

Tesi doctoral presentada per En/Na

Iñaki DE DIEGO MARTÍNEZ

amb el títol

**"Distribución intracelular de la anexina A6:
implicaciones funcionales"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

MEDICINA

Barcelona, 17 de desembre del 2005.

Facultat de Medicina
Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INTRODUCCIÓN	001
I - GENERAL	003
Dominios funcionales	004
Modelos de actuación propuestos en la fusión de membranas	010
Modificaciones post-traduccionales	012
Unión calcio-independiente a membranas	014
Anexinas en el sistema endocítico	015
Inserción en la membrana	020
Actuación en el núcleo celular	022
II - ANEXINA A6	022
Aspectos relativos a su estructura	022
Funciones de la anexina A6	026
III - CLASIFICACIÓN DE LAS FUNCIONES DE LAS ANEXINAS	033
IV - ANEXINAS Y COLESTEROL	036
Receptores LDLR y SR-BI	037
Colesterol y <i>lipid rafts</i>	042
Señalización de Ras y MAPKs	044
V - RESUMEN	048
OBJETIVOS	051
MATERIAL Y MÉTODOS	055
- Purificación de proteínas	057
- Pulldown GST-RBD	059
- Lowry-SDS	062
- Medidas de calcio intracelular	063
- Preparación (diálisis) de las HDL	066
- Obtención de HDL fluorescentes	067
- Inmunocitoquímica	068
- Fraccionamiento celular	070
- Immunoprecipitación	072
- Ensayo de actividad Raf	073
- Ensayo de binding de ¹²⁵ I-HDL	076
- Microscopía Electrónica de Transmisión	078
- Tratamientos y marcadores	080
- TABLA DE ANTICUERPOS	083
RESULTADOS	087
- <i>“Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6”</i>	091
- <i>“High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves Scavenger Receptor Type BI-mediated activation of Ras”</i>	105
- <i>“Annexin 6-mediated membrane recruitment of p120^{GAP} modulates the activation of Ras and Raf-1”</i>	113
- <i>Análisis de la translocación calcio-dependiente de la anexina A6</i>	157
DISCUSIÓN	173
CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFIA	201
ANEXO I	219
ANEXO II	235

ABC-A1	ATP binding cassette – A1
AMPC	cyclic adenosine monophosphate
ANX	annexin
APO	apolipoprotein
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CAPRI	calcium-promoted Ras inactivator
CD/ β -MCD	β -methyl cyclodextrin
CFP	cyan fluorescent protein
CHO	chinese hamster ovary
CTB	cholerae toxin B subunit
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxide
EDG	endothelial differentiation gene receptor
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EEA-1	early endosomal antigen -1
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
eNOS	endothelial nitric oxid synthase
ERK/MAPK	extracellular signal regulated kinase /
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	foetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GAPs	GTPase activating proteins
GEFs	guanine nucleotide exchange factors
GFP	green fluorescent protein
GPCRs	G-protein coupled receptors
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GST	glutathione-S-transferase
GTP	guanosine triphosphate
HDL	high density lipoprotein
IGF2/MPR	insulin-like growth factor receptor 2 / mannose-6-phosphate receptor
IP	propidium iodide
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LBPA	lisobisphosphatidic acid
LDL	low density lipoprotein
LDLR	low density lipoprotein receptor
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MBP	myelin basic protein
MEK/MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase mitogen activated protein kinase
MVBs	multivesicular bodies
NRK	normal rat kidney
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	paraformaldehyde

PH	pleckstrin homology domain
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PKB/AKT	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PLA2	phospholipase A2
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PNS	post-nuclear supernatant
PS	phosphatidylserine
PTX	pertussis toxin
PVDF	polyvinylidene fluoride
QM	chilomicron
RASAL	ras GTPase-activating-like protein
RBD	ras binding domain of Raf
REB	ras extraction buffer
RTKs	tyrosine kinase receptors
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPP	sphingosine 1-phosphate
SR-BI	scavenger receptor type B-I
TCA	trichloroacetic acid
TGN	trans-golgi network
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TRITC	tetramethyl rhodamine isothiocyanate
U18666A	3- β -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one
VLDL	very low density lipoprotein
W13	N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphthalensulphonamide
YFP	yellow fluorescent protein

INTRODUCCIÓN

GENERAL

El conocimiento de las anexinas se remonta a los finales de la década de los 70 y principios de los 80, época en la que se descubrieron los primeros miembros de esta familia. No obstante, aquellas primeras anexinas fueron tratadas como elementos independientes y denominadas de forma no unificada como sinexina (anexina 7, o proteína agregadora de gránulos), cromobindinas (Creutz CE, 1981)(anexinas 1, 2, 4, 6, o proteínas de unión a gránulos de cromafina), calcimedinas (Moore PB et al., 1984)(anexinas 3, 4, 5, 6, o proteínas mediadoras de señales de calcio), lipocortinas (Pepinsky RB et al., 1988)(anexina 1, 2, 3, 4, 5, 6, o inhibidores de lipasa inducibles por esteroides), calelectrinas (Südhof TC et al., 1982), endonexinas (Geisow MJ et al., 1984) o calpactinas (Glenney JR et al., 1987)(anexina 1, 2, o proteínas de unión a calcio, fosfolípidos y actina), entre otras.

A continuación sobrevino un periodo de intenso estudio centrado en la bioquímica, el clonaje de los genes, el estudio de la secuencia de DNA y aminoácidos, y el análisis cristalográfico para resolver la estructura tridimensional. Todo ello permitió determinar que existían rasgos comunes en todas estas proteínas, tanto a nivel del comportamiento bioquímico (Geisow MJ et al., 1986) como de la estructura del gen y de la proteína (Crompton et al., 1988 a).

Fue entonces cuando se decidió agrupar a todas ellas bajo el denominador común de ANEXINAS (Crompton MJ and Dedman JR, 1990; Geisow MJ et al., 1987). Bajo dicha denominación, en la actualidad se conocen 160 únicas anexinas expresadas en más de 65 especies, que van desde los hongos hasta las plantas y vertebrados superiores, con la única excepción de las levaduras. El análisis filogenético ha permitido la clasificación de las anexinas en cinco grandes subfamilias: A (anexinas de vertebrados y ortólogos conocidos), B (anexinas de invertebrados sin ortólogos humanos), C (anexinas de hongos y relativos), D (anexinas de plantas) y E (anexinas de procariotas) (Morgan RO and Fernandez MP, 1995, 1997)(ver *Figura 1*).

Cualquier molécula de la familia de las anexinas debe cumplir dos criterios básicos: en primer lugar, presentar la capacidad de unir fosfolípidos ácidos de forma dependiente de calcio y, en segundo lugar, contener una estructura

altamente conservada, de 70 aminoácidos, llamada "repetición anexina". Ambas características, de hecho, están ligadas, ya que es la estructura conservada de 70 aminoácidos la que contiene los motivos de unión a calcio y fosfolípidos acídicos. En concreto, este motivo canónico de unión a calcio se ha clasificado como de "tipo II" (Weng X et al., 1993; Swairjo MA et al., 1995), y es diferente del más conocido "brazo-EF" o "tipo I", presente en otras moléculas de respuesta a calcio como por ejemplo la calmodulina o la familia de proteínas S100. Dicho motivo (tipo II) está constituido por la ultraconservada "secuencia endonexina" (Geisow et al., 1986), de 17 residuos, KGhGTDExxLIpILApR, presente en toda la familia, si bien puede no encontrarse en todas las repeticiones. En el bolsillo de unión del calcio, en concreto, participan los primeros residuos de la secuencia endonexina (KGhGT) junto con un residuo ácido (D/E) situado 39 posiciones más adelante en sentido C-terminal, aunque próximo espacialmente en la estructura tridimensional (Huber R et al., 1990 a).

Existe entre todas las anexinas un elevado nivel de homología de secuencia tanto interespecífica (98% de homología entre la anexina A2 humana, bovina y de rata) como intraespecífica (entre el 40 y el 60% de homología entre todas las anexinas de vertebrados).

Esta conservación es todavía mayor al observar la conformación tridimensional de la proteína que, incluso en especies filogenéticamente muy alejadas, se preserva de forma casi exacta. La molécula tiene dos partes o dominios bien diferenciados: el extremo N-terminal y el "núcleo", próximo a la región C-terminal.

Dominios funcionales

El extremo N-terminal es en general muy variable en todas las anexinas, tanto en longitud (desde una decena de residuos a más de 160 en las anexinas A7 y A11), como en secuencia (salvo alguna excepción, como la A1 y la A2, o la A5 y la A6) y conformación (desde un alto contenido alfa-hélice, como en la A1, hasta una larga hélice hidrofóbica formada por secuencias GYP, en la A7 o la

Name	Synonyms/Former name(s)	Human gene symbol	Non-human gene symbol	
annexin A1	lipocortin 1, annexin I	ANXA1	Anxa1	
annexin A2	calpactin 1, annexin II	ANXA2	Anxa2	
annexin A3	annexin III	ANXA3	Anxa3	
annexin A4	annexin IV	ANXA4	Anxa4	
annexin A5	annexin V	ANXA5	Anxa5	
annexin A6	annexin VI	ANXA6	Anxa6	
annexin A7	synexin, annexin VII	ANXA7	Anxa7	
annexin A8	annexin VIII	ANXA8	Anxa8	
annexin A9	annexin XXXI	ANXA9	Anxa9	
annexin A10		ANXA10	Anxa10	
annexin A11	annexin XI	ANXA11	Anxa11	
annexin A12	<i>unassigned</i>			
annexin A13	annexin XIII	ANXA13	Anxa13	

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin B9	3 species of insect, annexin IX	Anxb9	
annexin B10	4 species of insect, annexin X	Anxb10	
annexin B11	1 species of insect, annexin	Anxb11	
annexin B12	Cnidaria, annexin XII	Anxb12	
	3 species of flatworms, 5 annexins 10 species of roundworms, 5 annexins (including <i>C. elegans</i> annexins XV-XVII,XXX)		

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin C1	<i>Dictyostelium</i> and <i>Neurospora</i> annexin XIV	Anxc1	
annexin C2-C5	4 species of fungi/ molds/alveolates	Anxc2-c5	

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin D1-D25	35 species including annexin XVIII and annexins XXII-XXIX	Anxd1-d25	

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin E1	<i>Giardia</i> annexin XXI	Anxe1	
annexin E2	<i>Giardia</i> annexin XIX	Anxe2	
annexin E3	<i>Giardia</i> annexin XX	Anxe3	

Figura 1. Reciente clasificación de las anexinas en cinco grandes grupos. Esta clasificación, propuesta por Morgan R, Fernández MP y colaboradores, agrupa a todas las anexinas en cinco grupos (A-E). Las anexinas de vertebrados más ancestrales, como la A7, la A11 y la A13, no presentan ortólogo alguno entre especies de no-vertebrados, complicando la interpretación del origen de la familia. No obstante, la presencia y elevada conservación de las anexinas en la mayoría de eucariotas, a excepción de las levaduras, a lo largo de más de 100 millones de años, sugiere la importancia de su funcionalidad.

A11). Modula aspectos en los que difieren las anexinas, como son la localización subcelular (Eberhard D et al., 2001; Mizutani A et al., 1995), la sensibilidad al calcio o la afinidad por los fosfolípidos. Dicho extremo se encuentra, en muchas de las anexinas, modificado post-traduccionamente (glicosilado, acetilado, e incluso miristoilado), es un dominio de interacción con otras moléculas (como la familia de proteínas S100) u otras membranas (como en la anexina A1), es susceptible a proteólisis (por calpaina, catepsina, plasmina o quimotripsina), y es fosforilable por diversas ser/thr - (como la PKC) y tyr-quinasas (como pp60^{src} o EGFR).

El extremo C-terminal o "núcleo" de las anexinas, de 34 kDa es, por el contrario, muy similar en secuencia y conformación, constituye la parte principal de la molécula y confiere a la proteína las funciones que caracterizan a la familia. La base estructural es la denominada "repetición anexina", de 70 aminoácidos y particularmente conservada en todas las anexinas, la cuál otorga la particular propiedad de unión a calcio y fosfolípidos. Dicho elemento estructural se organiza en tándems de 4 repeticiones, separadas por cortas regiones espaciadoras no tan conservadas. Así, el extremo C-terminal de la anexina A5 se considera prometípico de la familia. La estructura final del núcleo, bastante hidrofílico al poseer abundantes aminoácidos neutros polares y cargados, se compacta secuestrando en su interior las regiones más hidrofóbicas de alfa-hélice, dando lugar a una conformación de disco, ligeramente curvado y mostrando, por lo tanto, una cara cóncava y otra convexa. En esta compacta estructura, relativamente resistente a proteasas, las repeticiones 1-4 y 2-3 se hallan apareadas, quedando en el centro de las dos parejas una zona hidrofílica que podría funcionar como un canal iónico (Burns AL et al., 1989; Pollard HB et al., 1990). Analizando la estructura con más detalle, se ha determinado que cada una de las "repeticiones anexina" es una superhélice dextrógira compuesta, a su vez, de 4 hélices-alfa casi paralelas (A, B, D, E) y una quinta (C) perpendicular, conectadas por lazos no ordenados (si conservados), que sobresaden hacia ambas caras del disco. Los lazos que se orientan hacia la parte convexa, que es la que se encara a la monocapa citosólica de las membranas celulares, es donde residen los sitios de unión a calcio y fosfolípidos (de 2 a 4 secuencias endonexina, en repeats

diferentes, por cada molécula de anexina) (Huber R et al., 1990 b). En la parte cóncava, que está orientada hacia el citosol (como el extremo N-terminal), se podrían establecer interacciones con proteínas citosólicas.

En el caso de la anexina 6, el tándem de cuatro repeticiones está duplicado, dando lugar a 8 repeticiones en total (Crompton MR et al., 1988 b, Südhof TC et al. 1988), y ambas duplicaciones están separadas por una "región *linker*" suficientemente grande como para ser considerada un motivo estructural independiente. El núcleo de la anexina A6, adopta, en este caso, una conformación de doble disco, pudiendo ambas partes de la estructura disponerse de forma perpendicular, paralela o antiparalela, ya que la región *linker*, con menor grado de ordenación, dispone de una considerable flexibilidad (Avila-Sakar AJ et al., 2000). Además de su función como "bisagra molecular", la región *linker* es lugar de interacción proteína-proteína (ver más adelante).

