

Parte IV

PARTE IV:

ANÁLISIS DE LA TRANSLOCACIÓN CALCIO-DEPENDIENTE DE LA ANEXINA A6

Líneas celulares

Los experimentos descritos a continuación fueron realizados en la línea *c1.1000* (=c1p), obtenida a partir de CHO y sobreexpresa establemente la anexina A6-EGFP (ver *Anexo I*). En algunos ensayos, se utilizó alternativamente la línea celular COS-1 (de riñon de mono) transfectada de forma transitoria con pcDNA3.1(+)-Anexina A6-EGFP, al expresar estas células en mayor cantidad los marcadores requeridos.

El empleo de anexina A6-EGFP junto con la posibilidad de realizar videomicroscopía constituye una aproximación *in-vivo* que solventa artefactos derivados del aislamiento bioquímico o de la fijación. Asimismo permite el establecimiento de una secuencia de acontecimientos rápidos ($t < 1$ min) que son obviados en otras aproximaciones.

La Anexina 6 sobreexpresada en células CHO salvajes y en células COS se transloca desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a un incremento de calcio intracelular.

Células CHO-AnxA6 o COS transfectadas transitoriamente con el vector pcDNA 3.1(+)-Anexina A6-EGFP son deprivadas 1 hora en DMEM-Hepes-0% FCS-0.1% BSA. Seguidamente las células se incuban en presencia de W13 (10 μ g/ml) o bien IONOMICINA (1 μ M) añadidos al mismo medio de cultivo con el fin de inducir un incremento transitorio de calcio intracelular. El análisis por videomicroscopía del cultivo muestra cómo la anexina A6 rápidamente se transloca desde el citosol hacia la membrana plasmática en respuesta al tratamiento con el ionóforo. Esta translocación hacia la membrana inicialmente acontece de forma generalizada, si bien posteriormente existe un reclutamiento

hacia microdominios concretos. El tiempo (segundos) después de la adición de la droga está indicado (ver *Figura 1*). Los controles (no mostrados) fueron tratados del modo descrito con idénticas diluciones de DMSO (solvente de la IONOMICINA) o W12 (análogo inactivo del W13), no observándose en ningún caso la translocación de la anexina hacia la membrana.

El W13 (N-(4-aminobutil)-5-cloro-2-naftalensulfonamida) es una droga utilizada previamente como inhibidor específico de la calmodulina (Hidaka H and Tanaka T, 1983). No obstante, también ha sido descrita la capacidad de éste tipo de inhibidores de disminuir el pH citosólico e incrementar el calcio intracelular a partir de la liberación del catión de los reservorios intracelulares (Watanabe H et al., 1999), parámetros (pH y calcio) capaces de modular la distribución de las anexinas. La adición de Ionomicina (1 μ M), ionóforo potente ampliamente utilizado en la generación de incrementos de calcio intracelular, desencadenó idéntica translocación, confirmando así la hipótesis del calcio y descartando el papel de la calmodulina o del pH intracelular. Del mismo modo, la presencia de HEPES en el medio de cultivo contribuye a estabilizar el pH, minimizando la implicación de este factor.

Observación de los niveles de calcio intracelular

Con el fin de demostrar que el W13 era capaz de generar incrementos de calcio también en nuestro sistema se monitorizaron los niveles *in-vivo* de calcio intracelular en células CHO.

Brevemente, células CHO-AnxA6-EGFP deprivadas durante 1-2 horas en medio 0% FCS, 0.1% BSA, DMEM-Hepes se cargan con el fluoróforo no-radiométrico Fluo 4-AM (ver *Material y Métodos*). Después de lavar las células en DMEM-Hepes, se enfoca el campo deseado y se comienza a grabar durante 2 minutos con el fin de descartar la existencia de picos de calcio espontáneos. A continuación se añade cuidadosamente el W13 (10 μ g/ml) disuelto en un volumen de 100 μ l de medio.

