



L'ANNEXINA A6 REGULA EL TRANSPORT DE CAVEOLINA

Tesi Doctoral presentada per Laia Cubells Diez
per optar al grau de Doctora en Biologia

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

Barcelona, novembre 2008

Als meus pares, que sempre hi són.

Quatre anys passen molt ràpid, però el que passa dins seu no tant. Replantar, fixar, pensar, llegir articles sense parar. Photoshop, ppt... ara no va l'ordinador, o no hi ha tinta, o s'ha de buscar alguna cosa durant hores pel laboratori perquè ningú sap qui no l'ha desat al seu lloc. Entusiasmar-se, desil.lusionar-se, enfadar-se. Debats interminables des de les poïates. Fer experiments, sense final. Frustració, ràbia. Victòria!. Sentir-se molt bé, o molt malament. Èxits i desastres. La teva feina = la teva religió. Gaudir dels seminaris. Compartir les experiències dels altres. Anar coneixent a la gent, sense pressa. Rient, creixent, compartint moments. A poc a poc, et van llaurant la pell. Calçotades, mals rotllos, secrets i secretets, descobrir les cases de cadascú, la família de cadascú, els gustos. Descobrir... això no és una feina normal, la ciència atrapa, t'hi aboques. Abans tenia una visió idealitzada de la ciència, i dels científics. Creia que els científics eren purs, els únics que realment buscaven el saber pel saber. Creia que la ciència al nostre país era més europea i menys precària. Creia que els científics es dedicaven a descobrir... i en això no m'equivocava. He descobert; he descobert que la ciència m'agrada, que la biologia m'agrada, que vull seguir buscant respostes. Entendre coses que encara no s'han entès. He descobert bons i mals científics, qualitats, i sobretot defectes del *Ministerio*, i que no sempre guanya el millor, sovint guanya el més conegut. El màrqueting, la producció, la productivitat... també han invadit la ciència. Com nens petits, ens ensenyen que de vegades val més aprendre definicions dogmàtiques que plantejar-nos les nostres pròpies preguntes... perquè el més important és produir, i no pensar. No es busca només el saber pel saber.

Històries increïbles de com la gent ha començat a treballar, sense diners, a llocs inversemblants. Sous vergonyosament baixos de becaris i veterans, sous vergonyosament alts de personatges mediàtics. Quina poca representació del nostre país als congressos internacionals, i quina gran qualitat dels congressos d'aquí. Grans emocions, i grans decepcions. La màgia d'un bon resultat, del primer Western, de veure la il.lusió que encara conserven alguns dels que ja fa molts anys que s'hi dediquen. Una tesi no s'escriu en tres mesos, ni en tres setmanes. Una tesi es comença a escriure (i a corregir) a partir del primer dia.

És un treball d'equip, un equilibri fràgil difícil de trobar... també és un treball personal, una feina interior, que cadascú ha de fer sol. Ningú entén de què treballa (i encara sort de la Laia de Porca Misèria), o el que és pitjor, tothom em pregunta: "vols dir que això serveix d'alguna cosa?"

Arribarà un dia que el progrés de les nacions no es mesurarà per les seves indústries, exèrcits, edificis. Les millors societats seran les que tinguin científics creatius, enginyers innovadors, i empresaris amb capacitat per a crear productes d'un alt valor afegit. Cal que garantim la prosperitat de la societat formant joves perquè puguin desenvolupar el seu talent i esdevenir competitiu per a l'economia del coneixement, que determinarà el futur dels països.

La nova economia no és la "mà d'obra", és el coneixement, en tots els àmbits.

La ciència no només és rigor, formalitat, disciplina. La recerca ha de tenir qualitats com la imaginació, la creativitat, la llibertat.

I si, la ciència és vil; egoista; avariciosa; tendenciosa, dogmàtica, esclavitzant, precària. Però també fantàstica, inexplicable, irrepètible, poètica.

Tots aquests moments, tenen una mica de Carles. No hagués descobert res d'això sinó hagués estat per tu. Gràcies. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, per totes les vegades que m'has corregit encara que jo m'hi resistís. Gràcies per l'entusiasme, per les idees, pels articles. Per sempre saber com relacionar-ho tot dins de la cèl.lula. Per les paraules fugaces, que signifiquen molt i poc. Gràcies per això tan gran que m'has donat l'oportunitat de conèixer: la ciència. Tot i que amb valors i prioritats molt diferents, espero haver estat a l'alçada. Aquí tens, ha arribat el moment de recollir *the harvest*.

Afortunadament, *times are changing*. Així ha de ser. El temps, segons el seu vell costum, passarà; però ens queden per sempre les coses que l'han omplert. Sigui on sigui que em porti la meua carrera, sempre et recordaré: com el primer científic que vaig conèixer.

Gràcies,

A l'Albert Lu, que estarà encantat de ser el primer de la llista. Perquè has omplert aquesta tesi, i el laboratori. D'olors, colors, alegria, i adhesius de *Free i skate or dye*. Gràcies per escollir-me, per deixar-me conèixer de molt a prop aquest Albert Lu que tothom intueix però tan poca gent coneix. Sense tu, res hagués estat el mateix. Les festes de carnestoltes a la Facultat, les esquiades, calçotades, seminaris... Gràcies per fer-me plantejar coses, als seminaris i a fóra. Gràcies per fer que em dediquessin un *solo* de violí, per les teves crítiques de jazz (sobretot del Jamie Cullum) tan visceral. Per la postal d'aniversari. Gràcies, per mirar-me i somriure. Per explicar-me mil vegades com va l'espectro, com és la cua del K-Ras, o que els pèls de dàlmata es fan servir per tallar blocs. Em quedo amb una frase que va dir un dia el Jaumet "al Lu se l'ha d'estimar tal com és". I, qui sap, potser d'aquí uns anys podem demanar un projecte junts " *K-Ras & Anx6: smooth operators in late endosomes*".

Siscu, gràcies. No cal que busquis més Itaca, perquè tu ets Itaca. Un lloc on tot és honest, net, serè, noble. Gràcies per ajudar-me cada dia, amb els experiments, amb les hipòtesis. Per mai tenir un no (crec que aquesta és la frase més repetida quan la gent parla de tu). Tens el meu respecte i la meva admiració. Em va encantar la frase del Francesc Vinyals : « al Siscu durant el dia 10 vegades el vols llençar per la finestra, però 25 et salva la vida. El balanç és sempre positiu. » De tu m'enduc la passió per aprendre. I la humilitat, de sempre pensar que es pot saber més del què es sap. Les teves doctorandes diuen que ets el millor *jefe* que es pot tenir. Ni articles, ni contractes, ni projectes; aquest és el millor reconeixement.

Jemina, va, que també et mereixes medalla al pòdium dels primers. Gràcies veïna de poiata. Ha estat un plaer compartir amb tu, tan paral·lelament, aquest viatge... des del principi fins al final. No sé qui em dirà quants microlitres caben en un pou de quinze a partir d'ara... Com hem rigut amb les cançons marroquines sense lletra que et posava o amb la del que anava al dentista i es va equivocar de pis, o aprenent a conduir la teva moto. Gràcies per compartir amb mi experiments científics i no científics, dies d'estiu amb samarretes de conjunt i dies nevats d'hivern, confidències, dubtes, debats, *muchachitos*... Estic molt contenta d'haver-te conegut. No et faci por ser la més sensible, la més amiga, la més senzilla, la més decidida, ets fantàstica tal com ets. M'agrada molt veure't feliç. Deixem els dubtes al 303, ja no són dues setmanes, seguim endavant, i si ens equivoquem, no passa res: sempre podem muntar el restaurant aquell a Gràcia.

Anna Lladó, quin honor que em regalis el teu talent i la teva atenció en un moment tan especial. T'admiro, i et respecto, com algú que ha obert camí i m'ha ensenyat a espavilar-me. Gràcies per l'època que hem compartit al laboratori, quantes emocions i berenars... Gràcies per encomanar-me des del principi la il·lusió per la ciència. És com un regal trobar-se algú tan motivat treballant al teu costat. Sembla ahir que jo començava, i tu t'emocionaves perquè la Lídia llegia la tesi... i vivíem al carrer Martí. Però la vida, com els endosomes, no para de moure's... Gràcies per compartir amb mi el moviment de totes dues coses. No cal tenir un mirall dicroic ni un filtre especial per adonar-se de la llum que desprenen. Els principis i els finals sempre van junts, i el final de l'època al nostre estimat laboratori s'uneix amb el principi de l'època que comença... en la que encara hi seràs oi?

Maria Calvo, gràcies per ser tan propera des del primer dia. Gràcies per aquesta complicitat tan còmplice, potser per haver tingut el mateix jefe. Gràcies per la teva paciència i dedicació, per tot el temps que m'has dedicat i tot el què m'has ensenyat. Transmets serenitat i sinceritat, fas les coses bé de veritat, tres qualitats molt importants i difícils de trobar al laboratori. Gràcies per fer-me participar de petits moments importants, el primer dia d'escola de les teves filles, els teus embarassos, els teus records de la tesi. A poc a poc, com formiguetes, hem compartit engrunes de les nostres vides. Gràcies. Tant de bo allà on vagi sempre tingui algú com tu a prop.

Anna Bosch, família Bosch, Llibreria Bosch, Janna, Mila, Karim, Sant Jordi, Woody Allen, concerts de jazz, de RNR, teatre, dansa, festes de 40 anys, política, cròniques de viatges, maternitat, matinals infantils a Portal Nou, elogis de la furgo, esquiades... espero que la llista de coses que compartim no pari de créixer. Gràcies per ser l'exemple de com de fàcil pot ser fer les coses bé, gaudir de la vida, i ser feliç. M'agrada molt haver-te conegut, i seguir-te coneixent, perquè estic segura que ens seguirem veient. Però crec que cada dia, durant un momentet a l'hora de dinar, et trobaré molt a faltar.

Elena, casi me olvido de ti, porque siempre estás por ahí... pero gracias por estar tan cerca, en el barrio, y en el laboratorio. Siempre viajando, y en realidad tú ya eres como un viaje. Mucha suerte con los gradientes... y con tu tesis o tus tesis.

Marta, la germana gran que sembla la petita, la quarentona que sembla de trenta, la postdoc que està amb els doc... gràcies per aquest huracà que aixequés amb la teva vitalitat característica. Encara que pugui semblar que no, ets molt transparent i sensible, encomanes el riure i també les preocupacions. Valora't, i fes-te valorar. Potser no compartim la filosofia de treball (tu ets d'una altra època, jejeje), però sí la filosofia de vida, i m'encanta. Gràcies per compartir amb mi bones estones a casa teva, al teu barri, fent cerveses, amb les nebotetes, al teatre, o parlant d'experiments. Jo he pogut tenir la germana gran que mai he tingut per descobrir la Barcelona canalla, i tu la germana petita desastre -la teva de veritat no és desastre- per poder renyar de tant en tant i per poder-li ensenyar coses. M'afalaga que perdís el temps discutint amb mi. Podem seguir discutint tant com vulguis.

Albert Pol, parlant de germans, ens podíem haver comportat com dos bons germans del mateix pare científic que som, però no ho hem sabut fer. Gràcies per ajudar-me a decidir entre la feina i la ciència, la vam encertar. Gràcies per haver contribuït als meus primers passos. Caure, aixecar-se, ensopegar. Me'n recordo que un dia em vas explicar que la teva tesi començava com Star Trek. "*L'espai l'última frontera. Aquests són els viatges de la nau estelar Enterprise. En missió permanent d'explorar móns nous i desconeguts. Arribant fins allà on mai no ha estat ningú.*" Com era l'Albert al 98? Es bo saber disfrutar dels principis dels altres, ajudar-los, ho tens a les teves mans, aprofita-ho. Deixem les conquestes i les batalles pels d'Star Trek.

Gràcies a les Annexines, Sandra i Meri, que ens hem annexionat molt bé! Cada una amb la seva identitat pròpia però hem sabut cooperar. Espero que jugueu molt amb les joguines que us deixo!

Maite, vaig riure molt amb els múltiples intents perquè et polimeritzés un gel. Maria, sempre vens a tots els sopars que organitzem els del Lab303, això sí que és una bona assistència tècnica!

Als nous, Albert, Adam i Meri, gràcies per l'energia i la il·lusió... que em fan recordar quan vaig començar.

Als del laboratori gran: gràcies Mireia... hem compartit la primera adolescència i la segona (en la que també fan falta cerveses de tant en tant)... sempre que he necessitat sortir al passadís, has estat amb mi (ara el Fèlix no es deia Fèlix). Que bé tornar-te a trobar, en aquesta etapa de somnis i projectes de vida. Espero que no ens tornem a perdre la pista. Gràcies Neus Abella, per tots els cafès que hauríem d'haver fet. Només saber que hi eres ja era com fer un cafè. Quan vulguis comencem a recuperar-los!Paky, com vam riure a San Francisco eh? A veure si el Marc és tan bon company com tu! Eva Pombe, gràcies per aquesta mirada que llences a l'ambient, sempre

tens un gest amable. Ets un bon exemple a seguir. I a tots els que queden (sense voler deixar-me ningú): Alba, Alba, Natàlia, Patri, Blanca, Jaumet, Miriam, Maria, Noèlia, Eulàlia, Xus, Montse, Teresa, Núria, Carme... que cadascú ha aportat una peça al conjunt, fent d'aquest laboratori un lloc fantàstic (almenys de vegades). Un laboratori no és només una sala, amb centrífugues, pipetes i poiates. Té un esquelet que el sosté, i és la gent que el forma, que el manté viu i el fa créixer, que l'omplen de sensacions. Gràcies a tots per fer que fos així. M'agradaria poder quedar-me un bocinet de cadascú de vosaltres, i endur-me a casa dins una capsula el laboratori sencer... per recordar-vos sempre que volgués.

Rosa, m'agradaria poder fer una altra tesi i tenir-te de jefa... almenys el despatx ja sabia on és! Neus, no conec gaire la teva feina, però sento que hi ets, sempre estàs aquí, al laboratori, als seminaris, al bar, a la junta de la universitat, als despatxos... i això per mi té molt valor. Gràcies. Oriol, gràcies per l'entusiasme per la gent, per la ciència, per la política, per les pernillades... es troba a faltar.

Comissió de Festes: Ignasi, Ana D, Raffy, i Sandra G. Que bé que ens ho hem passat eh? Festes i *marujeos*, sempre arreglant el lab. Això és irrepentible, mai més tornaré a trobar una comissió tan genial. Ignasi, no canviïs mai, que has de fer feliç a moltes dones! Pacència que és la mare de la ciència! Ana, tu sigues sempre amb tu alegria y afán de organizar cosas, que esto también ayuda a trabajar, y haz que te lo valoren. Raffy, quan no trobis el Balanyà, em truques!. Sandra Guaita, ens ha faltat temps per conèixer-nos millor però crec que ens haguéssim entès.

Al passat del laboratori, als que ja no hi són, però que per mi sempre hi han sigut i sempre hi seran: la Silvia i l'Iñaki. Gràcies per ser-hi quan jo vaig arribar, va ser una època genial. Dos bons científics i bons amics que mai oblidaré. Heu estat per mi dos directors... cadascú d'una tesi diferent (aquesta és la tercera).

A la Elina Ikonen, Matts, Rikka, Anna, Maurice, Oüttio... i tot l'equip de Helsinki, que m'han donat la possibilitat de tastar com és la ciència amb diners, en un país model de l'Estat del Benestar.

A tots els investigadors, *Ramón y Cajals*, etc, que han lluitat i han sobreviscut, han marxat i han tornat, donant-nos als que comencem l'oportunitat de fer bona ciència també al nostre país.

Als de Castellar, als de sempre, primers amors i desamors, monitors, mestres... que em van fer sentir tan especial, valorant-me, encomanant-me la inquietud per saber, l'entusiasme per les coses, que m'han fet ser com sóc. Gràcies al Ramon Montes, mestre d'EGB, que em va fer creure en mi, i em va ensenyar a expressar-me sense por.

Gràcies a l'Eva, per estar a prop meu, ja fa més de vint anys... que vivim paral·lelament, perseguint notícies o cèl·lules, a Barcelona, Castellar o Cardedeu, però paral·lelament. Als amics de la universitat: Santi, Pere, Ariel, Guisi, Lluís, Sandra, Neus, Ariadna, amb qui vam anar descobrint la biologia, la joventut, i la vida simultàniament. Això a la UAB és encara millor. Ariadna... és impossible en una frase? oi tant que no: ets del meu raconet. Gràcies al Jordi, sempre amb un somriure i un *durum* a punt. Al Carles Salas i al grup de dansa de la UAB, gràcies per Bit, Segle XX, Personal, Mentides, Baraka, 10 anys, Madrid, París, Apolo, bancs del SAF, Nantes... vosaltres ja sabeu tot el que això porta implícit: comencem! Ballar mirant-nos als ulls, fer de les emocions un vocabulari corporal, emocionar-nos. Gràcies als de Casa Roya, a l'Edu, amb qui he descobert el Pallars des de ben endins, amb una intimitat i afecte que sempre recordaré. A la Núria i l'Àngels, que valen "un Perú". Tots teniu per sempre la meva estima. Tots conformeu el paisatge emocional de la meva vida, que m'ha fet col·locar el llistó molt alt, em sento molt afortunada. Gràcies a tots vosaltres sé qui sóc, què vull, i què no vull. Les emocions que sentim ens fan no renunciar a sentir-ne més... a seguir somniant... i diuen que el futur depèn de la qualitat dels nostres somnis, així que hem de seguir somniant molt. Sempre vull seguir envoltada de gent tan especial.

Als nous elements d'aquest paisatge; als IPs, que m'han ensenyat que la intel·ligència és de molts tipus. Als monis, que m'han fet molt fàcil entrar al Club i gaudir-ne. Tant a la plaça Caramelles com al Pisito. Espero que això tot just comenci. A la Penyita de Portal Nou, un grup d'amics com trets d'una pel·lícula, (o d'un conte titulat Magòria) que fan coses increïbles sense adonar-se'n. Gent del barri, gent feliç... tan simple i tan bonic. Humà. Gràcies per interessar-vos per la meva tesi durant aquests mesos. És un plaer veure-us parlar, riure, il·lusionar-vos. Veure com us estimeu, i us respecteu. És un plaer anar descobrint de mica en mica aquest gran tresor.

Gràcies a la meva família. Molt especialment al Pere i a la Susana, els meus pares, que m'han educat en la responsabilitat, el coneixement de les coses, i sobretot en la llibertat. D'ells he heretat la curiositat pel món i per la vida. De la meva mare, l'esperit de lluita, el donar valor a les petites coses i aprofitar al màxim cada segon, que no tornarà mai més. L'entusiasme. El dir-me sempre que el meu pare era fantàstic. Del meu pare, el comptar fins a deu, pensar amb claredat, reflexionar i divagar, donar sempre bons consells, valorar el què es té. Dir-me sempre que la meva mare era única i irreplicable. Només a ells els hi podia dedicar aquesta tesi. Gràcies. De la meva germana em quedo amb la senzillesa i el bon caràcter, el riure de panxa contenta que ja tenia quan era petita, la perseverança. Gràcies a l'àvia Lola, per les històries increïbles que expliquen les àvies, són com arbres centenaris amb tot un món d'experiències al seu interior. Els dinars mentre escrivia plens d'històries de fa anys... això no té preu. Gràcies al meu cosí

petit Marquitos, que ara ja no és petit ni Marquitos. Gràcies per l'animació, i pels bons records que tinc de la teva curiositat i preguntes de quan érem petits, sempre volies que t'expliqués coses. Quins bons estius a Torrent, parèntesis de vida lenta, creixent tots quatre junts, la Gemma, la Mireia, el Marc i jo. Llàstima que fer-se gran ens robi aquestes estones.

Gràcies Dani, company, de vida dolça. Gràcies per fer-me somriure. Per ser sens dubte les tres (o tres mil) coses que més m'han agradat. Gràcies per tantes coses que em regales i que no tenen per sort, explicació científica. *Aquest camí que deixo enrera és llarg, però em vull lleuger del seu bagatge, que res no em valen tants d'atzars, ni els vells camins, ni el blau del mar (i cel), si dintre seu no sento com batega, i hi batega, el fràgil art de la tendresa...*

Laia

Castellar del Vallès-Barcelona,
novembre 2008.

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	
Pròleg	7
COMPARTIMENT ENDOCÍTIC	
MEMBRANA PLASMÀTICA	9
▪ LA HIPÒTESI <i>RAFT</i>	9
▪ FORMACIÓ, DISTRIBUCIÓ I COMPOSICIÓ DELS <i>RAFTS</i>	11
▪ CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES DELS <i>RAFTS</i>	11
▪ SENYALITZACIÓ DIFERENCIAL DES DELS <i>RAFTS</i> : RAS I MAPK.	13
ENDOCITOSI I TRÀFIC INTRACEL·LULAR	15
▪ CLASSIFICACIÓ MOLECULAR O <i>SORTING</i>	17
▪ DIRECCIONAMENT I FUSIÓ	18
ENDOSOMES QUE SENYALITZEN	20
CAVEOLES	22
TRANSPORT INTRACEL·LULAR DE COLESTEROL	24
▪ COLESTEROL PROVINENT DE LES LDL	24
▪ SÍNTESI ENDÒGENA DE COLESTEROL	26
▪ EFLUXIÓ DE COLESTEROL	26
GOLGI I VESICULACIÓ	27

LES ANNEXINES	29
▪ INTRODUCCIÓ	
ELS ORÍGENS I LA FAMÍLIA.	29
DE L'ESTRUCTURA A LA FUNCIO.	30
LOCALITZACIÓ INTRACEL.LULAR I FUNCIONS.	33
▪ ANNEXINA A6	36
ANTECEDENTS	
- ANNEXINA A6 I CITOESQUELET	36
- ANNEXINA A6 I CALCI	37
- ANNEXINA A6 I PROLIFERACIÓ CEL.LULAR	38
- ANNEXINA A6 I SENYALITZACIÓ	38
• p120GAP	39
• PKC	43
- ANNEXINA A6 I COLESTEROL	44
- ANNEXINA A6 I CAVEOLINA	45
OBJECTIUS	53
MATERIALS I MÈTODES	55
MATERIALS	
1- Cultius cel.lulars	55
2- Productes	56
3- Anticossos	57
4- Vectors	58
MÈTODES	
▪ CLONATGE DE PROTEÏNES EN VECTORS FLUORESCENTS	59
▪ TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS DH5 α COMPETENTS	61

▪ IMMUNOFLUORESCÈNCIA	61
▪ MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA	62
▪ MICROSCÒPIA CONFOCAL	62
• iFRAP	64
• Anàlisi de colocalització	64
▪ MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	65
• Preparació i fixació de les cèl.lules.	
• Adquisició d'imatges (recompte de caveoles).	
▪ IMMUNOPRECIPITACIÓ	65
• Immunoprecipitació de la caveolina associada a Golgi.	
• Immunoprecipitació de GFP-cPLA ₂	
• Immunoprecipitació de GFP-NPC1 i AnxA6	
▪ FRACCIONAMENT CEL.LULAR	67
• Aïllament d'endosomes (gradient discontinu de sacarosa)	
• Aïllament de membranes de Golgi	
▪ MESURA DEL COLESTEROL DE GOLGI	69
▪ PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES	70
▪ INHIBICIÓ DE L'ANX6 UTILITZANT RNAi	70
▪ ASSAIG D'ALLIBERACIÓ D'ÀCID ARAQUIDÒNIC- ³ H.	70
▪ EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE GST-ANX6	71
▪ PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS CONTRA GST-Anx6/regió <i>linker</i>	73
▪ <i>PULL-DOWN</i> AMB GST-Anx6	74
▪ <i>WESTERN BLOT</i>	74

RESULTATS

LLISTA D'ARTICLES	79
-------------------	----

ARTICLE 1: *Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex.* 81

ARTICLE 2: *Annexin A6- induced inhibition of cPLA₂ is linked to cav-1 export from the Golgi.* 111

ANNEX 123

DISCUSSIÓ 135

CONCLUSIONS 155

BIBLIOGRAFIA 159

ABREVIATURES

AA, araquidonic acid
Anx, annexin
Anx6, Annexin A6
cav, caveolin 1
CFP, cyan fluorescent protein
CHO, Chinese hamster ovary cells
CHOwt, CHO wildtype cells
CHOAnx6, CHO Anx6 cells
cPLA2, cytoplasmic phospholipase A2.
EE, early endosome
EEA-1, early-ensosomal autoantigen
EGF, epidermal growth factor.
EGFR, epidermal growth factor receptor
ERC, endocytic recycling compartment
ERK, extracellular signal-regulated kinase
GFP, green fluorescent protein
GST, glutathione-S-transferase
GPI, glycosylphosphatidylinositol
K.O, knock-out
LDL, low density lipoprotein
LBPA, lisobisphosphatidic acid
LDLR, low density lipoprotein receptor
LPAT, lysophospholipid acyltransferases
LE, late endosome
LRP, LDL-related protein
MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MVB, multivesicular body
NPC, Niemann-Pick cells.
NSF, NEM-sensitive fusion protein
p120GAP, GTPase activating protein
PBS, phosphate buffered saline
PFA, paraformaldehyde
PKC, protein kinase C
PTRF, polymerase I transcript release factor
SRBI, scavenger receptor type BI
SNAREs, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors.
TGN, trans-Golgi-network
TRITC, tetramethyl rhodamine isothiocyanate
U18666A, 3-b-2-diethylamino ethoxy androst-5-en-17-one
W13, N-4-aminobutil-5chloro-2-naphtalensulphonamide
YFP, yellow fluorescent protein.

“El 90 % de la realitat és invisible”
E. Punset



INTRODUCCIÓ

annexines: família de proteïnes que uneixen fosfolípids d'una manera depenent de calci i que reben aquest nom per la seva capacitat intrínseca d'unir-se (annexionar-se) a membranes cel.lulars.

annex: unit o agregat a una altra cosa, amb dependència respecte aquesta.

annexar: adjuntar una cosa a una altra de manera que una depengui de l'altra.

annexionat: adjunt, inclòs.

LES ANNEXINES	29
▪ INTRODUCCIÓ	
ELS ORÍGENS I LA FAMÍLIA.	29
DE L'ESTRUCTURA A LA FUNCIO.	30
LOCALITZACIÓ INTRACEL.LULAR I FUNCIONS.	33
▪ ANNEXINA A6	36
ANTECEDENTS	
- ANNEXINA A6 I CITOESQUELET	36
- ANNEXINA A6 I CALCI	37
- ANNEXINA A6 I PROLIFERACIÓ CEL.LULAR	38
- ANNEXINA A6 I SENYALITZACIÓ	38
• p120GAP	39
• PKC	43
- ANNEXINA A6 I COLESTEROL	44
- ANNEXINA A6 I CAVEOLINA	45
OBJECTIUS	53
MATERIALS I MÈTODES	55
MATERIALS	
1- Cultius cel.lulars	55
2- Productes	56
3- Anticossos	57
4- Vectors	58
MÈTODES	
▪ CLONATGE DE PROTEÏNES EN VECTORS FLUORESCENTS	59
▪ TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS DH5 α COMPETENTS	61

▪ IMMUNOFLUORESCÈNCIA	61
▪ MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA	62
▪ MICROSCÒPIA CONFOCAL	62
• iFRAP	64
• Anàlisi de colocalització	64
▪ MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	65
• Preparació i fixació de les cèl.lules.	
• Adquisició d'imatges (recompte de caveoles).	
▪ IMMUNOPRECIPITACIÓ	65
• Immunoprecipitació de la caveolina associada a Golgi.	
• Immunoprecipitació de GFP-cPLA ₂	
• Immunoprecipitació de GFP-NPC1 i AnxA6	
▪ FRACCIONAMENT CEL.LULAR	67
• Aïllament d'endosomes (gradient discontinu de sacarosa)	
• Aïllament de membranes de Golgi	
▪ MESURA DEL COLESTEROL DE GOLGI	69
▪ PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES	70
▪ INHIBICIÓ DE L'ANX6 UTILITZANT RNAi	70
▪ ASSAIG D'ALLIBERACIÓ D'ÀCID ARAQUIDÒNIC- ³ H.	70
▪ EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE GST-ANX6	71
▪ PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS CONTRA GST-Anx6/regió <i>linker</i>	73
▪ <i>PULL-DOWN</i> AMB GST-Anx6	74
▪ <i>WESTERN BLOT</i>	74

RESULTATS

LLISTA D'ARTICLES	79
-------------------	----

ARTICLE 1: *Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex.* 81

ARTICLE 2: *Annexin A6- induced inhibition of cPLA₂ is linked to cav-1 export from the Golgi.* 111

ANNEX 123

DISCUSSIÓ 135

CONCLUSIONS 155

BIBLIOGRAFIA 159

ABREVIATURES

AA, araquidonic acid
Anx, annexin
Anx6, Annexin A6
cav, caveolin 1
CFP, cyan fluorescent protein
CHO, Chinese hamster ovary cells
CHOwt, CHO wildtype cells
CHOAnx6, CHO Anx6 cells
cPLA2, cytoplasmic phospholipase A2.
EE, early endosome
EEA-1, early-ensosomal autoantigen
EGF, epidermal growth factor.
EGFR, epidermal growth factor receptor
ERC, endocytic recycling compartment
ERK, extracellular signal-regulated kinase
GFP, green fluorescent protein
GST, glutathione-S-transferase
GPI, glycosylphosphatidylinositol
K.O, knock-out
LDL, low density lipoprotein
LBPA, lisobisphosphatidic acid
LDLR, low density lipoprotein receptor
LPAT, lysophospholipid acyltransferases
LE, late endosome
LRP, LDL-related protein
MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphate
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MVB, multivesicular body
NPC, Niemann-Pick cells.
NSF, NEM-sensitive fusion protein
p120GAP, GTPase activating protein
PBS, phosphate buffered saline
PFA, paraformaldehyde
PKC, protein kinase C
PTRF, polymerase I transcript release factor
SRBI, scavenger receptor type BI
SNAREs, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors.
TGN, trans-Golgi-network
TRITC, tetramethyl rhodamine isothiocyanate
U18666A, 3-b-2-diethylamino ethoxy androst-5-en-17-one
W13, N-4-aminobutyl-5chloro-2-naphtalensulphonamide
YFP, yellow fluorescent protein.

“El 90 % de la realitat és invisible”
E. Punset



INTRODUCCIÓ

annexines: família de proteïnes que uneixen fosfolípids d'una manera depenent de calci i que reben aquest nom per la seva capacitat intrínseca d'unir-se (annexionar-se) a membranes cel.lulars.

annex: unit o agregat a una altra cosa, amb dependència respecte aquesta.

annexar: adjuntar una cosa a una altra de manera que una depengui de l'altra.

annexionat: adjunt, inclòs.

INTRODUCCIÓ

Pròleg

Les cèl.lules posseïxen i elaboren una maquinària altament estructurada de transducció de senyals per respondre als estímuls externs. El model clàssic de senyalització involucra receptors de membrana, que un cop units als seu lligand (factors de creixement, hormones, etc.) a la superfície cel.lular, són internalitzats cap al citosol, des d'on activen missatgers secundaris que fan arribar el senyal fins al nucli. Tant el material internalitzat com les proteïnes cel.lulars viatgen pel citosol, formant part del que s'ha anomenat tràfic o transport intracel.lular. Les cèl.lules eucariotes han desenvolupat la capacitat de regular molt finament aquest transport intracel.lular, i això ha multiplicat per mil les possibilitats de comunicació entre la cèl.lula i l'exterior. Aquesta comunicació permet que diferents cèl.lules puguin relacionar-se, associar-se, formar organismes pluricel.lulars complexes amb xarxes de comunicació intercel.lulars molt sofisticades.

L'endocitosi es defineix com la captació selectiva de molècules cap a l'interior de la cèl.lula, mitjançant una invaginació de membrana que es tancarà formant una vesícula, que acabarà desprenent-se i entrant al citoplasma. El tràfic intracel.lular de membranes o transport vesicular és un dels principals processos responsables de la localització correcta de molècules a dins de la cèl.lula. Estructures membranoses vesiculars o tubulars gemmen des del compartiment donador i es fusionen amb el compartiment diana lliurant el seu contingut i les molècules associades a la membrana, als orgànuls diana. Les principals rutes cel.lulars de tràfic de membranes són la via biosintètica, responsable del transport de proteïnes (i lípids) des del reticle endoplasmàtic a l'espai extracel.lular o cap a altres compartiments cel.lulars membranosos, i la via endocítica, responsable de la captació de components del medi extracel.lular per a ésser utilitzats pel metabolisme cel.lular. La divisió del compartiment endocític en diferents subcompartiments (primerenc, tardà, de reciclatge) i el tràfic entre ells ha esdevingut un dogma dins de la biologia cel.lular (Fig.1). Com a bon dogma científic, s'ha anat desmitificant i ampliant des dels seus inicis fins l'actualitat, prenent consciència que el tràfic de membranes és un gran bloc de processos importants per la cèl.lula, entre ells hi ha la internalització, però aquesta és només una petita part del transport intracel.lular. Petita, però no menys important, la internalització a la membrana i el pas pels endosomes han estat utilitzats pels virus com a porta d'entrada a l'interior de la maquinària cel.lular. A més, els endosomes s'impliquen cada cop més en aspectes diferents al transport; Citant textualment a Sorkin i von Zastrow, "l'encreuament entre la traducció de senyals i les vies de transport han esdevingut una àrea d'experimentació i de discussions teòriques molt popular" [Sorkin A *et al*, 2002].

El tràfic intracel.lular governa en gairebé tots els processos cel.lulars: la secreció, la síntesi de proteïnes, el transport de molècules, proteïnes, i lípids als diferents orgànuls, la captació de nutrients, l'habilitat de construir una defensa contra invasors, la transmissió de senyals metabòlics i proliferatius, etc. No és gens estrany que amb aquest impressionant repertori, el tràfic intracel.lular reservi encara molts interrogants. Les annexines, donada la seva habilitat intrínseca d'unir-se a membranes cel.lulars, són una família de proteïnes estretament relacionada amb el tràfic. Sobre aquest tràfic, és a dir, aquest abecedari utilitzat per la cèl.lula per dialogar amb ella mateixa, i sobre els efectes de l'Annexina A6 en aquest tràfic, tractarà aquest treball.

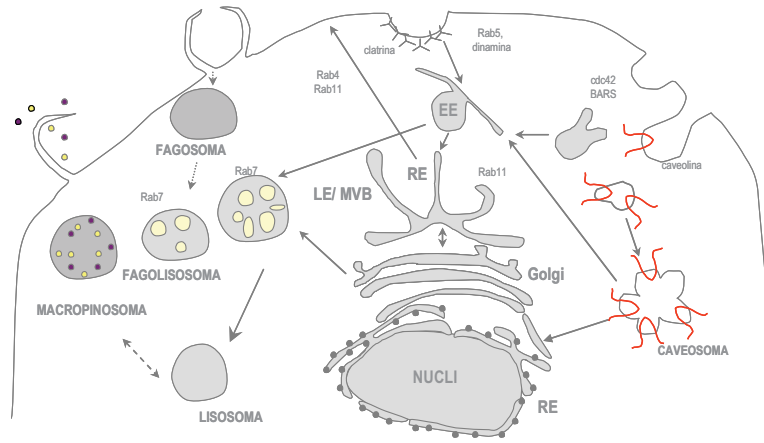


Fig 1. Visió general del compartiment endocític (adaptació de Perret E *et al*, 2005)

COMPARTIMENT ENDOCÍTIC

El compartiment endocític és el conjunt d'estructures intracel·lulars que estan implicades en el transport, direccionament, i processament de lligands i receptors. Els diferents compartiments que componen les cèl·lules eucariotes no són estructures estàtiques: són estructures dinàmiques i altament organitzades. Existeix un flux de compartiments membranosos des de l'interior de la cèl·lula cap a l'exterior (exocitosi), i a la inversa (endocitosi). Exocitosi i endocitosi són dos processos altament regulats, que mantenen constant la membrana plasmàtica. Els compartiments cel·lulars que intervien en aquest tràfic intracel·lular de membranes són bàsicament el reticle endoplasmàtic, el Golgi, els endosomes i lisosomes, i els caveosomes.

Per tal de fer "funcional" el transport vesicular i de regular la interacció entre aquests diferents compartiments hi ha una gran varietat de molècules específiques implicades (inositol fosfats, cPLA₂, Rabs, SNAREs, *sorting-nexins*, proteïnes motores, COPs, ARFs, APs, clatrina, bombes de protons, annexines...). Les annexines són una família de proteïnes que s'uneixen a fosfolípids de forma depenent de calci, reben aquest nom per la seva capacitat intrínseca d'unir-se (**annexionar-se**) a membranes cel·lulars. És localitzen a la membrana plasmàtica i al compartiment endocític, i per tant no sorprèn el fet que es considerin un component important en processos endocítics i de tràfic intracel·lular. El compartiment endocític representa la continuïtat funcional de la membrana plasmàtica, des d'on a través de l'endocitosi entren una gran diversitat de *senyals* que determinen el funcionament cel·lular. Introduiré primer el compartiment endocític i alguns aspectes del tràfic intracel·lular, per a centrar-me després en el paper d'un membre de la família de les annexines, l'Annexina A6, en l'endocitosi i el tràfic.

MEMBRANA PLASMÀTICA

La membrana plasmàtica és un embolcall continu que envolta totes les cèl·lules i separa el seu contingut del medi extern. No és una barrera passiva sinó que regula l'intercanvi de substàncies: és un filtre altament selectiu que manté una concentració desigual entre l'interior i l'exterior cel·lular. Permet que entrin els nutrients i que els productes de rebuig surtin de la cèl·lula. Totes les membranes biològiques, incloent-hi la plasmàtica i les membranes internes de les cèl·lules, tenen una estructura general comuna: lípids i proteïnes associats per unions no covalents. Des del model del mosaic fluid de Singer i Nicolson (1972) [Singer SJ, Nicolson GL 1972], que plantejava la membrana com una bicapa lipídica passiva en la que els lípids funcionaven només com un solvent per a les proteïnes, fins al model actual de la subdivisió en microdominis altament organitzats i dinàmics (a nivell ja de nanòmetres), passant pels dominis funcionals (micres) en cèl·lules polaritzades, la percepció de la membrana com un simple embolcall que limita les cèl·lules ha anat canviant. Actualment s'entén com un compartiment i no com un component purament estructural. Una de les principals funcions de la membrana és mantenir l'homeòstasi cel·lular.

▪ LA HIPÒTESI RAFT

Simons i van Meer [Simons K, van Meer G 1988] formulen el que s'anomena la "hipòtesi *raft*" al 1988. La membrana es presenta com una estructura amb una organització i composició específica i essencial per a la seva funcionalitat. Segons aquest model revolucionari [Simons K, Ikonen E 1997], la unió lateral del colesterol i esfingolípids (esfingomielina i glucoesfingolípids) crea plataformes flotants anomenades *rafts* (que es podria traduir literalment bot o rai, veure Fig.2) enmig d'un entorn ric en fosfolípids (revisat en [Simons K, Ikonen E 1997], [Mukherjee S, Maxfield FR 2000]). La funció assignada a aquests dominis segons el model seria la d'actuar com a plataformes, pel transport de dominis de membrana o servir com a estacions en la senyalització intracel·lular. La llista de funcions dependents dels *rafts* continua creixent.

Els *rafts* no només serveixen per organitzar aquests mòduls de senyalització a la membrana plasmàtica, sinó també a altres orgànuls com els endosomes, el Golgi, o el reticle. També són importants per a moltes cascades de senyalització, que depenen d'una composició o entorn lipídic determinat per a poder-se activar. Un *raft* es defineix, doncs, com un microdomini de membrana ric en colesterol i esfingolípids.

Un dels experts en *rafts* del nostre país, el Dr. Félix Goñi, acostuma a dir que el colesterol és la molècula amb més “mala fama” de la biologia, perquè sense el colesterol encara seríem bacteris. El colesterol és la peça bàsica de construcció de dominis especialitzats que permeten un nivell superior i complex de comunicació, és una de les peces bàsiques per a formar una membrana eucariota tal com la concebem avui. Fins fa poc, el paper del colesterol era controvertit i confós; es pensava que només conferia rigidesa a la membrana, fluïda per naturalesa, reduint la permeabilitat passiva i incrementant la durabilitat mecànica de la bicapa lipídica. Actualment, en canvi, es considera el colesterol com un dels principals responsables del direccionament de proteïnes des del Golgi o post-Golgi, durant la formació, estabilització, i distribució dels *rafts*. La funció postulada pels *rafts* en aquells primers treballs segueix essent vigent : segregat i concentrar proteïnes i lípids que aniran fins a la superfície cel.lular, des d'on podran senyalitzar [Mukherjee S, Maxfield FR 2000; Mukherjee S, Maxfield FR 2004; van Meer G ,1989]. Els *rafts* també són importants en el manteniment de la polaritat cel.lular [Toomre D *et al*, 2000]. Per a totes aquestes funcions, el transport i distribució de colesterol entre les diferents membranes és clau.

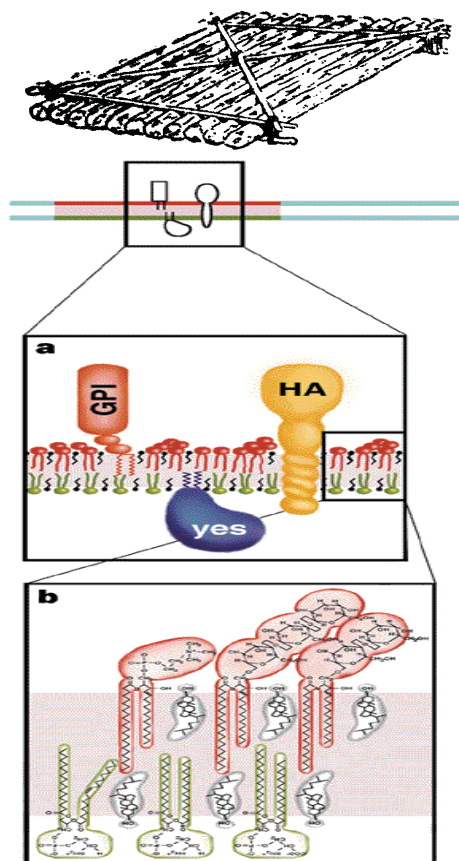


Fig 2. Representació gràfica del concepte *raft*. Adaptació de [Simons K, Ikonen E 1997]

▪ FORMACIÓ, DISTRIBUCIÓ I COMPOSICIÓ DELS RAFTS

Els *rafts* estan formats per colesterol, esfingolípids i proteïnes. El colesterol es sintetitza al reticle i també els esfingolípids que completen la seva síntesi i reben els grups polars (hidrofílics) al complex de Golgi [van Meer G, 1989]. El colesterol s'incorpora als *rafts* al Golgi [Heino S *et al*, 2000], i des del Golgi els *rafts* es distribueixen cap a la superfície cel·lular on s'enriqueixen amb més colesterol i esfingolípids [Fielding CJ, Fielding PE 1997]. Aquesta idea dels *rafts* preformats al complex de Golgi va ser molt controvertida en un principi, però sembla que finalment s'ha acceptat.

En cèl·lules epitelials polaritzades i neurones, els *rafts* s'acumulen a la membrana apical i axonal respectivament. En cèl·lules no polaritzades, els *rafts* estan distribuïts per tota la superfície cel·lular. També hi ha *rafts* als endosomes [Gruenberg J, 2001], al Golgi, al reticle, i al compartiment endocític de reciclatge [Heino S *et al*, 2000; Holtta-Vuori M *et al*, 2000; Simons K, Ikonen E 2000]. Els nivells de colesterol als diferents compartiments mantinguts constantment per la cèl·lula són essencials per la integritat d'aquests microdominis *raft* (revisat a Mukherjee S, Maxfield FR 2004).

Els *rafts* poden incloure proteïnes de molts tipus diferents, i de fet, es diu que encara ningú ha aïllat un *raft* tal com és *in vivo*, i per tant paràmetres com la seva mida o el nombre de proteïnes que contenen són encara molt polèmics. La principal propietat dels *rafts* és que poden incloure o excloure proteïnes determinades, classificant les proteïnes en regions determinades envoltades d'un context ideal per a la seva activació/desactivació [Brown DA, London E 1998]. Algunes de les principals proteïnes descrites com a proteïnes de *rafts* són : 1) proteïnes ancorades a la membrana mitjançant GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) [Brown DA, London E 1998]; 2) proteïnes de membrana doble acilades com les quinases de la família Src i les subunitats alfa de les proteïnes G heterotrimeriques [Resh MD, 1999]; 3) proteïnes associades a colesterol ; 4) proteïnes transmembrana, habitualment palmitoilades ;5) caveolina [Fielding CJ, Fielding PE 1997]; i d'especial interès per aquesta tesi 6) les annexines [Babiyuchuk EB, Draeger A 2000]. El colesterol dona una rigidesa característica a la membrana que fa que totes aquestes proteïnes s'empaquetin al domini *raft* d'una manera forta. Si s'extreu el colesterol (utilitzant drogues com la ciclodextrina), aquestes proteïnes es dissociaran.

Així com el model de la hipòtesi *raft* va ser acceptat d'una forma relativament ràpida i unànime, no es pot dir el mateix respecte els sistemes desenvolupats per aïllar *rafts*, basats en les seves propietats físico-químiques [Lichtenberg D *et al*, 2005], sobretot en la resistència a l'extracció amb detergent en fred, el que s'anomena aïllament de *DRMs* (membranes resistents a l'extracció amb detergent). El detergent utilitzat generalment és el Tritó X100. Aquests aïllaments són els sistemes més utilitzats per estudiar-los, tot i que es pensa que un *raft* aïllat mai és representatiu del *raft* dins la membrana cel·lular, ja que el procés d'aïllament en varia la composició. Potser un mètode menys agressiu per visualitzar regions *raft* és utilitzar la sonda fluorescent Laurdan que s'intercala a les regions condensades de membrana [Gaus K *et al*, 2003].

▪ CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES DELS RAFTS.

Els *rafts* aprofiten la distribució asimètrica de fosfolípids (glicerofosfolípids i esfingolípids, Taula 1 Fig.3) que hi ha a les bicapes. La cara citoplasmàtica de la bicapa està més enriquida en colesterol, i l'extracel·lular en glucoesfingolípids i esfingomièlina [Simons K, Ikonen E 2000]. Els lípids també s'ordenen en una dimensió lateral. Els esfingolípids s'empaqueten

entre ells i després s'hi insereix el colesterol, formant plataformes mòbils estables. Els esfingolípids s'associen lateralment (interaccions dèbils). Els espais buits entre les cues dels esfingolípids són ocupats per molècules de colesterol que funcionen com espaiadors, mantenint-los rectes. El colesterol incrementa encara més el grau d'empaquetament. L'associació del colesterol als esfingolípids és una interacció més forta, reforçada per ponts d'hidrogen entre el grup 3'OH de l'esterol i el grup amida de l'esfingolípida ceramida. L'organització asimètrica dels *rafts* és tant a nivell de proteïnes (les GPI estan a la cara externa i les Src a la interna de la bicapa) com a nivell de lípids (esfingomielina i fosfatidilcolina a l'externa, fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina a la interna).

LÍPIDS	
Àcids grassos	<ul style="list-style-type: none"> - Saturats - insaturats
Lípids saponificables	<ul style="list-style-type: none"> - triacilglicèrids - ceres - lípids de membrana o fosfolípids <ul style="list-style-type: none"> • glicerofosfolípids • esfingolípids (esfingomielines, glucoesfingolípids-ceramida-, gangliòsids)
Lípids insaponificables	<ul style="list-style-type: none"> - terpens - esteroids - hormones eicosanoids

Taula 1. Classificació dels lípids.

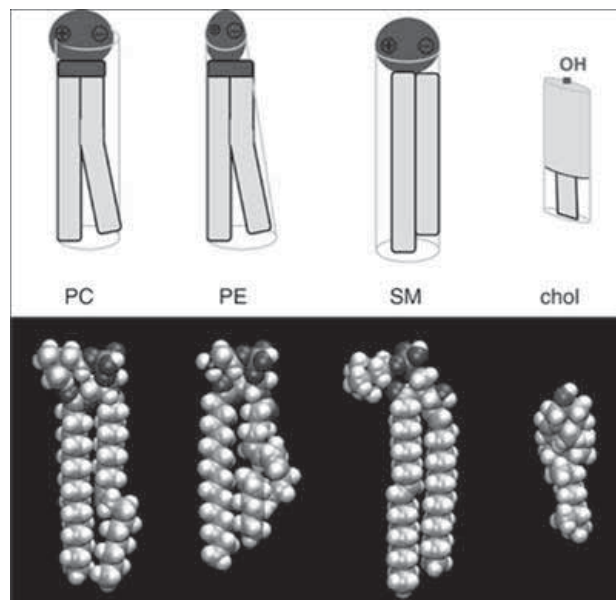


Fig 3. Estructura dels fosfolípids de membrana i del colesterol [van Meer G, 2005].

La rigidesa de la zona *raft* contrasta amb la fluïdesa de la resta de la membrana *no-raft*, i es van anomenar aquests dos nivells de rigidesa com fase líquida ordenada i fase líquida desordenada [Mukherjee S, Maxfield FR 2000; Simons K, Ikonen E 2000]. Els *rafts* són fases

líquides ordenades enriquides en colesterol que floten en una matriu líquida més desordenada de fosfolípids, d'aquí el símil del nom "rai". Aquest estat líquid-ordenat fa que els *rafts* siguin insolubles a detergents, una de les seves propietats definitòries. Tot i així, és impossible aïllar un *raft* en la seva conformació nativa utilitzant detergents, el detergent pot extreure algunes proteïnes. La mida mitja d'un *raft* més acceptada és d'uns 50 nm. De totes maneres, hi ha qui pensa que existeixen *rafts* de fins a micres.

▪ SENYALITZACIÓ DIFERENCIAL DES DELS RAFTS: RAS I MAPK

Una de les principals vies de senyalització relacionada amb els microdominis *raft* és la via de la família Ras (formada principalment per tres membres, H-, K-, i N-Ras) que controla les diferents vies de senyalització responsables de la proliferació i diferenciació cel.lular [Prior IA, Hancock JF 2001; Prior IA *et al*, 2001]. Les isoformes de Ras presenten una gran homologia de seqüència excepte en una regió anomenada regió hipervariable, que conté el domini d'unió a membrana, el motiu C-terminal CAAX. Diverses modificacions postraduccionalment en aquest domini (farnesilació, palmitoilació) dirigeixen el precursor citosòlic de cada isoforma a un microdomini de membrana determinat. H-Ras està palmitoilat mentre que K-Ras té una cua polibàsica, i per tant utilitzaran diferents sistemes d'ancoratge a la membrana. Aquesta compartimentalització, i el moviment que H-Ras presenta d'un domini a l'altre en activar-se [Prior IA, Hancock JF 2001] els hi permet activar efectors diferents (revisat a Ehrhardt A *et al*, 2002).

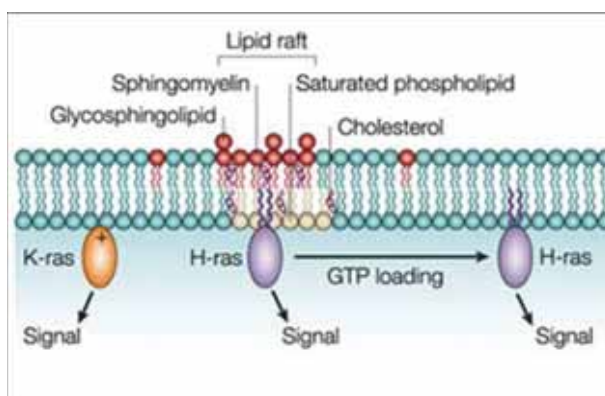


Fig 4. Compartimentalització de les isoformes H- i K-Ras a la membrana [Hancock JF, 2003]

Ras, unit estretament a la membrana, cicla entre un estat actiu i un d'inactiu, unit a GTP o GDP respectivament (Fig.5). Aquest procés està regulat per la pròpia activitat GTPàsica de la proteïna, i per proteïnes que estimulen aquesta activitat. Aquestes proteïnes van des del citosol cap a la membrana per activar o desactivar Ras. El procés d'activació requereix el recanvi del nucleòtid difosfat pel trifosfat (de GDP a GTP), i està mediat per les GEFs (*guanine-exchanging-factors*). Nous factors GEF com per exemple RasGRP i RasGRF s'han afegit recentment als ja descrits Sos i Sos2 [Campbell SL *et al*, 1998]. El procés d'inactivació (de GTP a GDP) està regulat per les GAPs (*GTPase activating proteins*). Les GAPs s'agrupen en quatre famílies: p120RasGAP, neurofibromina NF-1, SynGAP i GAP1. En el reclutament de GAPs i GEFs cap a la membrana participen diferents mecanismes moleculars (revisat per Cullen i Lockyer al 2002) [Cullen PJ, Lockyer PJ 2002].

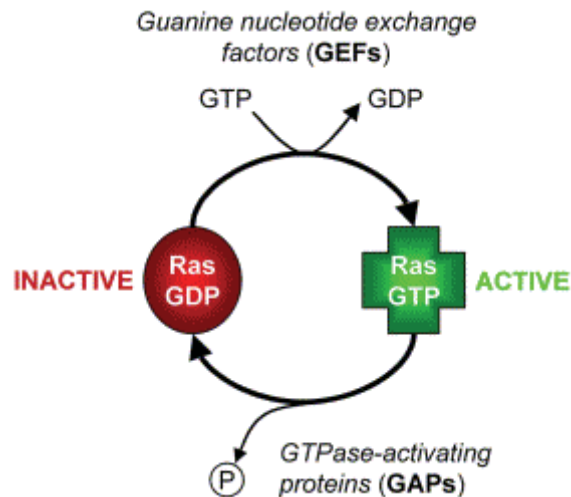


Fig 5. Cicle d'activació/inactivació de Ras [Walker SA *et al*, 2003].

La senyalització de Ras, que activa finalment ERK/MAPK, regula la proliferació cel.lular. S'activa a partir de receptors de membrana, tot i que la seva maquinària també s'ha trobat activada al compartiment endosomal [Pol A *et al*, 1998]. Raf1 acobla el senyal de Ras amb les MAPKs, va cap a la membrana quan s'activa Ras, assistit per proteïnes de la família 14-3-3. Raf1 interacciona pel seu domini RBD (*Ras Binding Domain*) amb Ras només si està unit a GTP (i per tant actiu). Després Raf fosforila (activant) a Mek1 i Mek2, que fosforilaran a MAPK1 i MAPK2 respectivament. Les MAPKs tenen molts efectors, entre ells factors de transcripció per proteïnes que regulen la transició G1/S com la ciclina D1.

Aquesta via de les MAPKs, és dependent de factors de creixement, i també de calci. El cicle d'activació-desactivació de Ras mediat per GEFs i GAPs respon a oscil.lacions en els nivells intracel.lulars de calci [Cullen PJ, 2006]. La cascada de senyalització de Ras està interconectada amb moltes altres vies, com per exemple la de la fosfolipasa C (que ahora genera un pic de calci a través del missatger secundari IP3), o la família PKC (ser/thr quinases activables per calci i diacilglicerol). Aquestes interconnexions s'intercalen a la via de les MAPKs en diferents nivells [Marais R *et al*, 1998].

La localització de les isoformes H i K a diferents dominis de membrana fa que puguin activar vies de senyalització diferents, específiques de cada localització [Roy S *et al* 1999; Roy S *et al*, 2002], que s'anomenen vies de senyalització específiques d'isoforma. Més concretament, sabem que l'H-Ras ha de localitzar-se en un subtipus de *raft* determinat, les caveoles, per a senyalitzar, on resta en un estat inactiu i només així pot ser estimulat correctament, i passar als sots de clatrina (no *raft*) des d'on s'internalitzarà. La depleció de colesterol afecta la capacitat d'H-Ras però no la de K-Ras (que es localitza a zones no ordenades de membrana), per activar el seu efector comú Raf1 [Roy S *et al* 1999]. A més, està demostrat que la depleció de colesterol (uns nivells de colesterol més baixos a la membrana) estimulen l'estat actiu (unit a GTP) de Ras, indicant que el colesterol, i les caveoles, són necessàries per a una correcta desactivació de Ras [Smart EJ *et al*, 1996; Scheiffele P *et al*, 1998; Pol A *et al*, 2001], que és molt important pel control de la proliferació cel.lular.

El Ras oncogènic està permanentment unit a GTP, i no pot ser desactivat amb normalitat pels bescanviadors de nucleòtids GAPs. Aquestes GTPases tenen molta importància en la senyalització, i estan regulades per diferents factors, com es veurà més endavant.

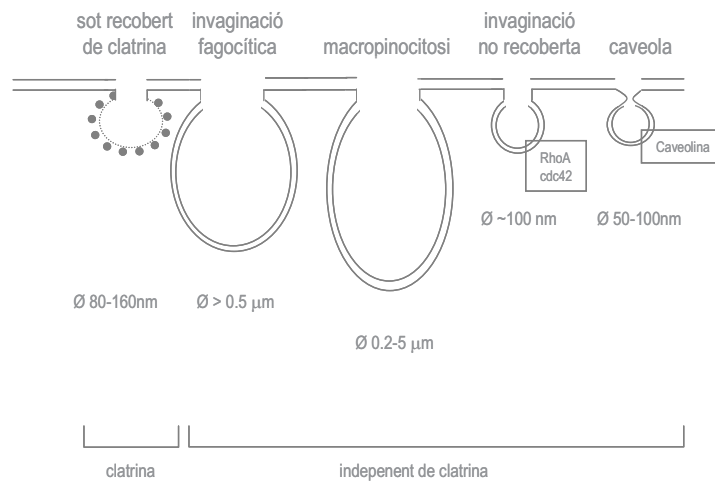


Fig 7. Vies d'internalització en cèl·lules eucariotes

Un cop els lligands són endocitats a la membrana plasmàtica mitjançant vies dependents o independents de clatrina, aquests han de ser classificats i transportats als seus destins intracel·lulars, i a partir d'aquí endosomes i transport intracel·lular formen un tot.

Pràcticament totes les vies d'internalització conflueixen als endosomes primerencs perifèrics. En general és aquí on el complex receptor-lligand es desacobla i els lligands i receptors són enviats al lloc corresponent en un procés que en anglès s'anomena molt il·lustrativament *sorting*. En la majoria dels casos la càrrega serà transportada fins al endosome tardà o LE (LE *late endosomes*) mitjançant vesícules portadores o un procés de maduració, i els receptors seran retornats a través d'una xarxa citoesquelètica regulada per proteïnes de transport (Rab i Rho) cap a la membrana (reciclatge). Els endosomes tardans maduren després fins a lisosomes (òrgànuls amb un pH àcid i que contenen enzims hidrolítics), on té lloc la degradació dels lligands/receptors endocitats. Hi ha quatre models diferents proposats per la transferència de càrrega des dels endosomes tardans als lisosomes. Segons el primer model (maduració) els endosomes tardans maduren cap a lisosomes per acidificació, i adquisició gradual de components lisosomals alhora que es van perdent els components d'endosome tardà. Un segon model (vesicular) són unes vesícules intermediàries (pre-lisosomes) que s'escindeixen dels endosomes tardans i es fusionen amb els lisosomes. El tercer model proposa un contacte fugaç (*kiss and run*) entre els LE i els lisosomes (*kiss*), durant el qual s'intercanvien la càrrega, per a separar-se de nou (*run*). Segons el darrer model o model híbrid, els endosomes tardans i els lisosomes es fusionen formant una estructura híbrida permanent [Luzio JP *et al*, 2007]. Hi ha endosomes que també s'anomenen cossos multivesiculars (MVBs), doncs poden contenir vesícules internes formades per invaginacions de la pròpia membrana. Es considera que un MVB o endosome és tardà o madur quan ja ha perdut totes les proteïnes que s'havien de reciclar i per tant ja és competent per fusionar-se o transformar-se en lisosoma [Woodman PG, Futter CE 2008].

Aquest sistema endosome/lisosoma pot enviar i rebre càrrega des del TGN (trans Golgi network) via vesícules intermediàries. El TGN es va definir com un òrganul en tàndem amb les cisternes trans del Golgi. Té una estructura túbulo-vesicular, i està constantment rebent i enviant vesícules [Rothman JE 1981]. El transport vesicular no es pot separar del citoesquelet, que forma "carreteres" per on es mouen les vesícules. Tot i això, sempre hi ha excepcions, i hi ha vesícules o "càrregues" determinades que poden literalment saltar d'un compartiment a un altre directament.

Totes aquestes vies de transport estan regides per tres principis bàsics: la classificació (*sorting*), el direccionament (*targeting*) i la fusió (Fig.8).

▪ CLASSIFICACIÓ MOLECULAR O SORTING

El *sorting* és l'habilitat d'incloure o excloure selectivament molècules i membranes durant la formació de les vesícules de transport i l'habilitat de separar la càrrega de la seva vesícula portadora. Aquesta classificació molecular permet el reciclatge i la continuació de les vesícules fins al seu destí, garantint una continuïtat temporal i espacial del transport. El *sorting* es dona al llarg de tota la via d'endocitosi (cap a dins de la cèl.lula), i també d'exocitosi (cap a fora de la cèl.lula). El primer pas de *sorting* en la via d'entrada inclou la formació de la vesícula seleccionada amb el seu contingut (invaginació o *budding*), i la classificació de la càrrega internalitzada durant el seu recorregut cap a dins. En la via de sortida -exocitosi- el *sorting* s'ocupa de classificar, i exportar o reciclar, les diferents proteïnes i lípids des del reticle i des del Golgi. Així el *sorting* regula processos de classificació fina com el transport de proteïnes de membrana a endosomes especialitzats de reciclatge (compartiment de reciclatge o *ERC*), a vesícules secretores, al TGN, o el transport de proteïnes des del Golgi fins a la membrana plasmàtica o fins als endosomes. Els endosomes de reciclatge estan formats per estructures tubulars, però són menys àcids que els endosomes primerencs [Gagescu R *et al*, 2000].

El *sorting* del material internalitzat (que ja ha passat un primer *sorting* durant la inclusió o no en una vesícula recoberta) comença als endosomes primerencs (EE). Són veritables estacions de classificació, que controlen el tràfic de lligands, receptors i fluids. Els endosomes primerencs *decideixen* si el lligand va cap a reciclatge o segueix la via degradativa, utilitzant dos principis fonamentals. Per una banda, l'acidificació interna dels endosomes: els lligands que es dissocien del seu receptor a pH baix aniran cap a lisosomes (per exemple l'LDL), mentre que el lligand que es mantingui unit anirà cap a reciclar-se, com passa per exemple amb la transferrina-Receptor de transferrina. I per altra, la distribució diferencial dins del mateix endosoma de les molècules que tindran destins diferents: els receptors que s'han de reciclar s'acumulen en unes prolongacions tubulars dels EE on el pH àcid facilita la dissociació del lligand; el lligand dissociat que s'ha de degradar (porta senyals específiques de degradació com la ubiquitinització) va cap a unes estructures diferents, vacuolars. El material que continguin aquestes estructures vacuolars o vesícules internes serà degradat. La ubiquitinització recluta uns complexos proteïcs que es van identificar primer en soques de llevats mutants per a proteïnes de *sorting* vacuolar [Woodman PG, Futter CE 2008]. Aquests complexos s'anomenen ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*). La formació d'aquestes vesícules intraluminals depèn dels complexos ESCRT, que regulen el trànsit de les proteïnes o càrregues que s'han de degradar (ubiquitinitzades) cap a l'interior d'aquestes estructures vesiculars. El model actual de funcionament dels complexos ESCRT en mamífers, descriu com el reclutament de la maquinària ESCRT comença als endosomes primerencs i continua als endosomes tardans. Es pensa que a través de variacions en la composició lipídica, els complexos ESCRT faciliten la curvatura de la membrana de l'endosoma que permet la invaginació i formació de vesícules. Algunes proteïnes o càrregues ubiquitinitzades no depenen dels complexos ESCRT per ésser degradades als lisosomes, fet que implica l'existència d'un *sorting* específic de càrrega regulat pels complexos ESCRT i d'un altre d'independent d'ESCRT. Hi ha altres factors que intervenen en la invaginació de membrana per formar vesícules internes, com per exemple el lípid LBPA als endosomes tardans o la ceramida [Woodman PG, Futter CE 2008].

Els receptors tirosin-quinasa estimulats per la unió de lligand (revisat a Sorkin A *et al*, 2002), com el EGFR, són ubiquitinitzats, internalitzats i classificats fins a les vesícules internes dels MVBs, on són degradats. Els receptors internalitzats sense lligand, en canvi, es reciclen cap a la membrana des dels EE. Algunes molècules que intervenen en el *sorting* del receptor activat cap a

degradar-se, també intervenen en la inhibició de la seva activació, com c-Cbl [Levkowitz G *et al*, 1999]. De la mateixa manera que l'activació del receptor per la unió de lligand n'estimula l'endocitosi, la traducció de senyals durant l'endocitosi en regula la desactivació. La connexió entre les xarxes de transport i la senyalització és bidireccional.

S'ha identificat en aquests EE tota la maquinària de senyalització de Ras [Pol A *et al*, 1998], per exemple, indicant que no són tan sols un compartiment de distribució i transport sinó també un compartiment per a la regulació de la senyalització (veure Endosomes que senyalitzen).

▪ DIRECCIONAMENT i FUSIÓ

Inclou el transport direccional (direccionament o *targeting*) de la vesícula fins al seu compartiment diana, i un cop allà la fusió amb la membrana d'aquest compartiment-destí o amb una nova vesícula que comportarà la descàrrega del contingut de la vesícula original. Com les vesícules identifiquen, troben i es fusionen amb les seves suposades dianes de forma específica és un dels aspectes fonamentals en el transport intracel·lular.

Aquests processos de direccionament i la fusió requereixen motors moleculars i el citoesquelet d'actina i microtúbuls per moure la vesícula. Un cop la vesícula ha arribat al destí, es "lliga" amb la vesícula o compartiment amb el que s'ha de fusionar en un procés seqüencial en el qual primer hi ha un apropament anomenat *tethering* [Pfeffer SR 1999] i a continuació l'ancoratge (*docking*) les dues membranes que es fusionaran. Aquests lligams poden sobrepassar distàncies més grans que la meitat del diàmetre de la vesícula (>25 nm). La característica comuna de moltes de les proteïnes que funcionen de *tethering* i *docking* és la seva propensió per formar estructures de forma *coiled-coil* [Warren G, Malhotra V 1998]. Algunes de les primeres proteïnes de *tethering* identificades van ser Sec6-Sec8 (exocist), Rabaptina5, EEA1 o la proteïna de Golgi p115. Pels endosomes primerencs, hi ha un model proposat per Zerial i McBride [Zerial M, McBride H 2001] segons el qual aquestes proteïnes serien reclutades als EE per la GTPasa Rab5.

Les proteïnes Rab són GTPases (*small GTPases*) que regulen el transport vesicular en l'endocitosi i en l'exocitosi, implicades sobretot en el reconeixement selectiu i *tethering* entre vesícules. Fins avui s'han identificat prop de 60 proteïnes Rab diferents, associades a diferents vies de transport (Taula 2). Mitjançant interaccions seqüencials amb múltiples efectors, sembla que les proteïnes Rab coordinen temporal i espacialment el transport vesicular. Les proteïnes Rab primer són reclutades cap a la membrana donadora, on s'activen i són importants en el *budding* (gemmació o invaginació) de la vesícula. Després, participen en el transport de la vesícula pel citoesquelet, i finalment participen en el *docking* i en la fusió. Les proteïnes Rab tenen un paper regulador, però el transport vesicular depèn de la seva acció coordinada amb altres proteïnes, per exemple, efectors enzimàtics que fan possible la motilitat de la vesícula o proteïnes SNARE per a la fusió [Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A 2000]. Les principals proteïnes Rab endosomals es resumeixen en la taula següent:

Rab	Localització intracel.lular	Funció
Rab4	Endosomes primerencs i compartiment de reciclatge	Reciclatge cap a la membrana plasmàtica.
Rab5	Vesícules recobertes de clatrina i endosomes primerencs	Internalització endocítica i fusió d'endosomes primerencs.
Rab7	Endosomes tardans (LE)	Transport des dels EE als LE.
Rab8	Endosomes primerencs (EE)	Transport des dels LE cap a reciclatge
Rab9	Endosomes tardans (LE)	Transport des dels LE cap al trans-Golgi.
Rab11	Endosomes de reciclatge.	Reciclatge apical i basolateral.
Rab43	Endosomes primerencs (EE)	Transport des dels EE al TGN.

Taula 2. Principals proteïnes Rab del compartiment endocític [Somsel Rodman J, Wandinger Ness A 2000] [Woodman PG, Futter CE 2008].

L'últim pas per completar la fusió depèn de les proteïnes SNAREs, que s'uneixen fortament entre elles per permetre la fusió total entre la vesícula donadora i la membrana receptora. L'especificitat de l'establiment de lligams o *tethering* i de la fusió de membranes és crítica per preservar la identitat dels orgànuls i mantenir el flux de la càrrega de les vesícules. Aquesta especificitat està majoritàriament mediada per les Rabs. L'aparellament final entre SNAREs afins (v-SNARE la de la vesícula donadora i t-SNARE la de la vesícula o membrana diana) asseguren també la precisió de la fusió. Les parelles v- i t- SNARE són separades després de l'acoblament per l'ATPasa NSF (*N-etil-maleimida Sensitive Factor*) reclutada per SNAP (*Soluble NSF attachment protein*). De fet, el nom d'SNARE prové de la identificació d'aquests factors com a factors units a SNAP (*SNARE, soluble NSF attachment protein receptors*). Les syntaxines són membres de la família SNARE que també intervien en aquesta fusió entre vesícules, en el pas posterior al *docking*, per acabar de "cordar la cremallera" (*zippering*).

Aquesta fusió de vesícules no només té lloc entre endosomes, els mateixos esdeveniments tenen lloc per exemple entre vesícules del complex de Golgi. La fusió de membranes és un dels processos més importants i vitals pel tràfic intracel.lular.

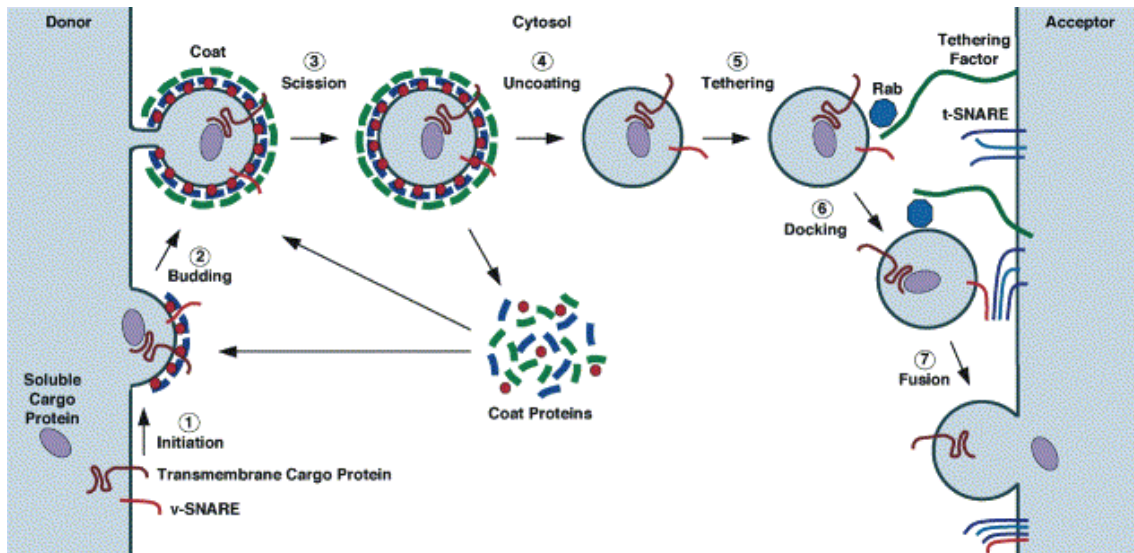


Fig 8. Formació, tràfic i fusió d'una vesícula [Bonifacino JS, Glick BS 2004].

ENDOSOMES QUE SENYALITZEN

La visió que la senyalització es localitzava només a la membrana plasmàtica va canviar al principi dels anys 90 quan Bergeron, Posner i el seu equip van trobar que la majoria de molècules del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) actives i els seus principals efectors no es localitzaven a la superfície cel·lular sinó als endosomes [Di Guglielmo GM *et al*, 1994], suggerint que la senyalització del receptor continuava succeint en aquest compartiment.

El paper dels endosomes en la senyalització anava prenent forma a mesura que s'anaven trobant diferents proteïnes de senyalització actives als endosomes ([Pol A *et al*, 1998; Choy E *et al*, 1999], revisat a Sorkin A *et al*, 2002 i Miaczynska M. *et al*, 2004). Més endavant, a part d'aquests primers indicis, es van establir evidències funcionals per aquesta senyalització endocítica, demostrant no només la presència de, sinó els establiments/no establiments d'interaccions proteïna-proteïna als endosomes. Els endosomes ja no seran mai més considerats tan sols com un mer embolcall transportador dels complexos de senyalització (Fig.9).

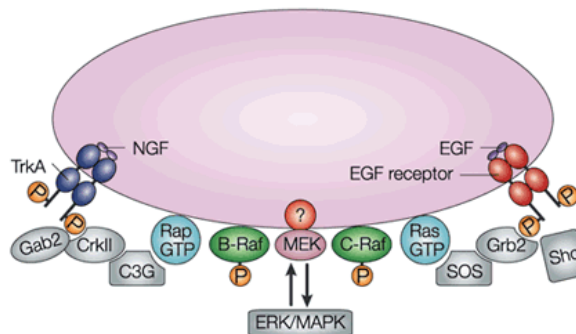


Fig 9. Model hipotètic dels complexos de senyalització als endosomes [Sorkin A *et al*, 2002].

Actualment ja s'ha acceptat plenament que els endosomes juguen un paper actiu en la propagació i amplificació dels senyals. El missatge final, producte de la traducció del senyal que ha començat per exemple a la membrana, no tan sols depèn de l'activació d'un determinat grup de molècules, també des d'on s'han activat i durant quant temps han estat actives. Schmid i el seu grup van demostrar que si el receptor d'EGF activat es quedava a la membrana plasmàtica i no era internalitzat (van utilitzar un mutant de dinamina que impedia l'endocitosi via clatrina) hi havia una menor activació dels elements posteriors (*downstream*) de la via com MAPK o PI3K [Vieira AV *et al*, 1996], indicant que alguns elements de la via s'activaven al compartiment endosomal. Ja no només des de quin compartiment és important, sinó des de quin domini de la membrana de l'endosoma [Gruenberg J, 2001; Zerial M, McBride H 2001; Pfeffer S 2003] s'emet el senyal. Les proteïnes de senyalització als endosomes no es distribueixen doncs a l'atzar, ho fan en dominis determinats.