La afinidad de las anexinas por el calcio es, al contrario que en las proteínas con "brazos-EF", baja en ausencia de fosfolípidos ($K_d = 25-1000 \mu\text{M}$). No obstante, en presencia de fosfolípidos ácidos (principalmente fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, presentes básicamente en la monocapa citosólica de las membranas celulares), esta afinidad se incrementa hasta 100 veces (Glenney JR, 1986). Del mismo modo, la presencia de dichos fosfolípidos incrementa el número de sitios de alta afinidad por el calcio (Schlaepfer DD and Haigler HT, 1987). Recíprocamente, el calcio induce el reclutamiento de la anexina soluble hacia la membrana (Barwise JL and Walker JH, 1996), a la cuál se une de forma electrostática, unión en la que colabora el conjunto de la "repetición anexina". Las aproximaciones a la conformación de las anexinas revelan que algunos de los residuos más próximos a la membrana, ubicados en los lazos orientados hacia la parte convexa de la molécula, y que conforman la interfase proteína-fosfolípido, pertenecen a la "secuencia endonexina" y son por tanto susceptibles a las modificaciones producidas por la unión al calcio (Meers P, 1990; Huber R et al., 1990 b). Residuos de naturaleza básica capaces de unirse a las cabezas polares de fosfolípidos ácidos, se encuentran del mismo modo próximos a los motivos de "tipo II". Calcio y fosfolípidos, a su vez, parecen inducir la oligomerización de la anexina (Concha NO et al., 1992),

estado en el cuál su capacidad de unión a membranas se optimiza (Zaks WJ and Creutz CE, 1991).

La estructura y funcionalidad del extremo N-terminal ha sido mayormente estudiada en dos anexinas con alta capacidad de agregación de vesículas a concentraciones micromolar de calcio, como son la anexina A1 y A2. En ambos casos el similar y corto (de 31 a 40 aminoácidos de longitud) extremo N-terminal se une, de forma muy parecida y a través de interacciones hidrofóbicas, a proteínas de la familia S100 (revisado en Lewit-Bentley A et al., 2000). No obstante, mientras que la interacción Anx A1-S100C requiere de la presencia de calcio, no ocurre así en la asociación Anx 2-S100A10. Este extremo es además fosforilable *in-vitro* e *in-vivo* por diversas kinasas, como el EGFR para la A1 y la pp60^{src} para la A2 y ambas anexinas son asimismo fosforiladas *in-vitro* por el enzima PKC en motivos consenso, aspectos que serán discutidos más adelante.

Un ejemplo de cómo el extremo N-terminal modula la función de las anexinas proviene de los estudios cristalográficos realizados en la anexina A1 (Rosengarth A et al., 2001; Rosengarth and Luecke, 2003). Su extremo N-terminal presenta características apolares, con elevado grado de ordenación hélice-alfa, sugiriendo que podría representar un segundo motivo (no electrostático, sino hidrofóbico) de unión de membranas, y observándose además que en la proteína soluble se encuentra replegado hacia el interior del núcleo hidrofóbico de la molécula. En ausencia de calcio, ocupa el lugar correspondiente a la hélice D de la repetición III, que es desplazada hacia el exterior del núcleo compacto, mientras que en presencia del catión y al unirse a la membrana, la hélice D recupera su lugar correspondiente en el interior de la estructura discoidal, lo cuál libera al extremo N-terminal que es entonces capaz de interactuar con otra membrana, o bien con proteínas S100 (que a su vez se unen al citoesqueleto) (ver *Figura 2*). Además, la presencia de residuos (Ser, Thr y Tyr) fosforilables en este extremo permite una regulación adicional, compleja y controlada espacialmente, de la función de la anexina (ver más adelante).

El extremo de la anexina A2 contiene menor grado de ordenación

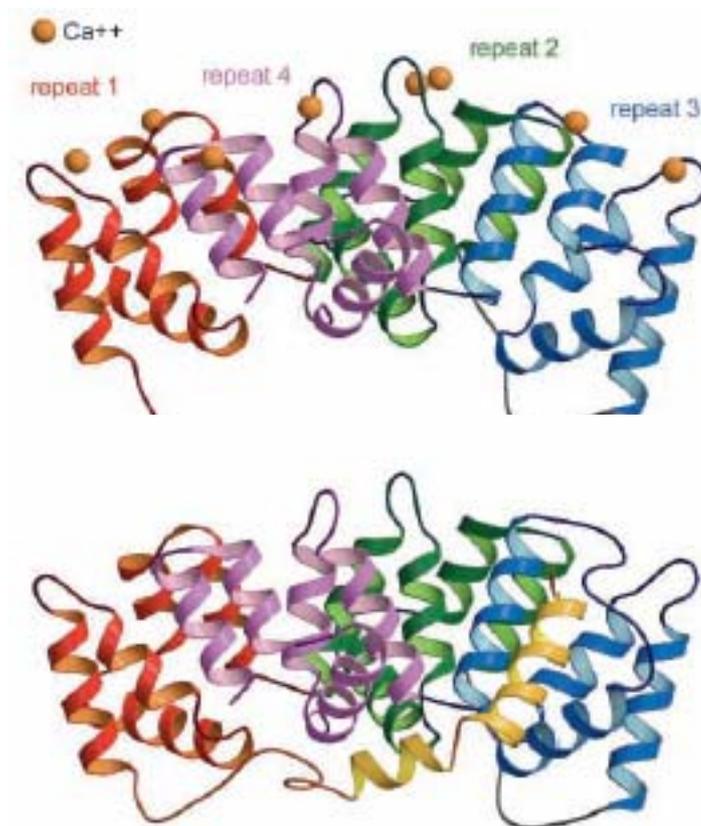


Figura 2. Estructura molecular de la anexina A1 en presencia (arriba) o ausencia (abajo) de iones Ca^{2+} (Rosengarth et al., 2001; Rosengarth and Luecke, 2003). Mientras que en ausencia de calcio el extremo N-terminal hidrofóbico se encuentra replegado hacia el interior del núcleo C-terminal, desplazando a la hélice D de la repetición III, la unión del calcio a los motivos endonexina, ubicados en la cara convexa de la molécula, libera este extremo hacia la cara cóncava donde puede establecer interacciones hidrofóbicas con otra membrana.

hélice-alfa y una estructura más relajada, lo cuál descarta en principio su capacidad de unir membranas directamente así como su inserción en el núcleo C-terminal. No obstante, este extremo es lugar de interacción de la anexina A2 con la proteína p11 (o S100A10), al igual que ocurre en la asociación Anx A1-S100C (S100A11), si bien en el primer caso no se requiere la presencia de calcio. En concreto, los primeros 14 residuos del extremo de la anexina A2 generan una hélice anfipática que se inserta en un bolsillo hidrofóbico del dímero de p11. El resultado es un heterotetrámero (AnxA2₂-p11₂) que requiere niveles mucho menores (fisiológicos) de calcio para unirse a fosfolípidos e inducir la agregación de gránulos de cromafina (Powel MA and Glenney JR, 1987; Drust DS and Creutz CE, 1988). Los complejos con proteínas S100 (que asimismo se dan entre Anx A1-S100A11 (S100C) o Anx A11-S100A6, por ejemplo) además alteran la localización de las anexinas. Así, mientras que las formas monoméricas de las anexinas (como la A2 y A11) se encuentran en forma soluble, los complejos se asocian al citoesqueleto (Zobiack N et al., 2001; Tomas A and Moss SE, 2003). Se ha descrito incluso como las anexinas pueden modular los niveles de expresión de proteínas S100, incrementando la vida media de éstas, influyendo en modificaciones post-traduccionales (Puisieux A, 1996).

El núcleo C-terminal de las anexinas representa un único módulo de unión a membrana. No obstante las anexinas, si bien no son moléculas fusogénicas *per se*, son capaces de inducir la agregación de vesículas (tanto *in-vitro* como en *in-vivo*) en respuesta a diversos estímulos, principalmente el calcio. Ello implica la necesaria existencia de dos sitios de unión a fosfolípidos, uno para cada membrana. Existen diversas hipótesis, no necesariamente excluyentes, formuladas al respecto (revisadas en Gerke V and Moss SE, 2002).

Modelos de actuación propuestos en la fusión de membranas

La primera de ellas implicaría la asociación entre dos moléculas de anexina situadas independientemente en una y otra membrana. Mediante dicha interacción proteína-proteína, se realizaría una aproximación de las membranas facilitando la actuación de la maquinaria de fusión. Este modelo es

probable para aquellas anexinas de un solo core que dimerizan en respuesta a calcio, como son la A1, A4 o A7. Así, las concentraciones de calcio requeridas por la anexina A7 para la agregación de gránulos cromafínicos se corresponde con aquella a la cuál ésta dimeriza, y la dimerización de moléculas de anexina A7 o A5 ubicadas en membranas diferentes ha sido observada mediante análisis de FRET (Zaks WJ and Creutz CE, 1991) y *cross-linking* químico (Concha NO et al., 1992).

La segunda hipótesis implicaría la existencia de un segundo módulo de unión de membrana en una misma molécula de anexina. Este segundo motivo estaría ubicado en el extremo N-terminal de la proteína, y su mecanismo de interacción, contrariamente al del primer módulo, sería del tipo hidrofóbico (Rosengarth A et al., 2001). Supuestamente, la aparición de este segundo lugar de unión requeriría de la auto-asociación lateral de varias moléculas de anexina, en este caso estarían situadas en una sola membrana. Este modelo ha sido descrito para la anexina A1.

Un tercer modelo está representado en la misma estructura de la anexina A6, que presenta una duplicación del tándem de repeticiones y por lo tanto dos motivos de interacción con fosfolípidos; éstos dos sitios de unión son capaces de modificar su disposición relativa al estar conectados por una región flexible, pudiendo cada uno de ellos unirse a una membrana diferente, o a membrana y citoesqueleto (Avila-Sakar AJ et al., 2000; Benz J et al., 1996) (ver más adelante).

La última de las hipótesis formuladas se basa en el modelo de la anexina A2, cuyo extremo N-terminal interacciona con proteínas de la familia S100 (p11), que a su vez dimerizan entre ellas. La estructura resultante es un heterotetrámero simétrico compuesto por dos moléculas de anexina, situadas en dos membranas diferentes, y un dímero de proteínas S100 que actuaría de conector entre las anexinas. Esta estructura simétrica, con una molécula de anexina a cada lado, podría unirse directamente a la membrana (a los fosfolípidos o a dominios ricos en colesterol) o bien al citoesqueleto subyacente, ya que el core de las anexinas es capaz de unirse, además de a

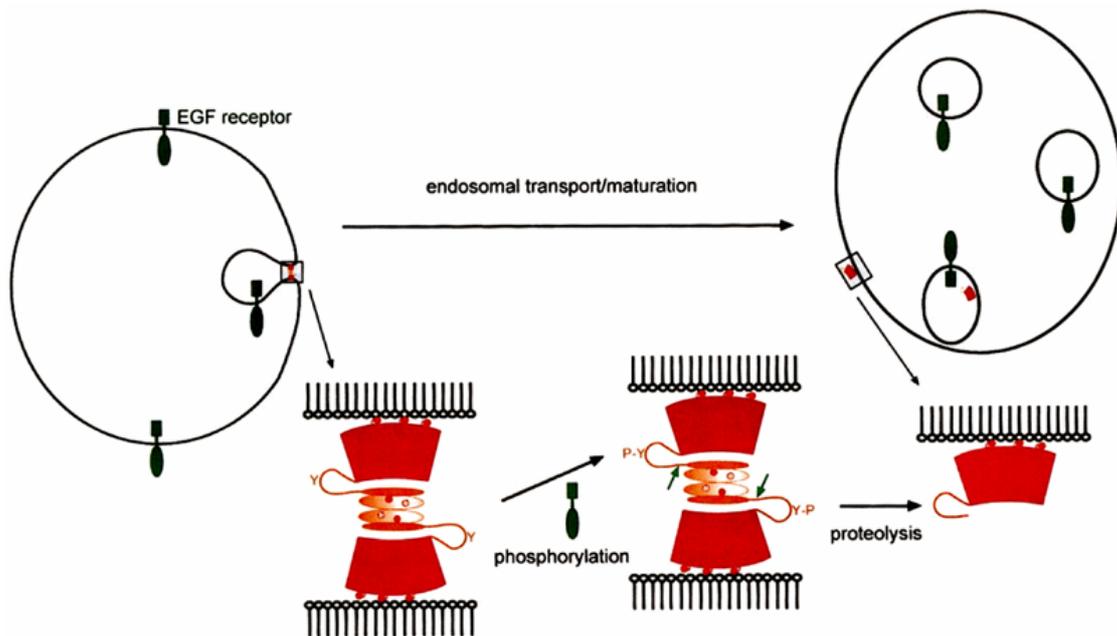
las cabezas polares de los fosfolípidos, a F-actina y espectrina de forma calcio dependiente (Thiel C et al., 1992; Filipenko NR and Waisman DM, 2001; Jones PG et al., 1992)(ver más adelante). Otras anexinas, como la A1 o la A11, las cuáles se unen a proteínas S100, podrían actuar de forma similar.

Modificaciones post-traduccionales

Fosforilaciones en el extremo N-terminal son un factor adicional de control sobre la funcionalidad de las anexinas. Un destacado ejemplo lo constituye la acción del receptor de EGF (EGFR) activo el cuál fosforila, gracias a su actividad tirosina-kinasa y a nivel de los cuerpos multivesiculares (MVBs), la región N-terminal de la anexina A1 (Futter CE et al., 1993). La fosforilación es específica de este compartimento dónde, concomitantemente con la propia, son las más importantes realizadas por el receptor. Dicha fosforilación altera entonces las características de la anexina, disminuyendo su capacidad de unirse a la membrana de forma independiente de calcio. Ello conlleva la disociación de un pool importante de anexina A1 de la membrana de los MBVs, y se acompaña de una segregación del receptor hacia las invaginaciones del lumen de la vesícula, que contienen moléculas destinadas a degradarse en los lisosomas. La fosforilación del extremo N-terminal de la anexina (en Tyr-20) por el EGFR incrementa la susceptibilidad a proteólisis del extremo, pudiéndose así fraccionar el hipotético heterotetrámero $(Anx A1)_2-(S100A11)_2$ que es el que mantendría unidas las paredes de la invaginación. Ello precedería a la fase final de escisión de la invaginación hacia el lumen del endosoma. De esta manera, la anexina A1 contribuye al feedback negativo realizado por el propio EGFR activo (ver *Figura 3*).

El extremo N-terminal de la anexina A2 es fosforilado por la tirosina-kinasa pp60^{src} (Glenney JR and Tack BF, 1985). Esta fosforilación requiere de la previa asociación de la anexina a la membrana (Bellagamba C et al., 1997), lo cuál modifica su conformación y expone los residuos fosforilables por pp60^{src}.