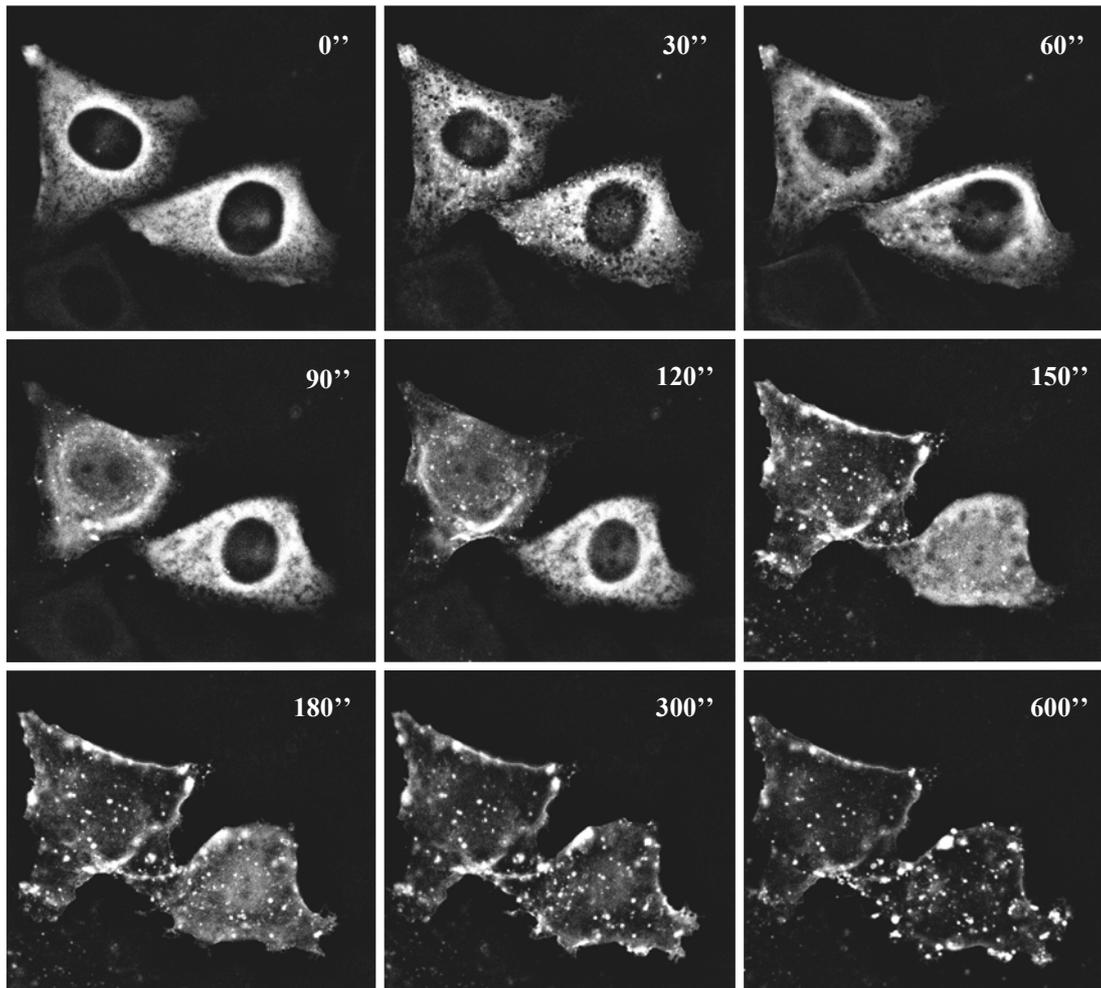


Figura 1. La anexina A6 sobreexpresada en células CHO-wt o COS se redistribuye rápidamente desde el citosol a la membrana en respuesta a un estímulo. Células COS o CHO transfectadas con el vector pcDNA-anexina A6-EGFP y privadas 2 horas en DMEM-Hepes-0% FCS-0.1%BSA se incuban con W13 o IONOMICINA para inducir un incremento del calcio intracelular. Se observa como rápidamente ($t = 30-90$ segundos) se desencadena una translocación masiva de anexina soluble hacia la membrana. Una vez en la membrana, la anexina se concentra progresivamente en dominios puntuales ($t = 2-10$ minutos).

En la *Figura 2 (a)* se muestra un campo seleccionado, donde se observan varias células que desencadenan incrementos transitorios de calcio intracelular (indicadas con flechas) ante el tratamiento con W13. En la gráfica *(b)* se observa el espectro de fluorescencia a lo largo del tiempo para varias células seleccionadas ($t_{\text{total}} = 10 \text{ min}$).