Una de les raons òbvies del perquè de la implicació dels endosomes en la senyalització és la d'aportar una regulació temporal. El temps de vida dels complexos de senyalització internalitzats des de la membrana depèn de molts paràmetres relatius als endosomes, incloent la pròpia cinètica d'internalització del receptor i la seva classificació dins el compartiment endocític. La durada del senyal depèn de la proporció de receptors reciclats vs la proporció de receptors degradats [Wiley HS 2003; Wiley HS, Burke PM 2001], i el desacoblament del lligand i el receptor depèn del pH, dos processos que tenen lloc a l'endosoma com s'ha vist abans.

L'altre bloc de funcions vinculants pel tàndem senyalització-endocitosi, seria la de portar els complexos de senyalització a un lloc determinat : direccionament o *targeting* (regulació espacial). El desplaçament entre els diferents compartiments endocítics és depenent d'actina i microtúbuls, és a dir del citoesquelet [Sorkin A *et al*, 2002]. Endosomes que continguin receptors activats poden modificar la seva mobilitat produint canvis locals al citoesquelet, per exemple via les proteïnes Rho i les seves efectores Src-quinases. Els moviments dels EE pels microtúbuls involucra Rab5 i PI3K [Zerial M, McBride H 2001]. Les molècules de senyalització poden activar Rab5 i PI3K i modular el moviment de l'endosoma, i per tant la seva distribució subcel·lular. El moviment dels endosomes pot activar directament molècules de senyalització portant-les a un lloc diana determinat [Verhey KJ *et al*, 2001], o al revés, retenir-les en un punt abans d'arribar a un altre on seran desactivades.

En les darreres etapes de la via endocítica, la inclusió d'un receptor a les membranes internes d'un cos multivesicular el porta a la degradació, mentre que si no és inclòs dins aquestes vesícules internes pot seguir senyalitzant. Els endosomes tardans aporten així un punt més a la regulació de la durada del senyal.

Si existeix una població d'endosomes destinats a regular la senyalització, o fins i tot diferents tipus d'endosomes, és un tema que encara està per resoldre. Sembla que hi ha alguns endosomes molt especialitzats, que no són ben bé ni EE ni LE, i això fa pensar que potser hi ha una població heterogènia d'endosomes, un endosoma concret per a cada via de senyalització [Miaczynska M *et al*, 2004]. Els microdominis de la membrana plasmàtica (caveoles per exemple) s'internalitzen seguint el patró de les vies endocítiques (senyalitzen, regulen espai-temporalment, utilitzen el citoesquelet [Parton RG, Richards AA 2003; Pelkmans L *et al*, 2001]). Així, els caveosomes representen una població endosomal de composició diferent, que no té tots els marcadors d'un EE (poden tenir Rab5 però no EEA1) o d'un LE tradicional.

CAVEOLES

Descrites per Palade [Palade GE 1953] i Yamada [Yamada E 1955] als anys 50, es poden definir com a “petites vesícules o sots que comuniquen la cèl.lula amb l’exterior”. D’elles s’han dit coses com “ningú s’esperava la varietat de molècules de senyalització que es concentren en aquest domini”, o “amb tantes molècules de senyalització agrupades en un mateix punt, és el lloc ideal per a la integració de senyals”, o “el seu sistema de membranes és igual en complexitat a qualsevol altre orgànul o compartiment cel.lular”. Més concretament són un subtipus de *raft*, amb una forma característica, anomenada de flascó o omega, d’una grandària d’entre 50 i 100 nm. Contenen una proteïna estructural principal, la caveolina, i com a *raft* que són, estan enriquides en colesterol i glucoesfingolípids (Fig.10).

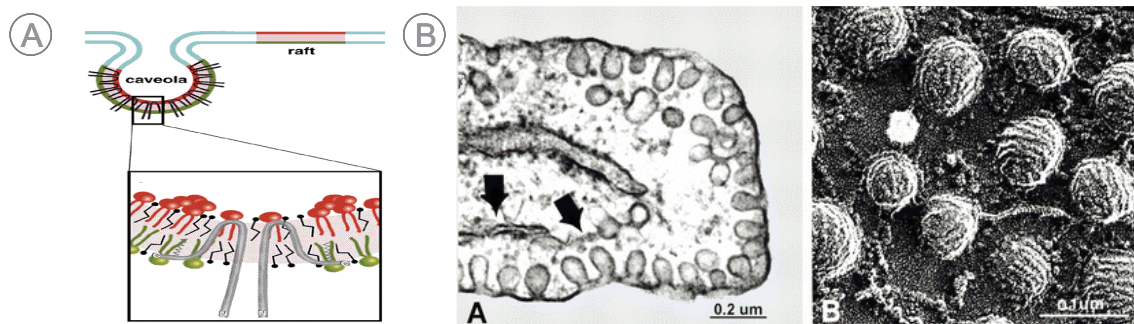


Fig 10. A) Diagrama d’una caveola i de la caveolina. B) secció fina de microscòpia electrònica i imatge d’un criogratat de caveoles de fibroblast, d’Anderson RG 1998.

Les caveoles estan en molts tipus cel.lulars diferents: cèl.lules endotelials, adipòcits, miòcits, fibroblasts, cèl.lules epitelials, pneumòcits, hepatòcits, etc. S’han implicat en moltes funcions com la senyalització, la regulació del metabolisme lipídic, l’endocitosi i actuar com a mecanosensors (revisat a Parton RG, Simons, K 2007). Les proteïnes estructurals per excel.lència de les caveoles són les caveolines : Cav1, Cav2, Cav3. La simple expressió ectòpica de Cav1 pot formar caveoles *de novo* en un Cav1-/- [Fra AM *et al*, 1995]. La Cav3 s’expressa en múscul esquelètic i cardíac [Way M, Parton RG 1995] i és necessària per la formació de caveoles en aquests teixits. En canvi, la Cav2 no és necessària per la formació de caveoles [Razani B *et al*, 2002] i el seu transport cap a la membrana plasmàtica és dependent de caveolina 1.

La Cav1 uneix colesterol i forma oligòmers altament ordenats [Murata M *et al*, 1995]. Cada caveola conté unes 144 molècules de caveolina. El model actual de formació de caveoles suggereix que la caveola es forma al Golgi gràcies a la oligomerització de la caveolina i a la unió d’aquesta a colesterol, formant una pre-caveola que és transportada fins a fusionar-se amb la membrana plasmàtica [Parton RG *et al*, 2006]. El paper de la caveolina en la formació de caveoles està ben establert com a model teòric, però els mecanismes moleculars exactes, o la intervenció d’altres proteïnes, encara no es coneixen del tot. Al gener del 2008 es va publicar un treball que descrivia una nova proteïna, la PTRF (*PTRF-cavin*), necessària per la formació i funció de les caveoles [Hill MM *et al*, 2008], que s’havia aïllat com a factor de transcripció inicialment, i ja s’havia trobat a les caveoles pel grup de Tranum-Jensen feia temps [Voldstedlund M *et al*, 2003; Voldstedlund M *et al*, 2001; Vinten J *et al*, 2005]. PTRF també s’havia trobat abans en caveoles immunopurificades d’adipòcits humans [Aboulaich N *et al*, 2004], però és en aquest darrer treball on es demostra definitivament que la PTRF és necessària per la formació de les caveoles en mamífer i en peix zebra, i que s’associa selectivament a les caveoles ja madures que han arribat a la membrana plasmàtica. No s’associa a caveolina no-caveolar (la de Golgi) ni a mutants de caveolina que no formen caveoles [Hill MM *et al*, 2008].

A part de formar caveoles, la caveolina intervé en altres funcions biològiques importants. Per exemple, una disminució en l'expressió de la Cav1 es relaciona amb transformació cel.lular i invasió tumoral [Williams TM, Lisanti MP 2005], o amb defectes en la regeneració hepàtica [Fernández MA *et al*, 2006]. Malgrat això, els mecanismes precisos pels quals les caveoles/caveolina regulen i són regulades dins la cèl.lula no es coneixen amb exactitud.

Les caveoles són estructures estables [Tagawa A *et al*, 2005], que resten intactes després d'un cycle endocític, o de fusionar-se entre elles formant el que s'anomena caveosoma, i poden ser reciclades de nou cap a la membrana plasmàtica [Pelkmans L 2005]. De totes maneres la caveolina esdevé mòbil i la caveola es desestructura si s'extreu el colesterol [Pelkmans L 2005]. La substitució de colesterol pel seu precursor desmesterol (el desmesterol és convertit a colesterol per la 24-dehidrocolesterol reductasa), fa que les caveoles siguin diferents en mida, morfologia, i nombre de caveolines per caveola, i que l'endocitosis de diferents tipus de lligands per caveoles es redueixi un 25% [Jansen M *et al*, 2008], assenyalant que els nivells de colesterol de les caveoles no són casuals.

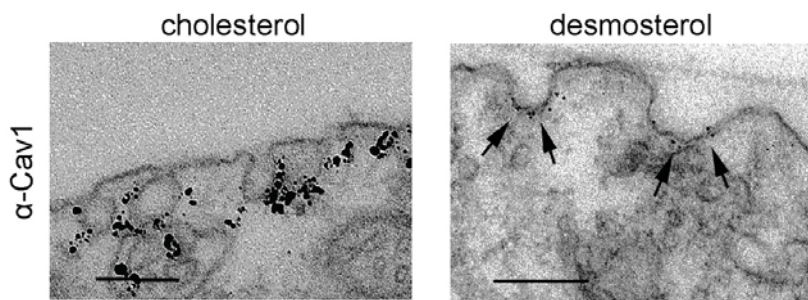


Fig 11. El colesterol és necessari per la integritat de les caveoles [Jansen M *et al*, 2008].

Contràriament a l'endocitosis mediada per clatrina, on la identitat - el què està inserit a la membrana que formarà la vesícula - es genera al moment previ a la formació de la vesícula i es perd quan aquesta vesícula es fusiona amb la membrana endosomal receptora, els components de la caveola (caveolina, colesterol, i altres proteïnes com PDGFR, SRB1, PKCalfa, SOS, Grb2, Ras, Raf, annexines 2 i 6, actina, VAMPs, etc.) no són reclutats, perquè ja es troben a la caveola, i es mantenen durant tot el camí endocític, i no es perden tot i fusionar-se amb caveosomes o endosomes [Parton RG 2004] (Fig.12).

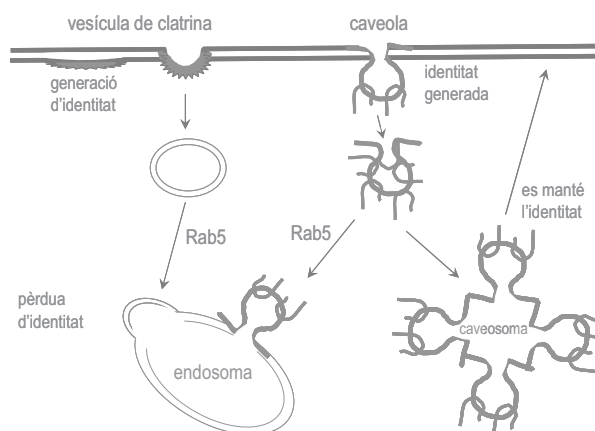


Fig 12. Manteniment o pèrdua d'identitat en l'endocitosis dependent de clatrina i l'endocitosis dependent de caveoles. Adaptació de Parton RG 2004.

Les caveoles presenten una composició lipídica molt característica, tenint com a component principal el colesterol, i enriquides en esfingomielina, gangliòsids GM1, GD3, ceramida, diacilglicerol i fosfatidilinositol difosfat [Hao M, Maxfield FR 2000; Choudhury A et al, 2002]. El lligam entre colesterol i caveolina, però, va més enllà d'una simple raó estructural: la caveolina regula l'homeòstasi i el transport intracel·lular del colesterol [Smart EJ et al, 1996; Scheiffele P et al, 1998] (veure [Transport intracel·lular de colesterol més endavant](#)). La secreció (efluxió) de colesterol té lloc des de les caveoles, i també la seva captació en forma de lipoproteïnes HDL, el receptor de les quals (SRB1) es localitza a les caveoles. Els nivells de colesterol regulen l'expressió gènica de caveolina unint-se al seu promotor (regió SREBP). L'expressió d'un mutant de la caveolina que funciona com a dominant negatiu (cav-3^{DGV}) causa una acumulació de colesterol lliure als endosomes tardans, la disminució del colesterol a la membrana plasmàtica i una reducció en la síntesi i l'efluxió de colesterol. Es creu que l'acció d'aquest mutant és impedir la sortida del colesterol que s'ha desesterificat des dels LE, ja que actua sinèrgicament amb la droga que fa aquest efecte U18666A [Pol A et al, 2001]. El colesterol és necessari pel tràfic de la caveolina des del Golgi fins a la membrana plasmàtica, i si s'extreu, la caveolina s'acumula al Golgi. També s'ha demostrat que un increment de colesterol fa que la sortida de la caveolina del Golgi sigui més ràpida [Pol A et al, 2005]. Aquest treball també assenyala com la relació de la caveolina amb els lípids va molt més enllà, perquè el tractament amb àcids grassos fa que la caveolina de la membrana vagi cap als cossos lipídics formats com a resposta al tractament, de forma reversible, on probablement tingui un paper de protecció contra la lipòlisi.

TRANSPORT INTRACEL·LULAR DE COLESTEROL

El colesterol és necessari pel creixement i la viabilitat de les cèl·lules. Els metabolits del colesterol inclouen àcids biliars, esterols, i hormones esteroidees, que tenen funcions fisiològiques vitals. El colesterol és un lípid, i té una funció estructural molt important a les membranes, sobretot a la membrana plasmàtica. Es creu que la interacció del colesterol amb els fosfolípids de membrana és però inespecífica, mentre que la interacció del colesterol amb proteïnes és altament específica [Westover EJ et al, 2004].

Les cèl·lules obtenen el colesterol de dues maneres : primera, l'adquireixen del torrent sanguini unit a la lipoproteïna LDL, *Low Density Lipoprotein* (s'anomena via endocítica); segona, el sintetitzen *de novo* (via biosintètica). Determinats tipus cel·lulars - el fetge o cèl·lules esteroïdògenes- també el poden captar a través de les lipoproteïnes HDL. Les cèl·lules censen constantment els nivells de colesterol lliure intracel·lular utilitzant els dominis SSDs (*Sterol Sensing Domains*) presents en moltes proteïnes. Quan hi ha colesterol lliure, la cèl·lula o bé l'esterifica, procés dut a terme al reticle endoplasmàtic per l'enzim ACAT, i l'emmagatzema en cossos lipídics, o bé l'allibera a l'exterior, procés anomenat efluxió (efflux) de colesterol.

Amb moltes preguntes sense resposta, el transport intracel·lular de colesterol ha esdevingut una de les àrees principals de la recerca en les darreres dècades [Ikonen E 2008].

▪ COLESTEROL PROVINT DE LES LDL

L'LDL s'uneix al seu receptor (LDLR) als sots de clatrina de la membrana plasmàtica. La vesícula recoberta s'internalitza, perd la clatrina i es fusiona amb els endosomes. Els receptors passen pel compartiment de reciclatge, i són retornats a la membrana plasmàtica [Brown MS, Goldstein JL 1986]. L'LDL és hidrolitzat per una lipasa en un endosoma intermedi i en endosomes tardans-lisosomes estarà en forma de colesterol lliure. Aquest colesterol lliure surt dels endosomes tardans i és transportat fins a la membrana plasmàtica. Una part d'aquest colesterol lliure que surt dels endosomes tardans va fins al reticle endoplasmàtic, on

serà esterificat de nou per l'enzim ACAT1 resident al reticle. Es creu, doncs, que des dels LE hi ha dues vies de transport diferents, la que va al reticle i la que arribarà fins a la membrana plasmàtica passant primer pel Golgi (Fig.13). Aquesta exportació de colesterol des dels endosomes tardans depèn de dues proteïnes anomenades NPC1 i NPC2 (*Niemann-Pick types C1 i C2*), que reben aquest nom perquè no són funcionals en la malaltia coneguda com síndrome de Niemann-Pick (per revisió, veure Chang TY *et al*, 2006). És una malaltia hereditària congènita, caracteritzada per una acumulació de lípids als espais neuroviscerals i un desordre en el tràfic de colesterol desesterificat i esfingolípid, que provoca una acumulació d'ambdós al compartiment LE-lisosomal, en cèl.lules de fetge, melsa i cervell. La malaltia es deu a una mutació homozigòtica del gen de NPC1 o del gen de NPC2. La síndrome es caracteritza per un retard mental i una neurodegeneració severa, particularment de les neurones de Purkinje localitzades al cerebel.

En cèl.lules mutants per NPC1 o NPC2 (anomenades cèl.lules NPC, *Niemann-Pick cells*), la sortida de colesterol i possiblement també d'esfingolípid des dels LE està bloquejada. NPC1 es localitza als LE, associada tant a les membranes internes dels cossos multivesiculars com a la membrana externa de l'endosoma [Garver WS *et al*, 2002], i NPC2 és una proteïna soluble que es localitza a l'interior o lumen dels LE. Totes dues uneixen colesterol [Yokoyama S 2005; Ohgami N *et al*, 2004]. Els rols exactes d' NPC1 i NPC2 en l'exportació de lípids endosomals no estan clars, però sembla que NPC2 transferiria al colesterol des de dins l'endosoma fins a l'NPC1, que el transportaria cap a fora del compartiment endocític tardà fins a altres compartiments com el Golgi o el compartiment de reciclatge [Hao M, Maxfield FR 2000] (Fig.13). El transport de colesterol des dels LE dependent d'NPC1 no està clar si és vesicular o no vesicular, més aviat sembla que n'hi hauria de tots dos tipus [Maxfield FR, Wustner D 2002].

En models cel.lulars, l'acumulació de colesterol provocada per mutacions en NPC1 i NPC2 es pot revertir sobreexpressant Rab9 [Choudhury A *et al*, 2002], que és una de les GTPases dels LE clau en el transport vesicular des d'aquest compartiment, especialment en acostament i fusió de vesícules des dels LE fins al TGN [Pfeffer S, Aivazian D 2004]. La sobreexpressió de Rab9 en cèl.lules mutants d'NPC1 incrementa el tràfic vesicular per aquesta via, i així s'accelera el transport del colesterol acumulat que arriba a Golgi sense necessitat d'NPC1/NPC2. Per tant, des dels LE al TGN, hi ha dos mecanismes diferents de transport de colesterol : un mediat per NPC1 i un altre que involucra vesícules dependents de Rab9.

Els endosomes-NPC1 també es caracteritzen per ser positius per LBPA, que es troba als LE de les cèl.lules normals. Estudis de Pagano i Marks, utilitzant l'anàleg fluorescent de la lactosil ceramida, BODIPY-LacCer, han mostrat que en aquests endosomes també s'hi acumulen esfingolípid (esfingomielina, galactosil ceramida, i gangliòsid GM1), que en cèl.lules normals arriben al compartiment endocític tardà des de la membrana plasmàtica i continuen sense aturar-se fins al Golgi [Marks DL *et al*, 2005].

Algunes amines com l'U18666A alteren el tràfic de colesterol en cèl.lules normals, donant un fenotip similar al de Niemann-Pick [Liscum L *et al*, 1999]. Es creu que aquest compost s'uneix al LBPA i el bloqueja fent que no es pugui moure entre les vesícules internes i la membrana externa de l'endosoma. Potser modificant la composició de les membranes afecta la localització d'NPC1, provocant una acumulació de colesterol lliure als LE [Liscum L 2000].

També hi ha un transport de colesterol derivat de les LDL que s'anomena retrògrad, des de la membrana plasmàtica fins al reticle, que pot implicar una via independent de clatrina i dependent de *rafts/caveoles* [Kirkham M, Parton RG 2005], totalment al marge dels elements endosomals. Aquesta via és utilitzada per molts patògens, un elegant mecanisme per entrar dins de la cèl.lula i arribar al reticle evitant ésser degradats als lisosomes, revisat per [Pelkmans L 2005; Cohen AW *et al*, 2004].

▪ SÍNTESI ENDÒGENA DE COLESTEROL

El complex proteic integral de membrana SCAP/SREBP localitzat al reticle controla l'expressió de gens involucrats en la síntesi de colesterol [Goldstein JL *et al*, 2006]. La disminució dels nivells de colesterol estimula la translocació del complex SCAP/SREBP cap al Golgi, on és processat per proteases, alliberant factors de transcripció (SREBPs) que entren al nucli i activen la transcripció de gens de síntesi de colesterol com l'HMG-CoA-reductasa. La síntesi de colesterol té lloc al reticle, i un cop sintetitzat es transporta ràpidament cap als *rafts* per un transport no-vesicular. Aquest transport implica la Cav1 (revisat per Matveev S *et al*, 2001) i és independent d' NPC1 [Liscum L *et al*, 1989]. Tot i ser el lloc de biosíntesi, al reticle és on hi ha menys colesterol de la cèl.lula, un 0.5 % aproximadament. Els dos compartiments on hi ha més colesterol són la membrana plasmàtica (80%) i el compartiment de reciclatge (20%) [Maxfield FR, Menon AK 2006].

▪ EFLUXIÓ DE COLESTEROL

El colesterol que s'ha obtingut de la hidròlisi de les LDLs mai es queda a dins de la cèl.lula com a colesterol lliure en condicions normals. O bé va ràpid cap als dominis *raft* de membrana o bé es torna a esterificar i s'emmagatzema en forma de cossos lipídics. La biosíntesi i la hidròlisi d'ésters de colesterol estan succeint continua i cíclicament. El colesterol va ràpidament fins a la membrana on és expulsat (a través de les caveoles), i això és el que s'anomena efluxió (*efflux*) de colesterol. És un procés molt important, doncs les cèl.lules poden emmagatzemar però no degradar colesterol, i el colesterol lliure els hi és tòxic [Yokoyama S 2005].

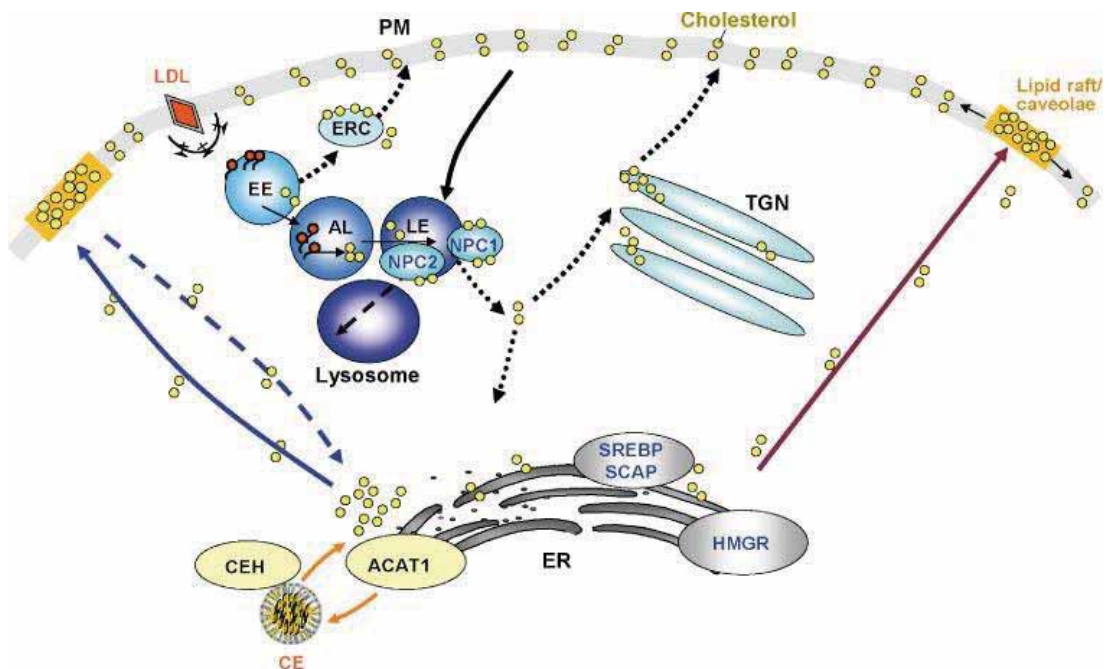


Fig 13. Transport intracel·lular de colesterol [Chang TY *et al*, 2006].

GOLGI I VESICULACIÓ

Un dels processos regulats pels nivells de colesterol és la formació de vesícules a l'aparell de Golgi. Aquest procés de vesiculació determina el tràfic de sortida des del Golgi, i és dependent en part de colesterol i de la fosfolipasa citosòlica A2 (cPLA₂) [Grimmer S *et al*, 2005]. La cPLA₂ també intervé en la formació de vesícules en altres compartiments (Fig. 14 A). La depleció de colesterol inhibeix la formació de vesícules de la via secretora al TGN [Wang Y *et al*, 2000], i *vice versa*, l'increment de colesterol induïx una gran formació de vesícules derivades del Golgi [Grimmer S *et al*, 2005]. En aquest context, Stüven i el seu grup han demostrat que els nivells de colesterol a l'aparell de Golgi són crítics pel transport de proteïnes des d'aquest compartiment [Stüven E *et al*, 2003]. Recentment s'ha publicat que la sensibilitat de la cPLA₂ als nivells de colesterol [Grimmer S *et al*, 2005; Klapisz E *et al*, 2000] modula la translocació d'aquesta proteïna cap al Golgi positivament, és a dir, quan més colesterol més cPLA₂ a les membranes de Golgi. La unió de la cPLA₂ a les membranes de Golgi facilita la generació de lípids en forma de con invertit (lisofosfolípids, Fig 14 B), alliberant-se àcid araquidònic com a producte de la hidròlisi exercida per la fosfolipasa a les membranes [Brown WJ *et al*, 2003]. Aquests lípids en forma de con fan que la membrana es pugui corbar [Kooijman EE *et al*, 2003] i es pugui formar una vesícula que s'escindirà de les membranes del Golgi. Per a la formació de la vesícula es necessita l'acció coordinada d'enzims que canvien la composició lipídica i la curvatura de la membrana (cPLA₂, endofilina i CtBP/BARS) [Brown WJ *et al*, 2003].

Altres factors com la dinamina [Grimmer S *et al*, 2005] i el citoesquelet d'actina [Egea G *et al*, 2006] també estan involucrats en aquest procés, suggerint que la vesiculació al complex de Golgi i per tant el transport de proteïnes des d'aquest compartiment, estan regulats per interaccions entre múltiples proteïnes i lípids [Brown WJ *et al*, 2003].

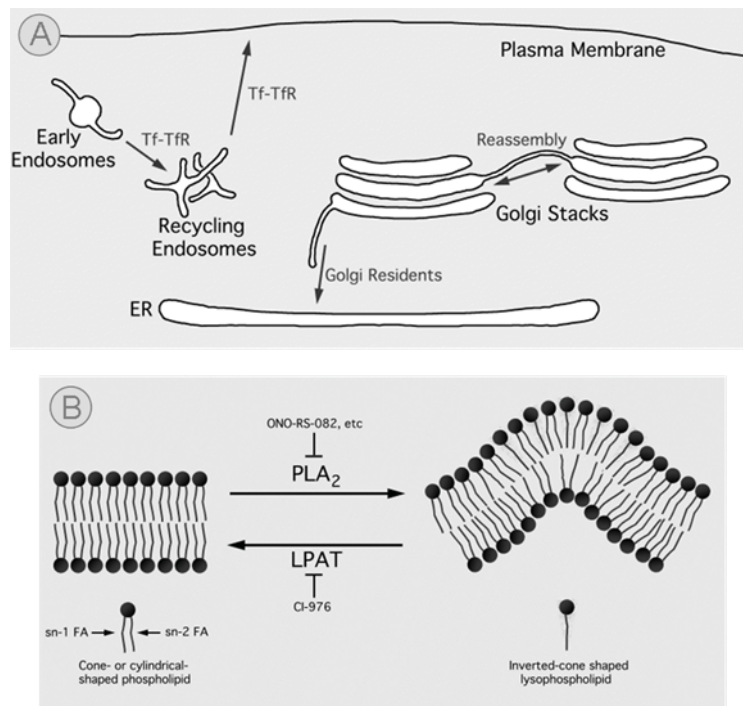


Fig 14. A) compartiments cel·lulars on actua la cPLA₂. B) mecanisme d'acció per generar els cons invertits [Brown WJ *et al*, 2003].

Les fosfolipases es relacionen amb processos inflamatoris. Algunes annexines, sobretot l'Anx1 i l'Anx2, i també l'Anx5, inhibeixen la cPLA₂, actuant com a antagonistes imitant l'efecte dels glucocorticoids, provocant un efecte antiinflamatori [Kim S *et al*, 2001]. També s'ha vist que l'Anx6 pot inhibir la cPLA₂ *in vitro* [Thorin B *et al*, 1995] [Koumanov K *et al*, 1997]. L'habilitat de les annexines per inhibir les fosfolipases s'ha atribuït a la seva propietat d'unir fosfolípids impedit que la cPLA₂ els pugui hidrolitzar.

La possibilitat de que l'Anx6 interfereixi en el tràfic de caveolina des del Golgi mitjançant la inhibició de la cPLA₂ per altres mecanismes ha estat analitzada en aquest treball com es veurà als resultats.

LES ANNEXINES

Introducció

ELS ORÍGENS I LA FAMÍLIA

Les annexines són una família de proteïnes que s'uneixen a fosfolípids d'una manera dependent de calci i que reben aquest nom per la capacitat intrínseca d'unir-se a membranes cel·lulars. Van ser descobertes l'any 1978 per C.Creutz, Christopher J.Pazoles i Harvey B.Pollard, encara no s'anomenaven annexines però s'agrupaven sota una estructura conservada i comú. Quan una família de proteïnes s'han conservat altament al llarg de l'evolució, i es troben des de plantes superiors fins a animals vertebrats i invertebrats, això anticipa una funció biològica important. Aquesta premissa es pot aplicar a la família de les annexines, una família de proteïnes definida com a tal per Crompton, Moss, i Crompton, prenent com a criteri bàsic taxonòmic la seva capacitat intrínseca d'unir-se (*annexionar-se*) a diferent tipus de membranes cel·lulars mitjançant l'afinitat que tenen pels fosfolípids àcids (sobretot fosfatidilserina i fosfatidilinositol) amb dependència de calci [Crompton MR *et al*, 1988] .

Les annexines han estat identificades com a mediadors de diferents processos endocítics, com l'organització i el tràfic d'algunes membranes cel·lulars, la interacció de determinades membranes amb el citoesquelet d'actina i el transport d'ions a través de diferents membranes. Alhora, altres estudis han relacionat a alguns membres de la família amb nombrosos processos com activitats antiinflamatòries, anticoagulants i com a mediadors o reguladors d'interaccions cèl.lula-cèl.lula i cèl.lula-matriu extracel·lular. Aquesta diversitat de funcions, va provocar l'aparició de diferents tipus de nomenclatura com lipocortines, cromobindines, calcimedines, proteïnes anticoagulants [Pepinsky RB *et al*, 1988; Moore PB *et al*, 1984; Creutz CE 1981; Geisow M *et al*, 1984] o calpactines [Kaetzel MA *et al*, 1994; Nakata T *et al*, 1990; Tomas A, Moss SE 2003]. Aquesta barreja babilònica de noms portava confusió, i és per això que finalment s'agrupen totes sota el mateix nom d'annexines [Pollard HB *et al*, 1990; Avila-Sakar AJ *et al*, 1998]. Van ser anomenades definitivament annexines als anys 80. Trenta anys després, encara hi ha molts enigmes per ésser desxifrats.

Com indica el seu nom les annexines són proteïnes responsables d'establir contacte entre dues superfícies diferents, ja sigui entre dues membranes o entre una membrana i diferents tipus de complexos proteics. Aquesta funció és essencial en processos com la fusió entre vesícules, en la relació entre la membrana plasmàtica o els endosomes amb el còrtex d'actina i probablement també en el manteniment de la morfologia dels endosomes primerencs i tardans.

Sota la denominació d'annexines actualment es coneixen 161 proteïnes úniques i diferents expressades en més de 65 espècies, que van des de fongs fins a plantes i vertebrats superiors [Morgan RO, Fernandez MP 1997]. Fa poc es va descriure la primera annexina de llevat, que era l'únic organisme on no se n'havien trobat [Morgan RO *et al*, 2004]. Hi ha 13 annexines (anomenades des d'Annexina A1 fins a Annexina A13) en vertebrats. Es classifiquen filogenèticament en cinc grups: A (annexines de vertebrats), B (annexines d'invertebrats), C (annexines de fongs i relatius), D (annexines de plantes) i E (annexines de procarïotes) [Morgan RO, Fernandez MP 1997; Morgan RO, Fernandez MP 1995]. Són proteïnes d'expressió ubíqua, i en general abundants a la cèl.lula, representant el 0.5 % de la proteïna cel·lular, i poden arribar fins a un 2% com l'Anx6 en fetge. De fet, d'aquests primers estudis sobre

annexines (fets en limfòcits B, vesícules sinàptiques, fetge, intestí o múscul llis entre d'altres) ja se'n pot extreure la idea que probablement cada membre de la família té una funció diferent, que depèn també del teixit on es localitzi, qüestions que encara no tenen una resposta clara, i són un dels punts més interessants tal com deia (cito textualment) un dels pares de les annexines M. J Crumpton : « *however, the need for satisfying explanations for the diversity of structure at the N-terminus, for the roles of post-translational modifications, and for their cellular, tissue and species distribution, still remain to entice new investigations and investigators* » (Imperial Cancer Research Fund, 1992).

DE L'ESTRUCTURA A LA FUNCIO

La confirmació definitiva per a poder anomenar les annexines com a nova família de proteïnes va ser, a part de les seves propietats bioquímiques comuns, la seva homologia de seqüència d'aproximadament el 50%, tant a nivell de nucleòtids com d'aminoàcids. Totes presenten una estructura interna formada per 4 repeticions en tàndem altament conservades, d'uns 70 aminoàcids cada repetició, on es troben els llocs d'unió a calci i fosfolípids, i un extrem N-terminal variable, que dóna identitat i "personalitat" a cada annexina (Fig.15). Aquest domini variable pot estar conservat en annexines que realitzen funcions properes, com passa entre l'Anx1 i l'Anx2. Aquest domini variable es troba modificat post-traduccionalment en moltes annexines (glicosilat, acetilat, o miristoïlat), és un domini d'interacció amb altres proteïnes (com les proteïnes S100; revisat recentment a Miwa N et al, 2008; Rintala-Dempsey AC et al, 2008) o d'unió a membranes. És susceptible a proteòlisi (per calpaina, catèpsina, plasmina o quimiotripsina) i és fosforilable per diferents Ser/Thr-quinases (com la PKC) i Tyr-quinases (com el EGFR). L'extrem N-terminal modula la funció i la localització de les diferents annexines.

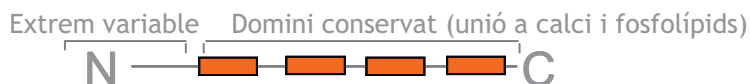


Fig 15. Estructura de les annexines.

Un altra peculiaritat d'aquesta família és la de presentar, en la regió conservada, dominis o motius canònics d'unió al calci, anomenats tipus II [Weng X *et al*, 1993], diferents al domini EF-hand (tipus I) descrit en la majoria de proteïnes que uneixen calci (com per exemple la calmodulina). La seqüència i disposició espacial d'aquests dominis varia sensiblement entre annexines, pel que podria ser responsable de les diferències que existeixen en l'afinitat pel calci per a cada membre de la família. Els dominis d'unió a calci "EF-hand" tenen certa similitud als dominis d'unió a calci de les annexines [Geisow MJ *et al*, 1986], apuntant a un possible ancestre comú evolutiu entre la família de les annexines i les proteïnes "EF-hand". El motiu "Tipus II" de les annexines conté la seqüència ultraconservada descrita inicialment per Johnson i el seu equip [Geisow MJ *et al*, 1986] i anomenada "seqüència endonexina" de 17 residus : KGhGTDExxLpILApR. Per unir calci participen els primers residus de la seqüència endonexina (KGhGT) i un residu àcid (D/E) situat 39 posicions endavant en sentit C-terminal, però molt proper espacialment en l'estructura tridimensional [Geisow MJ *et al*, 1986; Weng X *et al*, 1993].

Totes les annexines descrites fins ara presenten el model estructural de les 4 repeticions. L'única excepció a la norma és l'Anx6, que presenta 8 repeticions enlloc de 4 [Crompton MR *et al*, 1988; Sudhof TC *et al*, 1988], unides per una regió anomenada "frontissa" [Avila-Sakar AJ *et al*, 2000] o "linker", com s'ha esquematitzat a la Fig.16. Aquesta regió (entre les

repeticions quatre i cinc) és significativament més llarga que qualsevol de les altres seqüències connectores i divideix la proteïna en dues meitats, que alineades comparteixen un 50% d'identitat. L'Anx6 prové de la duplicació del gen que codificava per l'Anx10, de 4 repeticions [Morgan RO *et al*, 2004]. Una segona característica especial de l'Anx6 és la generació de dues isoformes per processament alternatiu. Difereixen en un hexapèptid situat a prop de l'inici de la setena repetició [Kaetzel MA *et al*, 1994].

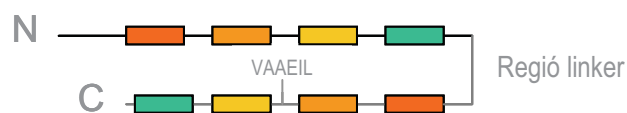


Fig 16. Estructura de l'Annexina A6. S'indica el punt d'*splicing* a l'inici de la 7a. repetició.

Encara que les annexines 1, 2, 4 i 5 no codifiquin directament per a un polipèptid de 8 repeticions, s'ha demostrat que existeixen en formes dimèriques, creant estructures similars a la de 8 repeticions. La dimerització és una propietat important de les annexines, formant grans complexes que poden formar ponts entre vesícules i membranes, o acoblaments directes entre el citoesquelet i les membranes [Nakata T *et al*, 1990; Tomas A, Moss SE 2003]. Les annexines es poden unir de diferents maneres a les membranes, individualment (a una membrana) o en forma dimèrica (a dues membranes simultàniament), ja sigui dimeritzant (com fa l'Anx1, per exemple) o per la mateixa estructura com en el cas únic de l'Anx6 (Fig. 17) . Poden formar-se dímers, trímers, dímers de trímers i trímers de dímers, arribant a formar autèntics "tapissos" bidimensionals sota la bicapa (o sobre monocapes sintètiques) [Oling F *et al*, 2001].

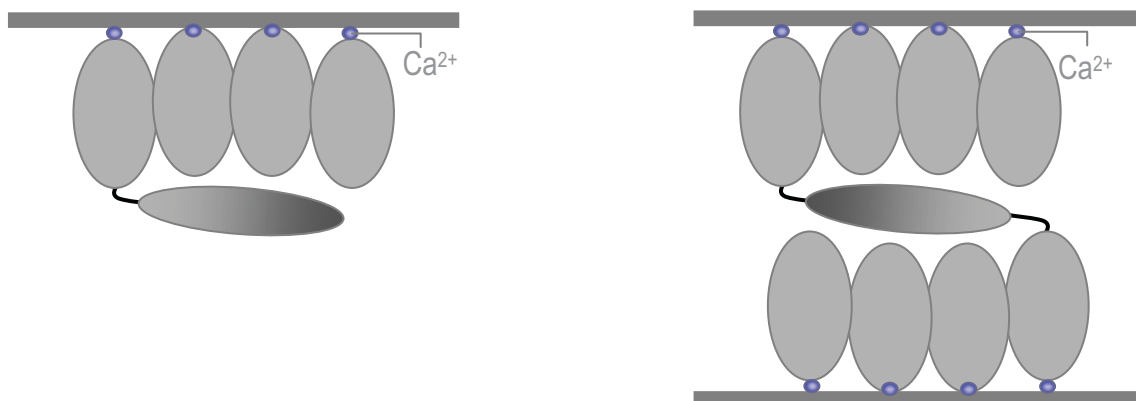


Fig.17. Models d'associació a membrana per a una annexina qualsevol i per a l'Annexina 6 [Gerke V *et al*, 2005].

Es podria pensar que la família prové d'un ancestre gènic que codificava per a una sola repetició, que per duplicació i diversificació ha fet néixer i créixer les annexines durant l'evolució. Si això és correcte, les proteïnes d'una o dues repeticions haurien d'existir, però de moment encara no han estat descobertes. Entre totes les annexines existeix un elevat nivell d'homologia, tant entre espècies (98 % d'homologia entre l' annexina A2 humana, bovina i de rata per exemple) com intraespecífica (hi ha un 40-60% d'homologia entre totes les annexines d'un vertebrat). Aquest alt grau de conservació és encara més evident quan es mira l'estructura tridimensional, que fins i tot en espècies molt allunyades filogenèticament, es manté gairebé exacte. Els estudis cristal·logràfics han mostrat uns plegaments homòlegs per a totes les annexines. Tenen dues parts ben diferenciades: l'extrem N-terminal i el nucli, o regió C-terminal. El nucli o part central 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 plegats segons les repeticions 1 i 4, i 2 i 3 (veure modelatge de l'Anx6 Fig.18), construint uns mòduls hermètics estabilitzats per interaccions hidrofòbiques. Les parelles de repeticions 1-4 i 2-3 deixen al centre una zona hidrofílica que podria funcionar com a canal iònic [Burns AL et al, 1989; Pollard HB et al, 1990]. En la molècula plegada cada repetició comprèn cinc hèlixs-alfa, connectades per *loops* curts on es troben els llocs d'unió de calci.

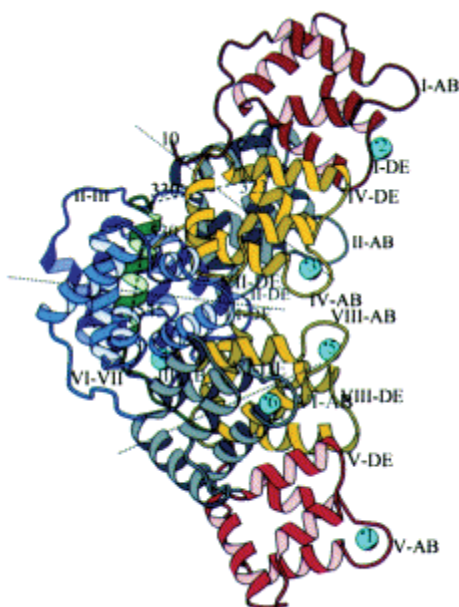


Fig 18. Estructura tridimensional de l'Anx6, unida a calci [Avila-Sakar AJ *et al*, 1998].

Podríem dir, doncs, que qualsevol membre de la família de les annexines ha de complir dos requisits bàsics: la capacitat d'unir fosfolípids àcids (principalment fosfatidilserina i fosfatidilinositol) de forma dependent de calci, i presentar com a mínim una vegada l'estructura de 70 aminoàcids altament conservada. Les dues característiques, com he volgut reflectir en el títol d'aquest punt, i com revisen molt elegantment Volker Gerke i Stephen Moss [Gerke V, Moss SE 2002], estan íntimament relacionades, ja que és l'estructura conservada de 70 aminoàcids la que conté els motius d'unió a calci i fosfolípids àcids, fent que en la relació entre estructura i funció no es pugui definir clarament quina és la causa i quina la conseqüència.

El calci, els fosfolípids i altres factors descrits més recentment com el colesterol i el pH dirigeixen aquesta innata -en tant que és estructural- promiscuïtat de les annexines per a una dinàmica i àmplia inter-relació espai-temporal amb altres proteïnes, i aquest joc de localitzacions i interaccions determina les seves funcions.

LOCALITZACIÓ INTRACEL·LULAR I FUNCIONS

La localització de cada annexina està estretament vinculada amb la seva funció. Les dues localitzacions majoritàries són la membrana plasmàtica i els endosomes. Seria molt extens recopilar tota la informació de les diferents annexines de la família, així que faré un breu resum de les principals localitzacions prevalents en la literatura.

L'**Anx1** es troba preferentment a la membrana plasmàtica, i en estructures endocítiques i fagocítiques. En fagosomes, sobretot de macròfags [Diakonova M *et al*, 1997], formant part de la maquinària de desactivació del receptor d'EGF en endosomes multivesiculars (MVBs), i també implicada en la formació de les vesícules internes d'aquests MVBs [Futter CE, White IJ 2007]. L'**Anx1** també està implicada en el mecanisme de secreció d'insulina induït per glucosa.

L'**Anx2** forma part de la xarxa del citoesquelet que recobreix la membrana [Chasserot-Golaz S *et al*, 1996] i està associada a vesícules recobertes de clatrina [Creutz CE, Snyder SL 2005]. També s'ha identificat en endosomes primerencs [Harder T *et al*, 1997], i és capaç d'interaccionar amb filaments d'actina i espectrina [Gerke V, Weber K 1984; Hayes MJ *et al*, 2004]. Recentment s'ha demostrat que l'**Anx2** uneix fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat, i els autors postulen que la unió a aquest lípid explica la presència d'**Anx2** en els dominis d'interacció membrana-actina [Zobiack N *et al*, 2002]. També s'ha descrit que l'acumulació de colesterol als endosomes tardans (LE), observada en algunes patologies com Niemann-Pick, recluta *persé* **Anx2** cap a aquest compartiment [Mayran N, Parton RG 2003], on col·labora amb el fosfolípid LBPA en la formació dels MVBs. En presència de colesterol l'**Anx2** s'uneix amb més afinitat a liposomes [Ayala-Sanmartin J *et al*, 2001]. L'**Anx2** és molt abundant en cèl·lules musculars, i actua com a un sensor intracel·lular de calci durant la contracció muscular. No només això, sinó que els canvis de pH que tenen lloc durant la contracció muscular, fan que l'heterotetràmer format per **Anx2-S100A10** (p11) pugui interaccionar amb la membrana també d'una forma independent de calci. Actuar com a sensor de canvis (calci, pH) és una de les funcions principals de gairebé totes les annexines, produint com a resposta canvis en l'estructura de la membrana o modulant la formació de canals iònics [Draeger A *et al*, 2005; Monastyrskaya K *et al*, 2007; Monastyrskaya K *et al*, 2008]. L'expressió d'**Anx2** està disminuïda en càncer de pròstata [Chetcuti A *et al*, 2001].

L'**Anx3** es troba a la membrana plasmàtica i a les membranes de grànuls intracel·lulars, i recentment s'ha utilitzat com a marcador important per al pronòstic de càncer de pròstata [Kollermann J *et al*, 2008], i s'ha vist que juga un paper important en la funció dels hepatòcits durant la regeneració hepàtica [Harashima M *et al*, 2008].

L'**Anx4** es troba associada també principalment a la membrana plasmàtica, i en cèl·lules polaritzades es localitza preferentment en l'apical o en la basolateral en funció del teixit. També hi ha **Anx4** als endosomes d'hepatòcits [Pol A *et al*, 1997].

L'**Anx5** - és un dels membres més coneguts de la família per a la seva utilització en tècniques de citometria de flux. Per la seva capacitat d'unio a fosfolípids s'uneix a la fosfatidilserina exposada a la cara externa de cèl·lules apoptòtiques, fent que es pugui utilitzar com a marcador per a quantificar-les. S'ha trobat a la membrana plasmàtica i vesícules endocítiques, i com a particularitat, localitzada en reticle endoplasmàtic i sarcoplasmàtic

[Giambanco I *et al*, 1993]. També s'ha involucrat en l'agregació de vesícules, i en l'adquisició de fenotip maligne en determinats càncers [Lopez de Silanes I *et al*, 2004; Guzman-Aranguez A *et al*, 2005].

L'**Anx6** és un dels membres de la família més polèmic en quan a localització; està publicat que s'ha trobat en hepatòcits -membranes endosomals [Jackle S *et al*, 1994], membrana apical [Ortega D *et al*, 1998]-, associada al sarcolema de múscul llis [Hazarika P *et al*, 1991a; Hazarika P *et al*, 1991b], al múscul cardíac [Luckcuck T *et al*, 1998], en sinapsis [Inui M *et al*, 1994], associada a membranes de forma depenent de calci [Babiychuk EB, Draeger A 2000], enriquida en fraccions caveolars i rafts lipídics [Babiychuk VS *et al*, 2000], associada al compartiment LE i pre-lisosomal [Grewal T *et al*, 2000; Pons M *et al*, 2000], en vesícules recobertes de clatrina [Lin HC *et al*, 1992] i un llarg etcètera que va des de mitocondris fins a Golgi o reticle en diferents tipus cel.lulars. Les diferents localitzacions fan que si li hagin adjudicat diferents funcions, que van des regulació de l'endocitosi via clatrina, fins a papers en la senyalització, passant pel tràfic intracel.lular i la mort cel.lular programada en neurones.

L'**Anx7** es va descriure en el citosol de cèl.lules *chromaffin*, va ser la primera annexina descrita, purificada com un component capaç d'agregar grànuls cromafínics en presència de calci, i més tard en la membrana plasmàtica de cèl.lules musculars [Kuijpers GA *et al*, 1992; Selbert S *et al*, 1995]. És un gen candidat a actuar com a supressor de tumors en càncer de pròstata [Srivastava M *et al*, 2001a; Srivastava M *et al*, 2001b].

L'**Anx8** s'uneix a l'F-actina [Goebeler V *et al*, 2006], i recentment s'ha implicat en la organització i funció dels endosomes tardans [Goebeler V *et al*, 2008].

L'**Anx9** forma part del complex S100A8/A9, que intervé en la inflamació. Un article d'aquest setembre explica com l'**Anx9** colocalitza amb l'**Anx6** en resposta a calci en membranes de cèl.lules de càncer de mama [Bode G *et al*, 2008].

L'**Anx11** es troba al nucli, fet que podria implicar les annexines en regulació del cicle cel.lular, hi ha alguns treballs publicats que en parlen [Mizutani A *et al*, 1992].

L'**Anx13** es troba particularment enriquida en enteròcits, tot i que també s'ha trobat associada a membranes basolaterals de cèl.lules polaritzades MDCK [Wice BM, Gordon JI 1992].

Les diferents funcions de les annexines s'han anat estudiant d'una forma poc integrada, més aviat caòtica, pel fet de no ser des d'un principi considerades com una família. Després de tot, la idea general seria que les annexines es localitzen sobretot en membranes cel.lulars (tant membrana plasmàtica com membranes endocítiques), i que participen en funcions relacionades amb endocitosi, transport, formació/estabilització de microdominis de membrana, i translocacions a membrana dependents de calci: actuen com a factors de comunicació entre les membranes i els moduladors intracel.lulars com el calci, el pH, o l'entorn lipídic.

(veure resum a la Taula 3).

Taula 3: Resum.

Annexina	Principals localitzacions descrites	Funcions més conegudes
Anx1	<ul style="list-style-type: none"> - Membrana plasmàtica - estructures endocítiques i fagosomes. 	<ul style="list-style-type: none"> - maquinària de desactivació del receptor d'EGF en endosomes multivesiculars (MVBs) d'NIH3T3. - fusió de les vesícules internes dels MVBs. - secreció d'insulina.
Anx2	<ul style="list-style-type: none"> - Forma part del citoesquelet - Vesícules recobertes de clatrina - Endosomes primerencs - Sarcolema 	<ul style="list-style-type: none"> - unions membrana-citoesquelet - sensor de calci i de pH en cèl.lules musculars durant la contracció. - Formació de canals iònics. - Factor anti-tumoral en càncer de pròstata.
Anx3	<ul style="list-style-type: none"> - membrana plasmàtica - coberta d'algunes vesícules intracel.lulars. 	<ul style="list-style-type: none"> - marcador de càncer prostàtic - paper en la regeneració hepàtica.
Anx4	<ul style="list-style-type: none"> - membrana plasmàtica - endosomes d'hepatòcits 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibeix els canals de clor - Segregació de lípids.
Anx5	<ul style="list-style-type: none"> - membrana plasmàtica - vesícules endocítiques - reticle sarcoplasmàtic. 	<ul style="list-style-type: none"> - agregació de vesícules
Anx6	<ul style="list-style-type: none"> - endosomes d'hepatòcits. - Membrana plasmàtica - Sarcolema de múscul llis - Múscul cardíac - Sinapsis - Rafts lipídics/caveoles - Compartiment LE/lisosoma - Vesícules clatrina 	<ul style="list-style-type: none"> - paper anti-tumoral - contracció cardiomiòcits - formació vesícules CCP. - Fusió de vesícules - Senyalització/estabilització microdominis de membrana. - Endocitosi - Tràfic intracel.lular (compartiment endocític)
Anx7	<ul style="list-style-type: none"> - grànuls cromafínics - membrana plasmàtica de cèl.lules musculars. 	<ul style="list-style-type: none"> - agregació de grànuls cromafínics - supressor de tumors prostàtics.
Anx8	<ul style="list-style-type: none"> - membrana plasmàtica - endosomes 	<ul style="list-style-type: none"> - s'uneix a l'F-actina - organització i funció dels LE.
Anx9	<ul style="list-style-type: none"> - membranes 	<ul style="list-style-type: none"> - colocalitza amb l'Anx6 en resposta a calci en membranes de línees de càncer de mama; - Exposició del complex S100A8/A9 a la membrana en resposta a calci.
Anx10	<ul style="list-style-type: none"> - en <i>Drosophila</i> 	
Anx11	<ul style="list-style-type: none"> - nucli 	<ul style="list-style-type: none"> - regulació cicle cel.lular? - es fosforila per MAPK
Anx12	<ul style="list-style-type: none"> - en <i>Hydra Vulgaris</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - es fosforila per PKC
Anx13	<ul style="list-style-type: none"> - enteròcits 	<ul style="list-style-type: none"> - tràfic a la membrana basolateral.

Annexina A6

ANTECEDENTS

L'Annexina A6, protagonista d'aquesta tesi, forma part d'aquesta família i com a tal ha estat implicada en una gran varietat de funcions cel·lulars, i de processos fisiològics, com la proliferació cel·lular, la diferenciació o la traducció de senyals [Gerke V *et al*, 2005; Grewal T, Enrich C 2006]. La majoria de cèl·lules i teixits expressen Anx6. En molts dels teixits analitzats, s'ha trobat Anx6 a la membrana plasmàtica i als endosomes [Gerke V, Moss SE 2002; Jackle S *et al*, 1994; Ortega D *et al*, 1998]. Aquesta localització al punt d'inici (membrana plasmàtica) i al llarg de la ruta endocítica fins als lisosomes [Kamal A *et al*, 1998], concorda amb l'estimulació de l'internalització d'LDL que provoca l'expressió ectòpica d'Anx6, i transport de l'LDL internalitzat fins als lisosomes [Pons M *et al*, 2001a; Grewal T *et al*, 2000], donant un paper clar a l'Anx6 en la via endocítica que ha estat demostrat pel nostre grup i ha servit com a precedent per a tot el meu treball.

En endosomes aïllats d'hepatòcits de rata i mitjançant tècniques immunocitoquímiques en cèl·lules BHK, NRK, i WIF-B, es va trobar l'Anx6 com un dels components majoritaris dels EE (positius per Rab5) [Ortega D *et al*, 1998] i també dels LE/prelisosomes [Pol A *et al*, 1997; Pons M *et al*, 2000] i fagosomes [Desjardins M *et al*, 1994]. En les cèl·lules WIF-B, hi ha una subpoblació de l'Anx6 associada a les membranes de Golgi [Pons M *et al*, 2000]. L'Anx6 també s'ha trobat als *rafts* i en fraccions subcel·lulars enriquides en caveoles [Babiychuk VS *et al*, 2000; Pol A *et al*, 1999].

Alguns tipus cel·lulars no tenen Anx6, com per exemple les cèl·lules epitelials de l'intestí prim, i les A431 (línia derivada de cèl·lules epitelials de carcinoma). Altres teixits, com l'epiteli del colon, i algunes línies de càncer de mama, tenen nivells molt baixos d'Anx6. Una vegada més, aquestes diferències d'expressió suggereixen funcions específiques en cada tipus cel·lular.

▪ ANNEXINA A6 i CITOESQUELET

El requeriment del citoesquelet d'actina per l'endocitosi mediada per receptor ja va ser descrit quan es va demostrar que l'endocitosi s'inhibia si es tractaven les cèl·lules amb Latrunculina A, una droga que segresta els monòmers d'actina. Totes les vies "clàssiques" d'endocitosi (vesícules de clatrina, macropinocitosi, caveoles, fase fluïda i fagocitosi) tenen aquest punt en comú, el citoesquelet d'actina.

L'Anx6 interacciona de forma directa amb l'actina [Hosoya H *et al*, 1992], i té una gran afinitat per l'espectrina. Mitjançant assaigs d'unió amb extractes de cèl·lules neuronals, es va veure que l'Anx6 unia espectrina de forma depenent de calci i fosfatidilserina. El lloc d'unió es localitza al domini N-terminal de la subunitat beta de l'espectrina, que conté un lloc d'unió a actina. La unió d'Anx6 a l'espectrina inhibeix la unió de l'F-actina a l'espectrina, com van demostrar Watanabe i col·laboradors al 1994 [Watanabe T *et al*, 1994]. L'espectrina és el component majoritari del citoesquelet d'actina de la membrana plasmàtica i està formada per dues cadenes alfa i dues cadenes beta. Es troba ancorada a la membrana a través d'anquirina. El citoesquelet adjacents a la membrana plasmàtica té la funció de restringir la difusió lateral de les proteïnes de membrana, formant part de la maquinària de direccionament de proteïnes. L'espectrina és molt abundant en eritròcits, formant una densa xarxa que ocupa tota la superfície interna de la membrana plasmàtica. Uns primers estudis van mostrar que l'endocitosi en eritròcits era precedida per la creació d'àrees lliures d'espectrina [Hayashi M *et al*, 1992]. En cèl·lules MDCK l'espectrina es troba només a la membrana basolateral. També s'ha trobat curiosament en membranes de Golgi [Beck KA *et al*, 1994], i en unes vesícules intracel·lulars no caracteritzades [De Matteis MA, Morrow JS 1998].

El citoesquelet d'actina-espectrina s'associa a les membranes a través d'anquirines, que interaccionen amb la cua citoplasmàtica de diverses proteïnes integrals de membrana. Fins i tot la relació entre citoesquelet i endocitosi pot dependre d'anquirina, doncs està publicat que l'anquirina s'uneix a la clatrina per internalitzar l'LDL, i a més a més, l'anquirina es segueix trobant associada als endosomes un cop internalitzats [Michaely P *et al*, 1999]. Es va demostrar que l'Anx6 forma part d'aquest entramat entre citoesquelet i endocitosi, provocant un canvi en el citoesquelet que permet la internalització [Kamal A *et al*, 1998], facilitant l'entrada de les vesícules de clatrina, ja que la unió de l'Anx6 a l'espectrina fa que la calpaïna I (l'enzim que trenca l'espectrina) pugui actuar, obrint la xarxa citoesquelètica. El mateix grup va demostrar *in vivo* que si s'inhibia la calpaïna amb la droga ALLN, l'eliminació d'espectrina es veia reduïda un cinquanta per cent. El mateix passava si enlloc de tractar amb ALLN introduïen a les cèl.lules una Anx6 mutada no funcional (deleció de les sis últimes repeticions, Anx6-delta). Tant amb ALLN com amb l'Anx6-delta, la internalització d'LDL disminuïa fins a la meitat. Tanmateix, però, després d'una hora, l'LDL vencia la inhibició i era internalitzat per algun mecanisme independent d'espectrina i/o Anx6 [Kamal A *et al*, 1998]. En un treball publicat anteriorment pel nostre grup [Pons M *et al*, 2001a], es demostra que l'Anx6 s'uneix a l'espectrina en cèl.lules NRK, i no només a la membrana plasmàtica com ja estava publicat sinó a l'espectrina dels pre-lisosomes. Es postula que l'Anx6 té un paper en el trencament de l'espectrina en aquest darrer compartiment de la via endocítica. Perquè un endosoma tardà i un lisosoma es puguin fusionar i transferir-se el contingut, cal que primer es trenqui l'espectrina (el citoesquelet) que els envolta, procés que estaria modulats per Anx6. La idea que existeix un citoesquelet d'espectrina als orgànuls cel.lulars no era nova, ja va ser suggerida al 94 per Nelson i el seu equip, que proposaven la interacció d'espectrina amb el Golgi [Beck KA *et al*, 1994]. Com ja hem vist més amunt, Kamal i els seus col·legues van mesurar la internalització d'LDL a la membrana plasmàtica per acabar conclouent que amb una Anx6 truncada o tractant amb ALLN, no es podia trencar la xarxa d'espectrina i l'LDL no es podia internalitzar. L'estratègia en aquest treball posterior va consistir en mesurar l'LDL als endosomes tardans, i la degradació d'LDL, permetent completar el model proposat per Kamal, que passava a ser també vàlid pel pas de *late* a lisosomes. Aquesta idea d'un citoesquelet envoltant els orgànuls que ja es dibuixava als anys 90, actualment està plenament acceptada. Tant és així, que fins i tot s'ha donat un paper actiu a l'actina i altres components com ara la cortactina o el complex Arp2/3 en el manteniment i l'estabilitat dels endosomes [Apodaca G 2001] i el trànsit entre els diferents compartiments [Llado A *et al*, 2008].

▪ ANNEXINA A6 i CALCI

Diferents estudis en cèl.lules musculars postulen que l'Anx6 i l'Anx2 tenen un paper en la contracció muscular modificant la rigidesa de les membranes associant-se de forma específica a determinats microdominis lipídics de la membrana [Babiychuk EB, Draeger A 2000; Gerke V *et al*, 2005]. Intervenen en la formació i l'estabilització d'aquests dominis, en resposta al pic de calci que té lloc durant la contracció muscular. Aquesta resposta és molt fina, depenent dels nanomols de calci alliberats una annexina o una altra és reclutada, i s'uneix a un domini determinat.

En relació també amb el calci, hi ha els resultats obtinguts en els *knockout* d'Anx6, que són contradictoris. Moss i el seu equip diuen que la funció cardíaca, immunitària i reproductora dels ratolins *knockout* és igual que en ratolins control [Hawkins TE *et al*, 1999]. En canvi, a partir de cardiomiòcits aïllats d'aquests ratolins s'ha observat un increment de l'amplitud de les oscil·lacions dels pics de calci, que comporta una disminució del període de recuperació dels cardiomiòcits, sense afectar l'alliberació de calci del reticle sarcoplasmàtic [Song G *et al*, 2002]. Això concorda amb la reducció dels nivells d'mRNA i proteïna Anx6 en pacients afectats d'aturada cardíaca congestiva [Benevolensky D *et al*, 2000].

Fa pocs anys es va descriure la interacció proteïna-proteïna entre l'Anx6 i la CRHSP-28, de forma dependent de calci en cèl.lules acinars [Thomas DD *et al*, 2002]. Aquesta proteïna intervé en la secreció, i està relacionada amb la proteïna de *rafts* lipídics MAL2. En resposta a

un estímul hormonal de secreció, que provoca un increment de calci intracel·lular, l'Anx6 es redistribueix cap als rafts lipídics que hi ha als grànuls de secreció, on s'associa a CRHSP-28. Aquesta unió promou una "reorganització" del citoesquelet d'actina que facilita la secreció.

Al nostre grup es van realitzar una sèrie d'experiments que demostren que tant *in vitro* com *in vivo* l'Anx6 es dirigeix cap a la membrana plasmàtica en resposta a un increment de calci, i que aquesta translocació no és a l'atzar sinó cap a uns dominis concrets de la membrana (rafts lipídics) de forma estrictament dependent de calci.

▪ ANNEXINA A6 I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

En general, la pèrdua d'expressió d'annexines es relaciona amb l'adquisició de capacitat metastàtica [Gerke V, Moss SE 2002; Grewal T *et al*, 2005]. Si es sobreexpressa Anx6 en cèl·lules A431 (que no n'expressen), la majoria es queden bloquejades en la fase G1 del cicle cel·lular, i creixen molt més lentament. Continuen tenint poder tumorigènic i causant tumors si s'inoculen en ratolí, però el desenvolupament dels tumors és molt més lent [Theobald J *et al*, 1995; Theobald J *et al*, 1994]. Aquestes cèl·lules A431 sobreexpressen receptor d'EGF i tenen la via de Ras/MAPK hiperactivada [King IC, Sartorelli AC 1986]. L'Anx6 està inhibida en la transició de fenotip no-metastàtic a metastàtic en melanoma de ratolí B16F10 [Francia G *et al*, 1996], també varia la seva expressió en melanoma uveal [Van Ginkel PR *et al*, 1998], i no s'ha trobat Anx6 en cap línia de limfòcits B humans transformats [Barel M *et al*, 1991]. Tot just fa uns mesos, el nostre grup ha demostrat que l'Anx6 presenta nivells baixos en línies cel·lulars de càncer de mama que sobreexpressen receptor d'EGF i no tenen receptor d'estrògens, com per exemple les MDA-MB-436, on la inhibició de l'Anx6 es relaciona amb una menor unió de p120GAP a Ras, i per tant un creixement cel·lular incrementat (Vilà de Muga *et al*, 2008 *in press*) (veure Annexina A6 i senyalització). En models de càncer de pròstata, els nivells d'Anx6 estan reduïts durant la progressió d'estat benigne a maligne. En general doncs, l'Anx6 sembla actuar com a supressor tumoral, i malgrat que en cèl·lules transformades hi ha nivells molt baixos d'Anx6, els ratolins *knockout* no desenvolupen tumors espontàniament [Hawkins TE *et al*, 1999]. Això és similar per les annexines 2 i 7, relacionades també negativament amb la transformació cel·lular, però sense veure's formació de tumors en els respectius *knockout*. Aquesta aparent contradicció indica que les diferents annexines es podrien suplir funcionalment. Malgrat aquesta clara acció anti-tumoral, l'expressió d'Anx6, al contrari que per exemple l'Anx1 i 2, no varia durant el cicle cel·lular o durant el desenvolupament embrionari [Moss SE *et al*, 1992].

▪ ANNEXINA A6 I SENYALITZACIÓ

A la superfície cel·lular, els nutrients i factors de creixement s'uneixen als receptors per a generar un ventall de missatgers secundaris, que, descodificats o traduïts per les proteïnes intracel·lulars, regulen la proliferació cel·lular. Una senyalització desregulada pot desembocar en carcinogènesi, que es caracteritza per una proliferació cel·lular no controlada. Diferents línies d'investigació relacionen l'Anx6 amb la traducció de senyals: tot i que primerament s'havia descrit com una proteïna localitzada al compartiment endocític [Gerke V, Moss SE 2002], també es localitza a plataformes actives de traducció de senyals, com les caveoles [Pol A *et al*, 1999; Schnitzer JE *et al*, 1995], i va cap a rafts lipídics no caveolars (també considerats punts de senyalització) en resposta al calci en diversos tipus cel·lulars [Babiyshuk EB, Draeger A 2000; Orito A *et al*, 2001]. No només hi va, sinó que també es considera una proteïna que participa en la formació d'aquests microdominis rafts [Di Guglielmo GM *et al*, 1994 ; Draeger A *et al*, 2005; Monastyrskaya K *et al*, 2007], d'una forma dependent de calci. A part d'aquestes evidències, el fet que l'Anx6 intervingui en

endocitosis i transport endosomal [Kamal A *et al*, 1998; Pons M *et al*, 2001a; Grewal T *et al*, 2000] i que treballs anteriors del grup demostrassin que la sobreexpressió d'Anx6 produïa una menor activació de Ras i de Raf-1 [Pons M *et al*, 2001b] com es resumeix a la Fig.19, van donar un nou paper de l'Anx6 en senyalització pròpiament dita.



Fig 19. Figures seleccionades del treball Pons *et al*, 2001b on es demostra la interacció entre Anx6 i Raf-1 (A) i la disminució de Ras actiu (*pull-down* amb GST-RBD) (B).

Aquest treball va poder demostrar que l'Anx6 s'unia a Raf inhibint-lo, probablement impedit que Raf s'uneixi a les proteïnes 14-3-3 i/o a fosfatidilserina, dos factors necessaris per a la translocació de Raf a la membrana on s'uneix a Ras i s'activa. De totes maneres, el fet que Ras també estigués inhibit en condicions basals en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 no s'explica només amb la inhibició de Raf, doncs Ras està inhibit independentment de l'activació de Raf. Per tant, hi ha algun altre punt en l'activació de Ras -previ a l'activació de Raf- que ha de ser modulats per l'Anx6.

p120GAP

Gairebé cronològicament en el temps, buscant proteïnes d'interacció amb GAPs (*GTPase Activating Proteins*), es va aïllar l'Anx6 [Davis AJ *et al*, 1996] unida a la p120GAP. La unió entre les dues proteïnes tenia lloc per un domini d'unió a fosfolípids carregats negativament de forma dependent de calci (és el que s'anomena domini C2 de p120GAP), que és el mateix domini que s'uneix a la membrana en resposta a un increment del calci intracel.lular. El mateix grup va mapar el punt exacte de l'Anx6 que s'unia a aquest domini, situat entre els dos blocs de quatre repeticions, és a dir, a la regió *linker* [Chow A, Gawler D 1999]. Concretament els autors l'anomenen regió interlobul.lar, considerant cada bloc de quatre repeticions com un lòbul. Aquesta regió interlobul.lar pot rotar 90 °, fent que canviï la conformació de la proteïna. Més tard es van descobrir dues proteïnes més que formaven complex amb Anx6-p120GAP, la quinasa Pyk2 i la quinasa Fyn de la família de les Src quinases [Chow A *et al*, 2000]. El model proposat postula que l'Anx6 s'uneix al domini C2 de p120GAP, Fyn s'uneix a l'Anx6 i Pyk2 s'uneix a Fyn. Definitivament, doncs, es va establir un vincle entre la via de senyalització de Ras/MAPK i l'Anx6, responnent a l'interrogant del treball de Pons *et al* : l'Anx6 podria estar inhibint Ras a través del seu desactivador principal p120GAP, un punt per dalt de la subseqüent activació de Raf. Quedava per resoldre, però, on tenia lloc aquesta unió, i com.

El nostre grup va començar a treballar cap a l'any 2003 en aquesta possible desactivació de Ras per Anx6 a través de la GTPasa p120GAP, partint de diferents hipòtesis, i finalment demostrant que l'Anx6 el que fa és promoure o regular la translocació de p120GAP a la membrana en resposta a calci, perquè un cop allà pugui desactivar Ras [Grewal T *et al*, 2005]. Per tant, quant més Anx6 hi ha en una cèl.lula, més p120GAP a la membrana, i més

desactivació de Ras, concordant perfectament amb el paper antitumoral de l'Anx6. Incloc alguns dels primers experiments realitzats, on es veu com l'Anx6, p120GAP i Ras formen un complex en el nostre model cel.lular (cèl.lules CHO que sobreexpressen Anx6 de forma estable), Fig.20 A i B. No és només un complex bioquímic, sinó que també colocalitzen *in vivo*, i van juntes cap a la membrana plasmàtica si tractem les cèl.lules amb calci (Fig 20 C). La translocació és dependent de la concentració de calci (Fig. 20 D).

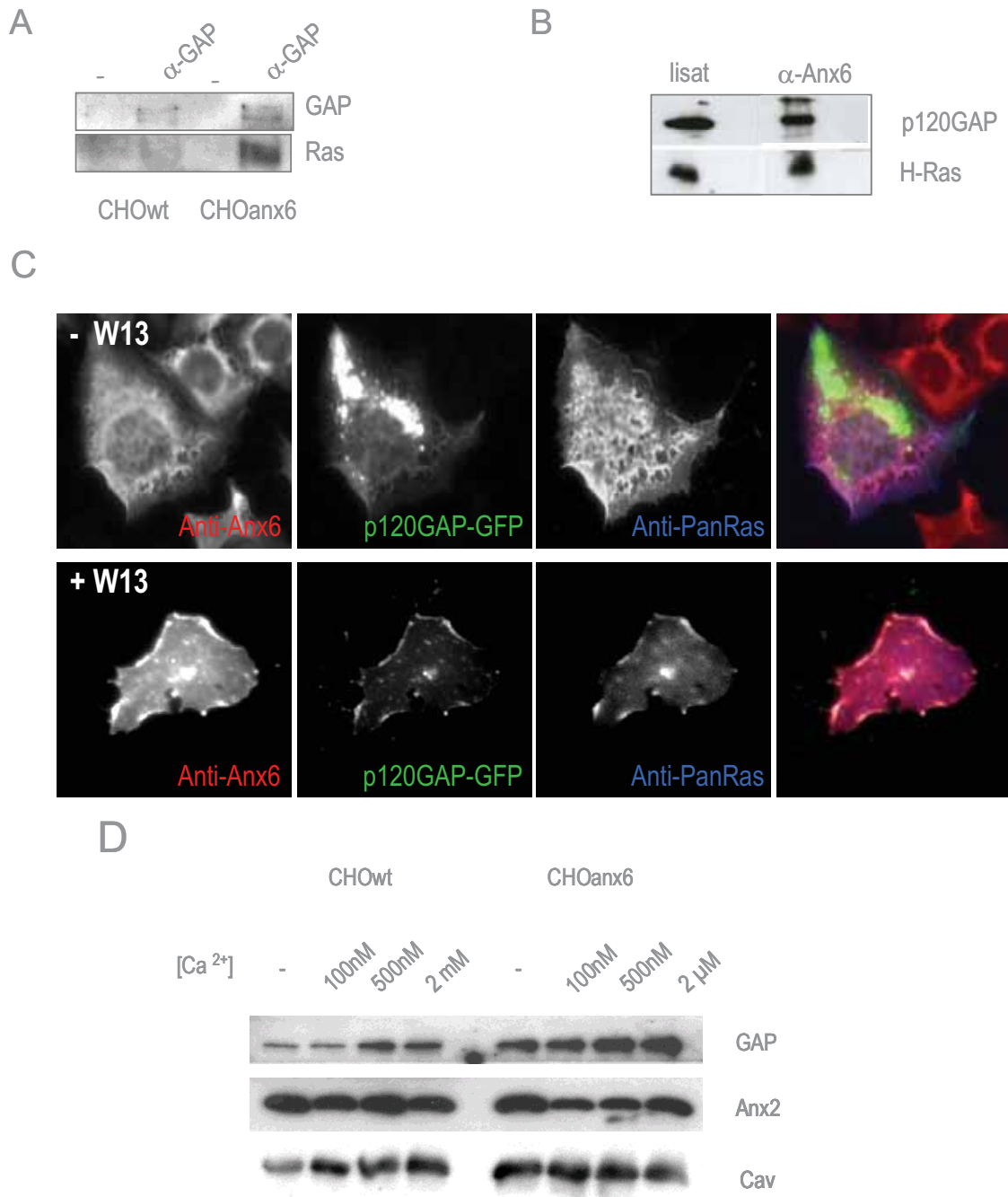


Fig 20. Selecció d'alguns dels primers experiments sobre la desactivació de Ras per Anx6 i p120GAP. Per veure el treball final complet publicat, consultar Grewal T *et al*, 2005. Revisat a Grewal T, Enrich C 2006. A) co-immunoprecipitació de GAP i Ras. B) co-immunoprecipitació de p120GAP, Anx6 i H-Ras. C) colocalització d'Anx6, Ras i GAP a la membrana. D) Translocació de p120GAP a la membrana a concentracions creixents de calci.

