

BIBLIOGRAFÍA

A

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH and Krieger M (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-20

Avila-Sakar AJ, Creutz CE and Kretsinger RH (1998). Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. *Biochim Biophys Acta* 1387: 103-16

Avila-Sakar AJ, Kretsinger RH and Creutz CE (2000). Membrane-bound 3D structures reveal the intrinsic flexibility of annexin VI. *J Struct Biol* 130: 54-62

Avraham H, Park SY, Schinkmann K and Avraham S (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12: 123-33

Ayala-Sanmartín J (2001). Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 72-9

B

Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S and Krieger M (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272: 13242-9

Babiychuk EB and Draeger A (2000). Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150(5): 1113-24

Babiychuk EB, Palstra RJ, Schaller J, Kampfer U, Draeger A (1999). Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274(49): 35191-5

Babiychuk VS, Draeger A and Babiychuk EB (2000). Smooth muscle actomyosin promotes Ca²⁺-dependent interactions between annexin VI and detergent - insoluble glycosphingolipid - enriched membrane domains. *Acta Biochim Pol* 47: 579-589

Bandorowicz-Pikula J, Kirilenko A, van Deursen R, Golczak M, Kuhnel M, Lancelin JM, Pikula S and Buchet R (2003). A putative consensus sequence for the nucleotide-binding site of annexin A6. *Biochemistry* 42: 9137-46

Barwise JL and Walker JH (1996). Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts. *J Cell Sci* 109: 247-255

Bellagamba C, Hubaishy I, Bjorge JD, Fitzpatrick SL, Fujita DJ and Waisman DM (1997). Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding. *J Biol Chem* 272: 3195-3199

Benevolensky D, Belikova Y, Mohammadzadeh R, Trouve P, Marotte F, Russo-Marie F, Samuel JL and Charlemagne D (2000). Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Lab Invest* 80: 123-33

Benz J, Bergner A, Hofmann A, Demange P, Göttig P, Liemann S, Huber R and Voges D (1996). The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. *J Mol Biol* 260: 638-643

Biesbroeck R, Oram JF, Albers JF and Bierman EL (1983). Specific high-affinity binding of high density lipoproteins to cultured human skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 71: 525-539

Bivona TG and Philips MR (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol* 15: 136-42

Brown DA and London E (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36

Brown DA and London E (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275: 17221-17224

Browning J, Pepinsky BB, Wallner B, Flower RJ and Peers SH (1990). Too soon for consensus?. *Nature* 346: 324

Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofmann A, Göttig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Romisch J and Weber K (1996). The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol* 257: 839-47

Burgoyne RD, Morgan A, Robinson I, Pender N and Cheek TR (1993). Exocytosis in adrenal chromaffin

cells. *J Anat* 183: 309-14

Burns AL, Magendzo K, Shirvan A, Srivasta M, Rojas E, Aligani MR and Pollard HB (1989). Calcium channel activity of purified human synexin and structure of the human synexin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3798-3802

C

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ and Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signalling. *Oncogene* 17: 1395-1413

Chiang Y, Schneiderman MH and Vishwanatha JK (1993). Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Res* 53:6017-21

Chow A and Gawler D (1999). Mapping the site of interaction between annexin VI and the p120GAP C2 domain. *FEBS Lett* 460: 166-72

Chow A, Davis AJ and Gawler DJ (2000). Identification of a novel protein complex containing annexin VI, Fyn, Pyk2, and the p120(GAP) C2 domain. *FEBS Lett* 469: 88-92

Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE and Philips MR (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98: 69-80

Clark DM, Moss SE, Wright NA and Crumpton MJ (1991). Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B-

and T-lymphocytes. *Histochemistry* 96: 405-12

Cluett EB and Machamer CE (1996). The envelope of vaccinia virus reveals an unusual phospholipid in Golgi complex membranes. *J Cell Sci* 109: 2121-2131

Concha NO, Head JF, Kaetzel MA, Dedman JR and Seaton BA (1992). Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 314: 159-62

Coxey RA, Pentchev PG, Campbell G and Blanchette-Mackie EJ (1993). Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick Type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res* 34: 1165-1176

Creutz CE (1981). Secretory vesicle - cytosol interactions in exocytosis: isolation by Ca²⁺-dependent affinity chromatography of proteins that bind to the chromaffin granule membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 103: 1395-400

Crompton MR, Moss SE, and Crumpton MJ (1988 a). Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* 55: 1-3

Crompton MR, Owens RJ, Totty NF, Moss SE, Waterfield MD, Crumpton MJ (1988 b). Primary structure of the human, membrane-associated Ca²⁺-binding protein p68 a novel member of a protein family. *EMBO J* 7: 21-7

Crumpton MJ and Dedman JR (1990). Protein terminology tangle. *Nature* 345: 212

Cuervo AM, Gomes AV, Barnes JA and Dice JF (2000). Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275: 33329-33335

Cullen PJ and Lockyer PJ (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 339-48

D

Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE and Gawler DJ (1996). The Ca²⁺-dependent lipid binding domain of P120GAP mediates protein-protein interactions with Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. Evidence for a direct interaction between annexin VI and P120GAP. *J Biol Chem* 271: 24333-6

de Rooij J and Bos JL (1997). Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14: 623-625

Deeg MA, Bowen RF, Oram JF and Bierman EL (1997). High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1667-74

Della Gaspera B, Braut-Boucher F, Bomsel M, Chatelet F, Guguen-Guillouzo C, Font J, Weinman J and Weinman S (2001). Annexin expressions are temporally and spatially regulated during rat hepatocyte differentiation. *Dev Dyn* 222: 206-17

Diaz-Muñoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990). Modulation of Ca²⁺

release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem* 265(26): 15894-9

Draeger A, Monastyrskaya K, Burkhard FC, Wobus AM, Moss SE and Babiychuk EB (2003). Membrane segregation and downregulation of raft markers during sarcolemmal differentiation in skeletal muscle cells. *Dev Biol* 262: 324-334

Drust DS and Creutz CE (1988). Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331: 88 - 91

E

Eberhard D, Karns LR, Vandenberg SR and Creutz CE (2001). Control of the nucleo-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* 114: 3155–3166

Eckhardt ER, Cai L, Sun B, Webb NR, and van der Westhuyzen DR (2004). High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem* 279: 14372-81

Ehrhardt A, Ehrhardt GR, Guo X and Schrader JW (2002). Ras and relatives — job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30: 1089–1106

Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G and Gruenberg J (1993). Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 120:1357-69

F

Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF and Hart IR (1996). Identification by differential display of annexin-VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. *Cancer Res* 56: 3855-8

Fidge NH (1999). High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* 40: 187-201

Fiedler K, Lafont F, Parton RG and Simons K (1995). Annexin XIII_b: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol* 128: 1043-53

Filipenko NR and Waisman DM (2001). The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* 276: 5310-5

Filvaroff E, Calautti E, McCormick F and Dotto GP (1992). Specific changes of Ras GTPase-activating protein (GAP) and a GAP-associated p62 protein during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 12: 5319–5328

Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P and Moss SE (1999). Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-specific. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 540-6

Freye-Minks C, Kretsinger RH and Creutz CE (2003). Structural and dynamic changes in human annexin VI induced by a phosphorylation-mimicking mutation, T356D. *Biochemistry* 42: 620-30

Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A and Hopkins CR (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 120: 77–83

G

Geisow M, Childs J, Dash B, Harris A, Panayotou G, Sudhof T, Walker JH (1984). Cellular distribution of three mammalian Ca^{2+} -binding proteins related to Torpedo calelectrin. *EMBO J* 3: 2969-74

Geisow MJ, Fritsche U, Hexham JM, Dash B, Johnson T (1986). A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca^{2+} -dependent membrane-binding proteins. *Nature* 320: 636-8

Geisow MJ, Walker JH, Boustead C, Taylor W (1987). Annexins-new family of Ca^{2+} -regulated-phospholipid binding protein. *Biosci Rep* 7: 289-98

Gerke V and Moss SE (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82: 331-71

Gerke V and Weber K (1984). Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J* 3: 227–233

Glass C, Pittman RC, Civen M and Steinberg D (1985). Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and

hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 260: 744-50

Glenney JR and Tack BF (1985). Amino-terminal sequence of p36 and associated p11: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7884–7888

Glenney JR, Tack B, Powell MA (1987). Calpactins: two distinct Ca^{++} -regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* 104: 503-11

Glenney, JR (1986). Phospholipid-dependent Ca^{2+} binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (calpactin) and its 33-kDa core. *J Biol Chem* 261: 7247-7252

Golczak M, Kicinska A, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R, Szewczyk A and Pikula S (2001a). Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J* 15:1083-5

Golczak M, Kirilenko A, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S (2001b). Conformational states of annexin VI in solution induced by acidic pH. *FEBS Lett* 496(1): 49-54

Goldstein JL and Brown MS (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-30

Gorvel JP, Chavier P, Zerial M and Gruenberg J (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915–925

Graf GA, Roswell KL and Smart EJ (2001). 17beta-Estradiol promotes

the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. *J Lipid Res* 42: 1444-9

Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U and Jäckle S (2000). Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem* 275: 33806-13

Gruenberg J, Griffiths G and Howell KE (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 108: 1301-16

Gu F and Gruenberg J (2000). ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem*. 275: 8154-8160

Gu X, Kozarsky K and Krieger M (2000). Scavenger receptor class B, type I-mediated [³H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol Chem* 275:29993-30001

Gunteski-Hamblin AM, Song G, Walsh RA, Frenzke M, Boivin GP, Dorn GW 2nd, Kaetzel MA, Horseman ND, Dedman JR (1996). Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* 270: H1091-100

Gwynne JT and Mahaffee DD (1989). Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 264: 8141-50

H

Hancock JF (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 373-384

Harder T, Kellner R, Parton RG and Gruenberg J (1997). Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8: 533-45

Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE (1999). Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol* 19(12): 8028-32

Hayes MJ, Rescher U, Gerke V and Moss SE (2004). Annexin-Actin Interactions. *Traffic* 5: 571-576

Hazarika P, Sheldon A, Kaetzel MA, Diaz-Munoz M, Hamilton SL and Dedman JR (1991). Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel requires intact annexin VI. *J Cell Biochem* 46: 86-93

Hidaka H and Tanaka T (1983). Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists. *Methods Enzymol* 102: 185-94

Hubaishy I, Jones PG, Bjorge J, Bellagamba C, Fitzpatrick S, Fujita DJ and Waisman DM. Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 34: 14527-14534

Huber R, Römisch J, Paques EP (1990 a). The crystal and molecular structure of human annexin V, an

anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 9: 3867-74

Huber R, Schneider M, Mayr I, Römisch J and Paques EP (1990 b). The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett* 275: 15-21

I

Ikebuchi NW and Waisman DM (1990). Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem* 265: 3392-3400

Ikemoto M, Arai H, Feng D, Tanaka K, Aoki J, Dohmae N, Takio K, Adachi H, Tsujimoto M and Inoue K (2000). Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6538-6543

J

Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB and Tall AR (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 272: 20982-5

Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH and Phillips MC (1991). Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1085: 273-98

Johnsson N, Nguyen Van P, Soling HD and Weber K (1986). Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein

kinase; differential inhibition of reassociation with p11. *EMBO J* 5: 3455-60

Johnstone SA, Hubaishy I and Waisman DM (1992). Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein.

