



Estudi del paper de l'annexina 6
en el transport intracel·lular.
Implicació en la transducció del
senyal.

Tesi presentada per Mónica Pons i Pons per
optar al grau de Doctor en Biologia.

Barcelona, abril de 2001

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Carles Enrich i Bastús al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina.

Universitat de Barcelona

Barcelona, abril de 2001

Al Torben

"...que el pensamiento no puede tomar
asiento
que el pensamiento es estar siempre
de paso..."

Luis Eduardo Aute

Agrai- ments

Al Carles Enrich, li agraeixo aquesta habilitat que té de fer tan fàcil tenir un jefe. També no m'oblido de la confiança que va dipositar en una estudiant sense nota.

A l'Oriol Bachs, que com a cap d'aquesta gran família, ha aconseguit implantar un ambient d'harmonia en el laboratori.

A la Neus Agell, mama de la família, per ser comprensiva i tolerant amb tots els nens que hem passat i passarem per aquí.

A les *Marujes*, Noemí Andrés, Anna Bosch, Maria Calvo i Sandra Peiró, a les quals les felicito per les interessants conversacions científiques i no tan científiques que han enriquit tan aquesta tesi així com una relació que espero perduri.

Al Siscu, fill responsable de la família, li agraeixo sincerament el seu caràcter servicial i la seva predisposició a implicar-se en tot tema que passi davant dels seus nasos. Al Josep M^a, pel seu caràcter emprenedor i pels seus rapidíssims però efectius consells (no sé quin paper donar-te en la família, et va bé tiet?). I la Carme, la cangur del lab, que sempre manté ordenades i a punt les joguines de la prole.

Als nens, un laboratori molt compenetrat i exemplar. Gràcies Anna Belén per la teva paciència, Oriolet i Roger per les vostres idees ingenioses, Priam pels teus protocols telefònics, Aina per mantenir la nevera al dia, Sonia per fer moure el cul a qualsevol, Maribel Jota per la teva energia que desprens, Maribel Esse per les teves conviccions altruistes i finalment Nuria per la teva serenitat. També als recent vinguts, Iñaki, Manolo, Anna, Cristina i Marta, espero que compartiu les joguines com a bons germans. Y gracias Ingi por darnos una lección de cómo aprender rápidamente un idioma y estar siempre de buen humor.

Als que ja han trencat el cordó umbilical i triomfen per les Austràlies, Albert i Montse, pel món de la microscòpia electrònica, Marta Te, per no sé on, Marta Bosch i per les Mallorques, Vicenç.

També agraeixo a l'Eulalia la seva ajuda en la microinjecció i en tot el que estés en les seves mans. A la Xus li agraeixo la seva espontaneïtat i a la Rosa la seva seguretat, dos coses de les que es pot aprendre. I per aprendre, la bondad de l'Elisenda és un gran exemple a seguir.

A les secres, la Núria i la Carme, gràcies per suportar els crits dels nens de baix, i per trametre tantes i tantes comandes.

No m'oblido de tota la penya d'histologia, que de crits també n'han de suportar. Gràcies per la vostra col·laboració, especialment Ferran i Anna.

Un agraïment especial pel Dr. Stefan Jäckle, gràcies al suport econòmic del qual i al suport tècnic del seu equip, Thomas Grewal, Walter i Dennis, van fer realitat la meitat d'aquesta tesi.

A n'en Tóbal i n'Eugenia, mon pare i mo mare. Gràcies per sa vostra ajuda i per haver-me deixat estudiar a Barcelona. Sense sa vostra llibertat i tolerància no hauria arribat aquí.

Gràcies Uwe i Elle, la seva comprensió i generositat són infinites. Vielen Dank.

I finalment al Torben, per ser simplement el millor i més fidel col·laborador.

Índex

ÍNDEX	i
ABREVIATURES	vii
I. INTRODUCCIÓ	
I.1. Les annexines.....	1
I.1.1. Els seus orígens.....	1
I.1.2. Els membres de la família de les annexines.....	1
I.1.3. La seva estructura.....	3
I.1.4. Localització intracel·lular de les annexines.....	5
I.1.5. Característiques bioquímiques i funcionals de les annexines...8	
I.1.5.1. Capacitat d'unió a fosfolípids.....	8
I.1.5.2. Inhibició de la fosfolipasa A ₂	9
I.1.5.3. Agregació de vesícules.....	10
I.1.5.4. Les annexines com a canals d'ions.....	11
I.1.5.5. Creixement cel·lular i diferenciació.....	12
I.1.5.6. Les annexines en l'exocitosi.....	13
I.1.5.7. Les annexines en l'endocitosi.....	15
I.1.5.8. Les annexines en l'organització de membranes.....	16
I.1.5.9. Fosforilació de les annexines.....	18
I.1.6. Proteïnes que interaccionen amb les annexines.....	20
I.1.7. Les annexines en les enfermetats i mort cel·lular.....	22
I.2. Annexin 6.....	26

I.2.1.	Diferents localitzacions.....	27
I.2.2.	Funcions de l'Anx6.....	30
I.2.2.1.	Implicació de l'annexin 6 en la proliferació cel·lular.....	30
I.2.2.2.	L'annexin 6 i el Ca ²⁺ lliure intracel·lular.....	31
I.2.2.3.	L'anx6 en el transport intracel·lular.....	32
I.2.2.4.	L'annexin 6 com a element estructural del citoesquelet.....	33
I.2.2.5.	L'anx6 i l'espectrina.....	35
I.2.3.	L'annexina 6 en la transducció de senyal.....	38
I.2.3.1.	Paper de l'endocitosi en la transducció de senyal.....	41
I.2.3.3.	L'anx6 en la via de senyalització.....	43
OBJECTIUS.....		49
 II. MATERIALS I MÈTODES		
II.1.	Cultiu cel·lular.....	53
II.1.1.	Manteniment de NRKs.....	53
II.1.2.	Manteniment de CHOs.....	53
II.1.3.	Congelació i descongelació de cèl·lules.....	54
II.2.	Condicions experimentals de diferents tractaments.....	54
II.2.1.	Marcadors d'endocitosi.....	55

II.2.1.1.	Dextrà-FITC/Texas Red.....	55
II.2.1.2.	Transferrin-FITC.....	55
II.2.1.4.	¹²⁵ I-LDL.....	55
II.2.2.	Drogues	55
II.2.2.1.	w13.....	55
II.2.2.2.	w12.....	56
II.2.2.3.	Chloroquine.....	56
II.2.2.4.	BFA.....	56
II.2.2.5.	BAPTA.....	56
II.2.2.6.	Wortmannin.....	56
II.2.2.7.	Cytochalasin D.....	56
II.2.2.8.	Latrunculin A.....	56
II.2.2.9.	Nocodazol.....	56
II.2.2.10.	ALLN.....	56
II.2.3.	Processament dels experiments de senyalització.....	56
II.2.3.1.	Deprivació de sèrum de les cèl·lules.....	56
II.2.3.2.	EGF.....	56
II.2.3.3.	TPA.....	56
II.2.3.4.	Lisi cel·lular.....	56
II.3.	Immunocitoquímica.....	57
II.4.	Microscopia electrònica.....	59
II.4.1.	Mostres en reïna Lowicryl.....	59
II.4.2.	Mostres en crioseccions.....	59

II.4.3. Anticossos utilitzats per immunocitoquímica en aquest treball.....	61
II.5. Fraccionament cel·lular.....	62
II.5.1. NRKs.....	62
II.5.2. CHOs.....	63
II.6. Quantificació de proteïnes.....	63
II.7. Immunoprecipitacions.....	64
II.8. SDS-PAGE.....	65
II.9. Western-blotting.....	68
II.10. Preparació de LDL des de plasma humà.....	69
II.11. Marcatge de LDL	71
II.11.1. Dil-LDL.....	71
II.11.2. ¹²⁵ I-LDL.....	72
II.12. Assaig de degradació de LDL.....	73
II.13. Microinjecció de cDNAs en el nucli de NRKs.....	73
II.14. Proteïna de fusió GST-Anx6.....	74
II.14.1. Construcció de GST-Anx6.....	74
II.14.2. Expressió i purificació de GST-Anx6.....	74
II.15. Producció d'anticossos contra GST-Anx6.....	76
II.15.1. Immunització del cunill.....	76
II.15.2. Purificació per afinitat de α -GST-Anx6.....	77
II.16. Experiments de pull down amb GST-Anx6 i GST-Anx6 ₁₋₁₇₅	79
II.17. Assaig d'unió de Ras-GTP a RBD.....	80

II.18. Assaig kinasa de Raf.....	80
----------------------------------	----

III. RESULTATS

III.1. Late Endocytic Compartments Are Major Sites of Annexin VI Localization in NRK Fibroblasts and Polarized WIF-B Hepatoma Cells.....	85
III.1.1. Abstract.....	85
III.1.2. Introduction.....	85
III.1.3. Results.....	88
III.1.4. Discussion.....	106
III.1.5. Resum capítol 1.....	113
III.2. Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes.....	115
III.2.1. Abstract.....	115
III.2.2. Introduction.....	115
III.2.3. Results.....	118
III.2.4. Discussion.....	127
III.2.5. Resum capítol 2.....	131
III.3. Activation of Raf-1 and Ras is defective in annexin 6 overexpressing Chinese hamster ovary cells.....	133
III.3.1. Abstract.....	133
III.3.2. Introduction.....	133
III.3.3. Results and discussion.....	135
III.3.4. Resum capítol 3.....	143

IV. DISCUSIÓ

IV.1. L'anx6 al final de la via endocítica en NRKs.....	147
IV.2. Possible paper de l'annexina 6 en els pre-lisosomes.....	149
IV.2.1. Associació d'anx6 amb spectrina en els pre-lisosomes.....	150
IV.2.2. Implicació de l'annexin 6 en la inhibició de la degradació de LDL.....	151
IV.3. Implicació de l'annexina 6 en la transducció de senyal	153
IV.3.1. Annexin 6 s'uneix a Raf-1.....	154
IV.3.2. L'activitat Raf-1 és bloquejada per l'expressió d'annexina 6.....	155
IV.3.3. L'annexina 6 inhibeix l'activació de Ras.....	157
IV.4. Possibles papers de l'annexina 6 en la transducció de senyal.....	158
IV.5. Les annexines com a organitzadors de membrana.....	159
IV.6. Relevància de l'expressió d'annexin 6.....	160
CONCLUSIONS.....	167
BIBLIOGRAFIA.....	171
RELACIÓ DE PUBLICACIONS OBTINGUDES DURANT LA REALITZACIÓ D'AQUESTA TESI DOCTORAL.....	201

ABREVIATURES

β 2A-R	β -2-adrenergic receptor.
ALLN	N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO
Anx	Annexina
AP	Clathrin adaptor protein.
ASGP-R	Asialoglycoprotein receptor.
BFA	Brefeldin A
BHK	Baby hamster kidney
CamKII	Calmodulin Kinase II
CCV	Clathrin coated vesicles
CEF	Caveolae enriched fraction.
COS	Monkey kidney, SV40 transformed
CURL	Compartment of uncoupling receptors and ligands.
ECL	Enhanced chemiluminescence.
ECV	Endocytic carrier vesicle.
EGF	Epidermal growth factor.
EGF-R	Epidermal growth factor receptor.
G α	α subunit of G proteins.
GAP	GTPase-activating protein.
GEF	Guanine nucleotide exchange factor.
GFAP	Glyal fibrillar acid protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins
GRB2	Growth factor receptor binding protein 2.
GST	Gluthatione-S Transferase
IP	Inositolphosphate.
LDL	Low-density lipoprotein.
LDLR	Low-density lipoprotein receptor.
Lgp120	Lysosomal integral membrane protein.

M6P-R	Mannose 6-fosphate receptor.
MAP	Microtubule associated protein.
MBP	Myelin basic protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney.
Mek	MAPK/ERK kinase.
MVB	Multivesicular body.
NGF	Neural Growth factor
NRK	Normal rat kidney.
PC	Phosphatidylcholine
PDGF	Platelet derived growth factor.
PG	Phosphatidylglycerol
pIgA	Polymeric immunoglobulin A.
pIgR	Polymeric immunoglobulin receptor.
PKC	Protein kinase C.
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PS	Phosphatidylserine
RRC	Receptor recycling compartment.
RTK	Receptor tyrosine kinase
SH3	Src homology 3
SOS	The mammalian homologue of SON OF SEVENLESS.
TGF	Tumoral growth factor
TGN	Trans-Golgi Network.
TPA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Tf	Transferrin.
Tf-R	Transferrin receptor.

I.

Introducció

I.1. LES ANNEXINES

I.1.1. Els seus orígens

En els primers anys aquestes proteïnes eren conegudes com a la família de les lipocortines o calpactines però ja en l'any 1990 es va elaborar una nova nomenclatura basant-se en l'homologia de la seqüència d'aminoàcids i la seva característica principal que és la capacitat d'unir diferents tipus de membranes mitjançant l'afinitat que tenen aquestes proteïnes preferentment pels fosfolípids acídics amb dependència de calci: **ANNEXINES** (Crompton et al., 1988). Les primeres indicacions de l'existència d'aquest grup de proteïnes van sorgir de laboratoris independents que descrivien la seva associació a membranes cel·lulars dependentment de calci en B-limfòcits (Michaely et al., 1999), vesícules sinàptiques (Sudhof et al., 1984), fetge i intestí (Shadle et al., 1985), múscul llis (Raeymaekers et al., 1985), placenta (Edwards and Booth, 1987) i cèl·lules cromafíniques (Creutz et al., 1987).

I.1.2. Els membres de la família de les annexines

Les annexines són una família de proteïnes descobertes molt recentment motiu que explica l'escassa informació que es té a l'abast. Al llarg d'aquests anys d'estudi s'ha pogut comprovar la seva elevada conservació en l'evolució trobant-les en plantes

superiors, floridura, metazous, insectes, ocells i mamífers. Únicament en llevats no se n'ha pogut identificar cap homòleg. Les annexines són unes proteïnes en general abundants representant el 0.5 % de la proteïna cel·lular.

Almenys 13 components s'han descrit sobretot en mamífers a excepció d'anx12 descoberta en Hidra i l'anx9 i 10 expresades només en *Drosophila melanogaster*.

	Pm	pI	Ca²⁺
Annexina 1	38	7.2	>0.1 mM
Annexina 2	36	7.4	1-100 µM
Annexina 3	34	5.9	
Annexina 4	33-36	5.9	>0.1 mM
Annexina 5	35	4.8	
Annexina 6	68	5.9	1-100 µM
Annexina 7	50		
Annexina 8	33-36	5.4	
Annexina 9	34		
Annexina 10	37		
Annexina 11	58		
Annexina 12	35		
Annexina 13	35		

Taula 1. Característiques físico-químiques de les annexines més conegudes

I.1.3. La seva estructura

La confirmació definitiva d'haver trobat una família de proteïnes va ser, a part de les seves propietats bioquímiques i immunològiques comuns, la seva homologia de les seqüències d'aproximadament del 50% a nivell tan de nucleòtids com d'aminoàcids. A més a més, presentaven una estructura interna compresa per 4 repeticions altament conservades, cadascuna d'aproximadament 70 aminoàcids i precedides per una regió variable de 7 a 40 aminoàcids. L'extrem N-terminal es caracteritza per la seva heterogeneïtat en composició i llargada mentre que els llocs d'unió al calci i fosfolípids es troben en les parts conservades (repeticions) de l'extrem C-terminal.

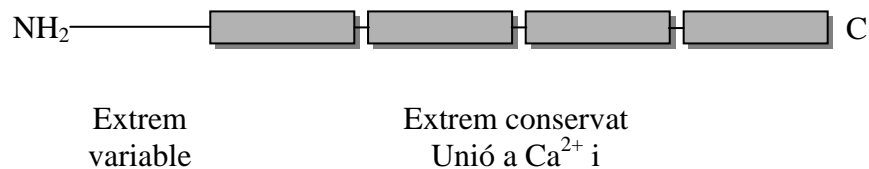


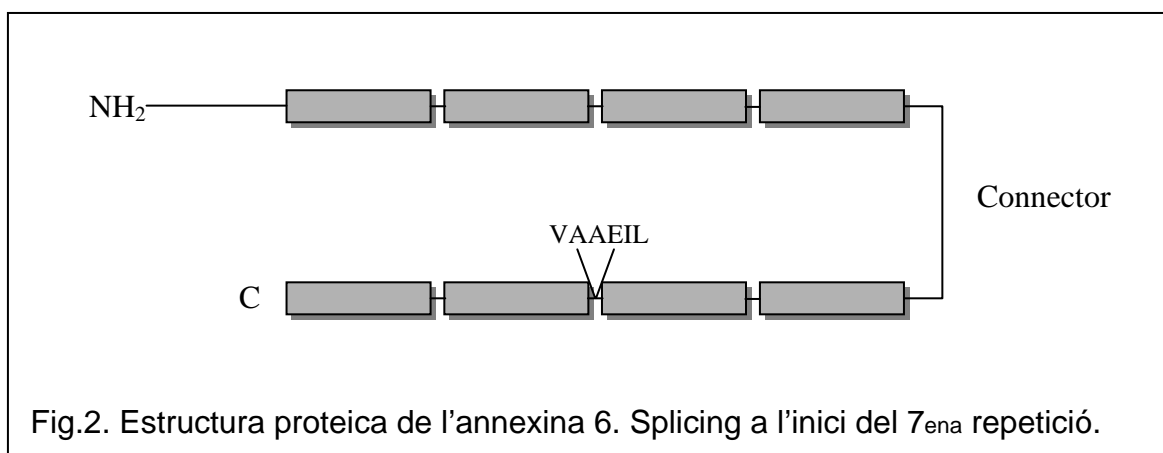
Fig. 1. Estructura proteica de les annexines.