La fosforilación, si bien no altera la unión del tetrámero a la membrana, si que



Gerke V and Moss SE, 2001

Figura 3. La fosforilación del extremo N-terminal de la anexina A1 por el EGFR contribuye a la propia down-regulación del receptor. La fosforilación, que acontece en los cuerpos multivesiculares, hace susceptible de proteólisis al extremo N-terminal de la anexina, y ocurre en paralelo al secuestro del EGFR en el lumen de los endosomas. La proteólisis del extremo, que conduce a la disociación del dímero de anexina, participaría en la escisión de las invaginaciones afectando así de forma específica a la degradación del receptor de EGF (Futter CE et al., 1993).

altera su co-asociación al citoesqueleto de actina, e inhibe su capacidad agregadora de gránulos de cromafina (Powell MA and Glenney JR, 1987; Hubaishy I et al., 1995). Este extremo resulta muy importante para la asociación *in-vivo* de la anexina A2 a membranas de endosomas tempranos (ver más adelante).

El extremo N-terminal, de la anexina A1 (Schlaepfer DD and Haigler HT, 1988) y de la A2 (Summers TA and Creutz CE, 1985), son además fosforilables *in-vitro* por el enzima PKC, lo cuál disminuye en ambos casos la capacidad agregadora de vesículas (Johnstone SA et al., 1992, 1993), sin afectar significativamente a las propiedades de unión a fosfolípidos. En algunos sistemas *in-vivo* también se ha observado la fosforilación de ambas moléculas por la PKC, aunque en otros no ocurre así. La anexina A1, por ejemplo, disminuye su capacidad de agregar gránulos de cromafina ante esta fosforilación, que se induce una vez estimulada la secreción (Michener ML et al., 1986). En el caso de la anexina A2 la serina fosforilada (ser-2) está comprendida en la región de interacción con la proteína p11 (residuos 1-14), interfiriendo así en la formación del heterotetramero (Johnsson N, et al., 1986). La anexina A4 es asimismo sustrato *in-vitro* de la PKC (Weber K et al., 1997). Las otras anexinas, si bien presentan motivos similares (Schlaepfer DD et al., 1992) no ha podido demostrarse que sean sustrato del enzima. Nuevas kinasas, como el PDGFR o el receptor de insulina, ha sido descrito que también fosforilan a varias anexinas (revisado en Rothhut B, 1997).

Unión calcio-independiente a membranas

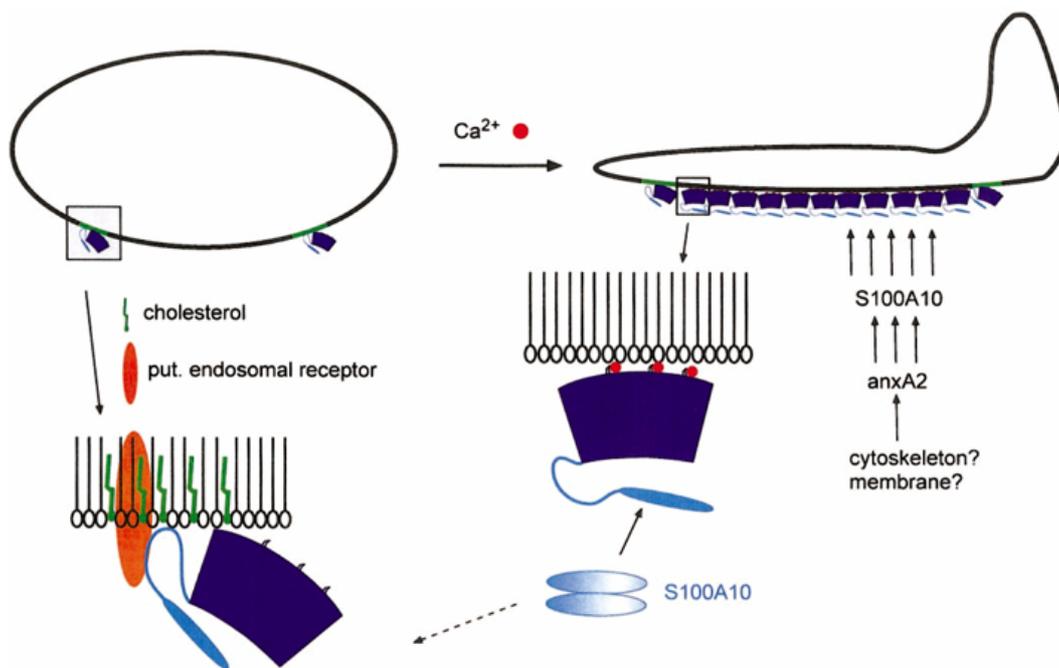
Además de la unión a membranas de forma dependiente de calcio, diversas anexinas, como la A2, la A4, la A6 o la A13a y A13b, son capaces de unirse a membranas, incluso agregar vesículas, de forma independiente de calcio y dependiente de colesterol (Harder T, 1997; Turpin E et al., 1998; Sable CL and Riches DW, 1999; Lecat S et al., 2000). El más significativo es el caso de la anexina A2, tanto en la forma tetramérica (A2-p11) como dimérica, con la necesaria presencia de fosfatidilserina en la bicapa. El colesterol, además, incrementa la capacidad de agregación mediada por la anexina A2 e inducida

por el calcio y disminuye los requerimientos de éste. El extremo N-terminal no parece tener ningún papel en dicho efecto del colesterol (Ayala-Sanmartín J, 2001), en sistemas *in-vitro* de liposomas, ya que no se ve afectado ni por mutaciones en la región ni por la adición de péptidos correspondientes a dicho extremo. Además, otras anexinas como la A5 y la A6, que presentan extremos N-terminales muy distintos a la anexina A2 pero extremos C-terminales similares, responden del mismo modo al incremento de colesterol en la membrana. Si bien no ha sido demostrado que las anexinas se unan al colesterol, se postula que dicho componente actuaría como organizador de microdominios a través de un mecanismo indirecto de inclusión-exclusión de determinados fosfolípidos. Así pues, el colesterol excluiría a la PS y esta se enriquecería en microdominios distales, siendo entonces más accesible facilitando la unión de las anexinas.

Al contrario de lo observado *in-vitro*, al analizar la funcionalidad del extremo N-terminal en sistemas *in-vivo*, se ha observado que es sumamente importante para la asociación calcio-independiente de la anexina A2 al compartimento endocítico temprano. Ha sido postulada la interacción proteína-proteína entre este extremo y un receptor de la membrana endosomal (König and Gerke, 2000; Jost M et al., 1997). Este mecanismo alternativo, restringido a las membranas celulares y no artificiales, no requiere de la interacción con proteínas S100 ni de los motivos de unión a calcio y fosfolípidos presentes en el “núcleo” C-terminal, si bien el colesterol aparece como un factor importante (ver *Figura 4*).

Anexinas en el sistema endocítico

La unión de las anexinas a las membranas celulares *in-vivo* no acontece, por lo tanto, únicamente a través de su interacción con los fosfolípidos. Diversas anexinas han demostrado la capacidad de asociarse a componentes del citoesqueleto cortical, y motivos específicos de interacción con F-actina se han ubicado en su extremo C-terminal (Filipenko NR and Waisman DR, 2001; Jones PG et al., 1992). Varias moléculas de la familia de las anexinas, como la anexina A2, son capaces de interaccionar *in-vitro* de forma calcio-dependiente



Gerke V and Moss SE, 2002

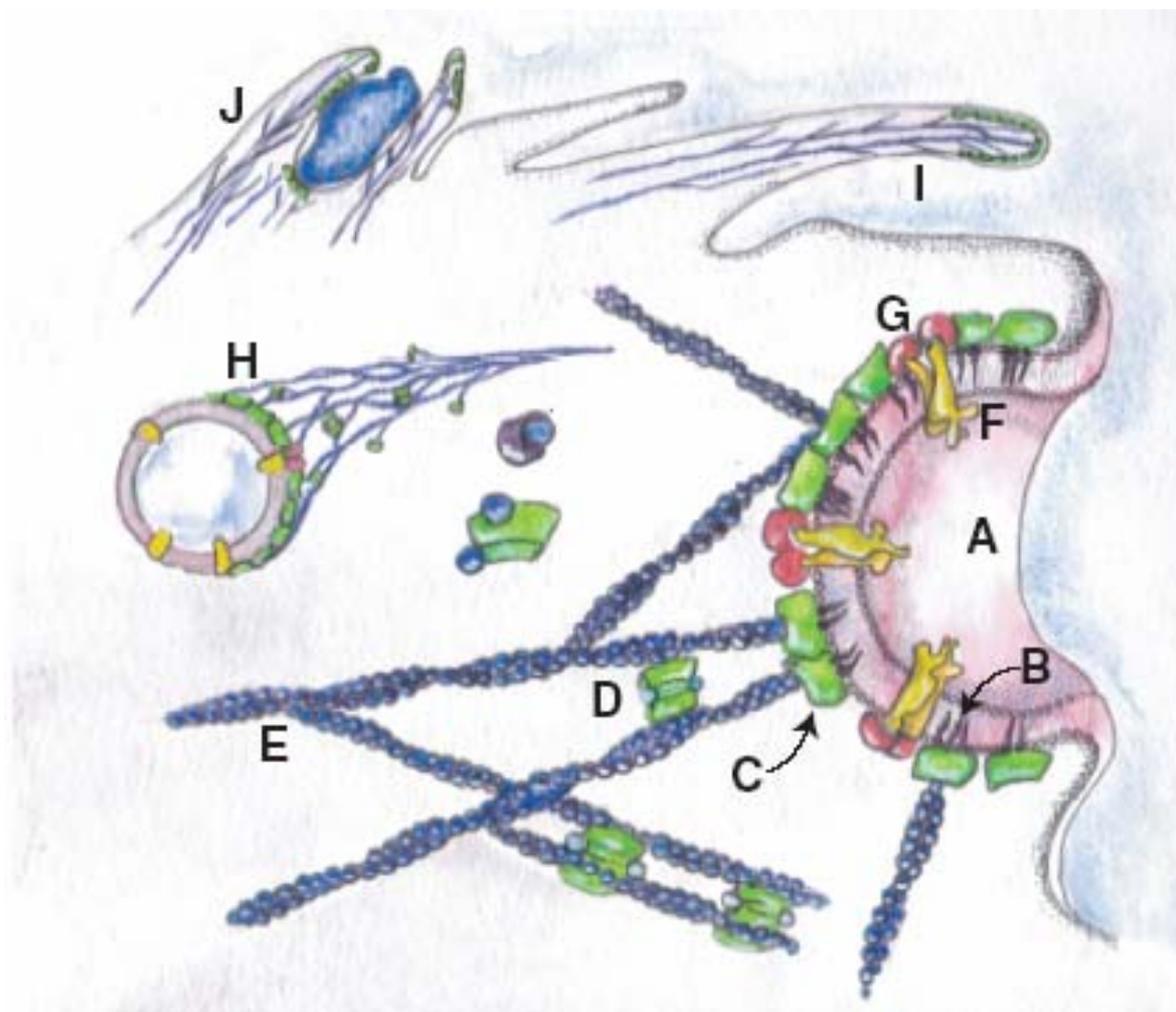
Figura 4. Unión calcio-independiente de la anexina A2 a la membrana del compartimento endosomal. El extremo N-terminal de la anexina se requiere para la interacción dependiente de colesterol (e independiente de calcio) con la membrana de los endosomas. Esta interacción proteína-proteína vendría mediada por un receptor de la anexina ubicado en dominios ricos en colesterol (König and Gerke, 2000; Jost M et al., 1997). La oligomerización de la anexina A2, formando cubiertas bidimensionales, podría participar en la creación de dominios diferenciados que participarían en procesos como el sorting de moléculas o la fusión entre endosomas.

(y a concentraciones fisiológicas) con filamentos de actina y espectrina (Ikebuchi NW and Waisman DM, 1990; Gerke V and Weber K, 1984), y de reorganizarse *in-vivo* en paralelo a componentes del citoesqueleto cortical (Zobiack N et al., 2002). Mediante ensayos de *pull-down*, nuestro grupo de investigación asimismo describió la interacción de la anexina A6 con espectrina y determinó su elevado grado de colocación *in-vivo* en células NRK, sugiriendo su papel como modulador del tráfico a través de ésta interacción (Pons M et al., 2001a) (ver más adelante).

La formación de estos complejos, por lo tanto, explicaría funciones postuladas para las anexinas como son la regulación de la endocitosis, la fusión de vesículas, o la motilidad y adhesión celulares, a través de la estabilización y regulación de interacciones entre membrana y citoesqueleto de actina (revisado en Hayes MJ et al., 2004) (ver *Figura 5*).

Recientemente ha sido demostrado que la anexina A2 es una proteína de unión a fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato, con una afinidad similar a la mostrada por el dominio PH (*pleckstrin homology*) presente en otras proteínas de asociación a fosfoinosítoles (Rescher U et al., 2004). Los autores postulan que la interacción con este lípido, reclutado en respuesta a la acumulación de colesterol y elementos del citoesqueleto de actina (Zobiack N et al., 2002), explicaría la presencia de anexinas en dominios de interacción membrana-actina.

Ha sido descrito que la acumulación de colesterol en los endosomas tardíos, fenómeno observado en algunas patologías que implican al sistema degradativo (como el síndrome de Niemann-Pick), se acompaña de un reclutamiento de anexina A2 hacia este compartimento (Mayran N et al., 2003). Los autores involucran funcionalmente a la anexina A2 en la correcta biogénesis de los cuerpos multivesiculares (MVBs) mediante el uso de *RNA antisentido (siRNA)* y ensayos de fusión *in-vitro*. En este proceso, la capacidad de autoasociación observada para varias anexinas, formando cubiertas bidimensionales (Oling F et al., 2001) permitiría a la anexina A2, unida a los endosomas tempranos a través de una interacción proteína-proteína, la creación en paralelo de plataformas ricas en colesterol necesarias para la formación de los MVBs y para la correcta fusión entre vesículas.



Hayes MJ et al., 2004

Figura 5. Representación del conjunto de interacciones descritas entre anexinas y actina. El reclutamiento de fosfoinositol bifosfato (B), en respuesta a la activación, en endosomas nacientes (A), de GPCRs (F) y fosfolipasas (G), ancla los monómeros de anexina A2 a la membrana desde donde establece una conexión con el citoesqueleto de actina (C). Por otro lado, el tetrámero anexina A2-p11 interconecta (D) filamentos de actina (E), y el recubrimiento de la membrana de endosomas (a través de la interacción de la anexina A2 con receptores específicos) participaría en procesos de fusión y movilidad (H). Por último, las anexinas han sido asociadas al citoesqueleto de actina presente en otras estructuras de membrana como macropinosomas (H) o filopodios (I).

