

## OBJETIVOS

Los antecedentes del presente trabajo indicaban que la anexina A6 se distribuía mayoritariamente en el compartimento endocítico tardío de varias líneas celulares como WIF-B, NRK y CHO, así como en hepatocitos diferenciados. Se encontró, además, que ejercía una función importante en la vía degradativa. Así, el estudio de la internalización de un ligando como las lipoproteínas LDL en células CHO reveló que las lipoproteínas internalizadas eran capaces de reclutar a la anexina hacia el compartimento endocítico, donde modulaba la degradación del ligando. El hecho de que el colesterol fuese uno de los principales componentes de estas lipoproteínas, y que fuera suficiente para inducir la asociación a membranas *in-vitro* de varias anexinas, nos llevó a establecer la hipótesis de que el lípido podía ser un factor modulador *in-vivo* de la distribución de la anexina A6.

En paralelo a estos resultados se observó, además, que la sobreexpresión de anexina A6 era capaz de interferir en la señalización a partir de la GTPasa Ras, activada principalmente por estímulos mitogénicos. Así, en células CHO que sobreexpresaban anexina A6: 1) se inhibía parcialmente la activación de Ras en respuesta a EGF, suero o ésteres de forbol, 2) se inhibía por completo uno de los principales efectores de Ras, c-Raf, si bien esto no modificaba la vía a niveles inferiores (MEK y ERK). Además, evidencias *in-vitro* (ensayo pulldown) indicaban interacción de la anexina A6 con moléculas de transducción de señal relacionadas con esta vía, como GAP o el propio Raf-1. Otros autores habían descrito la formación de un complejo entre anexina A6, p120GAP, Fyn y Pyk2, así como la asociación en células neuronales entre la anexina A6 y PKC $\alpha$ . El conjunto de estas interacciones calcio-dependientes y el papel observado en la señalización mitogénica por parte de la anexina A6 indicaban que la localización de la anexina podría ser un factor regulador de la transducción de señal.

Recientemente, había sido descrita la activación de las MAPKs por las lipoproteínas HDL las cuáles, al igual que las LDL, constituyen un sistema eficaz de suministro de colesterol hacia el interior de la célula. El hecho que la anexina A6 fuera capaz, por un lado, de modular a las MAPKs y, por otro, la degradación de las LDL, planteó la posibilidad de estudiar ambos fenómenos a

partir del análisis de la fisiología de las HDL y el efecto sobre ésta de la anexina A6, expresada en células CHO.

Los objetivos diseñados a partir de éstas hipótesis previas son:

- 1) Determinar el efecto que el colesterol ejerce sobre la distribución intracelular *in-vivo* de la anexina A6.
- 2) Determinar si existe una población de anexina A6 unida a las membranas en ausencia de calcio y, si es así, investigar si el colesterol modifica dicha asociación.
- 3) Analizar la señalización de las MAPKs a partir de otros estímulos celulares diferentes del EGF, el suero o los ésteres de forbol.
- 4) Analizar la vía señalizadora a partir de las HDL, el papel de la GTPasa Ras y los receptores implicados.
- 5) Observar el efecto de la sobreexpresión de anexina A6 sobre la señalización mitogénica a partir de las HDL.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## **PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS** (expresadas en *E. Coli*)

Este protocolo es específico para la proteína GST-RBD.

### A) Preparación de glicerizados:

- 1) Transformación de bacterias *BL21-PLys* competentes con 0.5  $\mu\text{g}$  del vector pGEX-2T (Amersham Biosciences®) (conteniendo el inserto codifica para la proteína clonado en pauta con el final de la GST) (Ver protocolo de transformación en *Anexo II*).
- 2) Plaqueo en agar sólido LB (1% Triptona- 0.5% Extracto de Levadura- 1% NaCl) conteniendo Ampicilina (25-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- 3) Picado de las colonias resistentes y minicultivo (200 rpm) en medio líquido LB conteniendo Ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Realizar un control negativo con medio sin bacterias.
- 4) Preparación y congelación (a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a partir de 1 ml del minicultivo, de glicerizados (en 10-15% glicerol).

### B) Cultivo de las bacterias e inducción de la síntesis de la proteína recombinante:

- 5) Minicultivo a partir de los *glicerostocks* obtenidos en 5 ml de medio LB (Ampicilina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) O/N a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación.
- 6) Maxicultivo (500 ml) a partir del minicultivo resultante ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación).
- 7) Al alcanzar el cultivo una  $\text{O.D.}_{600\text{ nm}} = 0.8$ , recoger una muestra (a) y a continuación realizar la inducción de la síntesis con IPTG (a una concentración final de 0.4 mM).
- 8) Incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas en agitación. Al final de este período se recoge una muestra (b).
- 9) Dejar 15 minutos en hielo.

C) Purificación de la proteína:

- 10) Centrifugación del cultivo (tubos de 250 ml, rotor GSA, centrífuga Sorvall<sup>®</sup> RC5B) durante 10 minutos a 4000 g (4500 rpm).
- 11) Resuspender en un volumen menor ( $\approx$  35 ml) con el mismo medio y centrifugar a 4000 g (6000 rpm, tubos de 40 ml, rotor SS-34, Sorvall<sup>®</sup> RC5B).
- 12) Descartar sobrenadante y congelar el precipitado a -80 °C.
- 13) Descongelar (en hielo) y resuspender el precipitado en 30 ml de Tampón de Lisis (PBS - 0.5 mM DTT - 1 mM PMSF - 5 mM NaF - 20  $\mu$ M Leupeptina -1 mM Aprotinina - 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) a 4 °C.
- 14) Sonicar (8  $\times$  1 min) en hielo.
- 15) Añadir Triton X-100 (concentración final 1%) e incubar 30 min a 4 °C en agitación.
- 16) Centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4 °C.
- 17) Añadir glicerol al sobrenadante (concentración final 10%).
- 18) Alicuotar en hielo y rápidamente congelar a -80 °C.

Para la obtención de otras proteínas recombinantes (como GST-AnxA6, GST-ERK y GST-MEK), los pasos siguientes varían:

- 13) Descongelar (en hielo) y resuspender el precipitado en 30 ml de Tampón NETN (Tris 20 mM pH 8 - 100 mM NaCl - 1 mM EDTA - 0.5% Nonidet - 5 mM NaF - 20  $\mu$ M Leupeptina -1 mM Aprotinina - 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) a 4 °C.
- 14) Sonicar 3-5  $\times$  10".
- 15) Centrifugar 20 minutos a 15000 rpm (rotor SS-34) y coleccionar el sobrenadante.
- 16) El sobrenadante se purifica añadiendo 2 ml de Sepharosa 4B-Glutathione (Amersham Biosciences<sup>®</sup>) e incubando durante 30-45 minutos a 4 °C. Se centrifuga el precipitado (5 min a 3000 rpm) y se realizan 3 lavados con 20 ml de NETN.