La seqüència d'aminoàcids també ens va revelar curiosament l'absència d'estructures "EF-hand", conegudes per ser responsable de les propietats d'unió del calci en la calmodulina. Malgrat tot, una Ca^{2+} -binding protein descrita per Lin et al. (Lin and Collins, 1992) contenia l'estructura "EF-hand" de la calmodulina i 17 aminoàcids d'unicó a Ca^{2+} (Moss and Crumpton, 1990), la qual compartia un 50 % d'homologia amb una seqüència consens de les annexines (Geisow, 1986). Això ens

fa sospitar sobre la possibilitat de que la família de les annexines i les proteïnes EF-hand podrien compartir un ancestre comú.

De totes les annexines descobertes fins ara totes presenten el model de les 4 repeticions exceptuant l'annexina 6 en quan presenta 8 repeticions internes. La regió que uneix la 4^a i 5^a repetició és significativament més llarga que qualsevol de les altres seqüències connectores i essencialment divideix la proteïna en dos meitats, que alineades comparteixen un 50% d'identitat. Per tant, parlant en termes d'evolució, sembla ser que annexina 6 prové de la duplicació del gen que codificava una proteïna amb 4 repeticions. Encara que les annexines 1, 2, 4 i 5 no codifiquin directament un polipèptid de 8 repeticions, s'ha demostrat que existeixen en formes dimèriques, el que crea estructures similars a 8 repeticions. La dimerització pot ser una propietat important de les annexines, proporcionant grans complexos per formar ponts entre vesícules i membranes o acoplaments citoesquelet -membranes (Nakata et al., 1990).

Una segona característica especial de l'annexina 6 és la generació de dos formes degut a un processament alternatiu. Aquestes 2 formes difereixen en un hexapèptid situat a prop de l'inici de la 7^a repetició interna. Aquest fet explica la presència d'un doblet en gels d'electroforesi desnaturalitzat.



Anàlisis de l'estructura cristalitzada descriuen uns plegaments homòlegs per totes les annexines molt característics. El nucli de les annexines, normalment de 300 residus de llargada, té la forma d'un disc compacte lleugerament corbat amb les 4 repeticions formant 4 dominis. Aquests estan organitzats cíclicament segons les repeticions 1 i 4, i 2 i 3, construint uns mòduls hermètics estabilitzats per interaccions hidrofòbiques. El centre de la molècula, separant els mòduls 1/4 i 2/3, és un porus hidrofílic proposat per representar una via de conductància d'ions. En la molècula plegada cada repetició compren 5 hèlix α les quals estàn connectades per loops curts on es troben els llocs d'acoblament del Ca^{2+} .

Mentre que les estructures principals comuns i les propietats bioquímiques de les annexines resideixen en el domini conservat de la proteïna, les funcions específiques de cada annexina es confereix a través del domini N-terminal (cap). La seva seqüència és altament variable i les annexines que tenen el cap curt, aquest podria estar implicat en la regulació de la conductància d'ions a través del porus hidrofílic central (Favierperron A 1996). Les que tenen el cap llarg s'ha demostrat que a través d'interaccions intramoleculares afecta als llocs d'unió a Ca^{2+} i fosfolípids disminuint la seva afinitat (Powell and Glenney, 1987), (Ando et al., 1989), (Liu et al., 1995). Anx7 difereix de les altres annexines de 4 repeticions en presentar en l'extrem N-terminal una llarga cua hidrofòbica de 167 aminoàcids.

I.1.4. Localització intracel·lular de les annexines

La localització específica de les diferents annexines està obstaculitzada per la utilització de diferents tipus cel·lulars, mètodes de fixació i anticossos utilitzats en un número molt elevat d'estudis immunocitoquímics.

L'anx1 sembla que resideix en la membrana plasmàtica i en membranes de certes estructures endocítiques i fagocítiques. Els últims són particularment evidents en macròfags on anx1 està localitzada en endosomes primerencs i membranes de fagosomes (Diakonova et al., 1997), mentre que en cèl·lules NIH 3T3 que sobreexpressen el receptor d'EGF, anx1 es troba en endosomes multivesiculars (Futter et al., 1993).

L'anx2 és generalment un constituent del citoesquelet que recobreix la membrana però també s'ha identificat en endosomes primerencs (Emans et al., 1993) (Harder et al., 1997) (Diakonova et al., 1997). En cèl·lules polaritzades l'anx2 apareix concentrada en la membrana apical (Gerke and Weber, 1984). En els endosomes primerencs, anx2 apareix concentrada en regions que tenen material filamentós associat, indicant un paper organitzador de membranes de l'anx2, possiblement unint certs dominis membranosos amb el citoesquelet (Harder et al., 1997). A més a més, anx2 està present també en vesícules de la ruta del transport de secreció formant connexions físiques o ponts entre la membrana plasmàtica i la membrana de les vesícules secretores respectives (Nakata et al., 1990) (Senda et al., 1994). Finalment, anx2 també ha estat identificada en fagosomes de macròfags J774 (Desjardins et al., 1994). Cultius amb medi amb poc Ca^{2+} porta a la translocació d'anx2 de la membrana plasmàtica al citoplasma (Harder and Gerke, 1993) (Vaaraniemi et al., 1994). La fosforilació en residus del domini N-terminal podria ser una altre senyal involucrada en la regulació d'interaccions d'anx2-membrana, ja que un polipèptid corresponent a aquest domini interfereix en la translocació ja esmentada (Chasserot-Golaz et al., 1996) i la fosforilació de la Ser-11 per PKC interfereix en la unió de p11, la qual és indispensable per l'ancoratge d'anx2 en el citoesquelet submembranós.

La distribució subcel·lular d'anx3 es troba en la membrana plasmàtica i sobre les membranes de grànuls intracel·lulars i fagosomes (Le, V and Maridonneau-Parini, 1994). Com ja s'ha observat per l'anx1, després de la fagocitosi i de l'estimulació de

les cèl·lules amb ésters de forbol, anx3 es transloca cap a la membrana plasmàtica i dels fagosomes (Ernst, 1991) (Le, V and Maridonneau-Parini, 1994).

L'anx4 es troba associada principalment amb la membrana plasmàtica i en cèl·lules polaritzades s'ha trobat enriquida en la membrana plasmàtica basolateral o apical segons el tipus de teixit (Massey et al., 1991) (Kojima et al., 1994). A més a més del pool localitzat a la membrana plasmàtica, anx4 s'ha identificat també associada a endosomes de macròfags i BHKs (Diakonova et al., 1997), i endosomes d'hepatòcits (Pol, Ortega, et al. 1997 ID: 40).

L'anx5 és un altre membre de la família que ha estat identificada en la membrana plasmàtica i en membranes endocítiques en diferents models cel·lulars (Spreca et al., 1992). En alguns tipus cel·lulars també s'ha trobat associada amb el reticle endoplàsmic i sarcoplàsmic (Giambanco et al., 1993). Com ja es va observar per altres annexines, certs estímuls provoquen la translocació d'anx5 citosòlica a membranes.

Respecta a la localització intracel·lular de l'anx6 és més polèmica. Mentre que ha estat localitzada en la membrana plasmàtica en diferents tipus cel·lulars com ara limfòcits (Owens and Crumpton, 1984) i hepatòcits (Weinman et al., 1994) (Tagoe et al., 1994), també s'ha trobat codistribuït amb mitocondris de fetge (Rainteau et al., 1995), reticle sarcoplàsmic (Hazarika et al., 1991a), fagosomes (Desjardins et al., 1994) i membranes endosomals de fetge (Jackle et al., 1994). S'ha observat també una associació independent de Ca^{2+} d'anx6 amb membranes aïllades de cèl·lules BHK, però no es va trobar cap enriquiment en compartiments específics (Seemann et al., 1996). Totes aquestes dades ens suggereixen que anx6 pot actuar en diferents membranes i que aquestes interaccions són regulades de forma diferent en diferents tipus de cèl·lules.

Mentre que anx7 s'ha trobat en el citosol en l'àrea granular de cèl·lules chromaffin (Kuijpers et al., 1992), en cèl·lules musculars s'ha localitzat en la membrana plasmàtica i en els túbuls transversals de muscle estriat (Selbert et al., 1995).

Curiosament, anx 11 s'ha localitzat en el nucli i aquesta localització depèn de la presència d'un domini N-terminal llarg (Mizutani et al., 1992).

L'anx13 es troba particularment enriquida en la cara apical de diferents enteròcits encara que també se n'ha trobat associada amb membranes basolaterals (Wice and Gordon, 1992). Una variant d'aquesta proteïna anomenada anx13b que conté una seqüència de 41 aminoàcids insertat en el domini N-terminal, va ser identificada com un component de vesícules apicals exocítiques de MDCK (Fiedler et al., 1995).

I.1.5. Característiques bioquímiques i funcionals de les annexines

I.1.5.1. Capacitat d'unió a fosfolípids

S'ha demostrat l'habilitat de diferents annexines d'unir-se a estructures del citoesquelet depenent de Ca^{2+} , basant-se en la seva insolubilitat al detergent i la seva posterior elució amb agents quelants com l'EGTA. En general la presència de fosfolípids augmenta l'afinitat de les annexines per la unió de Ca^{2+} , en alguns casos amb més de 1000 vegades. De la mateixa manera, el número de llocs d'unió a Ca^{2+} detectats incrementa amb la presència de fosfolípids, proporcionant-nos indicacions d'un lloc d'unió comú pel Ca^{2+} i fosfolípids (Schnapp and Reese, 1989). Les annexines s'uneixen a un extens rang de fosfolípids a nivells milimolars de Ca^{2+} , amb l'excepció de fosfatidilcolina i esfingomielina, els quals tenen un grup fosforilcolina. La naturalesa del grup acil no és important per la unió si no el cap polar

que és on s'hi uniren les annexines. En concret, l'anx6 i la 4 no s'uneixen a fosfatidilinositol bi-fosfat però sí a l'àcid araquidònic, àcid olèic i a l'àcid palmític en presència de Ca^{2+} (Lin et al., 1993).

I.1.5.2. Inhibició de la fosfolipasa A₂

La PLA₂ té la funció d'eliminar l'àcid araquidònic de fosfolípids. Els glucocorticoides inhibeixen aquesta funció de la PLA₂ provocant un efecte antiinflamatori. Així doncs, la inhibició de la PLA₂ impedeix la síntesi de precursors de la prostaglandina i com a conseqüència es desencadenen accions antiinflamatòries mediatades per l'activitat de glucocorticoides. En els sobrenedants de cèl·lules d'animals estimulades amb glucocorticoides es van clonar i seqüenciar l'anx1 i 2 (Flower, 1988) (Bandorowicz-Pikula and Pikula, 1998). Més tard es van trobar altres membres de la família que inhibien la PLA₂ i estaven involucrades en respostes antiinflamatòries. L'activitat PLA₂ és inhibida sobretot per anx1 i el complexe anx2, i de manera més dèbil per l'anx5, mentre que la inhibició per anx2 i anx3 era negligible (Kim et al., 2001). Cèl·lules transfectades establenent amb l'antisense de l'anx1 mostraven una activitat PLA₂ més elevada que en les transfectades amb el sense (Solito et al., 1998). Per una altra banda, es va demostrar que l'anx6 activava PLA₂, activant preferencialment l'eliminació d'àcids grassos poliinsaturats necessaris per la fusió de membranes (Koumanov et al., 1997).

L'habilitat d'aquestes proteïnes d'inhibir PLA₂ s'atribueix principalment a les seves propietats comuns d'unir fosfolípids dependent de Ca^{2+} impedit així que la PLA₂ pugui eliminar-los i formar metabòlits d'àcid araquidònic. Per una altra banda, malgrat la incapacitat de les annexines d'unir fosfatidilcolina, la inhibició de la PLA₂ va tenir lloc quan van ser usats com a substrat PC-liposomes.

L'assignació de les annexines com inhibidors in vivo de la PLA₂ ha estat contradita per diverses raons: primerament, diferents estudis demostren que l'expressió d'anx1

és induïda per glucocorticoids encara que altres autors ho contradueixen. Segon, l'activitat antiinflamatoria depèn de la presentació extracel·lular de les annexines i només hi ha evidències per les anx1 i 5 les quals es troben a nivells considerables en el fluid extracel·lular (Christmas et al., 1991) i per l'anx6 trobada en la bilis (Thorin et al., 1995). Finalment, el descobriment d'annexines en eucariotes inferiors fa difícil entendre aquest paper en la inhibició de la PLA₂. La possibilitat, però, de que certes proteïnes de la família de les annexines puguin inhibir la PLA₂ mitjançant interaccions amb molècules de la transducció del senyal, és encara factible.

I.1.5.3. Agregació de vesícules

El mecanisme molecular referent a l'agregació de vesícules encara no s'ha entès completament. Les annexines interaccionen amb membranes de grànuls de secreció i tenen la capacitat d'agregar aquests grànuls o liposomes en presència de calci (Sudhof et al., 1984) (Creutz et al., 1987).

La funció més significativa la té l'anx1 la qual estimula l'agregació de grànuls de secreció i alhora la seva fusió en presència d'àcid araquidònic a nivells de calci fisiològics (Drust and Creutz, 1988). Es pensa que cada polipèptid de les annexines conté 2 llocs d'unió a lípids separats espacialment, i això ha estat comprovat per l'anx1, però de cada vegada hi han més evidències que l'agregació de vesícules a través d'annexines requereix l'auto-associació de dos molècules d'annexina unides a dos membranes separades. Més tard es va demostrar que el domini responsable per l'agregació de vesícules eren els 8 residus de l'extrem amino-terminal de l'anx1 que precedeixen la primera repetició (Ernst et al., 1991).

Tanmateix aquest argument és diferent en el cas de les annexines 2 i 6, les quals contenen dos llocs de unió a lípids físicament diferents. Això és el resultat de la duplicació de la ja esmentada principal unitat de l'annexina (Anx6) i de l'auto-associació d'anx2 via dos molècules d'un lligand (anx2_{2p112}). L'anx2 té un

requeriment molt baix de Ca^{2+} per associar-se a membranes fisiològiques i l'heterotetràmer podia, a una concentració d'1 μM de Ca^{2+} lliure i petites quantitats d'àcid araquidònic, agregar grànuls cromafínics i fusionar-los (Drust and Creutz, 1988). En aquest context és interessant que anx6 purificada inhibeix l'agregació de grànuls de chromaffin mediada per anx2-p11 (Pollard and Scott, 1982) (Creutz et al., 1992)

L'agregació de vesícules mediada per annexines sembla ser un requisit per la fusió de membranes, però s'ha demostrat que la taxa de fusió en presència de molècules d'annexina és molt baixa indicant que les annexines no són proteïnes fusogèniques per si mateix. Curiosament quan s'afegeixen al sistema àcids grassos cis-no saturats, s'incrementa notablement la taxa de fusió amb l'anx1 però s'inhibeix amb l'anx5.

També es va trobar que anx7 interacciona amb la proteïna sorcina formant un complex. Anx7 reclutava sorcin a les membranes dels grànuls cromafínics dependentment de Ca^{2+} (Brownawell and Creutz, 1997).

Totes aquestes dades ens mostren que , encara que totes les annexines tinguin la capacitat d'unir fosfolípids dependent de Ca^{2+} , presenten profundes diferències en el lligar del Ca^{2+} per unir fosfolípids i agregar vesícules i la seva habilitat per catalitzar la fusió de membranes.

I.1.5.4. Les annexines com a canals d'ions

La primera dada sobre annexines respecte la seva activitat com a canal iònic va ser que anx7 formava corrents d'entrada en bicapes de fosfolípids acídics (Rojas and Pollard, 1987) formant canals de Ca^{2+} altament sensibles a voltatge (Pollard and

Rojas, 1988). Més tard es va demostrar que anx5 tenia la mateixa activitat (Rojas et al., 1990) al mateix temps que es publicava la seva estructura cristalina que mostrava característiques consistents com a canal d'ions (Huber et al., 1990). Coneixent la preferència de l'anx5 pels fosfolípids de càrrega negativa, es va proposar que el canal hidrofílic proveia una entrada selectiva de cations cap a l'interior de la cèl·lula (Demange et al., 1994). En el cas d'anx12 els residus del porus són bàsics, suggerint un canal aniònic.

Per afegir més confusió, sembla ser que les annexines també poden modular l'activitat d'altres canals d'ions. Es va demostrar que anx6 purificada incrementava el temps i la probabilitat d'obertura de canals de Ca^{2+} en el reticle sarcoplàsmic (Diaz-Munoz et al., 1990).

També es va demostrar que anx4 inhibia específicament l'activació del canal de Cl^- dependent de Ca^{2+} (Kaetzel et al., 1994), bloquejant la fosforilació del canal de Cl^- mitjançant la proteïna kinasa II dependent de calmodulina (CaMKII) (Chan et al., 1994).