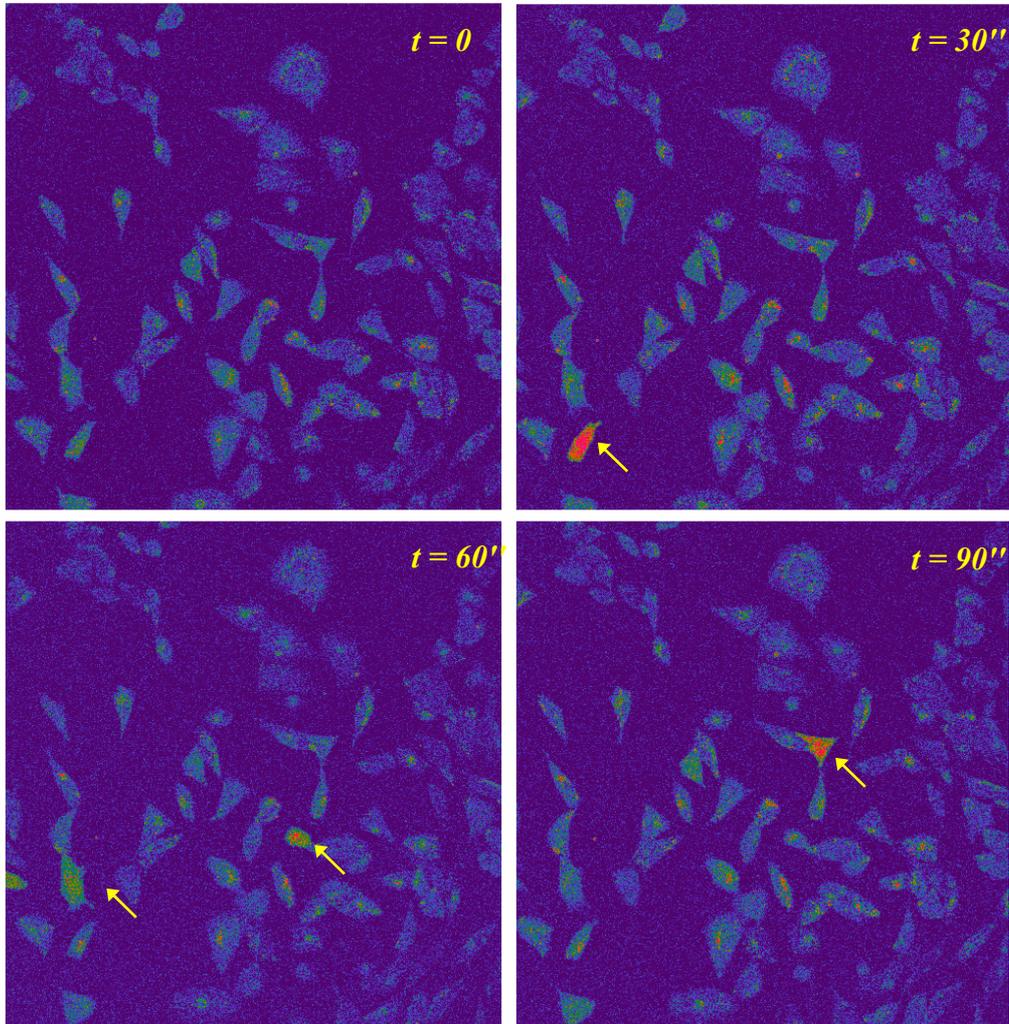
En el presente estudio se utiliza indistintamente el ionóforo IONOMICINA y la droga inhibidora de la calmodulina W13. Ambos componentes actúan a través de procesos muy diferentes y las oscilaciones del calcio intracelular son distintas. Así, mientras que el ionóforo IONOMICINA permeabiliza la membrana plasmática dejando entrar el calcio del medio extracelular hacia el citosol, el W13 libera el calcio de los reservorios intracelulares (Watanabe H et al., 1999). Esta diferente naturaleza se traduce en incrementos de calcio transitorios para el W13 y permanentes en el caso de la IONOMICINA. Curiosamente, una vez translocada la anexina A6, en ambos casos permanece asociada a la membrana y se concentra progresivamente en los microdominios mencionados, sugiriendo así la existencia de mecanismos independientes de calcio a este nivel.

La observación detallada de dicha respuesta indica que la translocación de la anexina A6 acontece de forma simultánea al incremento de calcio intracelular. Del mismo modo, la mayor capacidad de la IONOMICINA de inducir incrementos del catión se traduce en porcentajes más elevados de translocación.

