

DISCUSIÓN

Hasta la fecha, diferentes aproximaciones (incluido el presente trabajo) han demostrado que la unión de las anexinas a la membrana depende de factores diversos. Algunos postulan un modelo trifactorial (Junker M and Creutz CE, 1994) en el cuál el componente lipídico (fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos *cis*-insaturados), el componente proteico (otras moléculas de anexina, proteína kinasas, proteínas receptoras,...) y el calcio modulan conjuntamente la unión de la anexina a la membrana. En este modelo, la concentración de cualquiera de estos tres componentes requerida para obtener una determinada unión de la anexina a la membrana, es inversamente proporcional a la concentración de los otros dos factores. Recientemente (Golczak M et al, 2001a,b) se ha incluido, entre estos factores, el pH, que es asimismo capaz de inducir la interacción de la anexinas con la bicapa lipídica.

En la célula viva este modelo es difícilmente objetivable, e igualmente complicado resulta reproducirlo *in-vitro*. Así, se puede dar un incremento local de calcio en una región adyacente a un canal, sin alterarse significativamente la concentración citosólica del catión. Del mismo modo, se pueden obtener altas concentraciones de un determinado fosfolípido o de colesterol en microdominios concretos de membrana, sin encontrarse en alta concentración en el conjunto de la bicapa. La organización de proteínas en las membranas artificiales, asimismo, no se corresponde con la que presentan las membranas celulares.

Discusión Parte I

La unión independiente de calcio de varias anexinas a membranas con alto contenido en colesterol, había sido demostrada en sistemas *in-vitro* (Ayala-Sanmartín J, 2001). En el caso de otras anexinas como la A2 (Zobiack N et al., 2002; Harder T et al., 1997), dicha unión había sido además demostrada *in-vivo*. No obstante, no existían evidencias directas de esta asociación *in-vivo* en el caso de la anexina A6. Los antecedentes al presente trabajo realizados por nuestro grupo de investigación indicaban que la anexina A6 se redistribuía intracelularmente en paralelo a la internalización de LDL (uno de cuyos componentes mayoritarios es el colesterol). Así, el fraccionamiento subcelular

en gradiente de sacarosa mostraba que el transporte de la lipoproteína a través del compartimento endosomal inducía un incremento de la asociación de anexina A6 a membranas de éste (Grewal T et al., 2000), desde donde incrementaba la degradación del ligando. En este proceso se requiere la presencia del núcleo C-terminal de la anexina intacto, como se demostró al microinyectar en células NRK dominantes negativos de la anexina A6 (Anx6₁₋₁₇₅), que carecen de la región correspondiente a las seis últimas repeticiones (Pons M et al., 2001). Asimismo se localizó inequívocamente a la anexina en el compartimento endosomal de hepatocitos diferenciados (Ortega D et al., 1998), y en pre-lisomas de células polarizadas WIF-B, células NRK y CHO (Pons M et al., 2000, 2001a). No obstante, la participación exacta del colesterol o el calcio intracelular en esta redistribución quedaban por demostrar.

En el presente trabajo describimos por primera vez la asociación *in-vivo* de la anexina A6 a membranas de forma exclusivamente dependiente del incremento de colesterol. El uso de técnicas de fraccionamiento celular permitió confirmar que esta asociación no sólo tenía lugar en extractos totales de membrana sino que asimismo ocurría en las membranas del compartimento endocítico. Dos aproximaciones distintas consistentes bien en la extracción de colesterol de las membranas (con digitonina) o en la acumulación específica del lípido en las invaginaciones del compartimento endocítico tardío (con la droga U18666A) demuestran la existencia de dicha unión. Así, en diferentes sistemas, una parte significativa del total de la anexina A6 sobreexpresada (CHO-AnxA6) o endógena (CHO, NRK), se asocia a membranas de forma dependiente de colesterol e independiente del calcio, sin observarse efecto sinérgico alguno entre ambos componentes (al contrario de lo que ocurre en el caso de la anexina A2).

La acumulación de colesterol inducida por el agente U18666A se debe a la interferencia de esta amina hidrofóbica (probablemente interaccionando con el fosfolípido LBPA) en el transporte de colesterol libre desde los endosomas tardíos a los lisomas, lo cual afecta al tráfico y *sorting* de algunos componentes, como IGF2/MPR, sin afectar a otros, como TGN38 (Kobayashi T

et al., 1999). La incubación *in-vitro* de membranas aisladas (a partir de células CHO salvajes, pretratadas o no con U18666A), con GST-anexina A6 añadida exógenamente y detectada con anticuerpos (*sheep* anti-anexina A6) que no reconocen la forma endógena, demuestra que es la propia presencia de colesterol en la membrana, y no su interferencia en el tráfico, la que incrementa la afinidad de la anexina A6.

Cada vez más estudios demuestran que, otros factores a parte del calcio, como el pH, pueden inducir la unión de la anexina A6 en la membrana del compartimento endocítico tardío, el lumen del cuál, por ejemplo, se acidifica lo necesario (entre 5 y 6) para que este proceso tenga lugar (Golczak M et al., 2001a,b). La presencia de moléculas transmembrana que actúen como sensores de pH comunicando la acidificación del lumen endosomal al citoplasma y activando así procesos de fusión a nivel citosólico ha sido demostrada (Gu F and Gruenberg J, 2000), y la anexina podría formar parte de esta mecánica. De igual forma, el colesterol o moléculas de unión a éste en las membranas de los endosomas tardíos pueden ser un factor modulador de la asociación de anexina en este compartimento, al igual de lo que se postula para la anexina A2.

Mayran y colaboradores (Mayran N et al., 2003), en una reciente aproximación, similar a la publicada en el presente trabajo, y ayudándose de la tecnología del *RNA interference* (siRNA) así como de ensayos de fusión de endosomas (Gruenberg J et al., 1989), demuestran que la redistribución dependiente de colesterol de la anexina A2 hacia el compartimento endocítico constituye un mecanismo de regulación la biogénesis de intermediarios del tráfico interendosomal. Las anexinas serían capaces de colaborar con el componente lipídico para modular la segregación de moléculas en microdominios específicos dentro los endosomas tardíos, determinando el destino final de la molécula o su papel dentro del compartimento.

