos Cdk1-ciclina A i Cdk 1-ciclina B són els responsables de que es dugui a terme l'iniciació de la **mitosi o fase M**. El factor que regula l'inici de la mitosi es

coneix com a MPF (*maturation promoting factor*). Cdk1-ciclina A/B regulen MPF per fosforilació i també per l'entrada controlada de ciclina B a nucli. Un cop avançada la mitosi, la poliubiquitinació de les ciclina i la seva subseqüent degradació provoquen una ràpida caiguda de l'activitat de MPF, permetent completar la mitosi i assolir de nou l'estat inicial diploide G_1 o G_0 (Lodish et al, 1999).

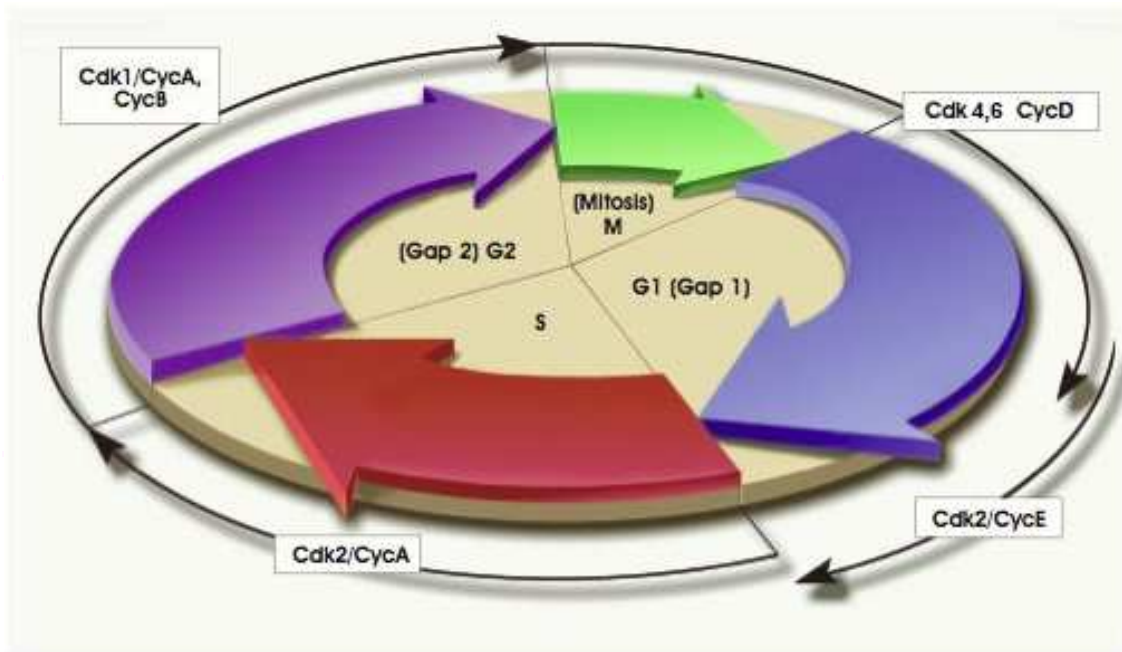


Fig 9. Visió esquemàtica del cicle cel·lular i els principals mecanismes de control. Es mostren les diferents fases del cicle i els complexos Cdk-ciclina que hi intervenen (*National Institute of Health*)

Els complexos Cdk-ciclina es regulen per mecanismes que afecten als nivells globals de proteïna (transcripció, ubiquitinació, ...), per modificacions post-traduccionals (fosforilacions principalment), i també, per associació amb altres components reguladors. En aquest apartat, són importants les famílies de proteïnes inhibidores de ciclina-cinases (CKIs): CIP (*Cdk inhibitory protein*) i INK4 (*Inhibitors of kinase 4*). En mamífers destaquen les proteïnes de la família CIP: p21, p27 i p57 (Lodish et al, 1999).