Caracterización de los dominios receptores de la anexina A6 translocada

Células COS transfectadas transitoriamente con anexina A6-GFP se tratan, según se ha descrito con anterioridad, con el ionóforo IONOMICINA (1 μM), o con W13 (10 $\mu\text{g/ml}$), por los tiempos indicados. Las células se fijan durante 30 minutos con PFA 4 % y permeabilizan 3 minutos en PBS-Triton 0.1%-BSA 0.1% a temperatura ambiente.

(a)



(b)

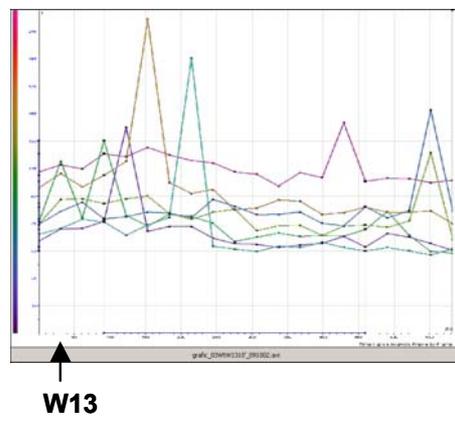


Figura 2. El incremento de calcio intracelular desencadena la translocación de anexina A6. Células CHO-wt o CHO-AnxA6GFP se deprivan 1 hora 30 minutos en DMEM-Hepes-0% FCS-0.1 % BSA (los últimos 10 minutos de privación se realizan a temperatura ambiente). A continuación las células se precargan con el fluoróforo Fluo4-AM 2 μ M - Pluronic 0.02% disuelto en el DMEM - Hepes - 0% FCS - 0.1 % BSA (ver Material y Métodos) durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar (3×1 min) las células con HBSS, se añade medio DMEM-Hepes-0% FCS-0.1 % BSA a 37 °C y se incuba durante 5 minutos. A continuación se monitoriza la concentración basal de calcio, y se añade W13 captando la fluorescencia emitida mediante microscopía confocal in-vivo (a). Las líneas (b) representan las medidas de fluorescencia capturadas por espacio de 10 minutos en células individuales. Se observan incrementos transitorios del calcio intracelular pocos segundos (45-60) después de la adición de W13. Estas oscilaciones de calcio coinciden en el tiempo con la translocación de anexina A6 observada anteriormente, si bien la anexina no retorna al citosol después de la recuperación de los niveles del catión.

La inmunocitoquímica se realiza con anticuerpos monoclonales anti-EEA-1 o anti-cadena pesada de la clatrina (X-22), ambos en rojo. Las imágenes deconvolucionadas se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia invertido (Zeiss[®] Axiovert 200) acoplado a una cámara digital Cool SNAP-HQ (Photometrics[®]).

Anteriormente se había descrito la presencia de Anexina A6 en vesículas recubiertas de clatrina de forma calcio-independiente (Turpin E et al., 1998) así como su funcionalidad en el budding de estas vesículas (Lin HC et al., 1992). Del mismo modo, la localización de diversas anexinas en el compartimento endosomal, como la A2 o la A6, ha sido ampliamente demostrada (revisado en Raynal P and Pollard HB, 1994). Las imágenes obtenidas (ver *Figura 3*) confirman que las estructuras enriquecidas en GFP-anx A6 en respuesta al incremento de calcio intracelular no son endosomas tempranos positivos para EEA-1 (*early endosomal antigen -1*) ni vesículas recubiertas de clatrina (CCP). Además, observamos como dichas estructuras son básicamente estáticas, con la mayor parte de anexina A6 secuestrada en la membrana plasmática.

La subunidad B de la Toxina Colérica (CTB) colocaliza con las estructuras positivas para anexina A6.

Células COS transfectadas con anexina A6- GFP se deprivan en DMEM-Hepes-0%FCS-0.1%BSA durante 1-2 horas. Pasado este tiempo, las células se incuban a 37 °C en presencia de 10 µg/ml de CTB-Alexa 594 diluida en DMEM-Hepes-0%FCS-0.1%BSA, durante 2 minutos. Después de lavar las células en medio atemperado, se tratan con IONOMICINA del modo descrito, por los tiempos indicados. Las secuencia de imágenes (ver *Figura 4*), obtenidas en un microscopio de epifluorescencia invertido acoplado a una cámara digital, revelan una abundante colocalización (flechas) de la anexina A6-GFP (en verde) y la CTB-Alexa 594 (en rojo), indicando que estas estructuras podrían ser *lipid rafts*.