I.1.5.5. Creixement cel·lular i diferenciació

El descobriment que algunes annexines són induïbles per l'oncogen fos, brinda la possibilitat de que tenen papers importants en el creixement cel·lular i diferenciació. Hi ha varies evidències on la diferenciació cel·lular ve acompanyada per un increment en l'expressió d'annexines, per exemple, anx1 està sobreexpressada durant la diferenciació de cèl·lules mielomonocítiques (William et al., 1988) (Isacke et al., 1989), anx2 i 5 estan sobre-expresades en les cèl·lules PC12 durant diferenciació induïda per NGF (Schlaepfer and Haigler, 1990) (Fox et al., 1991) i anx6 està sobre-regulada durant la diferenciació de limfòcits B i T (Clark et al., 1991).

S'han fet molts estudis que involucren a anx2 en diferenciació. Transfecció en PC12 de p11, el lligand d'anx2, estimulava la seva diferenciació en cèl·lules semblants a neurones simpàtiques (Masiakowski and Shooter, 1990). Es va demostrar que cèl·lules que expressaven el mRNA de p11, la proteïna p11 era indetectable a no ser que anx2 també fos expressada, suggerint que p11 no pot funcionar sol i que anx2 contribueix a la diferenciació cel·lular de les PC12 (Puisieux et al., 1996). En contrast, les cèl·lules de teratocarcinoma F9 de ratolí, mostren una expressió de p11 mentre anx2 sembla estar absent (Saris et al., 1987) (Harder et al., 1993).

En altres tipus cel·lulars les annexines poden funcionar per moderar o inhibir proliferació cel·lular. Primer es va demostrar que les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar reduïen dràsticament el seu creixement quan eren cultivades en presència d'anx1 recombinant (Croxtall and Flower, 1992). El bloqueig del creixement també va ser observat quan aquestes cèl·lules eren cultivades amb dexametasona, la qual estimula l'aparició d'anx1 en la superfície cel·lular. Finalment es va mostrar que la inhibició de la proliferació cel·lular d'aquestes cèl·lules, podia ser imitada pel fragment peptídic del domini N-terminal de l'anx1 (Croxtall et al., 1993).

Les cèl·lules A431 no expressen anx6 però quan es van examinar clons transfectats establen amb anx6, es va veure que s'inhibia el seu creixement (Theobald et al., 1994). Sobre aquest tema m'hi referiré en l'apartat específic de l'anx6.

I.1.5.6. Les annexines en l'exocitosi

La primera annexina descrita en la bibliografia, l'anx7, va ser purificada com un component capaç d'agregar grànuls cromafínics depenent de Ca^{2+} . En aquests últims anys s'han proporcionat noves evidències pel paper de les annexines en el transport de la via biosintètica.

L'anx1, per exemple, ha estat implicada en la secreció d'insulina induïda per glucosa, ja que es troba específicament localitzada en els grànuls que contenen insulina. Curiosament, la secreció coincideix amb la fosforilació d'anx1 en residus serina (Ohnishi et al., 1995).

Anx2, identificada com a proteïna de grànuls de secreció, és capaç d'agregar grànuls cromafínics aïllats en presència de Ca^{2+} . A més a més, la pèrdua successiva de resposta secretora estimulada amb Ca^{2+} pot ser disminuïda afegint anx2 purificada (Ali et al., 1989). Aquest efecte depèn en part de la formació del complex anx2-p11, ja que l'anx2 monomèrica és menys eficient. Estudis in vitro també revelen que la fosforilació d'anx2 per PKC unida als grànuls cromafínics, induïa la seva fusió (Regnoui et al., 1995). Finalment, anx2 monomèrica transloca del citosol a la regió citoplasmàtica de la membrana plasmàtica després d'estimular la secreció de catecolamines (Chasserot-Golaz et al., 1996).

Anx13b es troba específicament enriquida en vesícules del transport apical de MDCKs. A més a més, anticossos contra l'únic exó d'aquesta proteïna, interfereixen amb el transport a la membrana plasmàtica apical però no la basolateral (Fiedler et al., 1995) indicant que l'anx13b juga un paper important en el transport de vesícules a la membrana plasmàtica apical.

Ja que sembla que les annexines no són fusogèniques "per se" podrien necessitar cofactors, per exemple àcids grassos cis-no saturats, per executar tal funció. Alternativament, les annexines poden tenir una funció estructural unint físicament vesícules de secreció entre sí o a la membrana plasmàtica. A més a més, algunes annexines també podrien proporcionar connexions entre la membrana de la vesícula i elements del citoesquelet.

I.1.5.7. Les annexines en l'endocitosi

A més a més de les localitzacions immunocitoquímiques, algunes aproximacions experimentals han implicat varies annexines en transport i sorting de la via endocítica.

L'anx1 és substrat del receptor d'EGF i es va poder demostrar que, en cèl·lules NIH 3T3, la fosforilació tenia lloc en compartiments endocítics multivesiculars (MVBs) implicats en el direccionament de receptors destinats a degradar-se com el EGFR. Mentre l'anx1 no fosforilada interacciona amb la membrana plasmàtica i la membrana dels MVBs independent de Ca^{2+} , la fosforilació per EGFR la transforma de forma que requereix Ca^{2+} per mantenir tals interaccions (Futter et al., 1993). Tot junt suggereix que la fosforilació d'anx1 proporciona un senyal pel sorting del EGFR en els MVBs. Pel contrari, experiments de fraccionament cel·lular de cèl·lules BHK i MDCK demostraven que anx1 es trobava en la membrana plasmàtica i endosomes primerencs però no els endosomes tardans i multivesiculars (Seemann et al., 1996).

Anx2 és una altra annexina implicada en etapes primerenques de l'endocitosi. Està específicament localitzada en la membrana plasmàtica i regions tubulars dels endosomes primerencs. Assaigs in vitro que reproduïen la fusió homotípica entre endosomes primerencs revelava que anticossos contra l'anx2 interferien amb la fusió endosomal dependent de Ca^{2+} (Mayorga et al., 1994). Per una altra banda també s'ha trobat l'anx2 en caveoles on es pensa que podria unir específicament microdominis de membrana rics en colesterol al citoesquelet d'actina (Harder et al., 1997).

En un assaig in vitro que mesurava la pèrdua de clatrina de membrana plasmàtica immobilitzada es va implicar directament l'anx6 en la gemació dels sots recoberts de clatrina, activant aquest procés (Lin et al., 1992).

I.1.5.8. Les annexines en l'organització de membranes

S'ha involucrat a les annexines en, a més a més de transport endocític i exocític, en organitzar i estabilitzar certs microdominis de membranes. A nivell de membrana plasmàtica, l'organització en microdominis es veu reflectat en els sots recoberts de clatrina, on els receptors de membrana destinats a internalitzar-se són concentrats, i en microdominis enriquits en colesterol, esfingolípid i proteïnes (caveolina, proteïnes ancorades a GPI, CD44), enomenats caveoles. De la mateixa manera, en el compartiment endosomal primerenc és probable que es requereixi una reorganització de membranes per separar molècules destinades a endosomes tardans de les que es reciclen cap a la membrana plasmàtica. I en el TGN on es dóna la repartició de vesícules que porten materials cap a diferents dominis de la membrana plasmàtica i cap als lisosomes.

Es coneixen diversos components estructurals situats en la cara citosòlica de les seves respectives membranes que estan involucrats en generar i estabilitzar dominis de membrana. Aquests inclouen molècules adaptadores de les cobertes de les respectives vesícules, com els complexos AP1 (Golgi) i AP2 (sots de clatrina) i la proteïna que uneix colesterol, caveolina (caveoles). Però la unió d'aquestes o altres estructures membranoses al citoesquelet d'actina submembranós encara no es coneix en detall. Basat en les propietats bioquímiques de les annexines i la seva localització en certs dominis membranosos, resta pensar en la possibilitat de que algunes annexines participen en l'ancoratge de dominis de membrana al citoesquelet cortical o en l'establiment d'una segregació de certs lípids per sí mateixa.

Degut a la interacció preferencial de les annexines per ponts de Ca^{2+} amb fosfolípids que contenen caps polars carregats negativament, una unió de les proteïnes podria induir una agregació d'aquests fosfolípids àcids en la cara citosòlica de la membrana. En el cas de l'anx4, per exemple, la unió a membranes que contenen

diferents lípids induïa una segregació del PG de la PC (Junker and Creutz, 1993) per lo qual les annexines podrien estructurar membranes en les cèl·lules.

El complex anx2-p11 ha estat implicat amb la connexió entre membrana i citoesquelet. També s'ha trobat en microdominis de colesterol, on després d'un tractament amb filipina (agent que s'uneix al colesterol) s'eliminava selectivament juntament amb actina i proteïnes d'unió a l'actina suggerint que l'anx2 podria participar en unir específicament dominis de membrana rics en colesterol al citoesquelet d'actina (Harder et al., 1997). Aquest paper estructural de l'anx2 podria ser la base mecànica de la funció proposada pel complex anx2-p11 per detectar o transmetre senyals mecànics.

Les anx2, 5 i 6 es troben en microdominis dinàmics de la membrana plasmàtica de cèl·lules del múscul llis. Es va demostrar que anx6 participava en la formació d'un complex reversible de citoesquelet i membrana (Babiyhuk et al., 1999). Anx2 promou l'associació depenent de Ca^{2+} de microdominis lipídics (rafts), mentre que l'anx5 interacciona amb microcompartiments de glicerofosfolípids (Babiyhuk and Draeger, 2000).

I.1.5.9. Fosforilació de les annexines

Una de les observacions més reproduïbles és la fosforilació de les annexines 1 i 2. L'anx1 pot ser fosforilada en residus tirosina o serina després d'un tractament amb EGF (Sawyer and Cohen, 1985). L'anx1 és un excel·lent substrat pel EGFR i l'anx2 per la kinasa pp60^{v-src}. Aquestes diferències són degudes a que els llocs de fosforilació es troben en l'extrem N-terminal, on hi ha les regions amb menys similaritat. Hi ha evidències que la fosforilació en residus tirosina de les annexines 1 i 2 altera la seva unió a fosfolípids dependent de Ca²⁺.

Curiosament es va demostrar que l'anx11 és fosforilada in situ en residus serina i treonina en cèl·lules v-src transformades. Per altra banda també s'ha trobat in vitro que és fosforilable per MAPK en residus serina-treonina diferents. En el primer cas, l'anx11 perdia la capacitat d'unir-se a vesícules de PS mentre que en el segon cas no la perdia (Mizutani et al., 1993).

Es va aïllar també una annexina de *Hydra vulgaris*, anx12, la qual tenia un lloc de fosforilació per PKC descrit en altres annexines (Schlaepfer et al., 1992).

Tanmateix la fosforilació d'altres annexines ha estat difícil de demostrar, encara que in vitro van ser fàcilment fosforilades. Una excepció és l'anx6, la qual té residus serina i tirosina en el domini N-terminal però no estan continguts dins de seqüències reconegudes com òptimes per ser fosforilades tan per PKC com per proteïnes tirosina quinases.

	Característiques
Annexina 1	Fusió de vesícules Inhibició proliferació cel·lular d'adenocarcinoma pulmonar Secreció d'insulina
Annexina 2	Agregació de vesícules Augmenta la diferenciació de PC12 Unions membrana-citoesquelet
Annexina 3	Implicada en fagocitosi Funció inositol(1,2)-phosphohidrolasa
Annexina 4	Segregació de lípids Inhibició canals de Cl ⁻
Annexina 5	Canal de cations Inhibició de fusió entre vesícules Inhibició proliferació de cèl·lules A431
Annexina 6	Contracció cardiomiòcits Formació de coatet pits Agregació de vesícules exocítiques
Annexina 7	Agregació de vesícules Canal d'ions
Annexina 10 (Drosophila)	S'uneix a PS però no a PC
Annexina 11	Es fosforila per MAPK
Annexina 12 (Hydra vulgaris)	Es fosforila per PKC
Annexina B12	Hexàmer
Annexina A13	Específica d'intestí
Annexina B13	Tràfic a la membrana apical

Taula 2. Resum de les característiques més conegudes de les annexines

I.1.6. Proteïnes que interaccionen amb les annexines

Com es podia esperar de l'estructura modular de les annexines la majoria dels llocs d'unió a lligands han estat mapats en el domini N-terminal. Curiosament, diversos membres de la família de les proteïnes EF-hand S-100 formen complexos amb diferents annexines. El prototip d'aquests complexos és l'heterotetràmer format per l'annexina2-p11 en el qual un dímer de la proteïna p11 (S100A10) s'uneix a dos molècules d'anx2 (Gerke and Weber, 1984) (Gerke and Weber, 1985) (Erikson et al., 1984).

L'esmentada unió redueix de manera important el requeriment de Ca^{2+} per la unió a fosfolípids i per l'agregació de grànuls cromafínics (Powell and Glenney, 1987) (Drust and Creutz, 1988). A més a més, aquest complex té una localització subcel·lular diferent que l'anx2 monomèrica i la formació d'aquest complex sembla ser un requisit pel fort ancoratge d'aquesta annexina al citoesquelet cortical de fibroblastes i cèl·lules cromafíniques (Zokas and Glenney, 1987) (Thiel et al., 1992) (Chasserot-Golaz et al., 1996).

Dos parells més de complexos annexines-S100 són l'anx1-S100C i l'anx11-calciclina (S100A6) i el lloc d'unió ha estat també mapat en el domini N-terminal (Tokumitsu et al., 1992) (Naka et al., 1994) (Mailliard et al., 1996) (Seemann et al., 1996). No se sap si aquesta unió condueix a la formació d'una unitat heterotetramèrica ni les seves conseqüències fisiològiques.

També s'ha trobat que l'anx6 interacciona amb S100A1 i S100B bloquejant la capacitat que tenen aquestes 2 proteïnes d'inhibir l'ensamblatge de desmina i la proteïna acídica glial fibrillar (GFAP) en filaments intermediaris depenentment de Ca^{2+} . S100A1/B en solució existeixen com a homodímers i sembla ser que interaccionen amb 2 molècules d'anx6 (Garbuglia et al., 1998).

Altres proteïnes que s'han trobat que interaccionen amb les annexines són proteïnes del citoesquelet i associades. Anx1, 2 i 6 s'uneixen a actina filamentosa depenent de Ca^{2+} (Gerke and Weber, 1984) (Glenney et al., 1986) (Naka et al., 1994). Membres de la família de l'espectrina es troben també en estructures submembranoses i representen lligands in vitro per anx2 i 6 (Gerke and Weber, 1984) (Cheney and Willard, 1989) (Watanabe et al., 1994), indicant que algunes annexines poden servir com a element estructural en aquesta regió cortical de la cèl·lula.

La calciclina és una proteïna d'unió a l'àcid siàlic. La seva expressió és regulada pel cicle cel·lular i s'uneix específicament a l'anx2, 6 i 11 dependentment de Ca^{2+} (Zeng et al., 1993).

Podem il·lustrar 2 característiques esteses en les annexines. Primera, les proteïnes d'aquesta família representen sovint dianes de regulació a través de proteïnes S100. Segon, les annexines o complexos annexina-S100 poden associar no només membranes si no que també proteïnes del citoesquelet, més concretament aquelles que es troben en estructures del citoesquelet envoltant membranes.

A més a més d'aquests exemples discutits anteriorment, han sigut identificades annexines en la superfície externa de les cèl·lules que interaccionen amb proteïnes de la matriu extracel·lular com el colàgen, que s'uneix a anx5 (Pfaffle et al., 1988) o la tenascina C, la qual interacciona amb anx2 exposada en la superfície de cèl·lules endotelials (Chung and Erickson, 1994). A més a més, la proteïna del plasma apolipoproteïna A1 s'uneix a l'anx1 i 7, però no a l'anx4 i 6 depenent de Ca^{2+} (Brownawell and Creutz, 1996). En alguns casos, les annexines han estat implicades en interaccions intercel·lulars. Això inclou anx2 i 6, les quals van ser identificades com a components de la membrana de cèl·lules de limfomes participant en l'adhesió cel·lular (Tressler et al., 1993) (Tressler et al., 1994), i anx1, la qual es va veure que s'unia a leucòcits (Goulding and Guyre, 1993) i es va proposar una acció antiinflamatòria interferint amb la migració trans-endotelial dels leucòcits (Mancuso et

al., 1995). Les dades experimentals que expliquen la secreció específica de determinades annexines encara són escasses.

	Proteïnes que interaccionen
Annexina 1	S100C, actina, apolipoproteïna A1
Annexina 2	p11(S100A10), actina, tenascin C, calciclina
Annexina 3	Inositol cíclic(1,2)-fosfat
Annexina 4	
Annexina 5	colàgen
Annexina 6	Espectrina, S100A1, S100B, actina, dinamina, sinapsina, calciclina
Annexina 7	apolipoproteïna A1 sorcín
Annexina 11	S100A6, calciclina

Taula 3. Proteïnes que interaccionen amb algunes de les annexines

I.1.7. Les annexines en les enfermetats i mort cel·lular

L'anx1 ha estat implicada en el mecanisme de secreció d'insulina induïda per glucosa. Primer es va trobar que la seva localització en el pàncrees era

exclusivament en les cèl·lules β dels illots i mitjançant microscopia electrònica es va detectar més concretament en els grànuls que contenen insulina. A més, quan s'estimulaven els illots amb glucosa, s'indueix la fosforilació d'anx1 la qual estava sincronitzada amb la secreció d'insulina (Ohnishi et al., 1995). El glucocorticoid sintètic dexametasona indueix l'expressió a la superfície cel·lular de l'anx1. La sobreexpressió de l'anx1 inhibia la proliferació de cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó (A549) (Croxtall and Flower, 1992). També s'ha demostrat que tractant rates amb dexametasona o components que desencadenen una resposta inflamatòria, s'incrementa l'expressió d'anx1 (Oliani et al., 2000) afavorint el paper de l'anx1 com a agent antiinflamatori. Immunització d'animals amb anticossos neutralitzants contra l'anx1 interfereix amb la supressió induïda per glucocorticoids de la migració de neutròfils.