- 17) Se eluye con 2.5 ml de Tampón de Elución (50 mM Tris pH 9.6 - 120 mM NaCl - 20 mM Glutathion reducido). Se puede eluir de nuevo, guardando a parte este segundo eluido.
- 18) Se dializa la proteína ( $\times 2$ ) contra  $10^3$  volúmenes del tampón deseado, normalmente PBS. Se cuantifica, alicuota y congela a  $-80$  °C.

### **PULLDOWN GST-RBD**

Este protocolo esta basado en el descrito por de Rooij J and Bos JL (1997).

Para la preparación del tampón de lisis REB (optimizado para la solubilización de Ras) se preparan previamente soluciones stock conservadas a temperatura ambiente:

stock A Tris/HCL 200 mM pH 7.5 (12.11 gr Tris / 500 ml H<sub>2</sub>O destilada)

stock B EDTA 20 mM (3.72 gr / 500 ml)

stock C NaCl 1 M (29.22 gr / 500 ml)

stock D MgCl<sub>2</sub> 50 mM (5.08 gr / 500 ml)

Para 500 ml de tampón REB:

50 ml A + 50 ml B + 50 ml C + 50 ml D + 5 ml Tritón X-100 + 50 ml Glicerol + 245 ml H<sub>2</sub>O destilada.

Una vez preparado, el tampón REB debe conservarse a 4 °C. De forma inmediata a su utilización, se suplementa con 5 mM NaF, 20  $\mu$ M Leupeptina, 1 mM Aprotinina, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, y 0.5%  $\beta$ -mercaptoetanol, obteniéndose el Tampón de Lisis.

La proteína recombinante GST-RBD se obtiene a partir de la transformación de bacterias *BL21 pLys* (LB + Ampicilina) y siguiendo el protocolo descrito en *Purificación de proteínas*. No obstante, en este caso no es recomendable purificar el lisado final de las bacterias, sino que es preferible alicuotarlo y

congelarlo a -80 °C inmediatamente después de su obtención. Se ha observado que el ensayo no funciona adecuadamente con la proteína purificada.

Los lisados (cuya proteína mayoritaria es GST-RBD) obtenidos en cada purificación deben someterse a una titración, mediante la cuál se determinará la cantidad a utilizar en los sucesivos pulldown. A partir de células activadas con un estímulo potente, como TPA, PDGF o FCS, se realizan varios pulldown con cantidades crecientes de lisado bacteriano (p.ex. 20, 40, 80, 120, 200 µl) y se deduce a partir del western blot la franja de saturación y la menor cantidad de lisado a partir de la cuál no se precipita más Ras activo.

#### A) Preparación de los lisados celulares:

- 1)  $3 \times 10^5$  células CHO se siembran en placas p100 (Costar<sup>®</sup>) en 9 ml de medio de cultivo HAM's F-12 con un 10 % de FCS, y se dejan en el incubador hasta obtener un 70-80 % de confluencia (aprox. 36 h). Durante las 12 horas previas al ensayo, las células son deprivadas en HAM's F-12 0 % FCS, con el fin de reducir al mínimo los niveles basales de Ras activo.
- 2) En el momento del ensayo, se induce la activación de Ras (ver apartado *Tratamientos*) e inmediatamente después las placas se depositan en hielo, lavando (×2) brevemente la monocapa con PBS a 4°C.
- 3) Se aspira el PBS y se añade, por cada placa, 1 ml de Tampón de Lisis a 4°C.
- 4) Con la ayuda de un scraper las células se recogen y las suspensiones se depositan en eppendorfs en hielo durante 10 minutos.
- 5) Se centrifugan los eppendorfs en una microfuga, a 4 °C, durante 10 min a 13500 rpm. El pellet se descarta y el sobrenadante se vuelve a centrifugar de igual forma (eliminando por completo cualquier



fragmento de membrana, que puede incrementar al background del ensayo).

- 6) Se cuantifica la concentración de proteína del sobrenadante (método Bradford ó Lowry).
- 7) Se preparan muestras a partir de 10-20  $\mu\text{g}$  de cada sobrenadante, que servirán como control de la correcta solubilización de Ras.

B) Preparación de las *beads* (simultáneamente a A):

- 1) *Beads* de Glutathiona-Sepharosa ((Pierce®) se agrupan [(40  $\mu\text{l}$   $\times$  n° ensayos) +10%] en un mismo eppendorf, y se lavan en 500  $\mu\text{l}$  de tampón REB.
- 2) Se descarta el sobrenadante de la centrifugación (spin) y se añade al eppendorf la cantidad de lisado bacteriano (mayormente GST-RBD) determinada en la titración. Normalmente se añaden unos 35  $\mu\text{l}$  de GST-RBD por cada 40  $\mu\text{l}$  de *beads*.
- 3) Se incuba el eppendorf con la mezcla a 4°C en agitación durante 45 minutos. *Durante este tiempo de conjugación se recomienda realizar los lisados celulares.*
- 4) La mezcla de *beads* (conjugadas con GST-RBD), sin dejar depositar, se alicuota en tantos eppendorfs como ensayos queramos realizar. Después de centrifugar (spin) los eppendorfs, las *beads* se lavan 3 veces con 1 ml de tampón REB a 4 °C, obteniéndose los precipitados destinados al ensayo.

NOTA: Pipetear las *beads* con punta recortada.

C) Incubación:

- 5) A cada uno de los precipitados de *beads* conjugadas se añaden 600  $\mu\text{g}$  (600  $\mu\text{l}$  en las condiciones mencionadas) del lisado celular correspondiente. Con cada placa p100 se pueden realizar dos ensayos.

- 6) La mezcla se incuba durante 2 horas ( $\pm$  10 minutos) en agitación orbital a 4 °C. Modificaciones en este tiempo alteran la eficiencia del ensayo.
- 7) Para realizar los lavados, se centrifugan los eppendors durante 1 minuto a 13500 rpm ( $\approx$ 16000 rpm, en microfuga) y el sobrenadante (fracción no-unida) se aspira cuidadosamente sin arrastrar las *beads*. Para asegurarnos de ello acoplamos al extremo del tubo (conectado a la bomba) una punta de electroforesis (cuyo diámetro interno es menor que el tamaño de las *beads*). Se añade 1 ml de Tampón REB y se repite el proceso, hasta realizar 3-4 lavados.
- 8) El precipitado final se resuspende en 30  $\mu$ l de tampón de muestra 2 $\times$ . Se hierven las muestras durante 3 minutos en un baño seco.

#### D) Electroforesis y western blot:

Las muestras (pulldown y controles positivos) se cargan en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 12% (Laemmli UK, 1970). Los pulldown, que contienen *beads*, deben centrifugarse previamente, cargándose tan sólo 30  $\mu$ l del sobrenadante. Después de una transferencia de 2 horas a 60 V (y a 4 °C), preferiblemente a membranas de nitrocelulosa (que empíricamente retienen mejor las proteínas que el PVDF), las membranas se someten a western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra panRas (Oncogene OP-40, ab3), diluido 1/100.

#### LOWRY-SDS

Este método de cuantificación de proteína minimiza la interferencia del detergente SDS.