Johnstone SA, Hubaishy I and Waisman DM (1993). Regulation of annexin I-dependent aggregation of phospholipid vesicles by protein kinase C. *Biochem J* 294: 801-7

Jones PG, Moore GJ, Waisman DM (1992). A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem* 267: 13993-7

Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K and Gerke V (1997). Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci* 110: 221-8

Junker M and Creutz CE (1994). Ca²⁺-Dependent binding of endonexin (annexin IV) to membranes: Analysis of the effects of membrane lipid composition and development of a predictive model for the binding interaction. *Biochemistry* 33: 8930-8940

K

Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR (1994). Annexin VI isoforms are differentially expressed in

mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 368-74

Kamal A, Ying Y, Anderson RG (1998). Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142(4): 937-47

Kirilenko A, Golczak M, Pikula S, Buchet R and Bandorowicz-Pikula J (2002). GTP-induced membrane binding and ion channel activity of annexin VI: is annexin VI a GTP biosensor? *Biophys J* 82: 2737-45

Kobayashi T, Beuchat M-H, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Saturaba H, Parton RG and Gruenberg J (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1: 113-118

Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D and Rapp UR (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364: 249-52

König J and Gerke V (2000). Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins. *Biochim Biophys Acta* 1498: 174-80

Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER and Krieger M (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387: 414-7

Krieger M (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor

SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68: 523-558

Krieger M and Herz J (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63: 601-637

L

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lambert O, Cavusoglu N, Gallay J, Vincent M, Rigaud JL, Henry JP and Ayala-Sanmartin J (2004). Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279: 10872-82

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R and Pouyssegur J (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271: 20608-16

Lecat S, Verkade P, Thiele C, Fiedler K, Simons K and Lafont F (2000). Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells. *J Cell Sci* 113: 2607-2618

Lewit-Bentley A, Stéphane Réty, Sopkova-de Oliveira Santos J and Gerke V (2000). S100-Annexin complexes: Some insights from structural studies. *Cell Biology International* 24: 799-802

Li X-A, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M,

Uittenbogaard A and Smart EJ (2002). High density lipoprotein binding to Scavenger Receptor, class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem* 277: 11058–11063

Lin HC, Sudhof TC, Anderson RG (1992). Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* 70(2): 283-91

Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH and Hajjar KA (2004). Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 113: 38-48

Liscum L and Faust JR (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-diethylamino]ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264: 11796–11806

Liscum L and Munn NJ (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438: 19-37

Lockyer PJ, Kupzig S, Cullen PJ (2001). CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr Biol* 11: 981-6

M

Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, Olson MF and Marshall CJ (1998). Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280: 109-12

Mayran N, Parton RG and

Gruenberg J (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J* 22: 3242-3253

Meers P (1990). Location of tryptophans in membrane-bound annexins. *Biochemistry* 29: 3325-3330

Michener ML, Dawson WB and Creutz CE (1986). Phosphorylation of a chromaffin granule-binding protein in stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem* 261: 6548-55

Mizutani A, Watanabe N, Kitao T, Tokumitsu H, and Hidaka H (1995). The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization. *Arch Biochem Biophys* 318: 157–165

Moore PB, Kraus-Friedmann N, Dedman JR (1984). Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin. *J Cell Sci* 72: 121-33

Morales-Ruiz M, Lee M-J, Zöllner S, Gratton J-P, Scotland R, Shiojimai I, Walsh K, Hla T and Sessa WC (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 19672–19677

Morgan RO and Fernández MP (1995). Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 12: 967–979

Morgan RO and Fernández MP

(1997). Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 53: 508-15

Moss SE, Jacob SM, Davies AA and Crumpton MJ (1992). A growth-dependent post-translational modification of annexin VI. *Biochim Biophys Acta* 1160: 120-6
Nat Cell Biol 3: 368-75

N

Nofer JR, Junker R, Pulawski E, Fobker M, Levkau B, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G, Walter M (2001). High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb Haemost* 85: 730-5

Nofer J-R, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G and von Eckardstein A (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161: 1-16

O

Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, and Giancotti FG (1999). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH₂-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 145: 1461-1469

Oling F, Bergsma-Schutter W and Brisson A (2001). Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin A5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol* 133: 55-63

Oram JF, Brinton EA and Bierman

EL (1983). Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 72: 1611-1621

Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S (2001). Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J Neurosci Res* 64(3): 235-41

Ortega D, Pol A, Biermer M, Jackle S and Enrich C (1998). Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci* 111: 261-9

P

Parkin ET, Turner AJ and Hooper NM (1996). A role for calcium and annexins in the formation of caveolae. *Biochem Soc Trans* 24: 444S

Parton RG (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM₁ is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 42: 155-66

Parton RG and Simons K (1995). Digging into caveolae. *Science* 269: 1398-9

Pepinsky RB, Tizard R, Mattaliano RJ, Sinclair LK, Miller GT, Browning JL, Chow EP, Burne C, Huang KS, Pratt D, et al. (1988). Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. *J Biol Chem* 263: 10799-811

Pol A, Calvo M and Enrich C (1998).

Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* 441: 34-8

Pol A, Lu A, Pons M, Peiro S and Enrich C (2000). Epidermal growth factor-mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 275: 30566-72

Pollard HB, Burns AL and Rojas E (1990). Synexin (annexin VII): a cytosolic calcium-binding protein which promotes membrane fusion and forms calcium channels in artificial bilayer and natural membranes. *J Membr Biol* 117: 101-112

Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001a). Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 269: 13-22

Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S and Enrich C (2000). Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. *Exp Cell Res* 257: 33-47

Pons M, Tebar F, Kirchhoff M, Peiro S, de Diego I, Grewal T and Enrich C (2001b). Activation of Raf-1 is defective in annexin 6 overexpressing Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 501: 69-73

Powell MA and Glenney JR jr

(1987). Regulation of calpactin I phospholipids binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* 247: 321-328

Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG and Hancock JF (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.

Puisieux A, Ji J and Ozturk M (1996). Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms. *Biochem J* 313: 51-5

R

Raynal P and Pollard HB (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197: 63-93

Rescher U and Gerke V (2004). Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117: 2631-2639

Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N and Gerke V (2004). Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117: 3473-3480

Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, and Williams DL (1996). Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-B1), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol*

Chem 271: 33545-33549

Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J and Krieger M (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA 94: 12610-5*

Rinninger F, Deichen JT, Jackle S, Windler E and Greten H (1994). Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters and high-density lipoprotein particle uptake by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis 105: 145-57*

Rosengarth A, Gerke V and Luecke H (2001). X-ray structure of full-length annexin I and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol 306: 489-498*

Rosengarth A. and Luecke H (2003). A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol 326: 1317-1325*

Rotblat B, Prior IA, Muncke C, Parton RG, Kloog Y, Henis YI and Hancock JF (2004). Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol Cell Biol 24: 6799-810*

Rothhut B (1997). Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci 53: 522-526*

Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF and Parton RG

(1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol 1: 98-105*

S

Sable CL and Riches DW (1999). Cloning and functional activity of a novel truncated form of annexin IV in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun 258: 162-167*

Schlaepfer DD and Haigler HT (1987). Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J Biol Chem 262: 6931-7*

Schlaepfer DD and Haigler HT. In vitro protein kinase C phosphorylation sites of placental lipocortin (1988). *Biochemistry 27: 4253-8*

Schlaepfer DD, Fisher DA, Brandt ME, Bode HR, Jones JM, Haigler HT (1992). Identification of a novel annexin in *Hydra vulgaris*. Characterization, cDNA cloning, and protein kinase C phosphorylation of annexin XII. *J Biol Chem 267: 9529-39*

Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Walker JH and Biden TJ (1998). Activated protein kinase C alpha associates with annexin VI from skeletal muscle. *Biochem J 330: 675-81*

Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ and Parker PJ (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol 18: 790-8*

- Simons K and Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72
- Simons K and Ikonen E (2000). How cells handle cholesterol. *Science* 290: 1721-1726
- Simons K and Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-41
- Simons K and van Meer G (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197-202
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T and Lisanti MP (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304
- Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE (1994). Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J Cell Biol* 124(3): 301-6
- Song G, Harding SE, Duchon MR, Tunwell R, O'Gara P, Hawkins TE, Moss SE (2002). Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J* 16(6): 622-4
- Sprenger RR, Speijer D, Back JW, De Koster CG, Pannekoek H and Horrevoets AJ (2004). Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 25: 156-72
- Südhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barjon P and Reynolds GA (1988). Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 664-668
- Südhof TC, Walker JH, Obrocki J (1982). Calelectrin self-aggregates and promotes membrane aggregation in the presence of calcium. *EMBO J* 1: 1167-70
- Summers TA and Creutz CE (1985). Phosphorylation of a chromaffin granule-binding protein by protein kinase C. *J Biol Chem* 260: 2437-2443
- Sun Y, Wang N and Tall AR (1999). Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. *J Lipid Res* 40: 1799-805
- Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA (1995). Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* 2: 968-74
- T**
- Takagi H, Asano Y, Yamakawa N, Matsumoto I, Kimata K (2002). Annexin 6 is a putative cell surface receptor for chondroitin sulfate chains. *J Cell Sci* 115 (16): 3309-18
- te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, and Sillence DJ (2004). Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C Disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 279 (25): 26167-26175
- Theobald J, Hanby A, Patel K, Moss SE (1995). Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431

squamous epithelial carcinoma cells. *Br J Cancer* 71(4): 786-8

Theobald J, Smith PD, Jacob SM, Moss SE (1994). Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells suppresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation. *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 383-90

Thiel C, Osborn M and Gerke V (1992). The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci* 103: 733-742

Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE (2002). Identification of annexin VI as a Ca²⁺-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 277(38): 35496-502

Tomas A and Moss SE (2003). Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *J Biol Chem* 278: 20210-6.