En resumen, los resultados obtenidos por el Prof. Gruenberg y colaboradores sugieren que el componente proteico, básicamente la anexina A2, y el fosfolípido LBPA, se complementan en el proceso de la biogénesis de los MVBs. Así, mientras que el fosfolípido promueve, a través de sus peculiares características fisico-químicas, la formación de las invaginaciones, la anexina participa en la "cubierta" citoplasmática, regulando los procesos fusogénicos necesarios para formar los endosomas tardíos.

Además de la anexina A2, otras anexinas como la A1, la A13b, han sido implicadas funcionalmente en los sistemas endocítico y exocítico (Futter CE et al., 1993; Fiedler K et al., 1995). En sistemas *in-vitro*, anexinas como la A1, A3, A4 y A7 han demostrado poseer, al igual que la anexina A2, capacidad agregadora de vesículas de forma calcio-dependiente (revisado en Raynal P and Pollard HB, 1994). No obstante, el hecho que anexinas como la A6 no presenten esta capacidad, pero intervengan en la funcionalidad del sistema endocítico, sugiere que otras propiedades participan en el proceso. En este sentido, anexinas como la A1 y la A2 poseen regiones en su extremo C-terminal de considerable homología con proteínas como sinaptotagmina y exo1, ambas involucradas en tráfico de vesículas, y ha sido descrita la formación de complejos implicados en secreción entre anexinas y estas moléculas (Burgoyne RD et al., 1993; Willshaw A et al., 2004).

Tanto la anexina A2 (Emans N et al., 1993) como la A6 (Ortega D et al., 1998) han sido asociadas por inmunomicroscopía electrónica a estructuras endocíticas. En concreto, los antecedentes al presente trabajo describieron la asociación de la anexina A6 a membranas endosomales de hepatocitos, mayormente de forma dependiente de calcio (Ortega D et al., 1998). Posteriormente, en células CHO cotransfectadas con el receptor de LDL y la anexina A6, se observó la redistribución de ésta última hacia el compartimento endocítico tardío en paralelo a la internalización de LDL (cuyo componente mayoritario es el colesterol) (Grewal T et al., 2000)(ver más adelante).

Inserción en la membrana

La unión a membranas de forma dependiente de calcio, a través de los sitios de unión a fosfolípidos situados en las diferentes “repeticiones anexina”, o de forma dependiente de colesterol, no altera en gran medida la estructura general de la proteína, ni conlleva la inserción de la proteína en la bicapa lipídica. En concreto, dicha unión a la monocapa citosólica es superficial y mediada por interacciones electrostáticas. No obstante, ha sido descrito para varias anexinas un modo alternativo de unión a membranas, en el cuál se altera profundamente la estructura general y ello conlleva la inserción en la bicapa lipídica. El determinante de tal interacción es el pH del medio, de tal manera que a pH bajo, entre 4 y 5, se protonan (de forma reversible) diversos residuos del núcleo, lo cuál modifica la conformación e incrementa la hidrofobicidad de las anexinas, apareciendo estructuras alfa hélice continuas y transmembrana. El entorno lipídico (principalmente fosfolípidos) de la membrana contribuiría a que esta inserción se realizara en condiciones fisiológicas, ante transitorias y moderadas caídas del pH intracelular. Modelos análogos a éste, descrito para la anexina B12, consistentes en la exposición de amplias zonas hidrofóbicas que, en la formas solubles, se hallan hacia el interior, explican asimismo las inserciones inducidas a bajo pH observadas en las anexinas A5, A2 y A6. Esta última experimenta, a pH inferior a 6, una disminución en su contenido α -hélice con la aparición de láminas- β y giros- β . Al inserirse en la membrana las anexinas son capaces de actuar como canales iónicos (Golczak M et al., 2001a) (ver *Figura 6*).

La mayoría de las anexinas, entre ellas la A2 y la A6, poseen una secuencia del tipo KFERQ, implicado en un sistema de degradación lisosomal específica, la autofagia mediada por chaperonas, inducido en condiciones de carencia de suero o exposición a tóxicos. Así, una chaperona, la hsc73, se une a esta secuencia KFERQ y el complejo chaperona-proteína es reconocido entonces por un receptor de la membrana lisosomal, siendo internalizado y degradado en el lumen lisosomal. Aquellas anexinas que no poseen dicha secuencia, como la A5 y la A11, no son degradadas por este proceso, pudiendo ser este un mecanismo de down-regulación específica de determinadas anexinas (Cuervo

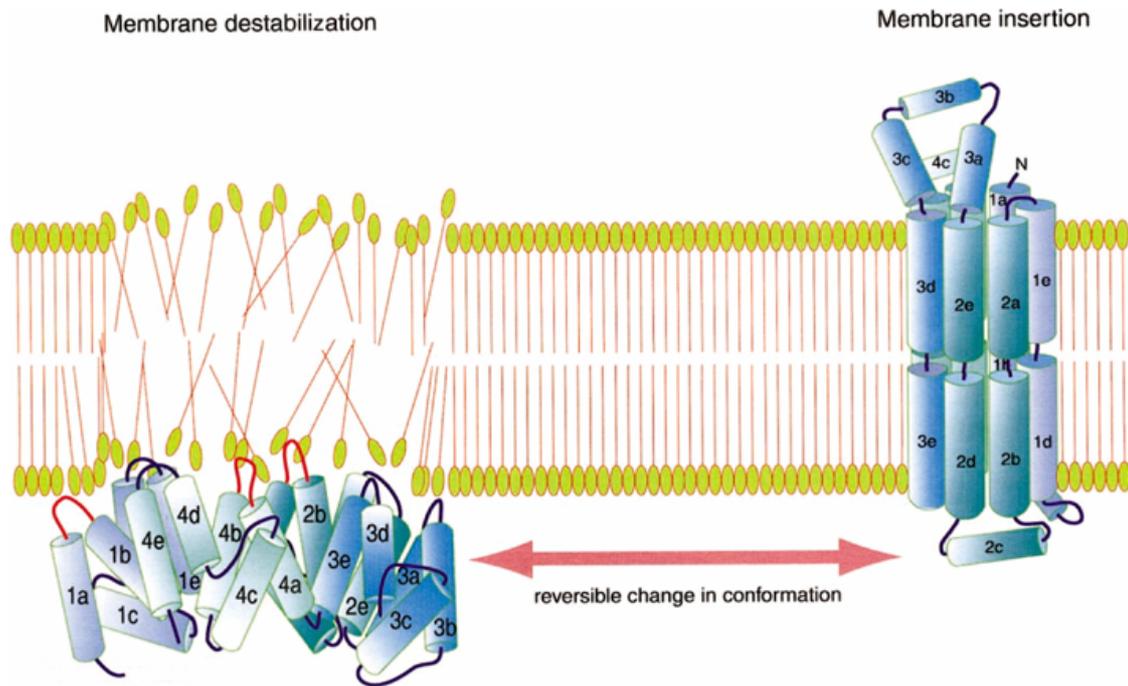


Figura 6. Modelo de inserción en la membrana y actuación como canal. Las anexinas experimentan cambios conformacionales, de forma reversible, en respuesta a un incremento en la concentración de H^+ , de tal forma que exponen dominios altamente hidrofóbicos que inducen su inserción en la membrana (Golczak M et al., 2001a,b). La presencia de un poro hidrofílico central en la estructura posibilita su actuación como canal iónico.

AM et al., 2000).

Actuación en el núcleo celular

Además de la translocación de las anexinas, en respuesta a calcio, hacia la membrana plasmática o las membranas endosomales, algunas anexinas concretas como la A4 o la A5 ven incrementada su asociación a la membrana nuclear en presencia de calcio. Se desconoce la función que estas anexinas, no obstante, realizan en el núcleo, ni el mecanismo de unión a la membrana, aunque posiblemente es a través de la unión a proteínas receptoras específicas. Con anterioridad había sido descrita la fosforilación de anexina A1 en células transformadas con el oncogen *v-src*. Del mismo modo, se ha descrito como la anexina A2, cuya expresión se regula por el ciclo celular (Chiang Y et al., 1993), actúa promoviendo la replicación de DNA en extractos de oocitos de *Xenopus* (Vishwanatha JK and Kumble S, 1993).

Recientemente, Moss y colaboradores (Tomas A et al., 2004) han descrito la translocación de la anexina A11, residente en el nucleoplasma en interfase, hacia la membrana nuclear en respuesta a incrementos de calcio y a la fase de ciclo celular (incrementando su asociación conforme se aproxima la telofase). Una vez translocada la anexina A11 se asocia con proteínas S100A6 (calciclina), y actúa como intermediaria entre el citoesqueleto de microtúbulos y la membrana nuclear, resultando además fosforilada en el proceso. Por último, los autores demuestran con el uso de *RNA interference* que dicha anexina es imprescindible para la correcta citocinesis.

ANEXINA A6

Aspectos relativos a su estructura

La anexina A6 se distingue del resto de la familia por poseer una duplicación del tándem de cuatro repeticiones que conforman en núcleo conservado de las anexinas. Los planos de los dos núcleos discoidales se disponen entre sí perpendicularmente, tanto en la forma unida a calcio (Avila-Sakar AJ et al., 1998) como en la anexina libre (ver *Figura 7*). Curiosamente, cuando dicha

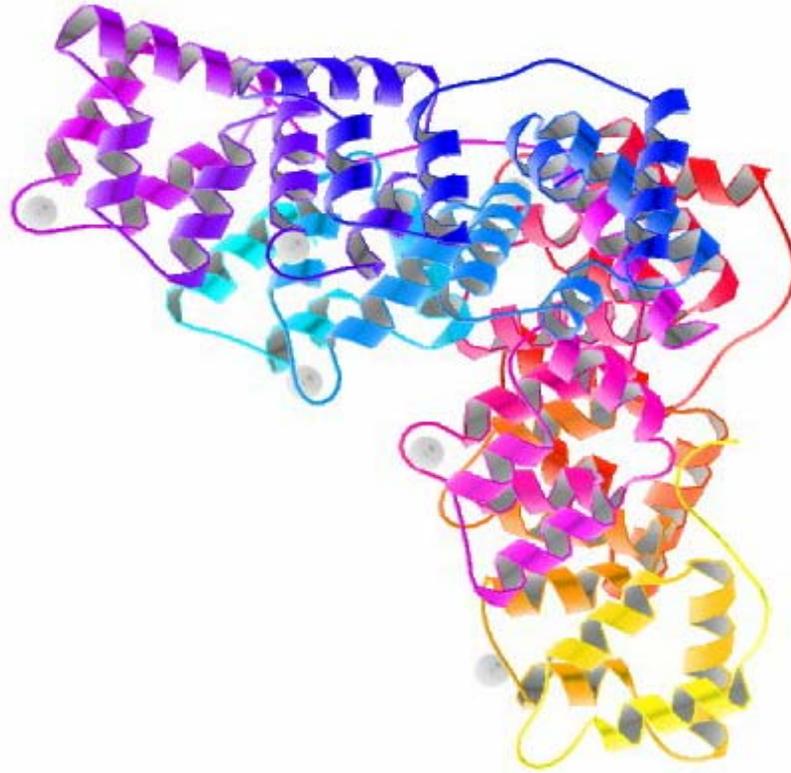
anexina se une a la membrana, se induce un cambio conformacional situándose ambos planos paralelamente, es decir, con las partes convexas de ambos discos (donde residen los lugares de unión a fosfolípidos) hacia el mismo lado. No obstante, se ha observado una interesante disposición alternativa en la forma unida a membranas, en la cuál los planos de los dos discos, mediante un giro de 180°, se extienden disponiéndose de forma antiparalela, es decir, con un cara convexa hacia cada lado (Avila-Sakar AJ et al., 2000). Esta nueva disposición sugiere la unión a dos membranas diferentes, al presentar dos motivos de unión a fosfolípidos presentados hacia lados opuestos.

La anexina A6 presenta dos motivos fosforilables, la Ser 13 y la Thr 356, candidatos a explicar la moderada fosforilación de la proteína inducida por factores de crecimiento (Moss SE et al., 1992). La Thr 356 se ubica en la región *linker* y al inducir la mutación T356D, que simula la fosforilación de este residuo, se han descrito tanto un incremento de la flexibilidad como cambios en los lazos de unión al calcio que conllevan un incremento en la afinidad y una relajación de la estructura (Freye-Minks C et al., 2003). Además, el grado de fosforilación por PKC, que en la molécula nativa es bastante bajo, se incrementa en el mutante T356D, sugiriendo la exposición de nuevos motivos fosforilables.

La región *linker*, comprendida entre los residuos 325-363, es además un dominio de interacción proteína-proteína. Es a través de este dominio que la anexina A6 interacciona, entre otras, con la proteína p120^{GAP} (Chow A et al., 1999), que es una proteína reguladora (activadora de la actividad GTPasa intrínseca) de Ras p21. La actividad de esta proteína es clave para la correcta señalización a través de MAPKs, que regulan la proliferación celular. En concreto, en respuesta a un pico de calcio y a través de su dominio C2, p120^{GAP} se tranloca hacia la membrana plasmática donde contribuye a desactivar Ras (revisado en Cullen PJ and Lockyer PJ, 2002).