#### SOLUCIÓN A:

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0.02% NaK Tartrato (NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>• 4H<sub>2</sub>O)

0.1 M NaOH

SOLUCIÓN B:

0.5% CuSO<sub>4</sub>

5% SDS

SOLUCIÓN C

Reactivo Folin:H<sub>2</sub>O (1:2)

- 1) Preparar curva patrón 2µg/ml ⇒ 0.0625µg/ml.
- 2) Mezclar, en cada cubeta, 20 µl de muestra y 80 µl de NaOH 0.1 M.
- 3) Añadir 1 ml de SOLUCIÓN A:B (49:1).
- 4) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y tapado de la luz.
- 5) Añadir a cada tubo 100 µl de SOLUCIÓN C.
- 6) Mantener en oscuridad y agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Medir absorbancia en espectrofotómetro (760 nm, también 595 nm).

### **MEDIDAS DE CALCIO INTRACELULAR**

El fluoróforo utilizado es el Fluo 4-AM (Molecular Probes<sup>®</sup>). Es un fluoróforo no radiométrico, cuyo espectro de absorción-emisión se asemeja al del FITC (lo que permite trabajar con láseres convencionales); en nuestro sistema (células CHO) se muestra más adecuado que el el Calcium Orange (Molecular Probes<sup>®</sup>) o el radiométrico FURA-PE3 AM (Texas Fluorescence Labs<sup>®</sup>), obteniéndose fácilmente una carga generalizada y con moderado grado de compartimentalización.

La compartimentalización interfiere en el funcionamiento de la técnica, ya que el fluoróforo incorporado es secuestrado (disminuyendo su concentración citosólica) en los compartimentos intracelulares.

Para evitar en lo posible este fenómeno, debe reducirse la temperatura, realizándose la carga con el fluoróforo y los lavados posteriores a temperatura

ambiente, e incrementándose (hasta 35 °C) en los 3-5 minutos previos a la medida del calcio (para no afectar al metabolismo del catión). Una vez incrementada la temperatura las medidas deben realizarse con la mayor brevedad posible.

Hemos observado, además, que la concentración de calcio en el medio extracelular influye en la producción de los incrementos intracelulares. Así, las células CHO generan mayores incrementos de calcio intracelular en presencia de medio DMEM (0.26 g/l de CaCl<sub>2</sub>) que en presencia de HAM's F-12 (0,044 g/l).

Los sistemas utilizados, indistintamente, para observar *in-vivo* y con elevada resolución el cultivo son dos: por un lado, una cámara Attofluor (Molecular Probes<sup>®</sup>) acoplada a cubreobjetos de 22 mm Ø (Electron Microscopy Sciences<sup>®</sup>) y a una membrana Foil Cover (Leica<sup>®</sup>), y por otro, placas de Petri de 35 mm Ø con cubreobjetos incrustado (Mat Tek<sup>®</sup>).

Para realizar el ensayo se deben preparar, alicuotar y congelar a -20 °C las siguientes soluciones:

- Fluo 4-AM 1 mM en DMSO (o bien solución *ready-made*: Molecular Probes<sup>®</sup> F14217)
- Pluronic 20% en DMSO (solución *ready-made* Molecular Probes<sup>®</sup> P 3000).

- 1) Las células se siembran en cubreobjetos de vidrio o placas p35 para microscopía *in-vivo*, en medio de cultivo HAM's F-12 10% FCS, manteniéndose en el incubador hasta alcanzar una confluencia del 60-70 %.
- 2) Se lava brevemente la monocapa con tampón HBSS (Hepes-buffered Balanced Salt Solution).
- 3) Después de aspirar el tampón, se añade a las células medio de cultivo DMEM-Hepes (sin colorante indicador de pH, GibcoBRL<sup>®</sup>), suplementado con un 0.1 % de BSA. Las células se deprivan en este medio durante 1 hora en el incubador, y posteriormente se dejan

equilibrar durante 10 minutos a temperatura ambiente (que será la temperatura de carga con el fluoróforo).

4) Carga de las células:

Para ello se añade, al medio DMEM-Hepes, el fluoróforo Fluo 4-AM mezclado con el detergente Pluronic<sup>®</sup> (que incrementará la solubilidad de éste). La concentración final de Fluo 4-AM es de 2  $\mu$ M y la de Pluronic de 0.02%.

*Se mezclan 3  $\mu$ l de Fluo 4 -AM 1 mM y 1.5  $\mu$ l de Pluronic al 20 %, y se añaden a 1.5 ml de medio DMEM-Hepes*

Se incuba durante 30-45 minutos a temperatura ambiente, en agitación suave y tapado de la luz.

- 5) Lavado rápido (3×1') de las células con tampón HBSS (*Hepes Balanced Salt Solution*) a temperatura ambiente.
- 6) Añadir un volumen conocido de medio DMEM-Hepes-0% FCS-0.1% BSA (atemperado a 35-37 °C), y dejar en el microscopio (equilibrado a 35°C y 5% de CO<sub>2</sub>) por espacio de 3-5 minutos. En el caso de utilizar cubreobjetos para microscopía in-vivo, se extrae éste de la placa, se prepara el sistema cubre-soporte y se añade rápidamente el medio.
- 7) Se enfoca el campo deseado y se realiza la medida del calcio en condiciones basales.
- 8) Se realiza el tratamiento objeto de estudio (ver *Tratamientos*). El compuesto añadido debe estar preferiblemente disuelto en medio en un volumen similar al existente en la placa o cubre, favoreciendo una respuesta homogénea y sincrónica.
- 9) Al finalizar el experimento, debe inducirse un incremento final de calcio con un ionóforo potente como la Ionomicina 1 $\mu$ M, para comprobar el porcentaje de células no-responsivas que se han cargado adecuadamente.

## **PREPARACIÓN (DIÁLISIS) DE LAS HDL**

La subfracción de lipoproteínas HDL<sub>3</sub> (libre de ApoE) era obtenida por el Dr. Franz Rinninger siguiendo el protocolo descrito (Rinninger F. et al., 1994) y enviada a nuestro laboratorio en Bromuro de Potasio (KBr) disuelto en PBS, solución que previene de la rápida oxidación de la lipoproteína. Para evitar la interferencia de dicha sal en los ensayos de activación de las MAPKs, las lipoproteínas son dializadas (pocas horas antes de su utilización) en tampón PBS.

Las pruebas realizadas desaconsejan la diálisis tradicional con PBS, que requiere varias horas en contacto con el aire, en comparación con la diálisis mediante cromatografía de exclusión molecular (realizada en pocos minutos). Las lipoproteínas dializadas con el segundo sistema, menos oxidadas en el proceso, mantenían por más días la capacidad de activar Ras (si bien, incluso en este caso, al cabo de una semana desaparecía por completo).