5.3 Mitosi

La mitosi és la fase de culminació del cicle cel·lular i inclou diferents estadis de divisió nuclear (mitosi) i citoplasmàtica (citocinesi) orientats a assegurar l'adquisició d'una dotació completa de cromosomes per cada una de les cèl·lules filles. De forma seqüencial consta de les següents fases (Alberts et al, 2002):

- a) **Profase:** els cromosomes replicats, cadascun consistent en dues cromàtides germanes, es condensen. Fora del nucli, el fus mitòtic (estructura de microtúbuls i proteïnes associades que jugarà un paper clau en la segregació cromosòmica) comença el seu ensamblatge entre els dos centrosomes (centres organitzadors de microtúbuls); els quals també s'han replicat i s'han mogut vers els pols de la cèl·lula.
- b) **Prometafase:** comença amb una destrucció abrupta de l'embolcall nuclear. D'aquesta manera, el fus mitòtic finalitza el seu procés de construcció i els cromosomes tenen llibertat per unir-se als microtúbuls a través del cinetocor. Aquest consisteix en un conjunt de proteïnes localitzades en la regió central del cromosoma (centròmer), les quals prenen part activa no només en la unió al citoesquelet, sinó també en el moviment que realitzaran els cromosomes cap als pols de la cèl·lula.
- c) **Metafase:** els cromosomes s'alineen en la zona central del fus mitòtic (placa equatorial) a mig camí entre els dos pols. Els microtúbuls del cinetocor uneixen cada cromàtida germana als pols oposats del fus.
- d) **Anafase:** en aquest punt, les dues cromàtides germanes se separen originant dos cromosomes independents. Els processos d'ubiquitinació i degradació per la via del proteasoma juguen un paper clau en aquesta i moltes altres transicions entre fases. L'estructura i la unió de les dues cromàtides és responsabilitat d'uns complexos multiproteics anomenats cohesines i condensines, la degradació dels quals possibilita la separació i segregació dels cromosomes (Hirano, 2000). Cadascuna de les cromàtides es empenya lentament cap als pols del fus mitòtic. Els microtúbuls del cinetocor s'escurcen per afavorir aquest moviment.
- e) **Telofase:** les dues dotacions de cromosomes arriben als pols de la cèl·lula i es descondensen. Un nou embolcall nuclear es forma completant la formació de dos nuclis i marcant el final de la mitosi. La divisió del citoplasma comença amb una redistribució del citoesquelet per formar l'anell contràctil.
- f) **Citocinesis:** el citoplasma es divideix en dos per un anell contràctil format per filaments d'actina i miosina, creant finalment dues cèl·lules filles. A la fase G2 s'havien incrementat el nombre dels diferents components cel·lulars, de cara a assegurar la supervivència de les dues noves entitats (Alberts et al, 2002).

5.4 Mecanismes reguladors de la mitosi

Les diferents fases i transicions que se succeeixen al llarg del cicle cel·lular es troben controlades per complexes xarxes de senyalització que engloben nombrosos factors. A la mitosi dos dels mecanismes principals de regulació es centren en els processos de fosforilació i els de degradació controlada per ubiquitinació.

5.4.1 Fosforilació. Aurora cinases.

Aurora és el nom donat a una família de serin/treonin cinases que regulen molts processos al llarg del cicle cel·lular. Les Aurora cinases es troben involucrades en el control del centrosoma i els cicles nuclears, i tenen funcions essencials en processos mitòtics com la condensació cromosòmica, les dinàmiques del fus mitòtic, les interaccions cinetocor-microtúbuls, l'orientació dels cromosomes i l'establiment de la placa metafàsica i són necessàries també en la finalització de la citocinesis. L'al·lel original *Aurora* fou identificat en un *screening* en *D. Melanogaster*. S'han trobat els homòlegs Ipl1 en *S.cerevisiae* i Ark1 en *S.Pombe*. En metazous existeixen diverses Aurora cinases, coneixent-se dos gens paral·lels en *Drosophila* i fins a tres en mamífers (Carmena & Earnshaw, 2003).

La subfamília Aurora cinasa A s'associa amb els centrosomes que s'estan separant durant el final de la fase S i inici de la fase G₂ i també s'ha pogut visualitzar en petites proporcions a la zona mitja del fus mitòtic. Principalment, regula la separació i maduració dels centrosomes, així com el reclutament de γ -tubulina per formar els microtúbuls astrals (Berdnik & Knoblich, 2002). Aurora A es degrada al final de la mitosi o inici de la fase G₁ degut al reconeixement per les ubiquitin ligases d'una seqüència anomenada D-box (*destruction box*) situada en l'extrem carboxi-terminal de la proteïna (Castro et al, 2002).