Las mecanismos que explican esta unión de la anexina A6 a membranas enriquecidas en colesterol no son *apriori* fácilmente explicables, teniendo en

cuenta que la característica bioquímica que define a la familia es su capacidad de unirse a los fosfolípidos acídicos de las membranas, típicamente ausentes en dominios ricos en colesterol, y de forma calcio dependiente a través de las “repeticiones anexina” de su secuencia. Además, hasta la fecha no ha sido descrito ningún dominio de unión al colesterol en la secuencia de las anexinas. Una posibilidad es la existencia de moléculas “receptoras” para la anexina, asociadas a membranas ricas en colesterol. Otra posibilidad es que la presencia de colesterol en la membrana genere, a través de mecanismos de exclusión o inclusión de fosfolípidos, dominios adyacentes ricos en fosfatidilserina, por ejemplo, los cuáles son diana preferente de las anexinas.

Recientemente (te Vruchte D et al., 2004) ha sido reproducida, en células defectivas para la proteína NPC1 (alterada en el síndrome de Niemann-Pick) o bien tratadas con la droga U18666A, la redistribución de anexina A2 y A6. Los autores demuestran que es la acumulación de glicosfingolípidos en el compartimento endosomal, que acontece en paralelo a la de colesterol, la que podría explicar las alteraciones en la distribución de las anexinas A2 y A6 así como el incorrecto tráfico intracelular.

La funcionalidad de la anexina A6 en el compartimento endocítico tardío, al igual que ocurre con la anexina A2, se ha atribuido a la mediación en procesos de fusión de vesículas. Anderson y colaboradores describieron dos tipos diferentes de vesículas de clatrina, unas dependientes anexina A6 y de la acción de la calpaína, y otras que no requieren dichas moléculas para su formación (Kamal A et al., 1998). Si bien, a nivel de la membrana plasmática, ligandos como las lipoproteínas LDL eran internalizados mediante ambos tipos de vesículas, los ligandos incorporados en vesículas del segundo tipo no alcanzaban el compartimento lisosomal. Nuestro grupo de investigación explicó estos resultados (Pons M et al., 2001a) demostrando que la proteólisis del citoesqueleto de espectrina mediada por la calpaína, y modulada por la anexina, podía acontecer asimismo en las membranas del compartimento endocítico tardío, induciendo la escisión/fusión de vesículas necesaria para la degradación del ligando. No obstante, al contrario de lo que ocurre en la

membrana plasmática, no se observa ningún mecanismo alternativo a éste, de tal forma que la expresión de dominantes negativos de la anexina A6 (Anx6₁₋₁₇₅) inhiben por completo el transporte a través de este compartimento. La existencia de células carentes de anexina A6 en las cuáles el tráfico hacia los lisosomas acontece con normalidad, como las células A431 (Lin HC et al., 1992), indicaría que otras anexinas redundantes podrían asimismo participar en el proceso.

Discusión Parte II

Los antecedentes al presente trabajo describieron cómo la anexina A6 afectaba a la vía de señalización de las MAPKs mediante el uso de técnicas como los ensayos de actividad para Ras y Raf, lo cuál permitió la caracterización de la vía señalizadora en el sistema de células CHO (Pons M et al., 2001b). Los ligandos activadores utilizados en estos ensayos, como el EGF o los ésteres de forbol, actúan a través de moléculas “diana” (el receptor de EGF y el enzima PKC, respectivamente) presentes en las caveolas (Pol A et al, 1998; Smart EJ et al., 1999); de hecho, la formación y estabilización de complejos relacionados con transducción del señal se postula como una de las funciones principales de este subtipo de *lipid raft*. La caveolina, molécula que diferencia a las caveolas del resto de *lipid rafts*, ha sido asociada a un complejo citoplasmático junto con el colesterol y la anexina A2 (Uittenbogaard A et al, 2002), y cuya funcionalidad se asocia al transporte citosólico del lípido. Finalmente, diversas evidencias habían sugerido al colesterol como un factor importante en la distribución *in vivo* de anexina A6 (Grewal T et al., 2000).

Nuestro grupo de investigación había estudiado asimismo la respuesta celular a las lipoproteínas LDL, y en esta ocasión se propuso abordar la función de las HDL las cuáles se unen a receptores presentes en las caveolas, y asimismo colaboran en el transporte del colesterol celular. Al contrario que las LDL, las HDL no son internalizadas al unirse a sus receptores celulares, y participan, a través de mecanismos poco conocidos, en la captación selectiva de ésteres de colesterol. En el organismo vivo, las HDL son las encargadas de mediar el

denominado *transporte reverso de colesterol*, a través del cuál los tejidos periféricos retornan el colesterol libre sobrante hacia la sangre que lo transporta hasta el hígado (órgano encargado de su metabolismo y excreción) o bien a los tejidos esteroideogénicos (que lo utilizan como precursor para la biosíntesis de hormonas). El receptor SR-BI es el responsable de este intercambio de colesterol, proceso finamente regulado por la célula, si bien hasta la fecha ninguna evidencia directa implicaba a dicho receptor en procesos de señalización.

Recientemente se ha atribuido a dichas lipoproteínas, además, un papel mitogénico, en diversos estudios que demostraban la capacidad de éstas de mediar la activación de enzimas como la PKC α y las MAPKs (revisado en Nofer J-R et al., 2002). Existen múltiples receptores celulares para los diferentes componentes de éstas lipoproteínas, que podrían explicar los efectos proliferativos de las HDL. Por ejemplo, los lisosfingolípidos son potentes mitógenos que se unen a la familia de receptores endoteliales EDG y que son capaces de activar a Raf-1 e incrementar el calcio intracelular. Por otro lado, la unión de proteínas de la cubierta de las HDL, como ApoA1 y AII, activa a fosfolipasas a través de receptores desconocidos. La existencia de estos y otros receptores complicaba la interpretación de los resultados. No obstante, en esta señalización proliferativa, tan sólo había sido posible determinar la intervención de c-Raf (o Raf-1) sin evidencia alguna de la activación de Ras (Nofer J-R et al., 2001). Del mismo modo, existía controversia acerca de la contribución exacta del enzima PKC α en esta señalización, el cuál parecía necesario en unos sistemas pero no en otros (Deeg MA et al., 1997).