L'anx2 es troba de manera anormal elevada en pacients que pateixen de leucèmia promielítica aguda. Anx2 és la responsable d'un augment de la producció de plasmina i podria ser un mecanisme que provoqués les disfuncions hemorràgiques tan corrents en aquests pacients (Menell et al., 1999). En la superfície cel·lular de les cèl·lules leucèmiques i de l'endoteli vascular, l'anx2 accelera l'activació de plasmina acomplexant-se amb el precursor de la plasmina (plasminògen) i amb l'activador del plasminògen, actuant com a receptor per l'activació del plasminògen, que és necessari pel processament proteolític a plasmina. Tractament amb àcid retinòic provoca la diferenciació de les cèl·lules leucèmiques, i comporta la restitució dels paràmetres normals de coagulació (Hajjar and Krishnan, 1999).

L'anx5 s'utilitza àmpliament com a marcador per cèl·lules apoptòtiques (van Engeland et al., 1996). En l'inici de l'apoptosi, les cèl·lules perden la seva membrana fosfolipídica i exposen la fosfatidilserina (PS) a la superfície cel·lular. L'anx5 té una elevada afinitat per la PS i si la conjuguem a un fluorocrom com FITC, podem monitoritzar aquest procés.

Una vegada que la PS és exposada a la superfície cel·lular, exhibeix una activitat coagulant i inflammatòria. L'anx5 s'uneix a la PS inhibint ambdues activitats. Això, afegit amb la presència d'anx5 en el medi extracel·lular, deixa entreveure un paper fisiològic important per l'anx5 (Reutelingsperger and van Heerde, 1997). En la placenta de pacients que tenien anticossos contra complexos de proteïnes unides a fosfolípids aniònics (síndrome dels antifosfolípids), es va trobar una deficiència d'anx5 (Rand, Wu, et al. 1994 ID: 343). Sembla ser que l'anx5 és necessària pel manteniment de la integritat de la placenta ja que anticossos contra l'anx5 provocaven l'abortament (Wang, Campos, et al. 1999 ID: 344).

L'anx6 és un candidat com a marcador per estats primerencs de mort cel·lular programada neuronal i està potencialment involucrat en processos de mort cel·lular (Wang et al., 1997). Ratolins knockout per l'anx6 no mostraven cap variació en el seu fenotip (Hawkins, Roes, et al. 1999 ID: 323).

Ratolins knockout per l'anx7 (-/-) són letals degut a una hemorràgia cerebral en l'estadi d'embrió. Els heterozigots són viables i presenten un defecte en la secreció d'insulina. Això sembla que es deu a un canvi en la capacitat del inositol trifosfat (IP3) en alliberar Ca^{2+} (Srivastava, Atwater, et al. 1999 ID: 345).

També s'ha descrit la presència d'algunes annexines en el cor, especialment l'anx2, 5 i 6. Un par cardíac és acompanyat per una sobreexpressió de les anx2 i 5, així com la translocació d'anx6 dels cardiomiòcits al teixit intersticial (Benevolensky et al., 2000). Per una altra banda s'ha suggerit que les diferents annexines actúen diferent durant un par cardíac, ja que mostraven diferents localitzacions i els nivells d'anx4 i 5 augmentaven. L'anx6 es trobava en el sarcolema i no mostrava cap canvi en la seva expressió (Matteo and Moravec, 2000).

També es van trobar anx5 i 6 en el medi extracel·lular de pacients amb artritis reumatoide. Els glucocorticoids són forts agents antiinflamatoris pel tractament d'aquesta enfermetat, i indueixen la síntesi i secreció d'anx1 però no d'anx 5 i 6.

Aquests pacients presenten uns nivells elevats d'auto-anticossos contra an_{x5} i 6, suggerint un paper perjudicial per l'efecte anti-PLA₂ de les annexines (Dubois et al., 1995).

Aquesta varietat de funcions proposades per les annexines tenen el denominador comú que són processos on intervé el calci.

I.2. Annexina 6

Després de que la biologia molecular revelés la seqüència genòmica de cada membre de la família de les annexines, es va establir una base per assignar amb precisió les semblances químiques. Degut als descobriments sobre la identitat exacta de les annexines amb 4 dominis repetits, es van desencadenar algunes polèmiques al veure com l'anx6 migrava com una proteïna de 67-73 kDa en un gel SDS/PAGE. La seqüència d'aminoàcids prediu un polipèptid de 673 residus, dels quals trobem 2 dominis de 4 repeticions de 65-70 aminoàcids, indicant duplicació de gens.

A més a més, sembla ser que la conformació de les 4 repeticions de les annexines no s'altera després d'unir-se a la membrana, però això és diferent en l'anx6. Aquesta compren 8 repeticions plegades en dos meitats similars, cadascuna de les quals representa un nucli d'annexina típica. Un cop té lloc la unió a membrana, les dos meitats roten 90° una respecte l'altra fins arribar a una organització coplanar amb la membrana (Kawasaki et al., 1996).



Fig.3.
Estructura
tridimensional
de l'Anx6

La localització de l'anx6 descrita en la membrana plasmàtica, vesícules endocítiques, i les interaccions amb proteïnes del citoesquelet així com la possibilitat de ser fosforilada per diferents quinases, suggereix que anx6 pot estar implicada en diferents papers dins la cèl·lula.

I.2.1. Diferents localitzacions

La distribució de l'anx6 ha estat descrita en moltes estructures intracel·lulars i també en el medi extracel·lular. En primer lloc depèn del tipus cel·lular on s'estudia i en segon lloc del tipus d'eina emprada. Així doncs, anticossos produïts contra la proteïna sencera en el seu estat unit a membrana no reconeixerà la mateixa proteïna que un anticòs produït contra 12 aminoàcids de l'extrem N-terminal. Aquest és el cas dels anticossos utilitzats en el present estudi, el primer dels quals reconeix l'anx6 unida a membranes d'endosomes i el segon té un patró més difós detectant també la proteïna a la membrana plasmàtica. Un tercer anticòs que vam generar al laboratori va ser un policlonal contra la proteïna de fusió GST-Anx6, el qual funcionava molt específicament per Western blotting però no per immunocitoquímica.

La majoria d'estudis troben l'anx6 associada a membrana plasmàtica. Estudis realitzats en macròfags trobaven l'anx6 associada a membrana plasmàtica, la qual es translocava cap a l'interior com a resposta a l'estrès oxidatiu (Lin and Cantiello, 1993) acompanyada d'un increment en el Ca^{2+} intracel·lular. Uns autors en concret trobaven l'anx6 en les vesícules recobertes de clatrina (Turpin et al., 1998). Aquestes vesícules recobertes són el primer estadi de l'endocitosi. Els complexos lligand-receptor d'aquestes vesícules són internalitzats i finalment es fusionaran amb l'endosoma primerenc. En aquests endosomes també s'ha trobat anx6. Mitjançant tècniques de microscopia electrònica, va ser possible fer estudis de col·localització amb marcadors d'estructures sub-cel·lulars. Així doncs es va quantificar en seccions

de Lowicryl que el 80 % del marcatge total d'anx6 estava en la regió subapical dels hepatòcits associat a estructures endocítiques al voltant del canalicle biliar. En experiments de doble marcatge amb el marcador d'endosomes primerencs Rab5 es va trobar que el 80 % d'endosomes apicals Rab5 positius, estaven també marcats amb anti-anx6, però no es va detectar cap col·localització significativa amb el receptor de les immunoglobulines polimèriques suggerint que anx6 no està implicada en la transcitosi de plgA (Ortega et al., 1998).

Com he citat abans, anx6 es troba en una varietat molt amplia d'estructures intracel·lulars incloent endosomes de fetge. Ja en l'any 1994, Jäckle i col·laboradors publicaren que l'anx6 era un marcador d'endosomes hepàtics i que la seva unió a membrana era dependent de Calci. Les fraccions purificades d'endosomes s'obtenien injectant LDL intravenós i aïllant 3 fraccions membranoses de diferents densitats mitjançant centrifugacions consecutives. La fracció de menys densitat correspon als endosomes tardans, la de densitat intermèdia als endosomes primerencs i la més densa correspon als endosomes de reciclatge i transcitosi. Per una altra banda, l'anx6 també es va ubicar en la membrana plasmàtica d'hepatòcits amb una concentració més elevada en el canalicle biliar. Un 31 % de l'anx6 es trobava associada a membranes independent de Ca^{2+} (Tagoe et al., 1994). Finalment es va quantificar la distribució relativa d'anx6 en les diferents fraccions endosomals de fetge, trobant-la lleugerament enriquida en els endosomes primerencs (Pol et al., 1997).

De tota manera, mitjançant fraccionament cel·lular de cèl·lules BHK es va demostrar que anx6 no era tan sols un component important d'endosomes primerencs sino també d'endosomes tardans (Seemann et al., 1996).

Uns altres estudis implicaven l'anx6 en els últims estadis de l'endocitosi i trobaven aquesta proteïna localitzada principalment en fagosomes tardans de macròfags aïllats (Desjardins et al., 1994). En l'endocitosi es distingeixen diferents compartiments implicats en els darrers estadis de la ruta degradativa:

- ECVs (endocytic carrier vesicles) que estan implicades en el tràfic de lligands des dels endosomes primerencs als tardans.
- Endosomes tardans, on es reben els lligands i el pH ha baixat lleugerament. Contenen poques hidrolases i poques proteïnes de membrana lisosomal (ex. Lgp120). Contenen el receptor de la manosa-6-fosfat (M-6-PR) que recicle entre el TGN i aquests endosomes.
- Prelisosomes, ja tenen un pH luminal molt baix. Tenen una elevada concentració d'hidrolases (són actives a pH àcid) i de proteïnes de membrana lisosomal. Aquí ja comença la degradació de les proteïnes. No es troba el M-6-PR.
- Lisosomes, també descrits com a lisosomes madurs, és on s'acaben d'hidrolitzar les proteïnes. El pH és molt baix, tenen proteïnes de membrana lisosomal però no el M-6-PR.

Existeixen diversos models pel transport intracel·lular en els últims estadis de l'endocitosi. Un d'ells postula que tot el transport és un procés de maduració de vesícules. L'altre opta per lisosomes i prelisosomes preexistents que es fusionen entre sí o amb vesícules que transporten els lligands. Estudis recents han proposat un model en el qual els prelisosomes s'originen de la fusió directa entre els endosomes tardans i els lisosomes (Bright et al., 1997).

Estudis d'immunolocalització amb anx6 en múscul esquelètic mostrava un patró d'expressió regular estriat. Aquest patró reticular donava evidències de que en aquest teixit anx6 no estava només localitzada en el sarcolema com en el múscul llis, sinó que suggeria també una associació amb el reticle sarcoplàsmic i la regulació dels canals de Ca^{2+} . Aquest orgànul allibera Ca^{2+} seguit d'una despolarització de la membrana per induir una contracció, i llavors segresta Ca^{2+} per la relaxació (Hazarika et al., 1991a; Hazarika et al., 1991b). Més tard van descriure l'anx6 en el reticle endoplasmàtic de fibroblastes que es translocava a la membrana plasmàtica

després de tractar les cèl·lules amb un ionòfor de calci (Barwise and Walker, 1996). Tanmateix però, aquesta distribució no es trobava en els miòcits cardíacs els quals presentaven anx6 tan sols en el sarcolema i no en el reticle sarcoplàsmic (Luckcuck et al., 1998). Això ens suggereix que en el múscul esquelètic l'anx6 es requereix per processos específics del sarcolema i el reticle sarcoplàsmic i en el múscul cardíac només del sarcolema.

També s'ha trobat l'anx6 en vesícules sinàptiques associada a sinapsina I amb presència de Ca^{2+} . La unió de l'anx6 era inhibida quan es fosforilava la sinapsina amb la quinasa depenent d'AMP cíclic o amb CaMKII. Aquests resultats indiquen que anx6 pot modular la funció de la sinapsina I depenent de Ca^{2+} i fosfolípids (Inui et al., 1994). La sinapsina té afinitat per dominis SH3 i s'uneix a un conjunt de proteïnes que contenen aquest domini implicades amb transducció de senyal, ensamblatge del citoesquelet o endocitosi. La fosforilació de sinapsina per CamKII o MAPK regula la unió amb l'amfifisina i espectrina afectant així l'habilitat de la sinapsina per unir actina i vesícules sinàptiques (Onofri et al., 2000).

I.2.2. Funcions de l'anx6

I.2.2.1. Implicació de l'anx6 en la proliferació cel·lular

L'anx6 ha estat implicada en la proliferació cel·lular en quan a que l'expressió d'anx6 en cèl·lules de carcinoma epitelial escamós A431 redueix el seu creixement. La línia cel·lular A431 en condicions normals no expressen anx6, però transfeccions estables d'anx6 fan créixer aquestes cèl·lules més lentament depenent de la concentració de sèrum. A baixes concentracions de sèrum (1-2 %), les cèl·lules A431 wild-type creixen normalment mentre que les que sobreexpressen anx6 s'arresten i s'acumulen en la fase G_1 del cicle cel·lular. Encara que semblés que s'havia revertit

a un fenotip no transformat, les cèl·lules A431 anx6⁺ encara eren tumorigèniques en ratolins immunodeficients, tot i que els tumors creixien d'una manera significativament més lenta que aquells derivats de les cèl·lules transfectades control (Theobald et al., 1994; Theobald et al., 1995).

Per una banda l'anx6 està sobre-regulada durant la diferenciació de limfòcits B i T i per una altra, s'expressa menys en cèl·lules mamàries lactants en oposició de les no lactant (Clark et al., 1991).

I.2.2.2. L'anx6 i el Ca²⁺ lliure intracel·lular

La gran afinitat de les annexines pel Ca²⁺ ha suggerit a molts autors una funció de tampó intracel·lular de Ca²⁺. Les cèl·lules amb estrès oxidatiu desencadenen una dissociació de l'anx6 de la membrana plasmàtica amb un conseqüent augment en Ca²⁺ lliure (Lin and Cantiello, 1993).

Ratolins transgènics en els quals anx6 va ser sobreexpressada en el cor, exhibien diversos problemes cardíacs, i els que tenien els nivells més elevats d'anx6 morien d'infart poc després de néixer. Així doncs es va demostrar que en miòcits cardíacs aïllats amb elevats nivells d'anx6, tenien menys Ca²⁺ i generaven pics més petits de Ca²⁺ després d'una estimulació elèctrica (Gunteski-Hamblin et al., 1996). El mecanisme de l'acció d'anx6 en els miòcits cardíacs encara no s'ha desxifrat però si la funció d'anx6 és suprimir la mobilització de Ca²⁺ implica que l'anx6 podria inhibir l'exocitosis en les cèl·lules secretores o reduir el creixement de cèl·lules en proliferació. Recentment però es van fer ratolins knockout en l'anx6 i no mostraven cap fenotip diferent als ratolins normals i les respostes cardiovasculars entre ells eren indistingibles (Hawkins et al., 1999).

En l'any 1990 es va trobar l'anx6 en vesícules del reticle sarcoplàsmic i es va pensar que modulava la sortida de Ca²⁺. Però l'anx6 no causava cap canvi en la

conductància del canal però sí augmentava la seva probabilitat d'obertura (Diaz-Munoz et al., 1990), suggerint un paper important en la contracció de la musculatura.

Estudis recents mostren una possible anomalia en la mobilització de Ca^{2+} mediada per factors de creixement. Cèl·lules A431 que expressen anx6 no tenen la capacitat de mantenir uns nivells elevats de Ca^{2+} citosòlic després d'una estimulació amb EGF. Aquest efecte tan sols es pot observar per la forma de més alt pes molecular de l'anx6 (Fleet et al., 1999).

I.2.2.3. L'anx6 en el transport intracel·lular

Uns experiments que ens relacionaven l'anx6 directament amb el transport intracel·lular, van ser els realitzats per Grewal i col·laboradors. Mentre que la sobreexpressió d'anx6 sola en cèl·lules CHO no modificava l'endocitosi i degradació de LDL, coexpressió d'anx6 i el receptor de LDL augmentava la internalització i degradació de LDL (Grewal et al., 2000). En canvi sobreexpressió d'anx6 i el receptor de transferrina augmentava la internalització de transferrina moderadament però no incrementava el seu reciclatge. Aquest increment era específic per l'endocitosi mediada per receptor, ja que la internalització per fase fluïda de HRP (horseradish peroxidase) no es veia afectada per la sobreexpressió d'anx6.