Tomas A, Futter C, and Moss SE (2004). Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. *J Cell Biol* 165(6): 813-822

Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, de Paillerets C, Alfsen A and Bomsel M (1998). In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. *Biochim Biophys Acta* 1402: 115-130

U

Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K and Ohno S (1996). Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent of Raf. *J Biol Chem* 271: 23512-23519

Uittenbogaard A, Everson WV, Matveev SV and Smart EJ (2002). Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J Biol Chem* 277: 4925-4931

Urban S, Zieseniss S, Werder M, Hauser H, Budzinski R and Engelmann B (2000). Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells. *J Biol Chem* 275: 33409-33415

V

Vishwanatha JK and Kumble S (1993). Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 105: 533-40

W

Walker SA and Lockyer PJ (2004). Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci* 117: 2879-86

Walker SA, Cullen PJ, Taylor JA and Lockyer PJ (2003). Control of Ras cycling by Ca²⁺. *FEBS Lett* 546: 6-10

Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA, Allen MJ, Philips MR and Cullen PJ (2004). Identification of a Ras GTPase-activating protein

regulated by receptor-mediated Ca^{2+} oscillations. *EMBO J* 23: 1749–1760

Watanabe H, Takahashi R, Tran QK, Takeuchi K, Kosuge K, Satoh H, Uehara A, Terada H, Hayashi H, Ohno R and Ohashi K (1999). Increased cytosolic Ca^{2+} concentration in endothelial cells by calmodulin antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 697-702

Webb BL, Hirst SJ and Giembycz MA (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* 130: 1433-52

Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, de Villiers WJ, de Beer FC and van der Westhuyzen DR (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem* 273: 15241-8

Weber K, Johnsson N, Plessmann U, Van PN, Soling HD, Ampe C and Vandekerckhove J (1987). The amino acid sequence of protein II and its phosphorylation site for protein kinase C; the domain structure Ca^{2+} -modulated lipid binding proteins. *EMBO J* 6: 1599-604

Weng X, Luecke H, Song IS, Kang DS, Kim SH, Huber R (1993). Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci* 2: 448-58

Willshaw A, Grant K, Yan J, Rockliffe N, Ambavarapu S, Burdya G, Varro A, Fukuoka S and

Gawler D (2004). Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett* 559: 13-21 Y

Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A and Hancock JF (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273: 24052-24056

Yang L and Glaser M (1996). Formation of membrane domains during the activation of protein kinase C. *Biochemistry* 35: 13966-74

Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH and Shaul PW (2001). *Nat Med* 7: 853–857

Z

Zaks WJ and Creutz CE (1991). Ca^{2+} -dependent annexin self-association on membrane surfaces. *Biochemistry* 30: 9607-15

Zobiack N, Gerke V and Rescher U (2001). Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells. *FEBS Lett* 500: 137-40

Zobiack N, Rescher U, Laarmann S, Michgehl S, Schmidt MA and Gerke V (2002). Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci* 115: 91–98

ANEXO I

ANEXO I

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES. EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE ANEXINA EN LA PROLIFERACIÓN, ADHESIÓN Y CICLO CELULAR

El presente bloque pretende dejar constancia de algunas observaciones y aproximaciones que completan el contexto del trabajo desarrollado.

Obtención de la línea celular CHO transfectada establemente con anexina A6

Material inicial:

Línea celular CHO que sobreexpresa anexina A6 de forma estable (Pons et al. (2001)).

Método:

El cDNA de la anexina A6 (forma larga) (Grewal T et al., 2000), de hígado de rata se clonó en un vector pGEMT (Promega[®]), a partir del cuál se amplificó un fragmento 2.0-2.2 Kpb, correspondiente al gen de la anexina A6. Posteriormente el fragmento se subclonó en un plásmido pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen[®]), y se transfectaron células CHO salvajes con el vector. Las células se seleccionan en medio de cultivo en presencia de antibiótico G418 (1 mg/ml), obteniéndose líneas de sobreexpresión estable después de varios pases (5-6). La línea estable original CHO-Anx A6 (Pons M et al., 2001) se utilizó para generar nuevas poblaciones a partir de células aisladas, con el fin de incrementar la homogeneidad en los niveles de expresión y suprimir el requerimiento de antibiótico de selección.

De entre todas las líneas clonales (7 “positivas” y 1 “negativa”; ver *Figura 1*); se decide utilizar el clon 2nd#7 como representativo de la sobreexpresión de anexina A6, por su acorde patrón, nivel de expresión y homogeneidad en el microscopio, siendo utilizado en todos los estudios presentados en este trabajo.

Como control negativo, se utilizarán células CHO salvajes y, en algunos estudios, también el clon negativo 2nd#6.

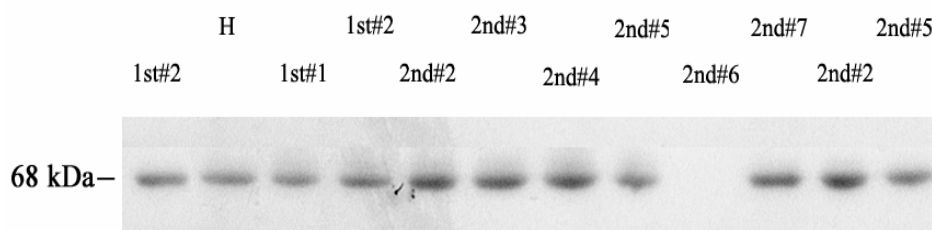


Figura 1. Western Blot a partir de electroforesis (SDS-PAGE) de 10 μ g de lisado celular de cada una de las líneas de sobreexpresión de anexina A6. 1st#1, 1st#2, 2nd#2, 2nd#3, 2nd#4, 2nd#5, 2nd#6 y 2nd#7 son los clones obtenidos a partir de la población inicial CHO-AnxA6 (indicada como H). Se utilizó anti-GST-Anexina A6 como anticuerpo primario (ver apartado de anticuerpos en Material y Métodos).

Cuantificación de los niveles de sobreexpresión de anexina A6 en células CHO transfectadas establemente

Material inicial:

La cantidad de anexina A6 sobreexpresada se determinó en las líneas CHO-2nd#4, CHO-2nd#7, CHO salvajes y A431 (que carece totalmente de anexina A6 endógena). Los niveles endógenos de expresión de anexina A6 en linfocitos Jurkat se consideran referente fisiológico (Theobald J et al., 1994).

Método:

Se basa en un western blot semi-cuantitativo, siguiendo un protocolo publicado anteriormente (Theobald J et al., 1994).

1) Suspensiones con 2×10^4 , 5×10^4 , y 1×10^5 células de cada una de las líneas (CHO salvaje; 2nd#4-Anx A6; 2nd#7-Anx A6, CHO-AnxA6) se alícuotan y centrifugan 5 min a 1300 g para sedimentar las células. Los pellets se lisan añadiendo directamente el tampón de muestra (conteniendo SDS).

- 2) Se realiza un estándar con alícuotas con 0, 15, 37.5, 75, 112.5, y 150 ng de proteína GST-Anexina A6, obtenida en bacterias *E.coli* BL21 Lys E (ver protocolo *Obtención de proteínas recombinantes*), a las cuáles se añade directamente el tampón de muestra.
- 3) Como control negativo, se prepara una muestra con 15 µg de un lisado de células A431.
- 4) Las muestras se someten a electroforesis SDS-PAGE y Western Blot con anti-GST-Anexina A6 (ver listado de anticuerpos). El revelado se realiza en un detector de bioluminiscencia (Fluor-S, BioRad[®]), obteniéndose imágenes en la franja de linealidad que precede a la saturación de la reacción.
- 5) Las bandas (de GST-Anx A6 o Anx 6) son analizadas con el programa Quantity One (BioRad[®]), obteniéndose la densidad óptica total para cada una de ellas. La cantidad de proteína se extrapola a partir de la recta patrón de GST-Anexina A6, siendo finalmente dividida por el número de células de cada muestra. Se indica la media aritmética de los triplicados (pg/célula) obtenidos (provenientes de los carriles con 2×10^4 , 5×10^4 , o 1×10^5 células), para cada línea celular .

Resultado:

$$y = (3.988 \times 10^{-5}) x - 3.226 \quad r^2 = 0.9585$$

línea celular	pg anexina A6/célula (n=3)
CHO	0
A431	0
CHO-Anx A6	1.2
2nd#4	1.6
2nd#7	0.9
Jurkat*	3.5 ± 0.5
*Theobald et al., 1994	

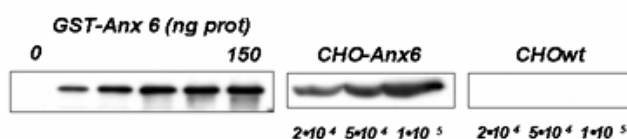


Figura 2. Niveles de anexina A6 (a) obtenidos a partir del análisis del western semicuantitativo (b). Lisados de 2×10^4 , 5×10^4 y 1×10^5 células se cargan en carriles y someten a electroforesis y western blot con anti-anexina A6 (oveja). La imagen digital de la luminiscencia se capta con Fluor-S[®] y cuantifica con el software Quantity One[®]. La cantidad de proteína de cada banda se extrapola a partir de la recta patrón realizada con GST-AnxA6 (0-150 ng), y el valor obtenido se divide por el número de células cargadas por carril. La media aritmética (pg/célula) obtenida para las tres concentraciones de células se representa en la tabla.

Los resultados indican que las diferentes líneas de células CHO que sobreexpresan anexina A6 lo hacen a niveles similares y que éstos a su vez se asemejan a los fisiológicos (células Jurkat). En estas condiciones, no se detecta la escasa anexina A6 presente en células CHO salvajes. Se considera que no existen diferencias significativas con respecto al reconocimiento, por parte del anticuerpo, de la anexina A6 y de la recombinante GST-anexina A6.