Los resultados obtenidos demuestran que, en nuestro sistema de células CHO, las HDL son también capaces de activar a las MAPKs. Además, describimos como esta activación se asemeja a la realizada por los factores de crecimiento a través de su unión a receptores tirosina kinasa (RTKs). Así, las HDL inducen la aparición de formas activas de la GTPasa Ras, desencadenando así la rápida y secuencial fosforilación de la ser/thr Kinasa Raf, MEK y ERK. La hipótesis que el receptor implicado podría ser SR-BI, residente en las caveolas

y cuya importancia fisiológica en el metabolismo de las HDL ha sido ampliamente demostrada (Kozarsky KF et al., 1997; Rigotti A et al., 1997), se confirmó al inhibir el binding de la partícula con anticuerpos capaces de bloquear la unión del receptor a la partícula de HDL.

Los receptores de la familia EDG (endothelial differentiation gene) ha sido descrito que son capaces de activar a las MAPKs en respuesta a la unión de HDL, en células endoteliales. Así, la unión de esfingosina 1-fosfato (SPP) a receptores EDG-3 activa la señalización de Rho, mientras que los receptores EDG-1 activan las vías de Ras/MAPK y Rac. Adicionalmente, a través de receptores EDG, la SPP activa a la PI3-K de forma dependiente de proteínas G_i (Morales-Ruiz M et al., 2001). El hecho de que el receptor EDG-1 pudiese ser responsable de la activación de Ras en nuestro sistema de células CHO, de origen epitelial, se descartó al confirmar que dicho sistema celular presenta niveles negligibles de proteína y de mRNA del receptor (Manuel Morales-Ruiz, comunicación personal).

El estudio intentó además aclarar la contribución exacta de la PKC, descartando claramente su colaboración en esta señalización. La down-regulación específica del enzima (isoformas convencionales y novel) por el tratamiento prolongado con ésteres de forbol, altamente efectiva en las células CHO, demostró que aún en ausencia total de éste tenía lugar la activación de las MAPKs con normalidad. Si bien otros habían descrito, tanto la implicación de la PKC_α en la señalización a partir de las HDL, como la presencia de picos de calcio intracelular y la activación de fosfolipasas en la génesis de dicho proceso (Nofer J-R et al., 2002), los ensayos preliminares realizados descartaron la existencia generalizada de oscilaciones del catión en las mismas condiciones en que se activaba a Ras y las MAPKs. En este sentido, había sido descrita la ausencia de incrementos de calcio intracelulares en respuesta a HDL en ese mismo sistema celular (Li X-A et al., 2002). Esta observación, en cualquier caso, no permite aislar ambos fenómenos, ya que menores y más localizados incrementos de calcio, por debajo del umbral de sensibilidad del método, podrían tener lugar (ver más adelante). Del mismo modo, el análisis

por western blot de uno de los sustratos fosforilados por la PKC α , P-MARCKs, confirmaba que el enzima, sin ser necesario para la activación de las MAPKs, si se activaba con la unión de la lipoproteína al receptor.

En resumen, el estudio describe una nueva vía de señalización a partir de las HDL, inducida por la interacción con uno de sus receptores de mayor afinidad e importancia fisiológica, independiente del resto de activaciones y que se asemeja a la ejercida por los factores de crecimiento en la inducción de la proliferación. En este aspecto de la fisiología de las lipoproteínas, hasta ahora no reconocido, las caveolas y el colesterol de la membrana plasmática ejercen un papel fundamental.

Discusión Parte III

Varias moléculas que residen en los *lipid rafts*, e involucradas en procesos de transducción de señal, interaccionan con la anexina A6. Así, ha sido descrita la interacción directa de la Src kinasa Fyn con la región linker de la anexina A6 (Chow A et al., 2000), e indirecta con la kinasa Pyk2, formando un complejo en el que además se incluye p120 RasGAP, la cuál interacciona a través de su dominio C2 de unión a calcio. En los *lipid rafts* de células neuronales, la anexina A6 interacciona de forma calcio dependiente con el enzima PKC α , cuya secuencia posee idéntico dominio C2 de respuesta a calcio. Recíprocamente, la asociación de la anexina A6 con los *lipid rafts*, de forma calcio-dependiente, asimismo ha sido demostrada en varios sistemas en los cuáles el metabolismo del calcio es sumamente importante, como las células neuronales (Schmitz-Peiffer C et al., 1998), acinares (Thomas DD et al., 2002) o musculares (Babiychuk and Draeger, 2000).

Los antecedentes publicados por nuestro grupo de investigación (Pons M et al., 2001b) demostraban que la sobreexpresión de anexina A6 era capaz de modular la señalización proliferativa de las MAPKs. Así, la activación de Ras en respuesta a factores de crecimiento (EGF) o ésteres de forbol (TPA) se reducía si en las células se sobreexpresaba la anexina. Más claramente, la actividad de

la ser-thr kinasa Raf, la molécula efectora de Ras en esa vía de señalización, se encontraba totalmente inhibida por la anexina A6. Sorprendentemente, las moléculas que señalizan a partir de cRaf, como MEK y ERK, se activaban con normalidad.

En el presente trabajo confirmamos similares resultados utilizando dos nuevos estímulos mitogénicos, el de las HDL (a través de su receptor SR-BI) y el del PDGF. En ambos casos, la sobreexpresión de anexina A6 inhibe la activación de Ras al igual que acontecía con el EGF o los ésteres de forbol. El estudio detallado de la señalización a partir de las HDL reveló que la sobreexpresión asimismo afectaba, de igual forma, al resto de moléculas de la vía, sin afectar en último término a MEK o MAPK.