Aquesta translocació de p120GAP a la membrana en resposta a calci és independent de l'activació de Ras, i és dependent d'Anx6, fet que torna el model encara més interessant [Grewal T *et al*, 2005].

En cèl.lules transfectades amb les formes constitutivament actives de Ras (H-Ras G12V) que no tenen Anx6 (A431), la GTPasa no es dirigeix cap a la membrana en resposta a calci, tot i haver-hi H-Ras actiu. En canvi, aquesta translocació sí que es dona quan les cèl.lules tenen Anx6, A431Anx6 (Fig. 21).

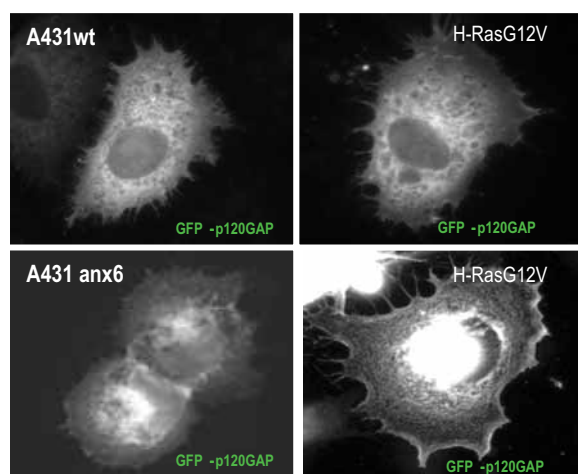


Fig 21. En cèl.lules que no tenen Anx6 (A431wt), p120GAP no transloca a la membrana encara que Ras estigui actiu (H-RasG12V) [Grewal T *et al*, 2005].

Queda pendent la descripció exacta del mecanisme d'unió d'aquest complex de tres proteïnes (H-Ras, Anx6 i p120GAP), que tot i que clarament colocalitzen a la membrana plasmàtica en cèl.lules fixades (Fig.22), no es coneix encara la dinàmica de formació del complex *in vivo*. Actualment s'està treballant en aquest punt al laboratori (S.Vilà de Muga, resultats no publicats), utilitzant la tècnica de FRET que detecta interacció directa entre proteïnes utilitzant les diferents possibles parelles (Anx6 i H-Ras, Anx6 i p120GAP) i analitzant els diferents llocs on pot produir-se la interacció, revisat a Grewal T, Enrich C 2006.

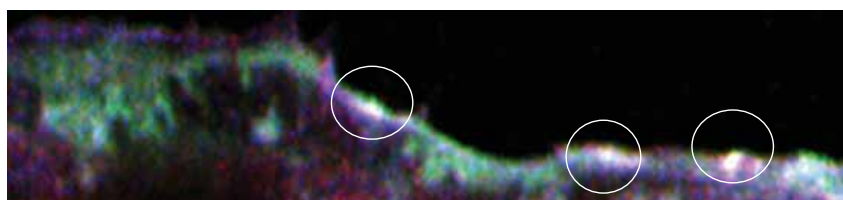


Fig 22. Magnificació de la membrana plasmàtica d'una triple immufluorescència on es veu la colocalització d'H-Ras, Anx6 i p120GAP.

Tornem doncs, a la importància del calci en la senyalització. Es formen dominis de senyalització a la membrana, s'activen per estimulació dels receptors (unió del lligand), i això via missatgers secundaris- relacionats amb increments de calci produïts per l'activació de la via de senyalització- com per exemple l'IP3, recluta grups de molècules cap a aquests dominis que estan començant a senyalitzar. Aquestes molècules reclutades cap al domini de senyalització en resposta a calci són molècules diferents, i hi van amb velocitat diferent en funció de la concentració de calci que s'hagi alliberat a l'interior de la cèl.lula. De manera, podem dir, proporcional a "l'interruptor" de la cascada, doncs cada unió lligand-receptor, cada lligand, cada "interruptor" molecular causarà uns pics de calci intracel.lular diferents. Apareixen infinites possibilitats de senyalització per calci, en termes de velocitat, intensitat, localització, amplitud, patró espai-temporal..i han d'existir, o existeixen, *traductors moleculars* capaços d'interpretar aquests canvis subtils o dràstics en la concentració de calci alliberada segons el receptor activat, i transformar això en la resposta al senyal correcta, tancant així el diàleg entre el què ha estimulat el receptor i l'interior de la cèl.lula. Walker, Cullen i Lockyer [Walker SA *et al*, 2003; Cullen PJ, 2006; Lockyer PJ *et al*, 2001] fan dues contribucions molt importants a aquesta idea : la primera, demostren que p120GAP i algunes altres GAPs-GTPases són sensibles a calci (CAPRI: *Ca²⁺-Promoted-Ras-Inactivator*, per exemple) i responen a aquesta activació per unió lligand-receptor; i la segona, especialment d'interès per nosaltres, és demostrar que p120GAP, o CAPRI, no són sensors de calci *persé* , i que necessiten d'una altra proteïna capaç de detectar aquests canvis de calci i de portar-los cap a la membrana responen-t'hi.

Nosaltres hem demostrat en un treball publicat per Grewal *et al* (2005) que l'Anx6 és la proteïna que sense el calci, "li tradueix" els canvis en els nivells de calci a p120GAP, i se l'emporta cap a la membrana per desactivar Ras. El cercle RasGTP/RasGDP es proposa com "processador ideal per descodificar la complexitat dels senyals del calci" [Walker SA *et al*, 2003]. Tot i que la regulació de la via Ras/MAPK no es deu evidentment només al calci, el fet que les GEFs i GAPs siguin sensibles al calci a un nivell molt fi implica un paper important de l'ió en la regulació de Ras.

Els increments en els nivells de calci intracel.lular regulen processos tan importants com la fertilització, la contracció muscular, la comunicació neuronal, l'aprenentatge i memòria...no sorprèn que hi hagi una gran corrent científica centrada en aquest ió a nivell intracel.lular, intentant desxifrar com i què regula [Michelangeli F *et al*, 2005; Berridge MJ *et al*, 2003]. És molt interessant el fet que l'increment de calci (o el què és el mateix, l'alliberació de calci dels reservoris intracel.lulars, veure esquema Fig.23) es correspongui d'una forma increïblement precisa amb l'amplitud o freqüència d'estimulació del receptor, termes massa físics pels biòlegs cel.lulars però que no es poden oblidar.

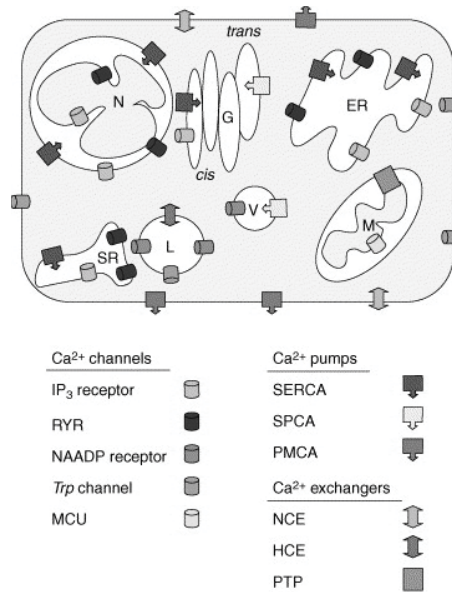


Fig 23. El calci a la cèl.lula [Michelangeli F *et al*, 2005].

PKC

La PKC (*Protein Kinase C*) també es relaciona amb la via d'activació de Ras/MAPK, produïda pel lligand HDL (*High Density Lipoprotein*). Les lipoproteïnes també poden activar cascades de senyalització unint-se als seus receptors de membrana, com ho fan els factors de creixement.

HDL està descrit que activa la via de Ras [Deeg MA *et al*, 1997; Nofer JR *et al*, 2001]. En un treball del nostre grup publicat al 2003, es va demostrar que l'activació de Ras induïda per HDL representava una via alternativa independent de PKC per fosforilar MAPK [Grewal T *et al*, 2003]. La senyalització desencadenada per l'HDL pot seguir un camí que es pot anomenar "dependent de PKC" o un altre "independent de PKC". Les dues vies coexisteixen a la cèl.lula. Si s'inhibeix PKC, es continuarà fosforilant MAPK per la via independent [Grewal T *et al*, 2003; Deeg MA *et al*, 1997]. El senyal d'HDL es transmet a través de la membrana mitjançant la unió d'HDL al seu receptor SRB1, estimulant processos anti-ateroscleròtics com la producció d'òxid nítric o l'efluxió de colesterol [Assmann G, Nofer JR 2003; Assanasen C *et al*, 2005]. Assanasen i els seus col.laboradors suggereixen que la via HDL-SRB1 pot actuar com a sensor de colesterol a la membrana plasmàtica, estimulant quan sigui necessari l'efluxió de colesterol i la producció d'òxid nítric [Gong M *et al*, 2003; Li XA *et al*, 2002]. El receptor SRB1 es troba preferentment a les caveoles, que és on té lloc l'efluxió de colesterol i producció d'òxid nítric. Les caveoles també es consideren clàssicament com plataformes d'estabilització i formació de mòduls específics de senyalització [Simons K, Toomre D 2000], i contenen diverses proteïnes de senyalització com PKC, i també PI3K, Akt, o H-Ras [Assanasen C *et al*, 2005; Gong M *et al*, 2003; Li XA *et al*, 2002; Liu P, Anderson RG 1995; Calvo M, Enrich C 2000].

L'Anx6 intervé en la regulació de Ras a través de p120GAP [Grewal T *et al*, 2005], per altra banda interacciona amb PKC alfa, i les dues proteïnes transloquen cap als rafts lipídics de forma dependent de calci [Orito A *et al*, 2001; Schmitz-Peiffer C *et al*, 1998]. Aquests dos punts estretament relacionats amb la via de Ras, van fer que al nostre laboratori es comparés l'activació PKC-dependenta i PKC-independent de la via Ras/MAPK en cèl.lules que sobreexpressaven Anx6 i en cèl.lules control. Aquesta podia ser una bona estratègia per

entendre perquè en cèl.lules CHOAnx6, on havíem demostrat que l'Anx6 inhibia Raf [Pons M *et al*, 2001b] i Ras [Grewal T *et al*, 2005] , els nivells finals de MAPK activa (fosforilada) no es veien modificats. Els resultats (publicats en [Rentero C *et al*, 2006]), van confirmar que l'activació d'H-Ras i MAPK esdevé dependent de PKC en cèl.lules que sobreexpressen Anx6. Sembla que l'Anx6 promou la via PKC-depenent per activar MAPK, compensant així la inhiació sobre Raf-1 i H-Ras. Podríem esquematitzar el model final de les vies PKC dependent i independent en l'activació de Ras/MAPK per HDL de la següent manera: (Fig24)

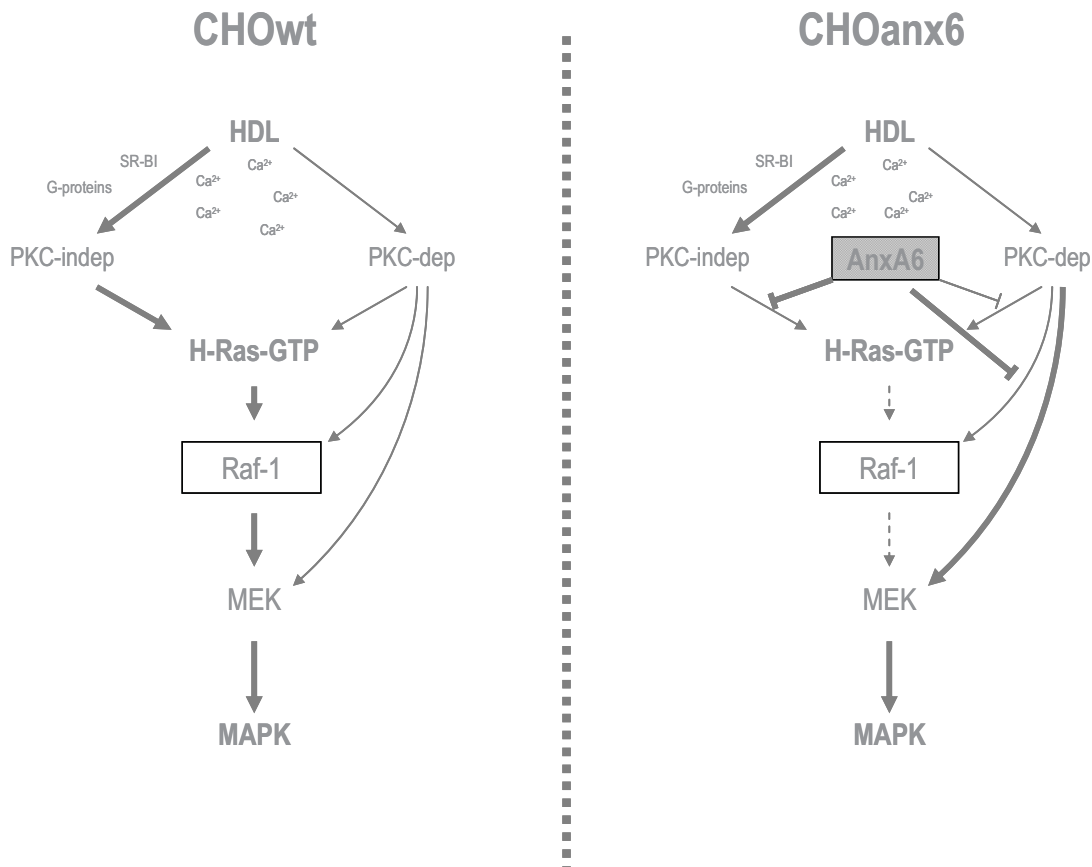


Fig 24. Diagrama il·lustratiu de les vies PKC-dependent i PKC-independent. Modificat de Rentero C *et al*, 2006 .

▪ ANNEXINA A6 i COLESTEROL

S'havia publicat que l'Anx6 intervenia en el transport i degradació de l'LDL en els darrers compartiments de la ruta endocítica. El següent interrogant plantejat era si el colesterol, un dels components majoritaris de les LDL, podia influir en l'afinitat de l'Anx6 per unir-se a les membranes o en podia modular la distribució intracel·lular. Si el colesterol regulava el transport de l'Anx6, es podia afegir un factor més a la llista: pH, calci i colesterol governaven la localització dinàmica de l'Anx6, que ahora determinaria les seves interaccions amb altres proteïnes. Els resultats del treball [de Diego I *et al*, 2002] es recopilen en una publicació amb un títol prou il·lustratiu, "El colesterol modula la unió a membrana i la distribució intracel·lular de l'Anx6". A part d'il·lustratiu, representa la resposta a la pregunta plantejada. Quan es tractaven membranes aïllades amb digitonina- una droga que extreu el colesterol- aquestes presentaven una afinitat molt menor d'unió a Anx6. Reforçant l'acció del colesterol sobre l'Anx6, es va veure que tractant les cèl.lules amb U18666A (droga que

inhibeix el tràfic de colesterol entre LE i lisosomes [Liscum L *et al*, 1989]) els endosomes engrandits plens de colesterol reclutaven Anx6, *in vivo* (Fig. 25 A) i *in vitro* (Fig. 25 B) , afegint una dada més sobre la regulació de la localització de l'Anx6.

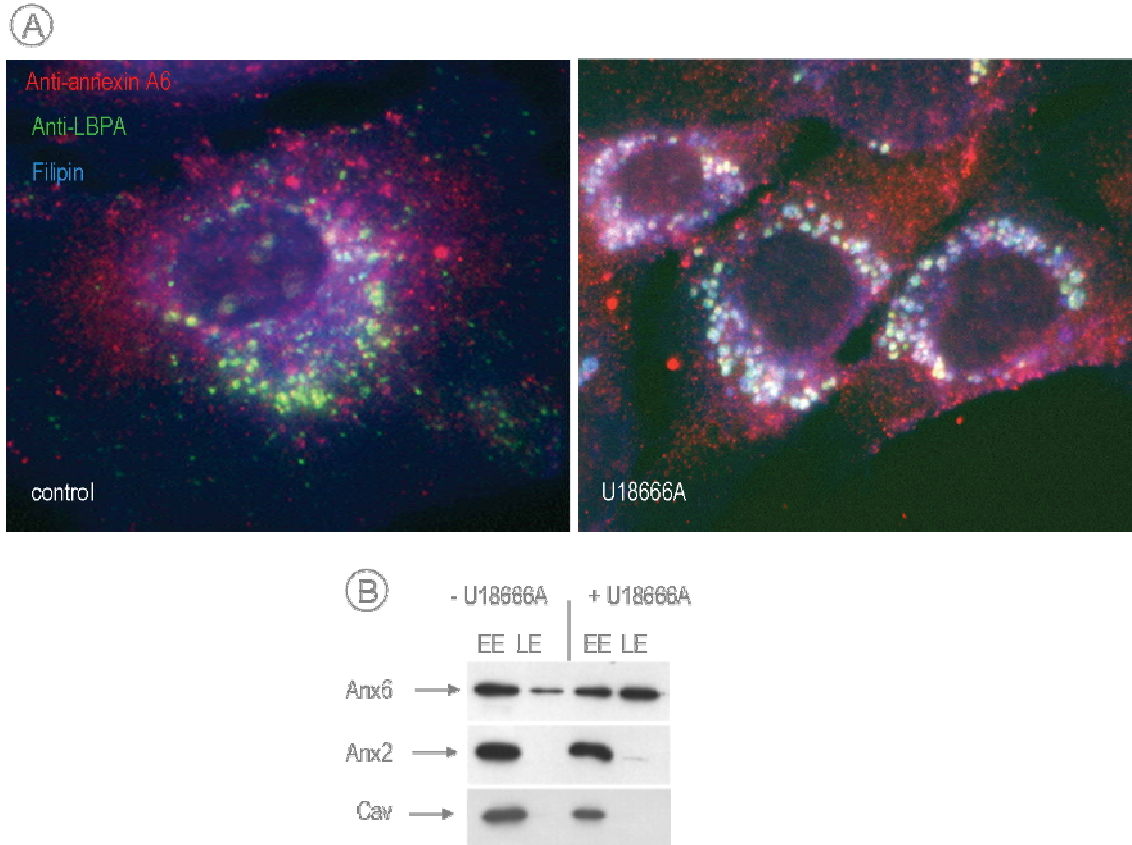


Fig 25. Experiments on es mostra com el colesterol recluta Anx6 als LE, tant *in vivo* (A) com *in vitro* (B). Per consultar figures definitives publicades, veure de Diego *et al.*, 2002.

▪ ANNEXINA A6 i CAVEOLINA

A partir dels experiments anteriors amb U18666A, es va marcar amb filipina el colesterol endògen en cèl.lules CHOwt i CHOAnx6 per analitzar-ne la distribució; en les CHOAnx6, el colesterol semblava acumular-se en vesícules perinuclears, mentre que en les CHOwt el colesterol es localitzava als compartiments esperats (Golgi, i membrana plasmàtica).

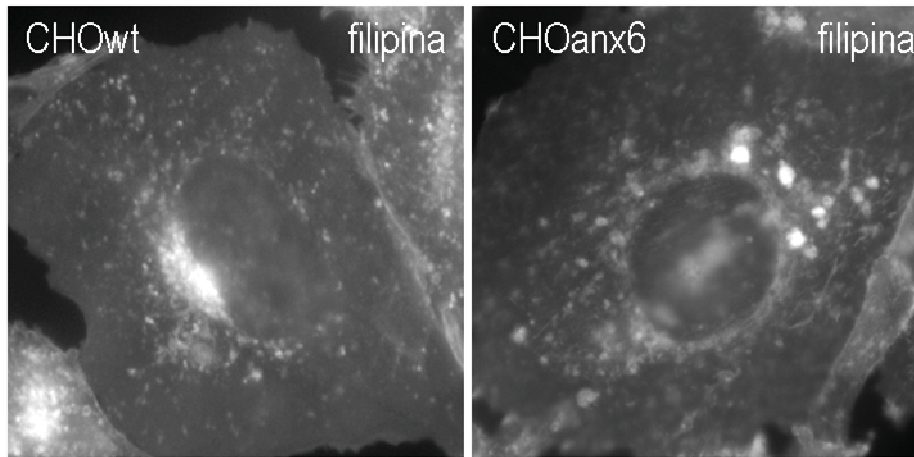


Fig 26. Marcatge amb filipina on es veu el patró diferent entre CHOwt i CHOAnx6.

La filipina s'uneix específicament al colesterol lliure, no esterificat [Schroeder F *et al*, 1971]. El colesterol lliure regula el transport de caveolina des de Golgi fins a la membrana plasmàtica, on formarà caveoles [Parton RG *et al*, 2006]. És imprescindible que la caveolina de Golgi, en forma monomèrica -soluble a baixes concentracions de detergent-, s'uneixi al colesterol [Tagawa A *et al*, 2005; Scheiffele P *et al*, 1998] per poder formar oligòmers -ara insolubles- que viatjaran fins a la membrana. La caveolina transporta el colesterol cap a la membrana cel.lular [Smart EJ *et al*, 1996; Pol A *et al*, 2005]. Se li ha assignat a la caveolina no només el paper de biogènesi de les caveoles, sinó també el manteniment d'aquestes, transportant-hi constantment colesterol [Anderson RG 1998]. Els mutants de caveolina que no arriben a la membrana, a part de provocar una disminució en el nombre de caveoles, fan que els nivells de colesterol de la membrana decreixin [Pol A *et al*, 2001], i això provoca un desequilibri de colesterol intracel.lular -el colesterol s'acumula als endosomes tardans en un fenotip igual al del tractament amb U18666A- que té diverses conseqüències a nivell cel.lular, com la inhibició de la senyalització d'H-Ras o la disminució del nombre de caveoles.

Les caveolines regulen el transport intracel.lular de colesterol, en un cicle complex que involucra les caveoles, el reticle i l'aparell del Golgi [Smart EJ *et al*, 1996; Scheiffele P *et al*, 1998; Pol A *et al*, 2005]. Tot i que les caveoles de la membrana plasmàtica són l'últim o el primer pas d'aquest cicle, les etapes intermèdies de tràfic intracel.lular de caveolina poden ser clau per mantenir l'homeòstasi del colesterol.

En un principi es creia que aquest colesterol transportat per la caveolina cap a les caveoles era colesterol que provenia del reticle [Anderson RG 1998; Smart EJ *et al*, 1996], proposant com a dues vies independents la de transport de colesterol derivat de LDL i la de transport de les noves caveoles. Estudis realitzats sobre aquest transport intracel.lular de colesterol han revelat que la majoria de colesterol que arriba a les caveoles (per tant, el que és transportat per la caveolina) és colesterol que no prové de nova síntesi del reticle com es pensava inicialment, sinó que és la fracció de colesterol lliure provinent de la hidròlisi de les LDL internalitzades (esquema Fig. 27). Fins i tot es parla d'uns endosomes especials rics en caveolina i aquest colesterol lliure que arriben des del compartiment endocític al seu destí final, les caveoles [Fielding PE, Fielding CJ 1996; Simons K, Gruenberg J 2000].

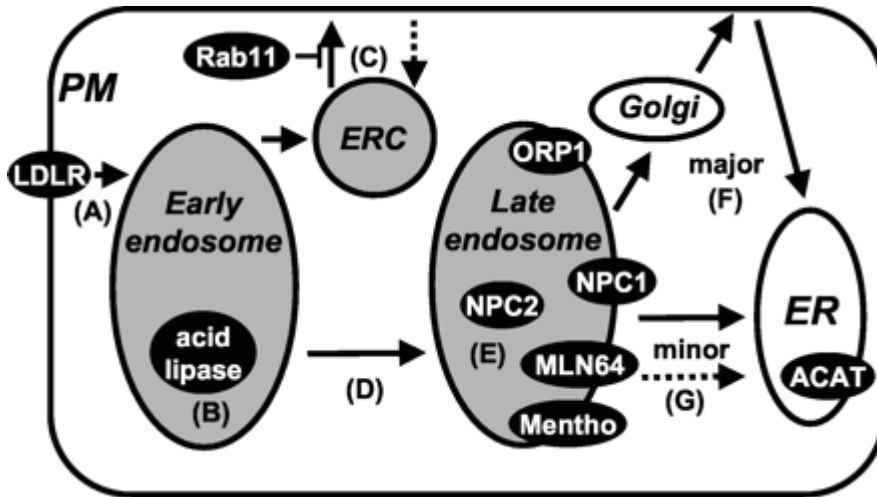


Fig 27. Diagrama del transport de colesterol derivat de LDL : des dels LE al Golgi, per arribar fins a la membrana plasmàtica. Font: [Fielding PE, Fielding CJ 1996]

La caveolina es sintetitza al reticle i d'aquí és transportada fins al Golgi. A partir del Golgi, i de forma dependent de colesterol, va cap a la membrana en forma oligomèrica. En algun punt d'aquesta ruta biosintètica, la caveolina s'ha d'associar a dominis *raft*, esdevenir insoluble, i formar uns oligòmers altament ordenats. Aquest punt es pensa que és el TGN, ja que la sortida de caveolina de Golgi requereix el seu empaquetament (oligomerització i associació a dominis *rafts* rics en colesterol i glucoesfingolípids) per formar una estructura exocítica semblant a la caveola madura, destinada a arribar fins a la membrana plasmàtica (Fig.28).

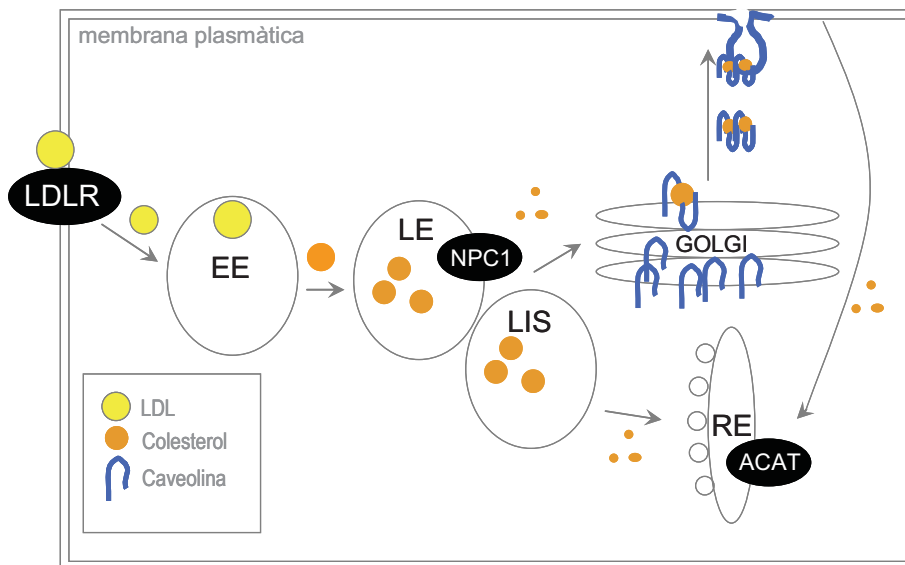


Fig 28. Esquema simplificat del tràfic intracel·lular de colesterol i caveolina des de Golgi.

El colesterol regula com ja s'ha discutit la localització i unió a membranes de l'Anx6, i a més a més regula la distribució intracel·lular de caveolina. Si la localització de colesterol és irregular en cèl·lules que sobreexpressen Anx6 (Fig.26), potser la distribució de caveolina

també està alterada en aquest model cel.lular. Es va marcar la caveolina de Golgi amb un anticòs específic per la caveolina monomèrica [Pol A *et al*, 2005], i es va comparar el patró obtingut en CHOwt i en CHOAnx6. En les cèl.lules que sobreexpressaven Anx6 la caveolina s'acumulava en un compartiment perinuclear (Fig.29). La sobreexpressió d'Anx6 afectava d'alguna manera la caveolina, invertint la seva localització habitual (un 90% a la membrana plasmàtica i un 10% al Golgi).

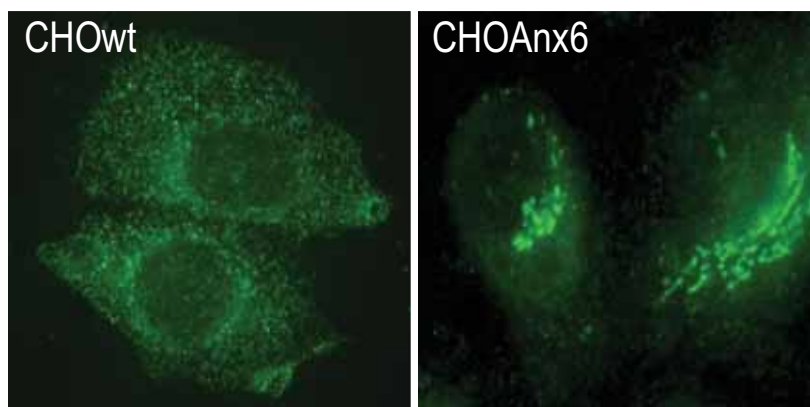


Fig 29. Immunofluorescència on es mostra l'acumulació de caveolina a les CHOAnx6.

D'aquest ampli avenç sobre les diferents funcions de l'Anx6 que he descrit, se n'extreu que la regulació de la localització de l'Anx6 ha de ser el factor clau per entendre les diferents funcions que duu a terme. La descripció dels mecanismes que regulen aquesta compartimentalització subcel.lular de l'Anx6 encara no està completa, malgrat les dues extenses tesis anteriors a aquesta centrades en aquest tema i les diferents publicacions recents tant del nostre com d'altres grups. Però d'acord amb les seves múltiples localitzacions i comportament dinàmic, diferents senyals semblen dirigir-la cap a diferents compartiments diana. Recopilant: l'increment de calci intracel.lular promou la translocació de l'Anx6 citosòlica cap a la membrana plasmàtica i els EE, on es creu que s'hi uneix a través de fosfolípids carregats negativament [Babiyshuk EB, Draeger A 2000; Gerke V *et al*, 2005]. A més, el colesterol recluta l'Anx6 al compartiment LE-prelissosomal. Si es tracten les cèl.lules amb U18666A, un fàrmac que provoca una acumulació de colesterol al compartiment LE, es veu una translocació de l'Anx6 *in vivo* cap a aquest compartiment, altament específica doncs ni altres annexines (com l'Anx2) ni altres proteïnes (com la caveolina) hi transloquen [de Diego I *et al*, 2002].

Si s'acumula colesterol (LDL) als LE també s'hi acumula Anx6 [Grewal T *et al*, 2000]. És a dir, l'Anx6 i l'LDL internalitzat als sots de clatrina són transportats en paral.lel cap als compartiments endocítics tardans. També sabem que l'expressió d'un mutant de l'Anx6 que actua com a dominant negatiu impedeix el transport correcte d'LDL del compartiment LE fins al compartiment lisosomal [Pons M *et al*, 2001a]. La degradació d'LDL en cèl.lules NRK microinjectades amb el mutant era inferior que en les microinjectades amb la proteïna sencera. A més, l'Anx6 s'associa a l'espectrina en els endosomes tardans de les NRK, i si són tractades amb inhibidors de la calpaïna, veiem el mateix efecte negatiu sobre la degradació de LDLs. La formació de vesícules de clatrina (que necessiten l'espectrina per desenganxar-se de la membrana) s'havia descrit que era dependent d'Anx6 [Kamal A *et al*, 1998], i amb aquests experiments de transport d'LDL es va poder demostrar que aquesta dependència en la formació i escissió de vesícules no només tenia lloc a la membrana plasmàtica sinó també als LE, on es forma la vesícula que ha de transportar l'LDL fins al lisosoma per a degradar-se.

El model proposat era el següent: l'Anx6 provoca una reorganització del citoesquelet proper a on es forma la vesícula unint-se a l'espectrina, que esdevé susceptible a l'acció de la calpaïna, una proteasa que dissocia el citoesquelet de la membrana, fent que la vesícula es pugui formar/escindir.

Malgrat totes les evidències anteriors que relacionen l'Anx6 amb l'endocitosi i el tràfic intracel.lular, s'ha de tenir en compte que l'endocitosi té lloc en A431 que no expressen Anx6 [Smythe E *et al*, 1994], i que els *knockout* d'Anx6 tenen un fenotip normal [Hawkins TE *et al*, 1999]. Tot sembla indicar que l'Anx6 ha de tenir una funció en el transport de LE cap a lisosomes, almenys en el transport de colesterol i proteïnes relacionades amb el colesterol entre aquests dos compartiments.

L'increment d'Anx6 modifica significativament l'expressió de proteïnes relacionades amb el transport intracel.lular, el citoesquelet, el metabolisme lipídic i la senyalització, segons indiquen els resultats preliminars obtinguts en *arrays* realitzats al nostre laboratori (*Whole Human Genome Affymetrix microarray database*, Servei de Genòmica, IDIBAPS). Això reforça el concepte de l'Anx6 com un vincle entre el tràfic, la senyalització, i el context lipídic. Per exemple, en cèl.lules que expressen Anx6 disminueix l'expressió ($p < 0.03$) de gens com TMP1 (proteïna d'unió a actina), RHOTEKIN (proteïna de la via de les proteïnes de transport Rho), S100A9 (reorganització del citoesquelet d'actina, resposta inflamatòria, biosíntesi d'integrines), EXOC5 (*docking*, transport vesicular post-Golgi), i c14orf108 (adaptador de clatrina, transport vesicular), tots estretament vinculats amb el transport i el citoesquelet. També disminueixen proteïnes de metabolisme lipídic lisosomal, com GM2AP. Els gens que es veuen incrementats ($p < 0.03$) corresponen a les mateixes categories funcionals; ADDUCIN3 (citoesquelet de membrana plasmàtica), DLC1 (biogènesi del citoesquelet i activador de les RhoGTPases), AP3 (complex adaptador de la coberta de clatrina, intervé en transport vesicular i direcció de proteïnes al lisosoma) o SAR1 (tràfic intracel.lular de proteïnes, transport del reticle al Golgi, regulació de les RabGTPases) correspondrien a proteïnes de transport vesicular i relacionades amb el citoesquelet. MLSTD1 (biosíntesi i metabolisme de lípids al reticle), i FADS1 (biosíntesi de fosfolípids, biosíntesi d'àcids grassos insaturats, metabolisme d'àcids grassos) serien proteïnes clarament relacionades amb el metabolisme lipídic. I també incrementen algunes proteïnes de senyalització, com EPS8 (senyalització via EGFR), FAS (apoptosi, anti-apoptosi) o UTRN (contracció muscular) (Cubells L, Enrich C, resultats no publicats).

L'Anx6 intervé en l'escissió de vesícules de clatrina, en la modulació dels senyals dependents de calci, en la desactivació d'H-Ras i per tant inhibició del creixement tumoral, en l'endocitosi, en l'estabilització dels *rafts*, en el transport i degradació d'LDL, és reclutada cap als LE en resposta a un increment de colesterol...i en aquest estudi s'afegeix encara una altra funció més: l'Anx6 intervé en el transport de colesterol i caveolina. Les conseqüències de l'afectació d'aquest transport es descriuen i discuteixen a continuació.

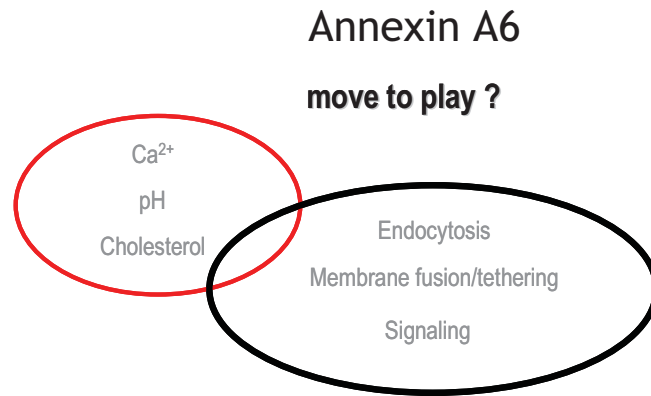


Fig 30. Esquema original utilitzat en alguns seminaris per parlar de la promiscuïtat de l'Anx6.

“Science may set limits to knowledge, but
should not set limits to imagination”.
Bertrand Rusell



OBJECTIUS

- 1- Analitzar els efectes de la sobreexpressió d'Anx6 al compartiment endocític.
- 2- Determinar el mecanisme(s) pel qual el colesterol lliure s'acumula als endosomes tardans en cèl.lules que sobreexpressen Anx6.
- 3- Analitzar com els canvis en la distribució de colesterol poden afectar el transport de caveolina en cèl.lules que sobreexpressen Anx6.

“To make a long story short”
anònim



MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS

1- Cultius cel.lulars

Taula 1: Principals línies cel.lulars utilitzades i condicions de cultiu.

TIPUS CEL·LULAR	ORIGEN	MEDI DE CULTIU
COS-1	Fibroblasts de ronyó de mico transformats amb el virus SV40	DMEM*10% FCS
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>	HAM F12* 10% FCS
CHOAnx6	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> transformades de forma estable amb DNAc d'Anx6 de rata [Pons M <i>et al</i> , 2001a; Grewal T <i>et al</i> , 2000]	HAM F12* 10% FCS
A431	<i>Epitelial carcinoma cell line</i> [King IC, Sartorelli AC 1986]	DMEM* 10% FCS
A431Anx6	<i>Epitelial carcinoma cell line</i> transformades de forma estable amb DNAc d'Anx6 de rata [Grewal T <i>et al</i> , 2005].	DMEM *10% FCS
HeLa	Helen Lambert, carcinoma de cèrvix humà	DMEM *10% FCS

* El medi es suplementa amb *fetal calf serum* amb L-glutamina 2mM, penicil.lina 50 U/mL, i estreptomicina sulfat 50 µg/ml de Biological Industries, Israel ©.

2- Productes

Taula 2: Productes, condicions experimentals i casa comercial.

REACTIU	CONDICIONS EXPERIMENTALS	CASA COMERCIAL	DESCRIPCIÓ
<i>Colesterol</i>	30 µg/ml, 90 min.	SIGMA	Per a tractaments d'adició de colesterol exogen.
<i>metil- β-ciclodextrina</i>	5mM, 45-60 minuts, afegida al medi de cultiu a 37°C.	SIGMA	Per a extreure el colesterol de la membrana.
<i>U18666A</i>	2-10 µg/ml, 10-24h, afegit al medi de cultiu a 37°C.	Biomol	Inhibeix el tràfic de colesterol entre el compartiment endocític tardà i els lisosomes.
<i>filipina</i>	5 µg/ml en solució de bloqueig (0.2% BSA). S'afegeix durant 20 minuts als cubres amb cèl.lules fixades, i es segueix el protocol habitual d'immunofluorescència. Protegir de la llum.	SIGMA	S'uneix al colesterol lliure, i emet per l'UV. S'utilitza com a marcador de colesterol lliure [Schroeder F <i>et al</i> , 1971]
<i>cicloheximida</i>	10 µg/ml, 90 min (pot variar en funció de la vida mitja de la proteïna)	SIGMA	Inhibidor de la síntesi de proteïnes.
<i>MAFP</i>	15 µM, 1h a 37°C, en DMEM 0%-Hepes 0.1 % BSA (Sandvig <i>et al</i> , Traffic 2005)	Biomol	Inhibidor de les fosfolipases dependents de calci.
<i>Helss (BEL)</i>	5µM, 30 min. [de Figueiredo P <i>et al</i> , 2000]	Biomol	Inhibidor de les fosfolipases independents de calci.
<i>BODIPY-LacotsylCeramide</i>	1 µM durant 19h 37°C, afegit al medi de cultiu.	Molecular Probes B-34402	Esfingolípid unit al marcador fluorescent BODIPY. [Kiss RS <i>et al</i> , 2006]
<i>α2M</i>	Afegir al medi de cultiu durant el temps d'incubació desitjat, a 37°C, rentar i fixar.	Dr. Jörg Heeren, Hamburg	α 2M activada conjugada amb cya3.
<i>W13</i>	10 µg/ml en DMEM-Hepes-0.1% BSA, entre 30 segons i 2 minuts.	SIGMA	Inhibidor específic de la calmodulina, que en aquest cas s'utilitza per induir increments transitoris de calci intracel.lular.
<i>Ionomicina</i>	1-2 µM, afegida al medi de cultiu durant 2-5 minuts. Temps llargs o concentracions elevades poden resultar tòxiques per la cèl.lula.	SIGMA	Ionòfor potent que genera un increment de calci sostingut degut a la formació de porus a la membrana plasmàtica.
<i>Phalloidin-TRITC</i>	Afegir a les cèl.lules fixades i permeabilitzades [Lladó A <i>et al</i> , 2008]	SIGMA	S'uneix a les fibres d'F-actina [Lladó A <i>et al</i> , 2008].
<i>dilLDL</i>	Dejunar les cèl.lules prèviament al tractament (12h amb 10%LPDS) i afegir dilLDL 30µg/ml a diferents temps: 10 min, 30 min, rentar i deixar temps de caça d'entre 10min i 6h.	Invitrogen	LDL marcat que permet seguir la ruta endocítica.

3- Anticossos

Taula 3: Característiques dels principals anticossos utilitzats.

DIANA	KDa	HOSTE	DILUCIÓ	FONT
Annexina VI (68KDa)	68 KDa	Rb	WB:1/1000 IMF: 1/100	Dr.Carles Enrich
caveolina-1 (28KDa)	28 KDa	Rb	WB: 1/1000 IMF: 1/300	Transduction Laboratories
caveolina-1 C37120 (anti-Golgi caveolin)	28 KDa	mo	IMF:1/100	Transduction Laboratories
caveolina-1 C43420 (anti-PM caveolin)	28 KDa	mo	IMF: 1/200	Transduction Laboratories
H-Ras	21 KDa	Rb	IMF: 1/50 WB: 1/100	Santa Cruz (sc-520)
K-Ras	21 KDa	mo	IMF: 1/10 WB: 1/100	Santa Cruz (sc-30)
PanRas	21 KDa	mo	WB: 1/1000	Calbiochem
Annexina II	51 KDa	mo	IMF: 1/10 WB: 1/1000	Dr. V.Gerke, University of Munster, Germany.
P120GAP	120 KDa	mo	WB:1/250	Santa Cruz
Actina	25 KDa	Rb	WB:1/500	MP Biomedicals
Anti-myc 9E10		mo	IMF: 1/50	Santa Cruz
GM130	130 KDa	mo	WB:1/250 IMF: 1/200	Transduction Laboratories
LBPA		mo	IMF: 1/15	Dr. J.Gruenberg, University of Generva, Switzerland.
cPLA ₂	110 KDa	mo	IMF:1/100	Santa Cruz
ManII		Rb	WB: 1/2000 IMF: 1/200	Dr.Angel Velasco (Sevilla)
LAMP1	45 KDa	mo	IMF:1/50	Dr. Jöerg Heeren (Hamburg)
NPC1	150 KDa	Rb	WB:1/1000	Novus Biologicals NB 400-148

4- Vectors

Taula 4: Principals vectors utilitzats.

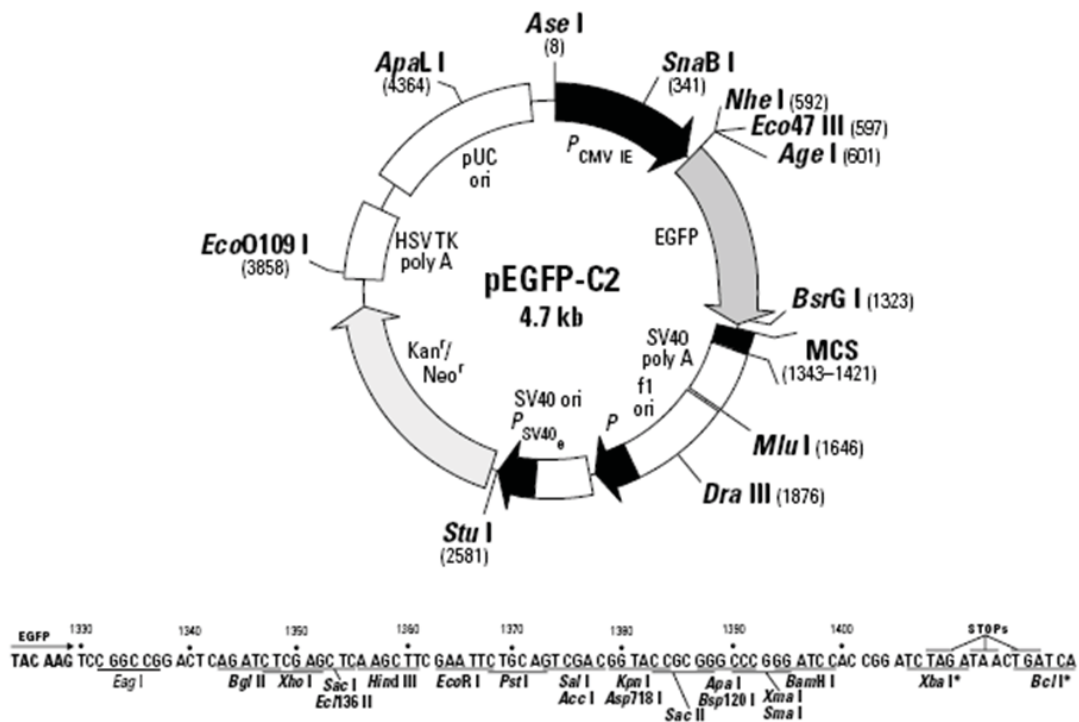
insert	vector	procedència
Anx6-GFP	pcDNA3.1	Dr. Thomas Grewal, University of Sydney, Australia
Anx6-YFP	pcDNA3.1	Dr. Iñaki de Diego, Universitat de Barcelona
Anx6-CFP	pcDNA3.1	Dr. Iñaki de Diego, Universitat de Barcelona
Anx2	pEGFP, Clontech	Dr. V.Gerke, University of Münster, Germany
Anx1	pEGFP, Clontech	Dr. V.Gerke, University of Münster, Germany
cav3	pEGFP, Clontech	Dr. Albert Pol, Universitat de Barcelona
cav1	pEGFP, Clontech	Dr. Albert Pol, Universitat de Barcelona
p120GAP	pEGFP, Clontech	Dr. Thomas Grewal, Universitat de Sydney.
p120GAP	pEYFP, Clontech	Dr. Carles Enrich, Universitat de Barcelona
p120GAP	pECFP, Clontech	Dr. Carles Enrich, Universitat de Barcelona.
cPLA2	pEGFP	Dr. Balsinde, Universitat de Valladolid
NPC1	pEGFP	Dr. Pentchev, Bethesda, USA.
LRP1	pFBGFP	Dr. Jöerg Heeren, Hamburg.

* Per a l'expressió transitòria de tots els plàsmids, s'ha utilitzat *Effectene* (QIAGEN®), seguint les instruccions del fabricant. Les cèl.lules s'utilitzen per als experiments 24h després de la transfecció.

MÈTODES

CLONATGE DE PROTEÏNES EN VECTORS FLUORESCENTS

Per obtenir construccions fluorescents útils per a estudis de colocalització o interacció per FRET el DNac de la proteïna P120GAP del vector pP120GAP-EGFPC2 (Dr. Grewal) es va subclonar als vectors pEYFPC2 i pECFPC2 de Clontech © utilitzant els enzims de restricció XhoI/BamHI.

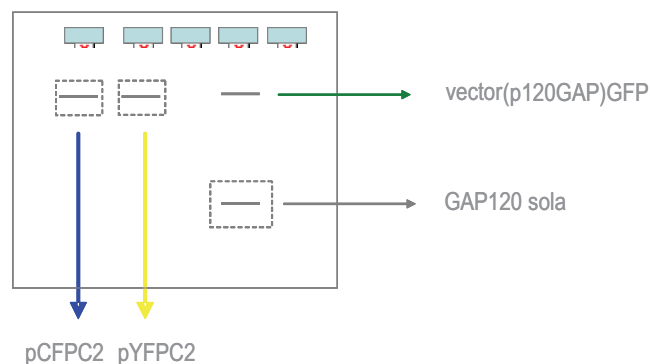


Procediment:

- Purificar el DNA dels vectors pP120GAP-GFPC2, pEYFPC2 i pECFPC2 seguint les instruccions del kit comercial “Nucleospin plasmid quickpure” de Macherey-Nagel © (*miniprep*).
- Digerir el DNA obtingut amb els enzims XhoI/BamHI (d’Invitrogen ©) utilitzant el tampó o buffer universal d’Stratagene ©, entre 12-14h a 37°C. (veure esquema següent)

Digestió vector pYFPC2	Digestió vector pCFPC2	Digestió de p120GAP-GFP
6 µl de vector	6 µl de vector	6 µl de vector
1 µl XhoI	1 µl XhoI	1 µl XhoI
1µl BamHI	1µl BamHI	1µl BamHI
2.5 µl <i>buffer</i> universal	2.5 µl <i>buffer</i> universal	2.5 µl <i>buffer</i> universal
14.5 µl d'aigua estèril.	14.5 µl d'aigua estèril.	14.5 µl d'aigua estèril.

- Còrrer en un gel d'agarosa i retallar les bandes d'interès (veure dibuix).



- Extreure l'ADN de les bandes retallades del gel d'agarosa seguint les instruccions del *kit* de M&N.
- Lligar dels vectors pYFPC2 i pCFPC2 amb GAP120, com a mínim 2h a temperatura ambient, guardant una proporció molar 1:3 (mols vector:mols insert). Realitzar els corresponents controls de lligació (veure taula següent).

pYFPC2 (vector sol)	pCFPC2 (vector sol)	pYFPC2 + P120GAP	pCFPC2 + P120GAP
2 µl de pYFPC2	2 µl de pCFPC2	2 µl de pYFPC2 (V)	2 µl de pCFPC2
4 µl buffer T4	4 µl buffer T4	7 µl GAP120 (I)	7 µl GAP120
1 µl lligasa T4	1 µl lligasa T4	4 µl buffer T4	4 µl buffer T4
13 µl d'aigua estèril.	13 µl d'aigua estèril.	1 µl lligasa T4	1 µl lligasa T4
		6 µl d'aigua estèril.	6 µl d'aigua estèril.

- transformar en bacteris DH5-alfa competents.

▪ TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS DH5 α COMPETENTS

- Barrejar 100 μ l de bacteris DH5 α competents amb els 20 μ l de producte de lligació
- Deixar en gel 30 minuts (el DNA s'enganxa a la paret del bacteri)
- Incubar 45 segons a 42°C en un bany sec, per realitzar un xoc tèrmic (el DNA entra a dins del bacteri).
- Refredar en gel durant 2 minuts.
- Afegir 300 μ l de medi ric LB (sense antibiòtic) i deixar recuperar el cultiu durant 1h a 37°C en agitació.
- Sembrar en plaques d'agar-LB amb l'antibiòtic corresponent.
- Deixar créixer durant 12-14h a l'estufa de 37°C.
- Inocular les colònies en medi líquid LB amb l'antibiòtic corresponent, incubar 12-14h a 37°C en agitació.
- Purificar l'ADN plasmídic (explicat anteriorment, *miniprep*)
- Comprovar la construcció per digestió o seqüenciació i fer un estoc de glicerol 15%.

▪ IMMUNOFLUORESCÈNCIA [Pol A *et al*, 2001]

- Posar els *cubres* amb les cèl.lules cap a la gota damunt d'un parafilm.
- Rentar amb PBS fred.
- Fixar les cèl.lules amb paraformaldehid (PFA) 4% en PBS durant 15-30 minuts a temperatura ambient. En el cas que la fixació sigui amb metanol o acetona (2' a -20°C) no es realitza permeabilització.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS.
- Permeabilitzar amb saponina 0.1% 10 minuts a temperatura ambient.
- Bloquejar amb 0.2% BSA 10 minuts a temperatura ambient.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS.
- Incubar les cèl.lules amb anticòs primari diluït en la solució de bloqueig 1h a temperatura ambient.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS
- Incubar les cèl.lules amb anticòs secundari conjugat (Alexa 488, Alexa 594) diluïts en la solució de bloqueig durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS.
- Muntar els cubreobjectes amb 4 μ l de Mowiol (Calbiochem©)
- Observar les mostres al microscopi òptic.

▪ MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

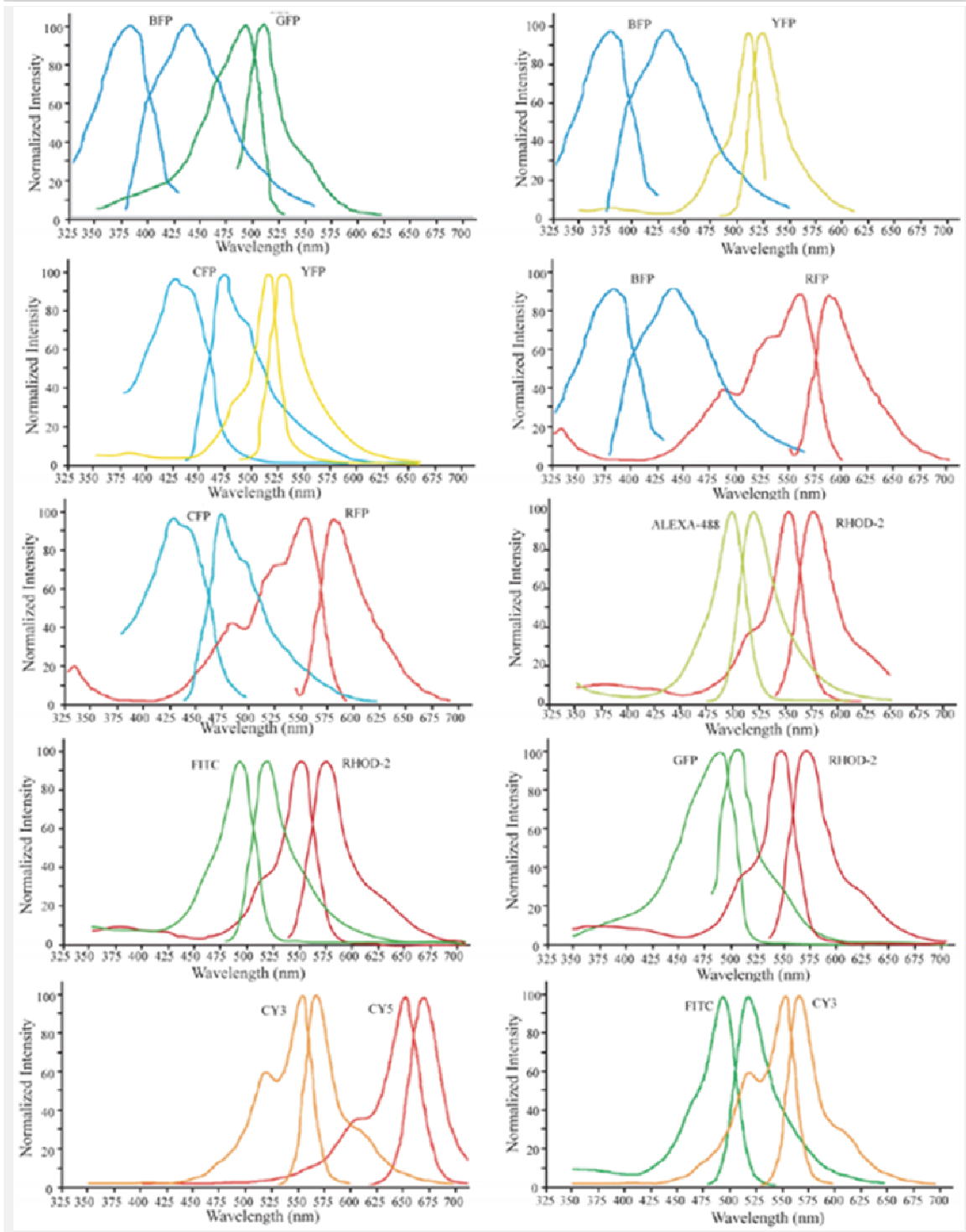
Les preparacions s'han observat en un microscopi de fluorescència Axio-plan, capturant les imatges amb una càmera AxioCam HRc, digitalitzades amb el software AxioVision 3.1. La majoria de les imatges s'han processat amb l'Adobe Photoshop 7.0. Per a les quantificacions d'intensitat de fluorescència dels marcatges de caveolina o colesterol (filipina) s'han utilitzat imatges d'experiments realitzats en paral·lel capturades amb contrast i temps d'exposició idèntics. Utilitzant un software del NIH (ImageJ), es selecciona l'àrea que es vol quantificar (per exemple, el Golgi pels marcatges de caveolina, les vesícules positives per filipina en marcatges de colesterol) i es determina la intensitat de píxels d'aquesta àrea, calculant la intensitat mitjana d'entre 50-150 cèl·lules per paràmetre.

▪ MICROSCÒPIA CONFOCAL

Per a la majoria d'imatges de CFP, GFP i YFP unit a les diferents proteïnes s'ha utilitzat un microscopi de fluorescència confocal-espectral LEICA TCS-SL, ajustant les finestres dels diferents filtres per a evitar creuament (i per tant patrons de marcatge inespecífics) entre fluoròfors d'emissió propera en funció de cada cas. La configuració utilitzada, per exemple, per a resoldre el creuament entre CFP i GFP ha estat la següent: pel CFP, línia làser 458nm; excitació (*beam splitter double dichroic*) 458/514nm; rang de detecció d'emissió: 465-485nm. Pel GFP, línia de làser 488nm, excitació (*beam splitter triple dichroic*): 488/543/633nm; rang de detecció d'emissió: 500-550nm. Les imatges on hi ha doble marcatge de filipina (que emet pel canal UV) i GFP, s'han pres utilitzant un microscopi LEICA DMI6000B de camp ample equipat amb una càmera LEICA DFC 350 FX monocroma. Per a la filipina, s'ha utilitzat el filtre *bandpass* de 360nm/40nm (on l'excitació creuada del GFP és gairebé nul·la o no n'hi ha), després un filtre *longpass* de 400nm al filtre dicromàtic, i un filtre de 425nm per a l'emissió. Pel GFP, s'ha utilitzat un filtre 488nm per a l'excitació (la filipina no pot absorbir llum de longitud d'ona de 460-500nm), un *longpass* de 505nm per al filtre dicromàtic, i 527 nm per a l'emissió. Això juntament amb l'adquisició seqüencial de les imatges ha fet possible descartar que la fluorescència passés d'un canal a l'altre.

ESPECTRES D'ABSORCIÓ/EMISSIÓ I SOLAPAMENT ENTRE PARELLES DE FLUOROCROMS

(font: Ammassy Periasany, Keck Center for Cellular Imaging, University of Virginia, EU)



iFRAP (Inverse Fluorescence Recovery After Photobleaching) [Cubells L et al, 2007]

Els experiments de FRAP invers (iFRAP) s'han realitzat utilitzant el mateix microscopi confocal-espectral LEICA TCS SL, acoblat a una cambra climàtica amb control de temperatura i CO₂. La fluorescència de tota la cèl.lula excepte el Golgi s'ha "apagat" utilitzant entre 50 i 80 passades del làser corresponent (488 nm si la proteïna transfectada era GFP) a màxima potència. Les imatges prèvies i posteriors a "l'apagat" s'han agafat en intervals de 30 segons, durant uns 90 minuts amb el làser a baixa potència (Taula 5). La mesura d'intensitat mitja de fluorescència en les regions d'interès es quantifica utilitzant el software de processament d'imatges de Leica. La fluorescència del fons es resta a cada punt. Les dades de cada experiment es normalitzen respecte la fluorescència inicial, i es corregeixen les possibles fluctuacions del làser i pèrdua de fluorescència per adquisició.

Taula 5: Paràmetres de configuració per a experiments d' iFRAP*.

	Frames	Temps/frame
Prebleach	3	30"
Bleach	25	1.635" (predet.)
Postbleach	180	30"

* Agafar les imatges amb 2 acumulacions, làser entre 3 i 6%, offset xyt, format 512 x 512, 8 bits, pinhole obert 4.94 p.au.

Anàlisi de colocalització [Cubells L et al, 2008]

Per poder quantificar numèricament la colocalització existent entre dues proteïnes (en aquest cas, la ManII i la cPLA₂), s'ha utilitzat el *plugin* de l'ImageJ (NIH, USA) anomenat "Highlighting Colocalization" (Pierre Bourdoncle, Institut Jacques Monod, Service Imagerie, París), que permet calcular la colocalització entre dos punts de dues imatges de colors diferents. Es considera que dos punts colocalitzen si la seva intensitat supera el llindar predefinit per l'usuari i el quocient de les seves intensitats resulta superior a un 50%. Això genera una imatge de colocalització. S'han analitzat un mínim de 50 cèl.lules per a cada condició.

▪ MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Preparació i fixació de les cèl.lules

- Rentar les plaques (normalment s'utilitzen una o dues plaques de 10 cm) amb PBS fred.
- Fixar amb PFA 2% / 2.5 % gluteraldehid en 0.1M tampó fosfat, 1h a temperatura ambient.
- Fer saltar les cèl.lules fixades de la placa utilitzant un *scraper*, recollir i centrifugar 5 minuts a 5000g.
- Fer tres rentats amb el tampó fosfat 0.1M.
- Les cèl.lules del *pellet* es post-fixen amb un OsO₄ 1%- FeCNK durant 90 minuts
- Finalment, les mostres són incloses en resina Spurr (Sigma) i tallades en seccions ultra fines.

Adquisició i anàlisi de les imatges (recompte de caveoles)

Els ultra fins es visualitzen en un microscopi electrònic Jeol1010, on es realitza un rastreig de les diferents seccions sistemàticament prenent imatges de regions de membrana a l'atzar (25000 augments). Per a cada línia cel.lular, s'han agafat imatges d'unes 50 cèl.lules, on s'ha examinat i comptat caveoles en una superfície aproximada de 500 µm.

▪ IMMUNOPRECIPITACIÓ

La immunoprecipitació és la tècnica que permet aïllar complexos de proteïnes dels extractes cel.lulars. Es basa en el concepte clàssic d'unió antigen-anticòs, arrossegant els complexos proteics utilitzant la unió de la proteïna d'interès a una proteïna comercial conjugada amb *sepharose*. Cada proteïna s'immunoprecipita millor utilitzant unes condicions determinades. A continuació es detallen els diferents protocols utilitzats en aquest cas per a cada proteïna.

Immunoprecipitació de la caveolina associada a Golgi [Pol A *et al*, 2005]

- Afegir 1 ml de 10mM TRIS pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM EDTA (amb inhibidors de proteases), on s'ha afegit just abans d'utilitzar-lo 0.1% Tritó (TX 100), a 1×10^7 cèl.lules, a 4°C.
- Es deixa actuar durant uns 3 minuts, a 4°C (el tritó extreu la caveolina de Golgi soluble a baixes concentracions de detergent en fred).
- Es recull el líquid que hi hagi a la placa, que conté la caveolina que s'ha solubilitzat. No cal sonicar.
- Centrifugar 10 minuts a 14.000rpm a 4°C, per baixar les restes de cèl.lules, recollir el sobrenedant.

- Mesurar la concentració de proteïna [Lowry OH *et al*, 1951]
- Incubar per a la IP específica entre 500-700 µg de la mostra amb 5 µl d'anticòs específic per a la caveolina de Golgi (monoclonal), 2h a l'agitador rotatori a 4°C.
- Afegir 40 µl de Proteïna A/G-Sepharose
- Incubar 1h a l'agitador rotatori a 4°C.
- Centrifugar per baixar els complexos proteïna-sepharose.
- Fer tres rentats amb el mateix tampó (sense el tritó) d'uns 750 µl cada rentat. Podem afegir NaCl 150mM al primer rentat per a un rentat més restrictiu.
- Afegir tampó de mostra 1X, bullir, i resoldre en un gel d'acrilamida, on podem carregar també el sobrenedant obtingut al primer rentat que correspondrà a la fracció no unida.

Immunoprecipitació de GFP-PLA₂

- Rentar la placa amb PBS
- Afegir tampó de lisi TGH (TX-100 1%, glicerol 10%, NaCl 50mM, HEPES 50mM pH 7.3, 1mM ortovanadat de sodi, NaF 10mM, PMSF 1mM, inhibidors de proteases), i *scrapejar*.
- Centrifugar els lisats 10 minuts a 4°C a 14.000g.
- Incubar els sobrenedants amb l'anticòs policlonal anti-GFP, o l'anticòs policlonal anti-Anx6 durant 2h a l'agitador rotatori a 4°C.
- Afegir Proteïna A-Sepharosa.
- Incubar 1h més a l'agitador rotatori a 4°C.
- Rentar els immunoprecipitats amb TGH
- Resoldre en un gel d'acrilamida.

Immunoprecipitació de GFP-NPC1 i Anx6 [Grewal T *et al*, 2005]

- Es renten les cèl.lules amb 5ml de tampó HB (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8.0).
- S'afegeix 1ml de tampó de lisi (HB més 5mM NaF, 0.2 mM Na₂VO₃, TX-100 1%, i inhibidors de proteases) i s'*scrapeja*.
- Incubar 500 µg de mostra amb 2 µg d'anticòs (policlonal anti-GFP o policlonal anti-AnxA6) durant 2h a l'agitador rotatori a 4°C.
- Afegir 6 µl de Proteïna G-Sepharose (Pharmacia).
- Incubar 45 minuts a l'agitador rotatori durant 4°C.

- Centrifugar, rentar tres vegades amb l'HB.
- Separar els immunoprecipitats en un gel d'acrilamida del 12%.

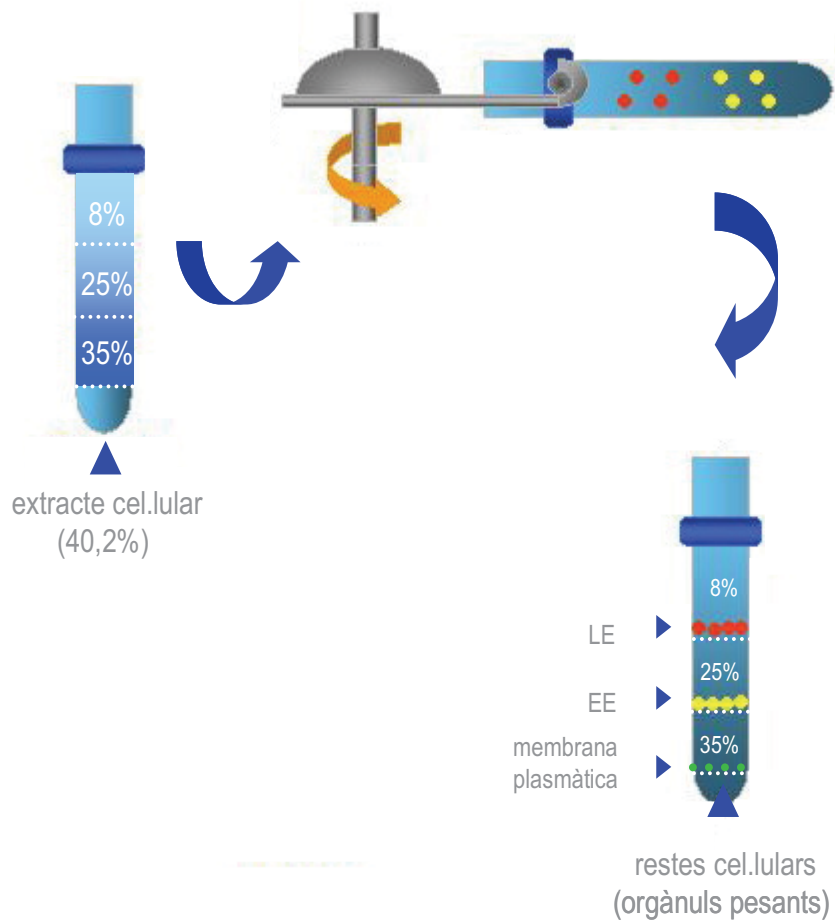
▪ FRACCIONAMENT CEL.LULAR

Aïllament d'endosomes (gradient discontinu de sucrosa)

El mètode utilitzat permet separar els components dels compartiments endocítics primerenc i tardà. Es basa en el mètode descrit per [Gorvel JP *et al*, 1991], veure també [Grewal T *et al*, 2000; de Diego I *et al*, 2002].

- 4-6 x10⁷ cèl.lules (aproximadament dos flascons de 300 cm²), es renten amb PBS fred, es tripsinitzen, i es centrifuguen. Es resuspen amb PBS per a fer un segon rentat. (500g 5 minuts).
- Resuspenem en tampó d'homogeneïtzació (250mM sucrosa, 3mM imidazol pH 7.4, inhibidors de proteases).
- Centrifugar 1500g 10 min.
- Homogeneïtzar molt bé el *pellet* passant-lo 20 vegades per una xeringa amb una agulla de 22g. Es pot comprovar al microscopi de contrast de fase si les cèl.lules s'han trencat correctament.
- Centrifugar l'homogenat 15 minuts a 1000 g, i recuperar el sobrenedant (o PNS).
- El PNS es porta a una concentració final de sucrosa de 40.2% (pes/volum), i això es col.loca a sota de tot del tub.
- S'afegeix amb molt de compte i lentament la sucrosa al 35%, després la de 25% , i finalment 8% a dalt de tot. És molt important verificar que les densitats siguin exactes, la densitat de flotació és orgànul-específica, i per tant els orgànuls poden no flotar a on esperem si el % de sucrosa no és correcte.
- Es centrifuga 90 minuts a 35.000 rpm a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman, amb el rotor SW40.
- Després de la centrifugació es recullen fraccions de 1ml, de dalt cap a baix del tub.
- En la interfase entre 8-25% trobarem la fracció enriquida en endosomes tardans (LE), en la interfase 25-35% la fracció enriquida en endosomes primerencs (EE), i la fracció enriquida en membrana plasmàtica en la interfase del 35 al 40%.

- Es confirma la puresa de les fraccions per WB utilitzant marcadors específics per a cada compartiment, i marcadors dels possibles compartiments contaminants. (descrit a [Grewal T *et al*, 2000], veure també [Cubells L *et al*, 2007] figura suplementària 1A.)



Aïllament de membranes de Golgi

Per aïllar membranes de Golgi s'ha utilitzat un mètode modificat del publicat per Balch [Balch WE *et al*, 1984], descrit amb detall a [Brugger B *et al*, 2000].

- Partir de 4-5 x 10⁹ cèl.lules.
- Fer dos rentats amb PBS fred.
- Fer dos rentats amb tampó BB (*Breaking Buffer*, 0.25M sucrosa en 10mM Tris-HCl pH 7.4), i resuspendre en 4 volums de BB.
- Homogeneïtzar molt bé passant 25 vegades per un homogeneïtzador-de-bola ("*Balch ball-bearing homogenizer*").
- Portar a una concentració de sucrosa de 37% (pes/pes), utilitzant la sucrosa pesada mare 62% (s'obté un coixí d'uns 15ml).
- Afegir 15 ml de sucrosa 35% i 9 ml de sucrosa 29% (preparades en Tris-HCl pH7.4 10mM).
- Centrifugar 2.5h a 25.000rpm.
- La fracció enriquida en Golgi està a la interfase 29-35%, recollir tot el gradient amb cura. Normalment, la fracció enriquida té un volum d'uns 2ml.
- Es confirma la puresa de les membranes de Golgi fent WB i comparant marcadors de Golgi amb els dels altres compartiments que poden contaminar la fracció. (veure [Cubells L *et al*, 2007], figura suplementaria 1 C).

▪ **MESURA DEL COLESTEROL EN FRACCIONS DE GOLGI** [Rudel LL, Morris MD 1973]

El mètode es basa en l'extracció del colesterol de la mostra d'interès utilitzant diferents solvents orgànics.

- Es barregen 500 µg de Golgi purificat amb 0.3 ml de KOH 33% i 0.3ml d'etanol 95%, en tubs de vidre.
- Incubar 15 minuts a 60°C en un bany líquid. Refredar sota l'aixeta.
- A la campana de gasos, afegir 10 ml d'hexà i 3 ml d'aigua destil.lada, agitar amb el vòrtex.
- Agafar 4ml de la fase superior (hexà amb lípids) i fer duplicats.
- Afegir 2ml de O-Phtaldehyde, i protegir de la llum amb paper de plata. Agitar, deixar reposar 1 minut. Pot virar a una gama de colors grocs en funció del contingut de colesterol.
- Afegir 1 ml d'àcid sulfúric. Agitar. Vira a color rosa.
- Llegir a 550nm.

▪ PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

Quan en les fraccions obtingudes d'un gradient no hi ha prou concentració de proteïna, podem precipitar-la per a concentrar-la. El mètode de precipitació de proteïnes utilitzat és el següent:

- Per a 150 µl de mostra (150-300 µg de proteïna), afegir 600 µl de metanol i barrejar bé amb el vòrtex.
- Afegir 150 µl de cloroform, agitar.
- Afegir 450 µl d'aigua destil.lada, agitar.
- Centrifugar a 12000 rpm, 5 minuts.
- Descartar la fase superior, mantenint el disc blanc que s'ha format entre les fases superior i inferior.
- Afegir 450 µl d'etanol, agitar.
- Centrifugar a 12000 rpm, 5 minuts.
- Descartar el sobrenedant i assecar el precipitat (a la campana de gasos, o en una centrífuga de buit) fins que estigui totalment sec.
- Resuspendre en tampó de mostra 1X.