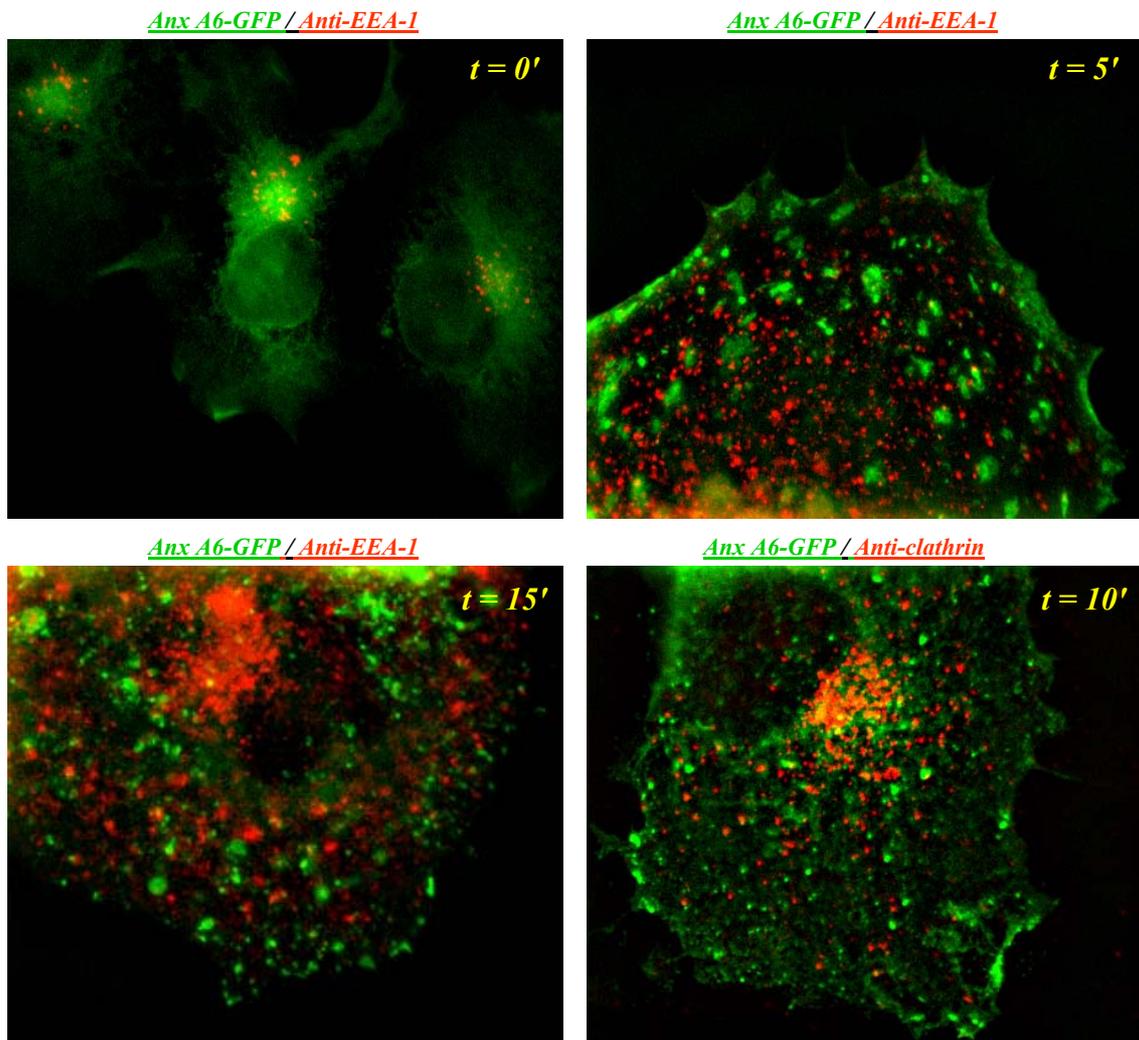


Figura 3. Caracterización de los dominios de concentración de anexina A6. Células COS transfectadas con pcDNA-anexina A6-EGFP se deprivan y a continuación se induce un incremento del calcio intracelular con W13 o bien con IONOMICINA. La monocapa se fija, permeabiliza en PBS-Triton 0.1%-BSA 0.1% y somete a inmunofluorescencia con un anticuerpo primario contra EEA-1 o la cadena pesada de la clatrina (ambos en rojo). Las imágenes de microscopía confocal sugieren que las estructuras que acumulan anexina A6-EGFP (verde) no son endosomas tempranos ni vesículas recubiertas de clatrina.