Ha sido descrito que la señalización proliferativa a partir de las HDL depende, al menos parcialmente, del enzima PKC α (Deeg MA et al., 1997). No obstante, existían algunas evidencias indicando que esta contribución no era la responsable única de dicha señal mitogénica (Nofer J-R et al., 2001). Para intentar determinar esta implicación introdujimos el estudio de la PKC α en nuestro sistema, e inducimos la depleción del enzima a través del tratamiento prolongado con ésteres de forbol. Sorprendentemente, descubrimos como, mientras que en las células CHO salvajes la activación de Ras inducida por HDL era, casi en su totalidad, independiente de la PKC (ver *Resultados*), al sobreexpresar la anexina A6, esta activación pasaba a depender totalmente de la kinasa. Éste resultado, nos indujo a pensar que la activación disminuida de Ras existente, en células que sobreexpresan la anexina A6, y la PKC-dependencia de esta activación podían estar relacionadas. La menor activación de este Ras era además incapaz de activar, aunque fuese mínimamente, al efector Raf.

Las diversas isoformas de Ras, si bien *in-vitro* interaccionan con un grupo de moléculas comunes, como los diferentes Ras-GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) y los Ras-GAPs (factores activadores de la función GTPasa), *in-vivo* ha sido descrito que activan de forma preferente

señalizaciones diversas (revisado en Hancock JF, 2003). Así, mientras que H-Ras activa preferentemente la vía de la PI3K, K-Ras activa con mucha mayor eficacia a c-Raf (Yan J et al., 1998). Además, la localización específica de estas moléculas es modulable ante su estado de actividad; mientras que H-Ras, para ser activado, requiere estar presente en los rafts lipídicos, una vez activo migra hacia el exterior de estos microdominios ubicándose en regiones menos ordenadas de la membrana plasmática (Prior IA et al., 2001; Rotblat B et al., 2004 a). La importancia de esta microlocalización es plenamente extrapolable a otras moléculas relacionadas como los factores GEFs y GAPs, moléculas que *in-vitro* no diferencian entre las diferentes isoformas de Ras (Hancock JF, 2003). Ello hace suponer que, *in-vivo*, su microlocalización es utilizada por la célula como un mecanismo de control (activador -GEFs- o desactivador -GAPs-) de las diversas isoformas de Ras y sus moléculas efectoras (Hancock JF, 2003).

La activación preferencial de Raf-1 por parte de K-Ras sugiere que una desactivación selectiva de esta isoforma, aún existiendo formas activas de H- o N- Ras, podría explicar la inhibición total de Raf observada en células CHO-AnxA6. No obstante, este sugerente modelo fue desmentido al bloquear completamente, en células pretratadas con ciclodextrina, la señalización mitogénica a partir de HDL. Este hecho demuestra que es H-Ras, y no K-Ras, la isoforma activada por las HDL. La menor activación de Ras por HDL, en células CHO-AnxA6, asimismo es sensible al pretratamiento con ciclodextrina, indicando que en ambos sistemas H-Ras es la isoforma implicada. H-Ras, de hecho, es la isoforma más abundante en las caveolas (Prior IA et al., 2001), donde también se localiza el receptor SR-BI (Babitt J et al., 1997).

En este contexto, la nula actividad Raf-1, en células que sobreexpresan anexina A6 queda por esclarecer. Una posibilidad es que la desactivación de H-Ras ocurra precisamente en microdominios de reclutamiento y activación de c-Raf. Otra posibilidad es que la anexina, a través de su interacción con c-Raf (Pons M et al., 2001b), pueda directamente inhibir la asociación a Ras, requerida para su activación.

La sobreexpresión de anexina A6, si bien reduce, no inhibe por completo la señalización. Por el contrario, la activación de H-Ras disminuye parcialmente, y en igual proporción a lo que lo hacía la activación de otras isoformas de Ras (activadas por PDGF, EGF o TPA). Recíprocamente, el pretratamiento con ciclodextrina bloquea por igual la activación de H-Ras en presencia o ausencia de anexina A6. La sobreexpresión de anexina, por lo tanto, no induce cambios en la contribución relativa de cada isoforma. De modo similar, los niveles de expresión de H-, K- o N-Ras, analizados por western blot, tampoco resultan alterados por dicha sobreexpresión. Consecuentemente, tanto la inhibición parcial de Ras como el incremento de la PKC-dependencia no se debe a la desactivación específica de una isoforma, sino que obedece a un mecanismo más general, e incluso a alteraciones en la propia estructura de las caveolas (Parkin ET, 1996) u otros dominios de la membrana plasmática o endosomal.

Si bien en este modelo la anexina no diferenciaría entre isoformas a la hora de modular su señalización, si que podría desactivar “regionalmente” al Ras presente en la membrana, muy posiblemente a través de la co-translocación de p120GAP hacia dominios concretos. En este sentido, al analizar la asociación calcio-dependiente de p120GAP a membranas de células CHO, observamos como la sobreexpresión de anexina A6 incrementa significativamente esta unión. La mayor asociación también en ausencia de calcio indica que, incluso en condiciones basales, la anexina podría actuar de molécula de anclaje para p120GAP.

La anexina A6 interacciona *in-vitro* de forma directa con p120 RasGAP; en concreto en dicha interacción participan la región C2 (de respuesta a calcio) del GAP (Davis AJ et al., 1996) y el dominio *linker* de la anexina A6 (Pons M et al., 2001b). Esta región flexible es capaz de experimentar significativos cambios conformacionales en respuesta a la unión calcio-dependiente a la membrana plasmática, ya que los dos núcleos cambian su disposición relativa (Avila-Sakar AJ et al., 2000). El resultado de estos cambios es la exposición de la región *linker* la cuál podría interaccionar con RasGAP o bien ser fosforilada, ya que presenta diversos residuos fosforilables (uno de ellos por la PKC α). La

importancia de esta región y su colaboración en la unión tanto de RasGAP como de PKC α (Schmitz-Pfeiffer C et al., 1998) podría explicar las diferencias de señalización observadas al sobreexpresar la anexina A6. Por ejemplo, la unión de RasGAP y PKC α , a través de sendos dominios C2, a la región *linker* de la anexina, podría ser exclusiva. En este aspecto posteriores estudios *in-vivo* de análisis FRET permitirán dilucidar dichas cuestiones.