Obtención de la línea celular CHO transfectada establemente con GFP-anexina A6

Material inicial:

Para la obtención del plásmido se partió de la forma larga de la anexina A6 de rata clonada en el vector pGEMT (ver inicio del presente anexo), que fué posteriormente amplificada por PCR, digerida con el enzima de restricción *NcoI* y subclonada en el vector pEGFP-N1 de expresión procariota (Clontech[®]). Así, la secuencia de anexina A6 precede a la de la EGFP. La secuencia recombinante anexina A6-EGFP se aisló mediante una doble digestión del vector con *HindIII* y *NotI*, y la banda, de aproximadamente 2.8 Kpb, se incorporó a un vector pcDNA3.1(+).

Método:

La línea celular CHO salvaje, con bajos niveles de expresión de anexina A6 endógena se transfecta con el plásmido pcDNA3.1(+)-Anx6-EGFP. Se cultivan

las células en medio con antibiótico G418 durante 24-48 horas favoreciendo la selección de las células transfectadas. De forma previa al análisis FACS (sorteador celular activado por fluorescencia), el cultivo se tripsiniza y resuspende en medio a una concentración de 1×10^6 células/ml. De esta suspensión, 2.5 ml se sorteán seleccionando la subpoblación (20%) de mayor fluorescencia, a partir de la cuál se siembran en placas de 24 pocillos *células aisladas* o bien *grupos de 1000 células* y se amplifica el cultivo durante 5 días en presencia del antibiótico selectivo.

Las poblaciones obtenidas mono- (derivadas de una célula) así como policlonales (derivadas de 1000 células) son testadas en un microscopio de epifluorescencia invertido.

Resultado:

De todas las poblaciones obtenidas (monoclonales -c1m y c2m- y policlonales -c1.1000, c2.1000, c3.1000, c4.1000, c5.1000, c6.1000, c3dm-) se preparan stocks congelados y se selecciona la línea estable c1.1000 (=c1p) como población de estudio para el análisis por microscopía. Todos los clones mantienen de forma estable niveles de expresión adecuados en ausencia de antibiótico de selección. Asimismo, permiten la observación del patrón *in-vivo* de la anexina A6 sin la necesidad de realizar transfecciones o inmunocitoquímica.

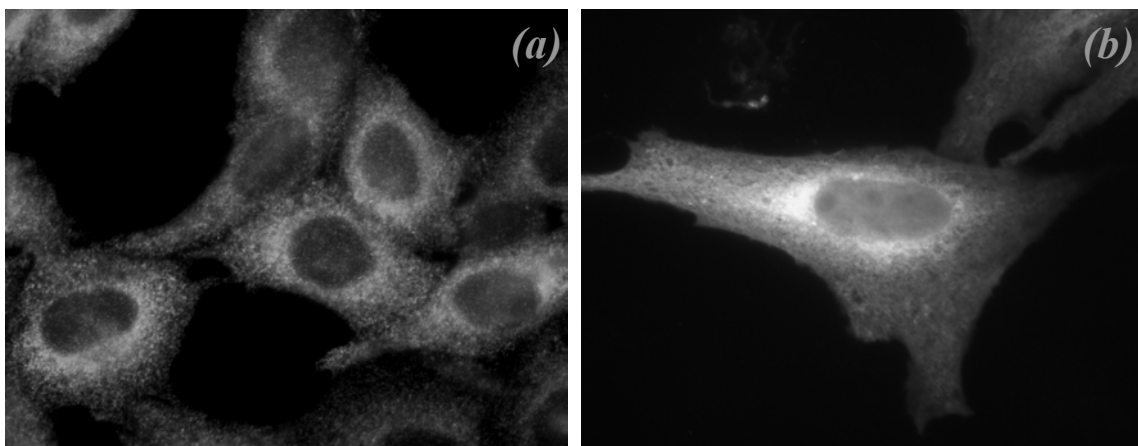


Figura 3. Patrón de expresión de la anexina A6 (a) y anexina A6-EGFP (b). Células CHO-2nd#7 se fijan en PFA 4% y someten a inmunofluorescencia con anti-GSTAnxA6 (1:100) como anticuerpo primario (a). En (b) se muestran células CHO-c1p (clon de sobreexpresión estable de anexina A6-EGFP) fijadas en PFA 4%. Las imágenes de fluorescencia se captan en un microscopio confocal espectral Leica® TCS NT.

Ensayos de proliferación

Material inicial:

Para realizar este ensayo se utilizó población control de células CHO salvajes, que fue comparada con dos poblaciones de clones “positivos” obtenidos, 2nd#4 y 2nd#7. Se pretende determinar empíricamente la observación reiterada de un crecimiento menor de los cultivos celulares que sobreexpresan anexina A6.

Método:

En placas de 35mm de diámetro (o placas de 6 pocillos), se siembran 3×10^5 células de las líneas CHO salvajes, 2nd#4 (CHO-Anx A6) y 2nd#7 (CHO-AnxA6). Para cada línea se siembran 15 placas, correspondientes a cinco tiempos, cada punto por triplicado. Se mantienen en el incubador, en medio de cultivo HAM's F-12 con un 10 % de suero fetal de ternera (FCS), durante los tiempos indicados (18h, 24h, 42h, 66h, 72h). No se realiza ningún cambio de medio en todo el proceso, al haberse añadido en exceso inicialmente (2.2 ml/placa).

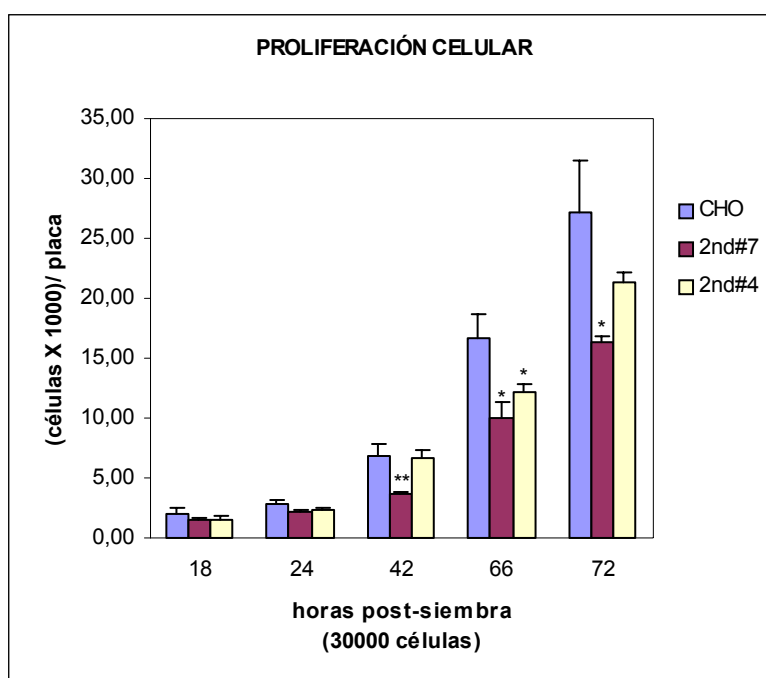
A los tiempos establecidos, se tripsinizan 9 placas (triplicados por cada una de las líneas) y se cuentan las células en la cámara de Neubauer. Previamente a la tripsinización se realiza un lavado con PBS abundante para descartar las células no adheridas.

Resultado:

Se observa que el crecimiento es más lento en presencia de niveles suficientes de anexina A6, en las dos líneas de sobreexpresión, comparado con el de la línea salvaje. La ausencia de G418 en el medio de cultivo, que no se requiere

al tratarse de clones homogéneos, permite descartar el efecto anteriormente observado fuese debido a la interferencia del antibiótico de selección en la curva de crecimiento de las células que sobreexpresan la anexina.

En un ensayo de proliferación preliminar se observó similar efecto, incrementándose aún más la diferencia en estadios iniciales, pero corrigiéndose en los últimos puntos del ensayo (con elevada confluencia). Este comportamiento dual lo atribuimos a un artefacto experimental en estos últimos puntos, debido a la saturación del crecimiento (inhibición por contacto, agotamiento de factores de crecimiento, acidificación...) que alcanzan antes, por proliferar más rápido, las células CHO salvajes. Es por ello que, en el estudio definitivo, decidimos trabajar en condiciones de menor confluencia y exceso de nutrientes.



Gráfica 1. La sobreexpresión de anexina inhibe la proliferación en células CHO. Representación de la media y la desviación estándar ($n=3$) de los contajes obtenidos en cada punto del estudio (t Test: $P<0.005$ (**); $P<0.05$ (*)).

Adhesión

Material inicial:

La capacidad de adhesión se analizó por microscopía electrónica de barrido en células que sobreexpresan anexina A6 (2nd#7) en comparación con células CHO que carecen de sobreexpresión de la anexina (CHO salvajes, y el clon negativo 2nd#6).

Método:

- 1) 2×10^4 células/cm² se siembran en cubreobjetos de vidrio y se incuban durante 6 horas en presencia de medio de cultivo HAM's F-12 con un 10% de FCS.
- 3) Las células se fijan en 2 % paraformaldehído, 2.5 % glutaraldehído en cacodilato sódico 0.1 M, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) La monocapa fijada se lava 3×5 min a temperatura ambiente en cacodilato sódico 0.1 M, y se incuba durante 10 min en presencia de 2 % de ácido tánico diluido en el mismo tampón cacodilato.
- 5) Se lava en tampón cacodilato 0.1 M (3×5 min) y las células se dejan en etanol 50% (en cacodilato sódico 0.1 M) hasta su procesamiento para MEB.

Resultado:

Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido demuestran como, tanto las células salvajes como el clon negativo 2nd#6 se han adherido completamente en el tiempo indicado. Por el contrario, las células que sobreexpresan anexina A6 (clon CHO-2nd#7 y línea parental CHO-AnxA6) se encuentran en estadios intermedios del proceso, presentando una forma redondeada y una adhesión más débil al sustrato. Este efecto es tan sólo evidente en las primeras horas, recuperando posteriormente la apariencia normal, y podría ser en parte responsable de las diferencias observadas en la tasa de proliferación.