▪ INHIBICIÓ DE L'AnxA6 UTILITZANT RNAi [Grewal T *et al*, 2005]

Per impedir l'expressió de l'AnxA6 de forma específica, s'ha transfectat l'RNAi a una concentració 10nm (AnxA6 siRNA Santa Cruz sc-29688) contra la proteïna humana d'AnxA6 en cèl.lules HeLa, utilitzant Lipofectamina 2000 (Invitrogen ©) i seguint les instruccions del fabricant. Els experiments s'han realitzat a les 72h de transfecció, quan hi ha el pic d'inhibició màxim.

▪ ASSAIG D'ALLIBERACIÓ D'ÀCID ARAQUIDÒNIC-³H [Grimmer S *et al*, 2005]

Com a mesura de l'activitat enzimàtica de la cPLA₂, s'utilitza la mesura del seu producte catalític l'àcid araquidònic, marcat amb l'isòtop radioactiu triti (³H). L'Àcid araquidònic marcat es deixa incorporar durant 16h a les cèl.lules, i es realitza la mesura d'àcid araquidònic, retirant el medi amb l'àcid araquidònic marcat no incorporat i incubant amb medi sol (amb BSA per a tamponar) els diferents temps en que es vulgui mesurar l'alliberació d'AA. Nosaltres vam utilitzar 10 i 30 minuts doncs es consideren els pics d'activitat de l'enzim [Grimmer S *et al*, 2005].

- Incubar les cèl.lules - en plaques de dotze pous- durant la nit (16h) amb 0.25 µCi/ml d'AA-³H en DMEM 0.5%FCS (el producte marcat entra a dins de les cèl.lules).
- Rentar, i incubar 10 i 30 minuts amb DMEM 0.2%BSA.

- Recollir el medi per una banda i les cèl.lules (*scrapejades*) per una altra, i mesurar amb el comptador de centelleig.
- La relació entre la radioactivitat (cpm) intracel.lular i la radioactivitat (cpm) del medi representarà l'activitat de l'enzim.

▪ EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE GST-Anx6 [Pons M *et al*, 2001a]

La proteïna de fusió GST-Anx6 va ser clonada en el vector d'expressió procariota pGEXKG (Pharmacia), procés descrit detalladament a la tesi de la Dra. Mònica Pons. El gen de l'Anx6 va ser tallat de la construcció pcDNA3.1 Anx6 utilitzant les dianes de restricció *Nco-Xba* i clonat dins el vector pGEX KG. Aquest vector ja conté el GST, que queda al costat 5' de l'Anx6, i que té la propietat d'unir-se a la glutatona reduïda, permetent purificar per cromatografia d'afinitat aquelles proteïnes recombinants unides a GST.

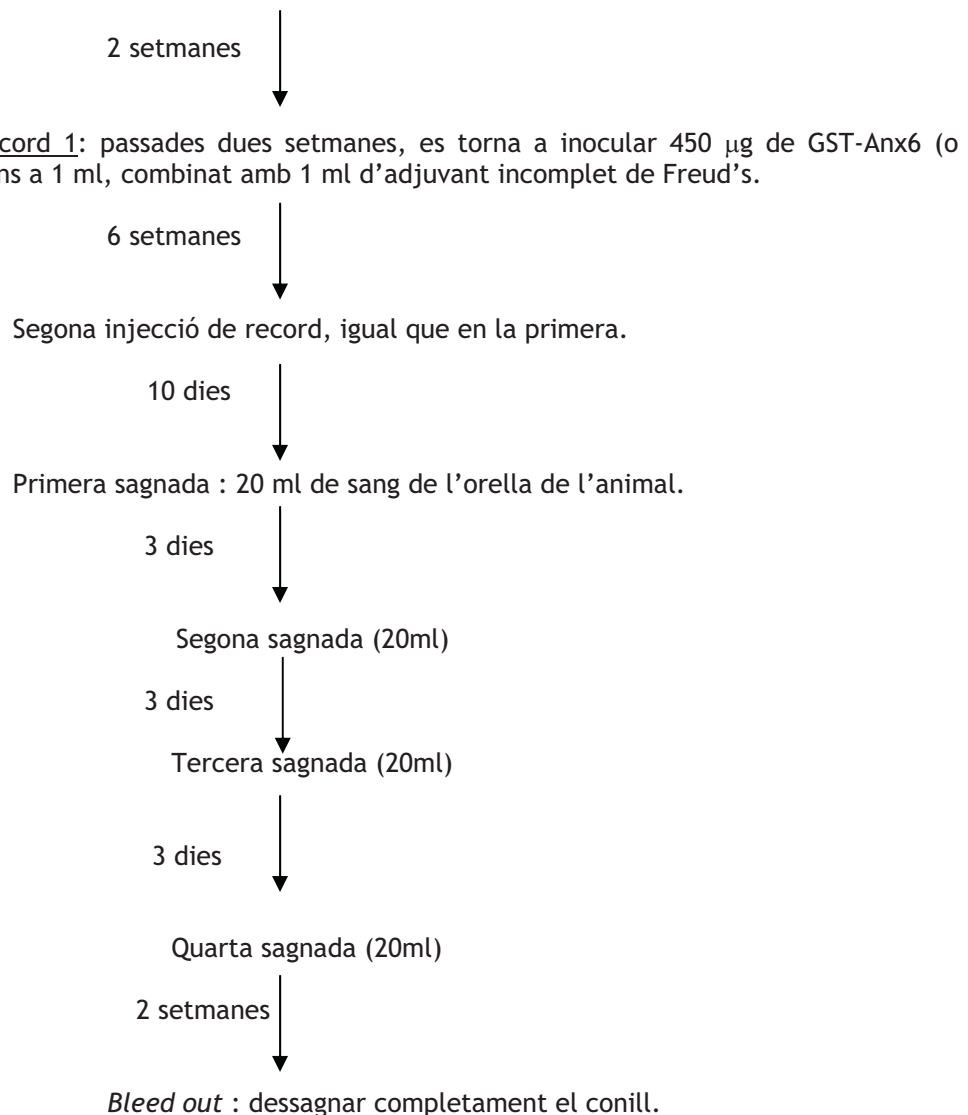
- Transformar bacteris BL21 lys E amb el plàsmid d'expressió pGEXKG-Anx6GST (o extreure el plàsmid d'un estoc ja existent).
- Amplificació del cultiu: diluir el cultiu líquid (2ml del cultiu en 200 ml de LB Amp/Cm, o 5ml en 500 de LB Amp/Cm) i es deixar créixer a 37°C en agitació fins a la fase exponencial (OD a 595 nm de 0.7). Quan més gran el recipient (*erlenmeyer*) utilitzat millor, per a una bona oxigenació del cultiu. S'ha de calcular que la OD es duplica cada trenta minuts.
- S'afegeix 0.5 mM d'IPTG (inductor del promotor de l'operó β -Gal que és el que controla l'expressió de GST-Anx6 en bacteris BL21), durant 16h a 37°C agitant-se (abans d'afegir l'IPTG cal agafar una mostra del cultiu per córrer al gel final i comparar l'expressió de proteïna abans/després de l'IPTG; n'hi ha prou amb uns 100 μ l).
- Fer una rèplica del procés a 25°C, de vegades l'expressió de proteïna s'indueix més a 25° que a 37°. Compararem les dues i triarem la millor.
- Es recullen els bacteris i es centrifuguen 10 minuts a 10000g.
- Es corren les mostres preIPTG/postIPTG (de 25 i de 37°C) en un gel del 8%.
- Es tenyeix amb Coomassie Blue per comprovar que s'ha induït l'expressió de la proteïna.
- Es congela el *pellet* a -80°C perquè després sigui més fàcil trencar les membranes.
- Mantenint els bacteris sempre en gel, resuspendre amb 4ml de tampó de solubilització (10mM Tris pH 8.0, 2mM EDTA, 25% sucrosa afegir en fresc 2mM EGTA, 1mM DTT, 150mM NaCl, inhibidors de proteases i tritó X100 1%, Tween-20 1%) els *pellets* sense esperar que es descongelin.
- Deixar 15 minuts en gel.
- Afegir més DTT fins a una concentració final de 4mM.

- Sonicar a 4°C molt bé per trencar tots els bacteris i alliberar el plàsmid. Aquest pas és molt important, i tot i que aquesta soca té el plàsmid Lys que li impedeix formar una paret bacteriana normal, cal la descongelació i una bona sonicació per lisar bé els bacteris.
- Centrifugar 30 minuts a 12000 rpm, 4°C, i recuperar el sobrenedant.
- Resoldre 10 µl dels sobrenedants en un gel d'acrilamida del 10 % .
- Tenyir-lo amb Coomassie, per comprovar en quin hi ha més proteïna.
- Afegir 2ml de boles de sepharosa 4B-glutaciona (Amersham) a l'extracte obtingut de bacteris, 1h a la nòria a 4°C.
- Centrifugar 5 minuts a 1500 rpm, 4°C. Descartar sobrenedant.
- Tres rentats amb tampó de rentat (50mM Tris, 2mM EDTA, 1/100 PMSF, 100mM NaCl, 2mM EGTA, 0.1% tritó, 0.1% Tween) de 4 ml cada un, centrifugant entre rentat i rentat 5 minuts a 1500 rpm 4°C.
- Eluir amb 1 ml de tampó d'elució (50mM TRIS pH 8.0, 20mM glutatió reduït - Glutatió-DTT).
- Es fan tantes elucions com es vulgui, en cada elució obtenim proteïna més neta. El tampó d'elució separa la proteïna de les boles. Normalment es fan 4 elucions (E1, E2, E3, E4).
- Centrifugar 5 minuts per baixar les boles i recuperar el sobrenedant (que conté la proteïna purificada).
- Congelar a -80°C.

▪ PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS CONTRA GST-Anx6/ regió *linker*

S'han immunitzat conills utilitzant dos antigens diferents: la proteïna de fusió purificada segons el punt anterior (GST-Anx6) i un pèptid sintètic corresponent a la *regió linker* de l'Anx6, obtingut al servei de Síntesi de Pèptids de la Universitat de Barcelona. Abans de la primera immunització es van extreure 20 ml de sang de cada conill (el que havia de ser immunitzat per Anx6 i el que havia d'ésser-ho per a la regió linker) per tenir el que s'anomena un control pre-immune.

1^a inoculació: injecció primària subcutània: 900 µg de GST-Anx6 en PBS (o de *linker*) fins a un volum d'1 ml, combinat amb 1 ml d' adjuvant complet de Freud's. Es va punxar a cinc llocs diferents a sobre el llom de l'animal, a la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.



Totes les sagnades es van recollir en tubs de 50 ml, es van deixar durant 1h a temperatura ambient i 16h a 4°C.

- Després es recupera el sèrum (part no coagulada de la sang) i es centrifuga durant 10 minuts a 3000 rpm.
- Les alíquotes es guarden a -80°C.

▪ **PULL-DOWN AMB GST-Anx6**

La tècnica de pull-down s'utilitza per a detectar unions entre proteïnes. El procediment utilitzat en els *pull-downs* inclosos en aquest treball és el següent:

- Incubar 75 µg de GST-Anx6 (tub control amb 21 µg de GST) amb 40 µl de *Glutathione Sepharose* a 4°C, ajustant si cal el volum amb PBS, durant 90 minuts.
- Rentar les cèl.lules amb PBS fred.
- Afegir tampó de lisi (també fred) 50mM TRIS, 100mM NaCl, 1% tritó, 0.1 mM CaCl₂, amb inhibidors de proteases.
- *Scrapejar* i centrifugar
- Centrifugar també la GST-Anx6 que ja s'ha unit a *Glutathione Sepharose*.
- Incubar 600 µg d'extracte cel.lular amb la GST-Anx6 (o amb el GST sol per al control negatiu) durant 2 hores a 4°C.
- Recuperar el material unit amb un pols de centrifuga.
- Tres rentats amb el tampó de lisi.
- Eluir la fracció unida (proteïna GST-Anx6 unida a les boles que s'haurà unit a les pròpies proteïnes d'unió del lisat cel.lular) amb 30 µl de tampó de mostra 2X.
- Córrer en un gel d'electroforesi.
- Fer els WB corresponents (per detectar possibles proteïnes unides a Anx6). Podem utilitzar com a control positiu proteïnes que ja s'hagin descrit com a proteïnes d'unió a l'Anx6 (veure un exemple a la Fig.5. de [Cubells L *et al*, 2008]).
- Només es podran considerar proteïnes d'unió específica a l'Anx6 les proteïnes de l'extracte cel.lular que s'hagin unit al GST-Anx6 però també al GST sol.

▪ **WESTERN BLOT**

Els extractes de CHOwt, CHOAnx6, HeLa, les mostres de fraccionament cel.lular, la fracció unida de les immunoprecipitacions i dels *pull-downs* s'han separat electroforèticament en un gel del 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE), a 80 Volts, i a continuació s'han transferit a una membrana d'Inmobilon-P (Millipore ©) durant 2h a 4°C, a 65 V. Un cop transferides, es poden assecar amb paper de filtre amb molta cura, o es poden incubar amb els anticossos directament. El protocol utilitzat majoritàriament per al *Western Blot* és el següent:

- Bloqueig: incubar la membrana amb un 5% de llet desnatada en pols en TBST (0.05 % Tween 20 en TBS; TBS, 50mM TrisHCl pH 7.4, 200mM NaCl), en agitació i a temperatura ambient, durant 1h.
- Rentar bé la llet, 3 x 10 minuts amb TBST.
- Incubar amb l'anticòs primari, cada anticòs té una dilució específica que es pot consultar a la taula d'anticossos de MATERIALS, durant 1h en agitació i a temperatura ambient en TBST.
- Rentar 3 x 10 minuts amb TBST.

- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari específic per l'hoste de l'anticòs primari utilitzat (ratolí, conill, ovella, etc.) conjugat amb peroxidasa, durant 45 minuts a temperatura ambient diluït aproximadament 1:4000 en TBST.
- 3 x 10 minuts amb TBST.
- 1 x 10 minuts amb TBS.
- Revelar amb ECL.

“Un científico es como un niño que sigue jugando durante el resto de su vida”
S. Ramón y Cajal



RESULTATS

LLISTA D'ARTICLES

Articles inclosos com a resultats d'aquesta tesi:

- **Cubells L, Vilà de Muga S, Francesc Tebar, Peta Wood, Rachael Evans, Mercedes Ingelmo-Torres, Maria Calvo, Katharina Gaus, Albert Pol, Thomas Grewal and Carlos Enrich. *Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex.***

Traffic. 2007 Oct 15;8(11):1568-1589

- **Cubells L, Vilà de Muga S, Tebar F, Bonventre JV, Balsinde J, Pol A, Grewal T, Enrich C. *Annexin-A6 induced inhibition of cPLA₂ is linked to cav-1 export from the Golgi.***

J Biol Chem 2008 Apr 11 ;283 (15) :10174-83

Articles no inclosos com a resultats en aquesta tesi:

- Thomas Grewal, Rachael Evans, Carles Rentero, Francesc Tebar, **Laia Cubells**, Iñaki de Diego, Matthias F Kirchoff, William E Hughes, Joerg Heeren, Kerry-Ane Rye, Franz Rinninger, Roger J Daly, Albert Pol and Carlos Enrich. ***Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity*** .
Oncogene. 2005 Sep 1;24(38):5809
- Carles Rentero, Rachael Evans, Peta Wood, Francesc Tebar, Sandra Vilà de Muga, **Laia Cubells**, Iñaki de Diego, Toni E.Hayes, William E. Hughes, Albert Pol, Kerry-Ane Rye, Carlos Enrich, Thomas Grewal. ***Inhibition of HRas and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells.***
Cell Signal. 2006 Jul;18(7):1006-16
- Sandra Vilà de Muga, Paul Timpson, **Laia Cubells**, Anika Hegemann, Rachael Evans, Tony E.Hayes, Francesc Tebar, Albert Pol, Roger J.Daly, Carlos Enrich and Thomas Grewal. ***Annexin VI interacts with H-Ras to inhibit EGF receptor signaling in breast cancer cells.***
Oncogene, *in press*. Oct 13. [Epub ahead of print]

ARTICLE 1

Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex.

El colesterol regula la localització subcel.lular de l'Anx6, i intervé en el transport de la caveolina de Golgi fins a la membrana plasmàtica. En aquest treball hem demostrat com l'Anx6 regula el transport de caveolina produint una alteració en el transport de colesterol intracel.lular des del compartiment endocític tardà fins a l'aparell de Golgi. Es va investigar la localització de la caveolina i el tràfic d'aquesta proteïna en el nostre model cel.lular, una línia transfectada de forma estable per a la sobreexpressió d'Anx6 (CHOAnx6). Hem demostrat que nivells elevats d'Anx6 provoquen una acumulació de caveolina al complex de Golgi. Aquest increment de caveolina s'associa a una acumulació de colesterol lliure als endosomes tardans, que alhora provoca una disminució dels nivells de colesterol a la membrana plasmàtica i a les membranes de Golgi. La disminució de colesterol al Golgi impedeix que la caveolina monomèrica pugui formar oligomers que és el requisit necessari perquè pugui sortir del Golgi i arribar a la membrana plasmàtica. Per això, en les cèl.lules CHOAnx6 el nombre de caveoles a la membrana està reduït fins a un 50%. Afegint consistència a aquests fets, tant l'expressió ectòpica de la proteïna NPC1 salvatge (que transporta el colesterol cap a fora dels endosomes tardans) com l'adició de colesterol soluble exogen, reverteixen l'acumulació de caveolina, que arriba amb normalitat a la membrana, i es recupera el nombre de caveoles fins a nivells control. En ambdós casos, també desapareix l'acumulació de colesterol lliure als endosomes. Aquesta reversió del fenotip també es produeix inhibint totalment la funcionalitat de l'Anx6 amb l'RNA d'interferència específic per a aquesta proteïna. Tots aquests resultats en conjunt demostren que la sobreexpressió d'Anx6 produeix una acumulació de colesterol als endosomes tardans, que fa que no arribi prou colesterol al Golgi, retenint la caveolina en aquest compartiment, i inhibint la formació de caveoles a la membrana plasmàtica.

Annexin A6-Induced Alterations in Cholesterol Transport and Caveolin Export from the Golgi Complex

OnlineOpen: This article is available free online at www.blackwell-synergy.com

Laia Cubells¹, Sandra Vilà de Muga¹,
Francesc Tebar¹, Peta Wood², Rachael Evans²,
Mercedes Ingelmo-Torres¹, Maria Calvo^{3,4},
Katharina Gaus⁵, Albert Pol³,
Thomas Grewal^{2,*} and Carlos Enrich^{1,3,*}

¹Departament de Biologia Cel·lular,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona,
Casanova 143, 08036-Barcelona, Spain

²Centre for Immunology, St. Vincent's Hospital,
University of New South Wales, Sydney,
NSW 2010, Australia

³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer
(IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de
Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Unitat de Microscòpia Confocal, Serveis
Científicotècnics, Facultat de Medicina, Universitat de
Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Centre of Vascular Research, School of Medical
Sciences, University of New South Wales, Sydney,
NSW 2052, Australia

*Corresponding authors: Carlos Enrich, enrich@ub.edu
and Thomas Grewal, t.grewal@cfi.unsw.edu.au

Annexin A6 (AnxA6) belongs to a family of Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins and is involved in the regulation of endocytic and exocytic pathways. We previously demonstrated that AnxA6 regulates receptor-mediated endocytosis and lysosomal targeting of low-density lipoproteins and translocates to cholesterol-enriched late endosomes (LE). As cholesterol modulates the membrane binding and the cellular location of AnxA6, but also affects the intracellular distribution of caveolin, we investigated the localization and trafficking of caveolin in AnxA6-expressing cells. Here, we show that cells expressing high levels of AnxA6 are characterized by an accumulation of caveolin-1 (cav-1) in the Golgi complex. This is associated with a sequestration of cholesterol in the LE and lower levels of cholesterol in the Golgi and the plasma membrane, both likely contributing to retention of caveolin in the Golgi apparatus and a reduced number of caveolae at the cell surface. Further strengthening these findings, knock down of AnxA6 and the ectopic expression of the Niemann-Pick C1 protein in AnxA6-overexpressing cells restore the cellular distribution of cav-1 and cholesterol, respectively. In summary, this study demonstrates that elevated expression levels of AnxA6 perturb the intracellular distribution of chole-

sterol, which indirectly inhibits the exit of caveolin from the Golgi complex.

Key words: annexin A6, caveolin, cholesterol, late endosomes, Golgi

Received 25 January 2007, revised and accepted for publication 13 August 2007, uncorrected manuscript published online 16 August 2007, published online 6 September 2007

Annexin A6 (AnxA6) is a member of a highly conserved family of Ca²⁺- and membrane-binding proteins that have been implicated in an array of physiological processes such as cell proliferation, differentiation and signal transduction (1,2). The different localization of each annexin in various cells and tissues analyzed and the interaction of individual annexins with different sets of membrane lipids and proteins, together with their association with cytoskeletal proteins, implicated a role for annexins in the regulation of membrane fusion, targeting and vesicle formation in endocytic and exocytic pathways (1,3). And indeed, in recent years, the involvement of annexins in the regulation of membrane traffic and membrane microdomain formation has emerged as one of their predominant functions. In many cells and tissues analyzed, AnxA6 was found both at the plasma membrane (PM) and in the early endosomes (EE) (4–6). These localization studies correlate with the stimulatory effect of ectopically expressed AnxA6 in receptor-mediated endocytosis (7–9) and favor a role of AnxA6 in the endocytic pathway.

Most cells and tissues express abundant amounts of AnxA6, and in rat liver, baby hamster kidney (BHK), normal rat kidney (NRK) cells and polarized WIF-B hepatocytes, immunocytochemical studies identified AnxA6 as a prominent component not only of EE but also of late endosomes (LE)/prelysosomes, Golgi compartments (6,10–12) and phagosomes (13). However, like all other annexins, AnxA6 is not expressed in some cell types and tissues analyzed (2,4). For example, epithelial cells of the small intestine and parathyroid gland and A431, a vulval squamous epithelial carcinoma cell line, completely lack AnxA6. Others, like colon epithelium, Chinese hamster ovary (CHO) cells and several human breast cancer cells have almost undetectable amounts of AnxA6 (2,8,14–16). These findings suggest cell-specific functions of AnxA6 that are associated with tightly controlled expression levels.

The regulation of the subcellular distribution of AnxA6 is poorly understood, but in close relation with its multiple

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2.5, which does not permit commercial exploitation.

locations and dynamic behavior, different and additional, yet unidentified signals seem to promote targeting of AnxA6 to certain cellular sites. Elevation of intracellular Ca^{2+} levels promotes the translocation of cytosolic AnxA6 to the PM and EE, where it is believed to bind to negatively charged phospholipids (1,17). However, in the late endosomal/prelysosomal compartment, recent findings from our laboratory suggest that cholesterol stimulates the membrane-binding affinity of AnxA6 (14). We identified that accumulation of low-density lipoproteins (LDL)-containing vesicles was accompanied by an increased amount of AnxA6 in LE (8). In addition, we showed that the expression of a dominant-negative mutant of AnxA6 inhibited the transport of LDL from the late endosomal/prelysosomal compartment to lysosomes (7). Finally, treatment with U18666A, a pharmacological agent that leads to an accumulation of cholesterol in LE, resulted in a significant and very specific translocation of both endogenous and ectopically expressed AnxA6 but not AnxA2 or caveolin in these vesicles *in vivo* (14). Although these mechanisms do not seem to operate in all cells and the healthy appearance of AnxA6 knockout (ko)-mice challenge the role of AnxA6 in this context (18,19), these studies indicate a role for AnxA6 in the lysosomal targeting and export of cholesterol from LE/prelysosomes.

Interestingly, studies on other proteins involved in the transport of cholesterol from LE/prelysosomes to other cellular compartments, such as Niemann–Pick C1 (NPC1), revealed that this process might be linked to the localization, trafficking and expression levels of caveolin-1 (cav-1) and caveolin-2 (cav-2) at the *trans* Golgi network (TGN) and at the PM (20–22). As AnxA6 in LE could be involved in the delivery of cholesterol to caveolin-containing compartments, we investigated its role in the subcellular localization and membrane trafficking of caveolin. In the present study, we demonstrate that increased expression of AnxA6 results in a sequestration and reduced export of cholesterol from LE, possibly by interacting and interfering with NPC1 function. This imbalance of intracellular cholesterol correlates with the accumulation of cav-1 in the Golgi complex and a reduced number of caveolae at the cell surface. The potential participation of AnxA6 in cholesterol transport from the late endocytic compartment, the mechanisms and its consequences for caveolin export from the Golgi complex are discussed.

Results

The AnxA6 is involved in cholesterol sequestration and export from LE

To investigate the consequences of AnxA6 expression on the intracellular distribution of cholesterol, we first compared CHO wildtype (CHOwt) cells and a well-characterized CHO cell line overexpressing AnxA6 [(CHOanx6); see *Materials and Methods* for further details]. The CHOwt cells express very low amounts of AnxA6 (7,8,15,23) (see also Figures 5C

and 8C and Figure S3C), whereas AnxA6 levels in CHOanx6 are rather similar to the AnxA6 expression observed in other commonly used cell lines such as HeLa (Figure 5C).

The CHOwt and CHOanx6 cells were fixed, stained with filipin, and the pattern of cholesterol staining was compared by epifluorescence microscopy (Figure 1A). As expected, in CHOwt cells, cholesterol was clearly detectable at the PM, and in punctate, in part perinuclear, structures throughout the cytoplasm. In contrast, 90% of CHOanx6 cells showed a very different staining pattern; in particular, weak cholesterol staining at the PM and a much stronger accumulation of cholesterol in cytoplasmic, perinuclear vesicles (Figure 1A). Both the size and fluorescence intensity of filipin-stained vesicle cells were significantly increased in CHOanx6 compared with CHOwt cells (Figure 1A; $p < 0.001$). Quantification of only prominently enlarged cholesterol-containing structures (defined as cytoplasmic, filipin-positive vesicles with a $\text{Ø} \geq 0.5 \mu\text{m}$ and a relative intensity ≥ 0.4 ; see inserts and quantification in Figure 1A) confirmed an accumulation of cholesterol in $45.7 \pm 14.6\%$ of CHOanx6 cells with an average of 3.2 ± 0.7 filipin-positive perinuclear structures/cell. In contrast, only $14.3 \pm 4.1\%$ of control cells showed similar structures with an average of 1.3 ± 0.2 filipin-positive structures/cell ($p < 0.001$).

To validate the strikingly different distribution of cholesterol in the CHOanx6 cell line and to exclude an aberrant phenotype as a consequence of cell line selection, we then analyzed CHOwt cells transiently transfected with green fluorescent protein (GFP)-tagged AnxA6 (GFP–Anx6). In these set of experiments, and similar to the elevated levels of AnxA6 in the CHOanx6 cell line (11.1 ± 2.7 -fold), expression levels of GFP–Anx6 were increased 9.4 ± 3.5 -fold compared with endogenous AnxA6 in CHOwt cells (compare Figure S3B–C and Figures 5C and 8C). Clearly, transient overexpression of AnxA6 resulted in an accumulation of cholesterol in vesicular structures (Figure 1B; $p < 0.01$). The same results were obtained when the filipin staining in A431 (A431wt) cells, which completely lack endogenous AnxA6 (15,18), and A431 stably expressing AnxA6 [(A431anx6); Figure 1B, see also Figure 8C for AnxA6 expression levels] was compared. Thus, not the CHOanx6 cell line selection but elevation of AnxA6 levels *per se* correlates with an accumulation of cholesterol in vesicular structures. This is not because of the increased internalization rates as AnxA6 alone does not alter LDL endocytosis but requires the coexpression of the LDL receptor to increase LDL uptake and degradation (7,8). Similarly, high transferrin receptor coexpression revealed a stimulatory role of Rab5 in endocytosis (24,25). To identify if AnxA6-induced accumulations of cholesterol were in the late endocytic compartment, CHOwt and CHOanx6 cells were transfected with the LE marker GFP-tagged Rab7 (Rab7–GFP) and stained with filipin. This showed a substantial colocalization of Rab7–GFP and cholesterol in CHOanx6 cells (Figure 1C, panels a–f). In support of this, we also observed a significant colocalization of filipin with

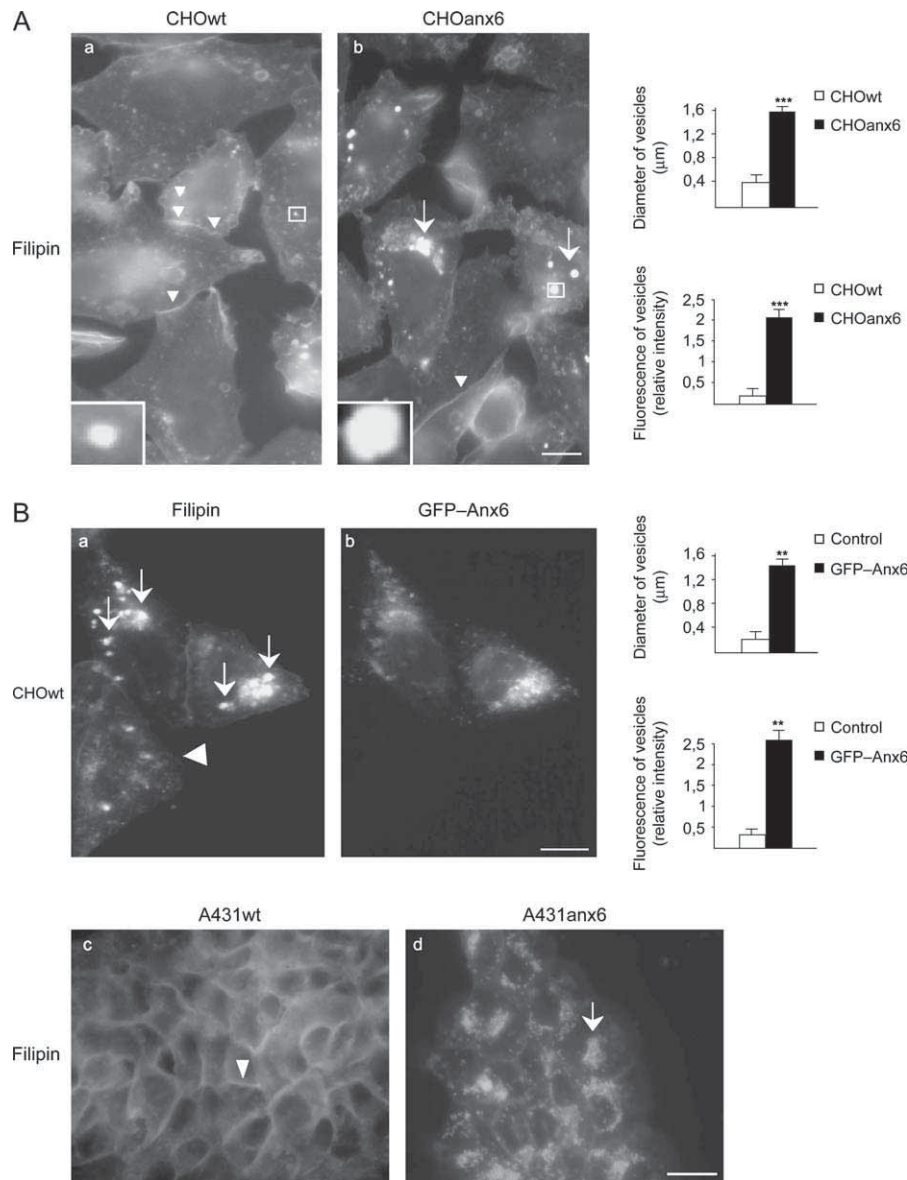


Figure 1: Sequestration of cholesterol in the late endosomal compartment of AnxA6-expressing cells. A) The CHOwt and CHOanx6 cells grown on coverslips were fixed and stained with filipin (5 μg/mL) as indicated. Arrows and arrowheads point at the accumulation of cholesterol in perinuclear compartments and at the PM, respectively. B) The CHOwt cells transiently transfected with GFP-Anx6 (a and b), AnxA6-deficient A431 cells (A431wt) and A431 cells stably expressing AnxA6 (A431anx6) were fixed and stained with filipin (c and d). The arrows point at the accumulation of cholesterol in perinuclear vesicles of GFP-Anx6 expressing CHO and A431anx6 cells, compared with the non-transfected control (arrowheads). For the quantification in A (a and b) and B (a and b), see text for further details. The mean values ± SD of the diameter and fluorescence intensity of perinuclear filipin-positive structures from three independent experiments (150 cells in total) per cell line is given; ** and ***, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ for Student's *t*-test, respectively. Inserts (in A) show representative filipin-positive structures. C) The CHOwt and CHOanx6 cells were transfected ± Rab7-GFP (a–c and d–f), fixed and immunolabeled with anti-LBPA (g–i and j–l) and stained with filipin (a, d, g and j) as indicated. The merged images (c, f, i and l) show a colocalization of cholesterol and LE in CHOanx6 cells (arrows in f and l). D) The COS-1 cells were cotransfected with Anx6-CFP (a) and Rab7-GFP (b), fixed and analyzed by confocal microscopy. Arrows in the merged image (panel c) point at colocalization of Anx6-CFP and Rab7-GFP. Bar is 50 μm in B (a and b) and 10 μm in all other panels. Figure 1 continued on next page.

another marker for LE, lysobisphosphatidic acid (LBPA), only in CHOanx6 cells (Figure 1C, panels g–l) but not in controls. As shown previously in CHOanx6 and NRK cells (7, 14), significant amounts of AnxA6 colocalized with Rab7 in the late endosomal compartments of COS-1 cells

transiently cotransfected with Anx6– cyan fluorescent protein (CFP) and Rab7–GFP (Figure 1D, panels a–c).

To confirm that expression of AnxA6 increases the content of cholesterol in LE by biochemical means, cell lysates

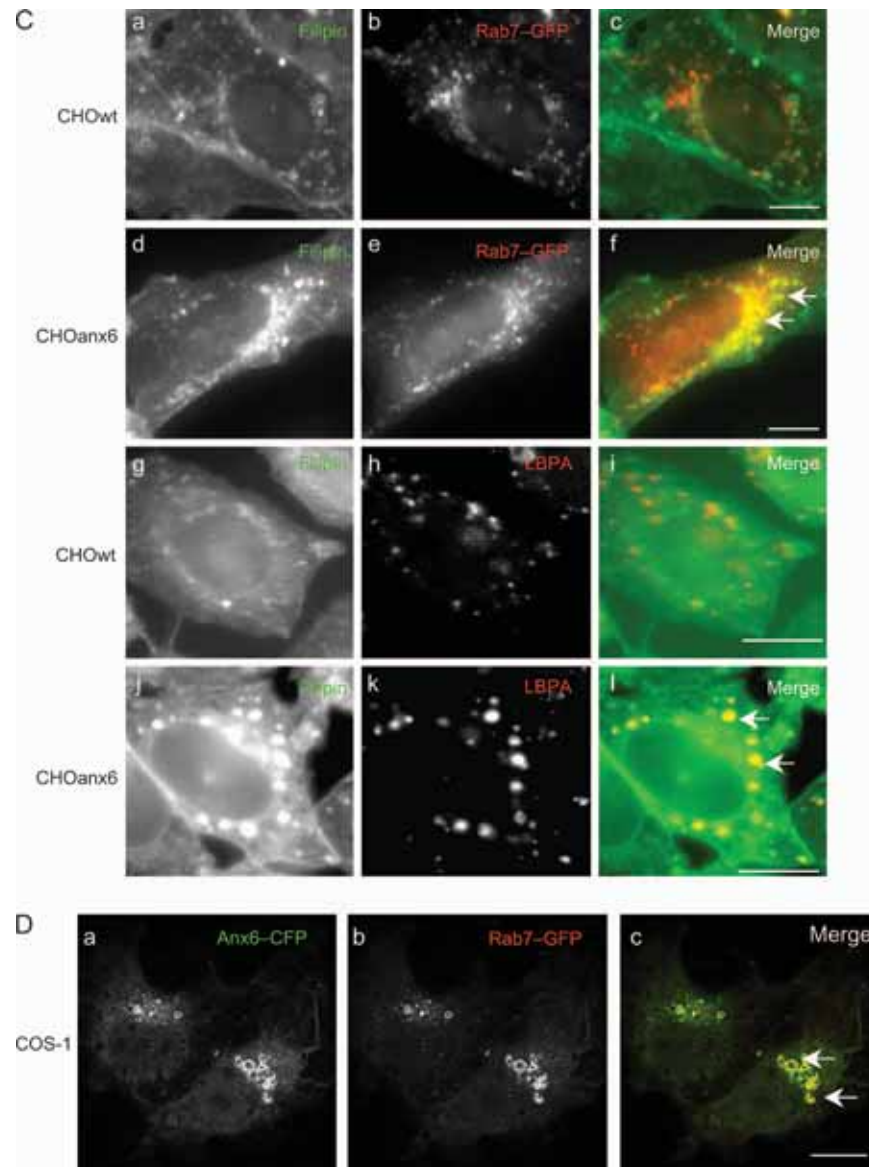
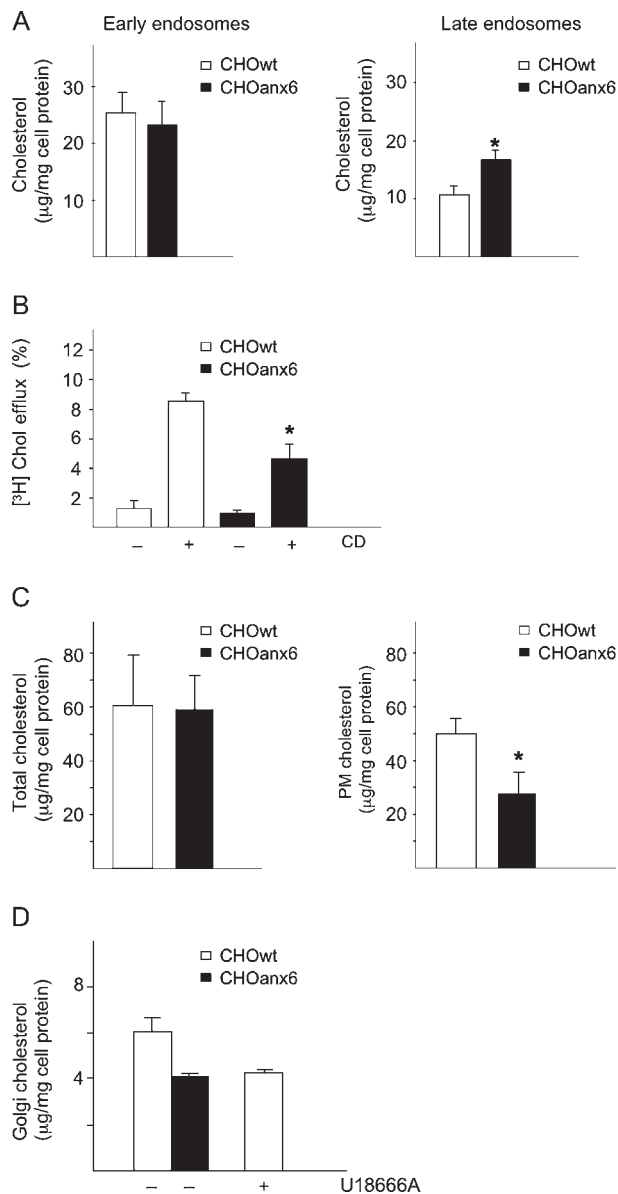


Figure 1: Continued from previous page.

from CHOwt and CHOanx6 cells were subjected to cell fractionation, and EE and LE were isolated on sucrose gradients (8) and analyzed for their cholesterol (Figure 2A) and phospholipid contents. The purity of isolated fractions was routinely assessed by immunoblotting with established markers for EE (Rab5 and EEA1), LE (Rab7 and Lamp1), PM [Na^+K^+ adenosine triphosphatase (ATPase)] and β -hexosaminidase activity assays (lysosomes) as described (8,14) (Figure S1A). Similar to previous studies (14), high-performance liquid chromatography analysis and fluorometric determinations showed comparable levels of cholesterol (Figure 2A) and phospholipids (phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine (PS) and phosphatidylcholine; unpublished data) in EE fractions of both cell lines. In contrast, and in agreement with the increased filipin staining (Fig-

ure 1A–C), LE from CHOanx6 cells contained more cholesterol ($55 \pm 12\%$; $p < 0.01$), whereas the molar ratio of phospholipids remained unchanged. The differences in late endosomal cholesterol levels measured biochemically in CHOanx6 cells versus CHOwt cells (Figure 2A) appear to be smaller than the differences in filipin staining (Figure 1A–C) between these cells. However, these results are consistent with the reports showing that moderate increases (30–40%) in late endosomal cholesterol result in a dramatic intensification of filipin staining (26–29).

Late endosomal/prelysosomal cholesterol is exported to various locations in the cell including the cell surface. In normal cells at steady state, very little cholesterol is detected in LE and lysosomes as cholesterol derived from the hydrolysis of internalized LDL is rapidly transported out



of LE (30–32). Thus, cholesterol export from LE cannot easily be quantified as incubation of cells with radioactive cholesterol [³H]-cholesterol (³H-Chol) preferentially labels the PM and to a lesser extent other intracellular compartments such as recycling endosomes and the Golgi. However, in the presence of U18666A, [³H]-Chol almost exclusively loads LE, and followed by incubation with cholesterol acceptors like methyl- β -cyclodextrin (CD), [³H]-Chol from LE is available for efflux to the PM and can be quantified (33,34). Although the CD-induced export of cholesterol is significantly delayed under these conditions and approximately fivefold to sevenfold less efficient as in control CHO cells (33) (see also Figure S2A), it allows to determine if cholesterol export from LE is affected upon AnxA6 overexpression. The CHOwt and CHOanx6 cells were incubated with U18666A in the presence of [³H]-Chol, followed by 1% CD for 120 min, and then the

Figure 2: Cholesterol imbalance in CHOanx6 cells. A) The EE and LE from 4 to 6×10^7 CHOwt and CHOanx6 cells were isolated as described (8,14) (see also Figure S1A), and cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein) in each endosomal fraction was determined in duplicate samples (see *Materials and Methods*). The mean \pm SD is given and is representative for five independent experiments. *, $p < 0.05$ for Student's t -test. B) The CHOwt and CHOanx6 cells were incubated with $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ U18666A together with [³H]-Chol (2×10^6 c.p.m./mL) for 24 h. Cells were washed with PBS and incubated \pm 1% CD for 120 min. The ratio of released and cell-associated radioactivity was determined, normalized to total cell protein, and the amount of efflux is given in per cent. The background efflux in U18666A-treated CHOwt and CHOanx6 cells was equivalent to 5.0 – 7.0×10^5 c.p.m./mg cell protein, respectively. Mean values \pm SD of three independent experiments with triplicate samples are given. *, $p < 0.05$ for Student's t -test. C) Total cellular cholesterol and PM cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein) were determined from whole cell lysates and PM fractions (15) (see also Figure S1B) of CHOwt and CHOanx6 cells (in triplicate) and normalized to cellular protein. The mean \pm SD is given and is representative for three and five independent experiments, respectively. *, $p < 0.05$ for Student's t -test. D) The CHOwt cells were incubated \pm U18666A ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h as indicated, and cholesterol levels in $500 \mu\text{L}$ of Golgi-enriched membrane fractions were determined and compared with CHOanx6 cells. Mean values \pm SD of two independent experiments with duplicate samples are given.

radioactivity released into the media was measured (Figure 2B). Compared with controls, CHOanx6 cells showed a $53.9 \pm 11.5\%$ reduction ($p < 0.05$) in cholesterol efflux upon incubation with CD. Similar results were obtained when comparing other cell lines (A431 and BT20) \pm AnxA6 (Figure S2B). Consistent with these findings, and despite the total amount of free cholesterol being comparable in both cell lines (Figure 2C), the cholesterol in isolated PM fractions was significantly reduced by $42 \pm 12\%$ ($p < 0.05$) in CHOanx6 cells (Figure 2C). Cholesterol efflux induced with 1% CD or physiological cholesterol acceptors [high-density lipoproteins (HDL), HDL₃] in the absence of U18666A, which will then predominantly remove [³H]-Chol derived from the PM, was reduced by 10–20% in CHOanx6 cells (Figure S2A). Although we cannot completely rule out some contribution of efflux from intracellular compartments in these experiments, it is supportive of cholesterol at the PM being reduced in CHOanx6 cells.

To address if cholesterol synthesis in AnxA6-expressing cells could contribute to the reduced cholesterol levels at the PM, CHOwt and CHOanx6 cells were labeled with [^{1-¹⁴C}]-acetic acid. Newly synthesized radioactive cholesterol was separated from its major precursors and analyzed by thin layer chromatography (TLC). The TLC plates were exposed to X-ray film, quantified using ImageJ [National Institutes of Health (NIH)] and normalized for total cellular protein as described (35). Interestingly, in two separate experiments with triplicate samples, relative cholesterol synthesis was slightly reduced by $36 \pm 18\%$ ($p < 0.05$) in CHOanx6 cells (Figure S1B). Similar findings

have been made for the caveolin mutant cavDGV (21) and could be (i) because of a reduced expression/activity of cholesterol synthetic enzymes in CHOanx6 cells or (ii) linked to inhibitory effects of AnxA6 and cavDGV on the Ras/PI3K/Akt signaling pathway in cholesterol synthesis (15,23,35,36). However, although newly synthesized cholesterol from the endoplasmic reticulum (ER) rapidly reaches the cell surface (37), it is unlikely that this pathway plays a major role in the reduction of cholesterol levels at the PM (and the Golgi; Figure 2D) of CHOanx6 cells as the majority of cellular cholesterol is derived from receptor-mediated uptake of lipoproteins, which is accompanied by a downregulation of cholesterol synthesis (31,32,37). In further support of this observation, the total amount of cellular cholesterol remains unchanged in CHOanx6 cells (Figure 2C).

Finally, to analyze if AnxA6-dependent reduction of cholesterol export from LE could be linked to cholesterol-dependent secretory pathways from the Golgi to the PM, we compared cholesterol levels in Golgi-enriched membrane fractions of CHOwt cells \pm U18666A with untreated CHOanx6 cells. The purity of isolated Golgi-enriched membrane fractions was confirmed through the enrichment of *cis*- and *trans*-Golgi markers [(GM130, Golgi microtubule-associated protein of 210kDa (GMAP210) and TGN38) and the lack of significant amounts of EE, LE (Rab5 and Rab7), PM (Na⁺K⁺ ATPase) or endoplasmic reticulum (KDEL) markers (Figure S1C). As shown in Figure 2D, isolated CHOwt cells Golgi membranes contain 6.0 ± 0.4 μ g cholesterol/mg cell protein, which is comparable to previously reported values (38,39). In contrast, CHOanx6 cells showed reduced ($38.0 \pm 5.7\%$) cholesterol levels in their Golgi fractions. Importantly, upon treatment of CHOwt cells with U18666A, reduced cholesterol levels in Golgi fractions were observed, which were comparable to the values obtained from untreated CHOanx6 cells. As newly synthesized cholesterol mostly bypasses the Golgi complex on its way to the PM, and the redistribution of internalized cholesterol from LE is the major source of cholesterol in the Golgi (37), these findings indicate that the blockage of cholesterol export from LE in U18666A-treated CHO cells mimics the effects observed in AnxA6-expressing cells, both ultimately leading to an impaired supply of cholesterol to the Golgi.

In summary, we conclude that AnxA6 is involved in cholesterol export from LE, and possibly in cholesterol synthesis, thereby contributing to an imbalance and altered distribution of cholesterol in other compartments like the Golgi apparatus and the cell surface.

Expression of AnxA6 leads to the accumulation of caveolin in the Golgi

We have recently shown that cholesterol regulates the transport of caveolin through the Golgi complex (40). As the export of cholesterol from LE could be linked to caveolin trafficking and given the accumulation of late endosomal cholesterol in CHOanx6 cells, we first com-

pared the localization of cav-1 in CHOwt cells and CHOanx6 cells (Figure S3A). Both cell types express very similar amounts of cav-1 and other proteins commonly found in caveolae such as Scavenger receptor BI (SR-BI) and H-Ras (15) (Figure S3C). Similar to other cell types, cav-1 is localized at the PM and in the intracellular compartments in CHOwt cells (images were taken with the focus at the plane of the Golgi). However, in more than 90% of AnxA6-expressing cells, a significant accumulation of caveolin in the perinuclear region was observed. Quantification of cav-1 fluorescence confirmed a 4.5 ± 0.4 -fold ($p < 0.001$) increase of caveolin staining in the perinuclear (Golgi) region of CHOanx6 cells compared with controls (Figure S3A). To validate these findings, the localization of cav-1 in CHOwt cells transiently transfected with GFP-Anx6 was analyzed (Figure S3B). Similarly, cav-1 accumulated 4.5 ± 0.5 -fold ($p < 0.01$) in the perinuclear region of CHOwt cells upon GFP-Anx6 overexpression. Double immunolabeling with polyclonal anti-caveolin and anti-GM130, a marker protein for the *cis*-Golgi compartment, revealed a remarkable colocalization in CHOanx6 cells (Figure 3A, panel f). Quantification of cav-1 fluorescence showed a 2.7 ± 0.4 -fold ($p < 0.001$) increase of caveolin in the GM130-containing compartment of CHOanx6 cells (Figure 3A). Comparable data were obtained using a monoclonal antibody specifically recognizing Golgi-associated cav-1 (40) (Figure 3B, panels a and b).

Several caveolin antibodies preferentially recognize the Golgi but not the PM pool of caveolin (40). To rule out that expression of AnxA6 interfered with the antibody detection of caveolin at the PM, CHOwt and CHOanx6 cells were transiently transfected with yellow fluorescent protein (YFP)-tagged cav-1 (YFP-cav1) or GFP-tagged caveolin-3 (GFP-cav3) and visualized by epifluorescence microscopy (Figure 3B, panels c–f). As shown for endogenous cav-1, YFP-cav1 and GFP-cav3 were found in intracellular compartments and in the PM in CHOwt cells. In contrast, the majority of transfected CHOanx6 cells (70–80%) were characterized by a strong accumulation of both YFP-cav1 and GFP-cav3 in the perinuclear region, further indicating a retention or slow export of caveolin out of the Golgi complex.

By means of a biochemical approach developed recently in our laboratory (40), the amount of cav-1 in the Golgi was compared between both cell lines in immunoprecipitation experiments (Figure 3C). These experiments confirmed the increase of Golgi-associated cav-1 in CHOanx6 cells (3.4 ± 0.2 -fold; $p < 0.0001$; see also Figure 4B and Figure S4B). The Cav-1 immunoprecipitates did not contain detectable amounts of AnxA6. Together with the lack of colocalization of AnxA6 with cav-1 in Golgi compartments (data not shown), this indicates that the increased association of cav-1 with the Golgi in CHOanx6 cells is not because of a direct interaction of AnxA6 with cav-1. In support of the results described above, when Golgi fractions from CHOwt and CHOanx6 cells were purified

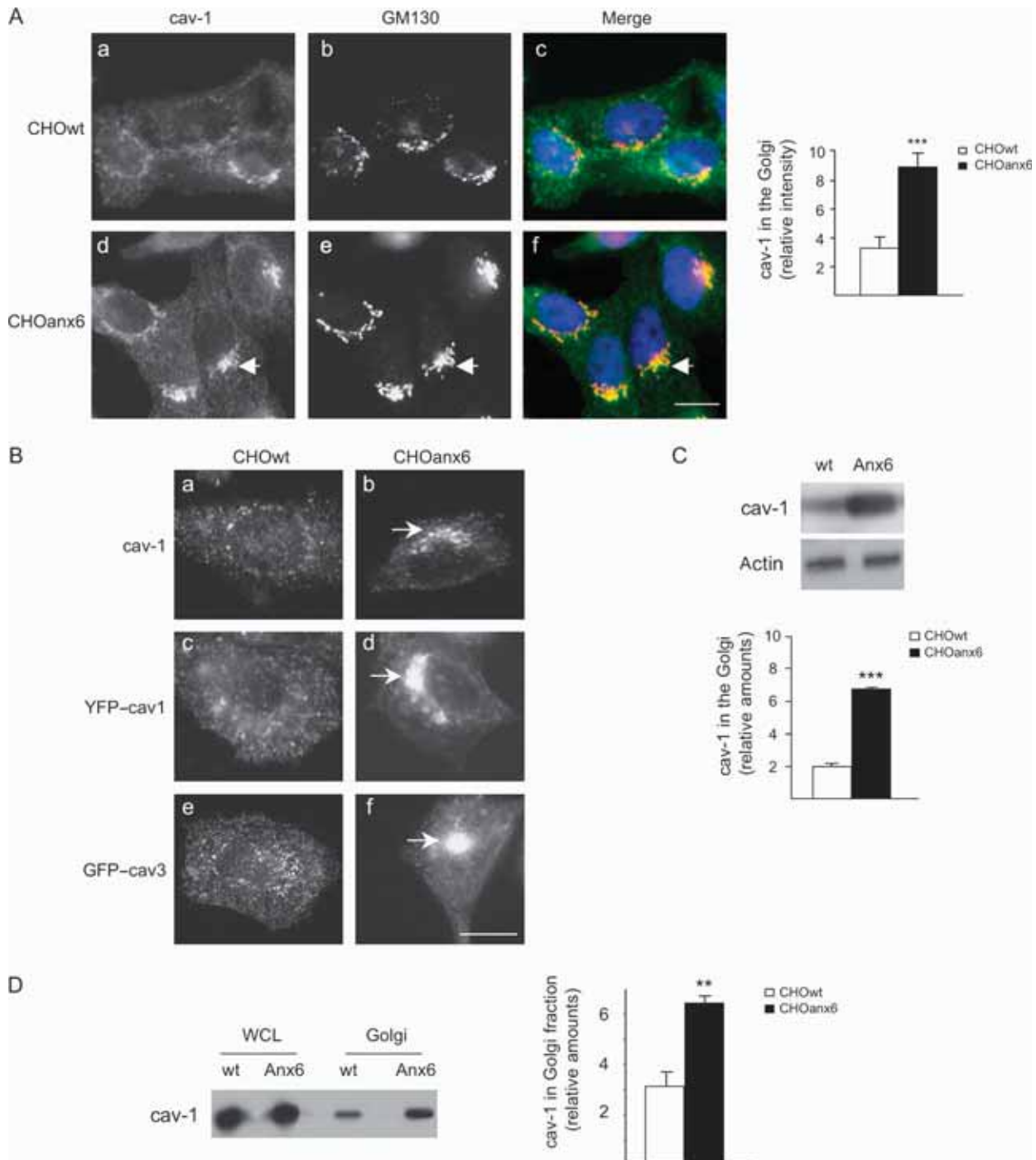


Figure 3: Legend on next page.

and analyzed for the amount of cav-1, we identified a 2.8 ± 0.5 -fold ($p < 0.001$) increase of cav-1 in Golgi fractions from CHOanx6 cells (Figure 4D).

The CHOwt cells express small amounts of AnxA6 making it difficult to detect in LE (14). To identify only residual amounts of endogenous AnxA6 in LE of U18666A-treated

CHOwt cells, purified LE fractions had to be concentrated 10-fold (14). Similar to RNA interference (RNAi) knock-down approaches (see also Figure 5C), we reasoned that this very low concentration of AnxA6 in LE makes CHOwt cells an appropriate model system to analyze if sequestration of cholesterol in LE *per se* can already lead to an accumulation of cav-1 in the Golgi. Therefore, we first

compared the localization of cav-1 in CHOwt cells \pm U18666A (Figure 4A). As expected, CHOwt cells incubated with U18666A are characterized by increased amounts of cholesterol in LE (Figure 4A, compare panels g and h). In confirmation of previous results (14), treatment with U18666A did not result in the recruitment of cav-1 to LE, but a redistribution and increased cav-1 staining in the Golgi in CHOwt cells were observed (compare panels a and b). This correlates with a 4.1 ± 2.3 -fold enlargement of LE in CHOwt cells upon drug treatment (compare panels d and e), which can already be observed in untreated CHOanx6 cells (panel f). It should be noted that CHOanx6 contained 2.5 ± 0.3 -fold more LBPA-positive vesicles compared with CHOwt cells (compare panels d and f), indicating a potential enlargement of the late endosomal compartment. In support of these findings, immunoprecipitation of Golgi-associated cav-1 in CHOwt cells treated with U18666A was increased 17.7 ± 0.7 -fold ($p < 0.001$) compared with untreated CHOwt controls (Figure 4B). To ensure that sequestration of cholesterol in LE in an AnxA6-independent manner can result in an accumulation of cav-1 in the Golgi, we analyzed an AnxA6 ko-model using A431 (A431wt) cells (15,18). The A431wt were treated with U18666A, and the Golgi-associated cav-1 was immunoprecipitated and analyzed by Western blotting as described above (Figure 4C). Like CHOwt cells (Figure 4B), A431 cells showed a 2.6 ± 0.4 -fold ($p < 0.0001$) increase of cav-1 in the Golgi upon treatment with U18666A. These findings suggest that the accumulation of late endosomal cholesterol, possibly accompanied by LE vesicle enlargement as observed here and proposed by others (41), leads to the concomitant retention of caveolin in the Golgi. In summary, the results described above suggest that AnxA6 is a component of the molecular machinery involved in cholesterol homeostasis that indirectly modulates the export of cav-1 from the Golgi.

Downregulation of AnxA6 restores the intracellular distribution of cholesterol and caveolin

We then transiently transfected CHOanx6 cells with a myc-tagged N-terminal deletion AnxA6 mutant (previ-

ously described as dominant-negative DN-anx6₁₋₁₇₅) (Figure 5A), which interferes with the function of endogenous AnxA6 in the endocytosis and delivery of LDL to lysosomes (7, 9). This mutant (Anx6₁₋₁₇₅) also seems to interfere with the function of ectopically expressed AnxA6 as observed by the loss of the characteristic distribution, size and number of enlarged, perinuclear filipin-positive structures (Figure 5A, arrows in panel a; loss of vesicular filipin-intensity in Anx6₁₋₁₇₅-transfected CHOanx6 cells: 2.5 ± 0.5 -fold; $p < 0.0001$). Furthermore, whereas cav-1 accumulates in the Golgi of CHOanx6 cells (Figure 5B, arrows in panels a and c; see also Figures 3 and 4), expression of the Anx6₁₋₁₇₅ mutant (Figure 5B, arrowhead in panel a) strongly reduced the amounts of cav-1 at the Golgi in 45–55% of transfected cells (loss of caveolin staining in the Golgi in Anx6₁₋₁₇₅-transfected CHOanx6 cells: 4.3 ± 0.3 -fold; $p < 0.0001$). In contrast, CHOanx6 transfected with myc-tagged vector control (Figure 5B, panels c and d) still show increased cav-1 staining at the Golgi (arrowhead in panel c).

Then we analyzed the localization of cav-1 in AnxA6-depleted HeLa cells, which normally express AnxA6 levels, as shown for CHOanx6 cells that are significantly higher (8.2 ± 1.8 -fold) compared with CHOwt cells (Figure 5C). The RNAi-mediated downregulation of AnxA6 by 70–80% did not affect cav-1 expression levels, but Golgi-cav-1 staining was strongly reduced (24.5 ± 0.21 -fold; $p < 0.001$) in the majority (60–70%) of AnxA6-depleted cells (arrowheads in Figure 5C) as compared with the untransfected (arrows) or RNAi-GFP-transfected controls (not shown). Next, we determined the amounts of immunoprecipitated and Golgi-associated cav-1 after RNAi-mediated depletion of AnxA6 (Figure 5D). In agreement with the data obtained from the immunofluorescence microscopy, Golgi-associated cav-1 in AnxA6-depleted HeLa cells was reduced 2.6 ± 0.3 -fold ($p < 0.001$). We then analyzed the distribution of cholesterol in AnxA6-depleted HeLa cells (Figure 5C). In AnxA6-expressing controls, a strong vesicular filipin staining was observed (arrows). In contrast, AnxA6 depletion resulted in a redistribution

Figure 3: Caveolin accumulates in the *cis*-Golgi compartment of AnxA6-expressing cells. A) The CHOwt (a–c) and AnxA6-expressing CHO cells (CHOanx6, d–f) grown on coverslips were fixed, permeabilized and stained with polyclonal anti-caveolin (green), anti-GM130 (red) and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (nuclei, blue) as indicated. The arrow points at caveolin (cav-1) accumulation and colocalization with GM130 in the Golgi of CHOanx6 cells. Images, focused at the plane of the Golgi, are representative for 90% of cells analyzed in each experiment ($n = 5$). Bar is 10 μ m. The fluorescence intensity of the cav-1 staining at the Golgi area in CHOwt and CHOanx6 cells was quantified. Values represent the mean \pm SD of five independent experiments with 50 cells per cell line in each experiment. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test. B) (a and b) The CHOwt and CHOanx6 cells were fixed, permeabilized and immunolabeled with mouse anti-cav-1 that specifically recognizes the Golgi-associated pool of cav-1. (c–f) The CHOwt and CHOanx6 cells were transfected with YFP-cav1 and GFP-cav3 as indicated. Twenty-four hours after transfection, cells were fixed, and the localization of YFP-cav1 and GFP-cav3 was analyzed by epifluorescence microscopy. Arrows point at the perinuclear accumulation of endogenous cav-1 (b) and transfected YFP-cav1 (d) and GFP-cav3 (f) in CHOanx6 cells, respectively. Images are representative for 70–80% of cells analyzed in five independent experiments. C) Golgi-associated caveolin was immunoprecipitated, analyzed by Western blotting as described (40) and normalized to actin. The relative amount of cav-1 in the Golgi in both cell types is given and represents the mean \pm SD of five independent experiments with duplicate samples. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test. D) Protein levels of caveolin in whole cell lysates (WCL) and Golgi-enriched fractions (Golgi; see also Figure S1C) of CHOwt and CHOanx6 cells were determined by Western blot analysis and quantified. Mean values \pm SD of three independent experiments with duplicate samples are given. **, $p < 0.01$ for Student's *t*-test.

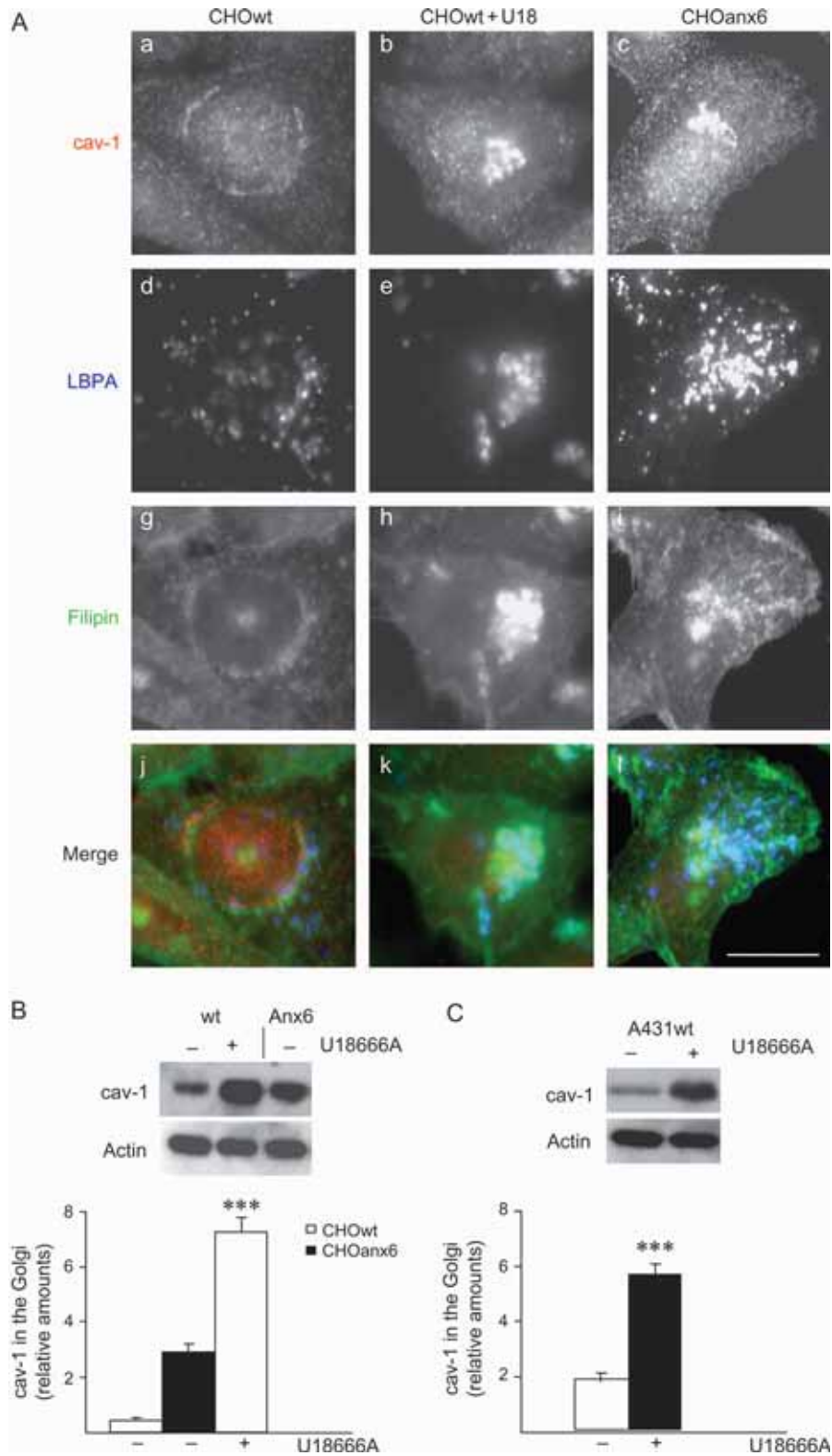


Figure 4: Legend on next page.

of cellular cholesterol with filipin predominantly staining the PM and the perinuclear GM130-positive region (arrowheads). This correlates with increased cholesterol levels ($25 \pm 3.5\%$) in PM-enriched membrane fractions of AnxA6-depleted cells (Figure 5E). Interestingly, depletion of Rab9, which upon overexpression can compensate for the accumulation of cholesterol in NPC-mutant cells (42–44), does not change the filipin pattern of HeLa cells (45). This indicates that more than a single pathway regulates cholesterol export from LE and proteins like AnxA6 and Rab9 drive efflux through different pathways. In summary, loss or downregulation of AnxA6 correlates with a redistribution of cholesterol, thereby modulating the intracellular transport of cav-1 from the Golgi to other cellular compartments.

U18666A-treated CHOwt cells and AnxA6-expressing cells show a similar phenotype that partially resembles alterations in cholesterol transport, observed in cells carrying a mutation in the NPC1 protein. Given these similarities and the predominant localization of NPC1 in LE, we investigated if AnxA6 is linked to the function/localization of NPC1. Immunofluorescence microscopy revealed the colocalization of AnxA6-CFP and GFP-tagged, wildtype NPC1 (NPC1-GFP) in transiently transfected COS-1 cells (Figure 6A). In addition, AnxA6 co-immunoprecipitated with NPC1-GFP in lysates from transfected CHOanx6 cells (Figure 6B). Most importantly, ectopic expression of NPC1-GFP in CHOanx6 cells resulted in a redistribution of cav-1 (Figure 6C, panel a) and cholesterol (panel c), indicating that overexpression of NPC1 overcomes the inhibitory effect of AnxA6 on cholesterol export in LE, thereby also releasing the blockage of cav-1 export from the Golgi (Figure 6C).

The AnxA6 modulates the export of caveolin from the Golgi complex

Given the requirement of cholesterol for caveolin export from the Golgi (40) and the reduced Golgi-cholesterol in CHOanx6 cells (Figure 2D), we determined the export of caveolin from the Golgi complex of CHOwt and CHOanx6 cells in inverse fluorescence recovery after photobleaching (iFRAP) experiments (40). In order to measure and visualize the kinetics of caveolin export, and to avoid any interference of GFP-tagged cav-1 with endogenous cav-1, we monitored the localization of GFP-tagged caveolin-3 (cav-3) (GFP-cav3). We and others have shown that the localization and trafficking of these two isoforms are comparable in commonly used cell lines that do not

express cav-3 (36,40). Therefore, CHOwt and CHOanx6 cells were transfected with GFP-cav3, and the entire cytoplasm except the Golgi region of transfected cells was photobleached. Then GFP-cav3 trafficking from the Golgi was monitored by confocal microscopy. Results from individual cells were compared, and a representative experiment is shown (Figure 7A, for quantification, see Figure 7B). As hypothesized, 90 min after photobleaching, $48 \pm 2.11\%$ of GFP-cav3 fluorescence disappeared from the Golgi in CHOwt cells (mobile fraction, for quantification details, see *Materials and Methods*), but much slower kinetics for GFP-cav3 export (mobile fraction, $16 \pm 2.51\%$) from the Golgi were observed in AnxA6-expressing cells ($p < 0.01$). Moreover, this appeared to be specific for caveolin as the kinetics of GFP-MAL, a raft-associated integral membrane protein at the PM, and GFP-tagged epidermal growth factor receptor (EGFR-GFP), which is found at the PM in both lipid rafts and clathrin-coated pits, were almost identical in CHOanx6 and controls (Figure 7B). Similar to published data (40,46), the kinetics and cholesterol requirements for the export of vesicular stomatitis virus-G protein (VSV-G)-GFP, a marker protein for the exocytic pathway, are in striking contrast to cav-1 (see also Figure S5). Elevation of cholesterol leads to a retention of VSV-G in the Golgi, which was observed in both CHOwt and CHOanx6 cells. Consistent with our hypothesis of an impaired supply of cholesterol to the Golgi in CHOanx6, one could expect an increased mobility of Golgi-associated VSV-G. Indeed, in the set of experiments performed (Figure 7B), we observed a $20 \pm 2\%$ increased mobility of Golgi-associated VSV-G in CHOanx6 cells compared with controls.

We have recently demonstrated that exogenous cholesterol stimulates the exit of cav-1 from the Golgi (40). To determine if the accumulation and slow transit of caveolin through the Golgi in CHOanx6 cells could be overcome by cholesterol loading, iFRAP experiments \pm exogenous cholesterol in CHOanx6 cells transiently transfected with GFP-cav3, which behaves like cav-1 in CHOanx6 (Figures 3B and 7A,B), were performed, and the kinetics of GFP-cav3 export were determined (Figure 7C). Clearly, addition of exogenous cholesterol completely re-established the onward trafficking of GFP-cav3 out of the Golgi complex in CHOanx6 cells *in vivo*. Then, the localization of endogenous cav-1 in controls and CHOanx6 cells \pm cholesterol was compared (Figure S4A). Similarly, significantly less cav-1 was associated with the Golgi complex upon addition

Figure 4: Sequestration of cholesterol in LE alters the cellular distribution of caveolin. A) The CHOwt and CHOanx6 cells were treated \pm U18666A ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h, fixed and stained with anti-caveolin, anti-LBPA and filipin ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) as indicated. A redistribution and increased cav-1 staining in the Golgi of U18666A-treated CHOwt can be observed (panels b and n). The merged images are shown (panels j–l). Bar is $10 \mu\text{m}$. B and C) The CHOwt, CHOanx6 (B) and A431 (C) cells were treated \pm U18666A as above, and Golgi-associated caveolin was immunoprecipitated and analyzed by Western blotting as described (40). Actin in the cell lysates is shown. The amount of immunoprecipitated cav-1 from the Golgi was quantified and normalized to actin. The relative amount of cav-1 in the Golgi is given and is representative for three independent experiments. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test.

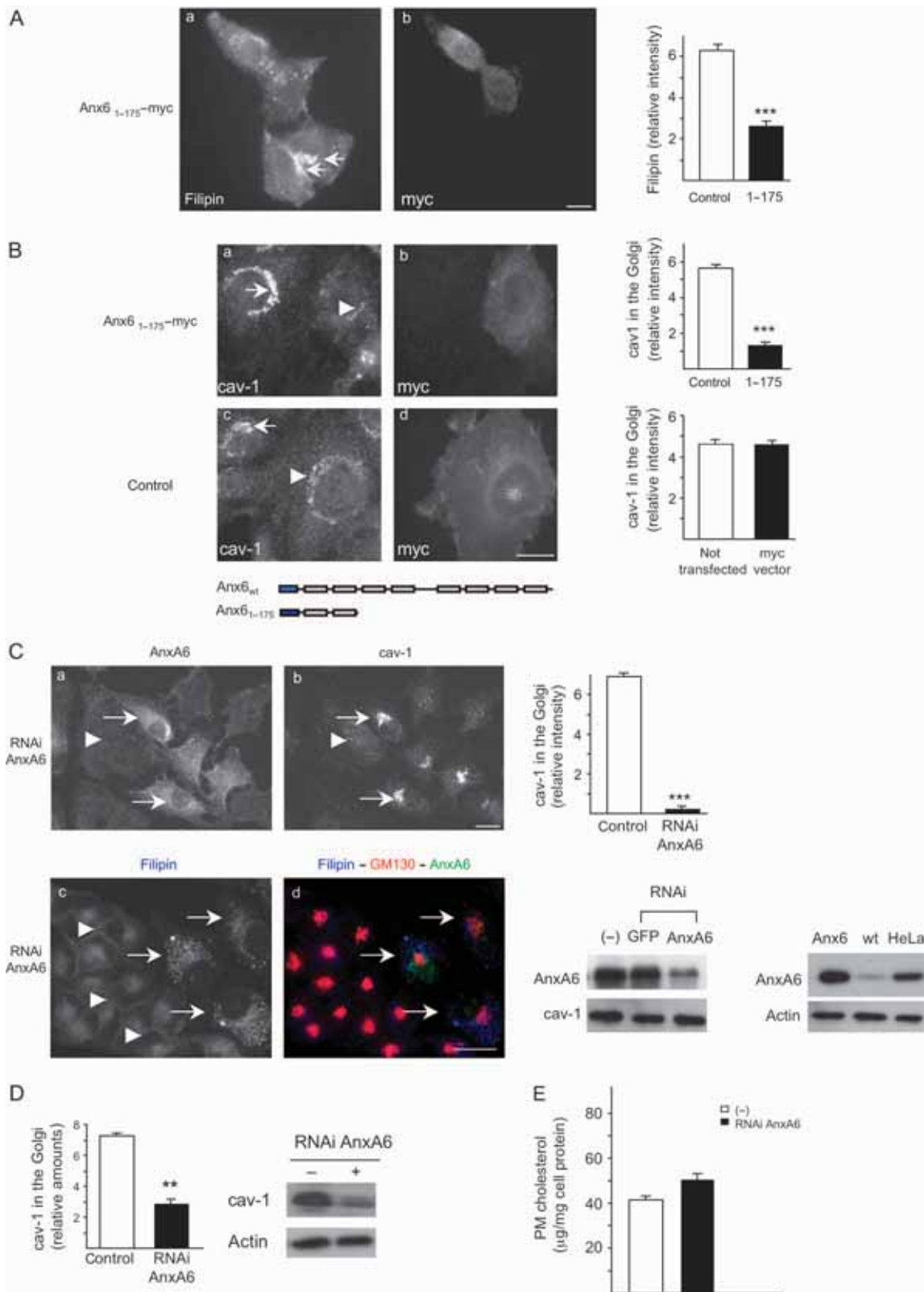


Figure 5: Legend on next page.

of cholesterol, but PM staining of cav-1 was evidently detectable in CHOanx6 cells (arrow in Figure S4A, panel d).