El fet que l'anx6 contingui 2 lòbuls similars, generats d'una duplicació d'una annexina típica, fa que presenti 2 dominis diferents d'unió a fosfolípids, els quals es troben en un mateix pla després de la unió a membrana (Kawasaki et al., 1996). Aquesta disposició seria favorable per associar-se a dos compartiments separats, ajudant així la seva fusió. Relacionat amb aquesta hipòtesi es va demostrar que el complex $\text{anx2}_2\text{-p11}_2$, el qual també conté 2 llocs d'unió a fosfolípids, contribuïa en la fusió entre endosomes primerencs (Emans et al., 1993).

Mesurant in vitro la internalització mitjançant la pèrdua de clathrina es va demostrar que l'anx6 estava implicada en aquest procés. La internalització era dependent de citosol, Ca^{2+} i ATP, però si s'eliminava l'anx6 del citosol, la internalització era inhibida i restituïda després d'afegir anx6 purificada al citosol deficient (Lin et al., 1992). S'han caracteritzat 3 poblacions de vesícules de clathrina (CCV) i anx6 es va trobar associada en la membrana dels 3 tipus de CCV independent de Ca^{2+} concretament unida a la GTPasa dinamina essencial per l'alliberament de la CCV (Turpin et al., 1998). En cèl·lules epitelials de mama també es va poder observar que després de polaritzar aquestes cèl·lules, anx6 s'incrementava en una fracció de membrana enriquida amb CCVs, i van suggerir una funció per l'anx6 com a senyal de direccionament (Lavialle et al., 2000).

La idea de que anx6 té un paper general en la formació de vesícules recobertes durant l'endocitosis mediada per receptor ha estat qüestionada pel descobriment d'una línia cel·lular que no expressa anx6. Són cèl·lules d'un carcinoma humà (A431) i no presenten cap diferència en l'endocitosis mediada per receptor quan s'expressa ectòpicament la l'anx6 (Smythe et al., 1994). Una possible explicació per aquests resultats és que l'anx6 no és indispensable per la formació dels sots recoberts però pot trencar la interacció de clathrina amb la membrana plasmàtica. Posteriorment es va demostrar que l'anx6 era un element important en el desprendiment de la vesícula de clathrina de la membrana plasmàtica (Veure I.2.2.5.).

I.2.2.4. L'anx6 com a element estructural del citoesquelet

L'anx6, a l'igual que l'anx2, interacciona amb 2 proteïnes de la família EF-hand, S100A1 i S100B. Aquestes 2 proteïnes s'uneixen i segresten amb gran afinitat un tipus de filament intermedi específic de cèl·lules gials (GFAP) i de cèl·lules musculars (desmina), inhibint el seu ensemblatge en filaments intermedis dependent de Ca^{2+} (Garbuglia et al., 1996; Bianchi et al., 1993). Sembla ser que el lloc d'unió de l'anx6 en les proteïnes S100A1/B es sobreposa parcialment al lloc d'unió de

GFAP/desmina, bloquejant l'habilitat de S100A1/B d'inhibir l'ensamblatge de GFAP/desmina en filaments intermedis (Garbuglia et al., 1998).

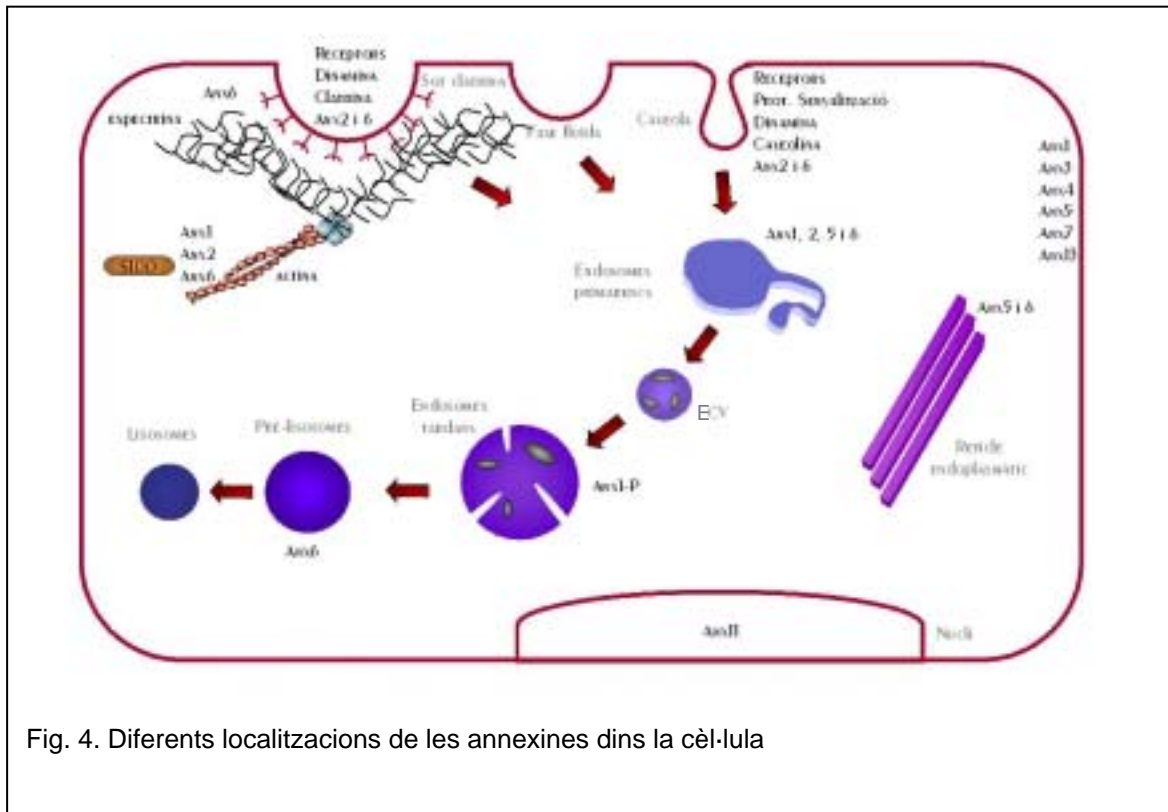
L'α-actinina transloca des del citoplasma al plasmalema quan s'estimulen les cèl·lules del múscul llis. En aquest teixit es va demostrar que α-actinina i β-actinina coprecipitaven amb actomiosina i una fracció de caveoles del sarcolema a elevades concentracions de Ca^{2+} . Una barreja d'actomiosina, annexines i lípids de les caveoles era requerida per generar un complexe reversible format per citoesquelet i membrana, suggerint que les annexines juguen un paper important en l'organització del sarcolema durant la contracció muscular unint membrana i citoesquelet (Babiychuk et al., 1999).

El requeriment del citoesquelet d'actina per l'endocitosi mediada per receptor ja va ser descrit quan es va demostrar que l'endocitosi es veia inhibida en presència de latrunculina A, una droga que segresta els monòmers d'actina. A més, dos altres reactius d'aquest tipus inhibien l'encapsulament en vesícules recobertes del receptor de la transferrina, però aquest efecte era neutralitzat específicament afegint monòmers d'actina (Lamaze et al., 1997). Aquests resultats suggereixen que aquests reactius actuen en els darrers passos del desanclament de les vesícules recobertes i que el citoesquelet és necessari per l'endocitosi mediada per receptor.

La internalització de molècules extracel·lulars en la cèl·lula, pot ser mediada per diferents vies:

- Vesícules recobertes de clatrina
- Macropinocitosi
- Caveoles
- Fase fluïda
- Fagocitosi

L'única característica en comú que presenten aquestes diferents entrades de lligands és la implicació aparent del citoesquelet.



I.2.2.5. L'anx6 i l'espectrina

A més a més de la interacció de l'anx6 amb l'actina (Hosoya et al., 1992), un altre membre del citoesquelet, l'espectrina, té una gran afinitat per l'anx6. Mitjançant assaigs d'unió amb lisats de cèl·lules neuronals, es va trobar que l'anx6 s'unia a espectrina dependent de Ca^{2+} i PS. El lloc d'unió es va localitzar en el domini N-terminal de la subunitat β de l'espectrina, el qual conté un lloc d'unió a l'actina. Quan es va examinar més profundament aquesta unió es va veure que la unió d'anx6 a espectrina inhibia la unió de F-actina a l'espectrina (Watanabe et al., 1994).

L'espectrina és el component majoritari del citoesquelet d'actina de la membrana plasmàtica i està formada per 2 cadenes α i 2 cadenes β . L'espectrina es troba fortament ancorada a la membrana a través de l'anquirina i la proteïna 4.1. Aquestes tenen l'habilitat d'unir-se a proteïnes de la membrana com transportadors d'ions i molècules d'adhesió cel·lular. El citoesquelet de la membrana té la funció de restringir la difusió lateral de les proteïnes de membrana, i per tant s'ha suggerit que el citoesquelet d'espectrina de la membrana té característiques de la maquinària de direccionament de proteïnes de membrana. En els eritròcits l'espectrina és molt abundant i es troba com a una densa xarxa per tota la superfície citoplasmàtica de la membrana plasmàtica. Uns primers estudis mostraven que l'endocitosi en eritròcits venia precedida per la creació d'àrees lliures d'espectrina (Hayashi et al., 1992). En MDCK es troba en la membrana plasmàtica basolateral. Curiosament l'espectrina està també present en les membranes del Golgi (Beck et al., 1994) així com en vesícules intracel·lulars no caracteritzades (De Matteis and Morrow, 1998; Stankewich et al., 1998). També es va trobar una isoforma de l'anquirina que unia i colocalitzava amb β -espectrina en el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi (Devarajan et al., 1996).

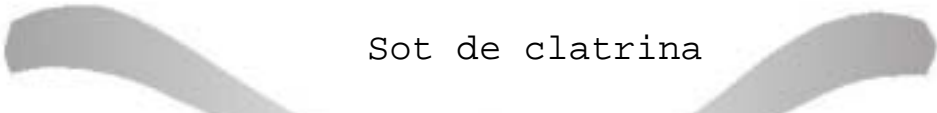
El citoesquelet d'espectrina-actina s'associa a les membranes primerament a través de les anquirines, les quals interaccionen amb la regió citoplasmàtica de nombroses proteïnes integrals de membrana. Recentment es va publicar que l'anquirina s'uneix a la clatrina i després d'interanalitzar LDL se la trobava associada a endosomes que contenen LDL (Michaely et al., 1999) indicant que l'anquirina i el citoesquelet tenen un paper important en l'endocitosi.

Ja es va suggerir que l'anx6 estava implicada en l'endocitosi en aquest nivell provocant un canvi conformacional del citoesquelet d'espectrina que té lloc en la superfície cel·lular durant l'endocitosi, facilitant així el desancoratge de les vesícules recobertes de clatrina de la membrana plasmàtica (Kamal et al., 1998). Aquests autors proposaven que la unió d'anx6 a espectrina mediava l'acció de l'enzim encarregat de trencar l'espectrina, la calpaina I, i van demostrar in vitro en vesícules

de clatrina aïllades que l'eliminació d'espectrina es veia inhibida en un 50% si s'hi afegia a l'assaig ALLN (inhibidor de la calpaïna I) o anx6 mutada (deleció de les 6 darreres repeticions). La internalització de LDL estava inhibida quan es microinjectaven les cèl·lules amb aquest mutant o es tractaven amb ALLN. Tanmateix però, després d'una hora, el LDL vencia la internalització dependent d'espectrina i anx6 mitjançant un mecanisme independent d'ambdues proteïnes.

Ja en l'any 1992 es va demostrar que la mu-calpaïna jugava un paper essencial en els canvis morfològics i en la fusió de membrana d'eritròcits a través de la degradació de l'espectrina (Hayashi et al., 1992). Més tard es va trobar que les calpaïnes es trobaven unides a la membrana de les vesícules de clatrina dependent de Ca^{2+} , però no en el sot pròpiament dit. Quan s'activaven les calpaïnes endògenes, la cadena lleugera de la clatrina, la tubulina i adaptines es tornaven molt sensibles a la digestió per calpaïnes (Sato et al., 1995). Aquests resultats indicaven que les calpaïnes estan implicades en la formació de vesícules i fusió d'endosomes.

Recentment s'ha descrit per primera vegada que una proteïna d'unió a l'espectrina es trobava en macropinosomes unida a espectrina i que la seva sobreexpressió inhibia la fusió de vesícules, implicant-la així en un paper regulador en la macropinocitosi (Xu et al., 2000). Per això els macropinosomes deuen estar recoberts per un esquelet de membrana format per espectrina. La macropinocitosi és un procés endocític que té lloc a través de vesícules no recobertes de clatrina més grans de $0.2 \mu\text{m}$ de diàmetre. Els macropinosomes no endociten transferrina i són resistents a BFA.



Sot de clatrina

Fig. 4. Esquema del cortex d'espectrina situat a la membrana plasmàtica

I.2.3. L'anx6 en la transducció del senyal

S'han identificat moltes proteïnes implicades en la transducció d'un senyal que prové del medi extracel·lular (hormones, pèptids, factors de creixement) i que per una cascada de fosforilacions s'activa una activitat específica per cada senyal (internalització de nutrients i ions, regulació de síntesis de proteïnes i ADN, proliferació o mort cel·lular). Els lligands com el NGF, PDGF, EGF i insulina s'uneixen a un receptor situat a la membrana plasmàtica que majoritàriament són receptors amb activitat tirosina quinasa, que s'autofosforilen estimulants la posterior cascada de la transducció del senyal i provocant canvis en la fisiologia cel·lular i l'expressió de gens. Aquestes vies de senyalització tenen una ampla gamma de

funcions incloent regulació de la proliferació cel·lular i diferenciació, supervivència cel·lular i regulació del metabolisme cel·lular.

La unió del lligand provoca la dimerització del receptor tirosina quinasa i l'autofosforilació en residus tirosina. Aquests interaccionen amb dominis SH2 de la proteïna adaptadora GRB2 que transmeten el senyal a altres components de la via de senyalització. Aquests poden ser la proteïna Ras que alterna entre un estat actiu unida a GTP i un d'inactiu amb un GDP unit. L'activació de Ras és accelerada per proteïnes bescanviadores de nucleòtids de guanina (GEF), Sos, que és activada per GRB2, i que posteriorment s'uneix a Ras-GDP causant la dissociació del GDP. Com que GTP es troba a més elevada concentració que GDP, GTP s'uneix espontàniament a les molècules de Ras. La desactivació de Ras requereix que proteïnes activadores de GTPases (GAP) s'uneixin a Ras-GTP accelerant la seva activitat intrínseca GTPasa en 100 vegades.

Una de les característiques de la transducció del senyal és l'activació dependent de Ras d'una cascada seqüencial de proteïnes kinases que consisteixen en Raf-1, Mek (MAP kinasa kinasa) i ERKs (MAP kinasa). Raf ha de ser transportada a la membrana per ser activada directament per Ras-GTP (Gawler, 1998). Més tard es van descriure una altre família de proteïnes anomenades 14-3-3 que interaccionen amb Raf i regulen la seva activació (Di Guglielmo et al., 1994). Raf a la vegada activarà MEK i de la mateixa manera s'activarà MAPK.