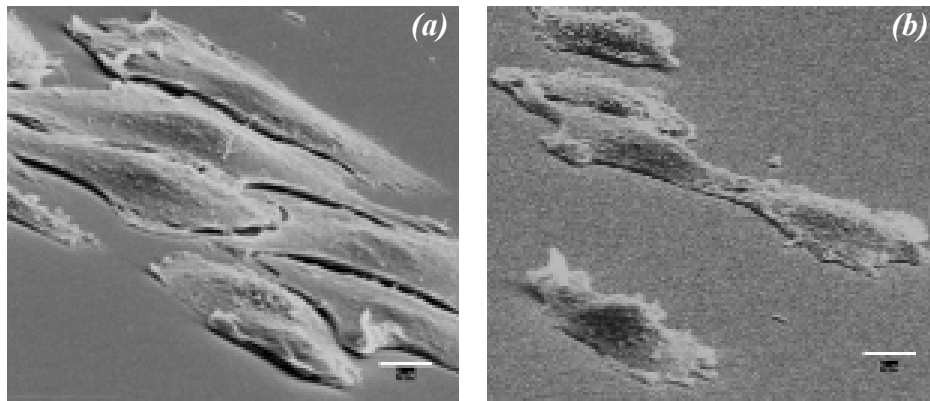


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido (MEB) mostrando el menor grado de adhesión de las células que sobreexpresan la anexina A6. Células CHO salvajes (a) o CHO-2nd#7 (b) seis horas después de la siembra en medio HAM's F-12-10 % FCS. Pasado este tiempo las células se fijan cuidadosamente en 2% PFA-2.5% glutaraldehído-0.1 M cacodilato sódico y procesan para MEB.

Determinación de los niveles de PKC α

Material inicial:

Se realiza un ensayo de western blot con 10 μ g de lisados celulares de líneas “negativas” (CHOwt y clon 2nd#6) y líneas “positivas” (CHO-AnxA6 y clon 2nd#7) para la sobreexpresión de anexina A6.

Método:

- 1) Células cultivadas en presencia de medio HAM's F-12 con un 10 % de FCS se sincronizan (en fase G0) del modo descrito anteriormente o bien se mantienen en las condiciones habituales (células no sincronizadas, ciclantes).
- 2) Se lisan los cultivos en tampón de lisis (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 20 μ M Leupeptina, 1 mM Aprotinina, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.1% Tritón X-100, pH 8) a 4 °C, homogeneizan (con aguja de 25 G) y centrifugan durante 5 minutos a 13500 rpm (microfuga), descartando el precipitado.
- 3) Se cuantifica la proteína del sobrenadante con el método de Lowry-SDS.

4) Se añade tampón de muestra a 60 μ g del sobrenadante y se realiza electroforesis SDS-PAGE (gel resolutivo al 12% y al 6%), seguida de western blot con anticuerpos específicos anti-PKC α , y anti-actina.

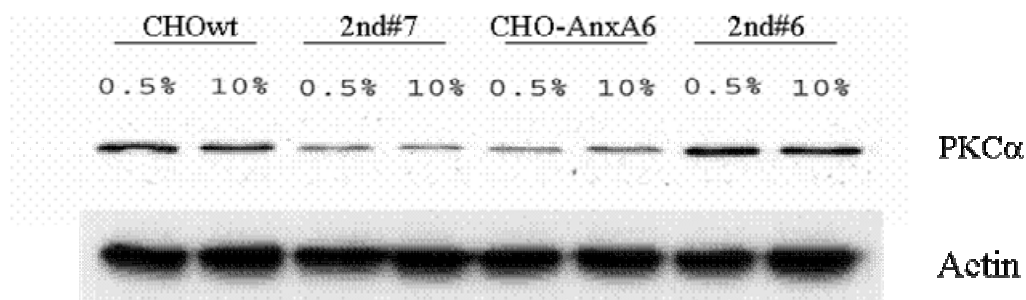


Figura 5. Niveles de expresión de PKC α y su afectación por parte de la anexina A6 y el ciclo celular. 60 μ g de lisado de células sincronizadas en G₀ mediante deprivación de suero (0.5 %) o ciclantes no deprivadas (10 %), que sobreexpresan (CHO-2nd#7; CHO-AnxA6) o no la anexina A6 (CHOwt; CHO-2nd#6) son comparadas mediante electroforesis y western blot con anticuerpos anti-PKCa (1:500) y anti-actina (1:1000).

Resultado:

Las células que sobreexpresan anexina A6 expresan niveles menores del enzima PKC α . Este efecto es altamente repetitivo a la vez que moderado si bien la relevancia fisiológica queda por determinar. Cabe destacar que dicho efecto no es secundario al proceso obtención de los clones ya que el clon negativo 2nd#6, que ha sido sometido al proceso de selección pero no sobreexpresa la anexina, presenta niveles similares del enzima que las células control. Al contrario que otras isoformas de la PKC, como la PKC δ o la PKC ϵ (resultados no mostrados), los niveles totales de PKC α no se regulan por el ciclo celular.

Ciclo celular

Material inicial:

El estudio del ciclo celular se realizó comparando la población CHO salvaje con las poblaciones CHO-Anx A6 y el clon CHO-2nd#7 (de sobreexpresión homogénea). El objetivo es determinar si la sobreexpresión de anexina A6 conlleva alguna variación en el ciclo celular que pudiese explicar el retraso en la proliferación observado, como ya había sido observado anteriormente en otros sistemas (Theobald J, et al., 1994).

Método:

1) Las células se cultivan hasta alcanzar la confluencia total, momento en el que se deprivan en HAM's F-12 con un 0.5% de FCS, durante 48 horas. Al cabo de 48 horas el total de las células se encuentra en G₀.

2) Una vez sincronizadas en G₀, las monocapas se tripsinizan y se cuentan las células. A continuación se siembran a baja confluencia (10⁴ células/cm²) y de forma homogénea en cubreobjetos conteniendo medio de cultivo con un 10 % de FCS. La pérdida de la inhibición por contacto y los factores de crecimiento inducen la entrada en ciclo sincrónica de todo el cultivo.

3) Las células se dejan en el incubador por los tiempos indicados (3h, 14h, 18h, 20h, 22h, 24h, 26h). Pasado este tiempo, el cultivo se lava rápidamente en tampón PBS y se fija en MetOH:H₂O (7:3) durante 30 min a temperatura ambiente.

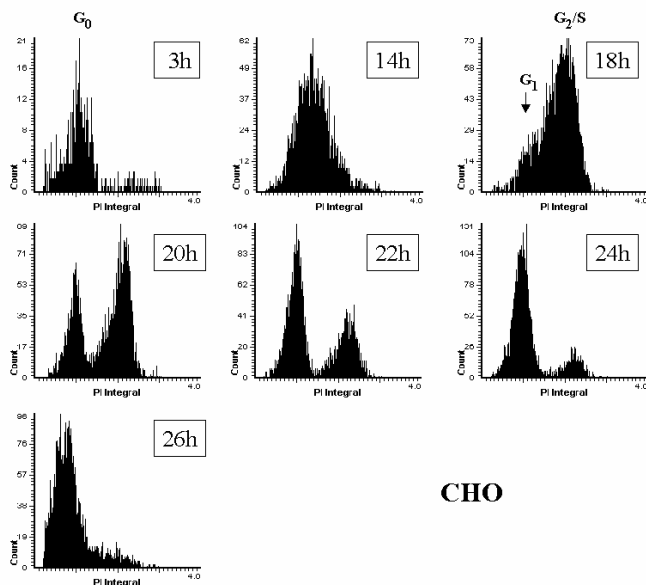
4) Los cubres se lavan en PBS y se incuban en 50 µg/ml de Ioduro de Propidio (IP), 200 µg/ml de RNAsa (libre de DNAsa) en PBS, durante 10 min a temperatura ambiente. El ioduro de propidio se incorpora al DNA de forma que la fluorescencia emitida por éste es un indicador directo de la dotación genética (*n*, *2n*, *4n*) de la célula.

5) Los cubres se montan en portaobjetos con medio de montaje consistente en 70 % glicerol, 100 µg/ml IP, en PBS. La fluorescencia se analiza mediante citometría de barrido por laser (LSC[®]), alcanzándose cuentas mínimas, para cada cubreobjeto, de 4000 células.

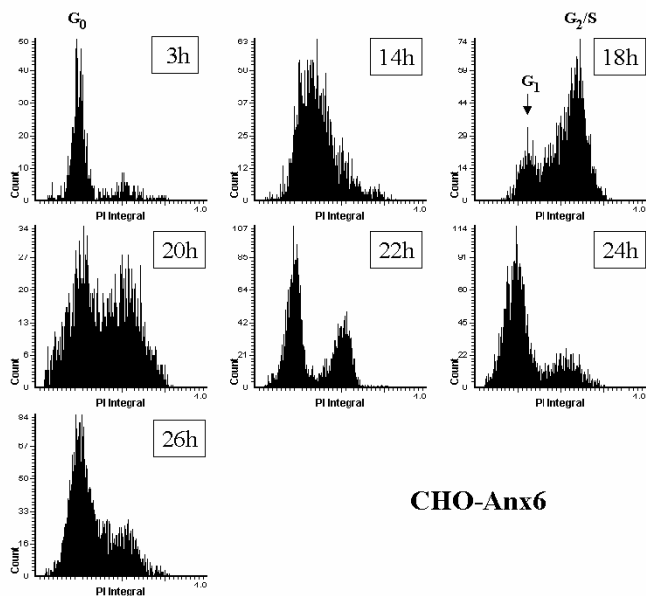
Resultado:

Las líneas celulares se sincronizan eficazmente con el tratamiento, observándose una única población en estadios iniciales que se encuentra en fase G₀. Tras una fase S homogénea y rápida (a las 14 horas), el ciclo celular se completa a las 20-24 horas.