To corroborate these findings, Golgi-associated cav-1 was quantified in immunoprecipitation experiments (Figure S4B). The CHOwt and CHOanx6 cells were again incubated \pm cholesterol for 90 min. Then the Golgi-associated cav-1 was immunoprecipitated and quantified as described (40) (see also Figures 3C, 4B,C and 5D). Control samples confirmed increased amounts of cav-1 associated with the Golgi complex in CHOanx6 cells (Figure S4B, compare lanes 1 and 5 and 2 and 6, respectively; $p < 0.001$). Addition of exogenous cholesterol reduced the amount of cav-1 in the Golgi by 37 and 84% in CHOwt cells as well as 63 and 68% in CHOanx6 cells \pm cycloheximide (Cyhx), respectively (Figure S4B; $p < 0.001$).

Finally, to verify and identify a possible correlation between the level of AnxA6 expression, the accumulation of cav-1 in the Golgi and the number of caveolae at the cell surface, several cell types expressing high and low levels of AnxA6 were analyzed and compared by electron microscopy (Figure 8A). The CHOanx6 cells had morphologically normal but reduced numbers (61.4%) of caveolae compared with control cells (Figure 8B). Less caveolae (60.8%) were also found in A431 stably expressing AnxA6 (A431anx6) compared with AnxA6-deficient A431wt. Likewise, the comparison of estrogen-receptor (ER) negative breast cancer cell lines with high (MDA-MB-436) and low (MDA-MB-468) AnxA6 levels showed a 55.0% reduction in the number of caveolae in the ER-negative cells with high AnxA6 expression levels. In addition, exogenous cholesterol increased caveolae formation in CHOanx6 cells and

resulted in comparable numbers of caveolae in both cell types (3.19 ± 0.68 and 3.32 ± 0.59 caveolae/section, respectively). These findings correlated with a slight decrease of HDL₃-induced cholesterol efflux, which is believed to be mediated through SR-BI in caveolae [(47) and references therein], in CHOanx6 cells (10–20%) compared with controls. Similar results were obtained when cholesterol efflux was determined using 1% CD (Figure S2A). Thus, we conclude that the overall ability of CHOanx6 and other cell types with high AnxA6 expression levels to form caveolae is not affected. In spite of this, AnxA6-induced perturbations in cholesterol metabolism, including late endosomal cholesterol export indirectly reducing the exit of cav-1 from Golgi compartments, could contribute to a reduced number of caveolae at the cell surface. These results are also consistent with the reduced number of caveolae observed in BHK cells treated with U18666A (A. Pol and R. G. Parton, personal communication).

Discussion

In this study, we have shown that high expression levels of AnxA6 can induce a cholesterol imbalance, thereby indirectly perturbing cav-1 export from the Golgi.

To our knowledge, only studies with (i) a dominant-negative mutant of cav3, cavDGV, and (ii) mutants of the NPC1 protein have shown a phenotype similar to AnxA6-expressing cells and revealed a link between intracellular cholesterol pools and caveolin localization.

Figure 5: Expression of an N-terminal deletion mutant or knock down of AnxA6 restores the cellular distribution of cholesterol and cav-1. A) The CHOanx6 cells were transfected with Anx6_{1–175}–myc (a and b), fixed, stained with filipin (5 μ g/mL) (a) and immunolabeled with anti-myc (b) as indicated. Arrows point at vesicular, cholesterol-containing structures (a). Loss of strong perinuclear filipin staining was observed in 50% of transfected cells in five independent experiments and quantified. The mean \pm SD of the relative filipin intensity in the perinuclear region is given. B) The CHOanx6 cells were transfected with Anx6_{1–175}–myc (a and b) and empty vector (c and d). Twenty-four hours after transfection, cells were fixed, permeabilized and immunolabeled with anti-cav-1 (a and c) and anti-myc (b and d) as indicated. As shown in the schematic diagram, myc-tagged Anx6_{1–175} contains the N-terminal signal peptide (blue) and two out of eight AnxA6-membrane-binding repeats (gray). Arrows point at the increased amount of cav-1 in the Golgi of non-transfected and vector-transfected CHOanx6 cells (a and c). Arrowheads point at reduced and unchanged cav-1 staining at the Golgi in Anx6_{1–175}-transfected (panel a) and control cells (panel c), respectively. Reduced cav-1 staining in the Golgi region upon Anx6_{1–175} expression was observed in 45–55% of transfected cells in five independent experiments. The fluorescence intensity of the cav-1 staining at the Golgi in Anx6_{1–175}-transfected versus non-transfected (panel a) and myc-transfected cells (panel c) were quantified. Values represent the mean \pm SD of 50 cells per cell line in each experiment ($n = 5$). ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test. Bar is 10 μ m. C) HeLa cells were transfected with RNAi targeting AnxA6 (RNAi–AnxA6) as described (15). Seventy-two hours after transfection, cells were fixed, permeabilized, immunolabeled with anti-annexin A6 (AnxA6), anti-cav-1 (cav-1) and anti-GM130 and stained with filipin as indicated. Arrowheads point at cells with downregulated AnxA6. Arrows show cells with unchanged AnxA6 expression levels and cav-1 staining (a and b) and vesicular filipin staining (c and d). In three independent experiments, reduced amounts of cav-1 in the Golgi region (a and b) and increased filipin staining at the PM (c and d) were observed in 60–70% of AnxA6-depleted cells. The fluorescence intensity of the cav-1 staining at the Golgi area in non-depleted/depleted cells was quantified. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test. Expression levels of AnxA6 in CHOanx6 (Anx6), CHOwt (wt) and HeLa \pm RNAi are given. Bar is 10 μ m. D) HeLa cells were transfected with RNAi–AnxA6 as above. Seventy-two hours after transfection, Golgi–caveolin was immunoprecipitated as described in Figure 4C. The relative amount of cav-1 in the Golgi was quantified and normalized to actin. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments with duplicate samples. **, $p < 0.01$ for Student's *t*-test. E) The PM cholesterol (μ g/mg cell protein) was determined as described above (Figure 2C) from HeLa cells transfected \pm RNAi–AnxA6 (in triplicate) and normalized to cellular protein. The mean \pm SD is given and is representative for two independent experiments.

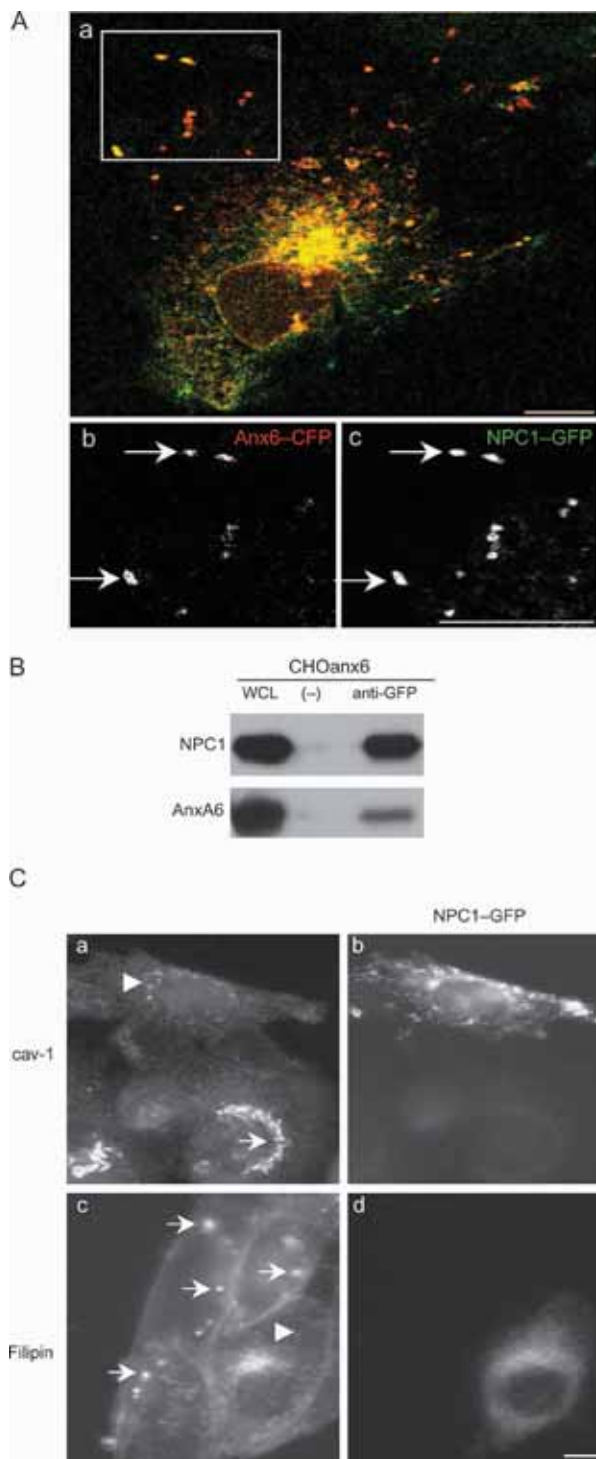


Figure 6: The NPC1 restores the cellular distribution of cholesterol and cav-1 in AnxA6-overexpressing cells. A) The COS-1 cells were cotransfected with AnxA6-CFP (b) and NPC1-GFP (c), fixed, and analyzed by confocal microscopy. The merged image, which is representative for 90% of cells analyzed, is shown in panel a. Arrows in the enlarged sections (panels b and c) point at colocalization of AnxA6-CFP and NPC1-GFP. Bar is 10 μ m. B) The CHOanx6 cells were transfected with NPC1-GFP. Twenty four hours after transfection, cell lysates (WCL) were immunoprecipitated with or without (-) a polyclonal antibody against GFP (anti-GFP) as described (15) and analyzed by Western blotting for the presence of NPC1-GFP and AnxA6. C) The CHOanx6 cells were transfected with NPC1-GFP (b and d), fixed, permeabilized and immunolabeled with anti-caveolin (a) and stained with filipin (c). Cav-1 and cholesterol accumulation (arrows) in the Golgi and LE (panels a and c) is lost upon overexpression of NPC1 (arrowheads in panels a and c). Bar is 10 μ m.

observed. As shown for AnxA6 in this study, cavDGV causes an intracellular accumulation of cholesterol in LE, a decrease in cholesterol synthesis and cell surface cholesterol, and a reduction in cholesterol efflux (21). Moreover, cavDGV-transfected cells show a significantly reduced number of caveolae. These changes in cavDGV-expressing cells result in dramatic alterations in cholesterol-dependent signaling events, such as the inhibition of the H-Ras-induced activation of Raf-1, and subsequent reduction of growth factor-dependent cell growth (36). Along these lines, we recently showed that AnxA6 inhibits the HDL-induced activation of H-Ras and Raf-1, which requires the binding of HDL to SR-BI in caveolae (23,50). In addition, AnxA6 reduces growth factor-induced Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and cell proliferation in CHO and A431 cells (51,52) (T. Grewal, R.J. Daly, C. Enrich, unpublished data). Thus, the mechanisms underlying the effects of cavDGV and AnxA6 on cholesterol and cav-1 transport could provide explanations for the role of caveolae in the regulation of signal transduction and cell growth.

The AnxA6 and cavDGV-expressing cells show a phenotype that partially resembles alterations in cholesterol transport observed in cells carrying a mutation in the NPC1 protein. The NPC1 is involved in cholesterol homeostasis and has been proposed to regulate caveolin expression and localization (20,22). Although the function of the NPC1 protein is not completely understood, NPC1-deficient cells accumulate cholesterol in LE/prelysosomes, delaying cholesterol transport to other caveolin-containing cellular compartments (20,33,37,53) such as the TGN and the PM. In NPC1 ko-cells, the total amount of caveolin at the PM remains unaffected as these cells develop compensatory mechanisms and increase the expression of cav-1 and cav-2 (20). Another member of the NPC1 protein family, NPC1L1, regulates cholesterol absorption at the cell surface of enterocytes. This process appears to involve cav-1 and AnxA2 (54-56), suggesting a cooperativity of some annexins in NPC- and caveolin-dependent cholesterol trafficking events (57). In conclusion,

Localization studies of N-terminal caveolin deletion mutants, including cavDGV, identified the C-terminal cytoplasmic domain being responsible for the targeting of caveolin to the Golgi (48,49). Akin the accumulation of endogenous cav-1 in the Golgi of AnxA6-expressing cells, the cavDGV mutant is also retained in the *cis*-Golgi complex. However, further striking similarities can be

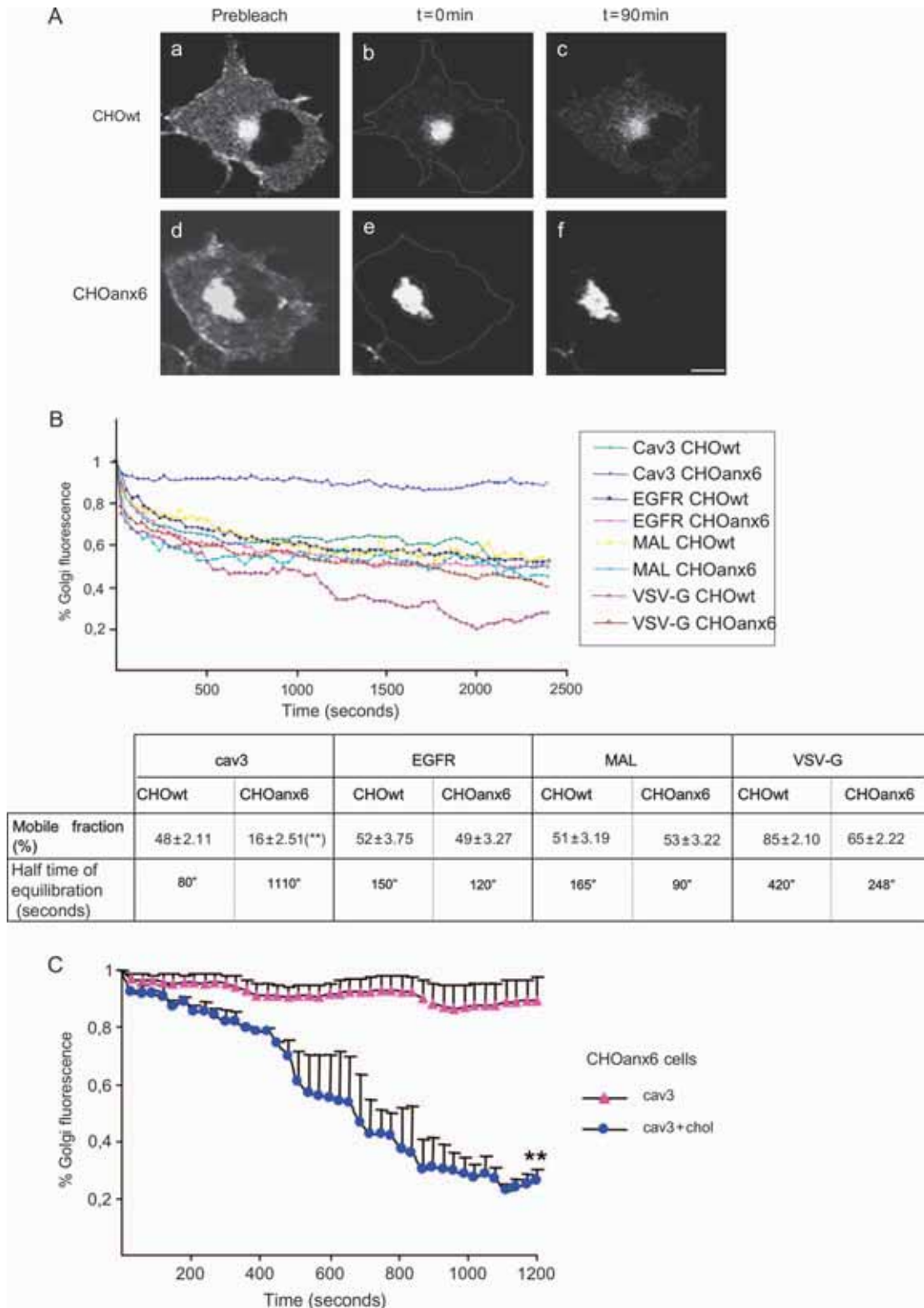


Figure 7: Legend on next page.

results obtained from studies on NPC1, cav-1 and AnxA6 indicate that the sequestration of cholesterol in the late endocytic compartment and cholesterol synthesis are potentially responsible for subsequent alterations in cav-1 localization/trafficking, cholesterol efflux and signaling events at the PM.

However, whereas caveolin and NPC1/2 are cholesterol-binding proteins and/or directly involved in cholesterol transport, it is believed that annexins, like AnxA6, do not directly interact with cholesterol. Up to date, only AnxA2 has yet been identified in a complex together with cav-1 and cholesterol (56,58). The AnxA6 is thought to predominantly bind to PS (1,58), whereas cholesterol associates preferentially with phosphatidylcholine. Despite these findings, we showed that accumulation of cholesterol stimulates the binding of AnxA6 to LE (14). Similarly, AnxA6 has been shown to relocalize to endocytic compartments in NPC1-deficient cells (59). Furthermore, AnxA6 colocalizes with cav-1 at the PM and in the endocytic compartments has been identified in Triton X-100 (TX-100) insoluble, caveolin- and cholesterol-enriched membrane fractions and translocates to cholesterol-rich membranes in different cell types, including CHO cells (1,17,60) (T. Grewal, K. Gaus, C. Enrich, unpublished data). This indicates that cholesterol modulates the membrane binding and subcellular distribution of AnxA6 (14), which in turn regulates cholesterol and cav-1 transport. Although at present, we cannot completely rule out a subset of AnxA6 proteins being targeted to cholesterol-rich membrane domains at the PM (1,17,60), thereby controlling PM cholesterol, caveolin distribution and caveolae formation, we currently favor several possibilities of AnxA6 acting in LE: AnxA6 could be involved in the formation of PS-rich domains in LE, thereby affecting the activity of proteins residing in neighboring cholesterol-rich domains that control cholesterol transport. Alternatively, the colocalization and co-immunoprecipitation of AnxA6 and NPC1 could indicate that AnxA6 directly downregulates NPC1 activity. This would ultimately control the amount of cav-1 and caveolae at the PM. In support of both models, we showed that the accumulation of Golgi-associated cav-1 in CHOanx6 can be overcome upon addition of exogenous cholesterol or overexpression of NPC1. The fact that AnxA6 is found in the Golgi in some cell types such as

hepatocytes and WIF-B cells (6,10) could indicate a direct involvement in cholesterol and cav-1 transport from this compartment. Nevertheless, currently available antibodies did not reveal significant amounts of AnxA6 in the Golgi of CHOanx6 cells.

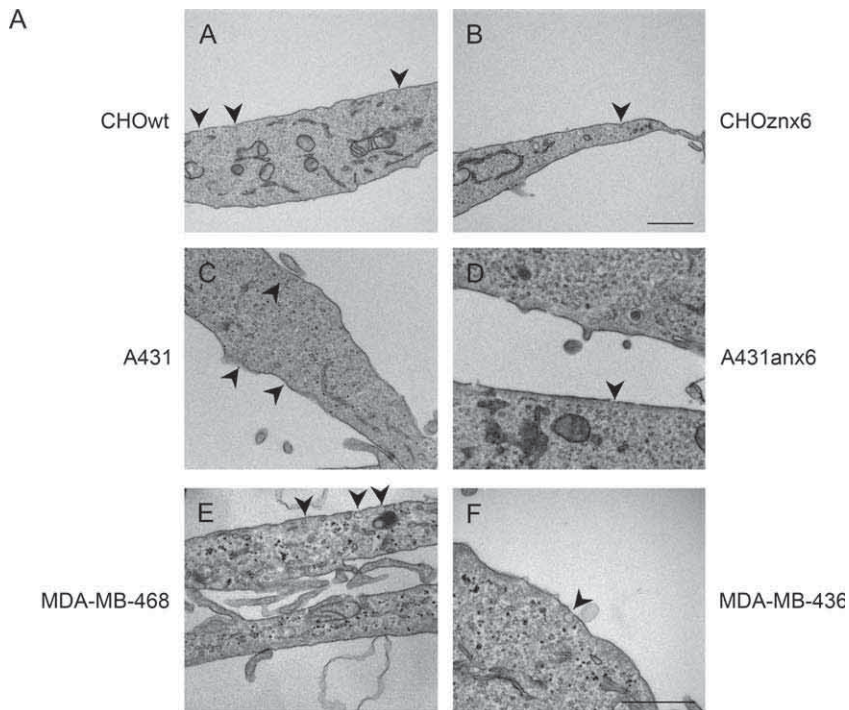
Recently, overexpression of late endosomal Rab proteins, in particular Rab9 and the recycling/exocytic Rab8, were shown to rescue the cholesterol accumulation in NPC1 mutant cells (42–44). The mechanisms linking NPC1 and Rab proteins are yet unclear, but Rab-dependent membrane transport seems to promote cholesterol export pathways from LE. Interestingly, RNAi experiments revealed that Rab9 is not essential for cholesterol export from LE in normal cells (45). Yet, accumulation of late endosomal cholesterol interferes with the activity cycle of Rab's (42,45) that requires their release from the membrane into the cytoplasm, and inhibition of Rab's blocks removal of cholesterol from LE (61). Thus, sequestration of Rab proteins in LE membranes may contribute to the cellular pathology of NPC-related disease. Future studies will have to clarify if high levels of AnxA6, similar to NPC1 mutations, interfere with the trafficking of late endosomal Rab proteins between their target membrane and the cytosol.

The AnxA6 and the secretory pathway

Data presented in this study suggest that sequestration of cholesterol in LE, possibly together with reduced cholesterol synthesis, in CHOanx6 cells reduces the activity of cholesterol-dependent secretory pathways thereby contributing to an accumulation of cav-1 in the Golgi. This is supported by several studies demonstrating that cholesterol is a limiting factor for the formation of vesicles in the secretory pathway. Both constitutive and regulated formation of secretory vesicles requires cholesterol. Depletion of cholesterol inhibits the formation of secretory vesicles from the TGN (62). Vice versa, increased cellular cholesterol levels induce pronounced vesiculation and dispersal of Golgi-derived vesicles (63). In this fashion, Stüven et al. (38) showed that the cholesterol levels at the Golgi complex must be precisely balanced to allow protein transport to occur.

One candidate protein potentially inhibited by AnxA6 and involved in vesiculation and tubulation events regulating

Figure 7: Annexin A6 modulates the export of caveolin from the Golgi. A) The CHOwt and CHOanx6 cells were transfected with GFP-cav3 and imaged before and after photobleaching of the entire cell except for the Golgi region. The loss of fluorescence signal (iFRAP) from the Golgi was monitored by time-lapse microscopy. To avoid fluorescence recovery from the novo synthesis, cells were treated with Cyhx. Representative Golgi images from CHOwt (a–c) and CHOanx6 (d–f) cells show GFP-cav3 localization before (a and d) and after bleaching at $t = 0$ min (b and e) and $t = 90$ min (c and f), respectively. A representative image from four independent experiments is shown. Bar is 10 μ m. B) Quantification of Golgi iFRAP kinetics of GFP-cav3, EGFR-GFP, GFP-MAL and VSV-G-GFP in transfected CHOwt and CHOanx6 cells. Images were taken every 30 seconds (see *Materials and Methods*, $t = 0$ –2500 seconds). Kinetic parameters (mobile fraction in % \pm SD and half time of equilibration in seconds) for each protein in both cell lines from four independent experiments are given. **, $p < 0.01$ for Student's t -test. C) Quantification of Golgi iFRAP kinetics of CHOanx6 cells transfected with GFP-cav3 as described in A and incubated \pm cholesterol for 20 min as indicated. Images were taken every 30 seconds. The amount of the mobile fraction \pm SD (%) in the Golgi is shown.



B

	Average number of caveolae/section	Reduction in the number of caveolae (%)
CHOwt	3.7±0.6	
CHOanx6	1.4±0.8	61.4
A431	3.1±0.7	
A431anx6	1.2±0.5	60.8
MDA-MB-468	3.4±1.1	
MDA-MB-436	1.6±0.7	55.0
CHOwt+ cholesterol	3.2±0.7	
CHOanx6+ cholesterol	3.3±0.6	

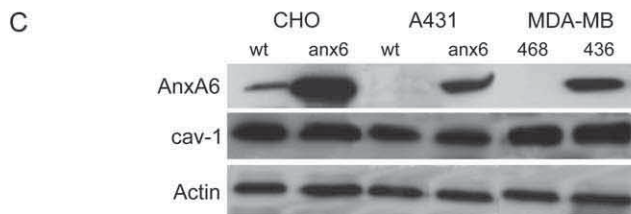


Figure 8: High AnxA6 expression levels correlate with a reduced number of caveolae at the cell surface.

A) Monolayers of cells with low (CHOwt, A431wt and MDA-MB-468; panels a, c and e) and high (CHOanx6, A431anx6 and MDA-MB-436; panels b, d and f) AnxA6 expression levels (see Western blot analysis in C), or CHOwt and CHOanx6 cells preincubated with cholesterol were fixed, collected, embedded in Spurr, and ultrathin sections were analyzed by electron microscopy. Bar is 1 μm in panels a and b and 0.5 μm in c, d, e and f, respectively. **B)** Grids were systematically screened, and the number of caveolae (arrowheads in A) in each cell line was determined in random fields of sections from images acquired at the same magnification (25 000 \times). For each cell line and condition, over 50 cells were examined with an estimated total lineal surface of 500 μm^2 . The average number of caveolae/section and the reduction in the number of caveolae (%) from three independent experiments are given. **C)** Expression levels of AnxA6, cav-1 and actin in the various cell lines analyzed above are given.

membrane traffic and cargo export from the Golgi could be the cholesterol-dependent cytoplasmic phospholipase A2 (cPLA₂). The cPLA₂ translocates to the Golgi apparatus in response to increased cellular cholesterol levels (63), and

cPLA₂ activity is cholesterol sensitive (64). Consistent with this hypothesis, we determined a reduced cPLA₂ activity in CHOanx6 cells that can be rescued by addition of exogenous cholesterol (unpublished data).

Similarly, the inhibitory effect of other annexins, such as AnxA1, AnxB1 and AnxA5, on cPLA₂ activity has also been demonstrated (65). This could lead to reduced vesiculation from the Golgi that would downregulate the availability of newly synthesized cholesterol acceptors, such as cav-1, for vesicular or non-vesicular export of cholesterol from LE (66). Besides, annexins have also been related to other aspects of the secretory pathway (1). The AnxA2 is involved in Ca²⁺-regulated exocytosis (4). The AnxA13b associates with sphingolipid and cholesterol-rich domains of the TGN that are required for the budding to the apical PM (67). However, other factors like dynamin (63), the actin cytoskeleton (68) and calmodulin (69) are also involved in this process suggesting that multifactorial protein–lipid interactions facilitate Golgi vesiculation. From these observations, one could envisage that individual annexins modulate various steps of the secretory pathway through different and possibly cholesterol-dependent mechanisms.

The role of AnxA6 in the secretory pathway has not been extensively investigated, and several reports suggested, in agreement with this study, an inhibitory role in the secretory process. First, Zaks and Creutz showed that AnxA6 inhibits vesicle aggregation and fusion, mediated by AnxA2 and AnxA7 (70). Second, AnxA6 is found in non-lactating breast epithelial cells but is undetectable in similar sections taken from lactating breast (71). Finally, hepatocytes expressing high levels of AnxA6 only contain a small number of caveolae (72, 73). As proposed by van Duyl et al. (74), the interaction of caveolin and cholesterol may be fundamental to the generation of caveolae. Defects in the export of caveolin from the Golgi because of the loss of Golgi exit information, exposure of retention signals or conformational changes can contribute to regulate the number of caveolae. Here, we show that alterations in cholesterol transport caused by the expression of AnxA6 result in a slow export of cav-1 from the Golgi. Hence, it is tempting to speculate that this process could include availability of cholesterol for NPC1, cav-1 oligomerization and the delivery of cholesterol to the PM. It is plausible that in certain epithelial cells, including hepatocytes that express abundant amounts of NPC1 (75), and AnxA6 (5,6,10), their interaction contributes to regulate the amount of caveolin/caveolae and cholesterol at the cell surface.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Nutrient Mixture Ham's F-12, DMEM, RPMI-1640, filipin, Cyhx and water-soluble cholesterol, saponin, U18666A and CD were from Sigma. Percoll was from Invitrogen. Protein A/G–Sepharose, [³H]-Chol and paraformaldehyde (PFA) was from Electron Microscopy Sciences, and Mowiol was from Calbiochem. Lipoprotein-deficient fetal calf serum (FCS) was prepared by preparative ultracentrifugation as described (76). High-density lipoproteins (HDL₃, density 1.125–1.21 g/mL) were isolated from the plasma of normolipidemic volunteers by sequential density gradient ultracentrifuga-

tion as described (50). After preparation, HDL₃ was stored in KBr at 4°C and dialyzed extensively against PBS before use. The construction of YFP-caveolin-1 (YFP-cav1), GFP-cav3 and EGFR (EGFR-GFP) expression vectors have been described previously (40,77). The GFP-tagged VSV-G (VSV-G-GFP), Rab7 (Rab7-GFP), MAL (GFP-MAL) and NPC1 (NPC1-GFP) were kindly provided by Dr J. Lippincott-Schwartz (NIH, Bethesda, MD, USA), Dr A. Sorkin (University of Colorado, Denver, CO, USA), Dr M.A. Alonso (Centro de Biología Molecular 'severo Ochoa', Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain) and Dr P.G. Pentchev (NIH, Bethesda, MD, USA), respectively. For the construction of expression vectors encoding CFP-tagged AnxA6 (Anx6-CFP) and myc-tagged AnxA6 deletion mutant Anx6_{1–175} (7) (Anx6_{1–175}-myc), rat full length and a 542 bp *HindIII*–*Asp1* AnxA6 fragment containing coding sequences from pos. +1 to pos. +526 were cloned into pECFP-C1 (Clontech) and pcDNA3.1A-myc-his (Invitrogen), respectively. For the construction of GFP-tagged AnxA6 (GFP-Anx6), a 733 bp EGFP fragment was isolated from pEGFP (BD Transduction Laboratories) and cloned immediately upstream the N-terminus of rat AnxA6 in pcDNAanx6 (8). The RNAi targeting human AnxA6 and GFP were from Santa Cruz Biotechnology. Polyclonal anti-caveolin (C13630), mouse anti-caveolin (PM-associated cav-1) (C43420), mouse anti-GM130, mouse anti-TGN38, mouse anti-GMAP210 were from BD Transduction Laboratories. Polyclonal anti-SR-BI and anti-actin were from Novus and MP Biomedicals, respectively. Monoclonal anti-LBPA was kindly provided by Dr J. Gruenberg (University of Geneva, Geneva, Switzerland). Mouse anti-cav-1 (Golgi-associated cav-1) (03-76000) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Zymed Laboratories. Mouse anti-myc (9E10), rabbit anti-Rab5, rabbit anti-Rab7 and mouse anti-HRas were from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti- α -1 Na⁺/K⁺ ATPase was from Upstate, mouse anti-KDEL-receptor was from Stressgen Bioreagents, and rabbit anti-GFP was from Abcam. Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride were from Molecular Probes Inc.

Cell culture

The CHO cells were grown in Ham's F-12, A431, HeLa and COS-1 cells in DMEM, MDA-MB-468 and MDA-MB-436 in RPMI-1640 together with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) at 37°C, 5% CO₂. To generate stable AnxA6-overexpressing CHO cells, 1 \times 10⁶ cells were transfected with 10 μ g of pcDNAanx6 and the FUGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals). G418 (1 mg/mL) was added 24 h after transfection. After 2 weeks, G418-resistant colonies were isolated and examined for expression of AnxA6 by Western blotting and immunofluorescence (7,8,14). As described previously (8), CHOanx6 cells showed no obvious morphological alterations of the endocytic compartment (Rab5, EEA1, Rab11 or the recycling of transferrin), lysosomes, Golgi (GM130) or the endoplasmic reticulum by immunofluorescence and electron microscopy (data not shown).

To generate the AnxA6-expressing A431 cell line, A431 cells were transfected with pcDNAanx6 and selected as described above (15). For the transient transfection of expression vectors encoding Anx6, Anx6_{1–175}, cav-1, cav-3, Rab7 and NPC1, 1 \times 10⁵ CHOwt, CHOanx6 or COS-1 cells were transfected with 1.5 μ g Qiagen-purified DNA and 4 μ L of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in OptiMEM (Gibco BRL) according to the instructions of the manufacturer. For the intracellular accumulation of cholesterol, cells were treated for 24 h with U18666A (2 μ g/mL) as described (14).

Cholesterol measurements and Cyhx/cholesterol treatments

The amount of cholesterol in whole cell lysates (total cholesterol) and PM, EE and LE fractions were determined using the Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit (Molecular Probes) as described (16). To determine the amount of cholesterol in PM fractions, 1 \times 10⁷ CHOwt and CHOanx6 cells were washed twice in 0.25 M sucrose, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 20 mM Tris–HCl, pH 7.8 plus protease inhibitors, collected, lysed and centrifuged. The postnuclear supernatant (PNS) was layered on top of 10 mL of 30% Percoll and centrifuged at 84 000 \times g for 30 min in

a Beckman 70.1 TI rotor as described (15). Fractions (1 mL) were taken from top to bottom, and the amount of cholesterol in 50 μ L of each fraction was determined and normalized to total protein (78). To identify the PM-containing fractions in the middle of the gradient, aliquots of each fraction were analyzed for the distribution of Ras by Western blotting (15) (see also Figure S1B).

For the determination of cholesterol in LE and EE, $4\text{--}6 \times 10^7$ CHOwt and CHOanx6 cells were homogenized by 10 passages through a 22-gauge needle, and endosomes were separated on sucrose gradients as described (8,14). In brief, the cell homogenate was centrifuged, and the PNS was brought to a final 42% sucrose (w/v) concentration. Then 35% sucrose, 25% sucrose and homogenization buffer were poured stepwise on top of the PNS. The gradient was centrifuged for 90 min at $155\,000 \times g$. After centrifugation, 1 mL fractions were collected from top to bottom, and fractions representing EE and LE were pooled. Before further analysis, the purity of fractions was routinely confirmed by Western blot analysis with PM, EE and LE markers and β -hexosaminidase assays (8) (see also Figure S1A). For the fluorometric quantification of cholesterol, 25 μ L of LE and EE together with cholesterol standards (Precinorm™, Precipath™; Roche Molecular Biochemicals) were incubated in 24-well plates according to the instructions of the manufacturer, and fluorescence was detected using Fluorocount™ (Packard Instrument Co.).

To determine cholesterol levels in the Golgi apparatus, a modified method of Balch and coworkers (79) described in detail by Brügger et al. (80) was used to isolate Golgi membrane fractions from CHO cells. All procedures were carried out at 4°C. In brief, $4\text{--}5 \times 10^9$ cells were harvested, washed twice with PBS, twice with breaking buffer (BB) (0.25 M sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and resuspended in four volumes of BB. Cells were homogenized by passing 25 times through a ball-bearing homogenizer (Balch homogenizer), which disrupts EE and LE, but not Golgi vesicles, and brought to a sucrose concentration of 37% (w/w) by addition of 62% (w/w) sucrose. Fourteen milliliters of sample was overlaid with 15 mL 35% (w/w) sucrose and 9 mL 29% (w/w) sucrose (in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and centrifuged for 2.5 h at $82\,700 \times g$. Typically, 2 mL of a Golgi-enriched membrane fraction was recovered at the 35–29% interphase. The purity of the isolated Golgi membranes was confirmed by Western blot analysis with Golgi (TGN38, GM130 and GMAP210), EE (Rab5), LE (Rab7), PM (Na⁺K⁺ ATPase) and endoplasmic reticulum (KDEL) markers (Figure S1C). To determine cholesterol levels, 500 μ g of purified Golgi fraction were mixed with 0.3 mL KOH (33%), 0.3 mL of ethanol (95%) and incubated at 60°C for 15 min as described (81). After addition of 10 mL of hexane and 3 mL of distilled water, samples were mixed, and 4 mL of the organic hexane phase were, together with cholesterol standard (0–60 mg in ethanol), evaporated under nitrogen. Two milliliters of freshly prepared ophtaldehyde solution (0.5 mg/mL in glacial acetic acid) and after 5 min, 1 mL of concentrated sulfuric acid, were added. After 10 min, the absorbance was read at 550 nm.

For the determination of cholesterol synthesis, 4×10^5 CHOwt and CHOanx6 cells (in triplicate) were grown in media containing 5% lipoprotein-deficient FCS and incubated overnight with 1 μ Ci/mL [¹⁴C]-acetic acid as described in Du et al. (35). Cells were washed twice in buffer C (5 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl) and 0.2% BSA, twice in buffer C alone and lysed in 1 mL of 0.1 M NaOH. Then cells were saponified with 1 mL of 75% (w/v) KOH, 2 mL ethanol, 20 μ M butylated-hydroxytoluene, 20 μ M EDTA at 70°C for 1 h. After cooling, nonsaponifiable lipids were extracted into hexane (3 \times 3 mL) and evaporated to dryness. Lipid extracts were redissolved in 100 μ L hexane and separated by TLC using 4% (w/v) silver-coated Silica Gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) and a mobile phase of heptane:ethyl acetate (2:1, v/v). This method separates cholesterol from its major precursors including desmosterol. For visualization and quantification, TLC plates were exposed to X-ray film, quantified using ImageJ (NIH) and normalized for total cellular protein (78).

To inhibit protein synthesis in some experiments, 10 μ g/mL Cyhx (in 100 mM Hepes, pH 7.5) was added to the media for 90 min. For cholesterol addition, cells were incubated with 30 μ g/mL cholesterol and premixed at

room temperature for 30 min in DMEM by gentle agitation. When Cyhx and cholesterol were used in combination, both were dissolved in DMEM. The Cyhx completely inhibited protein synthesis as judged by the lack of any detectable fluorescence after expression of GFP in the presence of Cyhx for 24 h (unpublished data).

The RNAi-mediated inhibition of AnxA6

HeLa cells ($1\text{--}2 \times 10^6$) were transfected in 2 mL medium with 10 nM AnxA6 small interfering RNA (siRNA) and 6 μ L of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer as described (15). Experiments were conducted 72 h after transfection. The GFP siRNA was used as a negative control.

Efflux experiments

To measure cholesterol efflux from LE, cells were treated for 24 h \pm U18666A (2 μ g/mL) in the presence of [³H]-Chol (2×10^6 c.p.m./mL). To remove non-internalized [³H]-Chol, cells were washed extensively, followed by incubation in serum-free media \pm 1% CD for 120 min. Then, the radioactivity in the media and cell lysate was collected, determined by scintillation counting (82) and normalized to total cellular protein (78). The ratio of released and cell-associated radioactivity was determined and is given in per cent. The background efflux obtained from U18666A-treated CHOwt and CHOanx6 cells was 0.8–1.2% (equivalent to $5.0\text{--}7.0 \times 10^5$ c.p.m./mg cell protein), respectively.

For the determination of HDL₃-induced cholesterol efflux, cells were labeled with radioactive LDL. To label LDL with [³H]-Chol, 100 μ L of [³H]-Chol (3.7 Mbq) was dried under liquid nitrogen, resuspended in 100 μ L of DMEM + 2% BSA and incubated overnight with 3–5 mg LDL in PBS and 10 mM EDTA at 37°C. Non-incorporated [³H]-Chol was removed by PD10 gel chromatography (Amersham Biosciences). Then $2\text{--}5 \times 10^5$ cells (in triplicate) were incubated overnight with [³H]-Chol-LDL (1×10^6 c.p.m./mL), and non-internalized radioactivity was removed by extensive washing with PBS. To determine HDL₃-induced cholesterol efflux, cells were incubated in Ham's F12/0.1% BSA \pm 5, 50 or 100 μ g/mL HDL₃ for 8 h. The media were harvested, cells were lysed in 0.1 N NaOH, and the total cellular protein was determined (78). The radioactivity in the media and cell lysate was determined by scintillation counting (82). The ratio of released and cell-associated radioactivity was determined and is given in per cent as above.

Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips and fixed with 4% PFA, washed, permeabilized with 0.1% saponin and incubated with primary and secondary antibodies or filipin (5 μ g/mL) as described elsewhere (21). At last, samples were mounted in Mowiol, and the cells were observed using an oil-immersion Plan-Apo63x/1.4 objective in an Axio-plan or Axiovert 200M Zeiss microscope (Zeiss). In the Axio-plan microscope, the images were captured with an AxioCam HRc camera and were digitally treated with AxioVISION 3.1 software. In the 200M microscope, the images were captured with a Photometrics Cool Snap HQ camera controlled by SLIDEBOOK 3.0.10.5 software (Intelligent Imaging Innovation). Image analysis was performed with ADOBE-PHOTOSHOP 7.0 software. To quantify the fluorescence intensity of cav-1 or cholesterol (filipin) staining, experiments were performed in parallel, and images were captured using identical contrast and exposure times. Utilizing NIH image (ImageJ), the area to be quantified (e.g. Golgi for cav-1) was selected, the pixel intensity was determined, and the average staining intensity (50–150 cells per cell line in –three to five experiments, respectively) was calculated. For the quantification and size determination (nm \varnothing) of LBPA-positive vesicles, 100 cells per cell line per treatment in three independent experiments were analyzed.

Different experimental set-ups were used for the imaging of CFP- and GFP-cotransfected cells and for filipin in GFP-transfected cells (see below). For the imaging of CFP-Anx6 and GFP-Rab7 in COS-1 cells, a Leica TCS-SL spectral confocal microscope with 63 \times oil immersion objective lens (NA 1.32) was used. To resolve these two fluorophores, the following

configuration was used in a sequential mode (for CFP, 458 nm laser line; excitation beam splitter double dichroic 458/514 nm, emission detection range 465–485 nm; for GFP, 488 nm laser line; excitation beam splitter triple dichroic 488/543/633 nm, emission detection range 500–550 nm).

Images of filipin and GFP-labeled cells were acquired using a Leica DM16000B epifluorescence microscope equipped with a Leica DFC 350 FX monochroma camera and 100 \times oil immersion objective lens (NA 1.4). Filipin was imaged using a 360-nm filter cube (40-nm bandpass) excitation filter (cross-excitation of GFP is null or unappreciated), 400-nm longpass dichromatic filter and 425-nm (longpass) emission filter. The GFP was imaged using a 480-nm filter cube (40-nm bandpass) excitation filter (filipin cannot be excited by 460–500 nm), 505-nm longpass dichromatic filter and 527-nm (30-nm bandpass) emission filter. This, together with the sequential acquisition of images, made it possible to discard fluorescence bleed through or cross excitation (measured using single labeled samples).

Photobleaching experiments and time-lapse confocal microscopy

The iFRAP experiments were carried out using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems) with Argon and HeNe lasers attached to a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with an incubation system with temperature and CO₂ control. For visualization of GFP, images were acquired using 63 \times oil immersion objective lens (NA 1.32; 488 nm laser line; excitation beam splitter RSP 500, emission range detection 500–600 nm). The confocal pinhole was set at 2–3 Airy units to minimize changes in fluorescence because of GFP-tagged proteins moving away from the plane of focus. The whole cytoplasm, except the Golgi of a GFP-fusion protein-transfected cell, was photobleached using 50–80 scans with the 488 nm laser line at full power. Prebleach and postbleach images were monitored at 30-second intervals for 90 min. The excitation intensity was attenuated down to approximately 5% of the half laser power to avoid significant photobleaching. The relative loss of fluorescence intensity in the unbleached region of interest and overall photobleaching in the whole cell during the time series were quantified using IMAGE PROCESSING LEICA CONFOCAL Software. Background fluorescence was measured in a random field outside of the cells. Fluorescence correction, normalization and kinetic parameters (mobile fraction and half time of equilibration) of GFP-tagged proteins were calculated according to Rabut and Ellenberg (83).

Immunoprecipitation and Western blotting

For the immunoprecipitation of Golgi-associated cav-1, the method previously described in Pol et al. (40) was used and 1 \times 10⁷ CHOwt, CHOanx6, A431wt and HeLa cells were extracted with 1 mL of ice-cold 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and protease and phosphatase inhibitors, supplemented with 0.1% TX-100. After removal of cell debris, the amount of extracted protein was quantified (78). Two micrograms of anti-caveolin (Golgi-associated cav-1) was mixed with 120 μ g of sample for 2 h at 4°C and antibody/caveolin complexes were collected with protein A/G-Sepharose and separated on 12% SDS-PAGE (see below).

For the co-immunoprecipitation of AnxA6 and NPC1, CHOanx6 were transfected with GFP-NPC1, and immunoprecipitation of AnxA6 was performed as described (15). Cells were washed twice in 5 mL of homogenization buffer (HB) (50 mM Tris, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 8.0) and scraped in 1 mL of lysis buffer (HB plus 5 mM NaF, 0.2 mM Na₂VO₃, 0.1% (v/v) Triton-X-100 and protease inhibitors). The protein content was determined, and then 500–800 μ g of cell lysate was incubated with 2 μ g of anti-AnxA6 (rabbit) and control antibodies for 120 min at 4°C. Then 6 μ L of Protein G Sepharose (Pharmacia) was added, and samples were incubated for 45 min at 4°C, centrifuged and washed three times in buffer HB. The immunoprecipitates were pelleted, washed and separated by 12% SDS-PAGE.

After transfer to Immobilon membranes, AnxA6, cav-1 and NPC1 were detected using polyclonal antibodies, respectively, followed by HRP-

conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence detection (Amersham).

Electron microscopy

Cell monolayers on 10-cm dishes were rinsed with PBS and fixed with 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 h at room temperature. Cells were gently scraped, collected and pelleted by centrifugation (5 min at 500 \times g). After three rinses in 0.1 M phosphate buffer, pellets were postfixed in 1% OsO₄–0.8% FeCNK for 90 min. Finally, samples were embedded in Spurr (Sigma), and ultrathin sections were analyzed with a Jeol1010 electron microscope. Grids were systematically screened, and the number of caveolae (non-coated 50–80 nm surface flask-shaped membrane invaginations) were determined in random fields of sections from images acquired at the same magnification (25 000 \times). For each cell line and condition, over 50 cells were examined with an estimated total lineal surface of 500 μ m. Similar results were obtained in three independent experiments.

Acknowledgments

We thank Dr Nuria Cortadellas and Anna Bosch [Serveis Científicotècnics (SCT), Universitat de Barcelona] for their excellent assistance in electron and confocal microscopy. This study was supported by the grants to C. E. [(BMC2003-04754, BFU2006-01151/BMC, GEN2003-20662 and fellowship PR-2006-0142 from the Ministerio de Educación y Ciencia, (MEC), Spain)] and T. G. (Gretl Raymond Foundation, G04S1650 and G06S2559 from the National Heart Foundation of Australia and RM02987 from the Cure Cancer Australia Foundation). F. T. is supported by Ramón y Cajal Research Program, MEC, Spain.

Supplementary Materials

Figure S1: (A–C) Western blot analysis of sucrose gradients (A), Percoll gradients (B) and Golgi membrane fractions (C) from CHOwt cells. A)

Early and late endosomal membrane fractions (20 μ g protein/fraction) are characterized by the presence of Rab5 and Rab7 and are well separated from the bulk membrane (Na⁺/K⁺ ATPase) at the bottom of the gradient (8,16). B) The PM-enriched membrane fractions (20 μ g protein/fraction) are characterized by the enrichment of Ras (15). Incubation of cells overnight with [³H]-Chol predominantly labels the Ras-containing fractions 4 and 5. C) Analysis of Golgi membrane fractions (Golgi; 100 μ g protein) and whole cell lysates (WCL, 100 μ g protein) shows the enrichment of Golgi markers GM130, TGN38 and GMAP210 (79,80). No significant amounts of EE, LE and PM markers (Rab5, Rab7, KDEL and Na⁺/K⁺ ATPase) were detected. Gradients from CHOanx6 cells showed similarly well separated endosomal, PM and Golgi membrane fractions (not shown).

Figure S2: Cholesterol efflux is decreased in AnxA6-expressing cells.

A) The CHOwt and CHOanx6 were incubated with [³H]-Chol (2 \times 10⁶ c.p.m/mL) for 24 h. Cells were washed with PBS and incubated \pm 1% CD for 120 min. The ratio of released and cell-associated radioactivity was determined, normalized to total cell protein, and the amount of efflux is given in per cent. The background efflux obtained from CHOwt and CHOanx6 cells was equivalent to 2.0–8.0 \times 10⁵ c.p.m/mg cell protein, respectively. Mean values \pm SD of three independent experiments with triplicate samples are given. *, p < 0.05 for Student's *t*-test. Alternatively, CHOwt and CHOanx6 cells were labeled overnight with [³H]-Chol-LDL (1 \times 10⁶ c.p.m/mL), and efflux was induced with 5–100 μ g/mL HDL₃ for 8 h as indicated. The percentage of [³H]-Chol efflux was calculated as described above and represents the mean \pm SD of three independent experiments with triplicate samples. B) The A431wt, A431anx6, BT20wt

(express low amounts of AnxA6, unpublished data) and BT20anx6 were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ U18666A together with [^3H]-Chol (2×10^6 c.p.m./mL) for 24 h. Cells were washed with PBS and incubated $\pm 1\%$ CD for 120 min. The ratio of released and cell-associated radioactivity was determined, normalized to total cell protein, and the amount of efflux is given in per cent. The background efflux in U18666A-treated cells was equivalent to $3.0\text{--}6.0 \times 10^5$ c.p.m./mg cell protein, respectively. Mean values \pm SD of three independent experiments with triplicate samples are given. **, $p < 0.01$ for Student's *t*-test. C) CHOwt and CHOanx6 cells (4×10^5) (in triplicate) were grown in media containing 5% lipoprotein-deficient FCS and incubated overnight with 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [^{14}C]-acetic acid. Lipids were extracted, and newly synthesized cholesterol was separated from its major precursors including desmosterol by TLC as described (35). For visualization and quantification, TLC plates were exposed to X-ray film, and the amount of radioactive cholesterol was quantified using ImageJ (NIH). Relative intensities were normalized for total cellular protein (78). The mean values for a representative experiment are given. In two independent experiments with triplicate samples, an overall reduction of cholesterol synthesis in CHOanx6 cells by $36 \pm 18\%$ ($p < 0.05$) was observed.

Figure S3: Caveolin accumulates in a perinuclear compartment of AnxA6-expressing cells. A) The CHOwt (a) and CHOanx6 (b) cells grown on coverslips were fixed, permeabilized and stained with polyclonal anti-caveolin. Arrowheads point at the perinuclear accumulation of caveolin in CHOanx6 cells. Images are representative for 90% of cells analyzed. The fluorescence intensity of the perinuclear cav-1 staining in CHOwt and CHOanx6 cells was quantified. Values represent the mean \pm SD of five independent experiments with 50 cells per cell line in each experiment. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test. B) The CHOwt cells (a and b) were transiently transfected with GFP-Anx6 and stained with polyclonal anti-caveolin. Arrowheads point at the accumulation of cav-1 in the perinuclear Golgi region of the transfected cell. The protein levels of cav-1, GFP-Anx6 and endogenous AnxA6 in transfected (+) and non-transfected (-) CHOwt cells are given. C) Western blot analysis of cav-1, Scavenger receptor BI (SR-BI), H-Ras and AnxA6 from total cell lysates of CHOwt and CHOanx6 cells.

Figure S4: Cholesterol restores the cellular distribution of cav-1 in CHOanx6 cells. The CHOwt cells (a and c) and CHOanx6 cells (b and d) were grown on coverslips, incubated \pm cholesterol for 90 min, fixed, permeabilized and immunolabeled with anti-caveolin as indicated. Images are representative for three independent experiments. Arrows point at the localization of endogenous cav-1 at the PM in CHOwt and CHOanx6 cells upon addition of cholesterol (c and d). Bar is 10 μm . E) The CHOwt (lanes 1–4) and CHOanx6 cells (lanes 5–8) were incubated with cholesterol and Cyhx for 90 min as indicated. Then the Golgi-associated cav-1 was immunoprecipitated and analyzed by Western blotting as described (40). The amount of immunoprecipitated cav-1 from the Golgi was quantified and normalized to actin. The relative amount of cav-1 in the Golgi is given and is representative for three independent experiments. ***, $p < 0.001$ for Student's *t*-test.

Figure S5: Cholesterol restores the ability of CHOanx6 cells to re-establish cholesterol sorting events of VSV-G. The CHOwt cells (a and c) and CHOanx6 cells (b and d) were grown on coverslips and transfected with VSV-G-GFP. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated \pm cholesterol for 90 min, fixed, permeabilized and analyzed by epifluorescence microscopy. The arrow points at the perinuclear localization of GFP-tagged VSV-G in CHOanx6 cells upon addition of cholesterol (d). Results are representative for three independent experiments. Bar is 10 μm .

Supplemental materials are available as part of the online article at <http://www.blackwell-synergy.com>

References

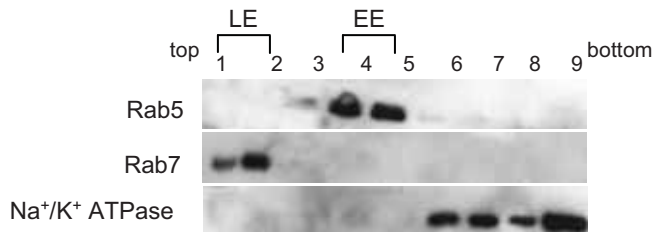
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:449–461.
- Grewal T, Enrich C. Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex. *Bioessays* 2006;28:1211–1220.
- Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197:63–93.
- Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002;82:331–371.
- Ortega D, Pol A, Biermer M, Jackle S, Enrich C. Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci* 1998;111:261–269.
- Jackle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Groger I, Greten H, Windler E. Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J Biol Chem* 1994;269:1026–1032.
- Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jackle S, Enrich C. Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 2001;269:13–22.
- Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jackle S. Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem* 2000;275:33806–33813.
- Kamal A, Ying Y, Anderson RG. Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 1998;142:937–947.
- Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jackle S, Enrich C. Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. *Exp Cell Res* 2000;257:33–47.
- Pol A, Ortega D, Enrich C. Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes. *Biochem J* 1997;327:741–746.
- Seemann J, Weber K, Osborn M, Parton RG, Gerke V. The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca^{2+} and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell* 1996;7:1359–1374.
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 1994;269:32194–32200.
- de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T. Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 2002;277:32187–32194.
- Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells L, de Diego I, Kirchhoff MF, Hughes WE, Heeren J, Rye KA, Rinninger F, Daly RJ, Pol A, Enrich C. Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* 2005;24:5809–5820.
- Massey-Harroche D, Mayran N, Maroux S. Polarized localizations of annexins I, II, VI and XIII in epithelial cells of intestinal, hepatic and pancreatic tissues. *J Cell Sci* 1998;111:3007–3015.
- Babiychuk EB, Draeger A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca^{2+} -regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 2000;150:1113–1124.
- Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE. Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J Cell Biol* 1994;124:301–306.
- Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol* 1999;19:8028–8032.
- Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA. Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol

- transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res* 2002;43:579–589.
21. Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 2001;152:1057–1070.
 22. Ikonen E, Parton RG. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic* 2000;1:212–217.
 23. Rentero C, Evans R, Wood P, Tebar F, Vila de Muga S, Cubells L, de Diego I, Hayes TE, Hughes WE, Pol A, Rye KA, Enrich C, Grewal T. Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells. *Cell Signal* 2006;18:1006–1016.
 24. Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 1994;13:1287–1296.
 25. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992;70:715–728.
 26. Sokol J, Blanchette-Mackie J, Kruth HS, Dwyer NK, Amende LM, Butler JD, Robinson E, Patel S, Brady RO, Comly ME et al. Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* 1988;263:3411–3417.
 27. Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, Ory DS. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem* 2003;278:25517–25525.
 28. Puri V, Jefferson JR, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *J Biol Chem* 2003;278:20961–20970.
 29. Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, Sharma DK, Holicky EL, Marks DL, Walkley SU, Pagano RE. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *Faseb J* 2005;19:1558–1560.
 30. Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HF, Slot JW, Geuze HJ. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 2003;4:222–231.
 31. Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 1992;13(Suppl. B):34–36.
 32. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11041–11048.
 33. Wojtanik KM, Liscum L. The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* 2003;278:14850–14856.
 34. Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 1996;271:21604–21613.
 35. Du X, Kristiana I, Wong J, Brown AJ. Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol Biol Cell* 2006;17:2735–2745.
 36. Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999;1:98–105.
 37. Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev* 2006;86:1237–1261.
 38. Stuenkel E, Porat A, Shimron F, Fass E, Kaloyanova D, Brugger B, Wieland FT, Elazar Z, Helms JB. Intra-Golgi protein transport depends on a cholesterol balance in the lipid membrane. *J Biol Chem* 2003;278:53112–53122.
 39. Sandhoff R, Brugger B, Jeckel D, Lehmann WD, Wieland FT. Determination of cholesterol at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 1999;40:126–132.
 40. Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell* 2005;16:2091–2105.
 41. Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, Mayran N, Faure J, Gruenberg J. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J* 2002;21:1289–1300.
 42. Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell* 2007;18:47–56.
 43. Walter M, Davies JP, Ioannou YA. Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes. *J Lipid Res* 2003;44:243–253.
 44. Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest* 2002;109:1541–1550.
 45. Ganley IG, Pfeiffer SR. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J Biol Chem* 2006;281:17890–17899.
 46. Ying M, Grimmer S, Iversen TG, Van Deurs B, Sandvig K. Cholesterol loading induces a block in the exit of VSVG from the TGN. *Traffic* 2003;4:772–784.
 47. Fu Y, Hoang A, Escher G, Parton RG, Krozowski Z, Sviridov D. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* 2004;279:14140–14146.
 48. Ren X, Ostermeyer AG, Ramcharan LT, Zeng Y, Lublin DM, Brown DA. Conformational defects slow Golgi exit, block oligomerization, and reduce raft affinity of caveolin-1 mutant proteins. *Mol Biol Cell* 2004;15:4556–4567.
 49. Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton RG. Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J Cell Biol* 1999;145:1443–1459.
 50. Grewal T, de Diego I, Kirchhoff MF, Tebar F, Heeren J, Rinninger F, Enrich C. High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras. *J Biol Chem* 2003;278:16478–16481.
 51. Theobald J, Hanby A, Patel K, Moss SE. Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431 squamous epithelial carcinoma cells. *Br J Cancer* 1995;71:786–788.
 52. Theobald J, Smith PD, Jacob SM, Moss SE. Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells suppresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation. *Biochim Biophys Acta* 1994;1223:383–390.
 53. Ikonen E, Holtta-Vuori M. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:445–454.
 54. Valasek MA, Weng J, Shaul PW, Anderson RG, Repa JJ. Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J Biol Chem* 2005;280:28103–28109.
 55. Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 2005;280:12710–12720.
 56. Smart EJ, De Rose RA, Farber SA. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3450–3455.
 57. Strzelecka-Kiliszek A, Tytki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J. Annexins in Niemann-Pick type C disease. *Annexins* 2004;1:206–216.

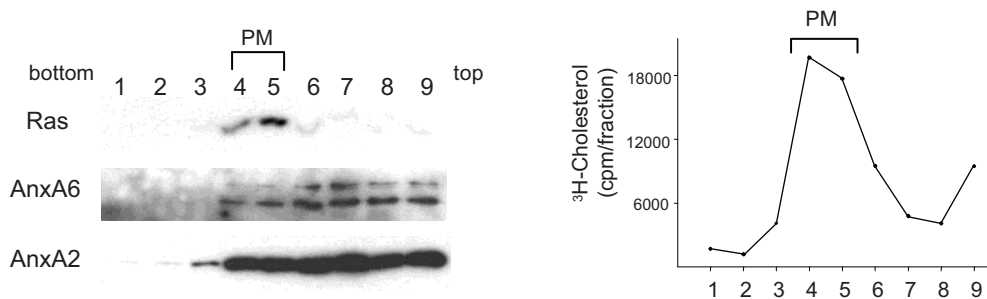
58. Ayala-Sanmartin J. Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:72–79.
59. te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, Sillence DJ. Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 2004;279:26167–26175.
60. Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S. Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J Neurosci Res* 2001;64:235–241.
61. Holttä-Vuori M, Maatta J, Ullrich O, Kuismanen E, Ikonen E. Mobilization of late-endosomal cholesterol is inhibited by Rab guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Curr Biol* 2000;10:95–98.
62. Wang Y, Thiele C, Huttner WB. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 2000;1:952–962.
63. Grimmer S, Ying M, Walchli S, van Deurs B, Sandvig K. Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism. *Traffic* 2005;6:144–156.
64. Klapisz E, Masliah J, Bereziat G, Wolf C, Koumanov KS. Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A(2). *J Lipid Res* 2000;41:1680–1688.
65. Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* 2001;276:15712–15719.
66. Maxfield FR, Wustner D. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 2002;110:891–898.
67. Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K. Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* 1998;142:1413–1427.
68. Egea G, Lazaro-Dieguez F, Vilella M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:168–178.
69. Tebar F, Villalonga P, Sorkina T, Agell N, Sorkin A, Enrich C. Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2002;13:2057–2068.
70. Zaks WJ, Creutz CE. Annexin-chromaffin granule membrane interactions: a comparative study of synexin, p32 and p67. *Biochim Biophys Acta* 1990;1029:149–160.
71. Donnelly SR, Moss SE. Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:533–538.
72. Everson WV, Smart EJ. Caveolin and its role in intracellular chaperone complexes. In: C. J. Fielding, editor. *Lipid Rafts and Caveolae*. Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & KGaA; 2006.
73. Calvo M, Tebar F, Lopez-Iglesias C, Enrich C. Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:1259–1269.
74. van Duyl BY, Meeldijk H, Verkleij AJ, Rijkers DT, Chupin V, de Kruijff B, Killian JA. A synergistic effect between cholesterol and tryptophan-flanked transmembrane helices modulates membrane curvature. *Biochemistry* 2005;44:4526–4532.
75. Garver WS, Xie C, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM. Niemann-Pick C1 expression is not regulated by the amount of cholesterol flowing through cells in the mouse. *J Lipid Res* 2005;46:1745–1754.
76. Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 1983;98:241–260.
77. Llado A, Tebar F, Calvo M, Moreto J, Sorkin A, Enrich C. Protein kinase Cdelta-calmodulin crosstalk regulates epidermal growth factor receptor exit from early endosomes. *Mol Biol Cell* 2004;15:4877–4891.
78. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
79. Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 1984;39:405–416.
80. Brügger B, Sandhoff R, Wegehingel S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann WD, Nickel W, Wieland FT. Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol* 2000;151:507–518.
81. Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res* 1973;14:364–366.
82. Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem* 2003;278:14370–14378.
83. Rabut G, Ellenberg J. Photobleaching techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, iFRAP and FLIP. In: R. D. Goldman and D. L. Spector, editors. *Live Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press; 2005.

Supplementary Figure 1

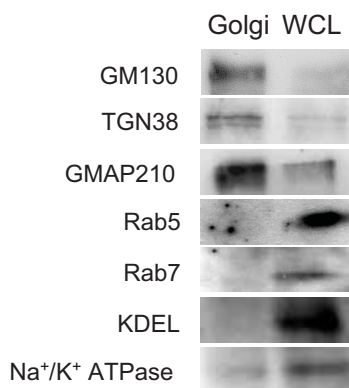
A



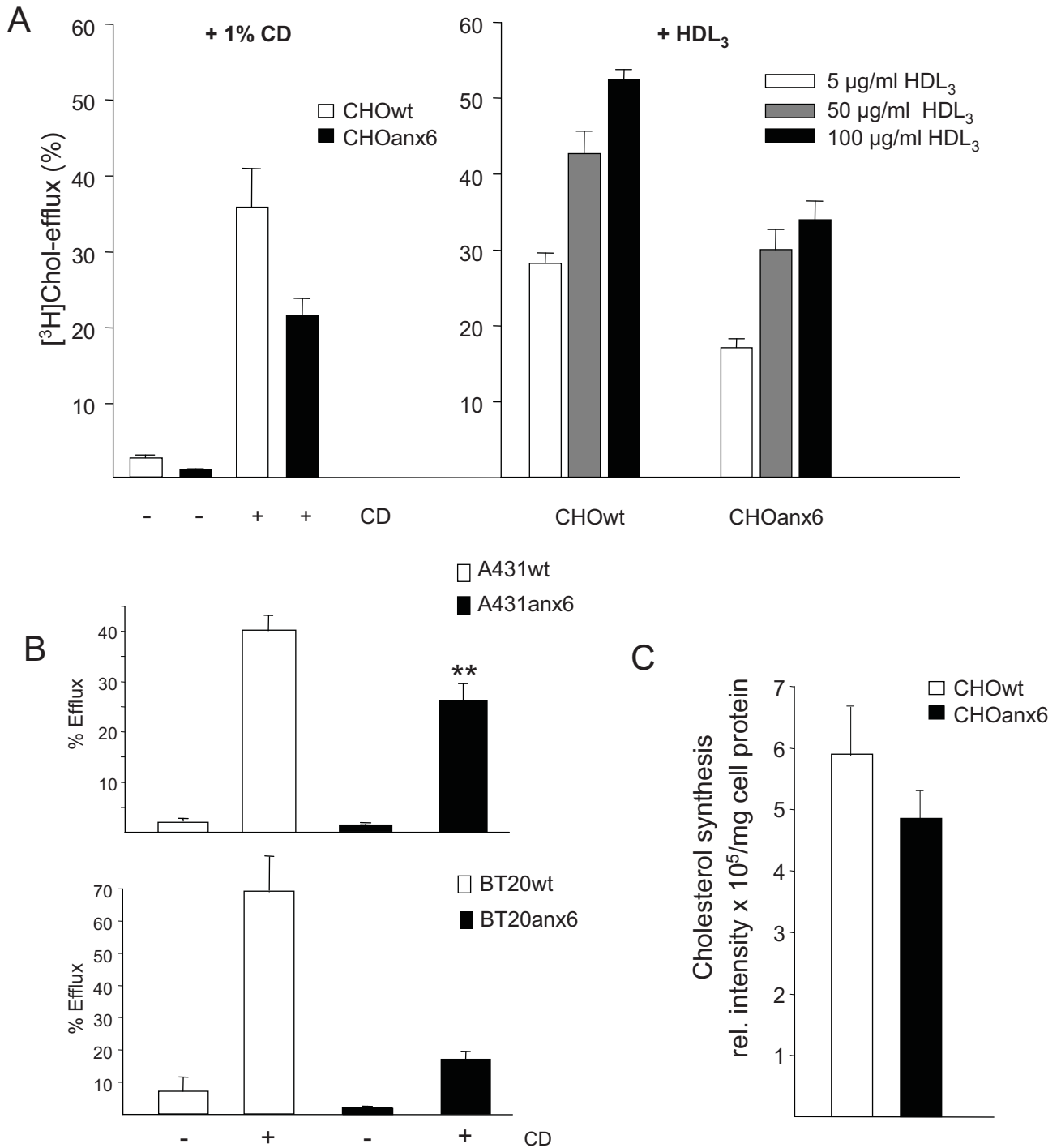
B



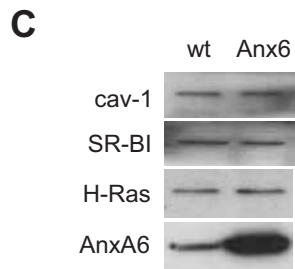
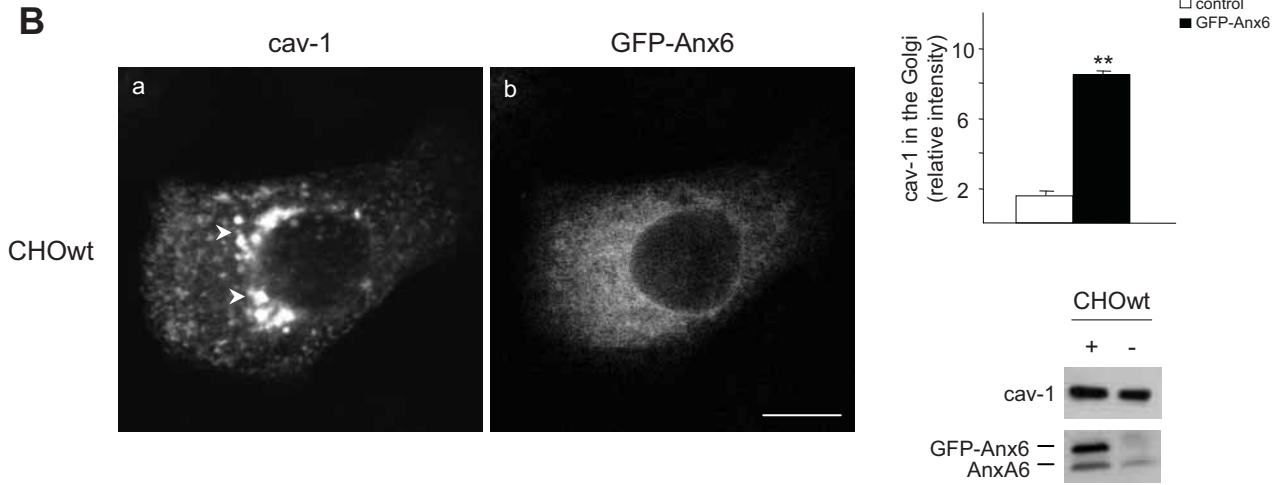
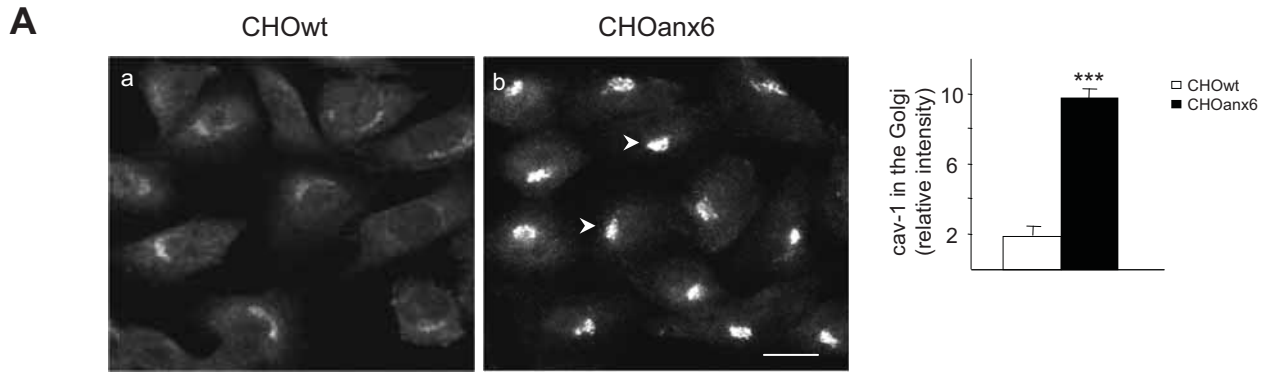
C



Supplementary Figure 2

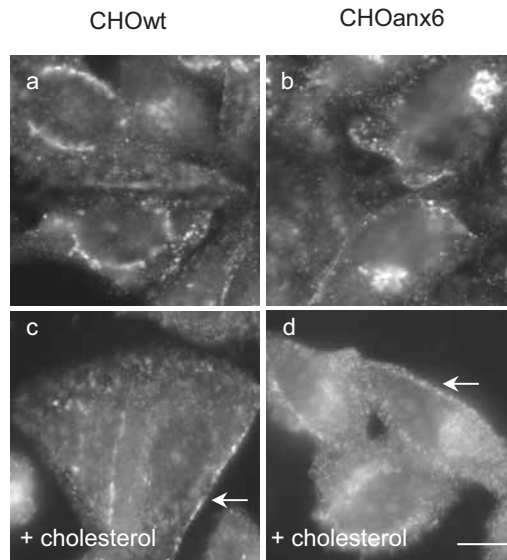


Supplementary Figure 3

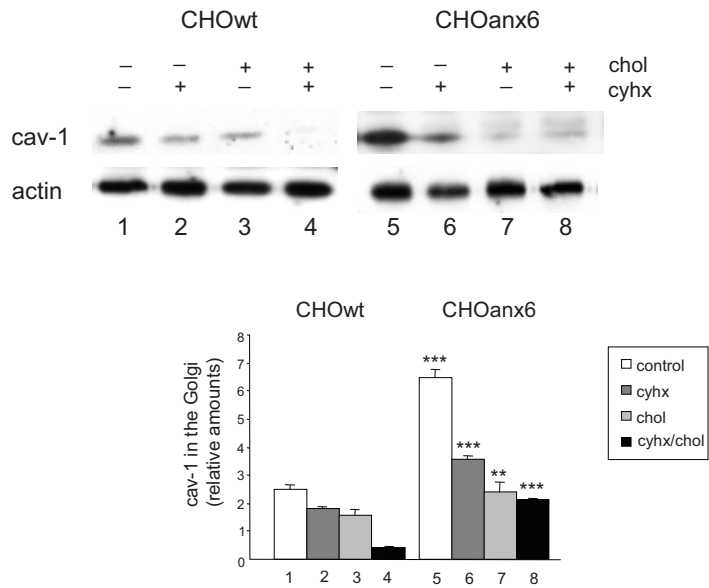


Supplementary Figure 4

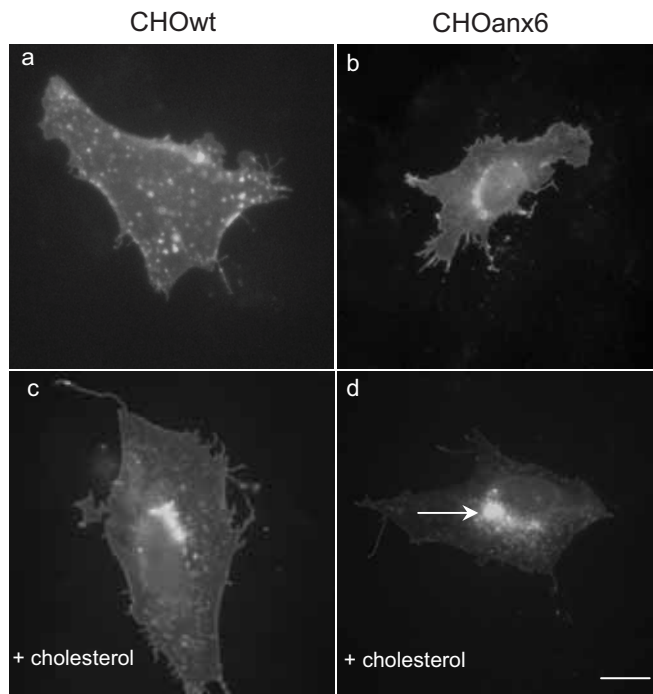
A



B



Supplementary Figure 5



ARTICLE 2

Annexin-A6 induced inhibition of cPLA₂ is linked to cav-1 export from the Golgi.