La cromatografías se realizan, pocas horas antes de los ensayos, con el kit de columnas PD-10 (Amersham<sup>®</sup>):

- 1) La solución conservadora de la columna (conteniendo azida sódica) se elimina mediante un equilibrado con 5 volúmenes de PBS.
- 2) Una vez ha entrado el PBS en el lecho cromatográfico, y sin dejar secar, se añaden las HDL en un volumen de 2,5 ml.
- 3) Dejar incorporar las HDL a la columna.
- 4) Añadir 3,5 ml de PBS y colección inmediata de las fracciones 5 × 1 ml.
- 5) Cuantificación de la proteína (=apolipoproteína) de cada fracción (Lowry). Las más concentradas suelen ser la 2<sup>a</sup> y la 3<sup>a</sup>, no encontrándose proteína en la 1<sup>a</sup> y la 5<sup>a</sup>. A partir de una concentración de la muestra inicial de 10 mg/ml se obtienen concentraciones finales de 4 a 5 mg/ml.

## **OBTENCIÓN DE HDL FLUORESCENTES (CONJUGACIÓN Apo-Cy3)**

Las HDL pueden ser marcadas de varias formas, en función de si nos interesa seguir los lípidos internalizados o bien la partícula de HDL (que principalmente permanece en la superficie). El método utilizado en el presente trabajo consiste en el marcaje de la partícula a través de la conjugación del fluorocromo Cy3 con las proteínas de la cubierta. En nuestro caso dicho marcaje nos sirvió para determinar el grado de colocalización de las HDL con el receptor SR-BI.

El proceso es muy simple, y se requiere:

- a) Cy3 (fluocromo) en polvo (Amersham<sup>®</sup>, *Cy3Dye Pack*). Kit comercial con viales preparados para la conjugación de 1 mg de proteína.
- b) 1 mg de HDL a una concentración de 2 mg/ml en PBS.
  - 1) Se añaden 50µl de bicarbonato sódico 1 M a 500 µl de HDL (1 mg).
  - 2) Añadir estos 550 µl a un vial de Cy3.
  - 3) Conjugación durante 1 h en agitación y tapado de la luz.
  - 4) Diálisis en columna PD-10 (ver *Preparación de las HDL*).
  - 5) Una vez los 550 µl del conjugado se han incorporado a la fase estacionaria se añaden 2,35 ml de PBS. Conforme el PBS se introduce en la columna desplaza a la banda roja más rápida (conjugado). Finalizado este proceso se colecta la banda (HDL<sub>3</sub>Cy3; 1ml a 1mg/ml) al añadir 1 ml adicional de PBS.

Microscopía de fluorescencia HDL<sub>3</sub>-Cy3:

- 6) Después de sembrar células en cubreobjetos y obtener una densidad del cultivo del 60%, se deprivan O/N en medio HAM's F-12-0,5% FCS.
- 7) A continuación y sin fijar las células, se enfría la placa en hielo por espacio de 5 minutos.
- 8) Se realiza un lavado rápido de las células en HAM's F-12-0% FCS.

- 9) Se incuban la monocapa en presencia de HAM's F-12-0% FCS-1% BSA-50 µg/ml HDL<sub>3</sub>Cy3 durante 1 h a 4 °C.

NOTA: La concentración indicada de HDL<sub>3</sub>Cy3 se refiere a células CHO que sobreexpresan el receptor SR-BI (CHO-SRBI). En células CHO-WT ó CHO-Anx A6 ésta debe incrementarse hasta 200 µg/ml.

- 10) Se lavan las células (2 ×1 min) en HAM's F-12-0% FCS a temperatura ambiente, seguido de un lavado de 10" en PBS.

- 11) Se fijan las células con PFA 4% en PBS y se realiza la inmunofluorescencia contra el receptor SR-BI (anticuerpo KKB.1; dilución 1/500).

NOTA: Al tratarse de un epítopo extracelular e intentar detectar la unión a superficie, la permeabilización de las células no es recomendable.

## **IMMUNOCITOQUÍMICA**

El protocolo de inmunocitoquímica se deriva del utilizado en el grupo del Dr. Grewal (University of New South Wales, Sydney). La observación de las muestras se realiza, dependiendo del experimento, en un microscopio confocal espectral (Leica<sup>®</sup> TCS SL) o bien en un microscopio de epifluorescencia invertido (Zeiss<sup>®</sup> Axiovert 200) acoplado a una cámara digital de alta resolución (Photometrics Cool SNAP-HQ).

- 1) Las células se siembran en cubreobjetos de 12 mm Ø y se cultivan hasta obtener un 65 % de confluencia. Por ejemplo,  $0.8 \times 10^6$  células en una placa de Petri de 100 mm Ø (y 36 horas en cultivo).
- 2) La adhesión completa de las células CHO al vidrio requiere del cultivo durante al menos 36 horas post-siembra. Un menor tiempo de espera conlleva la pérdida de células en la fijación o la aparición de artefactos morfológicos.
- 3) Alternativamente se pueden recubrir los cubreobjetos de vidrio con Silane<sup>®</sup>:

-Mezcla Silane:Acetona (1:50) (100 ml).



-Filtrado (esterilizado) rápido de la mezcla con filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  acoplado a jeringa de 50 ml.

-Se añade el filtrado, en condiciones estériles, sobre los cubreobjetos autoclavados, depositados sobre una placa de Petri (preferiblemente de cristal).

-Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente agitando ligeramente la placa cada minuto.

-Decantar el líquido y añadir Acetona 100%, e incubar durante 5 minutos del mismo modo.

-Lavar ( $\times 2$ ) con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ estéril.

-Dejar secar la placa a 37°C.

- 4) Se lava la monocapa brevemente con PBS a temperatura ambiente.
- 5) Las células se fijan en PBS-4% PFA (preferiblemente a partir de solución comercial al 16 % -Electron Microscopy Sciences<sup>®</sup>-) durante 25 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente se pueden fijar con MetOH al 100 % durante 2 min a -20°C (permeabilizando a la vez).
- 6) Incubación en PBS-Glicina 0.5%-saponina 0.05%, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente se pueden incubar las células en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM durante 5 minutos.

NOTA: En caso de no requerirse la permeabilización de las células se realiza el proceso de inmunocitoquímica en ausencia de saponina.

- 7) Bloqueo (20 minutos a temperatura ambiente) en PBS- Glicina 0.5%-saponina 0.05%-BSA 2%.
- 8) Incubación (1 hora a 37 °C, en cámara húmeda) con el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo. Por cada cubreobjetos se preparan 50  $\mu\text{l}$  de la dilución final.
- 9) Lavado ( $\times 1$ ) con PBS a temperatura ambiente.
- 10) Lavado ( $2 \times 5\text{min}$ ) con PBS-Glicina 0.5%-saponina 0.05%.
- 11) Incubación (50 min a 37 °C, en cámara húmeda) con la solución de anticuerpo secundario (en solución de bloqueo). Antes de añadir a las células centrifugar la solución final durante 5 minutos a 13500 rpm (microfuga).

- 12) Lavados ( $3 \times 3$  min) en PBS a temperatura ambiente.
- 13) Inmersión (1 segundo) del cubre en H<sub>2</sub>O mili Q. Absorber con papel de filtro el exceso de agua e inmediatamente montar en Mowiol<sup>®</sup>.