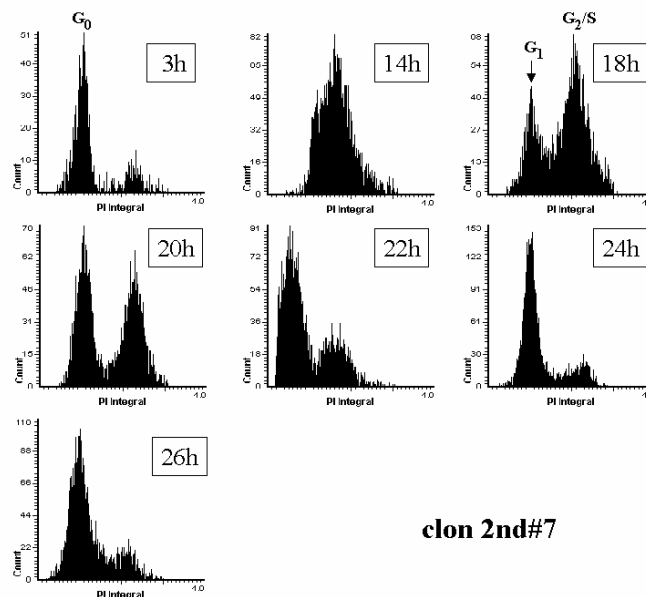
Se observa como en la población de máxima sobreexpresión de anexina A6 (el clon 2nd#7), existe a las 16-18 horas una población (aproximadamente un 30 % del total) en G₁, que no puede provenir de la división celular (resulta un tiempo anormalmente corto), y que por lo tanto pueden considerarse células que no han entrado todavía en fase S. En la línea celular CHO-Anx A6 (con menor cantidad de células positivas), el retraso es intermedio, mientras que en la línea celular CHO salvaje, que carece de anexina A6 sobreexpresada y presenta mínimos niveles de anexina A6 endógena las células no se ven retenidas en G₁.



CHO



CHO-Anx6



clon 2nd#7

Figura 6. La expresión de anexina A6 induce un arresto en fase G1. En la gráfica se indica la fluorescencia (eje ordenadas) emitida por el yoduro de propidio incorporado, con respecto al número de células (eje abscisas). Las horas transcurridas desde la entrada en ciclo se indican en cada gráfica. Se observa como una parte significativa (25-30%) de la población no avanza a través de la fase G₂ (ver punto 18 h) quedando retenida en fase G₀/G₁. Para cada punto se utilizaron contajes mínimos de 4000 células.

ANEXO II

ANEXO II: METODOLOGÍA

A) SUBCLONAJE DE LA ANEXINA A6 EN VECTORES PARA ANÁLISIS FRET

Objetivo: Obtención y expresión en células eucariotas de las proteínas recombinantes anexina A6-CFP y anexina A6-YFP, para la realización de estudios de localización e interacción de proteínas mediante análisis FRET (fluorescence resonance energy transfer).

Material inicial: pcDNA3.1(+)-AnxA6-EGFP (ver apartado *Obtención de Clones*). Vectores **pECFP-N1** y **pEYFP-N1** (Clontech®).

Método:

La estrategia consistió en sustituir la EGFP del pcDNA3.1(+)-A6-EGFP por ECFP o EYFP de los vectores pExFP-N1 (Clontech®). Para ello se sustituye el fragmento comprendido entre la diana *BseRI* (presente en la EGFP) y *Not I* (presente en el plásmido, a continuación de la EGFP), por el fragmento *BseRI-NotI* correspondiente de los vectores *pECFP-N1* y *pEYFP-N1* (ver *Figuras 1 y 2*). La diana *BseRI* (*Figura 2, (b)*), se encuentra dentro de la EGFP (a 32 pb del inicio), si bien este fragmento no reemplazado es idéntico en las secuencias de la EGFP, ECFP y EYFP.

PROCEDIMIENTO:

1- Aislamiento de los fragmentos de la EYFP la ECFP a partir de vectores pExFP-N1

1.1- Digestión total con el enzima *BseRI* de los plásmidos *pEYFP-N1* y *pECFP-N1* de Clontech®.

4 µl plásmido (provenientes de miniprep estándar)

2 µl tampón de restricción nº 2 (New England Biolabs®)

13 μ l H₂O mili Q autoclavada

1 μ l (= 4 U) enzima *BseRI* (New England Biolabs[®])

1 hora a 37 °C

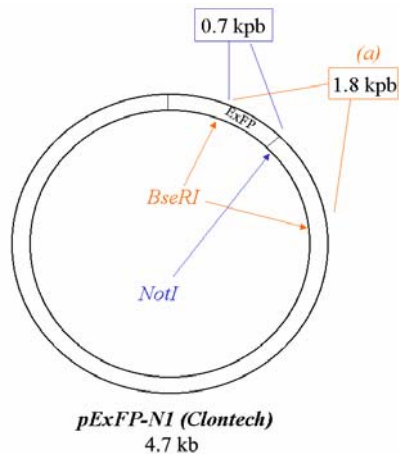


Figura 1

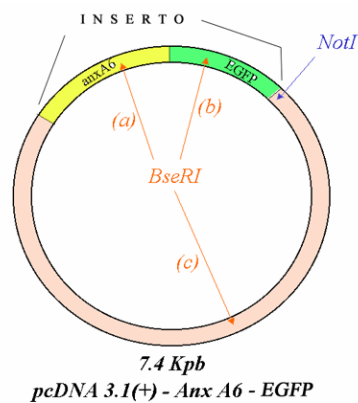


Figura 2

Figura 1 y 2. Esquema de los vectores pECFP, pEYFP y pcDNA-Anx A6-EGFP. Se indican las dianas de restricción utilizadas en la obtención de las construcciones.

1.2- Electroforesis en gel de agarosa de la muestra, se corta la banda de 1.8 Kpb correspondiente al fragmento (a) (ver Figura 1) y se guarda a 4 °C hasta su posterior extracción.

2- Digestión preparativa del vector pcDNA-Anx A6-EGFP

2.1- Digestión parcial del plásmido *pcDNA-Anx A6-EGFP* con *BseRI*. Se recurre a la digestión parcial para evitar que el enzima corte inadecuadamente dentro de la secuencia de anexina A6 de rata ya que contiene, al igual que el plásmido y la EGFP, una diana para el enzima. El fragmento que interesa

obtener proviene de un *único corte*, (banda de 7.4 Kpb), si bien por el momento se desconoce en cuál de las tres dianas se produce la digestión ((**a**), (**b**) o (**c**), ver *Figura 2*).

10 μ l plásmido pcDNA-AnxA6 (aprox. 3 μ g)
5 μ l tampón de restricción nº 2 (New England Biolabs[®])
34.75 μ l H₂O miliQ autoclavada
0.25 μ l (= 1 U) enzima *BseRI* (New England Biolabs[®])

Se incuba la mezcla durante 5 minutos a 37 °C (a los 10 minutos la digestión ya es total).

2.2- Se realiza una electroforesis en gel de agarosa de la muestra y se corta la banda de 7.4 Kpb correspondiente al plásmido linearizado, y se conserva a 4 °C hasta su posterior extracción.

3- Extracción del DNA de las bandas seleccionadas

Del gel de agarosa, se extrae el DNA de las bandas obtenidas (banda 7.4 kpb y banda 1.8 Kpb) mediante la utilización del kit *Concert Rapid Gel Extraction*, (GibcoBRL[®]).

4- Digestión del DNA con NotI

4.1- El DNA obtenido (30 μ l proveniente de cada extracción en gel) se digiere totalmente con *NotI*. Con este paso se permite, por un lado, seleccionar el *pcDNA-Anx A6-EGFP* que presente el corte adecuado de *BseRI* (ver *Figura 3*) y, por otro, eliminar de la *EYFP* y *ECFP* cualquier fragmento proveniente de los vectores de origen *pExFP-N1* (*Figura 1*).

27 μ l DNA extracción en gel
3 μ l tampón de restricción nº 3 (Invitrogen[®])

1 μ l enzima *NotI* (Invitrogen[®])

Overnight a 37 °C

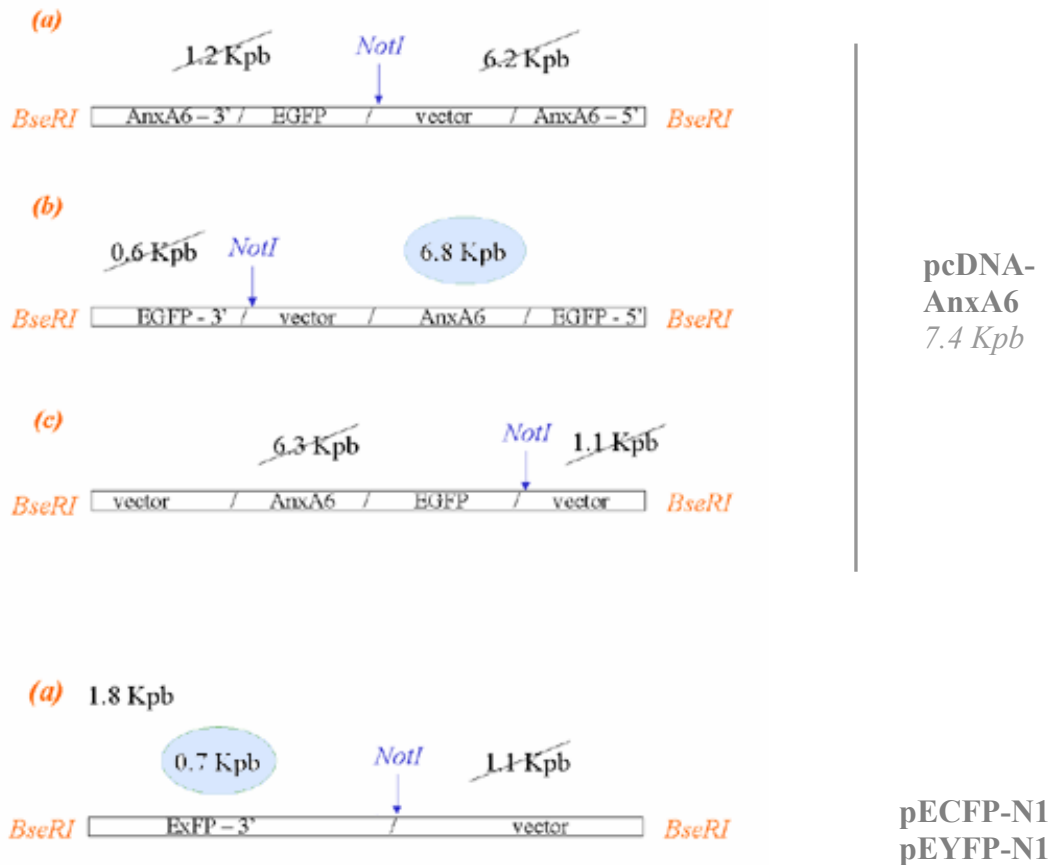


Figura 3. Bandas resultantes de la digestión de cada plásmido (pcDNA-AnxA6, pECFP-N1 y pEYFP-N1), primero con *BseRI* y posteriormente con *NotI*. Se seleccionan para la ligación las bandas de 6.8 y 0.7 Kpb.