Els nivells de colesterol són clau en la formació de vesícules que té lloc al complex de Golgi. També s'ha demostrat que la fosfolipasa cPLA₂ hi està involucrada. El nostre grup ha demostrat recentment que nivells elevats d'Anx6 pertorben la correcta distribució intracel·lular de colesterol, comportant un bloqueig en el transport de caveolina des del Golgi fins a la membrana plasmàtica. En aquest treball, mostrem com en cèl·lules que sobreexpressen Anx6 (CHOAnx6), el segrest de colesterol al compartiment endocític tardà que provoca un decrement en els nivells de colesterol a les membranes del Golgi inhibeix tant l'associació de la cPLA₂ a aquestes membranes com la seva activitat. Aquesta inhibició de l'activitat de la cPLA₂ es relaciona amb l'acumulació de caveolina al Golgi. Això concorda amb els resultats obtinguts al tractar cèl·lules amb MAFP (inhibidor de la cPLA₂), ja que s'observa una acumulació de caveolina al Golgi després del tractament. En el mateix sentit, si es tracten cèl·lules amb U18666A (que impedeix la sortida de colesterol dels LE mimetitzant l'efecte de la sobreexpressió d'Anx6), la cPLA₂ no pot translocar des del citosol cap a les membranes de Golgi, on ha d'intervenir en el procés de formació de vesícules necessàries per a la sortida de proteïnes cap a la membrana plasmàtica. La inhibició de l'activitat de la cPLA₂ causada per l'Anx6 es pot recuperar afegint colesterol exogen a les cèl·lules, o fent disminuir els nivells d'Anx6 amb l'RNAi. Podem treure dues conclusions d'aquests resultats; per una banda, no només l'activitat de la cPLA₂ sinó també la translocació cap a les membranes de Golgi, depenen íntimament del colesterol lliure que ve dels endosomes tardans. Els nivells de colesterol són crítics perquè la translocació es pugui donar i l'enzim pugui dur a terme la seva tasca d'hidròlisi de fosfolípids que permet la curvatura de la membrana per a poder formar una vesícula. Per altra banda, i per primera vegada, es demostra que el transport de caveolina des del Golgi és depenent no només de colesterol sinó també de cPLA₂, i que contràriament, ni el transport d'una proteïna resident de *rafts* lipídics (MAL), ni el transport d'una proteïna de sots de clatrina (EGFR) requereixen la cPLA₂ per transitar des del Golgi fins a la membrana plasmàtica.

Annexin A6-induced Inhibition of Cytoplasmic Phospholipase A₂ Is Linked to Caveolin-1 Export from the Golgi*

Received for publication, August 9, 2007, and in revised form, January 30, 2008. Published, JBC Papers in Press, February 1, 2008, DOI 10.1074/jbc.M706618200

Laia Cubells[‡], Sandra Vilà de Muga[‡], Francesc Tebar[‡], Joseph V. Bonventre[§], Jesús Balsinde[¶], Albert Pol^{||}, Thomas Grewal^{**1}, and Carlos Enrich^{‡||2}

From the [‡]Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, and the ^{||}Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, 08036-Barcelona, Spain, ^{**}Faculty of Pharmacy, University of Sydney, Sydney, New South Wales 2006, Australia, [§]Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, and [¶]Institute of Molecular Biology and Genetics, Spanish Research Council and University of Valladolid School of Medicine, 47003 Valladolid, Spain

The molecular mechanisms regulating the exit of caveolin from the Golgi complex are not fully understood. Cholesterol and sphingolipid availability affects Golgi vesiculation events and involves the activity of cytoplasmic phospholipase A₂ (cPLA₂). We recently demonstrated that high expression levels of annexin A6 (AnxA6) perturb the intracellular distribution of cellular cholesterol, thereby inhibiting caveolin export from the Golgi complex. In the present study we show that in Chinese hamster ovary cells overexpressing AnxA6, sequestration of cholesterol in late endosomes, leading to reduced amounts of cholesterol in the Golgi, inhibits cPLA₂ activity and its association with the Golgi complex. This correlates with the blockage of caveolin export from the Golgi in cells treated with methyl arachidonyl fluorophosphonate, a Ca²⁺-dependent cPLA₂ inhibitor. AnxA6-mediated down-regulation of cPLA₂ activity was overcome upon the addition of exogenous cholesterol or transfection with small interfering RNA targeting AnxA6. These findings indicate that AnxA6 interferes with caveolin transport through the inhibition of cPLA₂.

Annexins are a family of Ca²⁺ and membrane-binding proteins involved in membrane trafficking and various other processes including signaling, proliferation, differentiation, and inflammation (1–3). Each annexin consists of a unique N-terminal tail and a common, well conserved C-terminal core domain containing 4 (or 8 for AnxA6³) repeats of a highly

homologous 70-amino acid sequence which facilitates their Ca²⁺ and phospholipid binding.

We and others showed that AnxA6 is located at the plasma membrane, in the endocytic compartment, and in caveolae. AnxA6 has been implicated in endo- and exocytic membrane trafficking pathways and regulates low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated endocytosis (4, 5), is crucial for LDL degradation and its transport from late endosomes/pre-lysosomes to lysosomes (6), and is recruited to cholesterol-laden late endosomes (7). In addition, AnxA6 stimulates the membrane recruitment of the GTPase-activating protein p120GAP and protein kinase C to modulate the Ras signaling pathway (8, 9). These multifunctional features of AnxA6 are most probably a consequence of (a) its dynamic spatiotemporal behavior in a Ca²⁺ and/or cholesterol-dependent manner but also (b) the promiscuity to interact with a large set of other molecules (10), in particular through the flexible linker region (amino acids 320–378) which connects the N- and C-terminal AnxA6 repeats (4 repeats each).

Expression of AnxA6 and other annexins varies in cells and tissues as well as in different pathophysiological situations (1, 10). We recently compared wild type Chinese hamster ovary cells (CHOwt, contain very low AnxA6 levels) and AnxA6-deficient human epithelial carcinoma A431 cells with stable cell lines expressing high amounts of AnxA6 (CHOanx6, A431anx6). In these studies we showed that high AnxA6 levels result in an accumulation of cholesterol in the late endocytic compartment, leading to reduced amounts of cholesterol in the Golgi and the plasma membrane. This overall imbalance of cellular cholesterol is accompanied by an inhibition of caveolin export from the Golgi complex. Consequently, a significant diminution in the number of caveolae at the cell surface and a strong reduction of cholesterol efflux was observed (11). However, the molecular mechanism(s) regulating the exit of caveolin from the Golgi complex is not fully understood, and recently the participation of syntaxin 6 (12) or PTRF-cavin (13, 14) in this process has also been demonstrated.

Changes in the availability of cellular cholesterol can be directly related to the vesiculation of the Golgi apparatus. Vesiculation and tubulation events regulating membrane traffic and cargo export from the Golgi require the activity of cholesterol-dependent cPLA₂ (15). Therefore, we addressed the possibility of AnxA6 interfering with caveolin export from Golgi membranes through the inhibition of cPLA₂. In the pres-

* This study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia, Spain Grants BFU2006-01151/BMC and GEN2003-20662 and Fellowship PR-2006-0142 (to C. E.) and National Heart Foundation of Australia, Gretl Raymond Foundation Grant G06S2559 (to T. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence may be addressed. E-mail: tgrewal@pharm.usyd.edu.au.

² To whom correspondence may be addressed. E-mail: enrich@ub.edu.

³ The abbreviations used are: AnxA6, annexin A6; AA, arachidonic acid; AnxA1, annexin A1; cav, caveolin; CHO, Chinese hamster ovary; cPLA₂, cytoplasmic phospholipase A₂; EGFR, epidermal growth factor receptor; p120GAP, p120 GTPase-activating protein; GFP, green fluorescent protein; HELSS, E-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one (haloenoil lactone suicide substrate); iFRAP, inverse fluorescence recovery after photobleaching; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; wt, wild type; PTRF, polymerase I and transcript release factor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; RNAi, RNA-mediated interference; GST, glutathione S-transferase.

ent study we show that overexpression of AnxA6 indirectly inhibits cPLA₂ activity and its association with the Golgi complex through the reduction of cholesterol availability. In support of cPLA₂ being involved in caveolin transport, CHOwt treated with the Ca²⁺-dependent cPLA₂ inhibitor, methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), but not the Ca²⁺-independent cPLA₂ inhibitor haloenol lactone suicide substrate (HELSS), mimics the phenotype of AnxA6 overexpression and leads to an accumulation of caveolin in the Golgi complex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Antibodies—Nutrient Mixture Ham's F-12, DMEM, cycloheximide, water-soluble cholesterol, and saponin were from Sigma. [³H]Arachidonic acid ([³H]AA) was from Amersham Biosciences. cPLA₂ inhibitors E-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one (HELSS), MAFP, and U18666A were from BIOMOL. Paraformaldehyde was from Electron Microscopy Sciences, and Mowiol from Calbiochem. The cloning of the green fluorescent protein (GFP)-tagged caveolin-3 (GFP-cav3) expression vector has been described previously (16). GFP-tagged T-lymphocyte maturation-associated protein (MAL; GFP-MAL) and untagged AnxA1 expression vectors were kindly provided by Dr. M. A. Alonso (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Universidad Autónoma de Madrid, Spain) and V. Gerke (Institute of Medical Biochemistry, University of Münster, Germany), respectively. The construction of the epidermal growth factor receptor (EGFR)-GFP fusion construct (EGFR-GFP) has been described previously (17). The construction of full-length cytosolic group IVA phospholipase A_{2α}-GFP (GFP-cPLA₂) was described previously (18). RNAi targeting human AnxA6, GFP, and the mouse monoclonal anti-cPLA₂ (4-4B-3C; sc-454) were from Santa Cruz Biotechnology. Glutathione S-transferase (GST) and GST-AnxA6 fusion proteins were expressed in the *Escherichia coli* strain BL21 pLysE and purified by glutathione-Sepharose chromatography as described (6). Polyclonal anti-caveolin (C13630), anti-p120GAP, and mouse anti-GM130 were from BD Transduction Laboratories. Polyclonal anti-actin was from MP Biomedicals. Polyclonal anti- α -mannosidase II was kindly provided by Dr. A. Velasco (Universidad de Sevilla). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Zymed Laboratories Inc.. Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes.

Cell Culture—CHO cells were grown in Ham's F-12, and HeLa and COS-1 cells were grown together in DMEM with 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) at 37 °C, 5% CO₂. The generation of the stable AnxA6-overexpressing CHO cell line (CHOanx6) was described in detail (4, 6). For the intracellular accumulation of cholesterol, cells were treated for 24 h with U18666A (2 μ g/ml) as described (7). For the inhibition of Ca²⁺-independent and -dependent cPLA₂ activity, cells were incubated as described with either 5 μ M HELSS for 30 min or 15 μ M MAFP for 60 min, respectively (15). For transient transfections, cells (40–70% confluence) were transfected with 1 μ g of DNA/ml using Effectene (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

Cycloheximide/Cholesterol Treatments—To inhibit protein synthesis in some experiments, 10 μ g/ml cycloheximide (in 100 mM Hepes, pH 7.5) was added to the media for 90 min. For cholesterol addition, cells were incubated with 30 μ g/ml cholesterol (premixed for 30 min in DMEM by gentle agitation) for 90 min.

RNAi-mediated Inhibition of AnxA6—To specifically knock down gene expression of human AnxA6, 1–2 \times 10⁶ HeLa cells were transfected in 2 ml of medium with 10 nM AnxA6 small interfering RNA (Santa Cruz, sc-29688) and 6 μ l of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. Experiments were conducted 72 h after transfection when the depletion of AnxA6 was more significant (see Western blot in Fig. 1C). GFP small interfering RNA was used as a negative control.

Release of [³H]AA—Cells were incubated overnight in 12 wells with 0.25 μ Ci/ml [³H]AA in DMEM, 0.5% fetal calf serum. Cells were washed and incubated with DMEM, 0.2% BSA for 10 min. Then the media and cells were harvested and measured by scintillation counting (15).

Pulldown Assays with Purified GST-AnxA6—Cells were incubated with and without 30 μ g/ml cholesterol, placed in cold lysis buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1 mM CaCl₂ plus protease inhibitors), scraped, and centrifuged. Then 75 μ g of GST-AnxA6 and 21 μ g of GST were incubated for 90 min with glutathione-Sepharose at 4 °C in phosphate-buffered saline. After washing with lysis buffer, Sepharose-bound GST-AnxA6 (and GST as control) was then incubated with 600 μ g of cell extract for 2 h at 4 °C, and proteins bound to the column were collected by centrifugation and analyzed by Western blotting.

Immunoprecipitation—CHO and CHOanx6 cells grown on 100-mm dishes were transfected with pEGFP-cPLA₂. After washing in phosphate-buffered saline and solubilizing by scraping with a rubber policeman in TGH buffer (1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.3, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin) followed by gentle rotation for 10 min at 4 °C, lysates were then centrifuged at 14,000 \times g for 10 min at 4 °C. Supernatants of transfected or not transfected cells were incubated with rabbit polyclonal anti-GFP or polyclonal anti-annexin A6 antibodies for 2 h at 4 °C and then for 60 min after the addition of protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were washed twice in TGH supplemented with 150 mM NaCl and then once without NaCl. 10% SDS-polyacrylamide gels were used to separate proteins. Proteins were then transferred to Immobilon-P and immunoblotted using anti-annexin A6 or anti-GFP followed by the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody and ECL detection.

Immunofluorescence Microscopy—Cells were grown on coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde, washed, permeabilized with 0.1% saponin, and incubated with primary and secondary antibodies as described elsewhere (19). For anti-cPLA₂ labeling, cells were fixed with cold methanol for 2 min. For double labeling with anti-cPLA₂ and anti- α -mannosidase II, cells were first fixed with cold methanol followed by 4% paraformaldehyde for 12 min. Finally, samples were mounted

Annexin A6 Inhibits cPLA₂

in the anti-fading media Mowiol (Calbiochem), and cells were observed using an oil immersion Plan-Apo63x/1.4 objective in an Axio-plan Zeiss microscope. Images were captured with an AxioCam HRc camera and were digitally treated with Axio-Vision 3.1 software. In some experiments a Leica TCS SL laser-scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems) with argon and HeNe lasers attached to a Leica DMIRE2 inverted microscope was used. Image analysis was performed with Adobe Photoshop 7.0 software. To quantify the fluorescence intensity staining, images were captured using identical contrast and exposure times. Using NIH image software (Image J), the area to be quantified (the plasma membrane) was selected, the pixel intensity was determined, and the average staining intensity (20 cells from 3 experiments) was calculated. Colocalization of cPLA₂ and α -mannosidase II was quantified using the Image J program (National Institutes of Health) and the "Highlighting Colocalization" plugin (Pierre Bourdoncle, Institut Jacques Monod, Service Imagerie, Paris), which highlights the colocalized points of two images. Two points were considered to colocalize if their intensity was higher than 50%, and an image of colocalized points was generated. Then in each cell the Golgi was defined as the region of interest, and the co-localization (%) therein was calculated. In each experiment at least 50 cells per cell line were analyzed. In some experiments the colocalization of mannosidase II with transiently transfected GFP-cPLA₂ was analyzed. The transfection procedures have been described elsewhere (11).

Photobleaching Experiments and Time-lapse Confocal Microscopy—Fluorescence recovery after photobleaching (iFRAP) experiments were carried out in COS-1 cells using a Leica TCS SL laser-scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems) with argon and HeNe lasers attached to a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with an incubation system with temperature and CO₂ control (16). For visualization of GFP, images were acquired using 63 \times oil immersion objective lens (NA 1.32; 488 nm laser line; excitation beam splitter RSP 500, emission range detection 500–600 nm). The confocal pinhole was set at 2–3 Airy units to minimize changes in fluorescence due to GFP-tagged proteins moving away from the plane of focus. The whole cytoplasm, except the Golgi of a GFP fusion protein transfected cell, was photobleached using 50–80 scans with the 488-nm laser line at full power. Pre- and post-bleach images were monitored at 30-s intervals for 40 min. The excitation intensity was attenuated down to ~5% of the half laser power to avoid significant photobleaching. The relative loss of fluorescence intensity in the unbleached region of interest and overall photobleaching in the whole cell during the time series were quantified using Image Processing Leica Confocal Software. Background fluorescence was measured in a random field outside of the cells. Fluorescence correction and normalization of GFP-tagged proteins were calculated according to Rabut and Ellenberg (20).

Isolation of Golgi Membranes—A modified method of Balch (21) described in detail by Brügger *et al.* (22) was used to isolate Golgi membrane fractions. All procedures were carried out at 4 °C. In brief, 4–5 $\times 10^9$ cells were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline, twice with BB (breaking buffer; 0.25 M sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), and finally resus-

ended in four volumes of BB. Cells were homogenized by passing 25 times through a ball-bearing homogenizer (Balch homogenizer), which disrupts early and late endosomes, but not Golgi vesicles, and brought to a sucrose concentration of 37% (w/w) by the addition of 62% (w/w) sucrose. 14 ml of sample was overlaid with 15 ml of 35% (w/w) sucrose and 9 ml of 29% (w/w) sucrose (in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and centrifuged for 2.5 h at 25,000 rpm. Typically, 2 ml of a Golgi-enriched membrane fraction was recovered at the 35–29% interphase. In some experiments, before homogenization cells were preincubated with and without cholesterol for 90 min (30 μ g/ml). The purity of the isolated Golgi membranes was confirmed by Western blot analysis with markers for Golgi (TGN38, GM130, GMAP210), early and late endosomes (Rab5, Rab7), plasma membrane (Na⁺K⁺ ATPase), and endoplasmic reticulum (KDEL; data not shown).

Western Blot Analysis—CHOwt, CHOanx6, and HeLa cell lysates, samples from isolated Golgi membranes, and GST-AnxA6 pulldown assays were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P (Millipore) followed by incubation with primary antibodies and the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL detection (Amersham Biosciences). Protein content was measured by the method of Lowry *et al.* (23).

RESULTS

AnxA6 Expression Levels Affect Cholesterol-dependent cPLA₂ Activity—Regulation of membrane traffic and cargo export from the Golgi complex involves cPLA₂ activity (24, 25). To address whether the AnxA6-dependent reduction of cholesterol export from late endosomes (11) could be linked to cholesterol- and cPLA₂-dependent secretory pathways from the Golgi to the plasma membrane, we first compared the activity of cPLA₂ in CHOwt and CHOanx6 and measured the cellular release of radiolabeled arachidonic acid ([³H]AA) as described by Grimmer *et al.* (15). CHOwt express very low amounts of AnxA6 (4, 6, 8, 9), whereas AnxA6 levels in CHOanx6 are rather similar to AnxA6 expression levels in other commonly used cell lines, such as HeLa (11). As shown in Fig. 1A, both cell lines express comparable levels of cPLA₂ (Fig. 1B). Importantly, these experiments clearly showed a 1.5–2.0-fold reduction of [³H]AA release in CHOanx6 cells ($p < 0.01$) (Fig. 1A).

To find out whether AnxA6 down-regulation leads to increased cPLA₂ activity, HeLa cells, which express high levels of AnxA6 (11) (Fig. 1C), were transfected with RNAi targeting AnxA6 (RNAi-AnxA6), and the release of AA was measured. Upon AnxA6 knockdown, the cellular release of AA increased significantly (2.0-fold, Fig. 1C). RNAi-GFP-transfected cells were used as a control and did not show any changes in the release of AA. Then, to address if reduced cPLA₂ activity could be overcome by the addition of exogenous cholesterol in AnxA6-expressing cells, [³H]AA-labeled CHOwt and CHOanx6 cells were incubated with and without cholesterol, and the amount of released radioactivity was determined as described above (Fig. 1D). Similar to the results described in Fig. 1A, release of [³H]AA is reduced in CHOanx6 cells compared with the controls (100 \pm 6 and 65 \pm 7% for CHOwt and

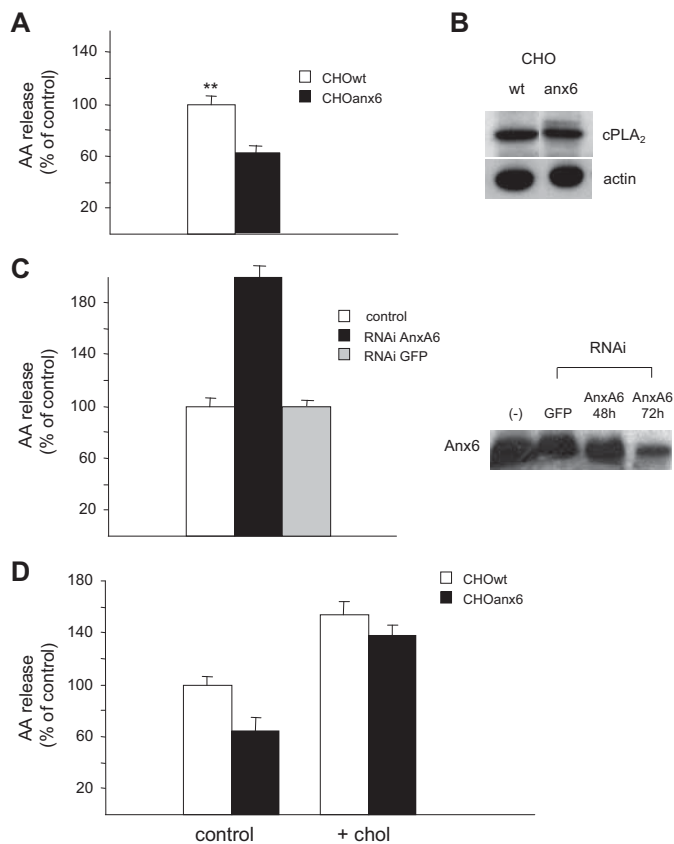


FIGURE 1. cPLA₂ is inhibited in CHOanx6 cells. *A*, cells were labeled with [³H]AA overnight, washed extensively, and incubated for 10 min at 37 °C. Then the media was removed, and the radioactivity in the media and in the cells was determined. Mean values \pm S.D. of three independent experiments with triplicate samples are given. **, $p < 0.01$ for Student's *t* test. *B*, protein levels of cPLA₂ and actin were determined by Western blot analysis from CHOwt and CHOanx6 cells as indicated. *C*, knockdown of AnxA6 increases cPLA₂ activity. HeLa cells were transfected with RNAi targeting AnxA6 (RNAi-AnxA6) as described previously (9). 72 h after transfection cells were labeled with [³H]AA overnight, washed, and incubated as described in *A*, and the radioactivity in the media and in the cells was determined. An increased release of [³H]AA into the media was observed after AnxA6 depletion. Western blot analysis confirmed RNAi-mediated depletion of AnxA6 at 72 h. *D*, cells were labeled with [³H]AA overnight as described above, washed extensively, and incubated with cholesterol for 90 min at 37 °C. Then the media was removed, and the radioactivity in the media and in the cells was determined as described above. The total [³H]AA incorporated (per 10⁹ cells) was 0.35 ± 0.01 , 0.93 ± 0.005 , and 0.93 ± 0.003 nmol in HeLa, CHOwt, and CHOanx6 cells, respectively.

CHOanx6, respectively). In agreement with previous data (15), exogenous cholesterol increased cPLA₂ activity 1.54 ± 0.10 - and 2.12 ± 0.37 -fold in both cell lines, respectively ($n = 3$). Thus, the addition of cholesterol compensates for the inhibitory effect of AnxA6 on cPLA₂ activity in CHOanx6 cells to result in a release of [³H]AA, which is comparable with that of the controls. It is tempting to speculate that the retention of cholesterol in late endosomes of CHOanx6 cells (11) leads to an impaired supply of cholesterol for cPLA₂, thereby interfering with Golgi vesiculation.

Impaired Translocation of cPLA₂ to the Golgi Complex in AnxA6-expressing Cells—Then, to address if elevated AnxA6 levels perturb cPLA₂ translocation to the Golgi, we isolated Golgi membranes from CHOwt and CHOanx6 cells and compared the amount of cPLA₂. Western blot analysis (Fig. 2A) revealed reduced cPLA₂ levels in the Golgi-enriched

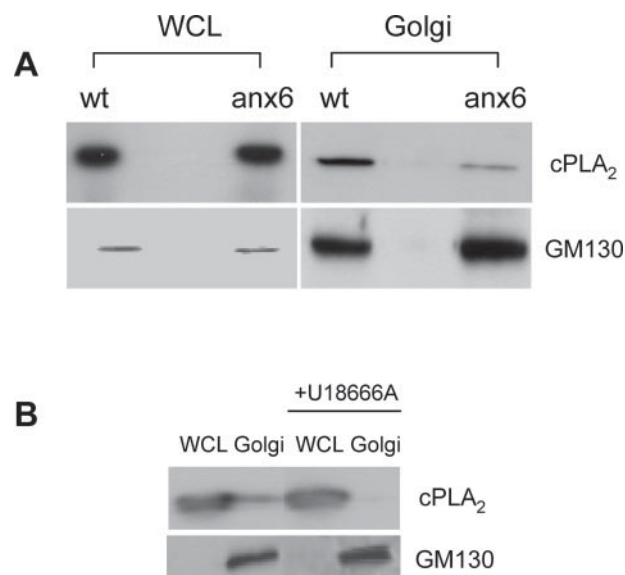


FIGURE 2. Cholesterol impaired translocation of cPLA₂ into Golgi membranes. *A*, reduced cPLA₂ levels in Golgi fractions isolated from CHOanx6 cells (*anx6*) compared with controls (*wt*) are shown. AnxA6 expression does not affect cPLA₂ levels in whole cell lysates (WCL, *A* and *B*). *B*, cPLA₂ levels in isolated Golgi fractions from CHOwt cells with and without U18666A were analyzed. cPLA₂ is not detectable in the Golgi fraction upon U18666A treatment, indicating that cPLA₂ translocation to the Golgi requires late endosomal cholesterol.

membrane fraction of CHOanx6 cells. Because CHOanx6 are characterized by an accumulation of cholesterol in late endosomes leading to reduced cholesterol levels in the Golgi (11), we concluded that reduced cPLA₂ levels in the Golgi of CHOanx6 cells could be due to an ineffective delivery of cholesterol from late endosomes to the Golgi complex. In support of this hypothesis, treatment of CHOwt cells with U18666A, a pharmacological agent to accumulate cholesterol in late endosomes, also resulted in a clear reduction of cPLA₂ in the Golgi fractions without affecting total amounts of cPLA₂ (Fig. 2B, compare the *second* and *fourth* lanes). To confirm these findings by means of immunofluorescence microscopy, the staining pattern of cPLA₂ and a Golgi marker (α -mannosidase II) in CHOwt and CHOanx6 was compared (Fig. 3A). In both cell lines punctuate and in part diffuse staining of cPLA₂ was observed throughout the cell and was more intense in the perinuclear region, in particular in CHOwt cells. In the CHOanx6 cell line, cPLA₂ appeared cytosolic with minor cPLA₂ staining detected within the Golgi complex as judged by colocalization with anti- α -mannosidase II and anti-cPLA₂ (see Fig. 3A, *arrows* in *panel a-c*). Quantification of fluorescence intensity confirmed the increased co-localization (~ 3 -fold) of cPLA₂ with α -mannosidase II in CHOwt compared with CHOanx6 cells (Fig. 3B). In addition, when Golgi membranes were isolated from CHOwt or CHOanx6 cells in the presence of cholesterol (90 min) and analyzed by Western blotting, a significant increase of cPLA₂ levels was observed (Fig. 3C). Thus, in CHOanx6 cells the reduced localization of cPLA₂ in the Golgi correlates with a decreased enzymatic activity of cPLA₂ (Fig. 1A).

To verify and extend our findings on endogenous cPLA₂, CHOwt and CHOanx6 were transiently transfected with the

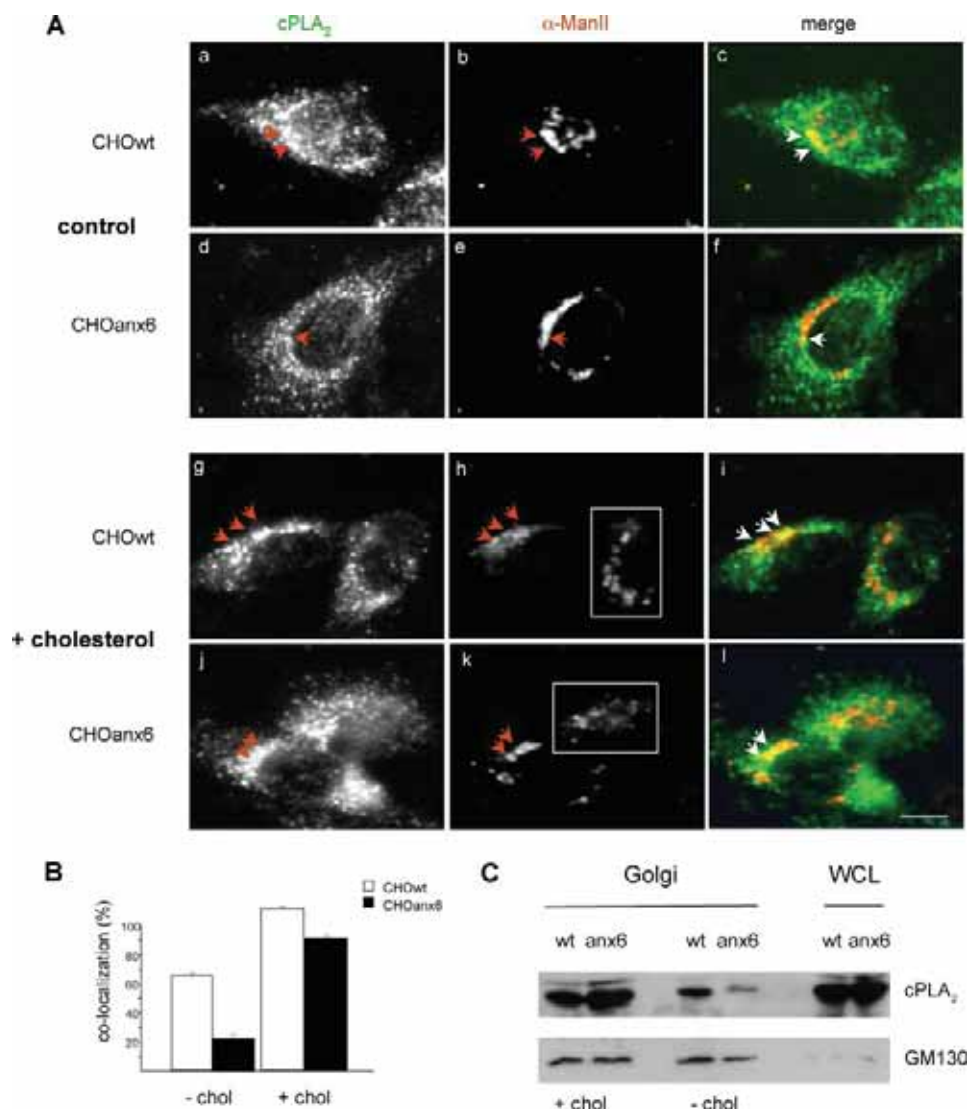


FIGURE 3. Annexin A6 inhibits translocation of cPLA₂ to the Golgi. *A*, CHOwt (*panels a–c* and *g–i*) and CHOanx6 (*panels d–f* and *j–l*) cells were grown on coverslips, fixed, permeabilized, and immunolabeled with anti-cPLA₂ and the Golgi marker anti- α -mannosidase II (α -ManII) and analyzed by confocal microscopy as indicated. The merged images are shown. Representative differential colocalization of cPLA₂ and α -mannosidase II in CHOwt, but not CHOanx6, is indicated by arrows (see *panels c, f, i, and l*). The fluorescence intensity of the cPLA₂ staining in the Golgi area (α -mannosidase II-positive) of CHOwt and CHOanx6 cells was quantified. Images shown were representative for 90% of cells analyzed in each experiment ($n = 3$). Values are given in (%) and represent the mean \pm S.D. of 3 independent experiments with 50 cells per cell line in each experiment. The same experiment was performed adding exogenous cholesterol (*panels g–l*). The quantification of co-localization in the Golgi region is shown in *B*. Areas with squares (*panels h* and *k*) indicate the increased vesiculation of the Golgi membranes. Arrows indicate colocalization in the Golgi structures. *C*, Western blot analysis of endogenous cPLA₂ in isolated Golgi fractions from CHOwt and CHOanx6 with (+chol) or without (–chol) exogenous cholesterol. GM130 shows the enrichment of Golgi membranes in the isolated fractions compared with the whole cell lysates (WCL). Bar, 10 μ m.

full-length cPLA₂ α fused to (GFP-cPLA₂) (Fig. 4). To study the localization of GFP-cPLA₂ α upon elevation of Ca²⁺ or cholesterol, translocation of the GFP-cPLA₂ fusion protein was elicited by treating the cells with the Ca²⁺ ionophore ionomycin (2.5 μ M for 2 min) or with cholesterol (30 μ g/ml for 90 min). In untreated controls, GFP-cPLA₂ α distribution was mostly cytoplasmic. However, upon Ca²⁺ increase cPLA₂ α translocated from the cytoplasm to the perinuclear region including the Golgi area of both CHOwt and CHOanx6 cells. A similar pattern of translocation was previously observed (18, 26). Importantly, and similar to the endogenous cPLA₂, the addition of

cholesterol also showed a translocation into the perinuclear region.

To elucidate the identity of the intracellular membranes targeted by GFP-cPLA₂, cells expressing GFP-cPLA₂ were again stimulated with ionomycin or cholesterol, fixed, and stained with antibodies for a cis-Golgi marker (α -mannosidase II). As shown in Fig. 4, the most significant colocalization between GFP-cPLA₂ and the Golgi marker was in CHOwt cells in the presence of Ca²⁺ (*panels g–l*). Cholesterol treatment also increased the membrane binding of GFP-cPLA₂ to Golgi membranes (*panels m–r*). Similar results were obtained in CHOanx6 cells.

In support of the biochemical data (Figs. 1*D* and 2*B*), the addition of exogenous cholesterol resulted in a significant translocation of cPLA₂ to the Golgi complex (see Fig. 3*A*; compare *panels f* and *l*, and see quantification in Fig. 3*B*; Fig. 4, *panels m–r*), which appeared increasingly vesicular and less compact in the presence of cholesterol (compare *panels b* and *e* with *h* or *k*) in both CHOwt and CHOanx6 cells. Similarly, and as shown previously by others (27), elevation of Ca²⁺ using Ca²⁺ ionophores (ionomycin) induced translocation of cPLA₂ to the Golgi in both cell lines (data not shown). In fact, in most studies translocation is associated with increase of cPLA₂ activity (15, 28, 29). Interestingly, cholesterol-induced vesiculation of the Golgi complex most likely occurs through a mechanism involving Ca²⁺-dependent members of the cPLA₂ family (15).

However, the inhibition of cPLA₂ activity in CHOanx6 cells could also occur via a direct interaction of AnxA6 with cPLA₂ (as demonstrated for annexin A1 (30)), thereby interfering with its enzyme activity and/or translocation to Golgi membranes. To test this hypothesis, we therefore performed pulldown assays utilizing AnxA6 fused to GST (GST-AnxA6) as bait (Fig. 5*A*) and immunoprecipitation experiments with antibodies against AnxA6 and cPLA₂ (Fig. 5, *panels B* and *C*). In support of AnxA6 inhibiting cPLA₂ indirectly, these studies confirmed binding of established AnxA6-binding proteins, such as p120GAP and Raf-1, but did not reveal a direct interaction of AnxA6 and cPLA₂. Even the addition of exogenous cholesterol did not induce the association of cPLA₂ to AnxA6.

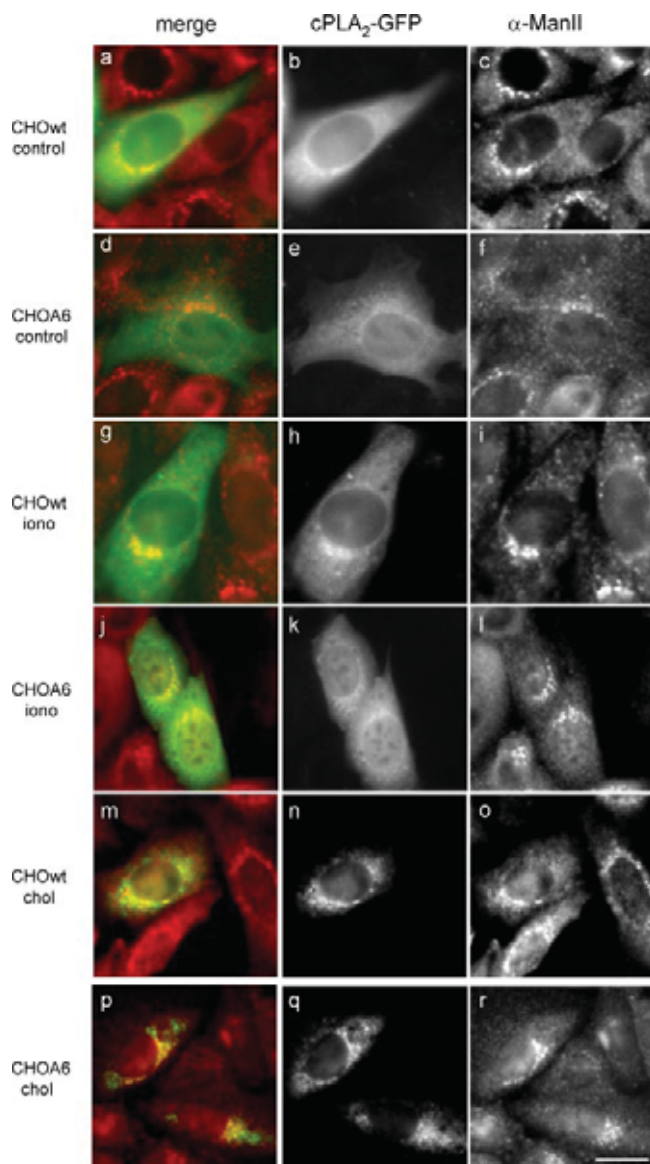


FIGURE 4. Translocation of GFP-cPLA₂ to intracellular membranes in response to Ca²⁺ and cholesterol in CHOanx6 cells. CHOwt and CHOanx6 cells were transfected with GFP-cPLA₂. After 24 h cells were non-treated (*control*) (panels *a–f*) or treated with ionomycin (2.5 μM for 2 min) (panels *g–l*) or with cholesterol (30 μg/ml for 90 min) (panels *m–r*). Then cells were fixed and stained with anti- α -mannosidase II (α -ManII) (in red). The rapid translocation/redistribution of GFP-cPLA₂ into the Golgi membranes of cells treated with ionomycin (*iono*, compare panels *b* and *h*) and with cholesterol (*chol*, compare panels *a* and *e* with *n* and *q*) can be observed. Bar, is 10 μm.

Protein Export from the Golgi Is Blocked in MAFP-treated Cells—Thus, in CHOanx6 cells, reduced cPLA₂ levels in the Golgi correlate with reduced cPLA₂ activity (Figs. 1 and 2) and an accumulation of cav-1 in the Golgi (11); see also Fig. 6, compare panels *a* and *b*. As mentioned above, CHOwt express only residual amounts of AnxA6 (7, 9, 11), and similar to RNAi approaches, this very low concentration of AnxA6 makes CHOwt an appropriate model system to analyze if inhibition of cPLA₂ activity *per se* in an AnxA6-independent manner can result in an accumulation of cav-1 in the Golgi. Therefore, CHOwt (and CHOanx6) were incubated with Ca²⁺-independent (HELSS) and Ca²⁺-dependent (MAFP) cPLA₂ inhibitors, and the staining of cav-1 was compared (Fig. 6). No differences

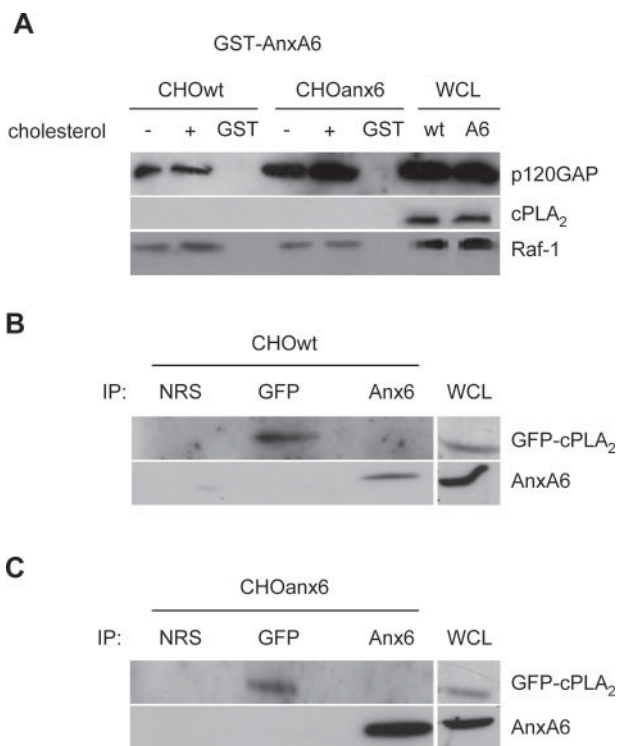


FIGURE 5. AnxA6 does not interact with cPLA₂ but affects cholesterol-dependent cPLA₂ translocation to the Golgi complex. *A*, pull-down experiments using GST-AnxA6 as bait with and without exogenous cholesterol (+*Chol*) were performed to study the potential interaction of AnxA6 with cPLA₂. CHOanx6 lysates (*WCL*) were incubated with GST-AnxA6 for 2 h at 4 °C. Bound proteins (GST-AnxA6) were collected, separated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting using antibodies to cPLA₂; Raf-1 and p120GAP were used as positive control. Pull-down assays using GST alone (*GST*) as a negative control did not show binding of cPLA₂ and p120GAP, respectively. *B* and *C*, lysates of CHOwt and CHOanx6 cells expressing GFP-cPLA₂ were immunoprecipitated (*IP*) with anti-GFP and anti-AnxA6 antibodies. The presence of cPLA₂ and AnxA6 in the immunoprecipitates was analyzed by Western blotting. *NRS*, normal rabbit serum.

in the subcellular distribution of cav-1 were observed in CHOwt cells after incubation with HELSS (Fig. 6, compare panels *a* and *c*). However, in CHOwt cells treated with MAFP, the cav-1 staining was more intense in the Golgi area compared with untreated CHOwt controls (98 ± 1.74% of CHOwt cells showed the accumulation of cav-1 in the Golgi) but similar to the one obtained in CHOanx6 cells (11) (Fig. 6, compare panel *a* with *e* and *b*).

These findings suggest that AnxA6 is a component of the molecular machinery involved in the regulation of cPLA₂. Thus, in cells with high AnxA6 levels, such as CHOanx6, the inhibition of the cholesterol- and Ca²⁺-dependent activity of members of the multifactorial cPLA₂ protein family could contribute to an accumulation of cav-1 in the Golgi. Together with the diminution of cholesterol at the cell surface, the sequestration of cholesterol in late endosomes and the significantly reduced Golgi cholesterol in CHOanx6 cells (~38% reduced compared with CHOwt) (11), this could lead to a slower and reduced trafficking of cav-1 from the Golgi to the plasma membrane in CHOanx6 cells.

We previously demonstrated the requirement of cholesterol for caveolin export from the Golgi (16). To validate if Ca²⁺-dependent cPLA₂ activity is involved in cav-1 export, we com-

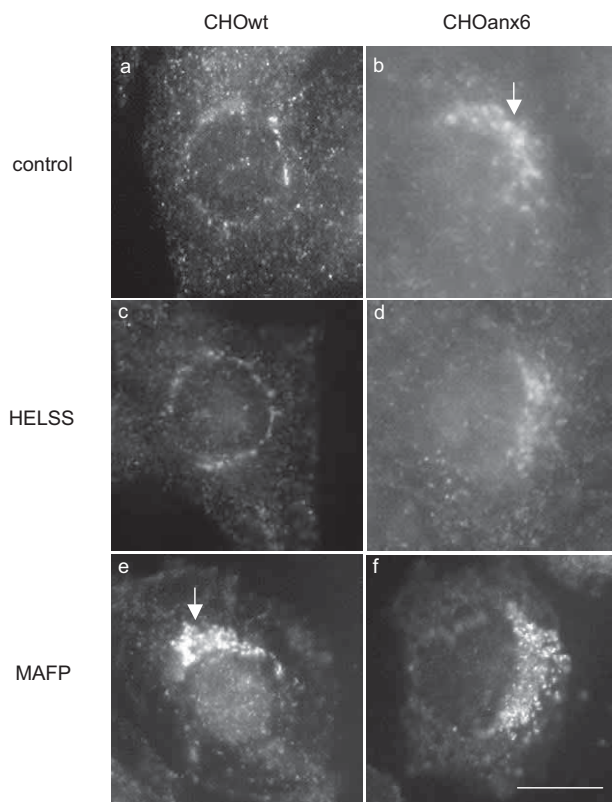


FIGURE 6. CHOwt (*a, c, and e*) and CHOanx6 cells (*b, d, and f*) were grown on coverslips, incubated with and without cPLA₂ inhibitors (HELSS, MAFP), fixed, permeabilized, and immunolabeled with anti-cav-1 as indicated. The incubation of CHOwt cells with MAFP leads to an accumulation of cav-1 in the perinuclear region (see the arrow in *e*) and is similar to the cav-1 staining obtained from CHOanx6 cells under all conditions (compare *e* with *b*).

pared the export of caveolin from the Golgi complex of COS-1 cells with and without MAFP by inverse fluorescence recovery after photobleaching (iFRAP) experiments (16). To measure and visualize the kinetics of caveolin export and to avoid any interference of GFP-tagged cav-1 with endogenous cav-1, we monitored the localization of GFP-tagged cav-3 (GFP-cav3) (trafficking of GFP-cav-1 and GFP-cav-3 is comparable in commonly used cell lines that do not express cav-3) (16, 31). Therefore, COS-1 cells treated with and without MAFP were transfected with GFP-cav3, and the entire cytoplasm except the Golgi region of transfected cells was photobleached. Then, GFP-cav3 trafficking from the Golgi was monitored by confocal microscopy. Results from individual cells were compared, and a representative experiment is shown (Fig. 7A, for quantification see Fig. 7B). As expected, 40 min after photobleaching, $53 \pm 2.23\%$ of GFP-cav3 fluorescence disappeared from the Golgi in COS-1 control cells (mobile fraction, for quantification details see methods), but much slower kinetics for GFP-cav3 export ($8 \pm 2.17\%$, Fig. 7B) from the Golgi were observed in MAFP-treated COS-1 cells, further supporting Ca²⁺-dependent cPLA₂ proteins contributing to promote cav-1 export from the Golgi. In CHOanx6 cells, the inhibitory effect of Anx6 on Golgi export appears specific for caveolin, as kinetics for MAL, a raft-associated integral membrane protein, and EGFR, which is found in lipid rafts and clathrin-coated pits, were identical to CHOwt controls. Interestingly, in these follow-up iFRAP

experiments in COS-1 cells, MAFP-mediated inhibition of cPLA₂ not only inhibited export of GFP-cav3 but also GFP-MAL and GFP-EGFR (Fig. 7B). These findings could point at cell-specific differences in CHO and COS-1 cells with respect to the regulation of Ca²⁺-dependent cPLA₂ proteins. Alternatively, cPLA₂ proteins might act as common regulators of Golgi vesiculation, and modulators, including AnxA6, might interfere only with the activity of cPLA₂ subpopulations, thereby creating specificity in the regulation of protein export from the Golgi in some cell types. However, these experiments would also allow independent pathways of AnxA6 and cPLA₂ interfering with protein transport through the Golgi complex, and future studies will have to clarify this issue.

Although the results shown here and previously (11) implicate a role for AnxA6 in cPLA₂ inhibition via sequestration of cholesterol in late endosomes, other members of the annexin family could also be involved. In particular, annexin A1 (AnxA1) binds to cPLA₂ (31, 32) and has recently been described to regulate membrane transport in the late endosomal compartment (33). To address the specificity of AnxA6-induced effects on cav-1 transport relative to other annexins, we co-transfected COS-1 cells with GFP-cav3 with and without AnxA1 expression vectors and studied if AnxA1 affects cav-3 export from the Golgi complex by means of iFRAP experiments. AnxA1 overexpression did not alter the distribution of cholesterol, as judged by filipin staining (data not shown). In addition, results shown in Fig. 7C clearly demonstrate that the kinetics of GFP-cav3 export from the Golgi are independent of AnxA1 co-overexpression.

Finally, we analyzed the ability of cholesterol upon inhibition of cPLA₂ to induce vesiculation and possibly to re-establish the transport of cav-1 from the Golgi. CHOanx6 cells were treated for 2 h with MAFP with and without cholesterol for 90 min and then stained with cav-1 together with GM130 to visualize the Golgi apparatus. Fig. 8, panels *a, d, and g*, shows the typical pattern of cav-1 accumulation in the Golgi of CHOanx6 cells. Treatment of MAFP had no apparent effect on overall Golgi structure or the accumulation of cav-1 in the Golgi (compare panels *b* with *e* and *h*). The addition of exogenous cholesterol in the presence of MAFP was not sufficient to restore Golgi vesiculation (see panel *h*). However, when cells were preincubated with MAFP followed by extensive washing and removal of MAFP, incubation with cholesterol resulted in a dramatic vesiculation of the Golgi apparatus in CHOanx6 cells (panel *k*). This was accompanied by a redistribution of cav-1 from the Golgi as judged by the appearance of cav-1 staining at the plasma membrane (panel *j*). These results strongly suggest that the exit of cav-1 from the Golgi complex not only requires cholesterol but also functional cPLA₂. In fact, exogenous cholesterol seems to target and compete for the same population of Ca²⁺-dependent cPLA₂ proteins that is inhibited by MAFP. Therefore, the addition of cholesterol cannot re-establish the exit of caveolin from the Golgi complex when MAFP is present and Ca²⁺-dependent cPLA₂ is inhibited (Fig. 8, panel *h*).

DISCUSSION

Data presented in this study support our hypothesis that the concomitant sequestration of cholesterol in late endosomes

by several studies demonstrating that both cPLA₂ and cholesterol are required for the formation of vesicles in the secretory pathway. cPLA₂ has been implicated in Golgi tubulation and vesiculation events (24, 25, 34). Both constitutive and regulated formation of secretory vesicles requires cholesterol. Depletion of cholesterol inhibits the formation of secretory vesicles from the trans-Golgi network (35). Vice versa, increased cellular cholesterol levels induce pronounced vesiculation and dispersal of Golgi-derived vesicles (15). Along these lines, Stüven *et al.* (36) showed that cholesterol levels at the Golgi complex appear precisely balanced to allow protein transport to occur.

It has recently been identified that cholesterol-sensitive cPLA₂ activity (15, 37) correlates with the increased translocation of cPLA₂ to the Golgi apparatus in response to elevation of cellular cholesterol levels (15). Binding of cPLA₂ to Golgi membranes might then facilitate the generation of lysophospholipids, such as lysophosphatidic acid, and stimulate the vesiculation of the Golgi apparatus through the action of C-terminal-binding protein/brefeldin α -ribosylated substrate (34). However, other factors like dynamin (15), the actin cytoskeleton (38), and calmodulin (39) are also involved in this process, suggesting that multifactorial protein-lipid interactions regulate Golgi vesiculation.

Taken together, mechanistically several direct/indirect events seem to converge to block the transport of caveolin in cells expressing elevated levels of AnxA6; first, AnxA6 appears to impair cholesterol transport into Golgi membranes driven by the lysosomal membrane protein NPC1 (11); second, AnxA6-induced reduction of Golgi-cholesterol leads

to the loss of cPLA₂ activity through its displacement from the Golgi membranes. It should be noted that other mechanisms involving the direct binding of AnxA6 to phosphatidylserine-enriched membrane domains in lysosomes, endosomes, or the plasma membrane, thereby affecting cPLA₂ activity and/or late endosomal cholesterol transport, cannot be completely ruled out yet (40). One possible scenario might involve the mem-

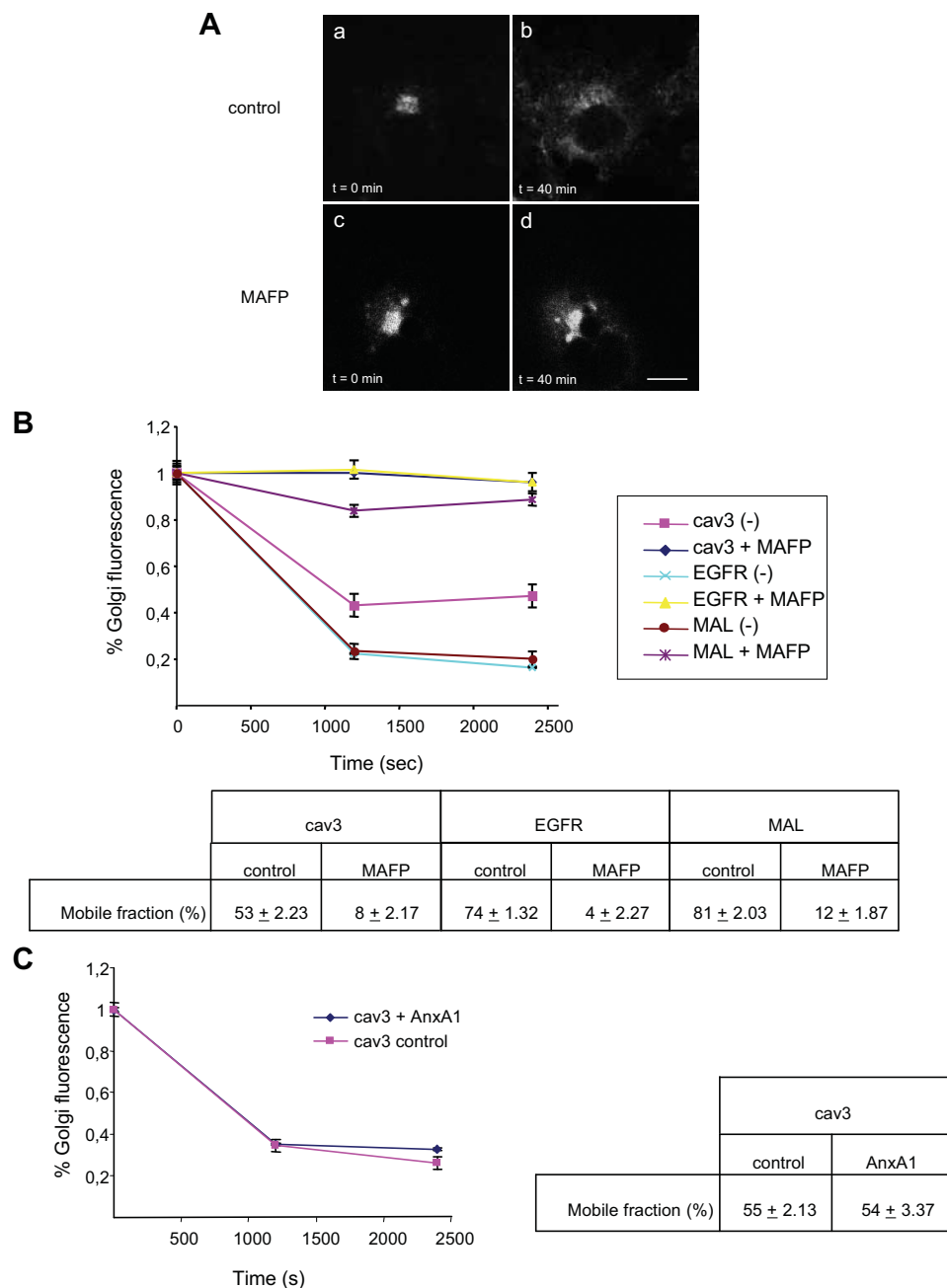


FIGURE 7. Inhibition of cPLA₂ leads to an accumulation of caveolin in the Golgi. *A*, COS-1 cells were transfected with GFP-cav3, treated with and without MAFP as indicated, and imaged before and after photobleaching of the entire cell except for the Golgi region. The loss of fluorescence signal (iFRAP) from the Golgi was monitored for 40 min by time-lapse microscopy. Images were taken every 30 s. *B*, COS-1 cells were transfected with GFP-cav3, GFP-MAL, and GFP-EGFR, treated with and without MAFP as indicated, and imaged before and after photobleaching as described above. The loss of fluorescence signal (iFRAP) from the Golgi was quantified. Kinetic parameters (mobile fraction in % \pm S.D.) for each protein with and without MAFP from four independent experiments are given. *C*, COS-1 cells were co-transfected with GFP-cav3 together with AnxA1 or empty control vector, and the export of GFP-cav3 from the Golgi was determined in iFRAP experiments as described above (for details, see "Experimental Procedures").

together with reduced amounts of cholesterol in Golgi membranes of CHOanx6 cells (11) reduces the activity of cholesterol- and Ca²⁺-dependent cPLA₂, thereby contributing to an accumulation of cav-1 in the Golgi.

The retention of cholesterol in late endosomes of CHOanx6 cells (11) leads to an impaired supply of cholesterol for cPLA₂, thereby interfering with Golgi vesiculation. This is supported

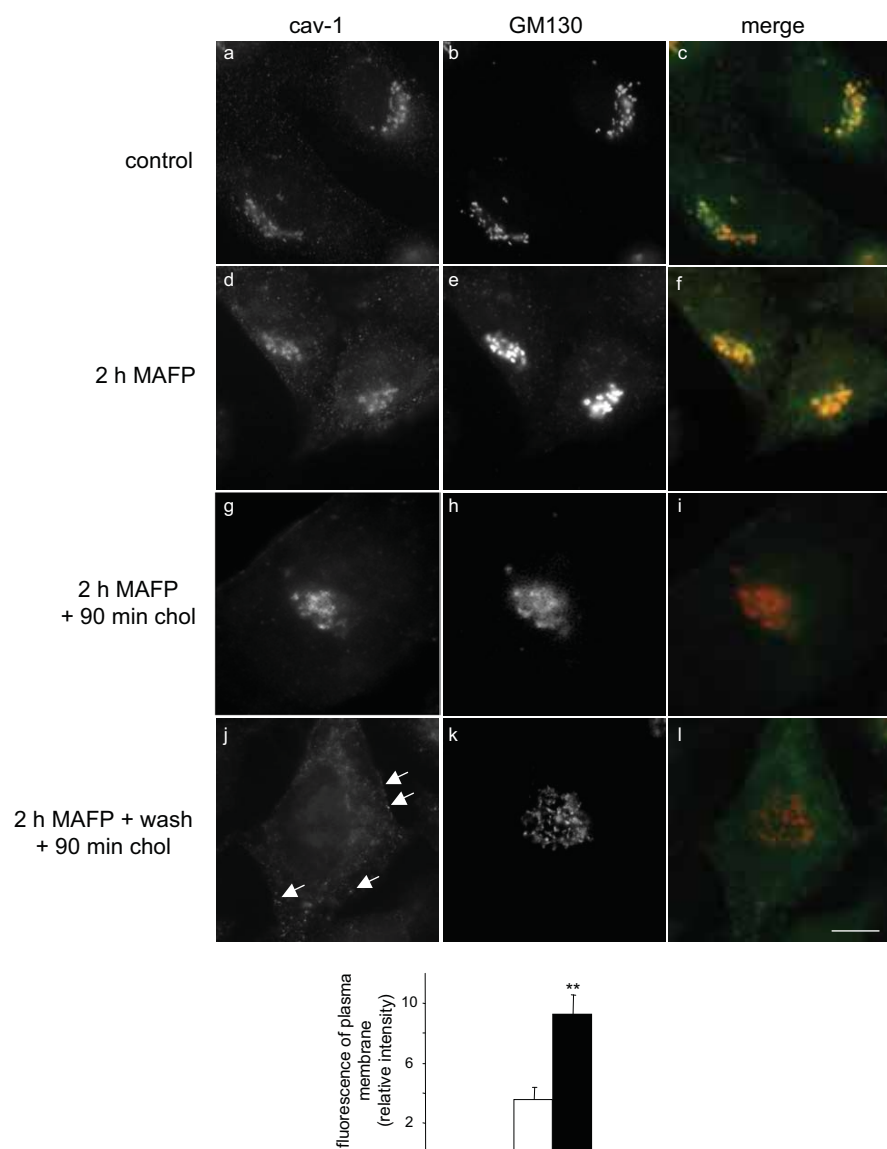


FIGURE 8. Cholesterol restores the ability of cPLA₂ to re-establish Golgi vesiculation in CHOanx6 cells. CHOanx6 cells were grown on coverslips and incubated with and without MAFF and cholesterol (*chol*) as indicated. Cells were fixed, permeabilized, and double-labeled for cav-1 and the Golgi marker GM130 (see "Experimental Procedures" for details). When cPLA₂ was inhibited (panels *d* and *g*), the Golgi is compact (panels *e* and *h*), and cav-1 accumulated in the Golgi complex (panels *d* and *g*). After removing the cPLA₂ inhibitor (panel *j*), the Golgi becomes more vesiculated (panel *k*), and cav-1 is not retained in the Golgi complex anymore (panel *j*). Relative fluorescence intensity at the plasma membrane was calculated by the Image J program (National Institutes of Health). The *white* and *black* bars relate to the average fluorescence intensity (\pm S.D.) of cav-1 in panel *g* and *j*, respectively. Images are representative for three independent experiments. Bar, 10 μ m.

brane recruitment of AnxA6 interfering/competing with constitutive trafficking events determined by tethering and/or SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) proteins, which eventually could arrest membrane transport (41).

We were not able to identify cPLA₂ associated with AnxA6 in pull-down or co-immunoprecipitation experiments. Hence, together with the beneficial effects of exogenous cholesterol on cPLA₂ activity in CHOanx6 cells, a direct inhibitory effect of AnxA6 on cPLA₂ appears unlikely. In contrast, the direct interaction and inhibitory effect of other annexins, including A1, B1, and A5, on cPLA₂ activity has been demonstrated (31, 32). Although we have also been unable to identify AnxA6 in the

Golgi complex, a direct interaction of AnxA6 with cPLA₂ in the cytoplasm or at the plasma membrane cannot completely be ruled yet, thereby trapping cPLA₂ and making it impossible for cPLA₂ to translocate to the Golgi. Finally, and as a further contribution of this study, we have identified that out of the cPLA₂ protein family involved, the cytosolic group IVA phospholipase A₂ α is sensitive to cholesterol diminution at the Golgi. The alteration of cPLA₂ activity and translocation would ultimately not only reduce vesiculation from the Golgi but also down-regulate the availability of newly synthesized cholesterol acceptors, such as cav-1, for vesicular or non-vesicular export of cholesterol from other compartment, such as late endosomes (42). Therefore, this study also provides evidence of a new player, AnxA6, to be indirectly involved in the molecular mechanisms of the secretory pathway. AnxA6 induces an imbalance of intracellular cholesterol, thereby inhibiting cPLA₂ activity, which ultimately regulates the exit of caveolin from the Golgi complex.

Nevertheless, for the regulation of cPLA₂ activity and localization, additional players like the lipidic environment, the actin cytoskeleton, and the direct interaction of the C2 domain of cPLA₂ with other proteins cannot be excluded. Several proteins have been shown to interact with the C2 domain of cPLA₂ *in vitro*, including annexins A1 and A5 (43, 44), vimentin (45), and PLIP (cPLA₂-interacting protein) (46). Nevertheless, their role in the regulation of cPLA₂ is still unclear. Future studies, in particular RNAi knockdown experiments, should help to clarify their contribution in modifying cPLA₂ activity and localization.

From the physiological point of view it is evident that the regulation of caveolin transport to the plasma membrane could have critical consequences in various cellular processes, considering the role of caveolin in the formation of caveolae at the cell surface and the importance of these structures in endocytosis, membrane microdomain formation, lipid transport (including cholesterol efflux), and cellular signaling. Most interestingly, in most cell types caveolin expression is strongly linked to the expression of PTRF-cavin, a recently identified protein that is required for caveolae formation (13, 14). In fact,

caveolin is expressed in prostate cancer PC3 cells and during development of zebrafish notochord, but both model systems lack caveolae, most likely due to their lack of PTRF-cavin expression (13, 14). It is yet unknown if expression levels of other proteins are linked to caveolin function or caveolae formation. However, we recently identified a significant diminution (~60%) in the number of caveolae in EGF receptors overexpressing carcinoma cells (A431) and breast cancer cell lines with high, but not low levels of AnxA6 (11). Future studies will have to clarify if levels of AnxA6 are possibly linked to caveolae formation in development and/or the potential tumor suppressor function of caveolin in some cancers such as breast cancer.

Acknowledgments—We thank the confocal Microscopy Facility of Serveis Científicotècnics (SCT-UB-IDIBARS) for support and advice on confocal techniques.

REFERENCES

- Raynal, P., and Pollard, H. B. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 63–93
- Gerke, V., Creutz, C. E., and Moss, S. E. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 449–461
- Grewal, T., and Enrich, C. (2006) *BioEssays* **28**, 1211–1220
- Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U., and Jackle, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33806–33813
- Kamal, A., Ying, Y., and Anderson, R. G. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 937–947
- Pons, M., Grewal, T., Rius, E., Schnitgerhans, T., Jackle, S., and Enrich, C. (2001) *Exp. Cell Res.* **269**, 13–22
- de Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Heeren, J., Beisiegel, U., Enrich, C., and Grewal, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32187–32194
- Rentero, C., Evans, R., Wood, P., Tebar, F., Vila de Muga, S., Cubells, L., de Diego, I., Hayes, T. E., Hughes, W. E., Pol, A., Rye, K. A., Enrich, C., and Grewal, T. (2006) *Cell. Signal.* **18**, 1006–1016
- Grewal, T., Evans, R., Rentero, C., Tebar, F., Cubells, L., de Diego, I., Kirchhoff, M. F., Hughes, W. E., Heeren, J., Rye, K. A., Rinninger, F., Daly, R. J., Pol, A., and Enrich, C. (2005) *Oncogene* **24**, 5809–5820
- Gerke, V., and Moss, S. E. (2002) *Physiol. Rev.* **82**, 331–371
- Cubells, L., Vila de Muga, S., Tebar, F., Wood, P., Evans, R., Ingelmo-Torres, M., Calvo, M., Gaus, K., Pol, A., Grewal, T., and Enrich, C. (2007) *Traffic* **8**, 1568–1589
- Choudhury, A., Marks, D. L., Proctor, K. M., Gould, G. W., and Pagano, R. E. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 317–328
- Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V. M., Martin, S., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (2008) *Cell* **132**, 113–124
- Liu, L., and Pilch, P. F. (2007) *J. Biol. Chem.* **283**, 4314–4322
- Grimmer, S., Ying, M., Walchli, S., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2005) *Traffic* **6**, 144–156
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., and Parton, R. G. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 2091–2105
- Llado, A., Tebar, F., Calvo, M., Moreto, J., Sorkin, A., and Enrich, C. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 4877–4891
- Casas, J., Gijon, M. A., Vigo, A. G., Crespo, M. S., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6106–6116
- Pons, M., Ihrke, G., Koch, S., Biermer, M., Pol, A., Grewal, T., Jackle, S., and Enrich, C. (2000) *Exp. Cell Res.* **257**, 33–47
- Rabut, G., and Ellenberg, J. (2005) in *Live Imaging: A Laboratory Manual* (Goldman, R. D., and Spector, D. L., eds) pp. 101–126, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A., and Rothman, J. E. (1984) *Cell* **39**, 405–416
- Brügger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J. B., Lehmann, W. D., Nickel, W., and Wieland, F. T. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 507–518
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
- de Figueiredo, P., Drecktrah, D., Polizotto, R. S., Cole, N. B., Lippincott-Schwartz, J., and Brown, W. J. (2000) *Traffic* **1**, 504–511
- de Figueiredo, P., Drecktrah, D., Katzenellenbogen, J. A., Strang, M., and Brown, W. J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8642–8647
- Ghosh, M., Loper, R., Ghomashchi, F., Tucker, D. E., Bonventre, J. V., Gelb, M. H., and Leslie, C. C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 11676–11686
- Evans, J. H., and Leslie, C. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 6005–6016
- Pettus, B. J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Leslie, C. C., Evans, J. H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y. A., and Chalfant, C. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11320–11326
- Herbert, S. P., Ponnambalam, S., and Walker, J. H. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 3800–3809
- Kim, S. W., Rhee, H. J., Ko, J., Kim, Y. J., Kim, H. G., Yang, J. M., Choi, E. C., and Na, D. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15712–15719
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 98–105
- Kim, S., Ko, J., Kim, J. H., Choi, E. C., and Na, D. S. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 243–248
- White, I. J., Bailey, L. M., Aghakhani, M. R., Moss, S. E., and Futter, C. E. (2006) *EMBO J.* **25**, 1–12
- Brown, W. J., Chambers, K., and Doody, A. (2003) *Traffic* **4**, 214–221
- Wang, Y., Thiele, C., and Huttner, W. B. (2000) *Traffic* **1**, 952–962
- Stüven, E., Porat, A., Shimron, F., Fass, E., Kaloyanova, D., Brugger, B., Wieland, F. T., Elazar, Z., and Helms, J. B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 53112–53122
- Klapisz, E., Masliah, J., Bereziat, G., Wolf, C., and Koumanov, K. S. (2000) *J. Lipid Res.* **41**, 1680–1688
- Egea, G., Lazaro-Dieguez, F., and Vilella, M. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–178
- Tebar, F., Villalonga, P., Sorkina, T., Agell, N., Sorkin, A., and Enrich, C. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 2057–2068
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silviu, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008) *Science* **319**, 210–213
- Sehgal, P. B., Mukhopadhyay, S., Xu, F., Patel, K., and Shah, M. (2007) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, 1526–1542
- Maxfield, F. R., and Wustner, D. (2002) *J. Clin. Investig.* **110**, 891–898
- Solito, E., Raguene-Nicol, C., de Coupade, C., Bisagni-Faure, A., and Russo-Marie, F. (1998) *Br. J. Pharmacol.* **124**, 1675–1683
- Buckland, A. G., and Wilton, D. C. (1998) *Biochem. J.* **329**, 369–372
- Nakatani, Y., Tanioka, T., Sunaga, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1161–1168
- Sheridan, A. M., Force, T., Yoon, H. J., O'Leary, E., Choukroun, G., Taheri, M. R., and Bonventre, J. V. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4470–4481

ANNEX Esfingolípids i NPC

Aquest bloc d'experiments es va dur a terme al laboratori de la Prof. Elina Ikonen, a l'institut *Biomedicum* de Helsinki, Finlàndia.

L'acumulació de colesterol a les CHOAnx6 no depèn de les lipoproteïnes del medi.

Si les cèl.lules són dejunades per a lipoproteïnes (es fan créixer en medi DMEM amb 10% LPDS, *lipoprotein deficient serum*, sense cap altre factor de creixement), es pot comprovar com l'acumulació de colesterol als endosomes tardans no desapareix en les CHOAnx6 (Fig.1).

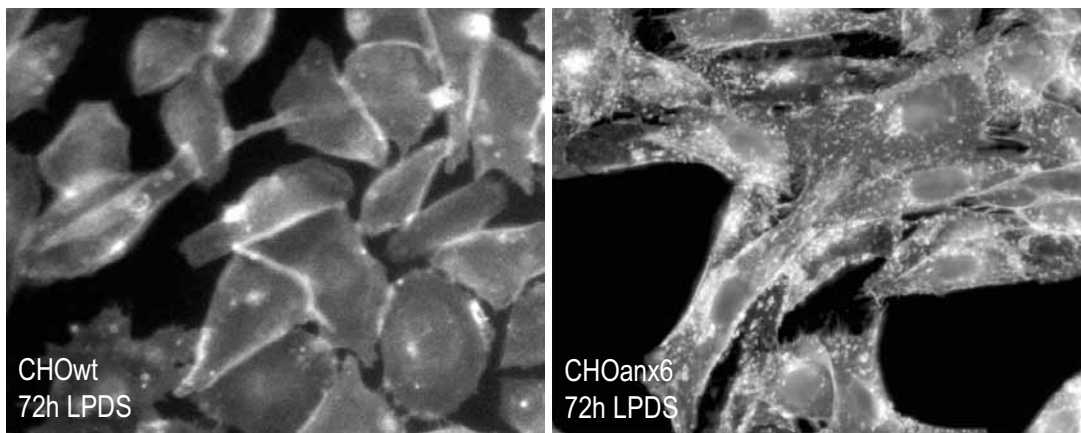


Fig 1. Dejuni amb LPDS durant 72h i marcatge amb filipina.

Això confirma que hi ha un defecte o bloqueig en la sortida de colesterol des del compartiment endocític tardà. Tal com es veu a la Fig.1, en CHOAnx6 el colesterol continua acumulat als LE després de 72h de dejuni.

L'arribada de colesterol fins a LE no està afectada en CHOAnx6.

Un altre punt important és saber si en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 entra més colesterol, i s'acumula als endosomes tardans, simplement per un increment de l'endocitosi. Per analitzar això es van incubar cèl.lules CHOwt i CHOAnx6 amb LDL (com s'ha vist anteriorment el colesterol dels LE arriba via LDL) marcat amb un fluoròfor (DiI-LDL). Com es pot veure a la quantificació, la internalització d'LDL no varia entre CHOwt i CHOAnx6 (fluorescència als 10 minuts), i tampoc ho fa a temps llargs, que representa la ruta per tot el compartiment endocític (6h) (Fig.2).