## **FRACCIONAMIENTO CELULAR**

El método utilizado (gradiente discontinuo de sacarosa) permite el aislamiento de fracciones enriquecidas en los compartimentos endocíticos temprano y tardío (Gorvel JP et al., 1991).

En primer lugar, se deben preparar las siguientes soluciones:

- |                                |   |               |
|--------------------------------|---|---------------|
| Tampón de homogenización (HB): | Imidazol 3 mM                                       | pH 7.4        |
|                                | Sacarosa 250 mM (8%)                                |               |
| Tampón de Lisis:               | HB + (20 μM Leupeptina, 1 mM Aprotinina, 1 mM PMSF) |               |
| Sacarosa Pesada:               | Solución al 64% en H <sub>2</sub> O.                |               |
| Sacarosa 25 %:                 | Imidazol 3 mM pH 7.4                                | Sacarosa 25 % |
| Sacarosa 35 %:                 | Imidazol 3 mM pH 7.4                                | Sacarosa 35%  |

Las densidades se comprueban con ayuda de un refractómetro.

### **A) Preparación de la muestra:**

- 1) Cada gradiente se realiza a partir de  $30 \times 10^6$  células (80-90% de confluencia).
- 2) Se lava rápidamente la monocapa con PBS a 4°C.
- 3) Se resuspende cuidadosamente la monocapa con ayuda de un scraper, en 5 ml PBS/flascón 150 cm<sup>2</sup>.

Las células deben mantenerse íntegras en este punto, por lo que deben utilizarse puntas o pipetas gruesas. Se recogen las

suspensiones en falcons y las células se precipitan mediante 5 minutos de centrifugación suave (500 g).

- 4) El precipitado se resuspende (punta gruesa) en tampón HB a 4 °C, y se centrifuga algo más rápido (1400 g), durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- 5) Resuspensión de las células en Tampón de Lisis a 4°C. En este momento se deben lisar las células, homogenizando con ayuda de una jeringa de 5 ml acoplada a una aguja de 22 G (sin crear burbujas). Cada 5 emboladas debemos observar la suspensión al microscopio, deteniendo el proceso al observar la mayoría de núcleos libres de material adherido.
- 6) Centrifugar a 1400 g (15 min a 4°C), obteniéndose la fracción PNS (sobrenadante) libre de núcleos.

#### B) Obtención y carga del gradiente:

- 7) Se utilizan tubos de ultracentrífuga Beckman<sup>®</sup> y el rotor SW 50.1
- 8) Se prepara (a 4 °C) la muestra a una concentración final del 40.6% de sacarosa. Para ello se mezcla la fracción PNS obtenida con un volumen calculado de sacarosa al 64%, acabándose de ajustar con ayuda del refractómetro.
- 9) El gradiente se obtiene al añadir, comenzando por la base del tubo, 1.2 ml de muestra al 40.6 %, 1.5 ml de solución sacarosa 35 %, 1 ml de solución sacarosa al 25 %, y enrasando a 5 ml con tampón HB. Los diferentes tubos deben ser equilibrados en una balanza de precisión.
- 10) Se centrifugan los tubos durante 1 h a 36000 rpm (120000 g) a 4 °C.

Las g se calculan aplicando la fórmula:

$$RCF (g) = 11.18 \times r \times (\omega/1000)^2$$

Donde *r* se calcula en *cm* y  $\omega$  son las *rpm*.

### C) Colección de las fracciones:

- 11) Se extraen las fracciones (desde arriba) correspondientes a las interfases 25%-8% (Endosomas tardíos o *Late*) y 35%-25% (Endosomas Tempranos o *Early*). La interfase 40.2%-35% contiene las fracciones de membrana más pesadas.
- 12) Cuantificación de la proteína de las fracciones (Bradford).
- 13) Se precipitan la proteína de las fracciones con TCA:
  - Añadir a la muestra TCA hasta obtener una concentración final del 10%.
  - Mezclar y dejar 10 minutos en hielo.
  - Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad (micrifuga).
  - Resuspender el precipitado en acetona a -20°C.
  - Mezclado con vortex.
  - Centrifugación de 10 minutos a máxima velocidad (microfuga).
  - Secar el precipitado a 37 °C. Resuspender en un tampón con SDS.

### IMMUNOPRECIPITACIÓN

- 1) Las células ( $0.8 \times 10^6$ ) se siembran en placas de 100 mm  $\varnothing$  (Costar<sup>®</sup>) y se cultivan 36 horas hasta alcanzar un 70-80 % de confluencia.
- 2) Se lavan ( $\times 2$ ) las células con Tampón HB (50 mM Tris-150 mM NaCl-5 mM EDTA, pH 8) a 4 °C.
- 3) La monocapa se resuspende en 1 ml de Tampón de Lisis (HB + [5 mM NaF, 20  $\mu$ M Leupeptina, 1 mM Aprotinina, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.1% Tritón X-100]) a 4 °C, con ayuda de un *scraper*.
- 4) Homogeneizar la suspensión con una aguja de 25 G acoplada a una jeringa de 5 ml (10 emboladas). Incubar en hielo durante 10 minutos.
- 5) Centrifugar a 4 °C durante 5 minutos a 13500 rpm (microfuga).
- 6) Recoger sobrenadante en otro tubo y centrifugar de igual modo.

- 7) Incubar, a 4 °C en agitación orbital, 450 µg (≈450µl) del sobrenadante con 1 µg del anticuerpo, durante 2 horas-O/N.
- 8) Añadir 40 µl de proteína A/G-Sepharosa (Pierce ©) e incubar en las mismas condiciones durante 1 hora.
- 9) Centrifugar 30 segundos a 14000 rpm (microfuga) para precipitar las bolas de agarosa. La fracción no unida (sobrenadante) se recoge como control del ensayo.
- 10) Lavar (×3) el precipitado, durante 5 minutos en agitación orbital, con 1 ml de Tampón HB a 4 °C.
- 11) Añadir al precipitado 40 µl de tampón de muestra 2×.
- 12) La presencia de SDS en el tampón de muestras y el hervido de las mismas desnaturizará las inmunoglobulinas, hecho que debe ser considerado para el análisis por western blot (técnica en la que es recomendable, además, la utilización de un segundo anticuerpo contra la proteína generado en una especie distinta).

### **ENSAYO DE ACTIVIDAD RAF**

Este protocolo deriva del descrito anteriormente (Marais R et al., 1995).