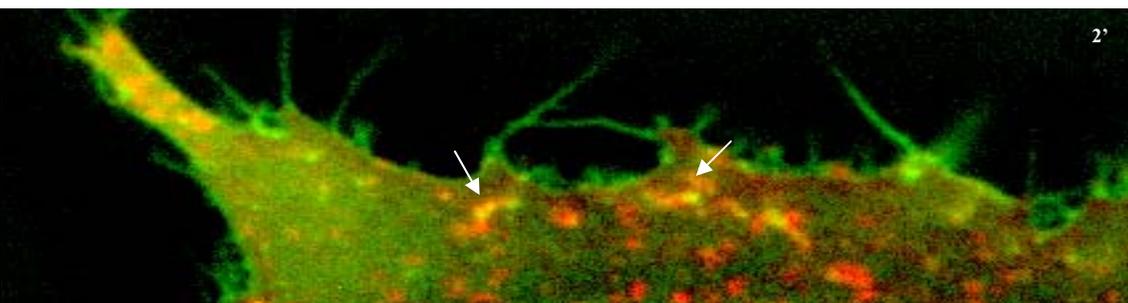
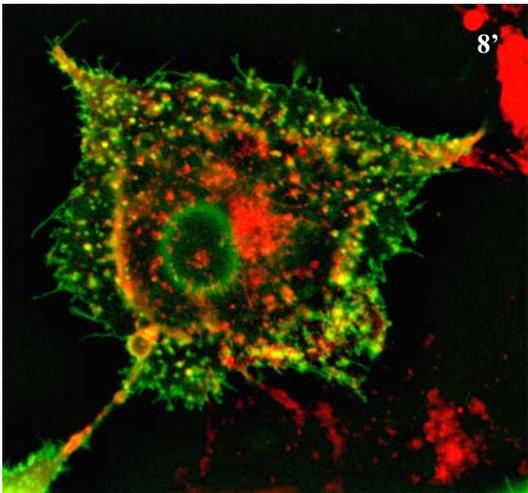
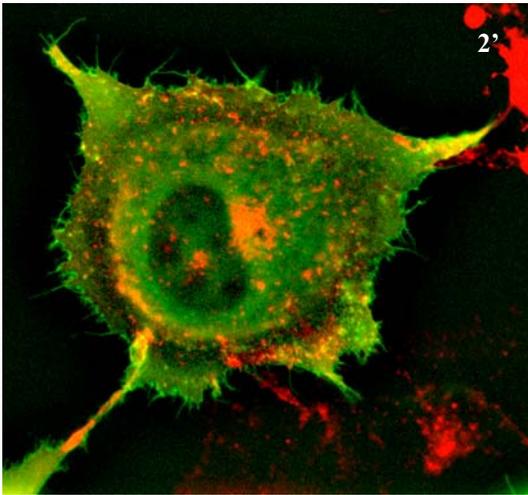
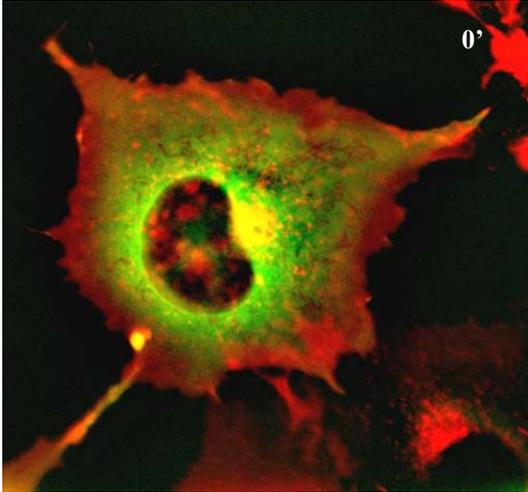


Figura 4. La subunidad B de la toxina colérica (CTB) co-localiza con las estructuras positivas para anexina A6. Células COS transfectadas con pcDNA-anexina A6-EGFP se preincubaban 2 minutos con CTB-Alexa 594 (ver Tratamientos). Después de lavar las células con medio a 37 °C, se tratan con IONOMICINA o W13 por los tiempos indicados. Las imágenes deconvolucionadas, extractadas de una secuencia de videomicroscopía, indican que la anexina A6-EGFP (en verde) se redistribuye hacia dominios (flechas) positivos para la CTB (en rojo), en respuesta a un incremento del calcio intracelular.