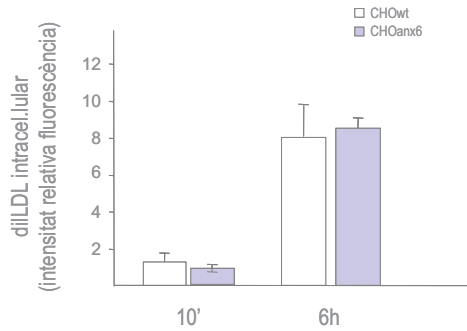


Fig 2. Quantificació de l'LDL internalitzat.

Per tant, es pot descartar que la diferència en el tràfic de colesterol des dels endosomes tardans als lisosomes es degui a una diferència en la captació d'LDL.

Anàlisi de l'efecte de l'Anx6 en cèl.lules NPC.

Les conseqüències de l'exportació alterada de colesterol també es van voler analitzar en cèl.lules NPC (*Niemann-Pick cells*). Cèl.lules CHO amb una mutació funcional a la proteïna NPC1 (CHOM12) es van transfectar de forma transitòria amb Anx6-GFP i es van fixar i marcar amb filipina (Fig.3A). Les cèl.lules CHOM12 acumulen grans quantitats de colesterol, però en canvi les cèl.lules CHOM12 transfectades amb Anx6 sembla que presentin una acumulació de colesterol diferent, una població d'endosomes heterogènia en mida i morfologia, a diferència de les CHOM12 no transfectades que tenen tots els LE molt semblants i al voltant del nucli (Fig.3A.). A més, es van transfectar fibroblasts 3123 que són deficientes per NPC1, i es veia també un canvi en el patró d'endosomes positius per filipina en fibroblasts no transfectats amb Anx6 (Fig.3B,a) comparats amb els que s'havien transfectat (Fig.3B,b).

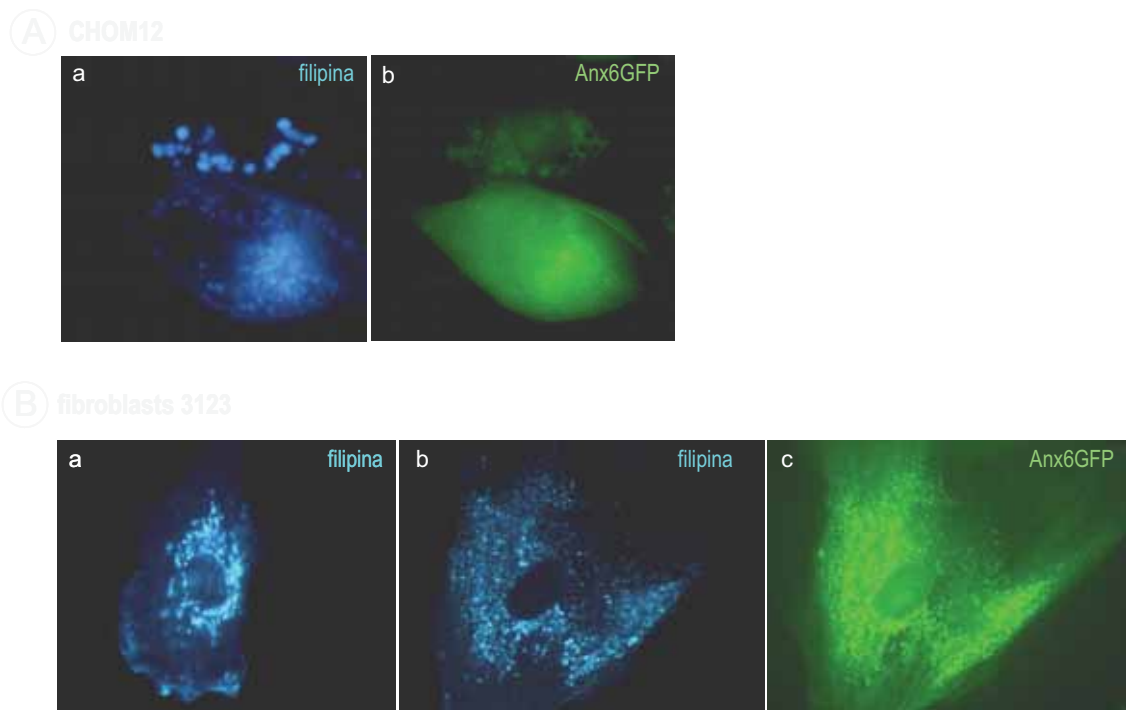


Fig 3. A) CHOM12 transfectades amb Anx6-GFP i marcades amb filipina. B) a. Fibroblasts 3123 control. Fibroblasts 3123 transfectats amb Anx6-GFP (c), marcats amb filipina (b).

Els marcatges d'Anx6 i filipina en fibroblasts 3123 no colocalitzen totalment, recolzant la idea de que hi ha poblacions diferents d'endosomes on s'acumula el colesterol. Així, podem veure endosomes que només tenen Anx6, endosomes que només tenen filipina, i endosomes positius per tots dos marcatges (Fig.4). És important destacar que l'Anx6 continua anant als endosomes tardans i s'hi continua acumulant colesterol tot i l'absència total d'NPC1.

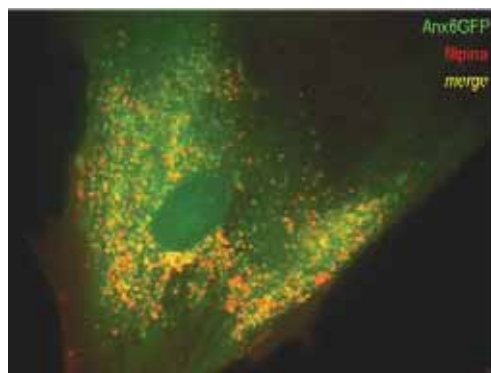


Fig 4. Colocalització parcial entre AnxGFP i filipina en fibroblasts deficients per NPC1.

Al treball previ (Article 1), es demostra que l'Anx6 i l'NPC1 (l'NPC1 salvatge o *wildtype*) colocalitzen als LE, i que l'Anx6 i aquest NPC1 (NPC1wt-GFP) co-immunoprecipiten, indicant que sí que es dona una interacció entre les dues proteïnes, si més no, entre les formes salvatges transfectades. Es va voler ampliar aquest punt, estudiant si les proteïnes endògenes immunoprecipitaven. L'Anx6 endògena i l'NPC1wt (*wildtype*) endogen també co-immunoprecipiten, tant en CHOwt com en CHOAnx6, demostrant que la interacció no depèn dels nivells elevats d'Anx6 en la línia que en sobreexpressa, i que per tant pot existir una connexió funcional entre les dues proteïnes independent de la sobreexpressió. Aquesta interacció sí que depèn de que la proteïna NPC1 no estigui mutada, ja que no coimmunoprecipiten en CHOM12 (Fig.5).

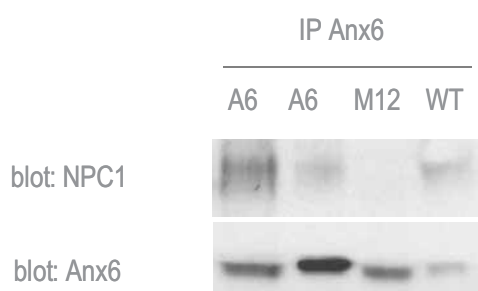


Fig 5. Coimmunoprecipitació NPC1/Anx6.

Acumulació d'esfingolípids en cèl.lules CHOAnx6

En la síndrome de Niemann-Pick, les cèl.lules afectades pateixen una acumulació d'esfingolípids a més de l'acumulació de colesterol lliure als LE/lisosomes. Com s'ha demostrat, la sobreexpressió d'Anx6 provoca una acumulació de colesterol lliure al compartiment endocític tardà, tot i que la morfologia dels endosomes tardans positius per filipina és diferent (Fig.6). L'acumulació de colesterol lliure i la interacció de l'Anx6 amb NPC1 fan pensar en un paral·lelisme entre ambdós fenotips. Es van analitzar els esfingolípids en CHOAnx6, per veure si també s'acumulaven com en cèl.lules NPC.

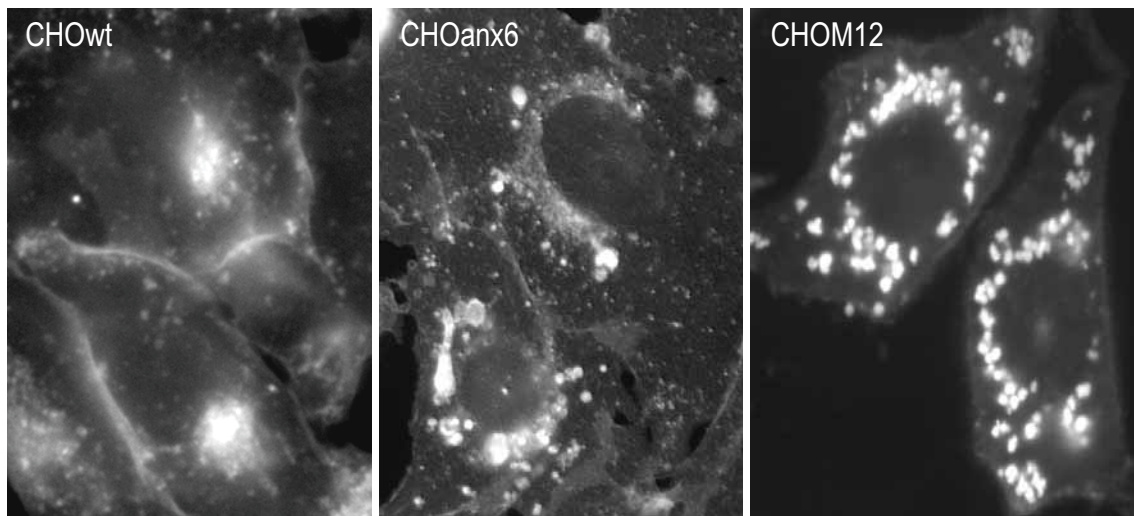


Fig 6. Diferències entre els patrons de filipina en CHOwt/CHOAnx6/CHOM12 (cèl.lules NPC).

Per estudiar el tràfic i/o la localització d'esfingolípids, es varen incubar les cèl.lules durant 19h amb lactosil-ceramida (esfingolípids, veure Fig.9) unida a una sonda fluorescent (BODIPY). Aquest mètode és el que s'utilitza per seguir el tràfic de la lactosil-ceramida (LacCer) al llarg de tot el compartiment endocític i comprovar si es degrada correctament [Kiss RS *et al*, 2006]. Com es veu a la Fig.7, hi ha un marcatge difús de BODIPY-LacCer en CHOwt mentre que en CHOAnx6 s'acumula en vesícules que es distribueixen per tota la cèl.lula.

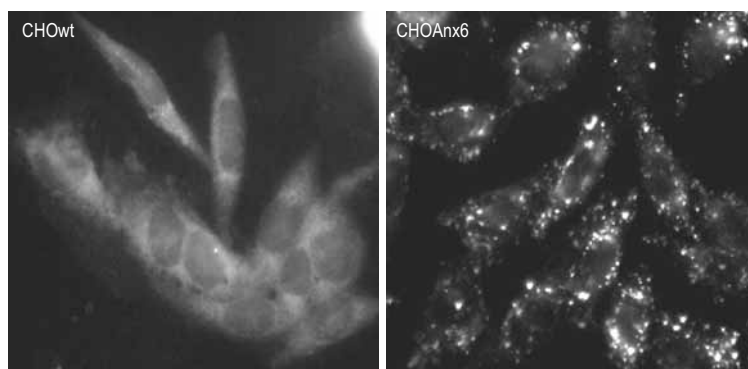


Fig 7. BODIPY-LacCer en CHOwt i CHOAnx6. Temps d'incubació:19h.

Per confirmar aquests resultats d'immunofluorescència, es van analitzar mostres de CHOwt i CHOAnx6 per HPLC per a quantificar els metabòlits provinents de la lactosil-ceramida que hi havia (glucosil-ceramida). La quantitat de glucosil-ceramida està reduïda en CHOAnx6, confirmant que hi ha una inhibició de la degradació de la lactosil-ceramida en aquestes cèl.lules (Fig.8). En CHOAnx6 s'acumula la lactosil-ceramida i en canvi el seu producte immediat de degradació (glucosil-ceramida) disminueix.

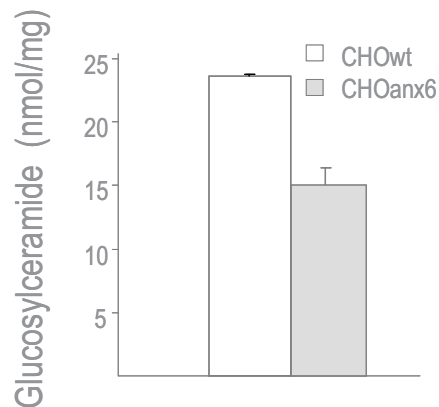


Fig 8. Nivells del producte immediat de degradació de la LacCer mesurats per HPLC.

Per comprovar que l'entrada de LacCer no és diferent entre CHOwt i CHOAnx6, es van incubar les cèl.lules de nou amb BODIPY-LacCer però aquest cop només durant 30 minuts [Pagano RE *et al*, 2000]. En aquest temps, no hi havia diferències entre els dos tipus cel.lulars (no es mostra aquest resultat). Això sembla indicar que l'acumulació es deu a algun defecte localitzat en els últims compartiments endocítics (LE-lisosomes) de les CHOAnx6.

La sobreexpressió d'Anx6 afecta el tràfic de la maquinària de degradació d'esfingolípids.

Si l'acumulació de colesterol als LE no es produeix per un increment en l'entrada d'LDL, i no es pot explicar únicament per la interacció amb el transportador de colesterol NPC1 als LE, doncs es segueix observant en cèl.lules deficientes per a NPC1, podria resultar ser un efecte secundari de l'acumulació d'esfingolípids, com s'ha publicat que passa en cèl.lules NPC. Perquè s'acumulen els esfingolípids? Probablement, per un defecte en la seva degradació. Els glucoesfingolípids (com la lactosil-ceramida) es degraden als lisosomes, i concretament l'esfingolípids que s'acumula en les CHOAnx6 (la lactosil-ceramida) és degradada als lisosomes pels enzims GalCer- β -galactosidasa i GM1- β -galactosidasa, que necessiten uns cofactors per a ser actius anomenats saposines. (Fig.9) [Kolter T, Sandhoff K 2005; Kolter T, Sandhoff K 2006].

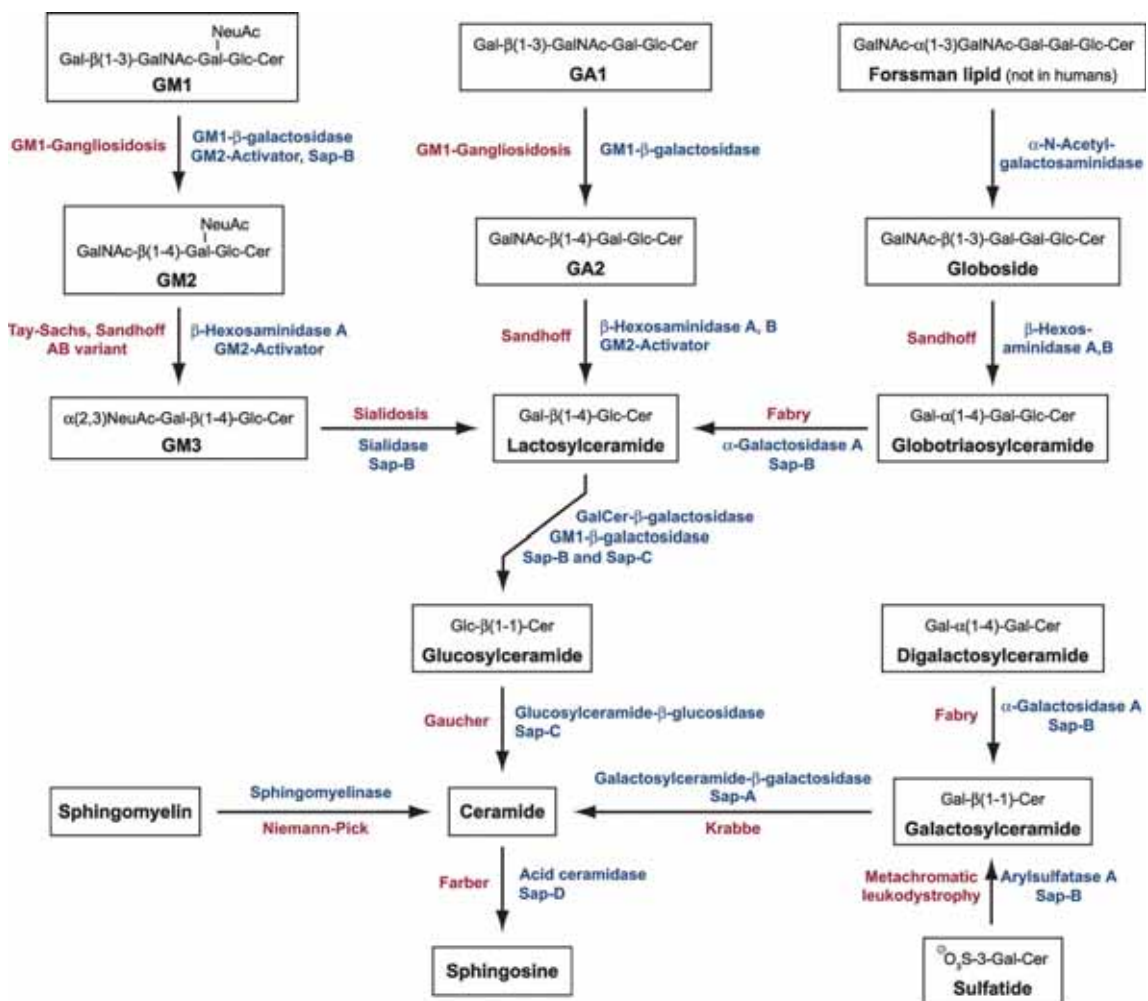


Fig 9. Degradació dels esfingolípids als lisosomes de les cèl.lules [Kolter T, Sandhoff K 2005]

Aquestes saposines són transportades en forma de precursor (prosaposina) des de la membrana plasmàtica fins als lisosomes. El transport d'aquesta proforma depèn del receptor LRP (LDL receptor-related-protein), un receptor de la família del receptor d'LDL.

S'activa a la membrana plasmàtica per unió de lligand, s'internalitza, i un cop a dins recluta la prosaposina que va amb el receptor fins als lisosomes, on és processada. S'obtenen les quatre saposines (A, B, C i D) que permeten que els enzims puguin degradar els esfingolípids.

Ens va semblar interessant estudiar la localització i el tràfic del receptor LRP en les nostres cèl.lules CHOAnx6, doncs si l'arribada d'aquest receptor als lisosomes estava afectada això podria explicar l'acumulació d'esfingolípids (no es podrien degradar) que alhora causaria l'acumulació de colesterol als LE. L'LRP és de la família del receptor d'LDL, que ja s'havia relacionat anteriorment amb l'Anx6, i això feia molt interessant la hipòtesi, doncs si l'Anx6 estimulava el tràfic del receptor d'LDL fins als lisosomes [Pons M *et al*, 2001a], podria fer el mateix amb l'LRP.

Es van transfectar cèl.lules COS amb LRP-GFP i es va veure que localitzava on s'esperava, sobretot a la membrana plasmàtica (Fig.10 A). En canvi, quan es cotransfectava LRP-GFP i Anx6, la localització del receptor era totalment diferent, colocalitzava amb l'Anx6 en unes estructures vesiculars a l'interior de la cèl.lula, indicant que l'Anx6 modificava el transport (o si més no la localització) del l'LRP (Fig.10 B). A més, si es cotransfectava l'LRP amb un mutant de l'Anx6, el patró d'LRP també és diferent, es veu acumulat de forma aberrant a dins d'unes vesícules intracel.lulars no identificades (no es mostra).

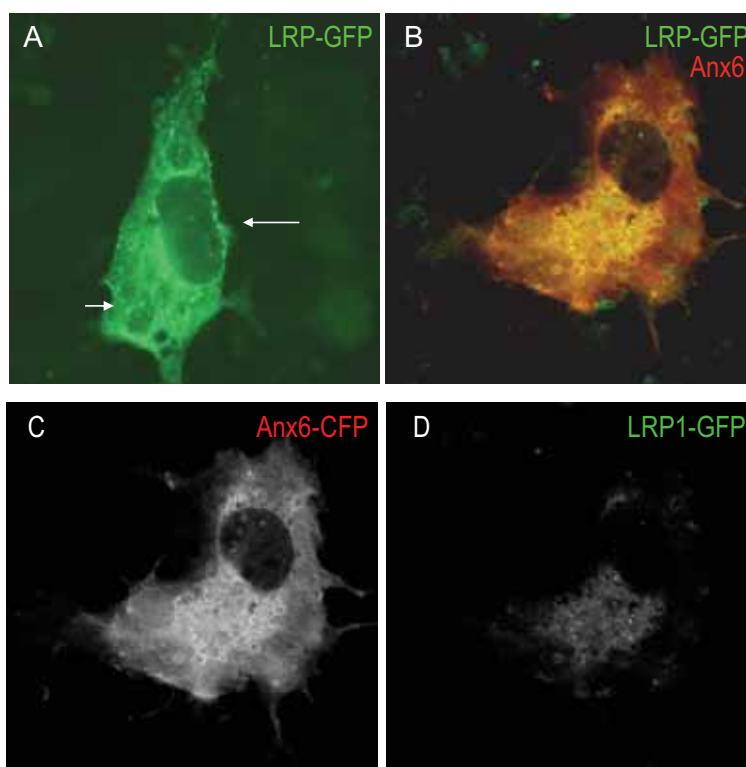


Fig 10. A) cèl.lules COS transfectades amb LRP1-GFP. B) cèl.lules COS cotransfectades amb LRP1-GFP i Anx6-CFP (*merge*) C) Anx6-CFP D) LRP-GFP.

Per poder estudiar el tràfic d'aquest receptor, es va utilitzar un dels seus lligands principals, l' α 2M (alfa -2- macroglobulina) [Kiss RS *et al*, 2006; Cubells L *et al*, 2007], conjugat amb el fluoròfor *cianina-3* (cya3). Si es segueix el tràfic d'aquest lligand comparant-lo entre CHOwt i CHOAnx6, es veu que mentre que en CHOwt el seu transport és normal (als 10 minuts s'ha internalitzat i està al compartiment endocític, d'on pràcticament ha desaparegut als 60 minuts), en CHOAnx6 tot i que s'internalitza igual després no desapareix, i s'acumula en estructures intracel.lulars vesiculars (Fig.11). Això sembla indicar que el tràfic de l'LRP pot ser defectuós en CHOAnx6.

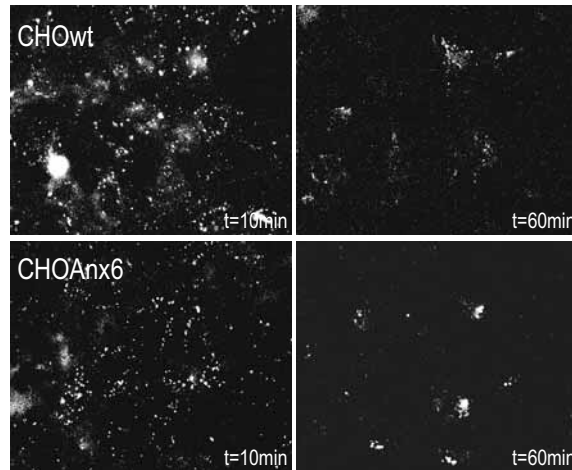


Fig 11. Seguiment de la internalització i tràfic d' α 2M-cya3 en CHOwt i CHOAnx6.

També es va analitzar el grau de colocalització d' α 2M amb un marcador lisosomal (LAMP1). S'esperaria que tot el lligand colocalitzés amb el marcador, indicant que ha arribat al compartiment lisosomal des de la membrana. En cèl.lules CHOwt això és el que es veu, però en CHOAnx6, tot i que hi ha una part de l' α 2M que ha arribat als lisosomes i per tant colocalitza amb LAMP, hi ha molta α 2M que no ha arribat formant unes vesícules heterogènies a sota la membrana plasmàtica. Tot i que només hi ha un treball que en parla, està publicat que l'Anx6 s'uneix a α 2M.

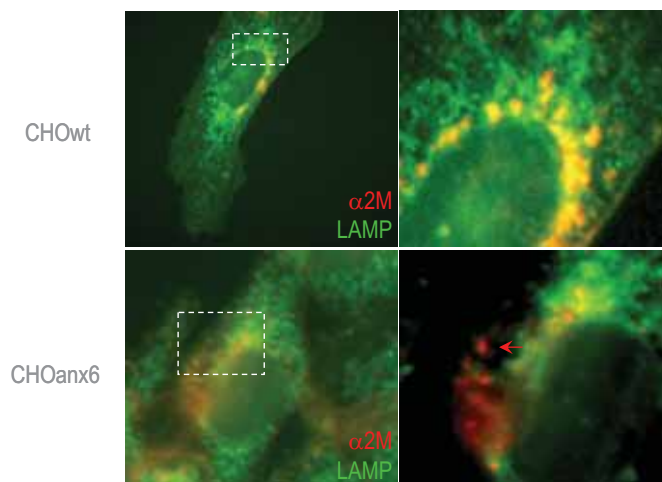


Fig 12. Colocalització de l' α 2M amb el marcador lisosomal LAMP. En els marcs de la dreta es mostra una magnificació de l'àrea senyalada amb la línia discontinua.

El colesterol i els esfingolípid s'acumulen en compartiments diferents.

Finalment, per tal de comparar la població d'endosomes que acumulava colesterol lliure (LE) descrita a [Cubells L *et al*, 2007] amb la població d'endosomes o lisosomes on s'acumulaven els esfingolípid, es va fer un doble marcatge en cèl.lules CHOwt i CHOAnx6 amb filipina i BODIPY-LacCer.

Tot i que el fet que els dos marcatges siguin molt brillants fa difícil obtenir bones imatges sense sobre exposar-les, es mostra una imatge d'un únic pla focal, on sembla que en principi es tractaria de compartiments endocítics diferents (Fig.13). No hi ha pràcticament colocalització i el patró és diferent en general. A més a més, no es veu acumulació en vesícules d'esfingolípid (i tampoc de colesterol) en cèl.lules CHOwt, fet que permet descartar una acumulació artefactual, si no hi ha molta Anx6 no s'acumulen ni esfingolípid ni colesterol lliure.

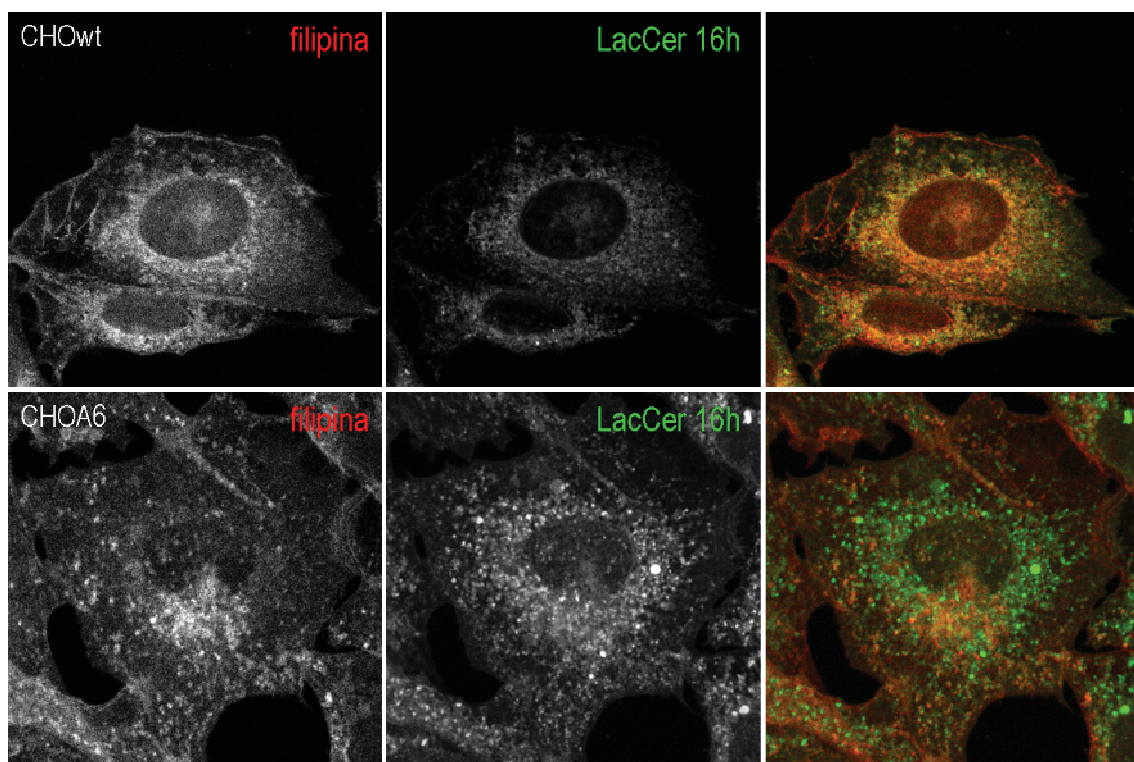


Fig 13. Doble marcatge amb filipina i BODIPY-LacCer en CHOwt i CHOAnx6.

“En el dubte està la ciència”
Dr. F. Tebar



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

En aquest treball fonamentalment s'ha relacionat l'Anx6 amb dos nous aspectes: primer, s'ha demostrat que en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 existeix un desequilibri en el transport de colesterol, i el colesterol es queda atrapat als LE. Segon, com a conseqüència d'aquesta retenció la vesiculació del Golgi dependent de colesterol i cPLA₂ està inhibida, fent que la caveolina no pugui sortir del Golgi i arribar a la membrana plasmàtica. El model es pot esquematzar de la següent manera: (Fig.1)

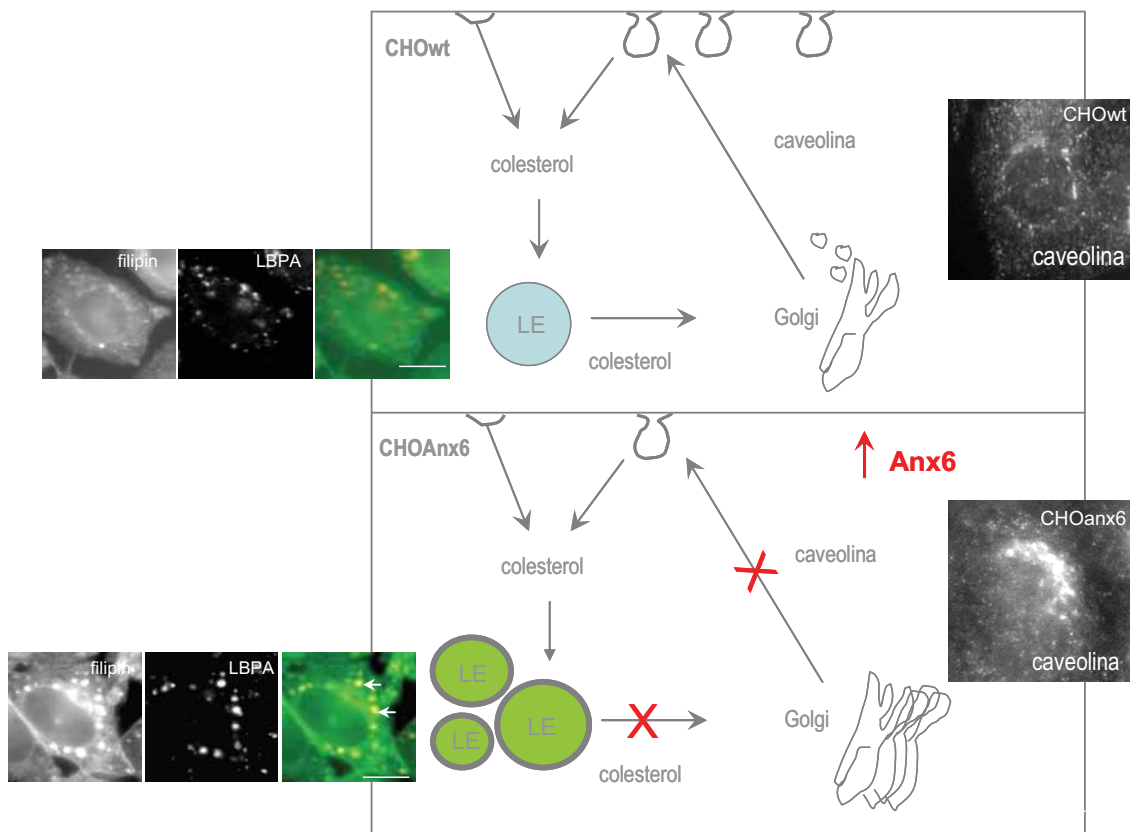


Fig 1. Model dels efectes provocats per l'Anx6 sobre el transport de colesterol i caveolina.

A partir d'aquestes evidències, i totes les evidències anteriors, quina podria ser, doncs, la funció biològica de l'Anx6? Podem atribuir tots els efectes de l'Anx6 als diferents compartiments a una funció biològica concreta? Probablement, no existeix aquesta "única funció", sinó que són moltes funcions diferents, que totes són reals depenent de la localització, com en l'acudit dels dos físics que no aconsegueixen posar-se mai d'acord sobre quina és la posició d'un electró, perquè sempre està en moviment. La premissa "una proteïna, una funció" ja fa molt de temps que no és vàlida. Si el genoma ha revelat que entre espècies les diferències gèniques són mínimes, està clar que les cèl.lules han d'utilitzar una mateixa proteïna per a diferents funcions, a partir de regulacions i reguladors cada cop semblen ser més complexes, imbricats i precisos.

En un intent d'agrupar les diferents evidències de l'Anx6 en causes i conseqüències, hom pot arribar a dues possibles raons simples que explicarien el bloqueig del transport intracel·lular de colesterol en cèl·lules que sobreexpressen Anx6:

- 1- L'Anx6 bloqueja directament el transport de colesterol.
- 2- El colesterol s'acumula com a efecte secundari; L'Anx6 bloqueja indirectament la maquinària de transport de colesterol.

OPCIÓ 1: BLOQUEIG DIRECTE SOBRE EL TRANSPORT DE COLESTEROL

I- Bloqueig de transportadors de colesterol als LE

Ja s'han descrit a la literatura dos models de bloqueig directe del transport de colesterol, en els que es produeix un fenotip semblant al de cèl·lules amb nivells alts d'Anx6. Són el dominant negatiu de la caveolina (cav^{DGV}) i les mutacions o deficiència de les proteïnes NPC1/NPC2.

■ BLOQUEIG DEL TRANSPORT DE COLESTEROL PER LA CAV^{DGV}

La caveolina es queda retinguda al Golgi en cèl·lules CHOAnx6, i en els treballs publicats sobre l'efecte del dominant negatiu de la caveolina (cav^{DGV}) es demostra que també s'hi acumula; aquesta clara similitud no aporta cap novetat conceptual important, ja que la cav^{DGV} té delecionada una regió a l'extrem N-terminal, però té intacte l'extrem C-terminal que està descrit que és la regió necessària per a la unió de la caveolina al cis-Golgi [Luetterforst R *et al*, 1999; Ren X *et al*, 2004]. De totes maneres, sí que és important el fet que la manca de tràfic Golgi-membrana d'aquest mutant produeixi una acumulació de colesterol als LE, i una disminució de colesterol a la membrana plasmàtica [Pol A *et al*, 2001]. També s'observa en cèl·lules transfectades amb la cav^{DGV} una reducció en el nombre de caveoles a la membrana plasmàtica. Aquests efectes comuns entre la cav^{DGV} (que no surt del Golgi) i la caveolina en cèl·lules CHOAnx6 (que tampoc ho fa amb normalitat) semblen confirmar que la disminució en el nombre de caveoles observada en els nostres models cel·lulars amb nivells alts d'Anx6 i la corresponent disminució de colesterol a la membrana plasmàtica es deuen directament a aquest bloqueig en la sortida de caveolina del Golgi. Com ja s'ha mencionat a la introducció, la caveolina participa en el transport de colesterol fins a la membrana. No pot realitzar aquest trajecte sense unir-se al colesterol, que alhora necessita estar unit a la caveolina per arribar a la membrana.

Les alteracions en el trànsit de la caveolina que es donen quan aquesta caveolina no és funcional, com la cav^{DGV} , tenen diferents conseqüències sobre les cascades de senyalització que depenen dels nivells de colesterol a la membrana plasmàtica, com la via d'H-Ras. En cèl·lules que expressen la cav^{DGV} l'activació de Raf1 per H-Ras està inhibida, i per tant es redueix la taxa de creixement cel·lular estimulada per factors de creixement [Roy S *et al* 1999]. Això encaixa perfectament amb la reducció de l'activació via HDL de Raf1 per part d'H-Ras que s'ha demostrat en cèl·lules CHOAnx6 [Rentero C *et al*, 2006]. També hi ha treballs publicats que demostren una inhibició d'aquesta via Ras/MAPK en una altra línia cel·lular (A431) quan sobreexpressa Anx6 [Theobald J *et al*, 1995; Theobald J *et al*, 1994].

Establint aquesta comparació entre els efectes d'una caveolina no funcional (per deleció d'un fragment N-terminal o retinguda al Golgi per efecte de l'Anx6) es confirma la necessitat d'un correcte transport de caveolina des del Golgi cap a la membrana. Si aquest transport deixa de funcionar amb normalitat, la cèl.lula veu afectats processos tan importants com la proliferació regulada per la senyalització dependent de factors de creixement que s'uneixen a receptors situats a les caveoles. El nombre de caveoles i la integritat d'aquestes és bàsic per a un correcte creixement cel.lular, com ja s'ha exposat a la introducció.

De totes maneres, hi ha un punt fosc en aquest paral·lelisme, i és l'origen del colesterol acumulat. En el nostre model de sobreexpressió d'Anx6, s'ha postulat que el colesterol acumulat als LE és colesterol provinent de les LDL endocitades, que en la seva ruta habitual pel compartiment endocític han alliberat el colesterol per acció d'una lipasa abans d'entrar als LE (Fig.2). Però un cop el colesterol lliure ha entrat als LE hi queda atrapat i no en pot sortir. Hi ha un defecte en la sortida de colesterol des dels LE, que no seguirà el seu destí fins al Golgi, on s'uniria a la caveolina i viatjaria amb ella fins a la membrana plasmàtica. En el cas de la cav^{DGV}, en canvi, aquest colesterol no es queda atrapat als LE per acció de l'Anx6, sinó que s'hi deu acumular per un mecanisme de *feedback* alimentat per la caveolina no funcional: en condicions fisiològiques el colesterol surt dels LE sense problema i arriba al Golgi, però com que la caveolina mutant no s'hi pot unir i emportar-se'l, aquests nivells elevats de colesterol lliure activen els sensors intracel.lulars que redueixen l'efluxió de colesterol lliure des de la membrana plasmàtica per no reduir-ne encara més els nivells, i també es redueix la síntesi de colesterol *de novo*, tot plegat modificant la distribució intracel.lular del colesterol que hi ha i tornant-lo als LE des d'on serà redistribuït o esterificat per formar cossos lipídics [Pol A *et al*, 2001]. Aquest dominant negatiu de caveolina, a més, s'associa majoritàriament als cossos lipídics, i en disminueix la motilitat depenent de microtúbuls [Pol A *et al*, 2004] atribuint a la caveolina salvatge un paper en la formació i estabilització dels cossos lipídics, als que s'associa en canvi de forma dinàmica i reversible en resposta a un tractament amb àcids grassos. En resum, el desequilibri de colesterol que hi ha en una cèl.lula com a resposta a la pèrdua de funcionalitat de la caveolina és molt més complex que un simple i concret bloqueig en la sortida de colesterol lliure provinent d'LDL dels LE, mecanisme que en principi estem pensant que causa la sobreexpressió d'Anx6.

■ BLOQUEIG DEL TRANSPORT PER DISFUNCIÓ D'NPC1

La mutació en la proteïna NPC1 té un efecte directe sobre la sortida de colesterol dels endosomes tardans. La funció d'NPC1 és precisament la de treure el colesterol dels LE (col.laborant amb NPC2) i portar-lo fins al reticle o fins al Golgi, des d'on el colesterol continuarà fins a la membrana plasmàtica [Chang TY *et al*, 2006; Cheruku SR *et al*, 2006]. En cèl.lules *knockout* per NPC1 (3123) o amb l'NPC1 mutat (CHOM12), el colesterol lliure no pot sortir dels LE i s'hi acumula, formant uns endosomes aberrants positius per filipina. Aquest colesterol prové de les LDL, en principi com el que s'acumula als endosomes tardans en CHOAnx6. La ruta del colesterol provinent de les LDL, es podria esquematitzar així:

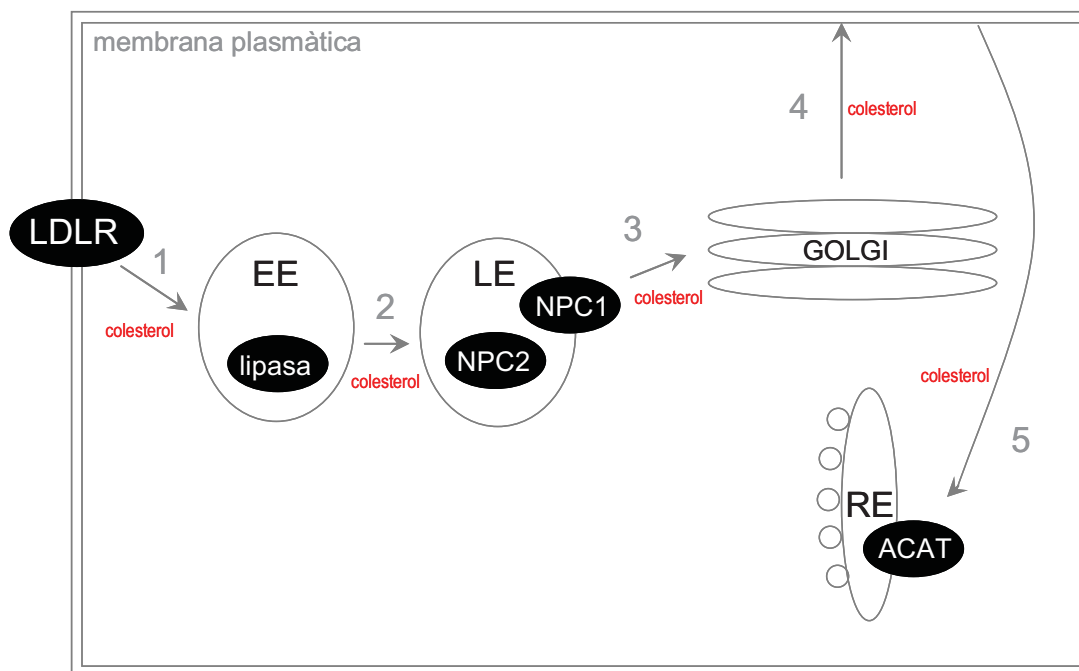


Fig 2. Transport de colesterol procedent de les LDL. El pas 3 està afectat en cèl.lules NPC i en cèl.lules que sobreexpressen Anx6.

Ja fa temps, es va establir una relació entre la caveolina i la proteïna NPC1, partint del fet que en cèl.lules amb NPC1 mutada, els nivells de caveolina a la membrana eren normals, i que per tant havien d'existir mecanismes compensatoris. Els *knockout* d'NPC1 expressen més caveolina, i potser així aconsegueixen compensar la manca d'NPC1 i la caveolina s'encarrega sola de transportar el colesterol lliure cap a la membrana [Garver WS *et al*, 2002; Garver WS *et al*, 1999]. Aquest procés sembla involucrar també l'Annexina A2, suggerint que les annexines i la caveolina poden cooperar en el transport de colesterol [Smart EJ *et al*, 2004; Valasek MA *et al*, 2005]. Aquesta cooperació s'ha demostrat, per exemple, en enteròcits, on l'absorció de colesterol procedent de la dieta està regulada per l'associació entre un membre de la família d'NPC1 (NPC1L1), la caveolina, i l'Anx2 [Davies JP *et al*, 2005]. El bloqueig en la sortida de colesterol del compartiment LE que es produeix tant en cèl.lules Niemann-Pick com en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 sembla que pot estar implicat en la localització i tràfic de la caveolina, provocant una sèrie de conseqüències en l'homeòstasi del colesterol i la senyalització a la membrana plasmàtica.

Però mentre que l'NPC1 i la caveolina uneixen directament colesterol, es creu que l'Anx6 no n'uneix. Existeix però una relació entre l'Anx6 i el colesterol, encara que no sigui directa. L'Anx6 s'uneix a fosfatidilserina [Gerke V *et al*, 2005; Ayala-Sanmartin J 2001], i el colesterol s'uneix preferentment a fosfatidilcolina, fet que fa pensar en descartar també una possible unió indirecta a través dels fosfolípids. Malgrat tot, s'ha demostrat que l'increment de colesterol lliure als LE hi recluta l'Anx6, tant en cèl.lules tractades amb U18666A [de Diego I *et al*, 2002] com en cèl.lules deficientes per NPC1 [te Vruchte D *et al*, 2004], i que per tant existeix una relació almenys entre els nivells d'Anx6 i colesterol al compartiment endocític tardà.

Com apunten Danielle te Vruchte i Dan J. Sillence a la discussió del seu treball [te Vruchte D *et al*, 2004], la identificació d'acumulació d'esfingosina en microdominis de membrana dels LE d'NPC, ha estat una troballa important. No se sap perquè l'esfingosina s'acumula als ratolins Niemann-Pick, però juntament amb el colesterol, l'esfingosina prové de la internalització de microdominis de membrana. Aquests components de membrana s'han d'exportar eficientment dels LE fins al reticle, per ser reutilitzats per formar noves membranes o bé per a ser eliminats. No es coneixen amb exactitud els mecanismes d'aquest transport, però proteïnes com l'NPC1, l'MLN64 o fins i tot l'Anx6 podrien estar-hi involucrades. També és important no oblidar els punts de contacte entre els endosomes tardans i el reticle, que poden permetre aquest transport o impedir-lo si la composició de la membrana dels LE es veu alterada [van Meer G, 1989; Davies JP *et al*, 2000; Zhang M *et al*, 2002] o si la morfologia o coberta d'actina dels LE es modifica.

▪ ANX6, COLESTEROL I CAVEOLINA

Es pot buscar també la relació entre el colesterol i l'Anx6 a través de la caveolina; l'Anx6 i la caveolina colocalitzen a la membrana plasmàtica i al compartiment endocític, en fraccions de membrana enriquides en colesterol [Babiychuk EB, Draeger A 2000; Gerke V *et al*, 2005; Orito A *et al*, 2001]. Una possibilitat és, doncs, que el colesterol reguli la distribució intracel.lular de l'Anx6, i que l'Anx6, en aquests compartiments on ha estat dirigida pel colesterol, reguli el transport de la caveolina i del mateix colesterol. Així, la translocació de l'Anx6 als *rafts* de la membrana plasmàtica o endosomes en resposta a canvis en els nivells de calci i/o colesterol podria regular el contingut de colesterol en aquests microdominis [de Diego I *et al*, 2002].

A partir dels resultats presentats en aquesta tesi, però, només podem parlar de l'acció de l'Anx6 al compartiment LE. L'Anx6 podria estar involucrada en l'estabilització o formació de microdominis rics en colesterol a les membranes endosomals (que són importants per exemple en el direccionament molecular) o indirectament en l'enriquiment de colesterol dels dominis rics en fosfatidilserina, que s'uneix directament a l'Anx6. Actuant sobre la composició dels microdominis rics en colesterol de les membranes del compartiment LE l'Anx6 podria estar regulant el transport de colesterol, ja sigui determinant la proporció de colesterol als dominis, la quantitat de dominis en sí, o proporcionant un entorn lipídic òptim per a proteïnes d'aquests dominis *rafts* reguladores del transport de colesterol. La composició lipídica de la membrana dels endosomes també es important durant els processos de *docking* i fusió entre vesícules. De totes maneres l'Anx6 no només colocalitza en aquests dominis amb transportadors de colesterol, sinó que hi interacciona directament: coimmunoprecipita amb NPC1.

La unió d'Anx6 a NPC1 fa pensar en el següent: l'Anx6 pot estar inhibint directa o indirectament l'activitat de la proteïna NPC1 a la membrana dels LE. Això explicaria immediatament l'acumulació de colesterol lliure als LE, i el bloqueig en el tràfic de caveolina produït com a conseqüència d'això. Ambdues possibilitats són vàlides, tant una modificació dels microdominis de membrana indispensables per la integritat de la funció de l'òrganul com una inhibició directa sobre NPC1. Estan recolzades pel fet que la reversió del fenotip succeeix

tant si afegim colesterol exogen com si hi sobreexpressem NPC1. El tractament amb colesterol exogen soluble, que arriba per difusió a les membranes del Golgi i dels LE té l'habilitat de recuperar el tràfic de caveolina, i pot rectificar la composició dels *rafts* dels LE modificada per l'Anx6, deixant que el colesterol en pugui sortir. La funció de l'Anx6 seria llavors formar aquests microdominis *rafts*, i la sobreexpressió de la proteïna en les CHOAnx6 hauria accentuat aquesta funció, incrementant el nombre de dominis rics en colesterol i fosfatidilserina als endosomes. L'increment de colesterol citosòlic al tractar les cèl.lules amb colesterol exogen podria reclutar l'Anx6, fent-la marxar dels LE, i permetent que el colesterol acumulat allà en pugui sortir. La correcta composició lipídica de la membrana endosomal permetria restablir el seu funcionament normal. Tot i que conceptualment aquest model és interessant, falta un suport experimental definitiu, que inclouria un seguiment del colesterol exogen, per saber si realment aquest colesterol va al Golgi i s'uneix a la caveolina, o va als LE, desfà l'embús, i és el colesterol que ja hi havia provinent de les LDL i no l'exogen el que rescata el tràfic de caveolina.

El colesterol és una molècula pràcticament insoluble en aigua i no-antigènica. És més difícil monitoritzar els nivells de colesterol intracel.lular que els de moltes proteïnes cel.lulars. L'existència de múltiples sistemes de transport de colesterol en una sola cèl.lula fa complicat estudiar una via específica de transport o demostrar la implicació d'una determinada proteïna en una d'aquestes vies; Hi ha encara moltes àrees relacionades amb el transport intracel.lular de colesterol que han de ser estudiades amb més profunditat: els papers dels dominis ORP i START presents en diferents proteïnes de membrana, i el paper dels transportadors de colesterol ABC; la importància relativa del transport vesicular i no-vesicular en la distribució de colesterol; la descripció de nous transportadors de colesterol; la identificació dels mecanismes exactes de transport de colesterol al reticle, per controlar les activitats SCAP/SREBP i/o HMGR i/o ACAT1/ACAT2; i els factors proteïcs i lipídics que contribueixen a la producció, manteniment, i funció dels *rafts* lipídics a la membrana plasmàtica i a les altres membranes cel.lulars.

Les annexines són proteïnes d'unió a fosfolípids, que semblen bons candidats per modular la composició de l'entorn lipídic en les diferents membranes cel.lulars. Respecte a l'Anx6 com a reguladora de la formació de microdominis ordenats, hi ha algunes evidències que apunten en aquesta direcció però que són encara confoses, responent a increments de calci i no de colesterol. Hem vist, per exemple, que si es comparen els microdominis de membrana plasmàtica en cèl.lules CHOwt i CHOAnx6 després de tractar les cèl.lules amb ionomicina, en les CHOAnx6 l'increment del percentatge de regions condensades és superior que en CHOwt. Però això és, com ja he dit, confós, i en tot cas, a la membrana plasmàtica i com a resposta a un increment de calci.

■ BLOQUEIG DEL TRANSPORT DES DELS LE I PROTEÏNES Rab

La sobreexpressió transitòria d'NPC1 pot revertir l'acumulació de colesterol simplement pel fet d'estar en excés. Si l'NPC1 que hi ha a la cèl.lula està unit (i inactivat) per l'Anx6, quan hi ha un excés d' NPC1 aquest pot esdevenir actiu i treure el colesterol dels LE. Aquesta estratègia de sobreexpressió s'ha utilitzat força per revertir l'acumulació de colesterol en cèl.lules Niemann-Pick. S'ha sobreexpressat per exemple la GTPasa encarregada del transport de LE a TGN, Rab9, i la de transport des de LE al compartiment de reciclatge, Rab8 (Fig.3), veient en tots dos casos com s'accelerava el transport de colesterol tant en cèl.lules normals com en cèl.lules amb defectes de transport de colesterol i esfingolípids [Choudhury A *et al*, 2002; Linder MD *et al*, 2007; Walter M *et al*, 2003]. Les proteïnes Rab coordinen el transport entre els diferents compartiments, reticle i Golgi, i via endocítica, regulant la mobilitat dels endosomes per les vies intracel.lulars, i aquesta tasca està estretament relacionada amb els lípids i el colesterol [Lebrand C *et al*, 2002; Zerial M, McBride H 2001].

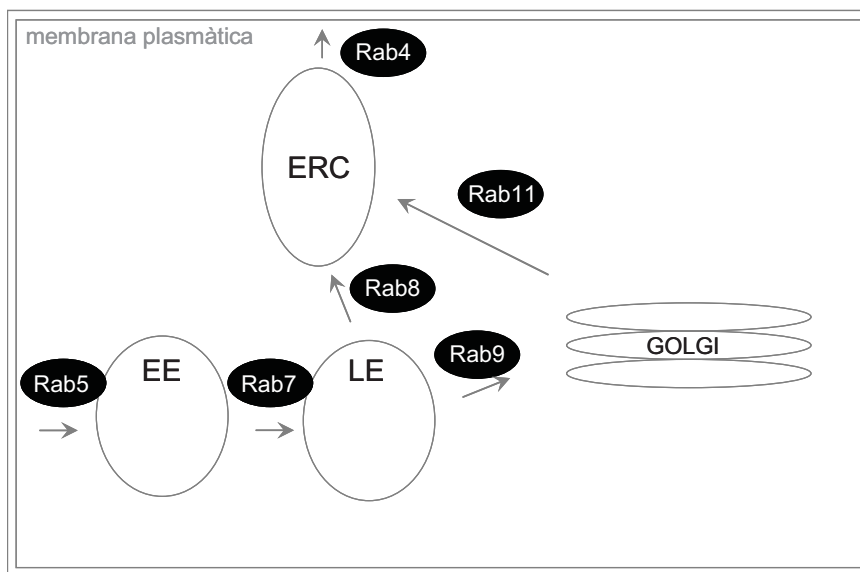


Fig 3. Principals Rabs endosomals. Rab5, transport de sots de clatrina fins a EE. Rab7, des d' EE fins a LE. Rab9, des de LE fins a TGN. Rab8, des de LE fins al compartiment de reciclatge (ERC). Rab11, des del Golgi fins al ERC. Rab4, des del compartiment de reciclatge fins a la membrana plasmàtica. Adaptat de Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A 2000.

No s'ha descrit cap interacció directa entre NPC1 i proteïnes Rab, però no es pot descartar que existeixi alguna relació, ja que els Rabs tenen la capacitat de promoure el transport de colesterol des dels endosomes tardans fins a la membrana plasmàtica fins i tot en cèl.lules deficientes per NPC1. En canvi, en cèl.lules que tenen NPC1 normal, Rab9 no és essencial per a l'exportació de colesterol, com han demostrat experiments que l'han eliminat amb l'RNA d'interferència [Ganley IG, Pfeiffer SR 2006]. Tot i no ser essencials, una acumulació de colesterol als endosomes tardans interfereix en la funció de les proteïnes Rab, impedit que es puguin dissociar de la membrana de l'endosoma un cop completada la fusió, que és un requisit indispensable perquè puguin ser retornats a la membrana units a GDI, per a un nou cicle de transport (veure esquema Fig.4). I a la inversa, una droga inhibidora dels Rabs causa una acumulació de colesterol als LE [Holttä-Vuori M *et al*, 2000]. La sobreexpressió de Rab9 podria formar un *pool* de Rab9 actiu no unit a la membrana que ràpidament transportaria les vesícules acumulades plenes de colesterol fins al TGN.

Aquesta relació entre el colesterol i les GTPases de la família Rab, lluny de contribuir a aclarir la funció de l'Anx6 sobre el transport de colesterol al compartiment LE, afegeixen encara més peces al trencaclosques, doncs podria ser que l'Anx6 estigués inhibint Rab9, de nou A) directament, ancorant-lo irreversiblement a la membrana, o B) indirectament, acumulant colesterol que inhibeix el seu cycle d'activació/desactivació.

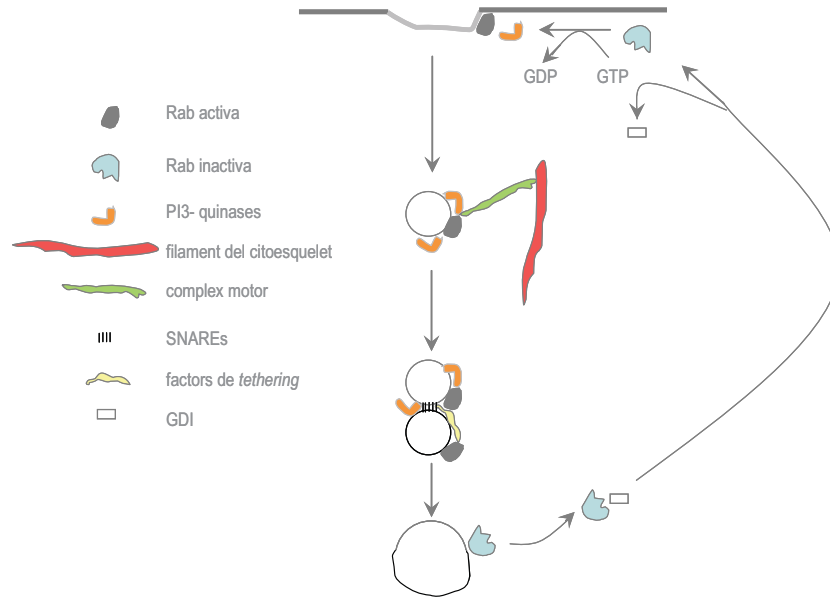


Fig 4. Cycle d'activació/desactivació de les proteïnes Rab [Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A 2000].

De totes maneres, si el mecanisme de transport de vesícules estigués dràsticament afectat en el nostre model, això provocaria un veritable tap als endosomes tardans, i els defectes en el transport serien molt més severos i no afectarien només vies de transport dependents de colesterol com el transport de caveolina. Tant experiments amb dextrà (marcador de fase fluïda) com amb transferrina (marcador de la ruta de reciclatge) mostraven cinètiques comparables a cèl.lules control. No es pot descartar, però, que existeixi una via de transport específic per a cada lligand, que comportaria una població heterogènia d'endosomes, alguns dependents i altres independents de Rab9. Això seria compatible amb una inhibició específica de la via Rab9-dependenta en el nostre model, i amb algunes publicacions que parlen de la dependència del colesterol pel transport des de LE fins a Golgi com a mecanisme específic per a algunes determinades molècules [Grimmer S *et al*, 2000]. Aprofundir en el coneixement de l'estat de la maquinària de vesiculació en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 ha d'aportar, sens dubte, dades fonamentals.

II- Efectes del bloqueig del colesterol al TGN i en el transport de caveolina.

El colesterol és un component essencial i factor limitant per a la formació de vesícules al TGN, i pel transport intra-Golgi [Wang Y *et al*, 2000; Grimmer S *et al*, 2005; Stuken E *et al*, 2003]. Els nivells de colesterol al Golgi han d'estar regulats amb molta exactitud perquè el transport de proteïnes es pugui iniciar a les seves membranes i xarxes de secreció (TGN). No només el colesterol, també la composició lipídica de les membranes de Golgi és molt important pel manteniment i integritat d'aquest orgànu. Fins i tot s'ha postulat que el *sorting* de lípids sigui una de les funcions principals del propi Golgi, que per això tindria una distribució diferencial i composició de lípids tan estructurats en les seves cisternes [Munro S 2005]. Aquest paper porta implícit el manteniment de la identitat dels orgànuls, que és un dels principis fonamentals de supervivència en les cèl.lules eucariotes [Munro S 2004]. L'aparell de Golgi és una plataforma molt complexa i altament organitzada. És molt asimètric en composició lipídica, el colesterol i els esfingolípids es concentren a la part *trans* (cisternes de sortida de Golgi) afavorint la contínua vesiculació que té lloc en aquestes cisternes terminals [Roux A *et al*, 2005]. Diferents estudis comparatius sobre la tensió de membrana existent a dos orgànuls com el reticle i el Golgi han mostrat com la tensió és molt més gran al reticle, donat que el Golgi està constantment curvant-se per formar vesícules [Upadhyaya A, Sheetz MP 2004]. La vesiculació i el Golgi són dos conceptes inseparables, i que encara avui, pràcticament cent anys després del descobriment del complex de Golgi, segueixen essent d'una rabiosa actualitat científica. La via secretora (del TGN a la membrana plasmàtica) està regulada per múltiples factors, proteïnes i lípids, com la dinamina [Grimmer S *et al*, 2005], el citoesquelet d'actina [Egea G *et al*, 2006] o la calmodulina [Tebar F *et al*, 2002]. Els elements del citoesquelet també tenen una gran importància en el circuit Golgi-reticle [Luna A *et al*, 2002; Matas OB *et al*, 2005]. Cada dia apareixen noves proteïnes implicades en la formació de vesícules al TGN, en el transport entre les cisternes de Golgi, o en la relació del Golgi, llurs vesícules i el citoesquelet. Només a tall d'exemple, recentment les septines, proteïnes implicades clàssicament en citocinesi, s'han relacionat amb tràfic de membranes i citoesquelet [Spiliotis ET, Nelson WJ 2006] i se'ls hi ha donat un paper en la formació de vesícules post-Golgi en cèl.lules polaritzades [Spiliotis ET *et al*, 2008].

■ GOLGI I cPLA₂

Una d'aquestes proteïnes implicades cada vegada més en processos relacionats amb la formació de vesícules a Golgi és la cPLA₂ (fosfolipasa A₂ citosòlica calci-dependent). Treballs relativament recents la relacionen amb la formació de túbuls connectors entre les diferents cisternes de Golgi [Trucco A *et al*, 2004; Drecktrah D *et al*, 2003], i clàssicament s'havien relacionat altres membres de la família (les fosfolipases calci-independents) amb el transport retrògrad de Golgi a reticle [de Figueiredo P *et al*, 2000] o amb el transport entre els endosomes primerencs i el compartiment de reciclatge [de Figueiredo P *et al*, 2001].

Diferents annexines de la família també s'han relacionat amb alguns aspectes de la via secretora des del TGN, per exemple l'Anx2 està implicada en l'exocitosi regulada per calci [Gerke V, Moss SE 2002] i l'Anx13b s'associa amb els dominis rics en esfingolípids i colesterol del TGN que són els que formaran vesícules que aniran fins a la membrana plasmàtica apical en cèl.lules polaritzades [Lafont F *et al*, 1998]. L'Anx6 es pot afegir ara a aquesta llista, doncs s'ha demostrat (Article 2) que inhibeix l'activitat i la translocació de la cPLA₂ a les membranes de Golgi afectant la via secretora dependent de cPLA₂ i colesterol. La necessitat d'uns nivells determinats de colesterol al Golgi perquè hi transloqui la cPLA₂ des del citosol per esdevenir un cop allà activa ([Grimmer S *et al*, 2005], veure també Golgi i vesiculació de la Introducció) fan que aquest procés estigui inhibit en CHOAnx6, on el colesterol no arriba al Golgi perquè està retintut als LE. Aquesta inhibició de la cPLA₂ comporta una reducció en la

vesiculació de Golgi, que afecta la secreció de proteïnes com la caveolina. Es pot dir doncs que la vesiculació al Golgi per al transport de caveolina és una via dependent de colesterol i cPLA₂. Òbviament no totes les proteïnes que es transporten des del Golgi cap a la membrana depenen de colesterol i cPLA₂, i una prova d'això és que el tràfic d'altres proteïnes des del Golgi (destinades a sots de clatrina, als dominis *rafts* o de secreció en general com el VSVG) no està afectat en cèl.lules CHOAnx6 (Fig.7B Article 1).

La cPLA₂ s'ha implicat també en la formació de cossos lipídics des del reticle, un nou paper relacionat amb la vesiculació possibilitada per la curvatura de membrana provocada per aquest enzim, aquesta vegada al reticle [Gubern A *et al*, 2008].

■ L'ANX6 INTERVÉ EN EL TRANSPORT DE CAVEOLINA

D'acord amb els resultats obtinguts en cèl.lules CHOAnx6 i A431Anx6, els hepatòcits que expressen molta Anx6 tenen molt poques caveoles. La interacció entre la caveolina i el colesterol és bàsica per a generar caveoles.

En el nostre model, on s'ha demostrat que la sobreexpressió d'Anx6 modifica el transport de colesterol reduint així el transport de caveolina, és interessant plantejar la idea que l'Anx6 podria funcionar com a mecanisme regulador del nombre de caveoles, disminuint la disponibilitat de colesterol per a l'oligomerització de la caveolina i formació de caveoles, potser utilitzant per a aquest propòsit proteïnes com NPC1 o Rab9. Cap la possibilitat que en hepatòcits, on s'expressen nivells molt elevats d'NPC1 i d'Anx6, aquestes dues molècules interaccionin constituint un mecanisme per regular la quantitat de caveoles a la membrana, que ha de ser relativament baixa en les cèl.lules del teixit hepàtic.

Diferents mecanismes semblen convergir en cèl.lules amb nivells alts d'Anx6 per bloquejar el tràfic de caveolina; l'Anx6 impedeix el transport de colesterol que depèn d'NPC1 cap a les membranes de Golgi, i aquesta disminució del colesterol porta a una pèrdua de l'activitat de la cPLA₂ impedit-ne la translocació a les membranes de Golgi (model Fig.5C). No es pot descartar totalment que es pugui produir una inhibició directa de l'Anx6 sobre la cPLA₂, (model Fig.5B) per la unió de l'Anx6 als dominis rics en fosfatidilserina de les membranes dels lisosomes, endosomes o membrana [Yeung T *et al*, 2008]. De fet, ja ha estat descrita la inhibició de la cPLA₂ per part de l'Anx1 i l'Anx5, per mecanismes més aviat d'aquest tipus o per una unió directa [Kim S *et al*, 2001a; Kim SW *et al*, 2001b]. No s'ha pogut demostrar que l'Anx6 s'uneixi directament a la cPLA₂, i si tenim en compte la recuperació de la inhibició de l'activitat a l'afegir colesterol exogen, tot sembla indicar que l'efecte sobre la cPLA₂ és indirecte, degut a l'acció sobre el colesterol. Per tant s'ha afegit un nou component indirectament implicat en la via secretora des del TGN, l'Anx6, que inhibint el transport de colesterol inhibeix la cPLA₂ i això redueix el transport de caveolina des del Golgi.

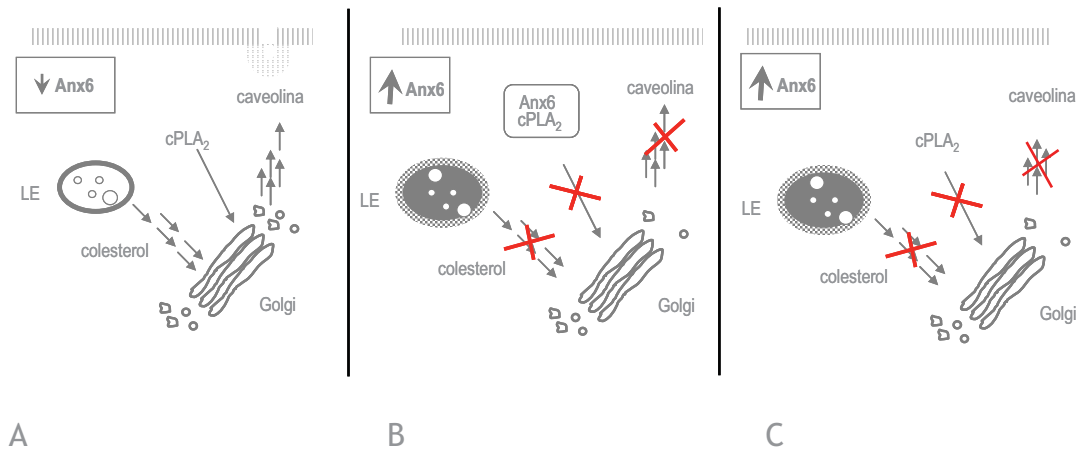


Fig 5. A) Quan hi ha poca Anx6, el colesterol arriba al Golgi, i això recluta la cPLA₂. B) Quan hi ha molta Anx6, aquesta pot inhibir **directament** la cPLA₂. C) La inhibició pot ser **indirecta**, la cPLA₂ no transloca al Golgi perquè no hi ha prou colesterol.

■ CAVEOLES, COLESTEROL I CÀNCER.

És evident que els mecanismes de regulació del transport de caveolina poden tenir un paper crític a nivell fisiològic. Errors en aquest transport tenen conseqüències sobre diferents processos cel·lulars, considerant la importància de la caveolina en la formació de caveoles a la superfície cel·lular. Les caveoles són importants per l'endocitosi, formació de microdominis de membrana, efluxió de colesterol i senyalització. En molts tipus cel·lulars, l'expressió de caveolina està estretament relacionada amb l'expressió de la PTRF (o *PTRF-cavin*), una proteïna identificada recentment com a indispensable per a la formació de caveoles [Hill MM *et al*, 2008; Liu L, Pilch PF 2008]. La pèrdua de PTRF es correlaciona amb la pèrdua de caveolina en cèl·lules de càncer de pròstata o en alguns estadis del desenvolupament embrionari del peix zebra. La sobreexpressió d'Anx6 no varia els nivells totals de caveolina, però sí que sembla haver-hi una relació entre alts nivells d'Anx6 i el nombre de caveoles. La reducció en el nombre de caveoles en línies cel·lulars de càncer de mama que expressen molta Anx6 (MDA-MB-436) però no en línies de cèl·lules de càncer de mama que n'expressen poca n'és (MDA-MB-468) un exemple (Fig. 8B Article 1).

Estudis futurs potser aclariran si els nivells d'Anx6 estan relacionats amb la formació de caveoles en cèl·lules cancerígenes on la caveolina té un paper anti-tumoral, com en el càncer de mama. A part del fet que menys caveoles puguin significar menys senyalització i per tant menys proliferació, un punt anti-tumoral *persé*, també s'ha relacionat l'adquisició de resistència a quimioteràpics amb les caveoles [Pang A *et al*, 2004]. L'increment en el nombre de caveoles i fins i tot un increment en l'expressió de caveolina estarien relacionats amb l'adquisició de resistència a tractaments amb agents quimioteràpics [Lavie Y *et al*, 1998; Lavie Y *et al*, 2001]. El receptor MDR (*Multi-Drug-Resistance receptor*) es localitza a les caveoles i no només això, sinó que es creu que els quimioteràpics utilitzen les vies de transport del colesterol per retornar des de l'interior de la cèl·lula cap a la membrana per ser extrusionats cap a l'exterior, utilitzant el mecanisme d'efluxió de colesterol dependent de caveolina i caveoles, conferint així resistència al tractament a la cèl·lula transformada [Lavie Y *et al*, 1999; Lavie Y, Liscovitch M 2000; Liscovitch M, Lavie Y 2000]. La via de transport de colesterol des de l'interior de la cèl·lula (TGN) cap a la membrana (caveoles) és la via de transport de caveolina, com ja s'ha plantejat anteriorment.

▪ ANX6, SNAREs I TRANSPORT DE CAVEOLINA.

Un altre punt important a considerar, és que l'Anx6 pot estar interferint/competint per la unió a membranes (de LE, o de Golgi) dels elements de tràfic habituals, com els factors de *tethering* (revisats en [Lupashin V, Sztul E 2005]) o proteïnes de la família SNARE, modificant el tràfic de membranes i la vesiculació [Sehgal PB, Mukhopadhyay S 2007]. Quan la formació dels complexos SNAREs no funciona, el Golgi s'engrandeix i s'hi acumulen proteïnes de la via secretora, entre elles la caveolina [Sehgal PB, Mukhopadhyay S 2007]. Un indicador de l'estat del funcionament general dels factors de vesiculació és l'NSF, que presenta un patró alterat en CHOAnx6, indicant un possible colapso d'aquests processos a la zona perinuclear, podent ser TGN o LE (M.Reverter, L.Cubells i C. Enrich, resultats no publicats). Les sintaxines, unes proteïnes de la família de les t-SNAREs que regulen la fusió de vesícules en processos de tràfic intracel.lular, formen uns agregats o *clusters* a la superfície de la membrana utilitzant ramificacions radials tridimensionals per a una fusió més ràpida entre membranes. Tornant al concepte tradicional que la composició lipídica de la membrana és responsable de la distribució de les proteïnes, aquests agregats de sintaxines es dispersen quan els nivells de colesterol decreixen a les membranes. Aquesta dispersió disminueix molt la taxa de fusió vesicular [Chen YA, Scheller RH 2001; White SH 2007]. Tot i que el colesterol afecta la formació d'agregats de sintaxines no n'és el responsable directe, Lang i el seu equip han demostrat com el motiu o domini SNARE present a les sintaxines condueix per ell mateix a la formació d'agregats [Sieber JJ *et al*, 2006]. Per tant, l'arrest de colesterol als LE de les cèl.lules CHOAnx6 pot modificar el contingut de colesterol a les membranes dels LE, reclutant per exemple la sintaxina 6 a aquestes membranes i potenciant allí la formació d'un excés d'agregats de sintaxines que seria aberrant i afectaria la gemmació/fusió dels endosomes tardans. En CHOAnx6, les alteracions de la composició de colesterol de la membrana de l'endosoma tardà poden modificar la gemmació/fusió des d'aquest compartiment.