Aurora cinasa B, també coneguda com AIM-1 en el moment del seu descobriment (*Aurora and Ipl-1 like midbody-associated protein*), és una proteïna essencial per a diferents processos al llarg de la fase M. Els seus nivells d'expressió estan àmpliament regulats, sent màxims en la transició G₂-M, amb una major activitat cinasa al llarg de la mitosi (Terada et al, 1998). Al seu torn, Aurora B es troba també regulada per fosforilació. El bloqueig/inactivació de proteïnes fosfatases (PP1, PP2A) permet mantenir un estat fosforilat d'Aurora B i el compliment de les seves funcions (Sun et al, 2008). Per contra, Aurora B es degrada en la transició M-G₁ en una forma dependent de proteasoma i similar al cas d'Aurora A: per reconeixement mitjançant un enzim E3

ubiquitin ligasa d'una seqüència D-box. La unió d'una proteïna reguladora anomenada Cdh1 és necessària per que es dugui a terme aquest reconeixement (Stewart & Fang, 2005).

Aurora B es troba unida a tres proteïnes més – INCENP, Survivin i Borealin – formant el que es coneix com a *chromosome passenger complex* (CPC) per la seva localització concreta al llarg de les fases de la mitosi. A l'inici, CPC transloca des dels braços dels cromosomes en condensació als centròmers. En la transició metafase-anafase, mentre els cromosomes es direccionen cap als pols de la cèl·lula, el complex es dissocia dels centròmers, situant-se en els microtúbuls de la zona central del fus mitòtic. INCENP, survivin i borealin formen una íntima estructura helicoidal destinada a regular l'acció d'Aurora B, la qual funciona com a subunitat catalítica del complex (Jeyaprakash et al, 2007).

INCENP fou el primer component identificat. Es tracta d'una proteïna adaptadora que interacciona amb els altres tres membres. El seu extrem 3' es troba molt conservat evolutivament degut a la seva funció d'unió i regulació de l'activitat Aurora cinasa.

Survivin és un conservat membre de la família IAP (*Inhibitor of apoptosis protein*) i es presenta en forma dimèrica. Es pot unir als altres tres elements i és objecte de fosforilació per Aurora B. Hi ha dubtes sobre la seva contribució a l'activitat cinasa i també sobre el paper assumit com a protector de l'apoptosi.

Borealin/Dasra-B es una proteïna relacionada funcionalment amb CSC-1 (*Chromosome segregation and cytokinesis defective-1*) de *C.elegans* però no hi ha relació estructural definida. Es coneix que Borealin es fosforilada *in vitro* per Aurora B però les conseqüències funcionals encara no són conegudes (Ruchaud et al, 2007).

Les funcions del complex CPC i per extensió, d'Aurora B, s'executen en paral·lel a la seva localització:

- **Condensació i cohesió cromosòmica:** un dels principals substrats de l'acció cinasa d'Aurora B és la histona H3. En la cromatina, les histones H3, H2B, H2A i H4 formen un octàmer al voltant del qual s'organitza i es compacta el DNA per formar els cromosomes. Per tant, qualsevol modificació en aquestes proteïnes (per fosforilació, glicosilació, acetilació o ubiquitinació) implica una combinatòria complexa de possibles estructures (*histone code*), la qual afectarà a l'estructura de la cromatina (Dai et al, 2005). La fosforilació d'histona H3 té lloc en N-terminal, concretament en els residus Ser10 i Ser28. Es dona d'una forma general durant la transició G₂-M i al llarg de

diverses fases mitòtiques. La defosforilació és abrupta en les fases finals de la mitosi (telofase-citocinesi) i es manté durant la interfase (Juan et al, 1998).

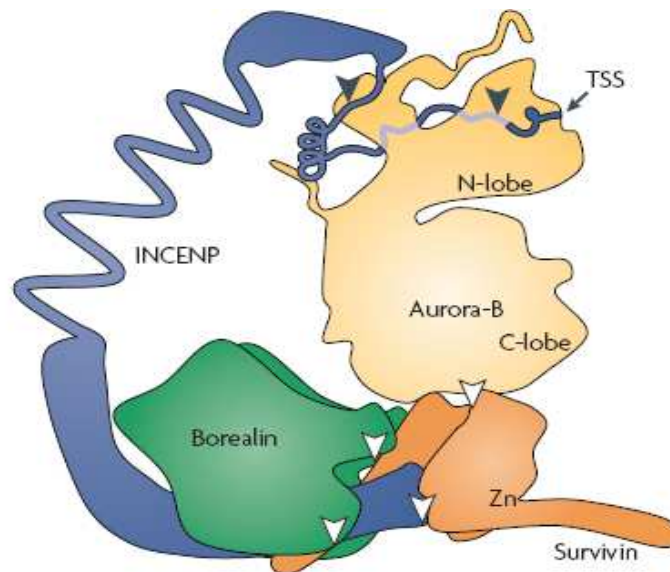


Fig 10. Representació esquemàtica del complex *chromosome passenger proteins* (CPC). INCENP actua com la proteïna *scaffold* que permet l'ensamblatge de les dues subunitats de survivin i de borealin. El conjunt actua regulant l'activitat de fosforilació per part d'Aurora B sobre els seus múltiples substrats, entre els quals es troben els propis components del complex (Ruchaud et al, 2007)