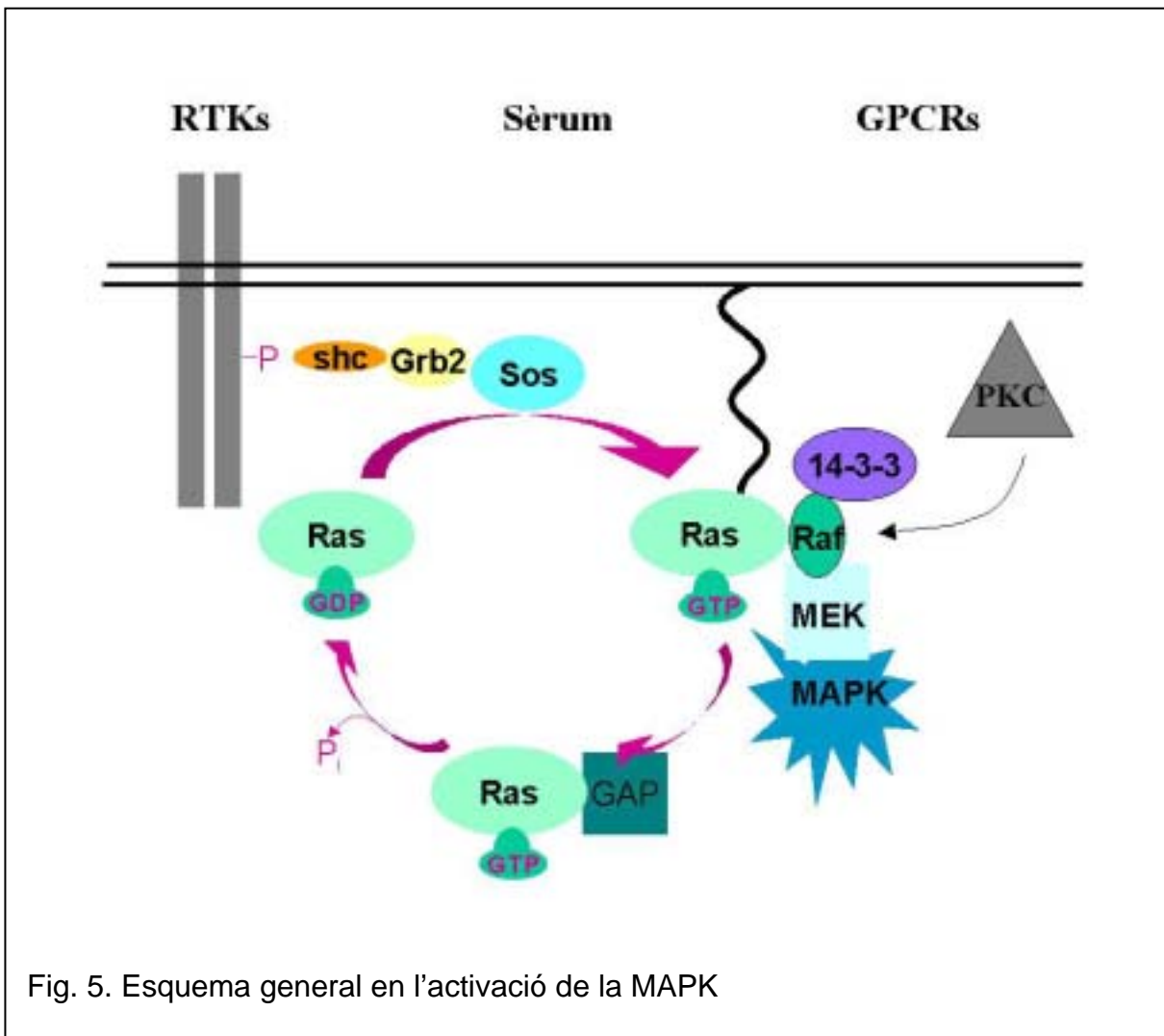


Fig. 5. Esquema general en l'activació de la MAPK

També es van trobar evidències que recolzaven un mecanisme d'activació de MAPK independent de Ras. Activant la PKC amb ésters de forbol (TPA) causava l'activació de MEK i MAPK, però s'havia de clarificar si aquesta activació tenia lloc via Ras. Si s'expressava un dominant negatiu de Ras, no es bloqueja l'activació d'MAPK per

PKC (Howe et al., 1992) en canvi sí ho fa en resposta a una estimulació de receptors tirosina quinasa (Wood et al., 1992), suggerint un paper intermediari de Ras només en el senyal que prové de receptors tirosina quinasa. Més tard es va demostrar que l'activació de MEK i MAPK per una forma activada de PKC δ necessita la presència de c-Raf i és independent del dominant negatiu de Ras (Ueda et al., 1996). No obstant, recentment s'ha demostrat que l'activació d'MAPK en cèl·lules COS tractades amb TPA es bloquejava completament quan es microinjectaven les cèl·lules amb un anticòs neutralitzant de Ras. A més a més, cèl·lules transfectades amb un mutant de Raf que no unix Ras-GTP, Raf no s'activava en cèl·lules tractades amb TPA (Marais et al., 1998). Això ens suggereix que Ras té un paper essencial en l'activació de la cascada de MAPK per PKC i que l'activació de Raf per senyals que activen PKC, és una conseqüència de l'activació de Ras. Aquests resultats corroboren uns estudis, on la sobreexpressió de GAP bloquejava l'activació de MAPK estimulada per TPA (Nori et al., 1992).

I.2.3.2. Paper de l'endocitosi en la transducció de senyal

Darrerament s'ha parlat molt sobre el paper de l'endocitosi en la transducció del senyal. Les interaccions de receptors activats de la superfície cel·lular amb efectors "downstream" està governat pel tràfic de membranes, compartimentalització i expressió proteïca.

Les caveoles són un candidat com a centre de senyalització perquè s'hi han trobat més de 30 receptors de membrana, molècules de senyalització i annexines. Inhibint l'expressió de caveolina (proteïna estructural de les caveoles) provocava la transformació de les cèl·lules i la hiperactivació d'ERK 1/2 (Galbiati et al., 1998) i sobreexpressant-la suprimia l'activació d'ERK 1/2 (Engelman et al., 1998). A més a més, inhibint la funció de la caveolina, s'interferia amb l'activació de Raf via H-Ras però no via K-Ras (Roy et al., 1999).

Està acceptat que els receptors activats són dirigits a les invaginacions de clatrina per ser internalitzats i abocats a través de compartiments intracel·lulars de membrana. L'acidificació dels endosomes és un dels mecanismes que permet que el lligand es dissociï del receptor, de tal manera que si la dissociació té lloc a un pH elevat (endosomes primerencs), el receptor anirà a reciclar (TGFR), mentre que si té lloc a un pH inferior, el conduirà cap a la degradació (EGFR). Experiments on s'inhibeix la degradació d'EGFR, s'incrementava la senyalització mitogènica (Waterman et al., 1999).

El concepte de que els receptors activats poden interaccionar amb molècules downstream de senyalització en localitzacions endocítiques ha estat estudiat inhibint l'endocitosi mitjançant la sobreexpressió del dominant negatiu de la dinamina que bloqueja l'endocitosi mediada per clatrina (Damke et al., 1994), causant la retenció de molts receptors a la superfície cel·lular. Un exemple seria el receptor de la insulina, el bloqueig a la superfície del qual provoca una reducció de l'activitat PI3-K dependent d'insulina (Ceresa et al., 1998).

També hi ha arguments a favor de que molècules de senyalització poden regular l'endocitosi. Aquest és el cas de c-Src. La forma inactiva d'aquesta kinasa pot inhibir l'endocitosi de β_2 AR i la seva forma activa l'augmenta (Ahn et al., 1999). A més, l'activació de β_2 AR provoca la fosforilació de dinamina a través d'un procés dependent de c-Src, suggerint un lloc de regulació més amunt de la dinamina en l'endocitosi del β_2 AR. A més a més, c-Src fosforila la clatrina i aquesta fosforilació és necessària pel reclutament de clatrina a la membrana (Wilde et al., 1999).

Treballs de diferents laboratoris indiquen que les GTP-binding proteins són necessàries pel transport vesicular intracel·lular. Pèptids sintètics corresponents a la regió del receptor β_2 -adrenèrgic on s'uneix la proteïna $G\alpha$ inhibia la fusió dels endosomes (Colombo et al., 1994).

En endosomes purificats de fetge de rata es va demostrar que la maquinària de senyalització era reclutada en endosomes primerencs on Raf-1 i Mek estaven activats (Pol et al., 1998). Aquestes proteïnes també es trobaven en la fracció caveolar i de forma enriquida. El receptor d'EGF no era present en aquesta fracció degut a que es troba normalment en vesícules de clatrina. Després de subministrar EGF, es mostrava una redistribució progressiva de Raf-1 i Mek des de la fracció enriquida de caveoles als endosomes primerencs, indicant-nos que EGF desencadena la internalització de la maquinària de transducció des de les caveoles als endosomes. En cèl·lules NRK també es va demostrar un internament progressiu de la caveolina després d'activar les cèl·lules amb EGF i aquest, juntament amb l'activació de MEK i MAPK, eren sensibles a Latrunculina A. Això ens indica que la internalització de caveolina, induïda per EGF, de la membrana plasmàtica als endosomes primerencs, i l'activació de MEK i MAPK depenen del citoesquelet d'actina (Pol et al., 2000).

Tot això ens suggereix que no són suficients un receptor activat i molècules de senyalització per obtenir una resposta cel·lular, si no que l'endocitosi i els endosomes són parts essencials.

I.2.3.3. L'anx6 en la via de senyalització

L'anx 6 ha estat també implicada en processos de transducció de senyal, ja sigui perquè s'ha trobat fosforilada in vitro o interaccionant amb proteïnes de la via de senyalització.

Es va veure que anx6 es fosforilava en resposta a una estimulació amb sèrum i interleukin-2 no obstant no s'ha establert cap diferència funcional entre la forma fosforilada i la no fosforilada. Estudiant la fosforilació de les annexines per proteïnes tirosina kinases de la família src, es va mostrar que anx6 era fosforilada in vitro per

p56lck i anx1 i 2 per p60src. La fosfo-proteïna p56lck estava associada a anx6 després de l'activació de les cèl·lules T (Dubois et al., 1995).

Per una altra banda també s'ha descrit en múscul esquelètic que l'anx6 interacciona amb la PKC α . Les dos proteïnes són dependents de Ca $^{2+}$ i fosfolípids de tal manera que la detecció de tal interacció era dependent de la presència de calci i PS. Tanmateix no es va poder detectar fosforilació de l'anx6 per la PKC α després de la purificació (Schmitz-Peiffer et al., 1998).

Buscant proteïnes que interaccionaven amb la proteïna activadora de GTPases (GAP), es va aïllar l'anx6 (Davis et al., 1996). Aquesta unió tenia lloc en un domini d'unió a fosfolípids carregats negativament dependent de Ca $^{2+}$ (domini C2 de GAP), el qual té l'habilitat d'associar-se a membrana en resposta a un increment del Ca $^{2+}$ intracel·lular. El mateix grup va mapar el lloc d'interacció de GAP en la regió interlobular d'anx6 (entre els 2 blocs de 4 repeticions) (Chow and Gawler, 1999). Més tard es van descobrir 2 proteïnes més de la via de senyalització que formaven un complex juntament amb anx6-GAP. Es tracta de la kinasa Pyk2 i la kinasa Fyn de la família Src (Chow et al., 2000). Ells conclouen que el domini C2 interacciona amb anx6, la qual uneix Fyn fent de pont entre aquestes 2 proteïnes. Pyk2 sembla ser que interacciona directament amb Fyn.

L'activació de Raf-1 és precedida per la translocació de Raf-1 a la membrana plasmàtica. Aquesta translocació és facilitada a través de la seva interacció amb Ras activat (Ras-GTP) i amb fosfolípids de membrana. Raf-1 té un domini ric amb cisteïnes que s'associa a proteïnes de la família 14-3-3 i té afinitat per fosfolípids acídics, especialment fosfatidilserina (PS). Després es va demostrar que les 14-3-3 ha d'estar acomplexada amb Raf-1 perquè tingui lloc un reclutament i una activació eficient per Ras, tanmateix però, la proteïna 14-3-3 era desplaçada completament després de que Raf-1 interaccionés amb la membrana (McPherson, 1998). Incubant Raf-1 amb PS es provocava l'eliminació de 14-3-3 i un increment de l'activitat Raf-1 kinasa (McPherson et al., 1999).

Curiosament, anx2 i les proteïnes 14-3-3 estimulen la secreció depenent de Ca^{2+} en cèl·lules cromafíniques (Burgoyne et al., 1993). Les annexines i les proteïnes 14-3-3 comparteixen un domini conservat, el qual s'ha proposat que està implicat en interaccions específiques proteïna-proteïna. Un pèptid amb aquest domini corresponent a l'extrem N-terminal de l'anx2, prevenia l'estimulació de la secreció per 14-3-3 i inhibia parcialment el control de la secreció (Roth et al., 1993).

Les proteïnes 14-3-3 a més a més de contenir un domini conservat similar a l'extrem C-terminal de les annexines, també presenten una seqüència homòloga al domini del pseudo-substrat de la protein kinase C (PKC). Es va poder demostrar que les proteïnes 14-3-3 inhibien l'activitat PKC, i que aquesta inhibició era deguda a aquesta seqüència (Wheeler-Jones et al., 1996). Aquests mateixos autors també van demostrar que la translocació de PKC del citoplasma a la membrana no era afectada ni per la seqüència del pseudo-substrat de PKC ni per la seqüència de les annexines que contenen les proteïnes 14-3-3. En canvi s'ha demostrat que l'anx5 també inhibeix la PKC (Schlaepfer et al., 1992).

El domini C-terminal de totes les annexines ha d'implicar alguna característica comú. Podria ser que tinguin un paper de direccionament cel·lular, portant la proteïna al compartiment correcte. S'està postulant cada cop més el paper de les annexines en diferents etapes de la via endocítica.

També han estat proposades moltes funcions per l'anx6 les quals es basen en la seva estructura bivalent promovent l'agregació de membranes, proteïnes o citoesquelet.

S'ha relacionat a l'anx6 amb el citoesquelet de membrana com a proteïna estructural, en l'escisió de vesícules de clatrina, en la modulació de canals de Ca^{2+} , en la proliferació cel·lular... Però és en aquest estudi on per primera vegada se la relaciona directament amb el transport de lligands a degradar-se en els lisosomes i en la transducció de senyal.

Malgrat tot, sembla esser que l'anx6 no es requereix per la internalització, ja que les cèl·lules A431 que no expressen anx6, té lloc normalment (Smythe et al., 1994) i ratolins knockout per l'anx6 són totalment viables (Bandorowicz-Pikula et al., 1997).

Objectius

OBJECTIUS

L'objectiu global d'aquest treball ha estat l'estudi de la localització i funcional de l'anx6 en cèl·lules en cultiu de rata o hamster. Aquest objectiu s'ha portat a terme a partir dels següents objectius específics:

- Producció d'anticossos i immunolocalització de l'anx6 en cèl·lules polaritzades i no polaritzades mitjançant assaigs de col·localització amb marcadors específics intracel·lulars per microscopia confocal o electrònica i fraccionament cel·lular.
- Anàlisi de la funció que realitza l'anx6 en el compartiment endocític.
- Estudi de proteïnes que interaccionen amb l'anx6, mitjançant la construcció de la proteïna de fusió GST-Anx6.
- Significat funcional de les interaccions d'anx6 amb l'espectrina i Raf-1.
- Estudi dels efectes en la transducció de senyal que provoca la sobreexpressió de l'anx6 en unes cèl·lules transfectades establement.

II. Materials i mètodes

II.1.1. Cultiu cel·lular

Les línies cel·lulars aquí utilitzades han estat:

- NRKs (Normal Rat kidney cells): cèl·lules fibroblasts
- CHOs (Chinese Hamster Ovary cells): cèl·lules epitelials

Aquestes línies s'han obtingut de la col·lecció ATCC.

II.1.1.1. Manteniment de NRKs

Les NRKs van créixer amb DMEM (Gibco) suplementat amb 5% FCS (Biological Industries), 100 U/ml penicil·lina , 100 µg/ml streptomícina, x piruvat i 2 mM L-glutamina a 37° C amb 5% CO₂.

Les cèl·lules eren replantades 2 o 3 cops per setmana aspirant el medi antic, rentant amb PBS i afegint tripsina fins que es desenganxin. Seguidament es diluïen amb medi nou contant com a temps de duplicació 24 hores.

II.1.1.2. Manteniment de CHOs

Les CHOs van créixer amb medi HAM (Sigma) suplementat amb 10% FCS, 100 U/ml penicil·lina , 100 µg/ml streptomícina, x piruvat i 2 mM L-glutamina a 37° C amb 5% CO₂. Les cèl·lules eren replantades de la mateixa manera que les NRKs.

II.1.3. Congelació i descongelació de cèl·lules

Congelar:

- Les cèl·lules a una densitat d' $1 \cdot 10^6$ cèl./ml s'han ressuspès amb 100% FCS.
- S'ha afegit el mateix volum de DMSO al 20 % (10% concentració final) amb la precaució de fer-ho gota a gota i agitant lentament. El DMSO és un crioprotector que és tòxic per les cèl·lules, per tant, ràpidament s'han de guardar a -80°C . Després de tres dies és millor guardar-les amb N_2 líquid. Això permet mantenir-les viables uns quants anys.

Descongelar:

- Atemperem 25 ml a 37°C del medi apropiat en un falcon de 50 ml.
- Es descongela l'alíquota afegint el medi dins el criotub, i pipetejant lentament es passa al falcon. Així treiem el DMSO en que s'havien congelat les cèl·lules.
- Es centrifuga en la centrífuga de taula a 2500 rpm durant 5 minuts.
- Retirem el medi i resuspenem el pellet cel·lular amb el medi corresponent.
- Ho passem a una p-60 o F-25. No replantarem fins al 2^{on} dia després de la descongelació.

II.2. Condicions experimentals de diferents tractaments:

En els diferents experiments realitzats, s'han fet pre-tractaments amb diferents lligands conjugats per veure els estadis de l'endocitosi, amb diferents drogues que afecten la morfologia o funcionalitat cel·lular i amb hormones activadores de vies de senyalització.

II.2.1. Marcadors d'endocitosi

- 2.1.1. DEXTRÀ-FITC/Texas Red: El dextrà conjugat amb fluoròfors va ser comprat de MOLECULAR PROBES. La internalització de dextrà es realitzava a una concentració de 10mg/ml pel FITC i 4 mg/ml pel Texas Red diluït en medi sense suero i amb 0.5% BSA. La dilució es feia en 50 µl/cubre, es dipositava a sobre del cubre i en una cambra humida es deixava entrar a 37°C i 5% de CO₂ en la foscor.
- 2.1.2. TRANSFERRIN-FITC: La transferrina s'internalitzava a una concentració d'entre 20 i 200 µg/ml en medi 0.5% BSA. Com en el cas del dextrà, la internalització es feia en forma de gota a sobre del cubre.
- 2.1.3. Dil-LDL: LDL-Dil era internalitzat amb medi 0.5 % BSA a una concentració de 20-50 µg/ml. Es pot fer en un volum final d'1 ml. Conjugació explicada en l'apartat III.11.1.
- 2.1.4. ¹²⁵I-LDL: Després de conjuguar LDL amb ¹²⁵I (III.11.2), ens quedava a una concentració de 0.5µg/µl i obteníem 250000cpm/µl. En 1 ml de medi amb 1 % de BSA afegíem 1x10⁶ cpm.

II.2.2. Drogues

Les diferents drogues utilitzades en aquest estudi eren incubades amb les cèl·lules amb el medi cel·lular a 37°C i 5% de CO₂.