També s'ha de pensar en la relació que existeix entre sintaxines, colesterol i caveolina en altres compartiments a part dels LE, com ara a les caveoles [Chintagari NR *et al*, 2006]. Primer, es coneix que l'endocitosi via caveoles depèn de que la sintaxina 6 hagi transportat fins a la membrana components de les caveoles perquè puguin ser endocitades. La sintaxina 6 endògena es localitza sobretot a Golgi, i si s'inhibeix la seva actuació disminueix tant la caveolina que arriba com les caveoles formades a la membrana plasmàtica. La sintaxina 6 s'encarrega de transportar des del Golgi fins a la membrana proteïnes associades als dominis *raft*, com el GM1, que són proteïnes necessàries perquè es produeixi l'endocitosi via caveoles [Choudhury A *et al*, 2006]. Les caveoles de la membrana (o caveoles madures) tenen una identitat proteica molt característica i prefixada, que ha d'existir perquè puguin ser funcionals (esquematzat a la Fig.12 de la Introducció). A més a més, la caveolina 1 i la sintaxina 6 coimmunoprecipiten [Choudhury A *et al*, 2006], fet que sembla confirmar una relació d'interacció específica entre aquestes dues proteïnes, que tindria la funció del tràfic de proteïnes de les caveoles preformades al Golgi fins a la membrana [Parton RG *et al*, 2006]. L'afectació d'aquesta interacció en CHOAnx6, ja sigui per la deslocalització de la sintaxina 6 cap als LE, o pel bloqueig de la vesiculació secretora al Golgi, podria contribuir també a la disminució de les caveoles a la membrana.

Segon, la sintaxina 4 també s'ha relacionat amb les caveoles. Es creu que la formació del complex sintaxina 4(t-SNARE)-SNAP23(v-SNARE) que és dependent de colesterol regula la fusió de la caveola amb la membrana plasmàtica [Predescu SA *et al*, 2005]. És a dir, un cop la sintaxina 6 ha portat la caveola fins a la membrana, el complex sintaxina 4-SNAP23 fa que la caveola s'hi pugui fusionar. Confirmant el defecte en el transport de caveoles en CHOAnx6, resultats recents del laboratori (M.Reverter, L.Cubells i C.Enrich, resultats no publicats) han mostrat com en aquestes cèl.lules hi ha menys sintaxina 4 i SNAP23 a la membrana plasmàtica.

En resum, la sobreexpressió d'Anx6 juntament amb l'acumulació de colesterol als LE i la disminució subseqüent de colesterol al Golgi sembla desestructurar la formació de complexos SNARE, afectant el tràfic vesicular de caveoles.

OPCIÓ 2: BLOQUEIG INDIRECTE DEL TRANSPORT DE COLESTEROL.

I- Acumulació de colesterol com a efecte secundari.

L'acumulació de colesterol al compartiment endocític tardà de cèl.lules amb nivells alts d'Anx6 es deu específicament a l'Anx6, doncs no es produeix en cèl.lules on s'han reduït els nivells d'Anx6 utilitzant RNAi (Article 1, Fig 5). A més, l'expressió transitòria d'Anx6 també produeix el fenotip d'acumulació de colesterol lliure als LE (Article 1, Fig 1B). Malgrat això, no es pot descartar que l'acumulació de colesterol sigui una conseqüència d'algun altre efecte produït per la sobreexpressió d'Anx6. Per exemple, en cèl.lules Niemann-Pick, a més de l'acumulació de colesterol hi ha també una acumulació d'esfingolípids (glucoesfingolípids concretament), al compartiment LE/lisosomal. De fet, l'acumulació de colesterol es planteja en molts treballs com un efecte secundari de l'acumulació dels glucoesfingolípids. Està ben documentat el fet que l'afinitat del colesterol pels esfingolípids fa que el colesterol es deslocalitzi, i s'acumuli com a conseqüència de l'acumulació d'esfingolípids que es produeix en les malalties degudes a desordres en el metabolisme lipídic [Mukherjee S, Maxfield FR 2004; Pagano RE *et al*, 2000; Kolter T, Sandhoff K 2006; Puri V *et al*, 2003; Marks DL, Pagano RE 2002; Pagano RE 2003; Sturley SL *et al*, 2004].

L'acumulació d'esfingolípids crea una trampa molecular pel colesterol lliure [Puri V *et al*, 2003], que s'acumula tant si s'incrementen els glucoesfingolípids per adició exògena [Puri V *et al*, 2003] com per inhibició de la seva degradació [te Vruchte D *et al*, 2004]. Complementàriament, un excés de colesterol provoca una acumulació de colesterol lliure i també d'esfingolípids [Frolov A *et al*, 2001]. La conseqüència immediata d'aquesta acumulació és la no-exportació de colesterol lliure des dels LE [Choi HY *et al*, 2003], tal com succeeix quan l'NPC1 està mutat o en cèl.lules CHOAnx6. Diferents investigadors han suggerit que la síndrome Niemann-Pick és primerament un desordre d'acumulació de glucoesfingolípids (recopilat en [Marks DL, Pagano RE 2002]) i l'acumulació de colesterol és només un efecte secundari.

■ ACUMULACIÓ D'ESFINGOLÍPIDS EN CHOAnx6

Com s'ha volgut mostrar a l'Annex (Annex, Fig.7), al model cel.lular de sobreexpressió d'Anx6 també es produeix una acumulació d'esfingolípids, i la degradació dels glucoesfingolípids en concret està disminuïda (Annex, Fig.8), fent pensar que l'acumulació de colesterol podria ser una conseqüència d'aquesta acumulació de glucoesfingolípids, sense ser incompatible amb tots els efectes descrits causats per l'acumulació de colesterol, donat que això són conseqüències.

Si l'Anx6 afecta el metabolisme dels glucoesfingolípids, i l'Anx6 es relocalitza cap al "compartiment NPC" (terme que s'utilitza sovint per a denominar un endosoma mixt, LE-lisosoma, específic de cèl.lules Niemann-Pick) en cèl.lules Niemann-Pick [te Vruchte D *et al*, 2004], aquesta relocalització pot fer que s'acumulin esfingolípids en aquest compartiment, i que s'acumuli colesterol com a conseqüència d'això. De fet, el treball de Sillence i

col.laboradors [te Vrucite D *et al*, 2004] designa l'acumulació de glucoesfingolípids com la causa primera i culpable de l'afectació del transport des dels LE-prelisosomes en cèl.lules Niemann-Pick. L'acumulació de glucoesfingolípids modificaria els dominis de membrana d'aquest compartiment, afectant proteïnes com l'Anx6 o l'NPC1, impedit que el transport de colesterol es produeixi amb normalitat. A més, demostren que l'acumulació del glucoesfingolípide BODIPY-LacCer, o la deslocalització de l'Anx2 i l'Anx6 que s'observa en cèl.lules Niemann-Pick es pot revertir inhibint la síntesi de glucoesfingolípids i fent-ne baixar així els nivells [te Vrucite D *et al*, 2004]. D'acord amb el que s'ha plantejat en aquesta discussió, en aquest treball de Sillence també es té en compte que altres components de la maquinària de transport endosomal com el Rab7 o el Rab9 poden resultar afectats en aquests perfils d'acumulació de glucoesfingolípids i colesterol, com està descrit [Choudhury A *et al*, 2002; Lebrand C *et al*, 2002].

El principal avantatge d'utilitzar tècniques d'HPLC per mesurar els nivells de glucoesfingolípids és que permet una separació clara i identificació dels diferents tipus de glucoesfingolípids. Tot i que la glucosilceramida i l'esfingomielina no es poden diferenciar i per tant quantificar acuradament, una acumulació de glucoesfingolípids mesurada per HPLC indica sense cap dubte un defecte en la degradació del precursor lactosil-ceramida [Kolter T, Sandhoff K 2005]. L'acumulació exagerada de glucoesfingolípids en cèl.lules que sobreexpressen Anx6 indica una relació entre aquesta proteïna i els glucoesfingolípids.

Podem suggerir, doncs, que l'acumulació intracel.lular de glucoesfingolípids observada en cèl.lules Niemann-Pick podria estar lligada a canvis en processos de transport al compartiment endocític, conduïts per la localització cap a aquest compartiment de proteïnes com les annexines (especialment Anx2 i Anx6). La reversió del fenotip de les Anx6 per la sobreexpressió de NPC1 (Article1) dona suport a aquesta relació. A part, l'èxit del tractament amb compostos que inhibeixen la síntesi de glucoesfingolípids en ratolins knockout d'NPC1 confirma la importància del correcte balanç d'aquest tipus d'esfingolípids per la cèl.lula [Zervas M *et al*, 2001]. L'increment de microdominis enriquits en glucoesfingolípids en Niemann-Pick o en altres patologies lipídiques fa que puguin ser bons models per estudiar el paper que tenen els diferents tipus de microdominis de membrana en el tràfic intracel.lular.

■ GLUCOESFINGOLÍPIDS I TRÀFIC INTRACEL.LULAR

A part de l'acumulació, la localització aberrant de glucoesfingolípids pot tenir altres efectes específics en la fisiologia cel.lular. En condicions normals, els glucoesfingolípids s'internalitzen i passen per tot el compartiment endocític (Fig.6). Alguns glucoesfingolípids intervenen en el transport de toxines i virus [Sillence DJ, Platt FM 2003; Tsai B *et al*, 2003], i s'ha suggerit que els glucoesfingolípids s'utilitzen pel tràfic de proteïnes endògenes potser a través de dominis específics d'unió a glucoesfingolípids [George T *et al*, 2001; Khine AA *et al*, 1998]. El transport intracel.lular des de la membrana plasmàtica cap al reticle per vies específiques de glucoesfingolípids també és rellevant, i depèn de la seva habilitat per formar microdominis de membrana [Falguieres T *et al*, 2001; Wolf AA *et al*, 1998]. El tràfic dependent de glucoesfingolípids pot resultar especialment sensible a desestructurar-se com passa en cèl.lules Niemann-Pick o en altres síndromes d'acumulació de glucoesfingolípids [Sillence DJ, Platt FM 2003]. No està clar perquè són concretament els glucoesfingolípids els que s'acumulen en Niemann-Pick. Només hi ha un article del 1998 on s'atribueix l'acumulació específica de glucoesfingolípids a un defecte en les vies de reciclatge d'aquests [Gillard BK *et al*, 1998]. Revisant alguns treballs publicats que parlen del transport de lípids, es pot recopilar més informació. Per exemple, la mobilització de calci també és bàsica en la funció endosomal [Burgoyne RD, Clague MJ 2003] i un defecte en el transport de calci pot ser la base de trastorns relacionats amb acumulació de lípids com la mucopolisardi tipus IV [Bargal R *et al*, 2000; LaPlante JM *et al*, 2002]. El transport de calci està influenciat pels glucoesfingolípids i els seus liso-derivats [Lloyd-Evans E *et al*, 2003a] i està inhibit en el model de ratolí de la

malaltia de Sandhoff, un fenotip que es corregeix si s'afegeixen glucoesfingolípids [Lloyd-Evans E *et al*, 2003b].

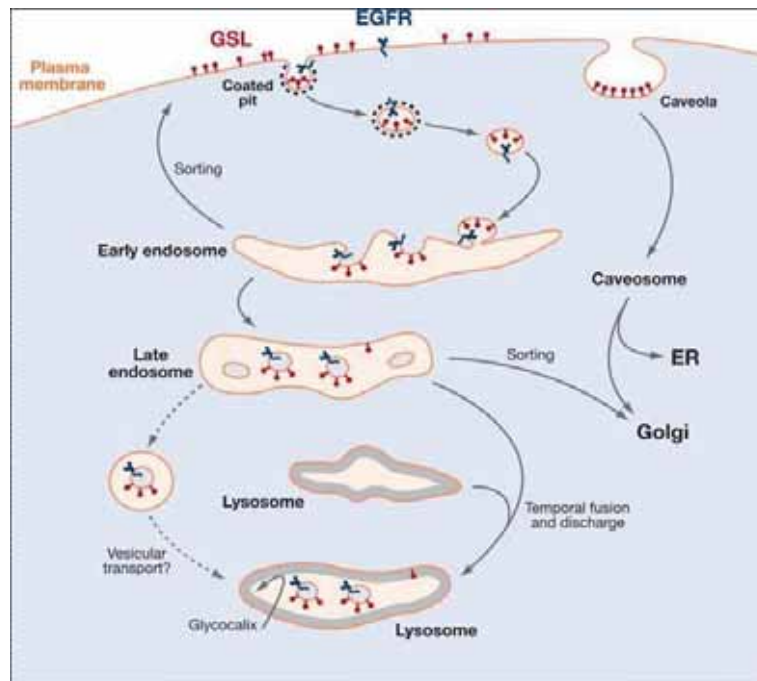


Fig 6. Tràfic dels glucoesfingolípids (GSL) [Kolter T, Sandhoff K 2005].

Els glucoesfingolípids també s'han implicat en senyalització via insulina [Yamashita T *et al*, 2003] i la seva acumulació podria alterar aquesta via en cèl·lules CHOAnx6. Tot i que això és pura especulació, la via de la insulina podria ser el vincle entre l'acumulació d'esfingolípids i colesterol, i la localització nuclear de la PTRF al nucli observada en el nostre model de sobreexpressió d'Anx6 (L.Cubells, M.Reverter i C.Enrich, resultats no publicats); ja s'ha publicat que la insulina regula la translocació de la PTRF al nucli, associada a la translocació d'una altra proteïna de caveoles, la lipasa HSL (*Hormone Sensitive Lipase*).

En concret aquesta lipasa es localitza a un subtipus de caveoles involucrades en la captació d'àcids grassos per convertir-los en triacilglicèrids (TAG), que contenen tota la maquinària enzimàtica implicada en aquesta síntesi, i també altres proteïnes relacionades amb el metabolisme lipídic com la perilipina, a més de l'HSL [Aboulaich N *et al*, 2006]. En aquesta publicació demostren com la translocació de la PTRF i l'HSL al nucli és simultània, regulada per insulina. L'HSL s'uneix a la PTRF al citosol i transloquen juntes cap al nucli en resposta a l'estimulació per insulina. Això no només representa un vincle entre la localització de la PTRF i la insulina, sinó també un vincle entre la PTRF i el control de la lipòlisi. La disminució en el nombre de caveoles podria afectar la localització de l'HSL *persé*, o bé la cèl·lula pot estar activant la lipòlisi (portant PTRF i HSL al nucli) com mecanisme de resposta a l'acumulació de glucoesfingolípids i colesterol.

■ L'ANX6 PODRIA AFECTAR DIRECTAMENT LES CAVEOLES: PTRF?

La interacció entre la caveolina i la PTRF està conservada evolutivament (la PTRF de mamífers s'associa a les caveoles generades per caveolines d'invertebrats) [Hill MM *et al*, 2008]. Com reconeix la PTRF la caveola madura? En principi s'atribueix a la caveolina oligomeritzada i a la composició lipídica de la caveola. La unió de la PTRF a fosfatidilserina s'ha demostrat *in vitro* i també el requeriment de colesterol per la interacció caveolina/PTRF [Hill MM *et al*, 2008]. Un domini de la caveolina anomenat domini *scaffolding* és el responsable de la oligomerització, formant associacions laterals entre caveolines i dominis enriquits en fosfatidilserina i colesterol. La PTRF es podria unir a aquests dominis de fosfatidilserina, estabilitzant-los. Això facilitaria la curvatura de les caveoles, i és consistent amb el reclutament de PTRF de mamífer a caveoles ja formades per caveolines d'invertebrats. És més important l'enriquiment en fosfatidilserina que la seqüència de la caveolina. El model de biogènesi de caveoles s'amplia amb la PTRF, implicant la caveolina en l'inici de la seva formació i la PTRF en l'estabilització (com una proteïna de coberta) i adquisició de la morfologia omega a la membrana [Hill MM *et al*, 2008]. L'Anx6 podria competir amb la PTRF per la unió a les fosfatidilserines, fent que sense la seva proteïna "de coberta" (PTRF) les caveoles madures no puguin ser estables ni tenir la seva morfologia omega característica. De fet, en les imatges de microscòpia electrònica de les CHOAnx6, algunes caveoles apareixen deformades a la membrana plasmàtica, podent indicar aquesta manca d'estabilitat, que els hi proporcionaria la PTRF (Cubells L, Enrich C, resultats no publicats).

II- Anx6 i maquinària lisosomal de degradació d'esfingolípids.

I, perquè la sobreexpressió d'Anx6 fa que s'acumulin glucoesfingolípids?

La degradació de la lactosil-ceramida té lloc al lisosoma, i hi intervenen dos enzims que necessiten els cofactors saposines per poder ser actius (Saposina B i Saposina C). Les saposines provenen d'una proforma anomenada prosaposina, que és citosòlica. Tot i que el mecanisme de translocació de la prosaposina al lisosoma no està del tot clar, es creu que és portada fins als lisosomes pel receptor LRP1 (*LDL Receptor-Related Protein*) [Kolter T, Sandhoff K 2005]. L'activació del receptor es produeix per unió dels seus lligands a la membrana plasmàtica [Herz J, Strickland DK 2001]. S'internalitza, i un cop als endosomes recluta la prosaposina. Un defecte en el transport de l'LRP i dels seus lligands fins al compartiment lisosomal (veure Annex) provocat per la sobreexpressió d'Anx6 podria produir una inhibició de l'activació dels enzims lisosomals. Com a resultat d'aquesta inhibició, els glucoesfingolípids no es degraden i s'acumulen. En l'Annex s'ha analitzat com s'implica l'Anx6 en el transport de l'LRP i d'un dels seus principals lligands, l' $\alpha 2M$. L'Anx6 s'havia identificat com la principal proteïna de membrana que s'unia a l' $\alpha 2M$, i que formava complexes ternaris amb $\alpha 2M$ i LRP [Ling TY *et al*, 2004]. L' $\alpha 2M$ és internalitzada via LRP i arriba fins als LE i lisosomes per ser degradada. Tot i que la internalització del lligand és igual entre CHOwt i CHOAnx6, sembla que a temps llargs en les CHOAnx6, l' $\alpha 2M$ s'acumuli en algun punt de la ruta endocítica. En cèl.lules control, $\alpha 2M$ colocalitza pràcticament amb el marcador de lisosomes LAMP, indicant que ha arribat als lisosomes. En canvi, en cèl.lules CHOAnx6, el grau de colocalització és molt inferior i hi ha una part important de l' $\alpha 2M$ que no ha arribat als lisosomes (Annex, Fig.12). Aquests resultats suggereixen que aquest lligand i potser el seu receptor no són transportats amb normalitat a les cèl.lules CHOAnx6. La sobreexpressió d'Anx6 podria segrestar $\alpha 2M$ al citosol, afectant la via d'arribada de la maquinària de degradació de glucoesfingolípids als lisosomes. De fet s'ha descrit que la proteïna GULP actua com a proteïna adaptadora del receptor LRP perquè el transport dels lligands ($\alpha 2M$, saposines) siguin correctes [Kiss RS *et al*, 2006] i quan aquest transport es veu afectat, s'acumulen glucoesfingolípids [Kiss RS *et al*, 2006; Zervas M *et al*, 2001]. L'Anx6 ja s'havia relacionat amb el tràfic d'LDL, implicada en l'estimulació de l'endocitosi del seu receptor LDLR i de l'arribada als lisosomes i degradació de l'LDL [Grewal T *et al*, 2000; Pons M *et al*, 2001a]. L'Anx6 podria dur a terme la mateixa funció amb els lligands del receptor

LRP, portant-los fins als lisosomes (Annex, estructures vesiculars Fig.10B). La sobreexpressió d'Anx6 podria afectar aquesta funció fent que els components de la maquinària de degradació d'esfingolípids no arribessin als lisosomes. La transfecció d'un mutant de l'Anx6 (Anx6 1-175) descrit com a dominant negatiu respecte la internalització de l'LDLR [Grewal T *et al*, 2000] i tràfic i degradació de l'LDL [Pons M *et al*, 2001a] produeix una distribució del LRP molt aberrant mentre que la co-transfecció de l'Anx6 salvatge i l'LRP sembla mostrar unes estructures LE-lisosoma on colocalitzen l'Anx6 i l'LRP (Annex, Fig. 10B).

La sobreexpressió d'Anx6 pot fer que l'excés d'Anx6 s'uneixi a l'LRP, o als seus lligands, compromentent la transició del receptor i la seva càrrega entre els compartiments endocítics. Aquest defecte en el transport de la maquinària lisosomal de degradació de glucoesfingolípids podria desembocar en una acumulació d'aquests, que pot acabar provocant una acumulació de colesterol. Els efectes de l'Anx6 sobre el transport de l'LRP i/o els seus lligands són perfectament compatibles amb la visió que en cèl.lules Niemann-Pick es produeix primer un defecte en la degradació de glucoesfingolípids que causarà l'afectació del transport de colesterol a través del compartiment endocític tardà. Si tota aquesta hipòtesi fos certa, seria el primer mecanisme concret descrit com a causant de l'acumulació de glucoesfingolípids i colesterol en patologies com Niemann-Pick.

Està publicat que l'Anx6 estimula el tràfic fins als lisosomes d'LDL [Pons M *et al*, 2001a]. Això pot semblar contradictori amb que la sobreexpressió d'Anx6 provoqui una acumulació de colesterol als LE-lisosomes, sense modificar la captació ni el tràfic d'LDL. Malgrat això, aquest model on la sobreexpressió podria afectar la funció biològica de la proteïna pot resoldre aquesta contradicció.

Podem recopilar els efectes provocats per la sobreexpressió d'Anx6 contemplant totes les opcions plantejades en el diagrama següent:

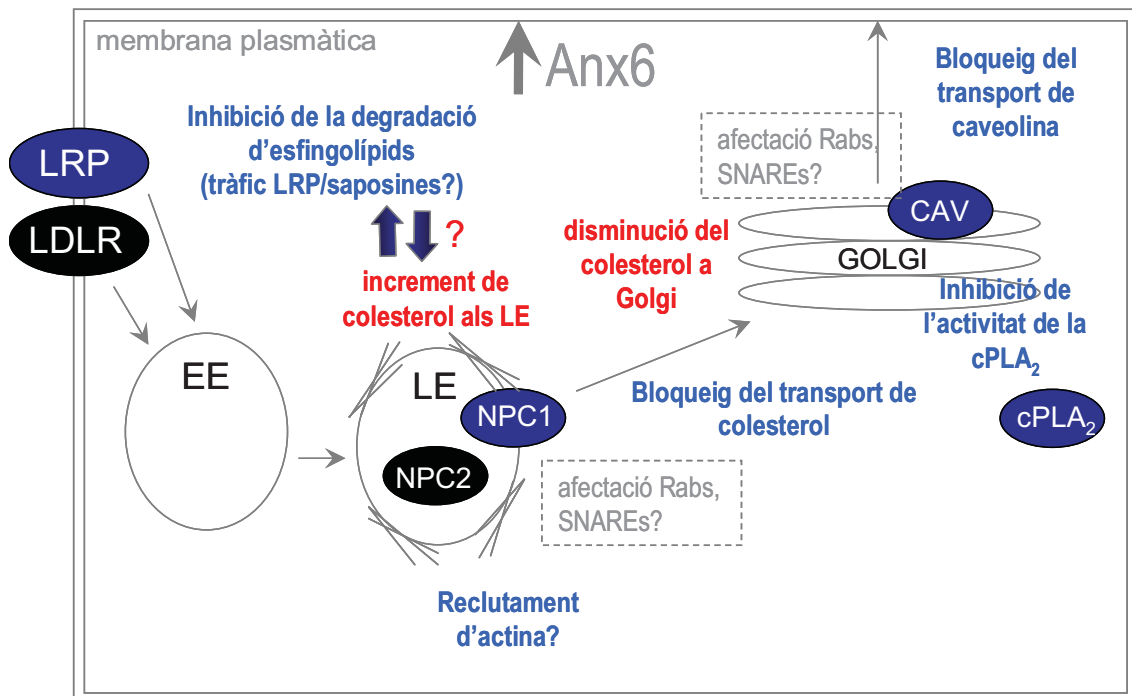


Fig 7. Diagrama dels mecanismes possiblement modificats per la sobreexpressió d'Anx6 relacionats amb el transport de colesterol i caveolina.

Les dues opcions plantejades en aquesta discussió, un bloqueig directe del transport de colesterol provocat per l'Anx6 i un bloqueig indirecte d'aquest transport, tenen un punt en comú: en cap de les dues es pot descartar una afectació de les SNAREs o de la maquinària de vesiculació i tràfic de membranes (Fig.7). Els nivells reduïts de colesterol al Golgi com a causa de l'acumulació del colesterol als LE poden afectar com ja s'ha discutit la formació de vesícules, no només de la via secretora cap a la membrana, sinó també en altres vies de transport, com la que va de Golgi als LE. Les hidrolases lisosomals són transportades per aquesta via Golgi-LE, pels receptors mannososa-6-fosfat que cicleu entre aquests dos compartiments [Perez-Victoria FJ *et al*, 2008; Janvier K, Bonifacino JS 2005]. Un funcionament incorrecte d'aquest transport condueix a una inhibició de la degradació lisosomal. A part dels adaptadors AP de la coberta de clatrina, darrerament s'estan implicant en aquesta via altres proteïnes de transport, com el complexe GARP [Perez-Victoria FJ *et al*, 2008] o les nexines [Mari M *et al*, 2008], que intervenen en la formació de vesícules que transportaran les hidrolases. Podríem seguir buscant connexions entre tràfic, colesterol i Anx6...però ja serien altres històries. La meua, arriba fins aquí.

Els objectius plantejaven analitzar el paper de l'Anx6 al compartiment endocític. Com a resposta, una nova pregunta: pot ser l'Anx6 un component bàsic de la maquinària de transport cap a i des dels LE? I malgrat haver determinat els efectes de la sobreexpressió d'Anx6 sobre el transport de colesterol i de caveolina, hi ha encara un interrogant per resoldre: la sobreexpressió estimula o impedeix la funció de l'Anx6?

Les conclusions depenen de les premisses que definim. La biologia ha tingut milions d'anys per crear, renovar i perfeccionar els processos que tenen lloc a l'interior de les cèl.lules. Els anys d'una tesi permeten poder albirar diferents possibles explicacions i respostes per a explicar els resultats obtinguts...però difícilment s'en poden descartar i triar-ne només una. L'Anx6, la meua porta cap al tràfic i els endosomes. L'endocitosi, la porta d'entrada a la cèl.lula. Només fa un segle que s'estudia l'endocitosi, i per sort, encara queden molts anys de feina. Hi ha preguntes i respostes que val més guardar. Sempre ha de quedar una porta oberta.
O per obrir.

“Brevity is the soul of wit”
Hamlet
W. Shakespeare.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1- La sobreexpressió d'Anx6 provoca un bloqueig del transport de colesterol lliure al compartiment endocític tardà.
- 2- Aquest bloqueig fa que els nivells de colesterol a l'aparell de Golgi disminueixin i això provoca una inhibició en la sortida de la caveolina d'aquest compartiment.
- 3- Hem demostrat que l'acumulació de caveolina a l'aparell de Golgi provocada per l'Anx6 té dues conseqüències funcionals: la disminució de fins a un 50% del nombre de caveoles a la membrana plasmàtica i la inhibició de l'efluxió del colesterol.
- 4- La disminució dels nivells de colesterol a les membranes de Golgi inhibeix l'activitat i la translocació de la cPLA₂ al Golgi. Aquesta inhibició de la cPLA₂ afecta el transport de caveolina, però no el d'altres proteïnes.
- 5- S'ha demostrat per primera vegada que el transport de caveolina des del Golgi depèn no només de colesterol sinó també de cPLA₂.
- 6- De la mateixa manera que el transport de caveolina no es pot explicar amb un únic mecanisme, el bloqueig d'aquest transport tampoc. Diferents mecanismes directes i indirectes convergeixen en cèl.lules que expressen nivells elevats d'Anx6 per regular el tràfic de colesterol i caveolina, i la formació de caveoles.



BIBLIOGRAFIA

- Aboulaich N, Ortegren U, Vener AV, Stralfors P: **Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF**. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **350**:657-661.
- Aboulaich N, Vainonen JP, Strålfors P, Vener AV: **Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes**. *Biochem J*. 2004 Oct 15;**383**:237-48.
- Anderson RG: **The caveolae membrane system**. *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:199-225.
- Apodaca G: **Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton**. *Traffic* 2001, **2**:149-159.
- Assanasen C, Mineo C, Seetharam D, Yuhanna IS, Marcel YL, Connelly MA, Williams DL, de la Llera-Moya M, Shaul PW, Silver DL: **Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling**. *J Clin Invest* 2005, **115**:969-977.
- Assmann G, Nofer JR: **Atheroprotective effects of high-density lipoproteins**. *Annu Rev Med* 2003, **54**:321-341.
- Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH: **Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state**. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1387**:103-116.
- Avila-Sakar AJ, Kretsinger RH, Creutz CE: **Membrane-bound 3D structures reveal the intrinsic flexibility of annexin VI**. *J Struct Biol* 2000, **130**:54-62.
- Ayala-Sanmartin J, Henry JP, Pradel LA: **Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration**. *Biochim Biophys Acta* 2001, **1510**:18-28.
- Ayala-Sanmartin J: **Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain**. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **283**:72-79.
- Babiychuk EB, Draeger A: **Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains**. *J Cell Biol* 2000, **150**:1113-1124.
- Babiychuk VS, Draeger A, Babiychuk EB: **Smooth muscle actomyosin promotes Ca2+-dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains**. *Acta Biochim Pol* 2000, **47**:579-589.
- Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE: **Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine**. *Cell* 1984, **39**:405-416.
- Barel M, Gauffre A, Lyamani F, Fiandino A, Hermann J, Frade R: **Intracellular interaction of EBV/C3d receptor (CR2) with p68, a calcium-binding protein present in normal but not in transformed B lymphocytes**. *J Immunol* 1991, **147**:1286-1291.
- Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A, Raas-Rothschild A, Glusman G, Lancet D, Bach G: **Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV**. *Nat Genet* 2000, **26**:118-123.
- Beck KA, Buchanan JA, Malhotra V, Nelson WJ: **Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex**. *J Cell Biol* 1994, **127**:707-723.
- Benevolensky D, Belikova Y, Mohammadzadeh R, Trouve P, Marotte F, Russo-Marie F, Samuel JL, Charlemagne D: **Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure**. *Lab Invest* 2000, **80**:123-133.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: **Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:517-529.
- Bode G, Luken A, Kerkhoff C, Roth J, Ludwig S, Nacken W: **Interaction between S100A8/A9 and annexin A6 is involved in the calcium induced cell surface exposition of S100A8/A9**. *J Biol Chem* 2008.
- Bonifacino JS, Glick BS: **The mechanisms of vesicle budding and fusion**. *Cell* 2004, **116**:153-166.
- Brown DA, London E: **Functions of lipid rafts in biological membranes**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998, **14**:111-136.
- Brown MS, Goldstein JL: **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis**. *Science* 1986, **232**:34-47.
- Brown WJ, Chambers K, Doody A: **Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function**. *Traffic* 2003, **4**:214-221.
- Brugger B, Sandhoff R, Wegehingel S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann WD, Nickel W, Wieland FT: **Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles**. *J Cell Biol* 2000, **151**:507-518.
- Burgoyne RD, Clague MJ: **Calcium and calmodulin in membrane fusion**. *Biochim Biophys Acta* 2003, **1641**:137-143.
- Burns AL, Magendzo K, Shirvan A, Srivastava M, Rojas E, Alijani MR, Pollard HB: **Calcium channel activity of purified human synexin and structure of the human synexin gene**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:3798-3802.
- Calvo M, Enrich C: **Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver**. *Electrophoresis* 2000, **21**:3386-3395.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ: **Increasing complexity of Ras signaling**. *Oncogene* 1998, **17**:1395-1413.

- Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y: **Cholesterol sensing, trafficking, and esterification.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:129-157.
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF: **Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells.** *J Cell Biol* 1996, **133**:1217-1236.
- Chen YA, Scheller RH: **SNARE-mediated membrane fusion.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:98-106.
- Cheruku SR, Xu Z, Dutia R, Lobel P, Storch J: **Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport.** *J Biol Chem* 2006, **281**:31594-31604.
- Chetcuti A, Margan SH, Russell P, Mann S, Millar DS, Clark SJ, Rogers J, Handelsman DJ, Dong Q: **Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors.** *Cancer Res* 2001, **61**:6331-6334.
- Chintagari NR, Jin N, Wang P, Narasaraju TA, Chen J, Liu L: **Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:677-687.
- Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, Heidenreich RA, Garver WS, Francis GA: **Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease.** *J Biol Chem* 2003, **278**:32569-32577.
- Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE: **Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells.** *J Clin Invest* 2002, **109**:1541-1550.
- Choudhury A, Marks DL, Proctor KM, Gould GW, Pagano RE: **Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**:317-328.
- Chow A, Davis AJ, Gawler DJ: **Identification of a novel protein complex containing annexin VI, Fyn, Pyk2, and the p120(GAP) C2 domain.** *FEBS Lett* 2000, **469**:88-92.
- Chow A, Gawler D: **Mapping the site of interaction between annexin VI and the p120GAP C2 domain.** *FEBS Lett* 1999, **460**:166-172.
- Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR: **Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi.** *Cell* 1999, **98**:69-80.
- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP: **Role of caveolae and caveolins in health and disease.** *Physiol Rev* 2004, **84**:1341-1379.
- Creutz CE, Snyder SL: **Interactions of annexins with the mu subunits of the clathrin assembly proteins.** *Biochemistry* 2005, **44**:13795-13806.
- Creutz CE: **Secretory vesicle - cytosol interactions in exocytosis: isolation by Ca²⁺-dependent affinity chromatography of proteins that bind to the chromaffin granule membrane.** *Biochem Biophys Res Commun* 1981, **103**:1395-1400.
- Crompton MR, Moss SE, Crumpton MJ: **Diversity in the lipocortin/calpactin family.** *Cell* 1988, **55**:1-3.
- Crompton MR, Owens RJ, Totty NF, Moss SE, Waterfield MD, Crumpton MJ: **Primary structure of the human, membrane-associated Ca²⁺-binding protein p68 a novel member of a protein family.** *EMBO J* 1988, **7**:21-27.
- Cubells L, de Muga SV, Tebar F, Bonventre JV, Balsinde J, Pol A, Grewal T, Enrich C: **Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi.** *J Biol Chem* 2008, **283**:10174-10183.
- Cubells L, Vila de Muga S, Tebar F, Wood P, Evans R, Ingelmo-Torres M, Calvo M, Gaus K, Pol A, Grewal T, et al.: **Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex.** *Traffic* 2007, **8**:1568-1589.
- Cullen PJ, Lockyer PJ: **Integration of calcium and Ras signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:339-348.
- Cullen PJ: **Decoding complex Ca²⁺ signals through the modulation of Ras signaling.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**:157-161.
- Davies JP, Chen FW, Ioannou YA: **Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein.** *Science* 2000, **290**:2295-2298.
- Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA: **Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia.** *J Biol Chem* 2005, **280**:12710-12720.
- Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ: **The Ca²⁺-dependent lipid binding domain of P120GAP mediates protein-protein interactions with Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. Evidence for a direct interaction between annexin VI and P120GAP.** *J Biol Chem* 1996, **271**:24333-24336.
- de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T: **Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6.** *J Biol Chem* 2002, **277**:32187-32194.

- de Figueiredo P, Doody A, Polizotto RS, Drecktrah D, Wood S, Banta M, Strang MS, Brown WJ: **Inhibition of transferrin recycling and endosome tubulation by phospholipase A2 antagonists.** *J Biol Chem* 2001, **276**:47361-47370.
- de Figueiredo P, Drecktrah D, Polizotto RS, Cole NB, Lippincott-Schwartz J, Brown WJ: **Phospholipase A2 antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum.** *Traffic* 2000, **1**:504-511.
- De Matteis MA, Morrow JS: **The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:542-549.
- Deeg MA, Bowen RF, Oram JF, Bierman EL: **High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, **17**:1667-1674.
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA: **Molecular characterization of phagosomes.** *J Biol Chem* 1994, **269**:32194-32200.
- Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ: **Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma.** *EMBO J* 1994, **13**:4269-4277.
- Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, van der Vusse G, Griffiths G: **Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes.** *J Cell Sci* 1997, **110 (Pt 10)**:1199-1213.
- Draeger A, Wray S, Babiychuk EB: **Domain architecture of the smooth-muscle plasma membrane: regulation by annexins.** *Biochem J* 2005, **387**:309-314.
- Drecktrah D, Chambers K, Racoosin EL, Cluett EB, Gucwa A, Jackson B, Brown WJ: **Inhibition of a Golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:3459-3469.
- Egea G, Lazaro-Dieguez F, Vilella M: **Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**:168-178.
- Ehrhardt A, Ehrhardt GR, Guo X, Schrader JW: **Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together.** *Exp Hematol* 2002, **30**:1089-1106.
- Falguieres T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C, Goud B, Salamero J, Johannes L: **Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:2453-2468.
- Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Pol A: **Caveolin-1 is essential for liver regeneration.** *Science*. 2006 Sep 15; **313**:1628-32.
- Fielding CJ, Fielding PE: **Intracellular cholesterol transport.** *J Lipid Res* 1997, **38**:1503-1521.
- Fielding PE, Fielding CJ: **Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae.** *Biochemistry* 1996, **35**:14932-14938.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG: **De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:8655-8659.
- Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF, Hart IR: **Identification by differential display of annexin-VI, a gene differentially expressed during melanoma progression.** *Cancer Res* 1996, **56**:3855-3858.
- Frolov A, Srivastava K, Daphna-Iken D, Traub LM, Schaffer JE, Ory DS: **Cholesterol overload promotes morphogenesis of a Niemann-Pick C (NPC)-like compartment independent of inhibition of NPC1 or HE1/NPC2 function.** *J Biol Chem* 2001, **276**:46414-46421.
- Futter CE, White IJ: **Annexins and endocytosis.** *Traffic* 2007, **8**:951-958.
- Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J: **The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:2775-2791.
- Ganley IG, Pfeffer SR: **Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**:17890-17899.
- Garver WS, Hossain GS, Winscott MM, Heidenreich RA: **The Npc1 mutation causes an altered expression of caveolin-1, annexin II and protein kinases and phosphorylation of caveolin-1 and annexin II in murine livers.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1453**:193-206.
- Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA: **Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae.** *J Lipid Res* 2002, **43**:579-589.
- Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W: **Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:15554-15559.
- Geisow M, Childs J, Dash B, Harris A, Panayotou G, Sudhof T, Walker JH: **Cellular distribution of three mammalian Ca²⁺-binding proteins related to Torpedo calelectrin.** *EMBO J* 1984, **3**:2969-2974.
- Geisow MJ, Fritsche U, Hexham JM, Dash B, Johnson T: **A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins.** *Nature* 1986, **320**:636-638.

- George T, Boyd B, Price M, Lingwood C, Maloney M: **MHC class II proteins contain a potential binding site for the verotoxin receptor glycolipid CD77.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001, **47**:1179-1185.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE: **Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:449-461.
- Gerke V, Moss SE: **Annexins: from structure to function.** *Physiol Rev* 2002, **82**:331-371.
- Gerke V, Weber K: **Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin.** *EMBO J* 1984, **3**:227-233.
- Giambanco I, Verzini M, Donato R: **Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **196**:1221-1226.
- Gillard BK, Clement RG, Marcus DM: **Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways.** *Glycobiology* 1998, **8**:885-890.
- Goebeler V, Poeter M, Zeuschner D, Gerke V, Rescher U.: **Annexin A8 regulates late endosome organization and function.** *Mol Biol Cell* 2008. Oct 15 Epub ahead of print.
- Goebeler V, Ruhe D, Gerke V, Rescher U: **Annexin A8 displays unique phospholipid and F-actin binding properties.** *FEBS Lett* 2006, **580**:2430-2434.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS: **Protein sensors for membrane sterols.** *Cell* 2006, **124**:35-46.
- Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, et al.: **HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner.** *J Clin Invest* 2003, **111**:1579-1587.
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J: **rab5 controls early endosome fusion in vitro.** *Cell* 1991, **64**:915-925.
- Grewal T, de Diego I, Kirchhoff MF, Tebar F, Heeren J, Rinninger F, Enrich C: **High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras.** *J Biol Chem* 2003, **278**:16478-16481.
- Grewal T, Enrich C: **Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex.** *Bioessays* 2006, **28**:1211-1220.
- Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells L, de Diego I, Kirchhoff MF, Hughes WE, Heeren J, Rye KA, et al.: **Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity.** *Oncogene* 2005, **24**:5809-5820.
- Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jackle S: **Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment.** *J Biol Chem* 2000, **275**:33806-33813.
- Grimmer S, Iversen TG, van Deurs B, Sandvig K: **Endosome to Golgi transport of ricin is regulated by cholesterol.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:4205-4216.
- Grimmer S, Ying M, Walchli S, van Deurs B, Sandvig K: **Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism.** *Traffic* 2005, **6**:144-156.
- Gruenberg J: **The endocytic pathway: a mosaic of domains.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:721-730.
- Gubern A, Casas J, Barcelo-Torns M, Barneda D, de la Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E: **Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets.** *J Biol Chem* 2008.
- Guzman-Aranguez A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Perez-Ramos P, Lopez de Silanes I, Lizarbe MA: **Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5.** *J Cell Biochem* 2005, **94**:178-193.
- Hancock JF: **Ras proteins: different signals from different locations.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:373-384.
- Hao M, Maxfield FR: **Characterization of rapid membrane internalization and recycling.** *J Biol Chem* 2000, **275**:15279-15286.
- Harashima M, Harada K, Ito Y, Hyuga M, Seki T, Ariga T, Yamaguchi T, Niimi S: **Annexin A3 expression increases in hepatocytes and is regulated by hepatocyte growth factor in rat liver regeneration.** *J Biochem* 2008, **143**:537-545.
- Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J: **Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol.** *Mol Biol Cell* 1997, **8**:533-545.
- Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE: **Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:8028-8032.
- Hayashi M, Imai Y, Naraba H, Tomoda H, Omura S, Oh-ishi S: **Enhanced production of platelet-activating factor in stimulated rat leukocytes pretreated with triacsin C, A novel acyl-coA synthetase inhibitor.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **188**:1280-1285.
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE: **Annexin-actin interactions.** *Traffic* 2004, **5**:571-576.
- Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR: **Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles.** *J Cell Biochem* 1991, **46**:78-85.

- Hazarika P, Sheldon A, Kaetzel MA, Diaz-Munoz M, Hamilton SL, Dedman JR: **Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel requires intact annexin VI.** *J Cell Biochem* 1991, **46**:86-93.
- Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Olkkonen VM, Ikonen E: **Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8375-8380.
- Herz J, Strickland DK: **LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor.** *J Clin Invest* 2001, **108**:779-784.
- Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, Walser P, Abankwa D, Oorschot VM, Martin S, et al.: **PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function.** *Cell* 2008, **132**:113-124.
- Holttä-Vuori M, Maatta J, Ullrich O, Kuismanen E, Ikonen E: **Mobilization of late-endosomal cholesterol is inhibited by Rab guanine nucleotide dissociation inhibitor.** *Curr Biol* 2000, **10**:95-98.
- Hosoya H, Kobayashi R, Tsukita S, Matsumura F: **Ca(2+)-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1992, **22**:200-210.
- Ikonen E: **Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:125-138.
- Inui M, Watanabe T, Sobue K: **Annexin VI binds to a synaptic vesicle protein, synapsin I.** *J Neurochem* 1994, **63**:1917-1923.
- Jackle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Groger I, Greten H, Windler E: **Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes.** *J Biol Chem* 1994, **269**:1026-1032.
- Jansen M, Pietiäinen VM, Polonen H, Rasilainen L, Koivusalo M, Ruotsalainen U, Jokitalo E, Ikonen E: **Cholesterol substitution increases the structural heterogeneity of caveolae.** *J Biol Chem* 2008, **283**:14610-14618.
- Janvier K, Bonifacino JS: **Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:4231-4242.
- Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR: **Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1223**:368-374.
- Kamal A, Ying Y, Anderson RG: **Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes.** *J Cell Biol* 1998, **142**:937-947.
- Khine AA, Firtel M, Lingwood CA: **CD77-dependent retrograde transport of CD19 to the nuclear membrane: functional relationship between CD77 and CD19 during germinal center B-cell apoptosis.** *J Cell Physiol* 1998, **176**:281-292.
- Kim S, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS: **Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model.** *FEBS Lett* 2001, **489**:243-248.
- Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS: **Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site.** *J Biol Chem* 2001, **276**:15712-15719.
- King IC, Sartorelli AC: **The relationship between epidermal growth factor receptors and the terminal differentiation of A431 carcinoma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **140**:837-843.
- Kirchhausen T: **Adaptors for clathrin-mediated traffic.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:705-732.
- Kirchhausen T: **Clathrin.** *Annu Rev Biochem* 2000, **69**:699-727.
- Kirchhausen T: **Three ways to make a vesicle.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:187-198.
- Kirkham M, Parton RG: **Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1745**:273-286.
- Kiss RS, Ma Z, Nakada-Tsukui K, Brugnera E, Vassiliou G, McBride HM, Ravichandran KS, Marcel YL: **The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux.** *J Biol Chem* 2006, **281**:12081-12092.
- Klapisz E, Maslah J, Bereziat G, Wolf C, Koumanov KS: **Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A(2).** *J Lipid Res* 2000, **41**:1680-1688.
- Kollermann J, Schlömm T, Bang H, Schwall GP, von Eichel-Streiber C, Simon R, Schostak M, Huland H, Berg W, Sauter G, et al.: **Expression and Prognostic Relevance of Annexin A3 in Prostate Cancer.** *Eur Urol* 2008.
- Kolter T, Sandhoff K: **Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:81-103.
- Kolter T, Sandhoff K: **Sphingolipid metabolism diseases.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1758**:2057-2079.
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN: **Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid.** *Traffic* 2003, **4**:162-174.
- Koumanov K, Wolf C, Bereziat G: **Modulation of human type II secretory phospholipase A2 by sphingomyelin and annexin VI.** *Biochem J* 1997, **326** (Pt 1):227-233.

- Kuijpers GA, Lee G, Pollard HB: **Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules and chromaffin cells: evidence for a dynamic role in the secretory process.** *Cell Tissue Res* 1992, **269**:323-330.
- Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K: **Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery.** *J Cell Biol* 1998, **142**:1413-1427.
- LaPlante JM, Falardeau J, Sun M, Kanazirska M, Brown EM, Slaugenhaupt SA, Vassilev PM: **Identification and characterization of the single channel function of human mucolipin-1 implicated in mucopolidosis type IV, a disorder affecting the lysosomal pathway.** *FEBS Lett* 2002, **532**:183-187.
- Lavie Y, Fiucci G, Czarny M, Liscovitch M: **Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells.** *Lipids* 1999, **34 Suppl**:S57-63.
- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M: **Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:32380-32383.
- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M: **Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **49**:317-323.
- Lavie Y, Liscovitch M: **Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences.** *Glycoconj J* 2000, **17**:253-259.
- Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, Mayran N, Faure J, Gruenberg J: **Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7.** *EMBO J* 2002, **21**:1289-1300.
- Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, et al.: **Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1.** *Mol Cell* 1999, **4**:1029-1040.
- Lewin DA, Sheff D, Ooi CE, Whitney JA, Yamamoto E, Chicione LM, Webster P, Bonifacino JS, Mellman I: **Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule.** *FEBS Lett* 1998, **435**:263-268.
- Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ: **High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner.** *J Biol Chem* 2002, **277**:11058-11063.
- Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H: **Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts.** *Trends Biochem Sci* 2005, **30**:430-436.
- Lin HC, Sudhof TC, Anderson RG: **Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits.** *Cell* 1992, **70**:283-291.
- Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E: **Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:47-56.
- Ling TY, Chen CL, Huang YH, Liu IH, Huang SS, Huang JS: **Identification and characterization of the acidic pH binding sites for growth regulatory ligands of low density lipoprotein receptor-related protein-1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:38736-38748.
- Liscovitch M, Lavie Y: **Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways?** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:530-534.
- Liscum L, Munn NJ: **Intracellular cholesterol transport.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1438**:19-37.
- Liscum L, Ruggiero RM, Faust JR: **The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts.** *J Cell Biol* 1989, **108**:1625-1636.
- Liscum L: **Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam.** *Traffic* 2000, **1**:218-225.
- Liu L, Pilch PF: **A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization.** *J Biol Chem* 2008, **283**:4314-4322.
- Liu P, Anderson RG: **Compartmentalized production of ceramide at the cell surface.** *J Biol Chem* 1995, **270**:27179-27185.
- Llado A, Timpson P, Vila de Muga S, Moreto J, Pol A, Grewal T, Daly RJ, Enrich C, Tebar F: **Protein kinase Cdelta and calmodulin regulate epidermal growth factor receptor recycling from early endosomes through Arp2/3 complex and cortactin.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:17-29.
- Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Bodenec J, de-Morgan A, Waller H, Schiffmann R, Futerman AH: **Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms.** *J Biol Chem* 2003, **278**:23594-23599.
- Lloyd-Evans E, Pelled D, Riebeling C, Futerman AH: **Lyso-glycosphingolipids mobilize calcium from brain microsomes via multiple mechanisms.** *Biochem J* 2003, **375**:561-565.
- Lockyer PJ, Kupzig S, Cullen PJ: **CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway.** *Curr Biol* 2001, **11**:981-986.
- Lopez de Silanes I, Olmo N, Turnay J, Gonzalez de Buitrago G, Perez-Ramos P, Guzman-Aranguez A, Garcia-Diez M, Lecona E, Gorospe M, Lizarbe MA: **Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:4593-4600.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.

- Luckcuck T, Trotter PJ, Walker JH: **Localization of annexin VI in the adult and neonatal heart.** *Cell Biol Int* 1998, **22**:199-205.
- Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton RG: **Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule.** *J Cell Biol* 1999, **145**:1443-1459.
- Luna A, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, Way M, Egea G: **Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:866-879.
- Lupashin V, Sztul E: **Golgi tethering factors.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1744**:325-339.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA.: **Lysosomes: fusion and function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:622-632.
- Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, Olson MF, Marshall CJ: **Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C.** *Science* 1998, **280**:109-112.
- Mari M, Bujny MV, Zeuschner D, Geerts WJ, Griffith J, Petersen CM, Cullen PJ, Klumperman J, Geuze HJ: **SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors.** *Traffic* 2008, **9**:380-393.
- Marks DL, Pagano RE: **Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease.** *Trends Cell Biol* 2002, **12**:605-613.
- Marks DL, Singh RD, Choudhury A, Wheatley CL, Pagano RE: **Use of fluorescent sphingolipid analogs to study lipid transport along the endocytic pathway.** *Methods* 2005, **36**:186-195.
- Matas OB, Fritz S, Luna A, Egea G: **Membrane trafficking at the ER/Golgi interface: functional implications of RhoA and Rac1.** *Eur J Cell Biol* 2005, **84**:699-707.
- Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ: **The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **49**:237-250.
- Maxfield FR, Menon AK: **Intracellular sterol transport and distribution.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**:379-385.
- Maxfield FR, Wustner D: **Intracellular cholesterol transport.** *J Clin Invest* 2002, **110**:891-898.
- Mayran N, Parton RG, Gruenberg J: **Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells.** *EMBO J* 2003, **22**:3242-3253.
- Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M: **APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment.** *Cell* 2004, **116**:445-456.
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M: **Not just a sink: endosomes in control of signal transduction.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16**:400-406.
- Michaely P, Kamal A, Anderson RG, Bennett V: **A requirement for ankyrin binding to clathrin during coated pit budding.** *J Biol Chem* 1999, **274**:35908-35913.
- Michelangeli F, Ogunbayo OA, Wootton LL: **A plethora of interacting organellar Ca²⁺ stores.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:135-140.
- Miwa N, Uebi T, Kawamura S: **S100-annexin complexes - biology of conditional association.** *FEBS J* 2008.
- Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H: **CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**:13498-13504.
- Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Hostettler A, Rescher U, Draeger A: **Annexins as intracellular calcium sensors.** *Cell Calcium* 2007, **41**:207-219.
- Monastyrskaya K, Tschumi F, Babiychuk EB, Stroka D, Draeger A: **Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia.** *Biochem J* 2008, **409**:65-75.
- Moore PB, Kraus-Friedmann N, Dedman JR: **Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin.** *J Cell Sci* 1984, **72**:121-133.
- Morgan RO, Fernandez MP: **Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics.** *Cell Mol Life Sci* 1997, **53**:508-515.
- Morgan RO, Fernandez MP: **Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in Giardia lamblia.** *Mol Biol Evol* 1995, **12**:967-979.
- Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, Gonzalez-Florez MI, Fernandez MP: **Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1742**:133-140.
- Moss SE, Jacob SM, Davies AA, Crumpton MJ: **A growth-dependent post-translational modification of annexin VI.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1160**:120-126.
- Mukherjee S, Maxfield FR: **Lipid and cholesterol trafficking in NPC.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1685**:28-37.
- Mukherjee S, Maxfield FR: **Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking.** *Traffic* 2000, **1**:203-211.
- Munro S: **Organelle identity and the organization of membrane traffic.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:469-472.
- Munro S: **The Golgi apparatus: defining the identity of Golgi membranes.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:395-401.
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K: **VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:10339-10343.

- Nakata T, Sobue K, Hirokawa N: **Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry.** *J Cell Biol* 1990, **110**:13-25.
- Nofer JR, Junker R, Pulawski E, Fobker M, Levkau B, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G, Walter M: **High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway.** *Thromb Haemost* 2001, **85**:730-735.
- Ohgami N, Ko DC, Thomas M, Scott MP, Chang CC, Chang TY: **Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:12473-12478.
- Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A: **Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals.** *J Struct Biol* 2001, **133**:55-63.
- Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S: **Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain.** *J Neurosci Res* 2001, **64**:235-241.
- Ortega D, Pol A, Biermer M, Jackle S, Enrich C: **Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes.** *J Cell Sci* 1998, **111 (Pt 2)**:261-269.
- Pagano RE, Puri V, Dominguez M, Marks DL: **Membrane traffic in sphingolipid storage diseases.** *Traffic* 2000, **1**:807-815.
- Pagano RE: **Endocytic trafficking of glycosphingolipids in sphingolipid storage diseases.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**:885-891.
- Palade GE: **An electron microscope study of the mitochondrial structure.** *J Histochem Cytochem* 1953, **1**:188-211.
- Pang A, Au WY, Kwong YL: **Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow.** *Leuk Res* 2004, **28**:973-977.
- Parton RG: **Caveolae meet endosomes: a stable relationship?** *Dev Cell* 2004 Oct;7(4):458-60.
- Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF: **Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation.** *J Cell Sci* 2006, **119**:787-796.
- Parton RG, Richards AA: **Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms.** *Traffic* 2003, **4**:724-738.
- Parton RG, Simons, K.: **The multiple faces of caveolae.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):185-94
- Pearse BM: **Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, **73**:1255-1259.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A: **Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:473-483.
- Pelkmans L: **Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1746**:295-304.
- Pepinsky RB, Tizard R, Mattaliano RJ, Sinclair LK, Miller GT, Browning JL, Chow EP, Burne C, Huang KS, Pratt D, et al.: **Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I.** *J Biol Chem* 1988, **263**:10799-10811.
- Perez-Victoria FJ, Mardones GA, Bonifacino JS: **Requirement of the human GARP Complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:2350-2362.
- Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E: **Evolving endosomes: how many varieties and why?** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:423-434.
- Pfeffer S, Aivazian D: **Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:886-896.
- Pfeffer S: **Membrane domains in the secretory and endocytic pathways.** *Cell* 2003, **112**:507-517.
- Pfeffer SR: **Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:E17-22.
- Pol A, Calvo M, Enrich C: **Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment.** *FEBS Lett* 1998, **441**:34-38.
- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C: **The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21).** *Hepatology* 1999, **29**:1848-1857.
- Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG: **A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance.** *J Cell Biol* 2001, **152**:1057-1070.
- Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ferguson C, Carozzi A, Luetterforst R, Enrich C, Parton RG: **Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**:99-110.
- Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG: **Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:2091-2105.

- Pol A, Ortega D, Enrich C: **Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes.** *Biochem J* 1997, **327 (Pt 3):**741-746.
- Pollard HB, Burns AL, Rojas E: **Synexin (annexin VII): a cytosolic calcium-binding protein which promotes membrane fusion and forms calcium channels in artificial bilayer and natural membranes.** *J Membr Biol* 1990, **117:**101-112.
- Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jackle S, Enrich C: **Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes.** *Exp Cell Res* 2001, **269:**13-22.
- Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jackle S, Enrich C: **Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells.** *Exp Cell Res* 2000, **257:**33-47.
- Pons M, Tebar F, Kirchhoff M, Peiro S, de Diego I, Grewal T, Enrich C: **Activation of Raf-1 is defective in annexin 6 overexpressing Chinese hamster ovary cells.** *FEBS Lett* 2001, **501:**69-73.
- Predescu SA, Predescu DN, Shimizu K, Klein IK, Malik AB: **Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane.** *J Biol Chem* 2005, **280:**37130-37138.
- Presley JF, Smith C, Hirschberg K, Miller C, Cole NB, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J: **Golgi membrane dynamics.** *Mol Biol Cell* 1998, **9:**1617-1626.
- Prior IA, Hancock JF: **Compartmentalization of Ras proteins.** *J Cell Sci* 2001, **114:**1603-1608.
- Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF: **GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.** *Nat Cell Biol* 2001, **3:**368-375.
- Puri V, Jefferson JR, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE: **Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage.** *J Biol Chem* 2003, **278:**20961-20970.
- Rapoport I, Boll W, Yu A, Bocking T, Kirchhausen T: **A motif in the clathrin heavy chain required for the Hsc70/auxilin uncoating reaction.** *Mol Biol Cell* 2008, **19:**405-413.
- Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Jr., Christ GJ, Edelmann W, et al.: **Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae.** *Mol Cell Biol* 2002, **22:**2329-2344.
- Ren X, Ostermeyer AG, Ramcharan LT, Zeng Y, Lublin DM, Brown DA: **Conformational defects slow Golgi exit, block oligomerization, and reduce raft affinity of caveolin-1 mutant proteins.** *Mol Biol Cell* 2004, **15:**4556-4567.
- Rentero C, Evans R, Wood P, Tebar F, Vila de Muga S, Cubells L, de Diego I, Hayes TE, Hughes WE, Pol A, et al.: **Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells.** *Cell Signal* 2006, **18:**1006-1016.
- Resh MD: **Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1451:**1-16.
- Rintala-Dempsey AC, Rezvanpour A, Shaw GS: **S100-annexin complexes - structural insights.** *FEBS J* 2008.
- Roth TF, Porter KR: **Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L.** *J Cell Biol* 1964, **20:**313-332.
- Rothman JE: **The golgi apparatus: two organelles in tandem.** *Science* 1981, **213:**1212-1219.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B: **Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules.** *EMBO J* 2005, **24:**1537-1545.
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG: **Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.** *Nat Cell Biol* 1999, **1:**98-105.
- Roy S, Wyse B, Hancock JF: **H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis.** *Mol Cell Biol* 2002, **22:**5128-5140.
- Rudel LL, Morris MD: **Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde.** *J Lipid Res* 1973, **14:**364-366.
- Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E: **Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells.** *J Cell Biol* 1998, **140:**795-806.
- Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Walker JH, Biden TJ: **Activated protein kinase C alpha associates with annexin VI from skeletal muscle.** *Biochem J* 1998, **330 (Pt 2):**675-681.
- Schnitzer JE, Liu J, Oh P: **Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases.** *J Biol Chem* 1995, **270:**14399-14404.
- Schroeder F, Holland JF, Bieber LL: **Fluorometric evidence for the binding of cholesterol to the filipin complex.** *J Antibiot (Tokyo)* 1971, **24:**846-849.
- Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J: **Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells.** *J Cell Biol* 1997, **139:**1137-1155.
- Sehgal PB, Mukhopadhyay S: **Pulmonary arterial hypertension: a disease of tethers, SNAREs and SNAPS?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **293:**H77-85.

- Selbert S, Fischer P, Pongratz D, Stewart M, Noegel AA: **Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells.** *J Cell Sci* 1995, **108 (Pt 1)**:85-95.
- Sieber JJ, Willig KI, Heintzmann R, Hell SW, Lang T: **The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane.** *Biophys J* 2006, **90**:2843-2851.
- Sillence DJ, Platt FM: **Storage diseases: new insights into sphingolipid functions.** *Trends Cell Biol* 2003, **13**:195-203.
- Simons K, Gruenberg J: **Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**:459-462.
- Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**:569-572.
- Simons K, Ikonen E: **How cells handle cholesterol.** *Science* 2000, **290**:1721-1726.
- Simons K, Toomre D: **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:31-39.
- Simons K, van Meer G: **Lipid sorting in epithelial cells.** *Biochemistry* 1988, **27**:6197-6202.
- Singer SJ, Nicolson GL: **The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.** *Science* 1972, **175**:720-731.
- Smart EJ, De Rose RA, Farber SA: **Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3450-3455.
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG: **A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane.** *J Biol Chem* 1996, **271**:29427-29435.
- Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE: **Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells.** *J Cell Biol* 1994, **124**:301-306.
- Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A: **Rab GTPases coordinate endocytosis.** *J Cell Sci* 2000, **113 Pt 2**:183-192.
- Song G, Harding SE, Duchen MR, Tunwell R, O'Gara P, Hawkins TE, Moss SE: **Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice.** *FASEB J* 2002, **16**:622-624.
- Sorkin A, Von Zastrow M: **Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:600-614.
- Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ: **Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules.** *J Cell Biol* 2008, **180**:295-303.
- Spiliotis ET, Nelson WJ: **Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization.** *J Cell Sci* 2006, **119**:4-10.
- Srivastava M, Bubendorf L, Nolan L, Glasman M, Leighton X, Miller G, Fehrle W, Raffeld M, Eidelman O, Kallioniemi OP, et al.: **ANX7 as a bio-marker in prostate and breast cancer progression.** *Dis Markers* 2001, **17**:115-120.
- Srivastava M, Bubendorf L, Srikantan V, Fossom L, Nolan L, Glasman M, Leighton X, Fehrle W, Pittaluga S, Raffeld M, et al.: **ANX7, a candidate tumor suppressor gene for prostate cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:4575-4580.
- Sturley SL, Patterson MC, Balch W, Liscum L: **The pathophysiology and mechanisms of NP-C disease.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1685**:83-87.
- Stuven E, Porat A, Shimron F, Fass E, Kaloyanova D, Brugger B, Wieland FT, Elazar Z, Helms JB: **Intra-Golgi protein transport depends on a cholesterol balance in the lipid membrane.** *J Biol Chem* 2003, **278**:53112-53122.
- Sudhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barjon P, Reynolds GA: **Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:664-668.
- Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A: **Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters.** *J Cell Biol* 2005, **170**:769-779.
- te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, Sillence DJ: **Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport.** *J Biol Chem* 2004, **279**:26167-26175.
- Tebar F, Villalonga P, Sorkina T, Agell N, Sorkin A, Enrich C: **Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:2057-2068.
- Theobald J, Hanby A, Patel K, Moss SE: **Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431 squamous epithelial carcinoma cells.** *Br J Cancer* 1995, **71**:786-788.
- Theobald J, Smith PD, Jacob SM, Moss SE: **Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells suppresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1223**:383-390.
- Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE: **Identification of annexin VI as a Ca²⁺-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**:35496-35502.
- Thorin B, Gache G, Dubois T, Grataroli R, Domingo N, Russo-Marie F, Lafont H: **Annexin VI is secreted in human bile.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **209**:1039-1045.

- Tomas A, Moss SE: **Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope.** *J Biol Chem* 2003, **278**:20210-20216.
- Toomre D, Steyer JA, Keller P, Almers W, Simons K: **Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy.** *J Cell Biol* 2000, **149**:33-40.
- Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Di Pentima A, Fusella A, Di Giandomenico D, San Pietro E, Beznoussenko GV, Polishchuk EV, Baldassarre M, et al.: **Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:1071-1081.
- Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA: **Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40.** *EMBO J* 2003, **22**:4346-4355.
- Upadhyaya A, Sheetz MP: **Tension in tubulovesicular networks of Golgi and endoplasmic reticulum membranes.** *Biophys J* 2004, **86**:2923-2928.
- Valasek MA, Weng J, Shaul PW, Anderson RG, Repa JJ: **Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport.** *J Biol Chem* 2005, **280**:28103-28109.
- Van Ginkel PR, Gee RL, Walker TM, Hu DN, Heizmann CW, Polans AS: **The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1448**:290-297.
- van Meer G: **Cellular lipidomics.** *EMBO J* 2005, **24**:3159-3165.
- van Meer G: **Lipid traffic in animal cells.** *Annu Rev Cell Biol* 1989, **5**:247-275.
- Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B: **Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules.** *J Cell Biol* 2001, **152**:959-970.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL: **Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis.** *Science* 1996, **274**:2086-2089.
- Vinten J, Johnsen AH, Roepstorff P, Harpoth J, Tranum-Jensen J: **Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1717**:34-40.
- Voldstedlund M, Thuneberg L, Tranum-Jensen J, Vinten J, Christensen EI: **Caveolae, caveolin and cav-p60 in smooth muscle and renin-producing cells in the rat kidney.** *Acta Physiol Scand* 2003, **179**:179-188.
- Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J: **cav-p60 expression in rat muscle tissues. Distribution of caveolar proteins.** *Cell Tissue Res* 2001, **306**:265-276.
- Walker SA, Cullen PJ, Taylor JA, Lockyer PJ: **Control of Ras cycling by Ca²⁺.** *FEBS Lett* 2003, **546**:6-10.
- Walter M, Davies JP, Ioannou YA: **Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes.** *J Lipid Res* 2003, **44**:243-253.
- Wang Y, Thiele C, Huttner WB: **Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network.** *Traffic* 2000, **1**:952-962.
- Warren G, Malhotra V: **The organisation of the Golgi apparatus.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:493-498.
- Watanabe T, Inui M, Chen BY, Iga M, Sobue K: **Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calpectin (brain spectrin or fodrin).** *J Biol Chem* 1994, **269**:17656-17662.
- Way M, Parton RG: **M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein.** *FEBS Lett* 1995, **376**:108-112.
- Weng X, Luecke H, Song IS, Kang DS, Kim SH, Huber R: **Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution.** *Protein Sci* 1993, **2**:448-458.
- Westover EJ, Covey DF: **The enantiomer of cholesterol.** *J Membr Biol* 2004, **202**:61-72.
- White SH: **Biochemistry. Crowds of syntaxins.** *Science* 2007, **317**:1045-1046.
- Wice BM, Gordon JI: **A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin.** *J Cell Biol* 1992, **116**:405-422.
- Wieland F, Harter C: **Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:440-446.
- Wiley HS, Burke PM: **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking.** *Traffic* 2001, **2**:12-18.
- Wiley HS: **Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling.** *Exp Cell Res* 2003, **284**:78-88.
- Williams TM, Lisanti MP: **Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis** *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Mar; **288**:C494-506.
- Wolf AA, Jobling MG, Wimer-Mackin S, Ferguson-Maltzman M, Madara JL, Holmes RK, Lencer WI: **Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia.** *J Cell Biol* 1998, **141**:917-927.
- Woodman PG, Futter CE: **Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity.** *Curr Opin Cell Biol* 2008.
- Yamada E: **The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.** *J Biophys Biochem Cytol* 1955, **1**:445-458.
- Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, Kono M, Tsuji S, Daniotti JL, Werth N, et al.: **Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3445-3449.

- Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silviu J, Kapus A, Grinstein S: **Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization.** *Science* 2008, **319**:210-213.
- Yokoyama S: **Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway.** *Curr Opin Lipidol* 2005, **16**:269-279.
- Zaks WJ, Creutz CE: **Annexin-chromaffin granule membrane interactions: a comparative study of synexin, p32 and p67.** *Biochim Biophys Acta* 1990, **1029**:149-160.
- Zerial M, McBride H: **Rab proteins as membrane organizers.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:107-117.
- Zervas M, Somers KL, Thrall MA, Walkley SU: **Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C.** *Curr Biol* 2001, **11**:1283-1287.
- Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martinez F, Comly M, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ, Strauss JF, 3rd: **MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria.** *J Biol Chem* 2002, **277**:33300-33310.
- Zobiack N, Rescher U, Laarmann S, Michgehl S, Schmidt MA, Gerke V: **Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic E. coli induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2.** *J Cell Sci* 2002, **115**:91-98.

Aquesta és la Barcelona de la que no em vull allunyar...i des d'on continuaré fent recerca.

"(...) Aquesta ciutat comtal, prodigiosa i cobejada, turística i domèstica, del disseny i l'anarquia, centralista i disbauxada, en un punt situat a l'enlloc del ben endins..

(...)perquè, certament, de sentiments estem parlant quan provem de retrobar, sota les runes multitudinàries, l'essència humida d'aquesta metròpoli tan antiga i aquest sentir que ens fa estimar l'asfalt que trepitgem;(...). Jo tinc la sort d'haver nascut al Poble Sec, en un carrer que du el nom d'un poeta monàrquic oblidat. Un carrer ni massa ample ni massa estret que s'enfila cap a Montjuïc, on les llambordes es fonien patinant escales amunt, entre les torretes de la classe mitjana de barriada, amb el pedregós bardissam que pentinava la muntanya, en aquells anys encara un bon tros verge i poblada per les barraques de la misèria en un altre tros ben bo. Vessants per on grimpàvem la canalla a robar figues i beure aigua de la Font del Gat. (...) Un partit infantil, amistós, acabat, però, a garrotades contra la tribu del Pinchavvas, que tan aviat arreglaven paraigües com desabonyegaven cassoles o ens fotien els mobles vells que guardàvem per a la foguera de Sant Joan.

He sentit relatar de boca dels pares el continuïum de dia i nit del Paral·lel republicà, on hi havia establiments que ni tan sols conservaven la clau de la porta, i he sentit mon pare fent la crònica d'un míting del Lerroix i de l'èxit apoteòsic d'en Josep Santpere a l'Ambos Mundos. Tot això i més: els jocs i la llibertat al carrer, les campanes escolars, els melindros amb xocolata a la granja Gustems, els batejos a la parròquia de Sant Salvador. La primera comunió a Santa Madrona, (...), el Lluís del colmado arrambant les clientes, la fàbrica de botons davant del *meublé* del pont del funicular, les sargantanes amb la cua escapçada i el germà de l'Ausensi cantant pel celobert mentre els caramellaires de la Nova Colla assajaven al Casinet la "Cançó de matinada" del Juanito i els més grandets feien torns per espiar a collibè i a través d'un finestruc les coristes del Molino.

Tot això ho he imaginat més tard convertit en cançons, que tal vegada pervisquin en la memòria d'algú, però que tard o d'hora el vent s'endurà. Tots nosaltres esdevindrem no-res en un magma impensat, però avui i aquí -és a dir, l'única eternitat documentada- només puc constatar que em constitueixen una sèrie de records, imatges, sons i aromes d'aquest Cap i Casal que no podré oblidar mai. Aquesta és la meua ciutat i ho serà mentre jo visqui.

(...)

Proposo, doncs, aplicar el focus sobre aquestes Festes de la Mercè i fer un parament interactiu d'antenes, tot desplegant un assaig de percepció ample i decidit, esfèric i sense embuts del potencial galàcticament poètic que substanciï els plànols i dimensions evidents però habitualment ignorats. A la plaça de Sant Jaume, a la del Sortidor, al Fossar de les Moreres i al carrer dels Robadors. A La Paloma, a la Catedral (...) al Mercat del Peix, i sempre, sempre la Rambla.(...)

La Rambla per on passejaven en Maragall apamant el lirisme de la Gran Encisera, la penya de l'Ateneu, Riba, Carner, Sagarra i el gran Pujols encapçalant la corrua embridant una tortuga de disset mil anys, la que trafegaren els cambrers del quiosc de Canaletes i la Monyos (...) i el Salvat Papasseit de la Rosa de Foc, que defallí al carrer d'Argenteria cridant "Llum, més llum!" (...) La Rambla d'un impecable Rusiñol venent dura quatre pessetes, però també la dels pistolers de la patronal que van pelar el Noi del Sucre. La de la Bodega Bohemia, el Jazz Colón. La del Gil de Biedma sortint del Copacabana i el Marsé i el Goytisoló entrant al Marsella, la de les carnisseres de la Boqueria i la de la divinitat bocacciana de l'Empordà derrapant Pegasos descapotables turquesa, maragda, robí del carrer Muntaner a la plaça Reial, i la de les paradetes d'ocells on ton avi i mon avi compraven cadeneres i periquitos.

(...)

És aquest el nervi estimulador sentimental d'una Barcelona que més m'estimaria amb menys turistes pixaners i més viatgers il·lustrats, amb menys txàndals olímpics de patacada i més boletaires d'innocència nua amb el cap a les estrelles, i amb els buròcrates emmagatzemats al Museu de Cera i els taurons especulant amb casetes retallables i hortets metafísics i no pas amb sostres i parets -que, tant de bo, no fossin de ningú!-. Una Rambla, una Barcelona i una urbanitat que molts vam creure possible que girés del costat del somni i no pas del de l'eficàcia econòmica, de la imaginació enfront de la llei de la gravetat i de la llibertat creadora en contra de la correcció ideològica(...). Ara, de nou, anhelants, descalços,

mudats, esbalaïts, és l'hora, mercedans. Cal, aprofitant l'avinentesa, tornar a formar la rua de bombolles quàntiques que mai no ha parat de desfilar per sota, per sobre, a banda de la guia municipal i les llistes d'empadronament. (...) I així, tants i tants que, des de les galàxies de la imaginació estant, no voldran marxar mai del tot d'aquesta Barcelona del seny i el cor delirant, infl amada i serena, perquè saben que el més sublim del Parnàs, la voladura més absoluta, no tindria al capdavant sentit, fóra en va i res més que fantasia, sense el teixit imprescindible dels veïns i veïnes que barcelonegen a tort i a dret. No pas l'estructura oficial, administrativa ni institucional, no els polítics professionals, ans la humanitat anònima, les persones una a una que fonamenten i arrelen la vida i l'existència i que fan possible la història que entre tots escrivim cada dia. Repartidors suant la samarreta, senyores rialleres amb ordinador o amb boatiné, homes apressats amb corbata. Escombriaires a qualsevol hora i funcionaris a quasi cap. Les poques porteres que van quedant. Dependentes de merceria i caixeres del súper. Els veterans de la petanca i les iaies que aguanten els néts. El gremi de l'arracada i el tattoo. El paio que fa recados a peu i el xava motorista. (...) quinquis i empleats de "la caixa". La gent del barri, treballadora, matinera, fraternal, dipositària d'una exquisida filosofia del carrer i contenta de viure. En fi, el poble de Barcelona. Real, assedegat de poesia, ballant la sardana i la rumba en una mixtura complementària i enriquidora.

El que som, el que tenim, el que somiem.

Des d'aquí convidem a tothom, barcelonins, barcelonasses, barcelonites, a menjar-se la festa i a beure a raig o a galet l'alegria de viure-la amb cordial intensitat. Tirem els coets, i a mercejar!"

Pregó Festes de la Mercè

Jaume Sisa

Saló de Cent, 19 de setembre de 2008

El mateix dia que es va començar a escriure aquesta tesi.