La interacción con p120^{GAP} es, además, específica para la anexina A6, ya que ninguna de las otras anexinas, de un solo núcleo, posee la región *linker*. Interesantemente, los cambios conformacionales que modifican la disposición

(a)



Avila-Sakar AJ et al., 1998

(b)

```
MAKIAQGAKYRGSIRDFPDFNPSQDAETLYNAMKGFSGDKEAIINLITSRSNKQRQEIC
QNYKSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVGLMRPPAYADAKEIKDAISGIGTDEKCLIEI
LASRTNEQIHQLVAAYKDAYERDLEADITGDTSGHFRKMLVLLQGTREDDVVSEDLV
QQDVQDLYEAGELKWTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVDFEYLKTTGKPIEASIRGELSG
DFEKLMLAVVKCIRSTAEYFAERLFFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRT
KYEKSLYSMIKNDTSGEYKKTLLKLCGGDDDAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVARVELK
GTVRPAGDFNPDADAKALRKAMKGLGTDEDTIIDIITHRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDL
MADLKSELSGDLARLILGLMMPPAHYDAKQLKKAMEGAGTDEKALIEILATRTNAEIQ
INKAYKEDYHKTLEDALSSDTSGHFKRILISLATGNREEGGEDRERAREDAQVAEILE
IADTTSGDKSSLETRFMMILCTRSYPDLRRVVFQEFVKMTNYDVEHTIKKEMSGDVRDVF
VAIVQSVKNKPLFFADKLYKSMKGAGTEEKTLTRIMVSRSEIDLNLNIRREFIEKYDKSL
HQAIEGDTSGHFLKALLAICGGED
```

Figura 7. Estructura tridimensional y secuencia aminoacídica de la anexina A6. La conformación de la forma unida a calcio de la anexina A6 de *Bos Taurus* (Fichero PDB 1AVC) (Avila-Sakar AJ et al., 1998) muestra la disposición perpendicular de los dos núcleos de la molécula (a). Los lugares de unión a calcio (esferas grises) se encuentran en los lazos que conectan las hélices α de las diferentes repeticiones (cada repetición en un color diferente). En (b) se muestra la secuencia de 673 aminoácidos que constituye la forma larga de dicha anexina.

relativa de los dos núcleos, a su vez modifican la accesibilidad a dicha región (Freye-Minks C et al., 2003). Esta interacción de la anexina A6 con p120^{GAP} permite la formación de un complejo en el cuál también se encuentran dos quinasas: Fyn (de la familia Src), mediante una asociación directa con la anexina A6, y Pyk2 de la familia FAK (focal adhesion kinase), asociada indirectamente a la anexina a través de Fyn (Chow A et al., 2000). Este complejo, formado por dos quinasas importantes, la anexina como molécula intermediaria, asociándolas por otro lado con la membrana y con GAPs (u otras proteínas con dominios C2), permitiría comunicar la señalización por calcio con los estímulos mitogénicos o de adhesión al sustrato. En este sentido, cada vez más indicios apuntan a las anexinas como moléculas organizadoras de microdominios en respuesta a calcio (ver más adelante).

No sólo p120^{GAP}, a través de su dominio C2, es capaz de interactuar con la región *linker* de la anexina A6. Al igual que otras anexinas, como la A1 o la A2 que además son sustratos fosforilables, la anexina A6 es capaz de asociarse con isoenzimas de la familia Proteína Kinasa C (PKC), si bien no actúa como sustrato. Curiosamente, la interacción proteína-proteína que establece la anexina A6 en células de músculo esquelético (Schmitz-Peiffer C et al., 1998), tejido en el que se expresa de forma abundante (0.2% de la proteína total), no es específica de isoenzima pero sí de la subfamilia de las PKC convencionales, interactuando al menos con la PKC_{α-β}, las cuáles presentan, al igual que p120^{GAP}, dominios C2 de unión a calcio-dependiente a membranas (la funcionalidad de dicha interacción será discutida en posteriores apartados).

No obstante, no sólo la unión a membranas o las distintas fosforilaciones pueden afectar a la función y estructura de la anexina A6. Bandorowicz-Pikula y colaboradores han demostrado que la anexina A6 puede unirse a los nucleótidos ATP y GTP, con una estequiometría de 1:1, y que dicha unión produce un cambio conformacional sutil (con tan sólo 7-8 residuos afectados) que afecta a su función (Bandorowicz-Pikula J et al., 2003). El modelado molecular sugiere que el nucleótido se une en un bolsillo ubicado en el centro del core, a través de dos motivos de unión idénticos (F-X-X-K-Y-D/E-K-S-L) presentes uno en cada tándem de repeticiones (Bandorowicz-Pikula J et

al., 2003). Esta unión induce la actuación de la anexina A6 como canal iónico, observada en bicapas lipídicas coplanares, mediante un mecanismo que no conlleva la inserción en la membrana. Es por ello que ha sido postulada la actuación de la anexina A6 como biosensor de GTP (Kirilenko A et al., 2002). Así, la concentración del nucleótido modularía la asociación a la membrana de la anexina A6 pudiendo acoplar, por ejemplo, señalizaciones a partir de GTPasas pequeñas con el metabolismo del calcio u otros iones.

FUNCIONES DE LA ANEXINA A6:

Funcionalidad en el sistema endocítico: Antecedentes

La anexina A6 se encuentra ampliamente expresada en tejidos mamíferos, a excepción de los eritrocitos, aunque se expresa en mayor medida en determinados tipos celulares específicos tales como células endocrinas, hígado, ciertos epitelios ductulares, corazón y músculo (Clark DM et al., 1991). Su localización subcelular depende del sistema utilizado, aunque básicamente se encuentra en forma soluble y asociada a endosomas. Así, en hepatocitos de rata se encuentra mayormente asociada a endosomas subapicales (o pericanaliculares) positivos para Rab 5 (Ortega D et al., 1998). Fracciones aisladas de este tipo celular revela un gran enriquecimiento de anexina A6 en estructuras de sorting (CURL), reciclaje y cuerpos multivesiculares (pre-lisosomas), y, en menor grado, en cisternas de Golgi, no encontrándose en los lisosomas (Pons M et al., 2000). Similarmente, en células polarizadas WIF-B, utilizadas por su gran similitud con los hepatocitos diferenciados, la anexina A6 se distribuye en dos poblaciones, una asociada a los pre-lisosomas, y otra a cisternas del aparato de Golgi (Pons M et al., 2001a). Mediante fraccionamiento celular de células BHK, se ha observado asociada a endosomas tempranos y tardíos. En células NRK, el patrón observado es principalmente pre-lisosomal.

La anexina A6 fue involucrada en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en base a resultados obtenidos en sistemas *in-vitro* de membranas aisladas de fibroblastos (Lin HC et al., 1992). Dicha implicación no pudo ser demostrada, sino más bien contradicha, en sistemas *in-vivo*. Así, en células

A431, que carecen de anexina A6, la endocitosis mediada por vesículas de clatrina tiene lugar con normalidad y la sobreexpresión de anexina A6 no revierte la inhibición inducida por la carencia de citosol, el cuál si que contiene otros factores necesarios que se translocan a la membrana en respuesta a un incremento de calcio intracelular (Smythe E et al., 1994).

Ambos resultados, aparentemente contradictorios, fueron integrados por Anderson et al. al describir, tanto en sistemas *in-vivo* como *in-vitro*, la formación alternativa de vesículas de clatrina a partir de microdominios que carecen de espectrina y de forma independiente de anexina A6 (Kamal A et al., 1998). En cambio, la formación de vesículas de clatrina convencionales, en dominios que sí contienen espectrina, requiere de la previa disociación de este citoesqueleto cortical y es en este proceso dónde la anexina A6 se revela imprescindible. Así, la anexina induce una reorganización del citoesqueleto de espectrina a través de su unión a ésta, que es entonces susceptible a la acción de la proteasa calpaina-I que disocia el complejo de membrana y citoesqueleto. No obstante, las vesículas de clatrina formadas de forma independiente de anexina A6, y por lo tanto a partir de zonas libres de espectrina, no son capaces de transportar el ligando internalizado (en este caso las LDL) hasta el compartimento endocítico tardío, permaneciendo dispersas en la periferia de la célula. Para explicar este hecho se postula un requerimiento de espectrina recubriendo a las vesículas con el fin de permitir el acoplamiento al citoesqueleto de microtúbulos, necesarios para el transporte hacia los endosomas tardíos, a través de adaptadores como la dinactina. Fue entonces cuando nuestro grupo explicó este fenómeno a través de otro enfoque.

La anexina A6 se redistribuye hacia el compartimento endocítico tardío en paralelo a la internalización de LDL (Grewal T et al., 2000) y es necesaria además para el correcto tráfico de las LDL hacia la degradación en los lisosomas. En células NRK microinyectadas con un mutante de la anexina A6 que carece de las seis últimas repeticiones las LDL son deficientemente degradadas con respecto a las células microinyectadas con la anexina salvaje, acumulándose en endosomas tardíos aberrantes (Pons M. et al, 2001), e indicando la importancia del núcleo C-terminal en el proceso. Similares

resultados sobre dicha degradación se obtienen en células CHO, que presentan muy bajas cantidades de anexina endógena, transfectadas con la forma salvaje o mutante de la anexina. Se ha observado, además, la asociación de espectrina y anexina en los endosomas tardíos de células NRK, y cómo el tratamiento con inhibidores de la calpaína conllevan el mismo efecto sobre la degradación de LDL.

Todo ello demuestra que el mecanismo promovido por la anexina A6, antes descrito en la escisión de vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática, tiene lugar también en los endosomas tardíos, y que en este proceso la anexina A6 es asimismo necesaria. Además, explica los resultados de Kamal et al. en los que describen una deficiente degradación de las LDL internalizadas en vesículas de clatrina carentes de espectrina y de forma independiente de anexina A6.

Participación en el metabolismo del calcio: Proliferación y diferenciación

Existen dos formas diferentes de la anexina A6 en función de si se realiza o no *splicing* alternativo del exon 21 del gen, de tal manera que la proteína final contiene o no un hexapéptido (VAAEIL) en la zona que conecta las repeticiones 7 y 8. Ambas formas se expresan en la mayoría de células de mamífero, si bien la que contiene el hexapéptido es mayoritaria (Kaetzel MA et al., 1994), y difieren funcionalmente. Así, la forma "larga" y no la corta es capaz de inhibir, en células A431 (humanas), la entrada de calcio extracelular en respuesta a EGF, sin afectar la liberación de calcio proveniente de compartimentos intracelulares ni actuar como tamponador del calcio (Fleet A et al., 1999).

La inhibición de la entrada de calcio extracelular podría explicar de forma unificada dos efectos diferentes, aparentemente inconexos, inducidos por la sobreexpresión de la proteína. Por un lado explica la inhibición de la proliferación inducida por factores de crecimiento, observada en el mismo tipo celular al sobreexpresar la forma larga de anexina A6 (Theobald J et al., 1994), así como la detención de estas células en la fase G1 del ciclo, sin interferir en la inducción de la expresión de genes proliferativos promovida por las MAPKs.

Evidencias en este sentido provienen de estudios realizados en líneas de melanoma, en las que se ha determinado que los niveles de expresión de anexina A6 se ven reducidos conforme se incrementa la capacidad metastática (Francia G et al., 1996). Es por ello que una de las funciones más plausibles descritas para la anexina A6 (así como para otras anexinas, como la A7) es la de actuar como supresor tumoral (Theobald J et al., 1995). No obstante, estudios realizados en diversos sistemas demuestran que la expresión de anexina A6, al contrario que en otras anexinas como la A1 o la A2, no se regula a través del ciclo celular (Moss SE et al., 1992) o el desarrollo embrionario (Della Gaspera B et al., 2001).

Además, el papel de la anexina A6 en la entrada de calcio extracelular, también observada en sistemas diferenciados, como los cardiomiocitos de ratones transgénicos que sobreexpresan anexina A6 en corazón, sería responsable de la hipertrofia ventricular y la reducida contractibilidad que presentan estas células (ver más adelante). De esta manera, observamos que un mismo efecto a nivel celular, ejercido sobre diferentes sistemas, podría explicar fenotipos diversos (*pleiotropismo*), y es culpable en parte de la ausencia de consenso a la hora de asignar una función general a la familia de las anexinas.

Actuación como organizador de microdominios

Estudios realizados en células de músculo liso por el grupo de investigación de Annette Draeger (Univ. Berna) han añadido evidencias a la posible función de la anexina A6 en el tejido muscular *in-vivo*. Así, postulan que el proceso de contracción muscular y el incremento transitorio de la rigidez de la membrana celular se acoplan mediante la formación de un complejo reversible calcio-dependiente en la membrana citoplasmática entre actina y las anexinas A2 y A6 (Babiychuk EB et al., 1999; Babiychuk VS et al., 2000). El complejo se formaría a partir de regiones cooperativas ubicados en la monocapa citosólica, consistentes en moléculas aisladas de anexina A6 estabilizadas por filamentos de actina, mientras que la anexina A2 participaría principalmente en la agregación de los *lipid rafts*.

Posteriormente los autores han ampliado el modelo, explicando de forma precisa la funcionalidad de las anexinas en las células musculares (Draeger A et al., 2003). En células de músculo liso, en paralelo a la contracción muscular, la membrana se organiza en dominios altamente estructurados, unos más rígidos y ricos en actina, y otros más flexibles y básicamente compuestos por caveolas (*lipid rafts* estables) y *lipid rafts* no caveolares (sumamente dinámicos).

Los resultados obtenidos indican que las anexinas actuarían de forma coordinada en respuesta a calcio siendo las responsables de esta organización (Babiychuk EB and Draeger A, 2000). Así, la anexina A2 es la iniciadora del proceso ya que, ante incrementos fisiológicos ($K_d=700$ nM) de calcio intracelular (responsables de la contracción muscular), se transloca a la membrana e induce la agregación de *lipid rafts* aislados y de pequeño tamaño, formándose estructuras de gran tamaño y con una relación proteína:lípidos mucho mayor (necesaria para la optimización de la señalización). Esta coalescencia de *rafts* distales sería posible gracias a la capacidad de las anexinas (en este caso la A2) de oligomerizar, formando capas bidimensionales subyacentes a la monocapa citosólica, en respuesta a su interacción calcio-dependiente con las cabezas polares de los glicerofosfolípidos (Lambert O et al., 2004; Oling F et al., 2001). Esta agregación de *lipid rafts* no caveolares y altamente dinámicos, incrementa los *outputs* señalizadores generados en la membrana, lo cuál conlleva una nueva entrada de calcio extracelular, alcanzándose niveles intracelulares de calcio libre de 800 nM. La elevada concentración de calcio induce entonces la translocación de anexina A6 hacia dominios *raft* y *no-raft* de la membrana plasmática; es en estos últimos lugar de anclaje para el establecimiento de un citoesqueleto de actina más potente que responda a las exigencias de la contracción. Finalmente, a niveles superiores a 1000 nM de calcio, se transloca la anexina A5 hacia zonas *no-rafts* desde donde podría actuar como canal o bien modular otros canales, para extraer el exceso de calcio intracelular y facilitar la relajación (ver *Figura 8*).