- 2.2.1. W13: 10 µg/ml durant 1h a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 10mg/ml en DMSO

2.2.2. W12: 10 μ g/ml durant 1h a 37°C i 5% de CO₂

Stock 10 mg/ml en DMSO

2.2.3. CHLOROQUINE (Sigma): 40 μ M durant 1h a 37°C i 5% de CO₂.

Amb ½ hora també es veia efecte.

Stock 100 mM en H₂O

2.2.4. BFA: 5 μ g/ml durant 1h a 37°C i 5% de CO₂

Stock 5 mg/ml

2.2.5. BAPTA (Calbiochem): 50 μ M durant 1h a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 13 mM (10 mg/ml) en DMSO

2.2.6. WORTMANNIN (Calbiochem): 1 μ M durant 1h a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 1 mM en DMSO

2.2.7. CYTOCHALASIN D: 5 μ M durant 5 minuts a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 10 mg/ml en DMSO

2.2.8. LATRUNCULIN A (Molecular Probes): 1 μ M durant 5 minuts a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 0.2 mM en H₂O

2.2.9. NOCODAZOL (Sigma): 5 μ M durant 1h a 37°C i 5% de CO₂.

2.2.10. ALLN: 500 μ M durant diferents temps a 37°C i 5% de CO₂.

Stock 10 mM en DMSO

II.2.3. Processament dels experiments de senyalització

2.3.1. DEPRIVACIÓ DE SERUM DE LES CÈL·LULES: Les cèl·lules CHO eren incubades amb medi sense sèrum abans d'activar-se durant 6 hores o bé durant tota la nit.

2.3.2. EGF: Les cèl·lules CHO eren incubades amb 10 ng/ml EGF durant 2 minuts a 37°C i 5% de CO₂.

- 2.3.3. TPA: Les cèl·lules CHO eren incubades amb 100nM TPA durant 2 minuts a 37°C i 5% de CO₂.
- 2.3.4. LISI CEL-LULAR: un cop activades les cèl·lules eren ràpidament rentades 2 cops amb PBS molt fred i lisades en 1 ml (per F-150) de tampó de lisi:

50 mM Tris-HCl pH:7,4

1 % Tritó X-100,

0.1 mM CaCl₂

150 mM NaCl

1 mM PMSF

1 µg/ml Aprotinin

1 µg/ml Leupeptin

0.1 mM Na₃VO₄

5 mM NaF

(Opcional: 5mM EDTA, 10 µg/ml fosfatidilcolina)

II.3. Immunocitoquímica

- Rentat - 2 x 1 min en PBS a temperatura ambient o a 4°C en el cas d'un assaig d'internalització, en agitació.
- Fixació - 10 min amb paraformaldèhid al 3.7%, preparat fresc a partir d'una solució mare al 40% filtrada conservada congelada a -20°C. També es pot fixar amb metanol a -20°C durant 2 min.
- Rentats - 3 x 3 min en PBS

- Permeabilització - si la fixació ha estat realitzada amb paraformaldèhid, seguidament es permeabilitzen les mostres durant 15 min amb una solució que conté 1%BSA (Sigma), 0.1% Saponina diluït en PBS a temperatura ambient i en agitació. El metanol per si mateix ja permeabilitza les membranes.
- 1er anticòs - durant 1 h s'incuben els cubres a 37°C amb una solució (igual a la de permeabilització però sense saponina si han estat fixades amb metanol) que conté el primer anticòs.
- Rentats - 3 x 3 min en PBS.
- 2on anticòs - Posteriorment s'incuba amb la solució del segon anticòs (igual a la de permeabilització, també sense saponina si la fixació ha estat feta amb metanol) durant 1 h a 37°C, la dilució serà de 1:50 pels anticòssos de Boehringer i 1:500 pels de Jackson.
- Rentats - 3 x 3 min en PBS.
- Muntatge - els cubres es munten sobre portaobjectes amb 4µl de solució Mowiol (Calbiochem).

Fixació PLP

Aquesta fixació la realitzaven quan anteriorment s'havia internalitzat dextrà, d'aquesta manera no el perdiem durant la immunocitoquímica:

- Internalització del lligand
- 2 rentats ràpids amb PBS molt fred
- Fixació: 2 h a temperatura ambient amb PLP (4% paraformaldehid en 40 mM sodi fosfat, 75 mM lisina, 9.1 mM periodat sòdic). Normalment es guardaven stocks a -20°C sense

el paraformaldehid i el periodat sòdic. Aquests eren afegits en el moment de l'experiment.

- Permeabilització: 10 minuts a temperatura ambient amb 0.5% BSA/PBS, 20 mM Glicina, 0.1% saponina.
- A partir d'aquí el procés és igual que la immunocitoquímica normal, afegint 20 mM de Glicina als anticossos i rentats amb PBS.

II.4. Microscòpia electrònica

II.4.1. Mostres en reïna Lowicryl:

A partir de seccions de 80-100nm obtingudes al ultramicrotom:

- Incubar la reixeta 5 min en PBS.
- 1h en 1er anticòs diluït en PBS 1%BSA.
- 3 x 3 min en PBS 1%BSA i 3 *jet wash* en PBS.
- 45 min 2on anticòs-or (1:40 per a proteïna A, 1:25 per a secundaris) en PBS, 1%BSA, 0.1% de tritó X-100, 0.1% Tween-20.
- 3 x 3 min en PBS, 1%BSA, 0.1% de tritó X-100, 0.1% Tween-20.
- 5 min en PBS 1%BSA.
- 5 min en aigua mQ.
- Contrastar: 7 min en 2% acetat d'uranil i 2 min en reactiu de Reynolds (clorur de plom) i rentar en *jet wash*.
- Assecar.

II.4.2. Mostres en crioseccions:

□ **Preparació de mostres**

- 2 rentats amb PBS després de treure el medi de cultiu
- Fixació. 8% paraformaldehid en 250 mM Hepes, pH 7.2, RT durant 1 h en agitació.
- 1 rentat amb PBS
- Scrapping. En 5 ml de PBS
- Centrifugació. 15 minut, 2500 rpm a RT
- Posar la gelatina. S'afegeix una gota de 10% gelatina en PB a 37°C a sobre del pellet.
- Desenganxar el pellet amb una agulla i centrifugar a 2000 rpm, 5'.
- Post-fixació. Afegir 0.5 ml de 3% de paraformaldehid en PB i es deixa a 4°C.
- Englobació
- Crioprotecció
- Crio-seccionament

□ **Immunolocalització**

- Incubar les reixetes 2 x 5 min en PBS 0.1M de glicina.
- 15 min en PBS 1%BSA.
- 1 h amb el 1er anticòs diluït en PBS 1%BSA.
- 3 x 5 min en PBS 1%BSA.
- 45 min amb el 2on anticòs (1:25, o 1:40 si és proteïna A) diluït en PBS 1%BSA.
- 3 x 5 min en PBS.
- 10 x 3 min en aigua mQ.

- Contrastar amb la solució (50 µl de 2% Acetat d'uranil i 450 µl de metil cel·lulosa) durant 10 min a 4°C.
- Assecar la reixeta sobre paper Whatman nº1. Deixar a temperatura ambient durant 15 min.

II.4.3. Anticossos utilitzats per immunocitoquímica en aquest treball

Anticòs	Hosta	Orígen	Dilució IMC
58K (Golgi)	ratolí	Sigma (G2404)	1:200
α2-Macroglobulina	conill	Sigma (M1893)	1:500
Actina	ratolí	ICN (69-100)	1:800
Annexin 6	conill	Stefan Jäckle	1:20
Catepsina D	conill	Paul Luzio	1:750
Celubrevina	conill	Joan Blasi	1:100
CD-MPR	conill	Annette Hille-Rehfeld	1:100
CI-MPR	conill	Annette Hille-Rehfeld	1:300
Caveolina	ratolí	TransductionLab	1:100
Caveolina	conill	TransductionLab	1:100
Espectrina	conill	Sigma (S1515)	1:100
Espectrina	ratolí	Sigma (S3396)	1:100
Lamp1	ratolí	Gustavo Egea	1:100
Igp110	conill	Paul Luzio	1:800
Igp120	ratolí	Paul Luzio	1:300
Manosidasa	conill	Gustavo Egea	1:7
Phaloidina-Rho		Molecular Probes	1:200
Rab5	conill	Santa Cruz	1:10
TfR	ratolí		1:250
Tranferrina	cabra		1:250
Tubulina	ratolí	Roche (1111876)	1:50

II.5. Fraccionament cel·lular

Es van utilitzar 2 gradients diferents segons el tipus cel·lular emprat.

II.5.1. NRKs

Les NRKs van ser homogeneïtzades de tal manera que la integritat dels orgànells no quedaven afectats. Amb aquest gradient vam poder separar lisosomes i pre-lisosomes de la resta de la cèl·lula:

- Replantar 6 F-150 el dia anterior a l'experiment donat que així són més fàcil de trencar.
- 2 rentats amb PBS fred
- Raspar les cèl·lules en 5 ml/F-150 de PBS
- Centrifugar 5 min a 750 rpm en una centrifuga de taula
- Rentar el pellet amb 5 ml de tampó d'homogeneïtzació HB (10 mM Tris pH 7.4, 250 mM sucrosa). Resuspendre amb una pipeta amb la punta tallada.
- Centrifugar 10 min a 2500 rpm en una centrifuga de taula
- Afegir al pellet 2 ml d'HB amb inhibidors de proteases i homogeneïtzar amb una xeringa amb agulla de 22G fins que es vegin al microscopi els nuclis nets.
- Centrifugar 15 min a 2500 rpm en una centrifuga de taula.
- Recollir el sobrenedant (PNS) i carregar-lo a sobre de 7 ml de percoll al 27% diluït en HB.

- Centrifugar amb el rotor 50Ti a 21000rpm durant 1h ½.
- Recullir fraccions de 500 µl aspirades amb una bomba des de baix.

II.5.2. CHOs

Amb aquest gradient aconseguíem separar endosomes primarencs dels tardans. Ens quedava una fracció a baix que constava de membranes:

- Replantar les plaques necessàries 1, 2 ó 3 dies abans de l'experiement. No cal replantar el dia anterior ja que aquestes cèl·lules es trenquen fàcilment.
- Homogeneïtzar com amb les NRKs però amb 1 ml d'HB (3 mM imidazol pH 7.4, 250 mM sucrosa).
- Portar el PNS al 40.6% de sucrosa i carregar-lo al fons d'un tub d'ultracentrífuga de 5 ml.
- Afegir a sobre 1.5 ml de 3 mM imidazol pH 7.4, 35% sucrosa
- Sobreposar 1 ml de 3 mM imidazol pH 7.4, 25% sucrosa
- Per últim afegir HB fins a 5 ml.
- Centrifugar amb el rotor SW50.1 a 36000 rpm durant 1h ½.
- Recullir fraccions de 500 µl aspirades amb una bomba des de baix.

II.6. Quantificació de proteïnes

La concentració de proteïnes es realitza pel mètode de Bradford. La solució de Bradford reacciona amb les proteïnes donant una coloració que és mesurable a 595

nm. Mitjançant la concentració coneguda d'una proteïna com a estàndard, s'extrapola i podem determinar la concentració proteica de les mostres.

1.- Pipetejar les quantitats de BSA o mostra (10 µl d'un F-150), aigua i reactiu de Bradford en tubs de 3 ml.

2.- Esperar 10' a RT. Llegir en un espectrofotòmetre a 595 nm.

Corba standard de BSA

STD (µg)	BSA (0,1 mg/ml) en µl	H ₂ O (µl)	2xBradford : 3xH ₂ O (µl)
0	0	500	500
5	50	450	500
10	100	400	500
15	150	350	500

II.7. Immunoprecipitacions

La immunoprecipitació és la tècnica que ens permet aïllar complexos de proteïnes dels extractes cel·lulars. Aquesta tècnica es basa en la unió de l'anticòs a l'antígen i arrossegar tot el complex mitjançant la unió a proteïna A conjugada a sepharosa ()

Tampó IP

50 mM Tris-HCl pH:7,4

1 % Tritó X-100,

1 mM CaCl₂

150 mM NaCl

1 mM PMSF

1 µg/ml Aprotinin

1 µg/ml Leupeptin

0.1 mM Na₃VO₄

5 mM NaF

- 2 rentats de les cèl·lules amb PBS fred
- Afegir 1 ml de tampó d'IP i escrapar. Deixar a 4°C
- Centrifugar 10' a 14.000 rpm en una centrífuga de sobretaula.
- S'incuben entre 1-3 mg de proteïna amb 2-5 µg d'anticòs. Es deixa en agitació tota la nit a 4° C. En el cas de Raf, s'uneix primer l'anticòs amb la proteïna G tota la nit i s'incuba el lisat 2 hores.
- S'incuba el lisat amb 35 µl de proteïna A-Sepharosa (50 % v/v en 20 % metanol) durant 1 h a 4°C.
- Per precipitar els complexos es fa un pols de centrifuga durant 6 sg en una centrífuga de sobretaula i es realitzen tres rentats amb el mateix tampó IP.
- Els immunocomplexos es separen electroforèticament en SDS-PAGE gels i es transfereixen les proteïnes a membranes d'Immobilon (Millipore), i es procedeix a fer el WB.

II.8. SDS-PAGE

La mostra proteica es mesclada amb tampó de mostres x4 el SDS del qual donarà la càrrega negativa necessària per que migri cap al pol positiu. La separació de proteïnes per mobilitat electroforètica (o pes molecular) es realitza pel sistema SDS-PAGE, les solucions que s'utilitzen són les següents:

Solució 1:

- 0.75M Tris-HCl pH 8.8 (90.825 g/l).
- 0.29% SDS (2.9 g/l).

Solució 2:

- 30% acrilamida (300 g/l).
- 0.8% Bis-acrilamida (8 g/l).

Solució 3:

- 0.25M Tris-HCl, pH 6.8 (30.28 g/l).
- 0.2% SDS (2 g/l).

Solució del gel resolutiu.

Prepararem 5 ml de solució per a gels prims (0.75mm) o 10 ml (el doble dels valors donats) per a gels gruixuts (1.5 mm):

		7%	8%	10%	12%	15%
1	Solució 1 (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
2	Solució 2 (ml)	1	1.4	1.7	2	2.5
3	H ₂ O (ml)	1.5	1.1	0.8	0.5	-
4	Temed (µl)	7	7	7	7	7
5	13% PSA (µl)	25	25	25	25	25

Solució del gel empaquetador

Gel de baixa concentració d'acrilamida on podràn migrar tots els tamanys de proteïnes i arribar empaquetades al gel resolutiu.

	stacking
1 Solució 2 (ml)	0.18
2 Solució 3 (ml)	0.75
3 H ₂ O (ml)	0.6
4 Temed (μl)	3.75
5 13% PSA (μl)	15

Laemlli tampó X4

- 40 mM NaP_i, pH 6.8.
- 40% de glicerol.
- 9 % de SDS.
- 2 mg/ml DTT.
- 0,5 mg/ml de blau de bromofenol

Tampó electròlit x 1 (2 l):

- 28.82 g Glicina.
- 6.06 g de Tris
- 2 g de SDS.
- Aigua mQ fins a 2 l.

II.9. Western-blotting

a) Transferència:

És un mètode pel qual les proteïnes separades en un gel de poliacrilamida es transfereixen a membranes de PVDF que les retenen, mitjançant un camp elèctric produït pels electrolits del tampó de transferència. Les proteïnes es transfereixen aplicant un camp elèctric de 60 V durant 2 h o 20 V tota la nit. Una vegada transferides les proteïnes, les membranes PVDF (com Immobilon) són hidròfugues i s'han d'hidratar mitjançant un tractament amb metanol i després un rentat amb TBST.

b) Western blot

Per poder detectar les proteïnes ens basem en l'especificitat dels anticossos d'unir antígens. Els anticossos poden ser monoclonals (normalment fets en ratolí) o policlonals (fets en conill, ovella, cabra, etc.).

- Bloquegem la membrana amb la solució de bloqueig 1 h. a RT per impedir la unió inespecífica dels anticossos a la membrana.
- Incubem durant 1 h el primer anticòs a la dilució adequada en solució d'incubació.
- Rentats 3 x 10' amb TBST.
- Incubem la membrana durant 45 minuts amb el segon anticòs (Biorad) contra l'hosta del primari que està conjugat amb peroxidasa (anti-conill, ovella, cabra...) diluït 1:4000 en solució d'incubació.

- Rentats 3 x 10' amb TBST.
- Rentat 1 x 5' amb TBS
- Revelat amb ECL. 1 minut de reacció seguit del revelat.

TAMPONS:

Tampó de Transferència

25 mM Tris HCl pH 8.3

192 mM Glicina

0,1 % SDS

10 % Metanol

Solució de Bloqueig

5 % Llet en pols desnatada
en TBST

Tampó TBST

0,05 % Tween Twenty en TBS

Tampó TBS

50 mM Tris HCl pH 7,4

200 mM NaI

II.10. Preparació de LDL des de plasma humà

- 1 bossa de plasma humà no congelat (Hematologia de l'Hospital Clinic).