Nuestros resultados en el análisis del calcio intracelular (no mostrados) son controvertidos. Los análisis preliminares de activación con HDL revelaron incrementos de calcio poco significativos, y ya presentes en estado basal, por lo que en el presente trabajo decidimos no incluirlos. No obstante, recientemente resultados obtenidos por el Dr Grewal (NSW University, Sydney), utilizando métodos más sofisticados de análisis, parecen indicar que efectivamente existirían incrementos generalizados de calcio en respuesta a las HDL. Posteriores estudios deberán confirmar esta existencia. En cualquier caso, creemos que la sensibilidad de nuestro método anterior podría haber obviado incrementos moderados de calcio. Incluso, oscilaciones localizadas del calcio en regiones adyacentes a la membrana podrían no ser detectadas con las técnicas convencionales. Finalmente, como ya hemos comentado, la existencia de mayores cantidades de GAP asociado a la membrana de células CHO-AnxA6 en condiciones basales, podría explicar la inhibición de Ras aún en ausencia de incrementos de calcio.

La inhibición de Ras no es capaz de bloquear la activación de MEK y MAPKs, y ha sido descrito en diferentes sistemas cómo diferentes isoformas de la PKC activan a varios niveles esta cascada (Schönwasser DC et al., 1998; Ueda Y et al., 1996; Kolch W et al., 1993). La activación de la PKC α en condiciones de inhibición parcial de Ras podría ser la encargada de mantener los niveles de activación de MEK y MAPK en células que sobreexpresan anexina A6, aún en ausencia de actividad Raf, constituyendo un mecanismo alternativo de *bypass* en estas células. Así, esta hipótesis explicaría asimismo la contradicción aparente entre la menor activación de Ras y Raf y la similar actividad de MEK y MAPKs. En este sentido, la presencia de menores niveles del enzima PKC α en células que sobreexpresan anexina A6, podría explicarse a través de una

mayor eficacia en la activación del enzima, de tal forma que la célula requeriría menores cantidades para conseguir un grado de activación similar.

Theobald & Moss describen como la sobreexpresión de anexina A6, en células humanas transformadas (A431), inhibía la proliferación a través del secuestro de las células en la fase G1 del ciclo celular (Theobald J et al., 1994) y suprimía el fenotipo tumoral (Theobald J et al., 1995). En otro trabajo, realizado en ese mismo tipo celular, se ha observado que la anexina interfiere en el incremento de calcio intracelular en respuesta a factores de crecimiento (Fleet A et al., 1999). Experimentos realizados en el presente trabajo (ver *Anexo I*) demuestran que la anexina A6 es asimismo capaz de reducir la tasa proliferativa al ser sobreexpresada en células CHO, e inducir un secuestro de parte de la población en fase G1. El hecho que las células que sobreexpresan anexina A6, a pesar de tener niveles similares de actividad MEK y MAPK, proliferan más lentamente, sugiere la existencia de mecanismos adicionales en células CHO salvajes, posiblemente activados colateralmente por Ras, PKC o el calcio intracelular, que colaborarían incrementando la tasa proliferativa final.

Discusión Parte IV

Los datos mostrados en el presente trabajo contribuyen a demostrar la complejidad de las interacciones de las anexinas con la membrana. A la ampliamente descrita, prototípica interacción calcio-dependiente con los fosfolípidos acídicos, añadimos la modulación calcio-independiente que el colesterol ejerce *in-vivo* sobre la unión a membranas del compartimento endocítico. Ambos tipos de unión, lejos de ser excluyentes, podrían interactuar en la determinación exacta de la microlocalización de la anexina, en membranas de diferentes compartimentos.

En este bloque de resultados mostramos claramente la translocación de la anexina de forma calcio dependiente hacia la membrana plasmática. Este hecho, descrito anteriormente mediante técnicas de aislamiento bioquímico (Babiychuk EB and Draeger A, 2000) e inmunofluorescencia (Barwise JL and

Walker JH, 1996), es ahora abordado *in-vivo* desde el uso de la videomicroscopía, lo cuál nos permitió determinar aspectos como la microlocalización (en el espacio y en el tiempo) que actualmente son considerados de elevada importancia funcional. Así, después de una inicial translocación generalizada hacia la membrana plasmática, acontece una reestructuración dentro del compartimento concentrándose la anexina en microdominios puntuales. La bioquímica así como la colocalización con marcadores de gangliósidos permitió caracterizar estos microdominios como *lipid rafts*. Ambos procesos, translocación y redistribución, presentan cinéticas algo distintas y postulamos que se rigen por mecanismos distintos. La translocación inicial es muy rápida (10-30 segundos), sincrónica con el incremento de calcio intracelular y alcanza dianas generalizadas de la membrana, como correspondería a la interacción electrostática con los fosfolípidos acídicos. La redistribución hacia microdominios puntuales es bastante más lenta (2-5 minutos), en un proceso de tipo *clusterización* que se circunscribe a la membrana, y que finalmente acaba en dominios ricos en colesterol. Postulamos que en este segundo proceso, inhibido con el pretratamiento con ciclodextrina, acontece una coalescencia de los *lipid rafts* en la cuál participaría la anexina A6. El colesterol y el citoesqueleto deberían ser importantes en este proceso. En este contexto, el calcio sería un factor movilizador rápido y masivo, mientras que la presencia de colesterol, concentrado en determinados microdominios de la membrana, determinaría la distribución final. Este nuevo concepto asimismo ha sido apuntado por otros (Rescher U and Gerke V, 2004). Los glicosfingolípidos, asociados a dominios enriquecidos en colesterol, podrían ser tan importantes como éste en el reclutamiento de las anexinas (te Vrucchte D et al., 2004).

La presencia de componentes de membrana de *lipid rafts* parecen favorecer la interacción con F-actina de varias anexinas (revisado en Hayes MJ et al., 2004). Además, algunas anexinas como la A2 son fosforiladas, posiblemente en estos microdominios, por kinasas de la familia Src, proceso que modula a su vez la asociación con el citoesqueleto (Hubaishy I et al., 1995). Del mismo modo, ha sido descrita la fosforilación de la anexina A6 en los *lipid rafts*

(Sprenger RR et al., 2004). Procesos similares a éstos podrían servir para estabilizar la anexina A6 en los microdominios descritos.