Gunteski-Hamblin y colaboradores, describen como, ante la sobreexpresión

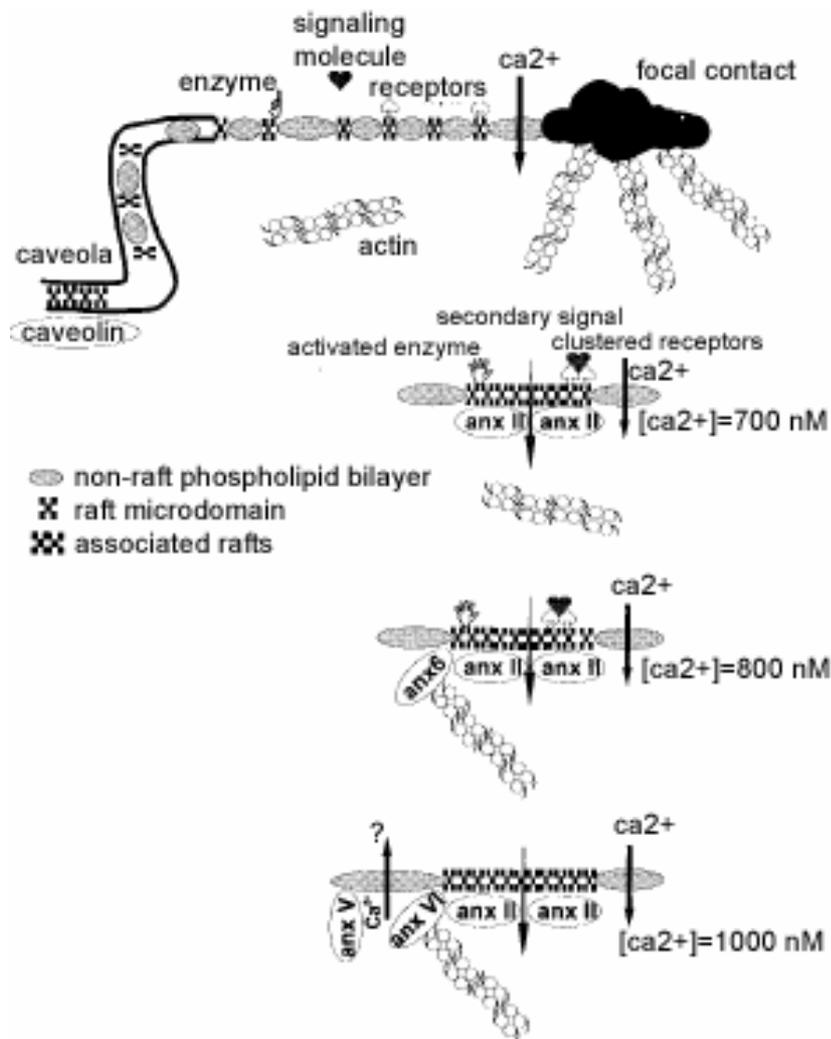


Figura 8. Hipótesis de actuación conjunta de varias anexinas en células musculares (Babiychuk EB and Draeger A, 2000). La inicial entrada de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_i = 700 \text{ nM}$) en respuesta a la activación, recluta anexina A2 hacia la membrana desde donde participa en la coalescencia de lipid rafts, proceso mediante el cuál se optimiza la señalización. Este nuevo impulso señalizador consigue elevar los niveles de calcio intracelular por encima de 800 nM, suficientes para translocar a la anexina A6, que se acumula en estos mismos dominios. Desde la membrana, la anexina A6 sirve de elemento de anclaje para el citoesqueleto. Al incrementarse el calcio intracelular por encima de $1 \mu\text{M}$ la anexina A5 es translocada hacia dominios no-lipid rafts, desde donde actuaría como canal facilitando la relajación.

dirigida a cardiomiocitos de anexina A6, los mutantes murinos presentan alteraciones cardíacas como hipertrofia, miocarditis, fibrosis, e infiltración linfocitaria. Una vez aislados, estos cardiomiocitos presentan menores niveles basales de calcio y una reducida amplitud de las oscilaciones del catión, con las consiguientes alteraciones en el proceso de contracción (Gunteski-Hamblin AM et al., 1996). Los autores sugieren la actuación moduladora de la anexina sobre canales de las membranas de cardiomiocitos, como canales de rianodina sensibles a calcio o intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Los resultados obtenidos en animales knockout para la anexina A6, al igual que sucede en el caso de otras anexinas como la A7, son contradictorios. Por ejemplo, Moss y colaboradores revelan que la funcionalidad cardíaca, inmunitaria y reproductora de los ratones *Anx A6(-/-)* no difiere de la observada en los animales control (Hawkins TE et al., 1999). En cambio, a partir de cardiomiocitos aislados de estos ratones, se ha observado un incremento significativo de la amplitud de las oscilaciones de calcio en paralelo a una disminución del periodo de recuperación en cardiomiocitos, sin afectarse la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (Song G et al., 2002). Ello sugiere, alternativamente, que existe una actuación sobre intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (que extraen calcio hacia el espacio extracelular) y/o sobre bombas $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$ de retículo sarcoplasmático (que secuestran el calcio en dicho compartimento). Estos resultados concuerdan con la disminución de anexina A6, observada en los niveles de mRNA y proteína, en pacientes afectados de fallo cardíaco congestivo (Benevolensky D et al., 2000). Del mismo modo, recientes observaciones de nuestro grupo de investigación revelan que la sobreexpresión de anexina A6 afectaría a la velocidad de recuperación de los niveles basales de calcio ante un incremento intracelular del catión.

La interpretación de los resultados obtenidos en células musculares, u otros sistemas es, por lo tanto, abordable desde diversos aspectos de la funcionalidad de la anexina A6, que comprenden su hipotética actuación como canal iónico, la modulación de otros canales, o la organización coordinada de microdominios. Recientemente, ha sido identificada la interacción proteína-

proteína de la anexina A6 con la proteína CRHSP-28 de forma dependiente de calcio en células acinares (Thomas DD et al., 2002). La proteína CRHSP-28 ha sido previamente involucrada en la secreción en estas células y descrita su asociación con MAL2, que reside en los *lipid rafts*. En respuesta a un estímulo hormonal de la secreción, que induce un incremento de calcio intracelular, la anexina A6 se redistribuye hacia los *lipid rafts* existentes en los gránulos de zimógeno a secretar, donde se encuentra CRHSP-28. Los autores postulan que se acoplaría entonces el citoesqueleto de actina facilitándose así la secreción de enzimas digestivos. Este mecanismo, básicamente análogo al que se describe en células musculares, facilita, en otro sistema celular, una funcionalidad diferente de la anexina A6.

CLASIFICACIÓN DE LAS FUNCIONES DE LAS ANEXINAS

El establecimiento de las funciones realizadas por las anexinas ha acontecido de forma poco integrada, más bien caótica, al no haber sido consideradas éstas como familia de proteínas hasta etapas relativamente tardías de su reciente historia. Además, muchas de las funciones no han estado carentes de controversia, debido en parte a la heterogeneidad de sistemas *in-vitro* e *in-vivo* utilizados y a las numerosas anexinas estudiadas procedentes de especies diferentes. No obstante, la profundización en el conocimiento de la estructura y función de las anexinas así como su consolidación como grupo, venciendo a las dudas iniciales (Browning J et al., 1990), permite, hoy en día, que el conjunto de funciones sea incluso clasificable considerando las propiedades físico-químicas más básicas, encontrándose así la manera de articular el gran volumen previo de datos inconexos.

Las funciones propuestas para todas las anexinas se pueden agrupar, de este modo, en cuatro grandes bloques interconectados (revisado en Raynal P and Pollard HB, 1994): 1) modulación de los flujos iónicos, 2) endocitosis y exocitosis, 3) intervención en procesos inflamatorios, 4) regulación de la proliferación y diferenciación.

El primer bloque de funciones, consistente en la actuación de las anexinas como canales iónicos, se basa, probablemente, en la generalizada capacidad

de las anexinas de experimentar un cambio conformacional a gran escala (de tipo *inside-out*), exponiendo grandes regiones hidrofóbicas en el exterior e induciéndose así la inserción en la bicapa lipídica. Adicionalmente, se podría producir una oligomerización de las anexinas formando estructuras cuaternarias (por ejemplo los trímeros formados por anexinas vegetales) que compondrían un poro hidrofílico en su interior. La inserción en la membrana se ha observado que es independiente de calcio, pero en cambio se genera en respuesta a disminuciones de pH (entre 5-6) al protonarse ciertos residuos. Si bien este fenómeno de inserción transmembrana es el modelo más probable, otros cambios conformacionales podrían explicar esta actuación como canal. Alternativamente, ha sido descrita la propiedad de las anexinas de actuar como canal iónico sin la necesidad de insertarse en la membrana, en un proceso inducido por la presencia de nucleótidos trifosfato (GTP,ATP), que se unen en un bolsillo central del core (Bandorowicz-Pikula J et al., 2003). No es descartable que la unión a calcio y fosfolípidos, a través de la inducción de ligeros cambios conformacionales, podría asimismo explicar una actuación como canal (Burger A et al., 1996). Finalmente, cabe destacar que las anexinas son capaces de afectar al funcionamiento de otros canales iónicos, como intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o canales de rianodina (Diaz-Muñoz M et al., 1990), si bien se desconocen los mecanismos moleculares implicados.

Dentro de este grupo de funciones se incluyen, por ejemplo, los efectos inducidos en cardiomiocitos por la sobreexpresión de anexina A6.

El segundo bloque de funciones se explica por la capacidad de numerosas anexinas de interactuar con la monocapa citosólica de la bicapa lipídica así como con componentes del citoesqueleto que la rodean. La interacción con la membrana, o con los endosomas, que en este caso no comporta grandes cambios conformacionales, es básicamente de tipo electrostático, a través de su interacción calcio-dependiente con fosfolípidos acídicos conferida por las repeticiones anexina, o con el citoesqueleto a través de motivos de unión a F-actina y espectrina presentes en el core de algunas anexinas. Las hipótesis generadas para explicar la participación (no suficiente si bien necesaria), en la fusión de membranas (discutidas anteriormente), incluirían desde la dimerización de anexinas presentes en diferentes membranas hasta la

existencia de dos motivos de unión a fosfolípidos diametralmente opuestos por cada molécula de anexina. Ejemplos de este tipo de funciones son la disociación promovida por la anexina A6 del citoesqueleto de espectrina facilitando la formación de vesículas recubiertas de clatrina, la agregación de liposomas ricos en PS o gránulos de cromafina inducida por varias anexinas ante incrementos fisiológicos de calcio intracelular, o la inducción de la secreción de gránulos de zimógeno en células acinares pancreáticas.

Alternativamente, en algunas anexinas (principalmente la A2) la unión a endosomas de forma calcio-independiente y sensible a colesterol posiblemente a través de interacciones proteína-proteína mediadas por el extremo N-terminal, parece ser determinante para la biogénesis y fusión de vesículas endocíticas.

En el tercer bloque de funciones las anexinas han sido reubicadas, de tal forma que algunas funciones establecidas en sus inicios han perdido credibilidad mientras que otras emergen con fuerza. Por ejemplo, la inhibición de la PLA₂ realizada por la mayoría de las anexinas se ha explicado posteriormente de forma puramente mecanística, a través del secuestro del sustrato del enzima, los fosfolípidos. En cambio, el hecho de que algunas anexinas se encuentren en el medio extracelular (como la A1 o la A2) de células inmunitarias activadas, la actuación como ligando de receptores en la superficie celular (como la A2 y el FPR-receptor del péptido formilo), los efectos en la maduración de linfocitos, su interacción con componentes de la matriz extracelular, así como su emergente rol en angiogénesis y coagulación, a través de la activación del plasminógeno, apuntan inequívocamente a un papel de las anexinas en los sistemas inmunitario y vascular. En este sentido, son particularmente clarificadores los resultados obtenidos por Hajjar y colaboradores en los ratones K.O. para la anexina A2 (Ling Q et al., 2004), los cuáles presentan severos defectos en perfusión post-lesión y neovascularización, derivados de la ineficaz actividad fibrinolítica extracelular de sus endotelios vasculares.

En el cuarto bloque de funciones las anexinas podrían actuar en la

organización de microdominios de la membrana plasmática, o bien de los endosomas, estos últimos conteniendo abundante maquinaria de señalización (Pol A et al., 1998, 2000). A través de su interacción con fosfolípidos acídicos o con receptores específicos, y asimismo por su capacidad de autoasociación formando capas bidimensionales, podrían segregar componentes como el colesterol o los glicosfingolípidos y estabilizar el citoesqueleto de actina, constituyendo un factor dinámico de comunicación entre los *lipid rafts* y el metabolismo de calcio intracelular. La translocación hacia estos dominios de proteínas de señalización como la PKC, Fyn o RasGAP, que interaccionan con la anexina A6, alteraría el equilibrio entre éstas moléculas y en último término afectaría a la transducción de señal a partir de estas estructuras. La modulación de los canales de membrana ejercida por varias anexinas, o incluso su actuación como tales, podría ser del mismo modo importante.

Por último, la localización de algunas anexinas en el núcleo o su movilización hacia este en respuesta a calcio o ciclo celular (anexinas A1, A5, A11), así como su participación en procesos nucleares, como la síntesis de DNA (anexina A2) o la citocinesis (anexina A11) debe ser esclarecida. Ejemplos de estas funciones son la inhibición de la proliferación y el secuestro en G1 de células A431, o la diferenciación de linfocitos B y T, ambos procesos inducidos por la anexina A6.

ANEXINAS Y COLESTEROL

Si bien la unión a la membrana responde, en su mayor parte, a la interacción con los fosfolípidos de forma calcio-dependiente, el hecho que diversas anexinas codistribuyan con dominios enriquecidos en colesterol e incluso participen en su formación, así como su capacidad *in-vitro* de unirse a las membranas de forma independiente de calcio y dependiente de colesterol, sugiere la participación del lípido en las funciones *in-vivo* de las anexinas.

Las células de mamífero requieren el colesterol para la biosíntesis de membrana, el crecimiento celular, la formación de lipoproteínas o la síntesis de ácidos biliares y hormonas. El control de los niveles de colesterol, afectando a

la síntesis *de novo* o bien a la recaptación mediada por receptores (ver más adelante), se realiza tanto a nivel transcripcional, como translacional y post-translacional (Goldstein JL and Brown MS, 1990).

En este complejo metabolismo del colesterol (Krieger M, 1999; Liscum L and Munn NJ, 1999; Nofer J-R et al., 2002), participan de forma importante las lipoproteínas sanguíneas. Éstas actúan como transportadores solubles de moléculas hidrofóbicas en el torrente sanguíneo. El colesterol libre o esterificado, otros compuestos lipídicos como triglicéridos o algunas vitaminas, son empaquetadas en estas estructuras globulares con cubierta de fosfolípidos y proteínas (mayormente apolipoproteínas, y algunos enzimas).

Cuatro grandes grupos de lipoproteínas han sido descritos en función de su tamaño, densidad y composición: VLDL, LDL, HDL y QM.