1er dia

- Mesurar el volum i portar-lo a una densitat de 1.025 gr/ml amb KBr (a 140°C perquè és molt hidrofílic) sempre a 4°C amb la fórmula següent:

$$0.026 \times \text{Volum en ml} = \text{gr KBr}$$

- Omplir els tubs (Beckman, Polialomer open top. Ref.) fins a 30 ml.
- Centrifugar a 38000 rpm amb el rotor 55.2 Ti durant 20 h

2on dia

- Descartar el sobrenedant (VLDL/IDL) que té un color blanc i fer un pool amb la resta (LDL/HDL) que és taronja.
- Centrifugar a 38000 rpm amb el rotor 55.2 Ti durant 20 h.

3er dia

- Descartar fracció superior.
- Portar el pool a una densitat de 1.050 gr/ml amb KBr amb la fórmula següent:

$$0.038 \times \text{Volum en ml} = \text{gr KBr}$$

- Omplir els tubs petits (Beckman, polialomer open top ref.) fins a 8-10 ml.
- Centrifugar a 38000 rpm amb el rotor 50 Ti durant 20 h.

4rt dia

- Agafar la fracció superior taronja (LDL) i descartar la fracció inferior groga (HDL). Quan agafem el LDL ens assegurem

d'agafar-ho tot important-nos inclús una mica de la part inferior.

- Centrifugar un altre cop a 38000 rpm amb el rotor 50 Ti durant 20 h.

5è dia

- Recullir el LDL de la fracció superior procurant no deixar-ne en el tub (8-10 ml).
- Adaptar un filtre de 0.22 μm entre una xeringa amb el LDL i una agulla la qual s'introduirà en un vacutainer de 10 ml. Tapat amb paper d'Alumini pot mantenir les seves propietats 1 o 2 mesos.

II.11. Marcatge de LDL

El LDL es va marcar amb Dil si es volien observar les preparacions al microscopi de fluorescència o amb ^{125}I si es volia quantificar la seva degradació:

II.11.1. Dil-LDL

- Dialitzar el LDL tota la nit en 0.9% NaCl
- Preparar 1.5 ml de LDL a una concentració de 2 mg/ml diluint-lo en PBS 0.5% BSA. Abans de fer la barreja ha d'estar tot a 37°C per evitar que el LDL s'agregui.
- Afegir 10 μl de Dil a 30 mg/ml (Molecular Probes; D-282) per cada mg de LDL (30 μl).
- Incubar la barreja de 8 a 10 hores a 37°C. Barrejar de tant en tant suaument. No vortex.

- Portar el LDL-Dil a una densitat de 1.063 gr/ml amb KBr:
$$\text{gr KBr} = V \times (D_f - D_i) / 1 - (0.312 \times D_f)$$
$$\text{gr KBr (1.5 ml)} = 0.128 \text{ gr}$$
- Carregar-lo al fons d'un tub de 5 ml i afegir a sobre 1 ml de 1.063 gr/ml KBr.
- Centrifugar 18-20h a 36000 rpm amb el rotor SW50.1.
- Recullir la banda més rosa (1.5 ml) que es troba a dalt de tot. Tindrem una concentració de 2mg/ml de LDL-Dil.
- Dialitzar tota la nit amb 0.9% NaCl.

II.11.2. ¹²⁵I-LDL

- Barrejar en un eppendorf 500 µl de LDL (5mg/ml) amb 400 µl de 1M Glicina pH10
- Barrejar en un altre eppendorf 100 µl de 1M Glicina pH10 amb 6 µl de ¹²⁵I (Amersham. Ref. IMS30).
- Pipetejar el contingut del 2on eppendorf a dins del 1er.
- Afegir 40 µl de sol·lució ICL (10 µl ICl, 2M NaCl en 0.1N HCl més 90 ml de cloroform). Barrejar abans d'utilitzar i procurar agafar tan sols de la fase superior.
- Barrejar suaument
- Incubar 2-3 minuts
- Passar la barreja radioactiva per una columna PD10 previament equilibrada amb PBS deixant que penetri totalment dins la columna.
- Afegir PBS i descartar el que vagi sortint de la columna fins que veiem el LDL (groc) a punt de sortir.

- Recullir el LDL en 2 eppendorfs i mesurar quina mostra té més activitat (aprox. 250000 cpm/ μ l)

II.12. Assaig de degradació de LDL

- Replantar cèl·lules en plaques de 6 ó 12 pous procurant posar la mateixa quantitat de cèl·lules.
- LPDS. Incubar les cèl·lules 24h abans del marcatge amb sèrum deprivat de lipoproteïnes perquè se sobreexpressi el receptor de LDL.
- 30' amb DMEM 1% BSA
- Incubar les cèl·lules amb 1×10^6 cpm 125 I-LDL en 1-2 ml de medi DMEM 1% BSA durant diferents temps. Incubar un pou control amb 100 vegades d'excés de LDL freda.
- Agafar 1 ml de medi/pou en un eppendorf
- Afegir 100 μ l de PBS 10% BSA, 0.5 ml de 50% TCA
- Vortex
- Deixar 30 minuts sobre gel
- Afegir 325 μ l de 0.7M AgNO₃
- Vortex
- Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm
- Agafarem tot el sobrenedant per contar la radioactivitat.

II.13. Microinjecció de cDNAs en el nucli de NRKs

Va ser necessari recórrer a la microinjecció per poder expressar els vectors pcDNA-Anx6 i pcDNA-Anx6 $_{\Delta 175}$ en NRKs, degut a que per mètodes de transfecció tenien una

eficiència molt baixa. Aquests vectors són adequats per expressar-se en eucariotes i van ser proporcionats pel Dr. T. Grewal d'Hamburg.

- Cèl·lules NRK van ser crescudes en cubres els quals es transferien a una p60 amb DMEM-Hepes 5 % FCS per així poder aguantar més a fora de l'incubador.
- Es microinjecten els nuclis de les cèl·lules amb el cDNA a una concentració final de 100ng/μl juntament amb 1% Dextrà-FITC (150.000 mol. wt., Sigma) com a marcador d'injecció. Pressió d'injecció.
- Es deixen recuperar 1h amb DMEM 5% FCS nou i després seguirem amb el tractament adient (fixació, internalització de lligands...).

II.14. Proteïna de fusió GST-Anx6

II.14.1. Construcció de GST-Anx6

Per la construcció del gen recombinant GST-Anx6, el cDNA de l'annexina 6 full length de 2.0 kb va ser clonat en un vector pGEX-KG (Pharmacia) modificat pel Dr. Oriol Casanovas (pGEX-KG-cycD3). El gen de l'anx6 va ser tallat del pcDNA-Anx6 per les dianes de restricció Nco-Xba i clonat en el pGEX-KG-cycD3.

II.14.2. Expressió i purificació de GST-Anx6

Per realitzar assaigs de Pull down s'ha utilitzat com a eina Anx6 fusionada a GST (Glutation S Transferasa). Per tal motiu, s'ha clonat el cDNA en el vector

d'expressió procariota pGEX-KG el qual conté el gen de la GST al que serà l'extrem 5' d'Anx6. La GST té la particularitat d'unir-se a la glutatona en estat reduïda, el que ens permet utilitzar aquesta propietat per poder purificar per cromatografia d'afinitat aquelles proteïnes recombinants amb GST.

- 1.- El plàsmid d'expressió utilitzat ha estat el pGEX-KG. Mitjançant tècniques de biologia molecular, es clona el fragment a expressar en *frame* amb la proteïna GST.
- 2.- Es transforma la línia bacteriana BL 21-Lys E:
 - 0,5 µg DNA plasmídic s'incuben 30' a 4° C amb 100 µl de bacteris competents de la soca *E coli* BL 21-LysE.
 - La internalització del DNA es realitza per shock tèrmic a 42 ° C 45".
 - Després es mantenen els bacteris en LB durant 1 h a 37 ° C.
 - Es sembren els bacteris en plaques LB suplementades amb l'antibiòtic corresponent (50 µg /ml Ampicilina) i es deixen tota la nit.
- 3.- Una de les colònies es fa créixer en 5 ml de medi LB + 50 µg/ml Ampicilina tota la nit a 37 ° C agitant-se (200 rpm).
- 4.- Es dilueix 2 ml en 200 ml del mateix medi i es fa créixer fins a la fase exponencial (OD a 600nm de 0.8).
- 5.- S'afegeix 0,5 mM IPTG i es deixa 16 h a 37° C agitant-se. A les 4 h es pot afegir altre vegada 0,5 mM IPTG.
- 6.- Es recullen els bacteris centrifugant 10' a 3.000 x g
- 7.- Congelem el pellet a -80°C perquè després sigui més fàcil el trencament de membranes. Aquest pas és molt important.
- 8.- Es ressuspenen amb tampó NETN (20 mM Tris pH 8 + 100 mM NaCl + 1 mM EDTA + 0,5% Nonidet P40) amb inhibidors de proteases (1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina).
- 9.- Soniquem 3 x 10" per trencar els bacteris, tot i que aquesta soca presenta els plàsmids Lys que li impedeixen formar una paret bacteriana normal i es poden trencar per congelació i descongelació.

10.- Centrifuguem durant 20' en un rotor SS-34 a 15.000 rpm i guardem el sobrenadant. Segons el sediment que quedi es pot fer una nova sonicació amb 5 ml del sobrenadant del pas 8.

11.- Els sobrenadant es fan servir per aïllar les proteïnes GST recombinants emprant la seva capacitat d'unir-se a la glutatona. S'afegeix 2 ml de boles de Sepharosa 4-B –glutatona amb l'extracte obtingut dels bacteris durant 30' a 4° C rodant.

12.- Es fan tres rentats amb tampó NETN (25 ml cada un) i s'elueix amb 2.5 ml de tampó d'elució (50 mM Tris pH 9.6 + 120 mM NaCl + 20 mM Glutatió reduït) incubant 5' a 4° C rodant. Els rentats es treuen centrifugant 5' a 3000 rpm.

13.- Segona elució amb 2.5 ml de tampó d'elució. A partir d'aquí es sol dialitzar la proteïna front el tampó que es vulgui i es congela a –80° C. És interessant dialitzar contra PBS si després es vol tallar la GST amb Trombina.

II.15. Producció d'anticossos contra GST-Anx6

II.15.1. Immunització del cunill

Amb la proteïna de fusió purificada GST-Anx6, vam immunitzar un cunill per produir anticossos. Abans de la primera immunització, es van extraure 20 ml de sang per tenir així un pre-immune com a control.

1. Injecció primària subcutània: 900 µg GST-Anx6 + PBS fins 1 ml + 1 ml Freund's complete adjuvant. Barrejar enèrgicament amb 2 xeringues connectades per un tub. Punxar en 5 llocs diferents a sobre el llom.

2 SETMANES

2. Primera injecció de record subcutània: 450 μ g GST-Anx6 + PBS fins 1 ml + 1 ml Freund's incomplete adjuvant. Procedir igual que en 1.

6 SETMANES

3. Segona injecció de record subcutània: igual que el punt 2.

10 dies

4. Sagnada 1: Agafar 20 ml de sang extraient-la per l'orella.

3 dies

5. Sagnada 2: 20 ml

3 dies

6. Sagnada 3: 20 ml

3 dies

7. Sagnada 4: 20 ml

2 SETMANES

8. Bleed out: desagnar completament al cunill.

Totes les sagnades es van recollir en falcons de 50 ml i es van deixar durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es va deixar tota la nit a 4°C. Al dia següent es recuperava el suero i es centrifugava el coàgul durant 10 minuts a 3000 rpm per extraure la resta de suero. Les alíquotes es van congelar a -80°C i una part es va guardar a 4°C per testar per Western Blot.

II.15.2. Purificació per afinitat de α -GST-Anx6

Les columnes d'afinitat són una eina important per a poder aïllar molècules afins a la molècula que es troba unida a una matriu o purificar anticossos. En el present treball, s'han utilitzat columnes GST-Anx6 unides a CNBr-Sepharosa-4B.

Tampó d'unió

100 mM NaHCO₃

500 mM NaCl

Solució de saturació

1 M Tris HCl pH: 8.0

Tampó bàsic

100 mM Tris HCl pH: 8.0

500 mM NaCl

Solució d'activació Sepharosa 4B

1 mM HCl

Tampó àcid

100 mM NaCH₃COO pH: 4.0

500 mM NaCl

Tampó de càrrega

50 mM Hepes-KOH pH: 7,6

50 mM KCl

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

1 mM DTT

10 % glicerol

Preparació de les columnes GST-Anx6-Sepharosa-4B:

Les columnes d'afinitat es van construir acoblant 5 mg de proteïna purificada amb CNBr- Activated Sepharose 4B (Pharmacia Biotech).

- 1.- Per 5 mg de proteïna es prepara 1 ml de columna (1 gr dona 3.5 ml de columna) de CNBr- Activated Sepharose 4B i es renta durant 15' amb 200 ml de la solució d'activació. La solució s'elimina en un filtre de vidre connectat al buit fins que la resina formi una crosta. Amb això es netegen els additius que porta la resina.

- 2.- Es dissol la proteïna amb tampó d'unió.
- 3.- Les proteïnes s'acoblen a la matriu incubant 2 h a 4°C o ON a 4°C agitant end over end amb el tampó d'unió.
- 4.- Després de tres rentats amb a la solució d'unió, s'atura rentant amb 1 M Tris-HCl pH: 8.0. Així s'aconsegueix bloquejar els grups que reaccionen amb amines lliures no unides a la proteïna.
- 5.- Per fer els enllaços covalents permanents, es fan rentats alternatius amb tampons àcids i bàsics.
- 6.- La Sepharosa-4B-amb la proteïna unida es dipositen en una columna i s'equilibra amb la solució d'unió. Ara ja està llesta per fer els assaigs de cromatografia d'afinitat.

Purificació per afinitat de l'anti-GST-Anx6 amb columnes GST-Anx6 Sepharosa-4B:

- 1.- Per fer els assaigs cromatogràfics, hem utilitzat 50 mg de proteïna total de suero extrets amb tampó de càrrega.
- 2.- Hem rentat exhaustivament la columna amb tampó de càrrega
- 3.- Eluïm l'anticòs purificat amb un volum de 5 ml de tampó d'elució.

II.16. Experiments de pull down amb GST-Anx6 I GST-Anx6₁₋₁₇₅

Un flascó-150 de cèl·lules van ser lisades amb 1 ml de tampó de lisi fred (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1 mM CaCl₂). 75 µg de GST-Anx6 i 21 µg of GST es van incubar durant 90 min amb 40 µl de Glutathione Sepharose at 4°C en PBS. Després de centrifugar, GST-Anx6-Sepharose va ser incubada amb 600 µg

d'extracte cel·lular durant 2 hores a 4°C i es va recollir el material unit amb un pols de centrifuga. Després de fer tres rentats amb el tampó de lisi, es va eluir la proteïna unida amb 30 µl de tampó de mostra 2X i van ser analitzades per electroforesi i Western-blot.

II.17. Assaig d'unió de Ras-GTP a RBD

Es va utilitzar la capacitat que té Ras-GTP per unir RBD (Ras-binding domain of Raf-1) per quantificar l'activació de Ras (de-Rooij J and Bos JL. (1997). Empravem un flascó de 150 mm per cada condició i es lisaven les cèl·lules amb tampó de lisi REB (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, 5mM NaF, 10% (v/v) glicerol, 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.1mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM aprotinin and 20 µM Leupeptin). Després de centrifugar 5 minuts a 14000 rpm, es va quantificar la proteïna en el sobrenedant. GST-RBD es va acoblar a Glutathiona unida a boles de sepharosa abans de ser incubat amb 600 µg de lisat durant 2 h at 4 °C. La sepharosa amb la proteïna unida es va rentar 4 cops amb el tampó REB i finalment es va eluir la proteïna amb 30 µl de tampó de mostres 2X. Les proteïnes unides es van córrer en und gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana d'immobilon i es van analitzar per Western Blot amb anti-(pan)-Ras (Oncogene Sciences, 1µg/ml).

II.18. Assaig kinasa de Raf

Per mesurar l'activitat Raf-1, cèl·lules CHO (1 flascó 150 mm/tractament) es van lisar amb tampó de lisi (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, 5mM NaF, 0.1mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM aprotinin i 20 mM Leupeptin) i el sobrenedant va ser immunoprecipitat amb 2 µg d'anti-Raf

(Transduction laboratories) pre-acoblat amb 20 μ l de protein G-sepharose (Pierce) durant 2 h a 4°C. Els immunoprecipitats es van rentar 3 cops amb 30mM Tris, 0.1 mM EDTA, 0.3% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.1% Tritó X-100, 5 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4 amb quantitats decreixents de NaCl (1M, 0.1 M i sense sal). La proteïna immunoprecipitada es va incubar durant 30 min a 30°C amb 20 μ l de tampó MEK (30 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 0.3% b-mercaptoethanol, 10 mM MgCl_2 , 0.1% (v/v) Triton X-100, 5mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 0.8 mM ATP, 6.5 mg/ml GST-MEK, 100 mg/ml GST-ERK2), i la reacció es va parar afegint 20 μ l de tampó Kill (30 mM Tris, 6 mM EDTA, 0.3% b-mercaptoethanol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4). Després de centrifugar es van incubar 6 μ l del sobrenedant amb 24 μ l de tampó MBP durant 15 min a 30°C. Després es van pipetejar 24 μ l a sobre de paper P81 i es van rentar 3 cops x 15 min en 75 mM àcid ortofosfòric. Els papers es van introduir en vials per ser comptats en un comptador de radiació β .

III.

Resultats