La funció d'histona H3 fosforilada no és del tot clara. Sembla que pot col·laborar en el desplaçament de proteïnes associades a l'heterocromatina, reordenament d'histones i posteriorment, en l'alliberament de les cohesines o d'ATPases remodeladores de cromatina (Prigent & Dimitrov, 2003).

Adicionalment, histona H3 és fosforilada en el residu Thr3 per la cinasa *Haspin*. Aquesta modificació també resulta important per al correcte alineament dels cromosomes en metafase (Dai et al, 2005).

Aurora B participa també de la localització i l'activitat del complex condensina, format per dues proteïnes SMC (*structural maintenance of chromosomes*), el qual és essencial per al manteniment de la integritat dels cromosomes mitòtics (Carmena & Earnshaw, 2003).

- **Formació del fus mitòtic:** l'ensamblatge del fus mitòtic requereix com a mínim dos processos diferents en els què el complex CPC és essencial. Primer, la via canònica què contempla la nucleació de microtúbuls en els pols del fus i l'estabilització en els cinetocors per la captura dels extrems positius. En segon lloc, un procés guiat per la

cromatina en que els microtúbuls es formen al citosol i s'estabilitzen a prop dels cromosomes mitòtics per acció de Ran-GTP, i aleshores s'organitzen en fibres fusiformes per acció de proteïnes motores (Wadsworth & Khodjakov, 2004). Aurora B hiperfosforila i inactiva diferents proteïnes com Stathmin o MCAK (*Mitotic centromere-associated kinesin*) que tenen com a objectiu desestabilitzar o depolimeritzar els microtúbuls. La seva inactivació permet la formació correcta del fus bipolar (Tulu et al, 2006).

- **Orientació i separació cromosòmica:** un aspecte crucial de la mitosi és l'existència d'un mecanisme que asseguri la correcta unió de les cromàtides germanes als pols de la cèl·lula (biorientació). En resposta a la falta de tensió microtubular provocada per unions sintèliques (dues cromàtides al mateix pol) o monotèliques (unió d'una sola cromàtida), Aurora B manté les proteïnes del complex del cinetocor (p.ex.: els complexos Dam o HEC1) en estat fosforilat de manera que desestabilitza la unió d'aquestes als microtúbuls del fus mitòtic, augmentant també el seu recanvi.

El sensor de tensió és una conseqüència directa de la localització d'Aurora B. Aquesta es troba empaquetada entre els dos cinetocors germans però no dintre d'ells mateixos. Quan la tensió és dèbil per una mala orientació del cromosoma, la unió és més íntima i les proteïnes es mantenen fosforilades. En canvi, si els dos pols intenten arrossegar les cromàtides envers ells, el petit augment de tensió fa que els cinetocors se separin lleugerament d'Aurora B, permetent l'acció defosforiladora de les proteïnes fosfatases i la continuïtat del cicle (Tanaka et al, 2002). La importància d'aquest procés radica en que la unió del DNA al fus mitòtic mai és simultània per les dues cromàtides i per tots els cromosomes, de manera que aquest sistema s'activa sempre durant la metafase. La inhibició (per tècniques de siRNA o mitjançant la molècula hesperadina) d'Aurora cinasa B augmenta considerablement el nombre d'unions no amfitèliques (Hauf et al, 2003).

- **Control del *spindle checkpoint*:** com s'explica en l'apartat 5.5c), el punt de control de la mitosi comprèn una sèrie de mecanismes que eviten la progressió de la transició metafase-anafase fins que l'orientació i la unió dels microtúbuls als cromosomes és l'adequada. El complex CPC actua com a sensor tal i com s'ha comentat en el punt anterior i, en els casos en que la tensió no és l'adequada, recluta les proteïnes necessàries -BubR1, Mad2 i el motor proteic CENP-E- per a establir el punt de control, impeding-se així la progressió del cicle (Ditchfield et al, 2003).