Receptores LDLR y SR-BI

Entre los receptores mejor estudiados de estas lipoproteínas, se encuentran el receptor de LDL (LDLR) y el receptor SR-BI (*scavenger receptor type B-I*, cuyo ligando específico son las HDL). Si bien la función de ambos receptores conlleva consecuencias fisiológicas comunes, ya que ambos acaban modificando los niveles de colesterol transportado en sangre (ver más adelante), los mecanismos moleculares que suceden a la activación de uno u a otro receptor son bien distintos. Así, el LDLR, presente principalmente en la membrana del hepatocito, se une con alta afinidad a la partícula de LDL y el complejo ligando-receptor es internalizado vía vesículas de clatrina incorporándose así al compartimento endosomal. Por el contrario, el receptor SR-BI, el cuál se une también con alta afinidad y especificidad, en este caso a la partícula completa de HDL, participa en la "captación selectiva" de colesterol por parte de la célula (a través de un mecanismo aún desconocido) sin existir internalización de la partícula (ni del receptor), que retorna "vacía" a la circulación en sangre (Johnson WJ et al., 1991).

El receptor SR-BI se expresa principalmente en aquellos tejidos donde se

destina el llamado "*transporte reverso de colesterol*", como son el hígado o los tejidos esteroideogénicos (glándula adrenal, testículos y ovarios). Es en dichos tejidos donde, mediante este proceso (Glass C et al., 1985; Gwynne JT et al., 1989), el colesterol se extrae de las lipoproteínas en sangre y se emplea bien para sintetizar hormonas o ser almacenado (como en el caso de los tejidos esteroideogénicos), o bien para su excreción en forma de ácidos biliares o la incorporación a las partículas de VLDL en formación (en el caso del hígado) (ver *Figura 9*).

Además de participar en la captación selectiva, algunos trabajos han implicado asimismo al receptor SR-BI en el proceso inverso, es decir, la salida del colesterol libre celular hacia las lipoproteínas HDL circulantes (Ji Y et al., 1997), conocido como "cholesterol-efflux".

El receptor SR-BI (ver *Figura 10*) es una glicoproteína de 82 kDa (~509 aa) molecularmente bien descrita, con los cortos extremos N- y C- terminal citoplasmáticos y un largo lazo extracelular glicosilado y que presenta los motivos de unión a la partícula de HDL. Diversas cisteínas en la región juxta- y trans- membrana son palmitoiladas de tal forma que el receptor se encuentra mayoritariamente asociado a caveolas (Babitt J et al., 1997). A pesar de la existencia de otros sitios de alta afinidad para las HDL (como los receptores ABC-A1, EDGs, HB₂, CD36...), y de forma posterior a los trabajos bioquímicos que incluyeron a SR-BI como receptor de alta afinidad para las HDL, diversos estudios han demostrado la gran relevancia fisiológica de este receptor en el organismo *in-vivo* (Rigotti A et al., 1997). Así, la sobreexpresión de SR-BI mediada por adenovirus en hígado de ratón conlleva una dramática disminución del colesterol asociado a HDL en paralelo a un incremento de la excreción en forma de ácidos biliares (Kozarsky KF et al., 1997). En segundo lugar, existe una regulación, por parte de las hormonas hipofisarias que regulan la esteroideogénesis, de la expresión de SR-BI (Rigotti A et al., 1996) y, por último, la distribución tisular del receptor es tan elevada como específica en aquellos tejidos involucrados en el transporte reverso de colesterol (Acton S et al., 1996).

El *splicing* alternativo del gen que codifica el receptor genera una variante

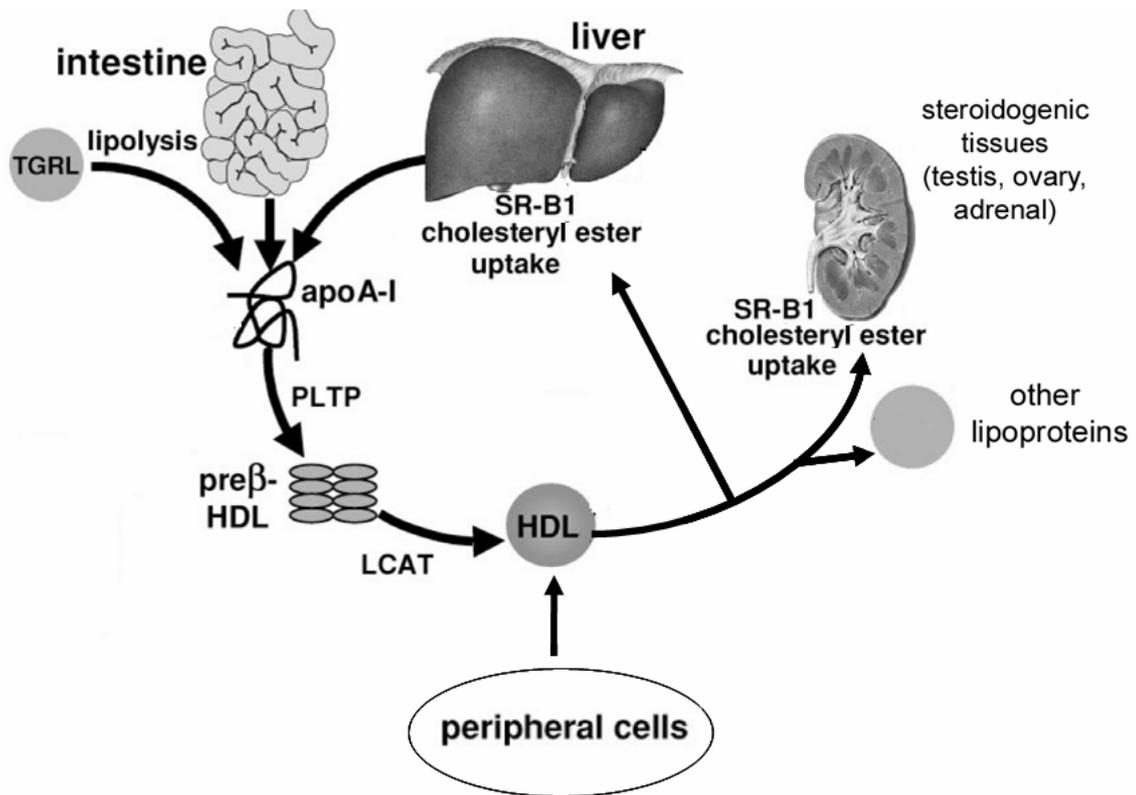


Figura 9. Transporte reverso de colesterol. Las lipoproteínas HDL recogen el colesterol no-esterificado o “libre” de los tejidos periféricos (Krieger M, 1999). El enzima plasmático lecitín:colesterol aciltransferasa (LCAT) esterifica el colesterol de la partícula que es entonces liberado, a través del proceso de “captación selectiva” mediado por el receptor SR-B1, a tejidos que lo requieren para el ensamblaje de nuevas lipoproteínas, la biosíntesis de hormonas esteroideas o para su excreción en forma de sales biliares.

llamada SR-BII, expresada en considerable cantidad en diversos de los tejidos mencionados. Este nuevo receptor, que tan sólo difiere en el extremo C-terminal (no en el lazo extracelular, donde se une la partícula) presenta asimismo alta afinidad y especificidad por la partícula de HDL, si bien presenta un 25 % de eficiencia, con respecto al SR-BI, en la mediación del transporte reverso de colesterol (Webb NR et al., 1998).

Ha sido descrita la regulación de la expresión relativa de ambas isoformas (SR-BI/II), en hígado y tejidos esteroideogénicos, por estrógenos (Graf GA et al., 2001).

Recientemente ha sido analizada la localización subcelular de este nuevo receptor que, al contrario que SR-BI, se expresa mayormente en compartimentos intracelulares (Eckhardt ER et al., 2004), diferencia que podría explicarse por la ausencia del motivo PDZ en el extremo C-terminal de SR-BII, presente en la isoforma SR-BI (Ikemoto M et al, 2000). El receptor SR-BII capta el colesterol a través de la internalización de la partícula, que es rápidamente incorporada al compartimento endosomal de reciclaje, mientras que el receptor SR-BI realiza la captación selectiva desde de la membrana plasmática. Es en este último compartimento donde el proceso se realizaría de forma más eficiente, explicando así la mayor capacidad del receptor SR-BI en el intercambio de colesterol.

Los resultados sugieren que SR-BII podría participar en el transporte intracelular de colesterol mediando la internalización de la partícula, si bien su importancia fisiológica está aún por determinar.

Otra característica metabólica de importancia fisiológica, mediada por las HDL a través de sus múltiples receptores (Fidge NH, 1999), es su capacidad mitogénica. Ha sido descrito, en varias líneas celulares, como las HDL son capaces de activar a numerosos enzimas de señalización como la eNOS (*endothelial nitric oxid synthase*), fosfolipasas C y D (PLC, PLD), proteína quinasa C (PKC), proteínas G heterotriméricas, o MAP kinasas (MAPKs), que dan lugar a diversos estímulos efectores como incrementos intracelulares de calcio, AMP cíclico (AMPc) o ceramida. Todas estas respuestas son capaces de inducir la proliferación celular.

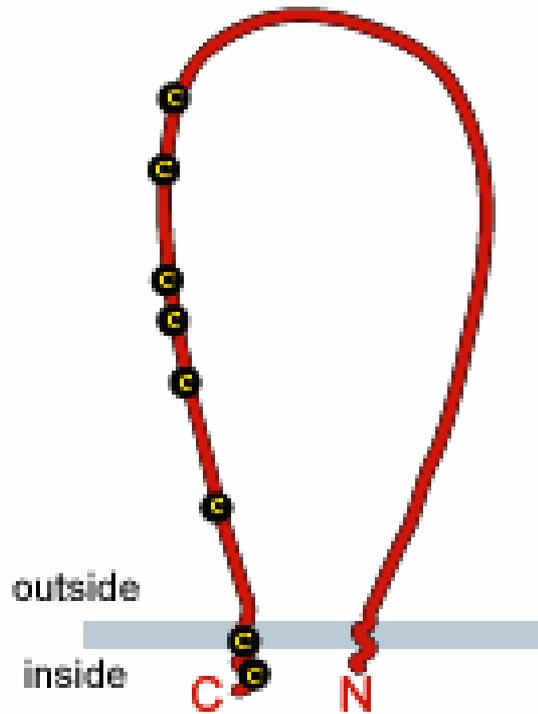
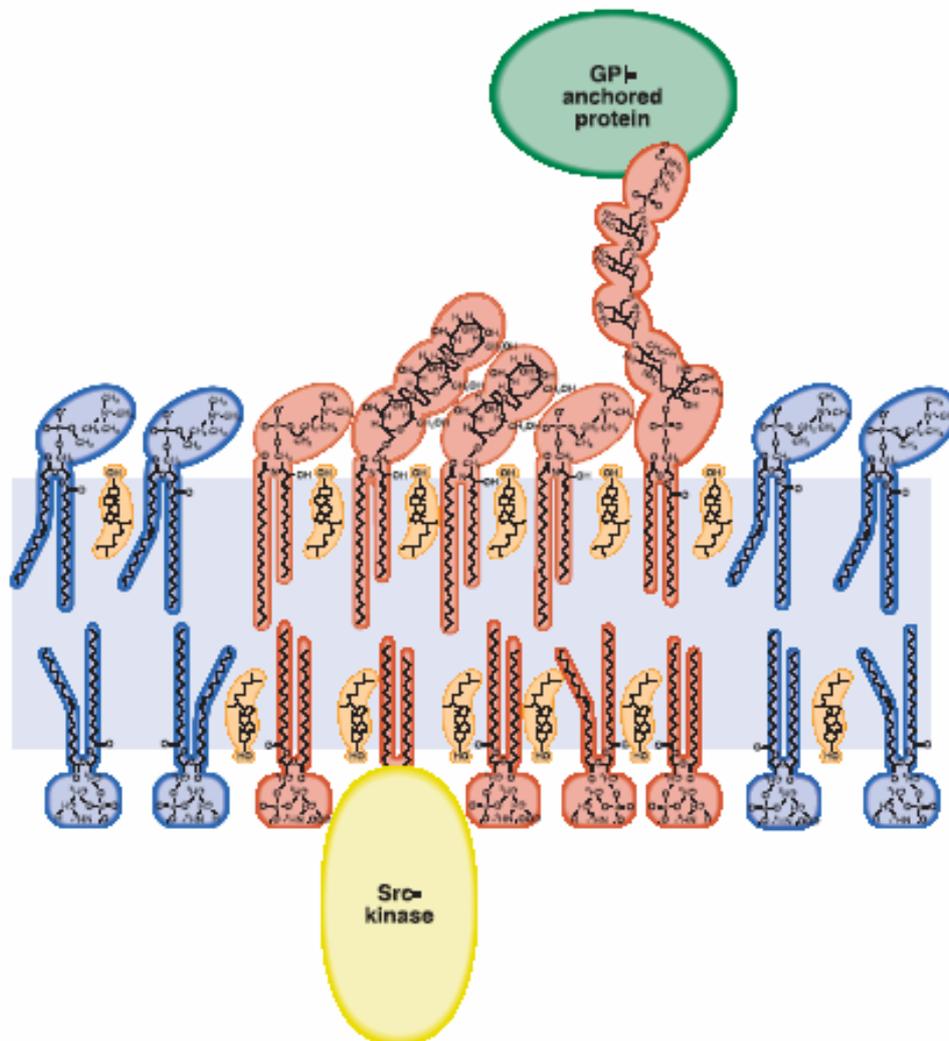


Figura 10. Topología del receptor SR-BI murino. El receptor SR-BI, miembro de la superfamilia de receptores CD36, es una proteína de 509 residuos altamente glicosilada, con dos cortos extremos citosólicos unidos a un largo (409 aa) lazo extracelular a través de dos regiones transmembrana. Las cisteínas del receptor se indican en la figura (círculos); de éstas, las ubicadas en el extremo C-terminal citosólico y en la región transmembrana adyacente se encuentran palmitoiladas, hecho que determina la localización del receptor en las caveolas (Babitt J et al., 1997).

Colesterol y lipid rafts

El colesterol transportado por las lipoproteínas, una vez incorporado a la célula, pasa a ser un constituyente estructural de la membrana. La membrana plasmática es una estructura fluida que se organiza en regiones “ordenadas” (*liquid-ordered fluid phase*) y “desordenadas” (*liquid disordered fluid phase*). Las regiones ordenadas de la membrana plasmática, enriquecidas en glicosfingolípidos, esfingomielinina, colesterol y proteínas de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (*GPI-anchored proteins*), son denominadas “plataformas lipídicas” (*lipid rafts*). Estas regiones presentan, en la monocapa extracelular, los glicosfingolípidos y las proteínas de anclaje a glicosilfosfatidilinositol, y, en la monocapa citosólica, glicerolípidos con predominio de ácidos grasos saturados, mientras que el colesterol se encuentra uniformemente distribuido en ambas monocapas. Este colesterol, al interaccionar con las cadenas saturadas de los esfingolípidos, contribuye a dotar de rigidez al conjunto (ver *Figura 11*). Este empaquetamiento elevado confiere a estos dominios resistencia a la solubilización con detergentes no iónicos como el Tritón X-100. De estos dominios ordenados son parcialmente excluidos fosfolípidos ácidos como la fosfatidiletanolamina o la fosfatidilcolina (Brown DA and London E, 1998). A su vez, los *lipid rafts* pueden dividirse en *caveolares* y *no-caveolares*, en función de si contienen o no la molécula caveolina. La presencia de dicha proteína permite la creación de invaginaciones de 80-100 nm de diámetro que constituyen una vía endocítica independiente a la de las vesículas de clatrina (revisado en Parton RG and Simons K, 1995).