Además postulamos que estas translocaciones masivas de anexina no sólo comprenderían a la molécula aislada, sino que asimismo arrastraría en su viaje a complejos citosólicos con moléculas de transducción de señal, que una vez en la membrana serían circunscritos a microdominios específicos. En este sentido, la interacción de la anexina con moléculas tales como RasGAP o PKC α ha sido descrita en aproximaciones *in-vitro*. Parece plausible que éstas moléculas puedan ser conducidas por la anexina hacia microdominios que determinarían la naturaleza de su diana, actuando así como un mecanismo de especificidad adicional.

Recientemente, y de forma paralela a la finalización del presente trabajo, hemos conseguido reproducir la translocación de p120GAP a la membrana de forma dependiente de calcio en células COS, que es enormemente similar a la observada para la anexina A6 (resultados no mostrados). Del mismo modo, imágenes coincidentes han sido mostradas anteriormente para p120GAP así como para otras GAPs (Walker SA et al., 2004, 2003), en respuesta a incrementos de calcio, e incluso para H-Ras en respuesta a la activación (Walker SA and Lockyer PJ, 2004; Bivona TG and Philips MR, 2003). En conjunto, creemos que H- Ras, anexina A6 y p120GAP codistribuyen con colesterol y parcialmente con actina en estos microdominios de rápida formación en respuesta a calcio.

Esta redistribución de la anexina A6 hacia los *lipid rafts* no sería tan sólo responsable de la modulación de procesos de transducción de señal. Draeger y colaboradores postulan que la translocación calcio-dependiente de las anexinas hacia la membrana de células musculares acoplaría de forma organizada estos microdominios con el citoesqueleto necesario para la contracción (Babiychuk EB et al., 1999). En este mismo sentido, la translocación calcio-dependiente de la anexina A6 hacia los *lipid rafts* de células acinares y su interacción en estos microdominios con moléculas

involucradas en la secreción de gránulos de zimógeno, como CHRSP28, demuestran que, dependiendo del sistema, esta translocación participaría en otros procesos celulares.

La posibilidad de que algunas de estas estructuras doblemente marcadas sean contactos focales debe ser asimismo considerada. Varias anexinas son capaces de unirse de forma calcio-dependiente a filamentos de F-actina y espectrina *in-vitro* y de reorganizarse *in-vivo* en respuesta a componentes del citoesqueleto (revisado en Hayes MJ et al., 2004). En nuestro sistema, la anexina A6 disminuye la adhesión de las células al ser sobreexpresada en células CHO (ver *Anexo I*), y su translocación a la membrana podría estar relacionada con la pérdida de adhesión secundaria a los incrementos de calcio generados. Diversas evidencias apuntan a la intervención de la anexina A6 en procesos relacionados con la adhesión celular, como son la interacción directa entre la anexina A6 y la tirosina kinasa Fyn, la cuál se asocia a integrinas activadas y está involucrada en la correcta progresión en G1 (Oktay M et al., 1999), o la posible actuación como receptor de proteoglicanos (Takagi H et al., 2002).

Claramente, las estructuras observadas podrían servir de punto de encuentro entre dominios ricos en colesterol, glicosfingolípidos, citoesqueleto cortical y moléculas de transducción de señal como RasGAP o PKC, con la anexina A6 como elemento articulador de este conjunto de interacciones. La presencia de sitios de unión, en el núcleo C-terminal de la molécula de anexina, para componentes de membrana y citoesqueleto (Filipenko NR and Waisman DM, 2001; Jones PG et al., 1992), y en la región *linker*, para proteínas de transducción de señal como RasGAP o *Fyn* (Chow A et al., 2000), además de la descrita asociación dependiente de colesterol a las membranas, apoyarían esta hipótesis.

MODELOS PROPUESTOS:

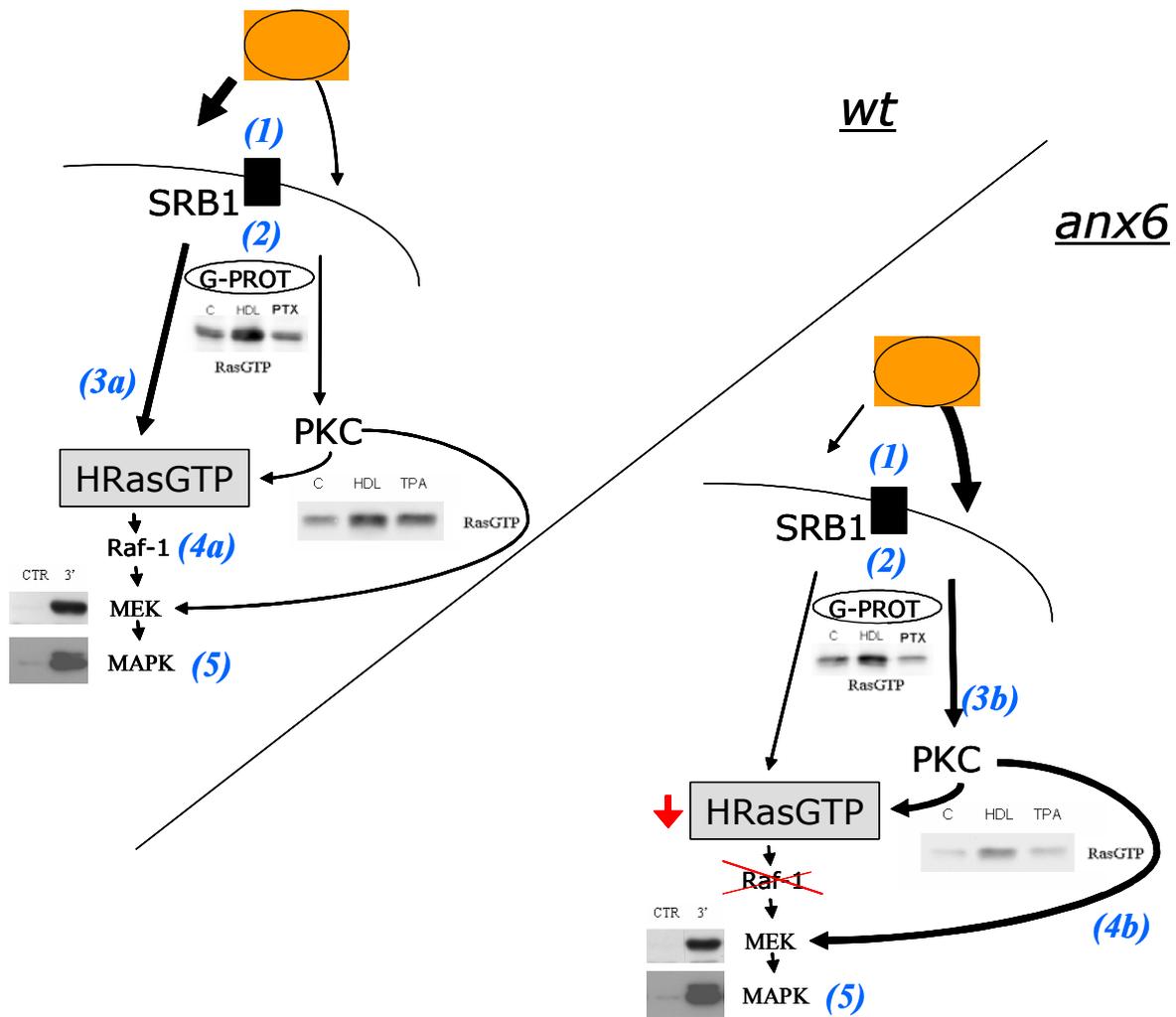
Diversos escenarios, no necesariamente excluyentes, podrían explicar la implicación de la anexina en la señalización a través de Ras y MAPKs. Sucesivos estudios, que comprenden tanto al análisis ultrestructural (microscopía electrónica y confocal con el uso de marcadores más precisos), la videomicroscopía y el análisis FRET, la tecnología del RNA antisentido para inhibir la expresión de una o, preferiblemente, varias anexinas, o aproximaciones bioquímicas a las interacciones proteína-proteína con Raf-1 o PKC α , permitirán esclarecer las hipótesis aquí presentadas.