- **El complex CPC en les fases finals de la mitosi:** quan la tensió de la unió microtúbuls-cinetocors és correcta, conseqüència de la biorientació de les cromàtides germanes i la seva unió bipolar al fus mitòtic, es desactiven els mecanismes de control i es permet la transició metafase-anafase. En aquest punt, el complex CPC se situa en la placa mitja del fus mitòtic. Se sap que Aurora cinasa B és capaç de crear un gradient de fosforilació al llarg de tota la cèl·lula. Els seus substrats histona H3 i MCAK es troben fosforilats a la zona central i defosforilats en els pols de la cèl·lula. D'aquesta manera Aurora B pot continuar el procés d'organització dels microtúbuls de la zona mitja. Aurora B difondria en el citosol però seria inactivada per les fosfatases citoplasmàtiques assegurant-se d'aquesta manera la creació del gradient (Fuller et al, 2008).

Finalment, el complex CPC té una participació activa en el procés de citocinesi. INCENP i Aurora B es troben localitzats a la regió on es formarà l'anell contràctil que permetrà la separació de les dues cèl·lules. L'abolició de l'expressió d'aquestes proteïnes provoca defectes en la finalització del cicle. Aurora B interactua amb motors microtubulars de la família quinesina i GTPases com Rac (Ruchaud et al, 2007). Una segona molècula GTPasa com és la Dinamin, generalment associada als processos d'endocitosi i transport vesicular, es troba també present en aquesta regió del fus mitòtic participant dels processos de fissió, fusió i remodelatge de membranes que tenen lloc durant la citocinesi. Contribueix a la redistribució de tubulina, mantenint les propietats adequades de tensió en la membrana plasmàtica i ajudant a la seva contracció per tal de separar la cèl·lula en dos (Thompson et al, 2002). A través dels microtúbuls del fus mitòtic hi ha un transport actiu vers la zona d'escissió de diferents subpoblacions vesiculars i F-actina en un procés en què també intervenen els motors de la família quinesina, així com GTPases de la família Rho (Albertson et al, 2008). Aquests models plantegen una relació entre les *chromosome passenger proteins* i les dinàmiques vesiculars associades a la membrana plasmàtica durant el procés de citocinesi.

5.4.2 Ubiquitinació. Complex APC/C.

El paper de la ubiquitinació i la degradació per la via del proteasoma en la progressió del cicle cel·lular es descobreix en la recerca d'un mecanisme que controli l'expressió oscil·lant de les molècules clau d'aquest procés: ciclins, CDKs i els seus inhibidors (CKIs) (Glotzer et al, 1991). Sorprenentment, les ubiquitin ligases tenen un ventall de funcions molt més ampli incloent el control en la separació de les cromàtides germanes

o nombrosos *pathways* de senyalització regulats per fosforilases/fosfatases (Nasmyth, 1999).

APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) és un gran complex multiproteic amb activitat E3 ubiquitin ligasa. En aquest complex, l'associació temporal d'alguns dels seus membres proporciona un element regulador (temporal o espacial) sobre les seves funcions. En humans, el **core ubiquitin ligasa** està format per les proteïnes Apc1, Apc2 i Apc11, les quals tenen uns dominis *cullin*/Ring-H2 respectivament que possibiliten la unió al substrat a degradar, així com la unió a les molècules E2 conjugadores d'ubiquitin (Zheng et al, 2002). També participa, la proteïna Doc1, associada a tot tipus de processos d'ubiquitinació (dins i fora de la progressió del cicle cel·lular) (Grossberger et al, 1999). D'altra banda, les proteïnes Cdc16, Cdc23 i Cdc17 formarien una **unitat de regulació** de l'activitat d'APC/C. La modulació vindria produïda per canvis conformacionals en funció de si aquestes proteïnes es troben o no fosforilades (Harper et al, 2002). Finalment, hi són presents les conegudes com a **proteïnes activadores**: Cdc20 (també anomenada *Fizzy*, *Fzy*) i Cdh1 (o *Fizzy-related*, *Fzr*). Actuen al llarg de la mitosi en el cas de Cdc20 i en les fases finals de la mitosi i G₁ quan es tracta de Cdh1. Aporten especificitat de substrat, doncs contenen dominis formats per repeticions WD40 que permeten la seva unió a múltiples molècules (Schwab et al, 1997).