Las proteínas que residen en estos dominios presentan modificaciones post-traduccionales, como acilaciones dobles (que permiten la interacción con la monocapa citoplasmática, como ocurre con la kinasa Src) o palmitoilaciones (que favorecen la inserción transmembrana), o bien interaccionan directamente con el colesterol a través de motivos en su secuencia (e.g. caveolina). Estas plataformas más estables, donde la difusión lateral de moléculas es más lenta, son necesarias para el anclaje de numerosos enzimas los cuáles, a través de interacciones con otras moléculas, desencadenan procesos de señalización (Simons K and Toomre D, 2000) (ver *Figura 11*).



Simons K and Ikonen E (2000)

Figura 11. Estructura de los lipid rafts. Se representa una fase líquida-ordenada (en rojo) de la bicapa intercalada en la fase líquida-desordenada (azul). El colesterol (naranja) se distribuye preferentemente en la fase ordenada. En la monocapa externa, se concentran glicosfingolípidos y esfingomiélinea, mientras que la monocapa interna se compone de glicerolípidos saturados. Ambas monocapas se conectan a través de mecanismos mal conocidos. Se observan dos proteínas intercaladas en la membrana del raft: una proteína de anclaje a GPI unida a la superficie extracelular y, a nivel intracelular, una quinasa de la familia Src doblemente acilada.

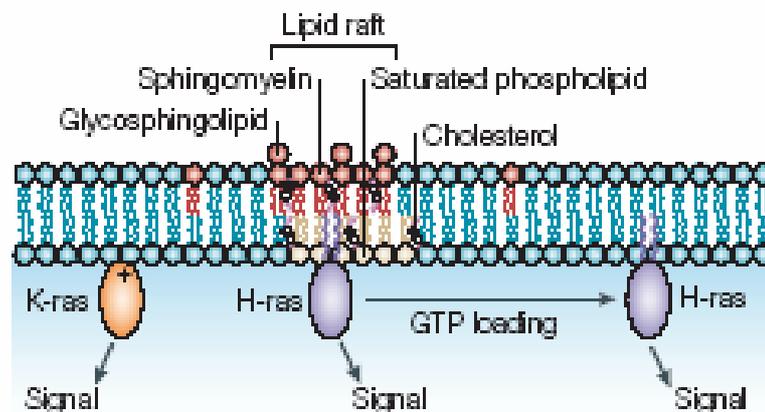
Del mismo modo, las plataformas lipídicas están presentes en Golgi/TGN, endosomas (Coxey RA et al., 1993; Cluett EB and Machamer CE, 1996) y posiblemente otros compartimentos como RE (Choy E et al., 1999), donde participan en procesos como la exocitosis y la transcitosis (Simons K and van Meer G, 1988; Simons K and Ikonen E, 1997).

Señalización de Ras y MAPKs

Una de las principales vías de señalización a partir de la membrana plasmática se activa por la familia p21Ras de pequeñas GTPasas, la cuál presenta diferentes miembros (principalmente H-, K- y N- Ras), que son los encargados de regular las cascadas de señalización que controlan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular. Estímulos del exterior celular como hormonas, factores de crecimiento o moléculas de adhesión a la matriz extracelular, a través de su actuación sobre GPCRs, RTKs y tirosina kinasas no receptoras (como la familia Src), transducen la señal hacia efectores intracelulares.

Las diversas isoformas de p21Ras presentan gran homología de secuencia a excepción de la región hipervariable (HVR), que contiene el dominio de unión a la membrana: el motivo C-terminal CAAX. Diversas modificaciones post-traduccionales sobre este motivo (como farnesilación, metilación y, en algunos casos, palmitoilación) serán las encargadas de direccionar el precursor citosólico de cada isoforma hacia un microdominio diferente de la membrana. La presencia en distintos microdominios de membrana, tales como las plataformas lipídicas, y la movilidad que algunas isoformas presentan al ser activadas (Rotblat B et al., 2004; Prior IA et al., 2001) (ver *Figura 12*), permite la activación de diferentes efectores, tales como la ser/thr kinasa Raf-1, la PI3K, RalGEFs y NORE/MST1 (revisado en Ehrhardt A et al., 2002).

La molécula Ras, unida establemente a la membrana, cicla entre un estado activo, unido a GTP, y otro inactivo, unido a GDP, proceso regulado tanto por la propia actividad GTPasa de la proteína, como por la asociación de moléculas residentes o bien translocadas desde el citosol. El proceso de activación (de



Hancock JF, 2003

Figura 12. Localización de las isoformas H- y K-Ras. Mientras que K-Ras no se palmitoila en el RE, sí lo hacen las isoformas N- y H-Ras, hecho que determina la asociación de éstas últimas con la membrana de los lipid rafts. Además de su diferente localización en condiciones basales, ha sido descrito, en el caso de H-Ras, como su activación modula esta distribución (Prior IA et al., 2001), dirigiéndolo hacia dominios no ordenados desde los que continuaría la señalización iniciada en los lipid rafts.

RasGDP a RasGTP) requiere el recambio del nucleótido difosfato (unido a Ras en condiciones basales) por la forma trifosfato (más abundante en el citosol), con la colaboración de factores GEF (intercambiadores de nucleótidos de guanina). La activación de los efectores de Ras conlleva el reclutamiento de moléculas GAP (moléculas activadoras de la actividad GTPasa de Ras) con la consiguiente desactivación de la señal (ver *Figura 13*).

Numerosos factores GEF, como las familias RasGRP y RasGRF, han sido recientemente añadidos a los ya conocidos Sos y Sos2 (Campbell SL et al., 1998). Lo mismo ocurre para las proteínas GAP, que actualmente se agrupan en cuatro subfamilias: p120RasGAP, neurofibromina (NF-1), SynGAP y GAP1)(Lockyer PJ et al., 2001).

En el complejo reclutamiento de GAPs y GEFs hacia la membrana participan diferentes mecanismos moleculares (revisado en Cullen PJ and Lockyer PJ, 2002). Por ejemplo, Sos y Sos 2 son reclutados hacia la membrana en forma de complejo con las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc (que reconocen las fosfotirosinas de los receptores activados a través de motivos SH2). En otros casos, el calcio o el diacilglicerol inducen el reclutamiento, si bien la presencia de numerosos motivos de respuesta, como dominios PH (de unión a fosfoinositoles), IQ (de unión a calmodulina), EF-hand, C1 y C2 (de unión calcio dependiente a membranas) entre otros, complican la interpretación. En este aspecto, la anexina A6 ha sido descrito que interacciona con p120 RasGAP pudiendo colaborar en la translocación del factor observada ante incrementos de calcio intracelular (Filvaroff E et al., 1992).

La vía de señalización que activa ERK/MAPK (kinasa regulada por estímulos extracelulares / proteína kinasa activada por mitógenos), una de las principales vías efectoras de la señalización a través de Ras, regula procesos como la proliferación y diferenciación celulares. Esta cascada se activa principalmente a partir de receptores de la membrana plasmática, si bien la presencia de maquinaria de señalización en otros compartimentos como endosomas (Pol A e al., 1998) o Golgi sugiere que la activación acontece asimismo a partir de endomembranas (revisado en Bivona TG and Philips MR, 2003). Las MAPKs

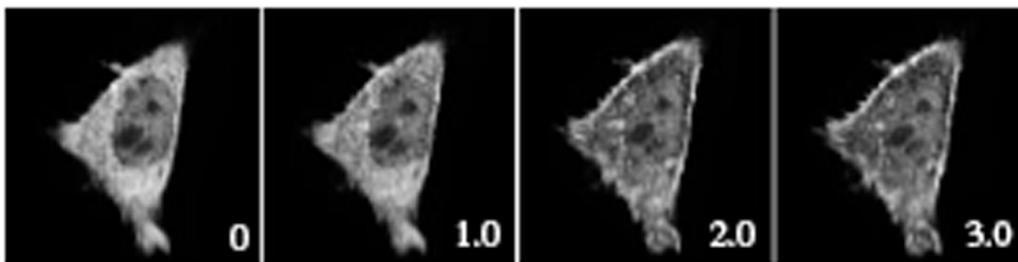
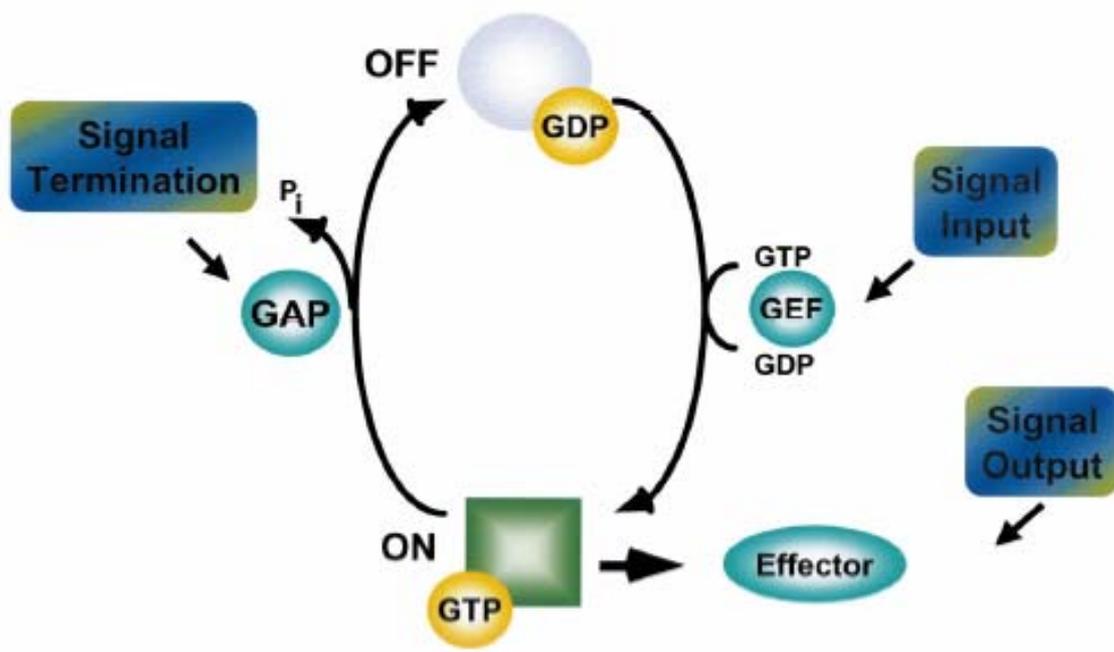


Figura 13. Ciclo de activación-desactivación de Ras. Las diversas isoformas de Ras ciclan entre un estado activo (unido a GTP) y otro inactivo (unido a GDP). En este ciclo de activación-desactivación interviene tanto la propia actividad GTPasa de Ras como moléculas accesorias: GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos) y GAPs (inductores de la actividad GTPasa). Mientras que Ras se encuentra asociado a las membranas, los factores GEFs y GAPs son citosólicos en condiciones basales. No obstante, diversos estímulos son capaces de translocar de forma rápida a estos factores hacia las membranas donde modularan la actividad de Ras. En la figura (abajo) se muestra la rápida translocación (en segundos), en respuesta a un incremento de calcio intracelular, de RASAL, una de las GAPs más recientemente descritas (Walker SA et al., 2004).

se acoplan a la activación de Ras mediante la ser/thr kinasa Raf-1 (o c-Raf), que se transloca hacia la membrana, asistido por proteínas de la familia 14-3-3 (Roy S et al., 1998), en respuesta a la aparición de formas activas de Ras. En concreto, Raf interacciona, a través de su dominio RBD (Ras Binding Domain), específicamente con el Ras-GTP. Sucesivamente Raf fosforila (activa) a las kinasas MEK1 y MEK2, que a su vez harán lo propio con las kinasas MAPK1 y MAPK2, respectivamente. Las MAPKs activas fosforilan a diversos efectores entre los que se encuentran factores de transcripción que incrementan la expresión de proteínas necesarias para la progresión en G₁/S, como la ciclina D1 (Lavoie JN et al, 1996).

La cascada de las MAPKs, además de la presencia extracelular de factores de crecimiento, depende en gran medida de la movilización intracelular del calcio. El ciclo de activación-desactivación de Ras mediado por GEFs y GAPs responde a oscilaciones en los niveles calcio intracelular (Cullen PJ and Lockyer PJ, 2002). Adicionalmente existen diversas interconexiones entre ambas vías de señalización, como la kinasa Pyk2 (la cuál se activa por calcio e induce el reclutamiento de Sos hacia la membrana, activando Ras) (Avraham H et al., 2000); la activación, por parte de RTKs, de diversas fosfolipasas como la PLC γ 1 (cuya acción genera incrementos de calcio intracelulares, ya que induce la aparición de IP₃), o la familia de isoenzimas PKC (ser/thr kinasas, la mayoría de ellas activables por calcio y DAG, capaces de intervenir a varios niveles en la vía de señalización por MAPKs) (Marais R et al., 1998; Schönwasser et al., 1998).

RESUMEN

La anexina A6, así como el resto de las anexinas, redundantes y ubicuas en la mayoría de sistemas, y a través de su capacidad de responder ante parámetros celulares como el calcio o el colesterol, son moléculas candidatas a regular procesos “logísticos” dentro de la célula, como la organización de la membrana plasmática, o procesos de tráfico entre diferentes orgánulos. La interacción de la anexina A6 con moléculas implicadas en transducción de señal a partir de la membrana, como p120^{RasGAP}, Fyn, Pyk2 o PKC α posibilita la afectación

observada de diferentes señalizaciones. El transporte y localización de moléculas es un factor que conlleva implicaciones funcionales *in-vivo* hasta ahora obviadas en aproximaciones *in-vitro*. Si bien la presencia de motivos prototípicos altamente conservados en todas las anexinas sugiere que la mecánica de sus funciones es común, otros factores que acontecen *in-vivo* pueden repercutir en localizaciones y efectos muy diversos.