La translocación calcio-dependiente de anexina A6 hacia los *lipid rafts* había sido descrita anteriormente por otros así como por nuestro propio grupo de investigación. Así, el aislamiento bioquímico de *lipid rafts* a partir de membranas de células CHO tratadas *in-vitro* con diferentes concentraciones de calcio, muestra como la anexina A6 se distribuye en las fracciones de lipid rafts en presencia del catión a concentraciones por encima de 2 μM (resultados no mostrados). Otros han demostrado, incluso, como la anexina A6 es una de las proteínas fosforiladas en estos microdominios (Sprenger RR et al., 2004)

La observación de la secuencia de imágenes obtenida en el presente apartado, permite observar como, en paralelo a la redistribución de anexina A6 hacia los microdominios donde se concentra la toxina colérica, se produce asimismo una redistribución de éste marcador, parte del cuál se encontraba de forma dispersa en la membrana. Esta observación nos hace pensar que la translocación masiva y redistribución posterior de la anexina A6 podría participar en procesos de coalescencia de *lipid rafts* (Simons K and Toomre D, 2000), de forma similar a lo postulado para la anexina A2 en células musculares (Babiychuk EB and Draeger A, 2000).

Las estructuras positivas para anexina A6 codistribuyen parcialmente con F-actina.

Células COS son transfectadas con anexina A6-GFP (en verde) y privadas 1-2 horas en DMEM-Hepes-0% FCS-0.1% BSA, preincubándose a continuación con W13 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 minutos a 37 °C. Las células se fijan 30 minutos en 4 % PFA-PBS y se permeabilizan en PBS-0.1% TX-100-0.1% BSA durante 3 minutos a temperatura ambiente. La F-actina (en rojo) se marca con Faloidina-TRITC (30 $\mu\text{g/ml}$) diluida en PBS. Las imágenes son captadas en un microscopio confocal espectral Leica[®] TCS SL con un objetivo 100X (grosor de sección óptica = 236 nm). La *Figura 5* muestra una sección óptica X-Y (**a**) y dos cortes X-Z de diferentes zonas de la misma célula (**b**). Se observa parcial codistribución de F-actina y anexina A6 en la región juxtamembrana (flechas).