4.2- Electroforesis y extracción del DNA de las bandas seleccionadas, acorde con el esquema representado en la *Figura 3* (6.8 Kpb y 0.7 Kpb).

5- Ligación de la EGFP y EYFP aisladas con el vector pcDNA-AnxA6

Ligación del fragmento de 6.8 Kpb con los de 0.7 Kpb (pECFP-N1 ó pEYFP-N1). Para el cálculo de las cantidades relativas del DNA a ligar se sigue la fórmula matemática:

$$\frac{ng \text{ vector} \times (1/\alpha) \times pb \text{ (inserto)}}{pb \text{ (vector)}} = ng \text{ (inserto)}$$

$$\alpha = \text{moles de insertos/mol vector} \approx 5-10$$

2 μ l vector pcDNA 6.8 Kpb

8 μ l inserto 0.7 Kpb

4 μ l tampón de ligación 5 \times (Invitrogen[®])

1 μ l T4 DNA ligasa (Invitrogen[®])

5 μ l H₂O autoclavada (13 μ l en el control de religación sin inserto)

2 horas a 23 °C (extremos cohesivos)

6- Obtención y caracterización de las contrucciones generadas

6.1- Transformación de bacterias DH5 α competentes:

- Añadir, a 100 μ l de bacterias competentes, 15 μ l de la mezcla de ligación.
- Dejar en hielo durante 30 minutos.
- Realizar un choque térmico de 45 segundos a 42 °C.
- Enfriar en hielo durante 2 minutos.
- Añadir 150 μ l de medio LB (sin antibiótico) y dejar recuperar el cultivo durante 1 hora a 37 °C en agitación.
- Sembrar en placas con medio sólido con Ampicilina (50 μ g/ml), para seleccionar las bacterias transformadas con el pcDNA "quimera"

(AnxA6-ECFP, AnxA6-EYFP). Realizar un control con bacterias transformadas con el DNA proveniente de la ligación sin inserto.

- Dejar crecer O/N a 37 °C.

6.2- Minicultivos (en 5 ml de medio líquido LB + Ampicilina 50µg/ml) de 3 de las colonias generadas para cada una de las dos ligaciones, O/N a 37 °C en agitación. -Minipreps del DNA plasmídico mediante el kit *Concert MiniPrep Extraction*, (GibcoBRL®), obteniéndose un total de 6 DNAs de ligaciones independientes.

6.3- Los plásmidos resultantes se testan en un gel de agarosa previa digestión con enzimas de restricción adecuados (ver *Figura 4*). Si la construcción obtenida es correcta se han de observar tres bandas al cortar con *BseRI* (ver *Figura 2*; (a-c) de 5.8 Kpb, (a-b) de 0.7 Kpb, y (b-c) de 1.8 Kpb).

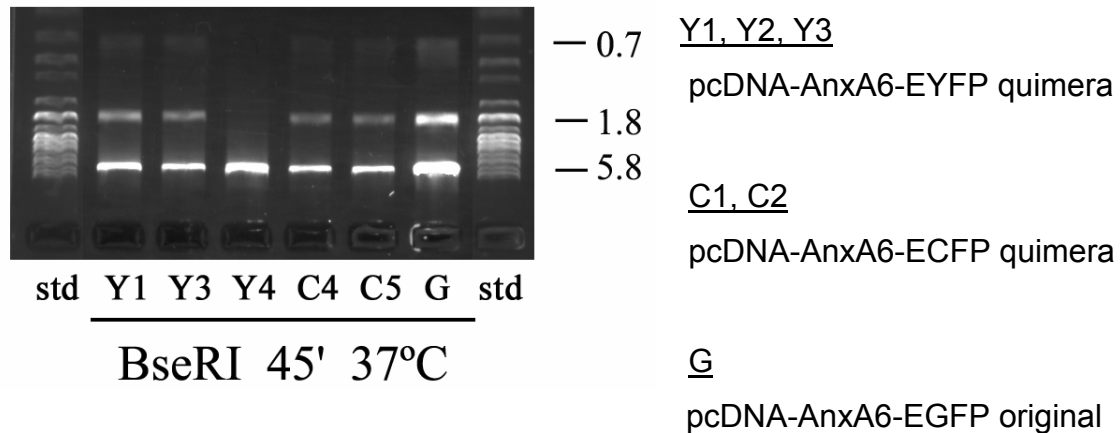


Figura 4. Digestión total con *BseRI* de la construcción original y de las "quimeras" obtenidas. La secuencia reemplazada en las quimeras (correspondiente a el extremo 3' de la secuencia codificante para EGFP) no modifica el mapa de restricción para el enzima, observándose idénticas bandas que en la construcción original (5.8, 1.8 y 0.7 Kpb) (ver *Figura 2*). La construcción Y4 carece del patrón de restricción correcto.

Resultado:

Los plásmidos resultantes son quimeras entre el *pcDNA3.1(+)-AnxA6-EGFP* y los *pEYFP-N1* y *pECFP-N1*. No obstante, el promotor, el gen de resistencia, y la estructura general es la del pcDNA. Por lo tanto los niveles de expresión de AnxA6-YFP y AnxA6-CFP serán similares a los de Anexina A6-EGFP.

Después de asegurar que los insertos eran correctos (a excepción de la construcción Y4, que resulta defectuosa, ver *Figura 4*), comprobamos tanto el patrón de expresión (no alterado por el nuevo tag), como su correcto espectro de absorción-emisión (asegurando que las proteínas fluorescentes son las esperadas y que son funcionales para FRET) (*Figura 5*). Se seleccionan finalmente las construcciones Y1, Y3, C4 y C5 y se preparan stocks de glicerol (al 10%) a partir de cultivos de las colonias de origen.

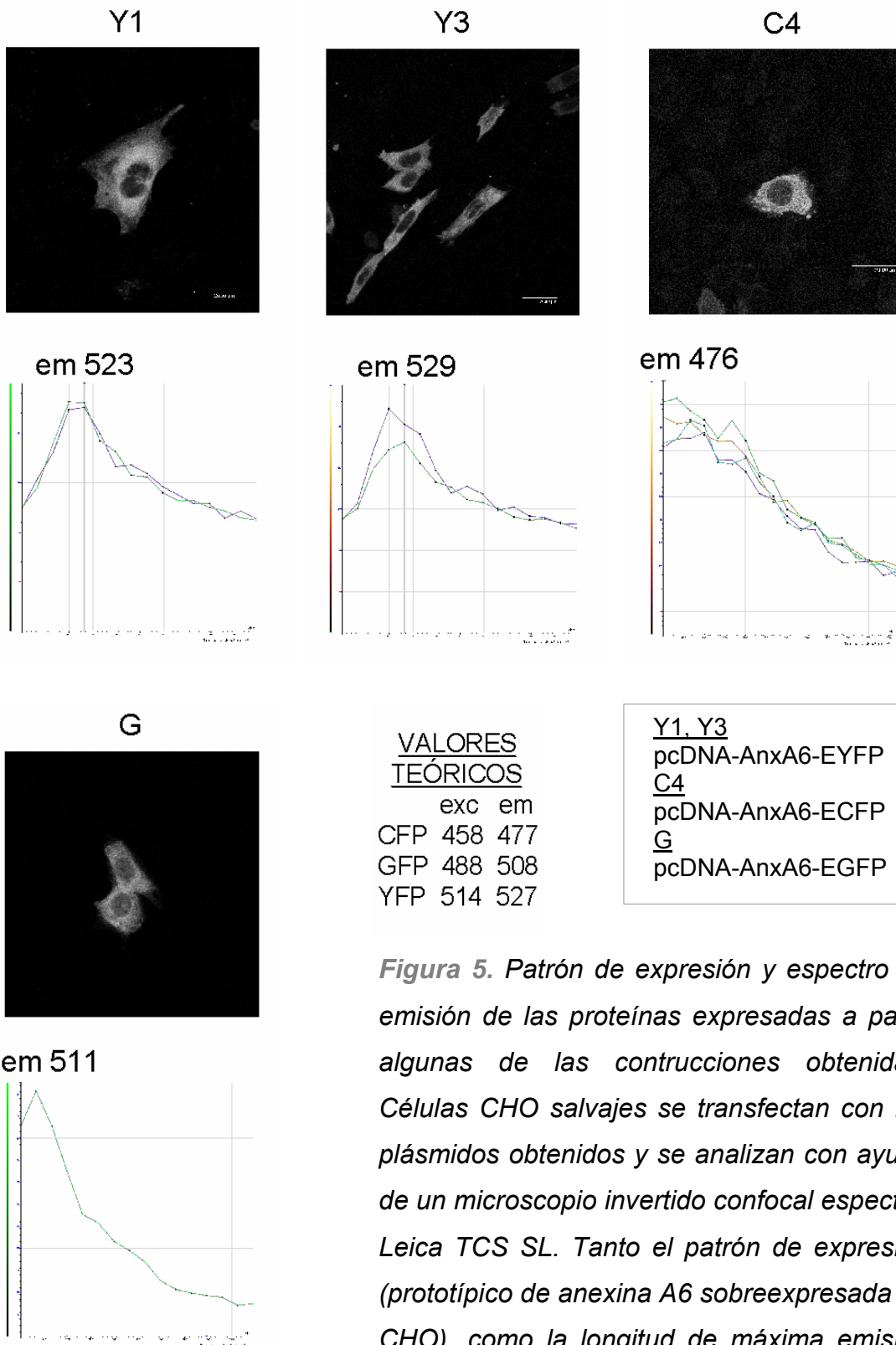


Figura 5. Patrón de expresión y espectro de emisión de las proteínas expresadas a partir algunas de las construcciones obtenidas. Células CHO salvajes se transfectan con los plásmidos obtenidos y se analizan con ayuda de un microscopio invertido confocal espectral Leica TCS SL. Tanto el patrón de expresión (prototípico de anexina A6 sobreexpresada en CHO), como la longitud de máxima emisión por parte de la proteína fluorescente (indicada en cada gráfica) concuerdan con los esperados para cada construcción.