#### Tampón de Lisis:

20 mM Tris-HCl, pH 7.5  
2 mM EDTA  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 % (v/v) Triton X-100  
10 % (v/v) Glicerol  
0.5 % β-Mercaptoetanol

#### Tampones de Lavado (TL):

TL1: TL3 + 1 M KCl  
TL2: TL3 + 0.1 M KCl

TL3: 30 mM Tris  
0.1 mM EDTA  
0.3 %  $\beta$ -Mercaptoetanol  
10 % Glicerol  
0.1 % Triton X-100  
5 mM NaF  
0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

Tampón MEK:

30 mM Tris pH 7.5  
0.1 mM EDTA  
0.3 %  $\beta$ -Mercaptoetanol (v/v)  
0.1 % Triton X-100 (v/v)  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
5 mM NaF  
0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   
0.8 mM ATP  
6.5  $\mu\text{g/ml}$  GST-MEK  
100  $\mu\text{g/ml}$  GST-ERK

Tampón Kill:

30 mM Tris-HCl pH 7.5  
6 mM EDTA  
0.3 %  $\beta$ -Mercaptoetanol (v/v)  
0.1 % Triton X-100 (v/v)  
5 mM NaF  
0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

Tampón MBP:

50 mM Tris-HCl pH 7.5  
0.1 mM EDTA  
0.3 %  $\beta$ -Mercaptoetanol (v/v)  
0.1 % Triton X-100 (v/v)  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
5 mM NaF

0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
500 µg/ml Myelin Basic Protein  
0.1 mM ATP  
2 mg/ml BSA  
50 µCi/ml [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

A) Obtención de los lisados celulares:

- 1) Las células ( $0.8 \times 10^6$ ) se siembran en placas de 100 mm  $\varnothing$  y se cultivan a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24-36 horas. Anteriormente a cada ensayo las células se deprivan durante 12 horas en medio sin FCS.
- 2) Después de activar la señalización con el estímulo deseado (ver *Tratamientos*), la monocapa se lava ( $\times 2$ ) rápido con PBS, se aspira y se añaden 500 µl/placa de Tampón de Lisis a 4 °C.
- 3) Se resuspenden las células con ayuda de un scraper y la suspensión se centrifuga a 13500 rpm (microfuga) durante 5 minutos a 4 °C.
- 4) Se cuantifica la proteína del sobrenadante (Bradford).
- 5) Cada ensayo requiere de 400 a 900 µg de proteína.

B) Immunoprecipitación de Raf-1:

- 6) Conjugación, por cada muestra, de 25 µl de proteína G-Sepharosa (Sigma<sup>®</sup>) y 2.5 µg de anti-Raf-1 (Transduction Labs R19120), en un volumen de 150 µl (enrasado con PBS), durante 12 horas a 4 °C y en agitación orbital.
- 7) Se lava el conjugado ( $\times 2$ ) con PBS, y se añade al precipitado la cantidad indicada del lisado celular.
- 8) Se incuba durante 2 horas a 4 °C en agitación orbital.
- 9) Se realizan tres lavados del precipitado (pulso 10 segundos) con los tampones de lavado TL1 > TL2 > TL3 (fuerza iónica

decreciente). La última centrifugación (90" a 13500 rpm) permite aspirar completamente el sobrenadante.

C) Ensayo kinasa:

- 10) Añadir 20 µl de tampón MEK a cada muestra e incubar 30 min a 30 °C. El control de background se realiza con 20 µl de Tampón de Lisis más el tampón MEK.
- 11) Después de la incubación, parar la reacción añadiendo 20 µl de Tampón Kill y dejar en hielo.
- 12) Centrifugar 4 min a 13500 rpm a 4 °C.
- 13) Recoger 24 µl del sobrenadante. A partir de éste, pipetear triplicados de 6 µl cada uno (como control del paso final). Dejar en hielo.
- 14) Se añaden 24 µl de tampón MBP a cada punto e incubar durante 15 min a 30 °C.
- 15) Añadir 24 µl de la mezcla incubada a filtros P-81 Millipore® (3 × 3 cm) e inmediatamente lavar (3 × 20 min) en 75 mM de ácido ortofosfórico (en un recipiente con un agitador magnético).
- 16) Añadir cada filtro a un vial con 4 ml de líquido de centelleo y contar la radiactividad (contador de centelleo).

### **ENSAYOS DE BINDING DE <sup>125</sup>I-HDL**

El protocolo descrito deriva del publicado anteriormente (Biesbroeck R et al., 1983; Oram JF et al., 1983).

Este ensayo requiere que la monocapa de células sea homogénea y la confluencia total, ya que se pretende exponer una superficie de membrana equivalente y reducir al máximo la unión inespecífica de la partícula radiactiva al plástico de cultivo.

En los ensayos descritos en el presente trabajo se utilizó <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> (134000 cpm/µl; 1.0 µg/µl) y HDL<sub>3</sub> (5.69 µg/µl) como ligando no-radiactivo.



- 1) Células CHO-WT o CHO-AnxA6 se siembran por cuadruplicado (placas 12-pozos) y mantienen 24 horas (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) en presencia de medio HAM's F-12-10 % FCS.
  - 2) Deprivar el cultivo durante 8-12 horas en medio HAM's F-12-0.5 % FCS.
  - 3) Pretratamiento -/+ 2 % Ciclodextrina en 0.5 % FCS Ham's F-12, durante 45 minutos a 37 °C.
  - 4) Enfriar las células en hielo durante 15 minutos.
  - 5) Preparar las soluciones requeridas para el ensayo (a 4°C):
    - Solución 1 (<sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> 10 µg/ml)
      - 9900 µl 2 mg/ml BSA en Ham's F-12-0% FCS
      - 100 µl <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>
    - Solución 2 (<sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> + 50 veces HDL<sub>3</sub>)
      - 9021 µl 2 mg/ml BSA en Ham's F-12-0% FCS
      - 879 µl HDL<sub>3</sub>
      - 100 µl <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>
  - 6) Lavar cuidadosamente la monocapa con PBS a 4 °C (2 ml/pozo).
  - 7) Incubar las células con 500 µl de Solución 1 ó 2, durante 2 h en hielo.
  - 8) Recoger cuidadosamente el sobrenadante.
  - 9) Realizar 2 lavados rápidos de la monocapa con PBS-2mg/ml BSA a 4 °C.
  - 10) Lavar dos veces (10 minutos/lavado) con PBS-2mg/ml BSA a 4 °C.
  - 11) Lavado rápido (×2) con PBS frío.
  - 12) Lisar las células con 1 ml de 0.1 N NaOH en ligera agitación durante 30 min a temperatura ambiente.
- NOTA: Se asume que a 4 °C la internalización es negligible, equiparando la radiactividad total del lisado a la proveniente de la unión a superficie.
- 13) Pipetear 1 ml de lisado en viales conteniendo 3 ml de líquido de centelleo.
  - 14) Guardar una 50 µl de lisado para la cuantificación de proteína (método Bradford, diluir patrón en 0.1 N NaOH).

- 15) La unión específica se obtiene al restar, de la unión en presencia de Solución 1 (unión total), la unión en presencia de Solución 2 (unión no-saturable = inespecífica).

## **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Se requiere 1 flascón de 150 cm<sup>2</sup> para cada bloque de resina.