En el primer escenario, la anexina A6 modularía directamente el metabolismo del calcio que secundariamente repercutiría en estas enzimas o incluso en las diferencias de adhesión y proliferación observadas. Ante determinadas condiciones las anexinas son capaces de actuar como canales de calcio al insertarse en la membrana plasmática. Además, algunos canales de este catión son modulados por la anexina A6 (Hazarika P et al., 1991; Diaz-Muñoz M et al., 1990). Por otro lado, la presencia de varios lugares de unión a calcio en la molécula de anexina, y su elevada expresión en los tejidos (en algunos de ellos alcanzando el 0,5 % del total de la proteína celular), podría permitirle actuar como un auténtico quelante del catión a nivel intracelular.

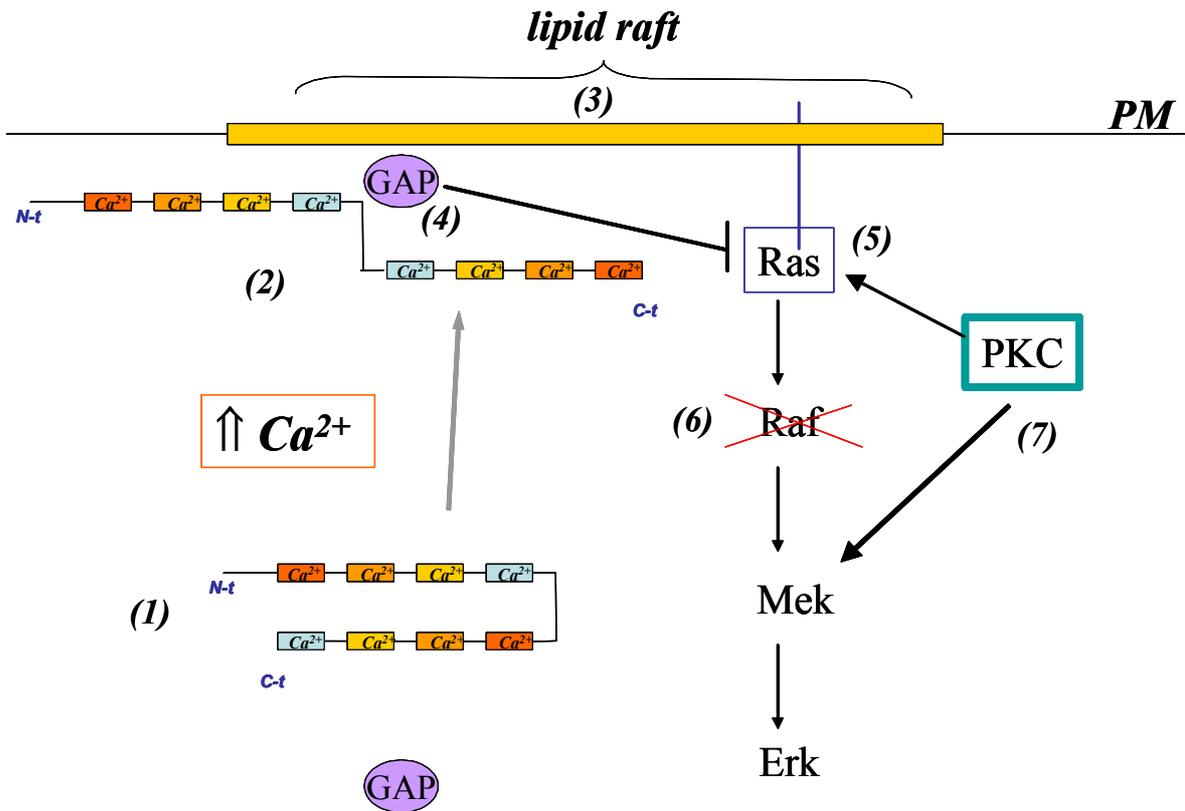
En la segunda de las hipótesis, la anexina A6, a través de interacciones proteína-proteína con estas moléculas (ya descritas en ambos casos), y la posterior formación de complejos multiproteicos, modularía su actividad o bien colaboraría en la translocación calcio-dependiente hacia la membrana plasmática. En este sentido, la anexina A6 experimenta interesantes cambios conformacionales en respuesta a la interacción calcio-dependiente con la membrana plasmática (Avila-Sakar AJ et al., 2000), exponiendo la región linker lo cuál puede dar lugar a nuevas interacciones y/o a la exposición de residuos fosforilables (al menos uno de ellos por la PKC α).