La regulació per fosforilació pot ser d'una forma activadora o inhibidora segons quina sigui la molècula efectora i el residu fosforilat. Els complexos Cdk/ciclina mitòtics així com les proteïnes de la família Plk (*Polo-like kinases*) regulen APC/C d'una forma positiva, permetent l'avenç a través de la mitosi (Descombes & Nigg, 1998; Lahav-Baratz et al, 1995) i, de forma contrària, el tractament amb fosfatases inactivaria la seva acció (Lahav-Baratz et al, 1995). Una explicació, és la major afinitat per unir Cdc20 per part d'un complex APC/C en què les subunitats reguladores es troben fosforilades (Kramer et al, 2000). En canvi, quan les fosforilacions tenen lloc directament sobre les molècules que conformen el nucli del complex, el resultat és una inhibició de l'acció ubiquitinadora. Per exemple, la proteïna cinasa A (PKA, *cAMP dependent protein kinase*) fosforila i inactiva la unitat estructural Apc1. Com que els nivells d'expressió de PKA es troben regulats al seu torn en funció de la fase mitòtica en què es troba la cèl·lula, aquest fenomen afegeix un punt extra de regulació de la progressió del cicle cel·lular (Kotani et al, 1998).

Entre les principals funcions d'APC/C-Cdc20 es troben: 1) la degradació de les ciclines de la fase S, les quals antagonitzen de forma molt potent l'acció del propi complex APC/C-Cdh1 que actuarà en les fases finals de la mitosi, assegurant d'aquesta manera l'ordre correcte en la progressió de les fases (Harper et al, 2002) i 2) la separació de les cromàtides germanes durant l'anafase. Aquest procés és d'una elevada complexitat en mamífers: s'inicia per una separació dels complexos cohesina dels braços dels cromosomes en una acció dependent de la cinasa *Polo-like* (Sumara et al, 2002). Aquests complexos cohesina romanen en la zona del centròmer i són degradats per una activitat separasa (Hauf et al, 2001). La regulació d'aquest complex separasa és crítica per a evitar una dissociació precoç o tardana dels cromosomes i el guany o pèrdua genètics corresponents. La separasa es troba unida a una molècula anomenada securina, la qual és l'objecte de degradació per APC/C-Cdc20 (Salah & Nasmyth, 2000). Aquest procés es troba sota control del *checkpoint* mitòtic, el qual s'explica en l'apartat 5.5 c). Un cop iniciada l'anafase, APC/C-Cdc20 degrada també les ciclines presents en l'inici de la mitosi, així com les proteïnes cinases que fosforilen i inactiven Cdh1 (Shirayama et al, 1999). És aleshores el torn d'APC/C-Cdh1 que finalitzarà la degradació dels elements necessaris en fase M, donant pas a la fase G₁ (Visintin et al, 1997).

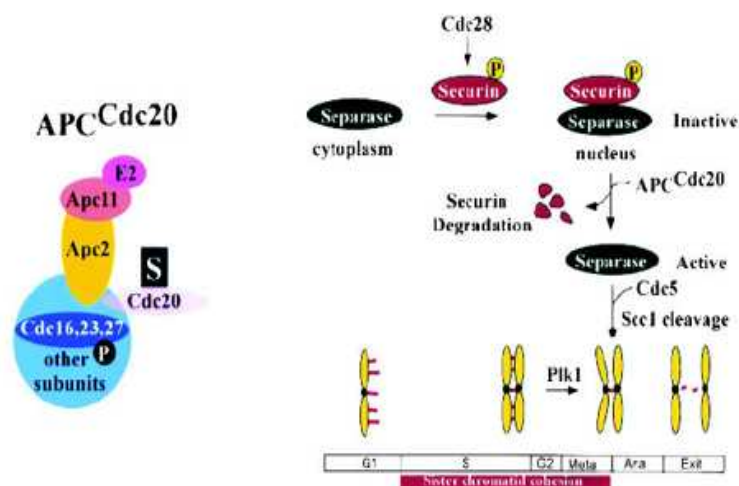


Fig 11. *Panell esquerre*: components del complex APC/C. Elements centrals (Apc11 i Apc2); elements reguladors (Cdc16, Cdc23, Cdc37); element activador (Cdc20). *Panell dret*: mecanisme d'acció del complex en la separació dels cromosomes. APC/C-Cdc20 és responsable de la degradació de les molècules de securina i promotor de l'activitat separasa (Harper et al, 2000)