- 1) La monocapa de células (80-90 % de confluencia) se fija en Tampón de Fijación (3 % glutaraldehído-0.1 M cacodilato sódico/HCl pH 7.3-sucrosa 0.05 M) durante 2 h 30 min a temperatura ambiente.
- 2) Se lava (3 × 20 min) con cacodilato sódico 0.1 M, en ligera agitación a temperatura ambiente.
- 3) Se añade nuevo Tampón de Fijación (4 ml) y se resuspende la monocapa con ayuda de un scraper.
- 4) Se centrifuga a 500 g durante 5 min para precipitar las células, se descarta el sobrenadante.
- 5) *Osmificación*: el precipitado se incuba, a 4 °C, en presencia de 1.5 % tetróxido de osmio-0.7 % ferrocianato potásico-0.1 M cacodilato sódico, durante 1.5-2 h. Este paso y los siguientes deben realizarse en una campana de flujo laminar y en oscuridad.
- 6) Lavar (3 × 20 min) con cacodilato sódico 0.1 M a temperatura ambiente.
- 7) *Deshidratación*: se realizan lavados, en oscuridad y agitación orbital suave, con concentraciones crecientes de acetona (o EtOH) disuelta en cacodilato sódico 0.1 M, a temperatura ambiente.
  - 1 × 15 min 50 % acetona
  - 2 × 15 min 70 % acetona
  - 3 × 15 min 80 % acetona
  - 3 × 15 min 90 % acetona
  - 3 × 15 min 96 % acetona
  - 3 × 15 min 100 % acetona

- 8) *Inclusión*: Se utiliza resina epoxy de baja viscosidad SPURR. Se prepara una mezcla con los siguientes componentes; por cada eppendorf:

2.5 g ERL  
1.5 g DER  
6.5 g NSA  
0.1 g DMAE  
0.2 g DBP

- 9) Se resuspende el precipitado de forma sucesiva en las siguientes combinaciones de disolvente (EtOH o Acetona) y resina SPURR:

Resina : Disolvente

1	:	3	1 h temperatura ambiente
2	:	2	1 h temperatura ambiente
1	:	3	1 h temperatura ambiente
0	:	4	1 h temperatura ambiente
0	:	4	1 h temperatura ambiente

- 10) Se recoge el precipitado (lo más concentrado posible) con una pipeta con punta cortada y se deposita en el fondo del molde, rellenando el resto (sin remover) con resina pura.
- 11) Se deja polimerizar O/N a 60 °C.
- 12) Se corta el bloque con el ultramicrotomo, y después de recoger cuidadosamente los cortes, éstos se depositan en rejillas de cobre.
- 13) Contraste de los cortes con 2 % acetato de uranilo (filtrado), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14) *Jet wash* (lavado rápido con un flujo paralelo a la rejilla), con H<sub>2</sub>O durante 10 segundos.
- 15) Dejar secar sobre papel de filtro.
- 16) Incubar las rejillas durante 3-5 min a temperatura ambiente con citrato de plomo (reactivo de Reynolds). Para prevenir la formación de precipitados de carbonato de plomo, la incubación se realiza en una placa de petri tapada conteniendo pastillas de NaOH.
- 17) *Jet wash* con H<sub>2</sub>O. Dejar secar y observar.

## TRATAMIENTOS Y MARCADORES

### *Tratamientos:*

-**U18666A**: Inhibe el tráfico de colesterol entre el compartimento endocítico tardío y los lisosomas (Kobayashi T et al., 1999; Liscum L and Faust JR, 1989). Se añade al medio de cultivo, en presencia de 5 % FCS, a una concentración final de 2-10 µg/ml, y se incuba un mínimo de 10 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

-**Digitonina**: Detergente que secuestra el colesterol de las membranas. *In-vivo*, se añade al medio de cultivo a una concentración de 5 µg/ml y se incuba durante 10 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). En el tratamiento de fracciones *in-vitro*, se incuba a 4 °C durante 30 minutos.

-**TPA**: Éster de forbol, también denominado PMA, que activa al enzima PKC, en concreto a los isoenzimas PKC "típicas" y "novel". El tratamiento prolongado induce, por el contrario, la down-regulación de los enzimas activados (Webb BL et al., 2000). Para activar al enzima se utiliza a una concentración de 100 nM durante 2 minutos a 37 °C. Para inducir down-regulación, se emplea una concentración de 500 nM durante al menos 10 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

-**PDGF**: Factor de crecimiento que activa de forma potente a Ras y a la cascada de MAPKs, a través del receptores tirosina kinasa. Se incuban con 10 ng/ml células deprivadas de suero O/N, durante 3 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

-**HDL<sub>3</sub>**: Para la activación de Ras y las MAPKs se incuban las células (deprivadas de suero O/N) durante 3 minutos con 40 µg/ml (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

-**Toxina Pertussis**: Utilizada para inhibir a la subunidad G<sub>i</sub> de las proteínas G heterotriméricas. Se añade al medio de cultivo a una concentración de 0.1 µg/ml y se incuba durante 10 h, a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

-**Deprivación de suero**: Se extraen los factores de crecimiento para disminuir al mínimo los niveles basales de activación proliferativa. Para ello se requiere incubar las células durante 10 horas (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) en medio carente de FCS. Esta deprivación se puede combinar con el tratamiento prolongado con *TPA* y *Toxina pertussis*.

-**β-metil-Ciclodextrina**: Extrae el colesterol de las caveolas. Se utiliza para inhibir específicamente la señalización de la isoforma H-Ras (Roy S et al.,

1999). De forma previa a la activación se incuban las células durante 45-60 minutos con un 2 % de ciclodextrina en el medio de cultivo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

**-Wortmannina:** Inhibe la señalización de la PI3K. De forma previa a la activación se incuban las células 30 minutos con 5 μM wortmannina disuelta en el medio de cultivo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

**-Anti SR-BI (KKB.1):** El tratamiento *in-vivo* con este antisuero bloquea la unión de las HDL al receptor SR-B1 (Gu X et al., 2000). Las placas se enfrían en hielo y se añade el antisuero al medio de cultivo a una concentración de 50 μg/ml, incubando las células durante 45 minutos a 4 °C. Las células se lavan a continuación con medio a 37 °C de forma previa a la activación con HDL<sub>3</sub>.

**-W13:** Inhibidor específico de la calmodulina. Su análogo no activo, el W12, se utiliza como control. Esta familia de inhibidores inducen, además, incrementos transitorios de calcio intracelular, posiblemente al liberar el catión de los compartimentos intracelulares (Watanabe H. et al., 1999). En el presente trabajo, se utiliza a 10 μg/ml en medio de cultivo DMEM-Hepes-0.1%BSA, incrementando el calcio en apenas 30 segundos.

**-Ionomicina:** Ionóforo potente que genera un incremento de calcio sostenido al inducir la aparición de poros en la membrana plásmica, con la subsiguiente entrada del ión extracelular. Añadido a una concentración de 1 μM en el medio de cultivo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), ejerce dicho efecto en pocos segundos.

#### *Marcadores in-vivo:*

**-Toxina colérica** (subunidad B): La CTB, conjugada a un fluoróforo, se utiliza como marcador de lipid rafts, al unirse específicamente a la porción glucídica del gangliósido GM<sub>1</sub> (Parton RG, 1994). Las células se incuban durante 2 minutos con 10 μg/ml de CTB-Alexa 594 en medio DMEM-Hepes-0 %FCS-0.1%BSA, de forma previa a su activación (e.g. con W13).

