

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	18
SUMMARY	20
RESUM	22
1 INTRODUCCIÓN	24
1.1 Terapia Celular	26
1.2 Células madre.....	27
1.2.1 Clasificación de las células madre.....	29
1.2.1.1 Clasificación de las células madre en función de su origen.....	29
1.2.1.2 Clasificación de células madre en función de su potencialidad.....	30
1.2.2 Células estromales mesenquimales (MSCs).....	31
1.2.2.1 Caracterización biológica.....	32
1.2.2.2 Fuentes de aislamiento de MSCs.....	35
1.2.2.3 Ensayos clínicos con MSCs.....	35
1.3 La hipoxia como inductora de respuesta de los sistemas biológicos.....	36
1.3.1 Respuesta a la hipoxia.....	37
1.3.2 HIF-1 y otros miembros de la superfamilia de HIF.....	39
1.3.3 Activación de la vía HIF-1	41
1.4 Vía de señalización Notch, componentes y activación.	43
1.4.1 Activación de la vía de Notch.....	43
1.4.2 Receptores y ligandos de la vía de Notch.....	44
1.4.2.1 Receptores de la familia Notch.....	44
1.4.2.2 Ligandos de la vía Notch.....	¡Error!
Marcador no definido.	46
1.4.3 Interacción receptor-ligando.....	48
1.5 La proteína SUMO (<i>Small-Ubiquitin related Modifier</i>) implicaciones biológicas y proceso de conjugación.	49
1.5.1 Vía de conjugación de SUMO a proteínas diana.....	50
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
2.1 HIPÓTESIS.....	55
2.2 OBJETIVOS.....	56
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	58

3.1	Modelos celulares.....	60
3.1.1	Líneas celulares procariotas.....	60
3.1.1.1	Medios de cultivo procariota.....	60
3.1.2	Líneas celulares eucariotas.....	60
3.1.2.1	Medios de cultivo eucariota.....	61
3.2	Métodos de Genética Molecular.....	61
3.2.1	Transformación bacteriana y obtención del plásmido purificado.....	61
3.2.2	Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	62
3.2.3	Inhibición química de la SUMOilación y detección de los sitios de unión de SUMO	62
3.2.4	Generación de mutantes de NIICD.....	63
3.2.5	Digestiones enzimáticas.....	65
3.2.6	Transducción lentiviral.....	66
3.2.6.1	Transducción de MSCs con los vectores lentivirales.....	66
3.2.6.2	Infección de HEK 293T con los vectores lentivirales.....	68
3.3	Métodos de Biología Molecular.....	68
3.3.1	Extracción de ARN y cuantificación.....	68
3.3.2	Generación de ADN copia por retrotranscripción.....	69
3.3.3	Cuantificación relativa de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real ¡Error! Marcador no definido.	69
3.4	Métodos Bioquímicos.....	70
3.4.1	Extracción proteica.....	70
3.4.2	Cuantificación proteica.....	71
3.4.3	Preparación de las muestras para electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.....	72
3.4.4	<i>Western blot</i>	72
3.4.4.1	Electroforesis desnaturizante y reductora.....	72
3.4.4.2	Transferencia húmeda.....	¡Error! Marcador no definido.
3.4.4.3	Bloqueo de membrana, incubación con anticuerpos y revelado....	75
3.4.4.4	Anticuerpos utilizados en los <i>Western Blots</i>	76
3.4.5	Inmunoprecipitación.....	76
3.5	Métodos de Biología Celular.....	77
3.5.1	Fraccionamiento celular.....	77
3.5.2	Inmunofluorescencia.....	78
3.5.2.1	Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias.....	79
3.5.2.2	Obtención y análisis de las imágenes.....	79

3.5.3	Cuantificación de la translocación nuclear de N1ICD mediante ensayo de InCell ¡Error! Marcador no definido.	80
3.5.4	Ensayo de proliferación por incorporación de bromodesoxiuridina.....	80
3.5.5	Activación/Inhibición de la vía de Notch.....	81
3.6	Métodos funcionales.....	82
3.6.1	Ensayo de cicatrización <i>in vitro</i>	82
3.6.2	Ensayo de migración mediante cestillo.....	82
3.7	Análisis estadísticos.....	83
4	RESULTADOS.....	¡Error!
	Marcador no definido.	4
4.1	La sobreexpresión de HIF-1 α induce cambios en la expresión génica y proteica de las MSCs ¡Error! Marcador no definido.....	86
4.2	La sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs potencia la vía de señalización Notch ..	88
4.3	HIF-1 α incrementa la expresión de ligandos funcionales de la vía de Notch en MSCs ¡Error! Marcador no definido.....	89
4.4	Implicación de Notch en la migración de las células MSCs con expresión estable de HIF-1 α	91
4.5	La proliferación mediada por HIF-1 α de las MSCs es independiente de la vía de Notch ¡Error! Marcador no definido.....	93
4.6	La proliferación de MSCs mediada por HIF-1 α es dependiente de SUMO....	94
4.7	Las vías de señalización de HIF-1 α y Notch están relacionadas a través de la SUMOilación	95
4.8	SUMO1 modifica postraduccionalmente a N1ICD.....	97
4.9	La SUMOilación de N1ICD aumenta su translocación al núcleo en células MSCs. ¡Error! Marcador no definido.....	98
4.10	La SUMOilación inducida por HIF-1 α media la migración de las MSCs a través de Notch1	100
4.11	La SUMOilación de N1ICD en células HEK 293T aumenta en condiciones de hipoxia ¡Error! Marcador no definido.....	101
4.12	Las mutaciones puntuales en los sitios de SUMOilación de N1ICD, modifican su localización subcelular y modulan su actividad transcripcional en las células HEK 293T	105
4.13	La mutación K2150P-N1ICD inhibe la translocación de N1ICD al núcleo en células MSCs.	110
5	DISCUSIÓN.....	116

5.1	Modulación de la vía de Notch en MSCs en presencia o ausencia de HIF-1 α	118
5.2	Respuesta molecular y celular de los mutantes K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD. ¡Error! Marcador no definido.....	122
5.3	Respuesta molecular y celular del mutante K2150P_N1ICD.	124
5.4	Papel dual de la SUMOilación de N1ICD en las MSCs y modulación de sus propiedades migratorias y proliferativas.....	126
6	CONCLUSIONES.....	129
	ANEXO	132
	BIBLIOGRAFÍA	134