5.5 *Check-points* del cicle cel·lular

La supervivència dels organismes depèn de la transmissió acurada de la informació genètica de la cèl·lula parental a les filles. Aquesta acció requereix una extrema cura en la replicació del DNA i precisió en la distribució dels cromosomes, a més de la capacitat per solventar danys espontanis i induïts en el DNA minimitzant el nombre de mutacions heretables. Per aconseguir-ho, les cèl·lules de mamífer han desenvolupat un seguit de mecanismes que monitoritzen la progressió del cicle cel·lular i coordinen els mecanismes de reparació. Aquests punts de control o *checkpoints* són vies reguladores que poden dur a terme diferents accions: aturar les transicions del cicle cel·lular, activar els mecanismes de reparació del DNA, promoure la transcripció de gens implicats en rutes reparadores i finalment, si el dany és irrecuperable, iniciar processos de mort cel·lular programada per apoptosi (Zhou & Elledge, 2000). Les respostes a anomalies del DNA són:

- a) **G1/S checkpoint:** es caracteritza per una resposta ràpida involucrant ciclina D i Cdc25, i una resposta més lenta basada en p53. Ciclina D és degradada immediatament per mecanismes dependents d'ubiquitina/proteasoma després del dany al DNA, provocant la redistribució dels inhibidors de CDK p21^{CIP/WAF} i p27^{KIP1} (de ciclina D-Cdk 4/6 a ciclina A/E- Cdk 2). La degradació de la fosfatasa Cdc25 posterior al dany en el DNA provoca la fosforilació en Thr14/Tyr15 de Cdk2, fet que contribueix a la seva inactivació.

La resposta més lenta procedeix amb l'activació de p53. MDM2 (una de les dianes transcripcionals de p53) inhibeix la transcripció dependent de p53, trasllada aquesta fora del nucli i la direcciona a la proteòlisi regulada per ubiquitina/proteasoma. L'agressió a la integritat del DNA indueix l'activació de diferents proteïnes cinasa (ATM, ATR, DNA-PK, CHK1 i CHK2) que fosforilen residus en la regió N-terminal de p53, inhibint d'aquesta forma la unió de MDM2 a p53. Conseqüentment, la sobreactivació de p53 resulta en l'augment d'expressió de p21^{CIP/WAF} i la inhibició dels complexos ciclina-CDK2 (Chow et al, 2003). La cinasa mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), acomplexada i regulada al seu torn per Aurora cinasa B i survivin, és un element afegit de control de la transició G1-S, mitjançant la fosforilació dels seus substrats 4EBP1 i p70S6 cinasa (Song et al, 2007).

- b) **G2 checkpoint:** p21^{CIP/WAF} és suficient per a la inhibició dels complexos ciclina A/E- Cdk2 però no és la responsable de la inhibició dels complexos de

les ciclines mitòtiques A/B amb Cdk1. En presència de DNA danyat, aquests complexos són inhibits per fosforilació en Thr14/Tyr 15. ATM/ATR fosforilen i activen CHK1/CHK2 que al seu torn fosforilen Cdc25C. Aquest procés provoca directament l'augment en l'activitat fosfatasa de Cdc25C i en la destrucció de Cdc25A, fenòmens necessaris per prevenir l'entrada de cèl·lules danyades en mitosi (Blasina et al, 1999).

p53 es troba també implicada en el manteniment del *checkpoint* en G₂ a través de l'activació de la proteïna 14-3-3σ, la qual segresta el complex ciclina B-Cdk1 al citoplasma, i p21^{CIP/WAF} (Taylor & Stark, 2001). Cap d'aquestes dues evita l'entrada en mitosi però p21^{CIP/WAF} pot aturar el cicle en les cèl·lules tetraploides resultants (Andreassen et al, 2001).

- c) **Checkpoint mitòtic:** la transició metafase-anafase és un pas clau en el cicle cel·lular en el que la cèl·lula comença la separació de les cromàtides germanes i, per tant, la separació del material genètic prèviament duplicat. En metafase els cromosomes s'alineen i s'uneixen de forma biorientada al fus mitòtic. Només quan cada cromàtida es troba correctament associada als microtúbuls del fus a través del sistema proteic del cinetocor, s'activa la maquinària cel·lular que conduirà a la finalització del cicle. Es tracta d'un procés de "tot o res" que té lloc de forma simultània en totes les parelles de cromàtides. Errades en aquest procés condueixen a una distribució desigual del material genètic amb el guany o pèrdua d'informació conseqüent. Aquesta situació "catastròfica" per a l'estabilitat cel·lular ha fet evolucionar en les cèl·lules eucariotes un sistema de control conegut com *spindle checkpoint* (Millband et al, 2002).