**-HDL<sub>3</sub>-Cy3:** Fracción de lipoproteínas cuya proteína se ha conjugado con Cy3 (conjugación descrita en otro apartado). Las células deprivadas se incuban con HDL<sub>3</sub>-Cy3 50 μg/ml diluidas en medio de cultivo (con un 0% de FCS y 0.1 % BSA), durante 1 hora a 4 °C, de forma previa a la fijación.

**-EGF-TRITC:** Ligando del EGFR internalizado en vesículas recubiertas de clatrina, utilizado como marcador del receptor (unión durante 45 min a 4 °C en DMEM-Hepes-0 % FCS-0.1% BSA) o de endosomas (15 minutos a 37 °C) a una concentración de 200 ng/ml.

**-Transferrina-TRITC:** Marcador de compartimento de reciclaje. Para ello, la internalización mediada por receptor se realiza a una concentración de 50 µg/ml en medio DMEM-Hepes-0 % FCS-0.1% BSA, encontrándose en compartimento de reciclaje a los 15-30 minutos.

**-Dextrano-FITC:** Marcador de endocitosis de fase fluida al ser internalizado por pinocitosis. De 5 a 10 mg/ml, disuelto, justo antes de su utilización, en medio de cultivo. Se incuba con las células por espacio de 10 minutos.

**-Fluo4-AM:** Fluoróforo no-radiométrico que permite monitorizar las oscilaciones de calcio intracelular. Se cargan las células con una solución 2 µM junto con detergente Pluronic al 0.02% en medio DMEM-Hepes, durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Se lavan (×3) las células y se realiza el ensayo a 35-37°C en DMEM-Hepes-0% FCS-0.1% BSA.

#### *Marcadores post-fijación:*

**-Faloidina-TRITC:** Marcador de F-actina. Disuelta en DMSO, se incuba junto con la solución de anticuerpo secundario (45 min a 37 °C) a una concentración de 10-30 µg/ml.

**-Filipina:** Altera la estructura de las caveolas, al unirse al colesterol. Gracias a su elevada autofluorescencia en el canal UV, se utiliza como marcador del colesterol libre celular. Se prepara un stock a 5 mg/ml en DMSO y se mantiene congelado a -80 °C y preservado de la luz hasta su utilización. Se incuba junto con la solución de anticuerpo secundario a dilución 1/20.

**-Ioduro de Propidio:** Agente intercalante utilizado en los estudios de ciclo celular. La autofluorescencia detectada en el canal rojo es proporcional a la cantidad de DNA (permitiendo discriminar entre estadios *n*, *2n* ó *4n*). Se utiliza, en células fijadas con MetOH 70%, a 50 µg/ml junto con 200 µg/ml de RNAsa (libre de DNAsa) en PBS, durante 10 min a temperatura ambiente.

## **TABLA DE ANTICUERPOS**

### **Características de los anticuerpos utilizados:**

*(de izquierda a derecha)*

- antígeno/molécula reconocida*
- huésped inmunizado*
- tipo*
- origen*
- especies probadas que reconoce*
- nomenclatura*
- dilución inmunofluorescencia*
- dilución inmunoprecipitación*
- dilución western blot*
- dilución bloqueo*

anexina A6	oveja	purificado por columna de afinidad con péptido	UKE (T. Grewal)	rata hamster	sheep anti-anexina A6	1/50-1/100	1/100	1/500	
anexina A6	conejo	antisuero	Univ.Barcelona (C. Enrich)	rata hamster	anti GST-anexina A6	1/100	1/100	1/500	
anexina A6				?	anti-anexina A6 (#708)				
anexina A6				?	anti-anexina A6 (#709)				
anexina A6				hamster ratón rata	anti-anexina A6 (#712)				1/1000
anexina A6				hamster ratón rata	anti-anexina A6 (#713)				1/1000
anexina A6	ratón	Inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	humano	anti-anexina A6 monoclonal (A30120)			1/3000	
anexina A2		sobrenadante de hibridoma	Univ. Munster (V. Gerke)	hamster	anti anexina A2 (HH7)	1/10	1/100	1/1000	
LBPA		sobrenadante de hibridoma	Univ. Ginebra (J. Gruenberg)	hamster rata mono	anti-LBPA	1/10			
SR-BI/II	conejo	antisuero	Abcam	hamster ratón rata	anti SR-BI (ab3)	1/1000		1/1000	
SR-BI/II		purificado proteína A-Sepharosa	K.Kozarski-M.Krieger ó Abcam	ratón	anti SR-BI (KKB.1)    anti-SR-BI (ab3811)	1/500	1/100		1/500
pan Ras	ratón	immunoglobulinas purificadas	Oncogene	hamster mono	OP 40 anti-panRas (ab3)		1/100	1/100	
H-Ras	conejo		Santa Cruz	hamster	anti H-Ras (sc 520)	1/50	1/100	1/100	
N-Ras	ratón			hamster	anti N-Ras (sc 31)		1/100	1/100	
K-Ras				hamster	anti K-Ras (sc 30)		1/100	1/100	



Clathrin Heavy Chain	ratón	sobrenadante hibridoma	F.M.Brodsky JCB 101: 2047-2054 (1985)	hamster	X-22	1/150			
GAP120	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Upstate Biotechnology # 05-178	hamster	anti-GAP		1/150		
EEA-1	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	mono	anti-EEA-1		1/100		
GM130	ratón	inmunoglobulinas purificadas		hamster humano	GM130	1/30		1/250	
actina	ratón	inmunoglobulinas purificadas	ICN Pharmaceuticals	hamster	anti-actina			1/500	
caveolina-1	conejo	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	hamster rata humano	rbTL (C13630)	1/400-1/800	1/100	1/1000	
caveolina-1	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Zymed Labs	hamster	moZy (03-6000)	1/25			
P- Akt/PKB ser <sup>473</sup>	conejo	inmunoglobulinas purificadas	New England Biolabs	hamster	P-Akt			1/1000	
P-Mek 1/2	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Cell Signaling	hamster mono	anti-P-MEK			1/500	
P-Erk 1/2	conejo	inmunoglobulinas purificadas	Cell Signaling # 9101	hamster mono	anti-P-MAPK			1/500	
P-Marcks ser <sup>152/156</sup>	conejo	inmunoglobulinas purificadas	Cell Signaling # 2741	mono hamster	anti-P-Marcks			1/500	
PKC <sub>α</sub>	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	hamster	anti-PKC <sub>α</sub>		1/50	1/500	
PKC <sub>ε</sub>	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	hamster	anti-PKC <sub>ε</sub>			1/500	
PKC <sub>δ</sub>	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	hamster humano	anti-PKC <sub>δ</sub> (P36520)			1/500	
c-Raf	ratón	inmunoglobulinas purificadas	Transduction Labs	hamster mono	anti-raf-1 (R19120)		1/50	1/1000	