En el tercer escenario, la anexina A6 contribuiría, a través de interacciones con el componente lipídico, como fosfatidilserina, o colesterol, a la creación de microdominios por los cuáles estas enzimas tienen mayor afinidad. Así, ha sido descrita como la presencia de fosfatidilserina en la membrana incrementa la actividad del enzima PKC α (revisado en Yang L and Glaser M, 1996), y experimentos realizados por el grupo del Dr Grewal demuestran como las células CHO que sobreexpresan anexina A6 presentan mayores niveles de fosfatidilserina en la membrana plasmática. Alternativamente, ha sido postulada la actuación de diversas anexinas, principalmente la A2, como organizador de los microdominios *lipid rafts* en respuesta a calcio (Babiychuk EB and Draeger A, 2000), y recientemente se ha descrito como su interacción con fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato redistribuiría a esta anexina en microdominios de membrana enriquecidos en actina, colesterol y moléculas de transducción de señal (Rescher U et al., 2004).

Una desactivación regional de Ras mediada por el complejo p120GAP-anexina A6, podría integrar resultados previos y actuales. Por un lado, una menor activación del Ras total ante diversos estímulos mitogénicos, como PDGF, EGF, HDL o TPA. Por otro lado, el bloqueo total de la actividad Raf, ya que las regiones afectadas podrían ser lugares específicos de distribución y activación de Raf. Recíprocamente, la alteración en estas células del equilibrio entre la vía de Ras-Raf y el resto de señalizaciones, incrementaría la contribución relativa de la PKC α en la activación de las MAPKs.



Esquema 1. Efecto de la sobreexpresión de anexina en la vía de señalización a partir de HDL. Tanto en presencia como en ausencia de anexina A6 sobreexpresada, las HDL activan, a través del receptor SR-BI (1) y de forma dependiente de proteínas G_i , (2), la señalización proliferativa, incrementando la actividad MAPK hasta niveles similares (5). En las células CHO-wt se activan completamente H-Ras (3a) y c-Raf (4a), para dar lugar a la activación de MEK y ERK. Por el contrario, la sobreexpresión anexina A6 inhibe parcialmente la activación de Ras y totalmente la de Raf-1; esta disminución de la vía convencional potencia la contribución de la PKC_α en la activación de Ras (3b) y, más claramente, de las MAPKs (4b).



Esquema 2. Modelo integrado de actuación de la anexina A6. La anexina A6 se encuentra, en condiciones basales, en forma soluble en el citosol (1). Un incremento del calcio intracelular, que se une a los dominios endonexina del núcleo C-terminal, induce la translocación de la anexina hacia la membrana (2). La unión a la membrana genera un cambio conformacional en la anexina A6, que alinea los dos núcleos y expone la región linker, (oculta en la conformación soluble) capaz de interactuar con dominios C2, presentes en otras moléculas de unión calcio dependiente a membranas (como p120GAP y PKC α). La anexina formaría entonces complejos con las moléculas mencionadas (4), e incluso sería susceptible a modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, la fosforilación por PKC α). A nivel de la membrana, componentes como el colesterol, los glicosfingolípidos o el citoesqueleto de actina determinarán la localización definitiva de la anexina A6 y, en consecuencia, de las proteínas de unión a ésta, en los lipid rafts (3). En resumen, dicho proceso constituye un eficaz mecanismo de transporte citosol-membrana, y de segregación dentro de

ésta de complejos multiproteicos implicados en señalización o tráfico de vesículas. El proceso descrito explica los resultados observados en la modulación de señal por parte de la anexina A6, ya que permitiría a p120GAP, a través de su interacción con la anexina A6 (4), acceder a los lipid rafts donde desactivaría a H-Ras (5) interfiriendo así en el reclutamiento de Raf-1 (6). En este contexto la PKC α (7) contribuiría a la activación parcial de Ras y, más evidentemente, de MEK y MAPK.

CONCLUSIONES

1 -Existe una población de anexina A6 unida a las membranas *in-vivo* de forma independiente de calcio que es, no obstante, sensible a la extracción del colesterol. La depleción adicional del calcio no induce efecto sinérgico alguno en dicho proceso.

2 -El colesterol es capaz por sí mismo de redistribuir a la anexina A6 dentro de las membranas del compartimento endocítico. Así, la acumulación de colesterol en este compartimento implica la concentración de anexina A6, tanto en la célula viva como en sistemas de endosomas aislados mediante fraccionamiento celular.

3 -Las lipoproteínas HDL activan la señalización de las MAPKs a través de la GTPasa Ras, en células CHO. En concreto, la isoforma activada es H-Ras, y en esta activación no se requiere la presencia del enzima PKC. Se fosforila y activa a las quinasas c-Raf-1 (MAPKKK), MEK (MAPKK) y ERK (MAPK).

4 -En la activación de Ras a partir de las HDL, el receptor SR-BI juega un papel importante, de tal forma que la inhibición de la unión de éste a la lipoproteína conlleva la supresión de esta señalización, en células CHO.

5 -La expresión (niveles fisiológicos) de anexina A6 en células CHO inhibe parcialmente (en un 50%) la activación de Ras mediada por HDL (ó por PDGF). Más claramente, la actividad c-Raf se encuentra totalmente inhibida en estas células. No obstante, la actividad de MEK y ERK no se afecta de forma significativa. La menor activación de Ras depende, en mayor grado que en las células control, de la presencia del enzima PKC.

6 -La presencia de anexina A6 incrementa la unión de p120GAP a las membranas celulares, e induce la co-asociación con Ras, mecanismo que explicaría los menores niveles de Ras activo. La anexina A6 modula estas uniones también en condiciones basales, sugiriendo una actuación como “anclaje” para estas moléculas a determinados dominios de la membrana.

7 -La anexina A6 en células CHO y COS transloca, de forma rápida y masiva en respuesta a un incremento de calcio intracelular, hacia la membrana plasmática. Una vez translocada, la anexina A6 establece interacciones estables y calcio-independientes con los *lipid rafts* de la membrana plasmática, de forma dependiente de la presencia de colesterol.