Aquest sistema efectua 3 accions separades: 1) un sensor que monitoritza la presència de cromosomes no alineats o mal units al fus mitòtic. Ho aconsegueix detectant anomalies en les forces de tensió que es produeixen quan els microtúbuls del fus s'uneixen al cinetocor; 2) un sistema d'amplificació, el qual permet que el senyal generat per un sol sensor en un cromosoma sigui suficient per activar el sistema; i 3) un sistema efector capaç d'inhibir la progressió del cicle cel·lular per inhibició del complex APC/C (Sudakin et al, 2001). Existeixen diversos components del sistema que duen a terme aquestes accions:

- Proteïnes Mad (*Mitotic arrest deficient*): Mad1 regula l'entrada a nucli i la seva localització dins del complex del cinetocor de Mad2 (Ikui et al, 2002), una acció en la que també col·labora el motor microtubular CENP-E. Mad2, per la seva

banda, funciona com a sensor de tensió, i alhora, interacciona amb els components del complex APC/C (Wassmann & Benezra, 1998) inhibint la seva activitat ubiquitin ligasa (Sudakin et al, 2001).

- Proteïnes Bub (*Budding uninhibited by benzimidazole*): Bub3 té capacitat per unir-se a la major part de les proteïnes del complex i té una funció presumiblement adaptadora. Bub1 (o BubR1 en humans) no només promou l'acció del complex de control, sinó que també afavoreix la interacció entre microtúbuls i cinetocors (Lampson & Kapoor, 2005). Mitjançant un domini cinasa pot funcionar com un potent inhibidor *in vitro* de Cdc20, la subunitat activadora del complex APC/C (Tang et al, 2001).

Quan un dels cromosomes no es troba ben alineat a la placa metafàsica, Aurora B, en acció conjunta amb la resta dels components CPC, recluta les proteïnes Mad i Bub (apartat 5.4.1, orientació i cohesió cromosòmiques, control del *spindle checkpoint*), les quals inhibeixen l'acció del complex APC/C. L'activitat d'aquest complex és imprescindible per a la progressió del cicle (apartat 5.4.2, ubiquitinació i complex APC/C).

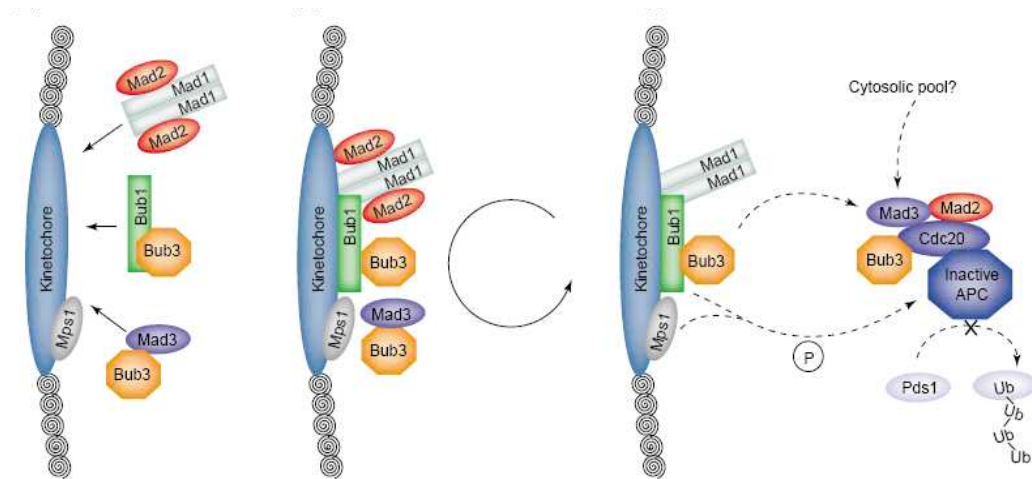


Fig 12. Representació dels components del complex *mitotic checkpoint* i el seu mode d'activació: a) reclutament al cinetocor; b) reorganització i *turnover* d'alguns dels components; c) inhibició de la transició metafase-anafase per acció directa sobre el complex APC/C-Cdc20.