B) OBTENCIÓN DE ANTISUEROS DE CONEJO CONTRA LA REGIÓN LINKER Y N-TERMINAL DE LA ANEXINA A6

Material inicial:

Se encargó la síntesis de dos péptidos, uno correspondiente al extremo N-terminal (péptido AK, residuos 1-20) , y otro correspondiente a la región *linker* (péptido DA, residuos 325-363), de la anexina A6 de ratón. Se obtuvo el correspondiente conjugado a KLH, a través de un residuo Cys C-terminal añadido al péptido (46 % de conjugación para el péptido AK y 24 % para el péptido DA) así como el péptido puro liofilizado. Los animales inmunizados fueron conejos White Zealand, en concreto dos para cada uno de los péptidos (712, 713 para AK, y 708, 709 para DA).

Objetivo:

La obtención de anticuerpos policlonales contra la secuencia de anexina A6 de ratón, que se sumaran a los ya obtenidos anti-GST-anexina A6 (en conejo) y anti-anexina A6 (en oveja) (ambos contra anexina de rata). Este nuevo anticuerpo sería útil en posteriores estudios previstos en ratones *knock-out* para la anexina A6. Además de intentar obtener un marcaje diferente por inmunofluorescencia, dichos anticuerpos, especialmente el que reconoce la región *linker*, podrían presentar propiedades de bloqueo de interacciones proteína-proteína a nivel de dicha región (por ejemplo con p120RasGAP o PKC α) con importantes consecuencias funcionales.

Método:

- 1) Después de la *inmunización primaria*, cada una con 500 μ g del péptido conjugado, se realizaron un total de cuatro *dosis recuerdo* para cada uno de los animales, espaciadas entre ellas aproximadamente 21 días.
- 2) Unos 3 días después de cada recuerdo, se extrae una muestra de suero que se testa por western blot. Al final de el último recuerdo se realizó el desangrado (*bleed out*) de los animales.
- 3) Finalizada la coagulación (2 horas a temperatura ambiente), se recogió cuidadosamente el sobrenadante (*suero*) de la centrifugación suave del plasma

coagulado, evitando tanto la hemólisis (descartando la alícuota en caso necesario) como la recolección de fragmentos de coágulo.

4) El suero obtenido (unos 10-15 ml por animal) se alicuota y congela a -20 °C hasta su utilización.

5) Se testan los antisueros obtenidos para su uso en inmunocitoquímica, western blot e inmunoprecipitación, y utilizando en paralelo el suero preimmune (extraído antes de la inmunización primaria) de cada animal.

Resultado:

La caracterización preliminar de los antisueros revela que aquéllos generados contra la región N-terminal de la anexina (péptido AK, sueros 712 y 713) son plenamente funcionales, incluso a diluciones por encima de 1/2000, para su uso en western blot. Además, estos antisueros son capaces de reconocer la anexina endógena de células CHO, al igual que ocurre con el antisuero ya existente anti-GST-Anexina A6. Podemos concluir en este aspecto que dichos antisueros reconocen la anexina con alta afinidad. Por el contrario, los anticuerpos generados contra la región linker (péptido DA, sueros 708 y 709) no reconocen la anexina A6 sobreexpresada en células CHO por técnicas estándar de electroforesis SDS-PAGE y western blot, no habiéndose testado dicha técnica a partir de electroforesis no desnaturizante.

La falta de reconocimiento de la anexina por parte de los antisueros 708 y 709 podría deberse a una inmunización ineficaz (péptido hidrofóbico y largo) generada por un plegamiento inadecuado. Asimismo podría existir una falta de reconocimiento, por parte del antisuero, de la anexina A6 sobreexpresada en CHO (cuya secuencia proviene de rata), aunque esto último no parece probable por diferir ambas secuencias en tan sólo un residuo de la región. Alternativamente, es posible que el antisuero generado sea incapaz de reconocer al antígeno en condiciones desnaturizantes.

Las pruebas realizadas por inmunocitoquímica revelan que ninguno de los cuatro antisueros generados (708, 709, 712, 713) presenta niveles aceptables de especificidad, con marcajes parcialmente similares obtenidos en los controles de suero pre-immune. La solución a este problema pasa

necesariamente por la purificación del antisuero mediante cromatografía de afinidad, con proteína A inmovilizada a la fase estacionaria o bien con el propio péptido unido covalentemente a una columna.

Finalmente, la inmunoprecipitación tampoco desveló funcionalidad *a priori* de los antisueros para esta técnica, al menos en las mismas condiciones en las que funcionan, por ejemplo, los anticuerpos anti-GST-AnxA6 (principalmente) o sheep anti-anexina A6 (en menor grado). No obstante, y debido a la complejidad de esta técnica, posteriores experimentos cambiando las concentraciones de detergente o de sal en los tampones de inmunoprecipitación y lavado pueden alterar dicho resultado, ya que la afinidad de los nuevos anticuerpos por el antígeno puede ser ligeramente diferente.

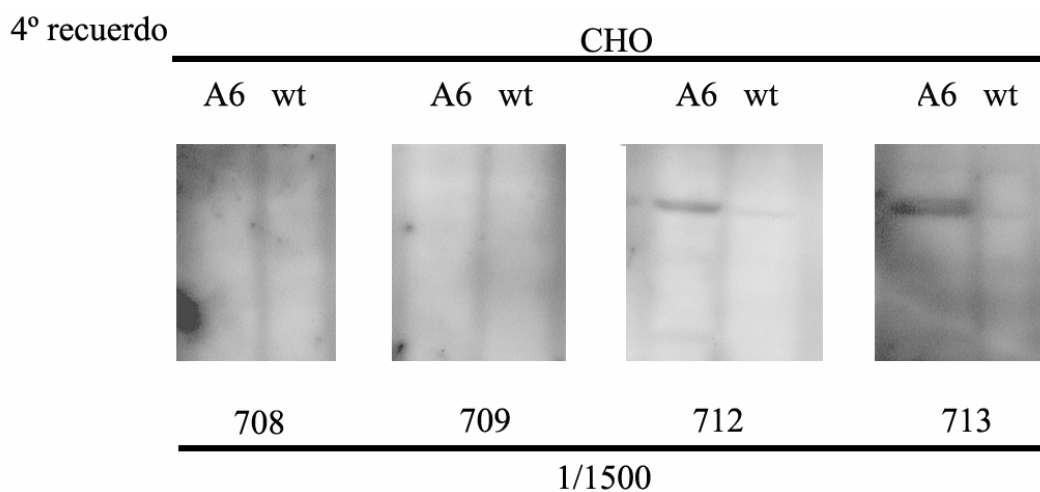
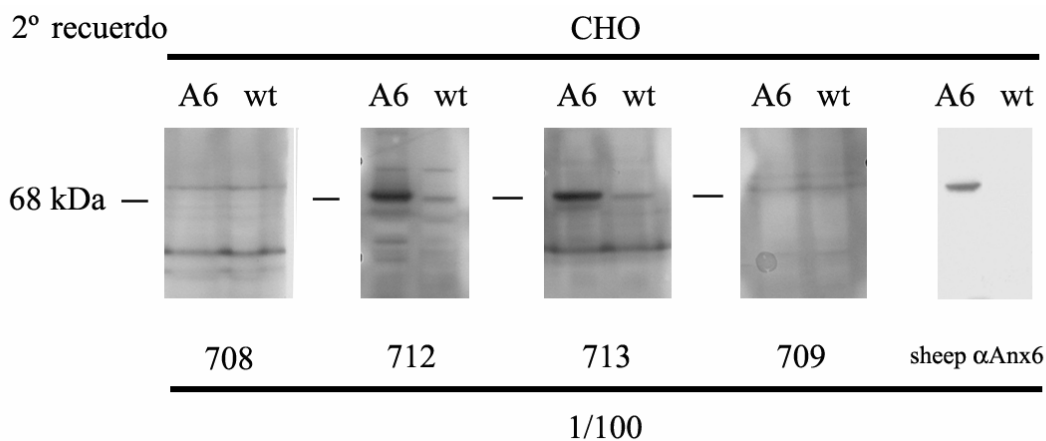


Figura 1. Testado por western blot de los sueros extraídos 3 días después de la tercera (2ª dosis recuerdo) y quinta (4ª dosis recuerdo) inyecciones de péptido. Se observa cómo se optimiza el título de anticuerpo presente, pudiéndose incrementar las diluciones del antisuero final por encima de 1/1500.

Anticuerpos anti-Anexina A6 disponibles en el grupo

SP.	ANTÍGENO / SECUENCIA /	INYECCIÓN DE	NOMBRE (tipo)
Oveja	Péptido N-terminal AnxA6 Rata	MAKIAQGAMYP	sheep anti-anxA6 (purificado cromatografía afinidad)
Conejo	GST-AnxA6 AnxA6 Rata	Proteína completa expresada en <i>E.coli</i> transformadas con pGEX-KG-AnxA6	anti-GSTanxA6 (suero)
Conejo	Péptido N-terminal AnxA6 Ratón	AKIAQGAMYRGSVHDFPEF D-KLH	AK712 AK713 (sueros)
Conejo	Peptido linker AnxA6 Ratón	DAAAQFFPEAAQVAYQMEL SAVSRVELKGTVSAANDFN- KLH	DA708 DA709 (sueros)

Tabla 1. Anticuerpos (o antisueros) generados en nuestro grupo de investigación hasta la fecha. La funcionalidad y diluciones utilizadas se detallan en el apartado Anticuerpos de Material y Métodos.

AK AKIAQGAMYRGSVHDFPEFDC 20 + 1AA
MO AKIAQGAMYRGSVHDFPEFD
HU AKPAQGAKYRGSIHDFPGFD
RA AKIAQGAMYRGSVHDFADFD

DA DAAAQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVSAANDFNC 39 + 1AA
MO DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVCAANDFN
HU DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVARVELKGTVRPANDFN
RA DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFN

Figura 2. Péptidos sintetizados (AK, DA) y secuencias correspondientes de ratón (MO), humano (HU) y rata (RA). La homología en la región es muy elevada (para ambos péptidos) en las tres especies, con lo cuál podemos presuponer que los antisueros reconozcan la anexina A6 de todas ellas. Existen dos residuos que no se corresponden entre el péptido DA, el cuál presentó problemas para su síntesis, y la secuencia de ratón.