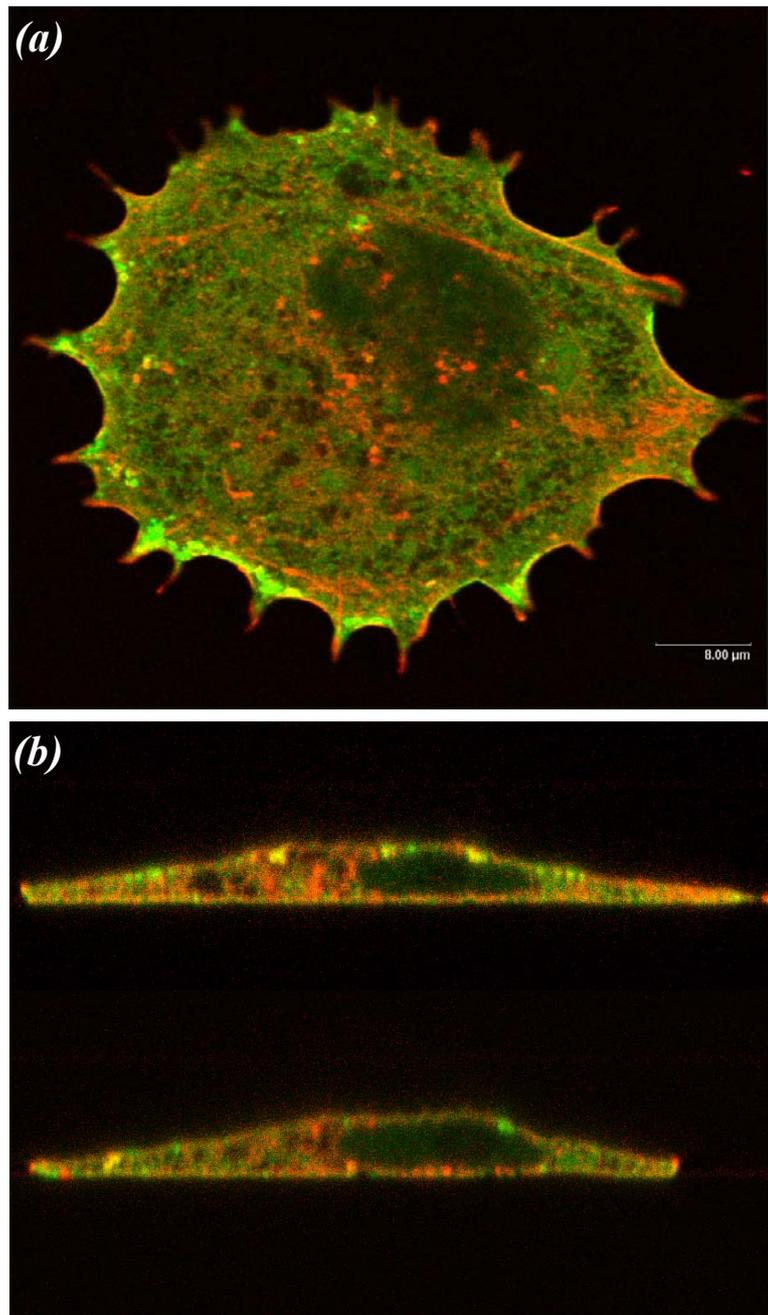


Figura 7. La anexina A6 de la membrana codistribuye parcialmente con F-actina. Células COS transfectadas con anexina A6-GFP (en verde) y preincubadas (ver Tratamientos) con W13, se fijan y permeabilizan. La F-actina (rojo) se visualizó con faloidina-TRITC (30 $\mu\text{g/ml}$). Las imágenes de microscopía confocal muestran un significativo grado de colocación entre la anexina y el citoesqueleto subyacente a la membrana. Se observa una sección X-Y (a) y dos transversales X-Z (b).

El marcaje de F-actina pone de manifiesto que parte de las estructuras que concentran la anexina A6 contienen citoesqueleto cortical subyacente. La observación de los cortes transversales indica además que son estructuras de membrana o yuxtamembrana.

Ha sido descrito como la presencia de componentes de citoesqueleto disminuye los requerimientos de calcio para la asociación de las anexinas a componentes de *lipid rafts* (Babiychuk VS et al., 2000). Gerke y colaboradores describen como el heterotetrámero anexina A2-p11 se concentra *in-vivo* en estructuras macroscópicas ricas en F-actina, colesterol y glicosfingolípidos, creados por la célula en respuesta a la infección con *E.coli* (Zobiack N et al., 2002). Recíprocamente, la extracción del colesterol de la membrana conlleva la disociación de anexina A2 junto con elementos del citoesqueleto de actina (Harder T et al., 1997).

Las estructuras observadas en el presente estudio, que concentran anexina A6 y asimismo acumulan colesterol, se asemejan a estos dominios macroscópicos. En ellos, la baja movilidad de la anexina A6 podría deberse a la estabilización de esas regiones a través del citoesqueleto subyacente.

Del mismo modo, novedosos análisis por microscopía de la activación de Ras han permitido observar una distribución subcelular coincidente con la mostrada aquí para las formas activas de Ras e incluso para factores accesorios como GAPs en respuesta a incrementos de calcio intracelular (ver *Introducción*).

Deficiente translocación de anexina A6 hacia la membrana plasmática en células pre-tratadas con ciclodextrina.

Células CHO que sobreexpresan de forma estable GFP-Anexina A6 se deprivan 1 hora a 37 °C en DMEM-Hepes-0.1 % BSA y a continuación se preincuban en presencia de una solución al 2 % de β -metil-ciclodextrina en medio DMEM-Hepes-0.1 % BSA, durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar en DMEM-Hepes-0.1 % BSA, las células se incuban con W13 (10 μ g/ml) según se ha descrito y por los tiempos indicados.

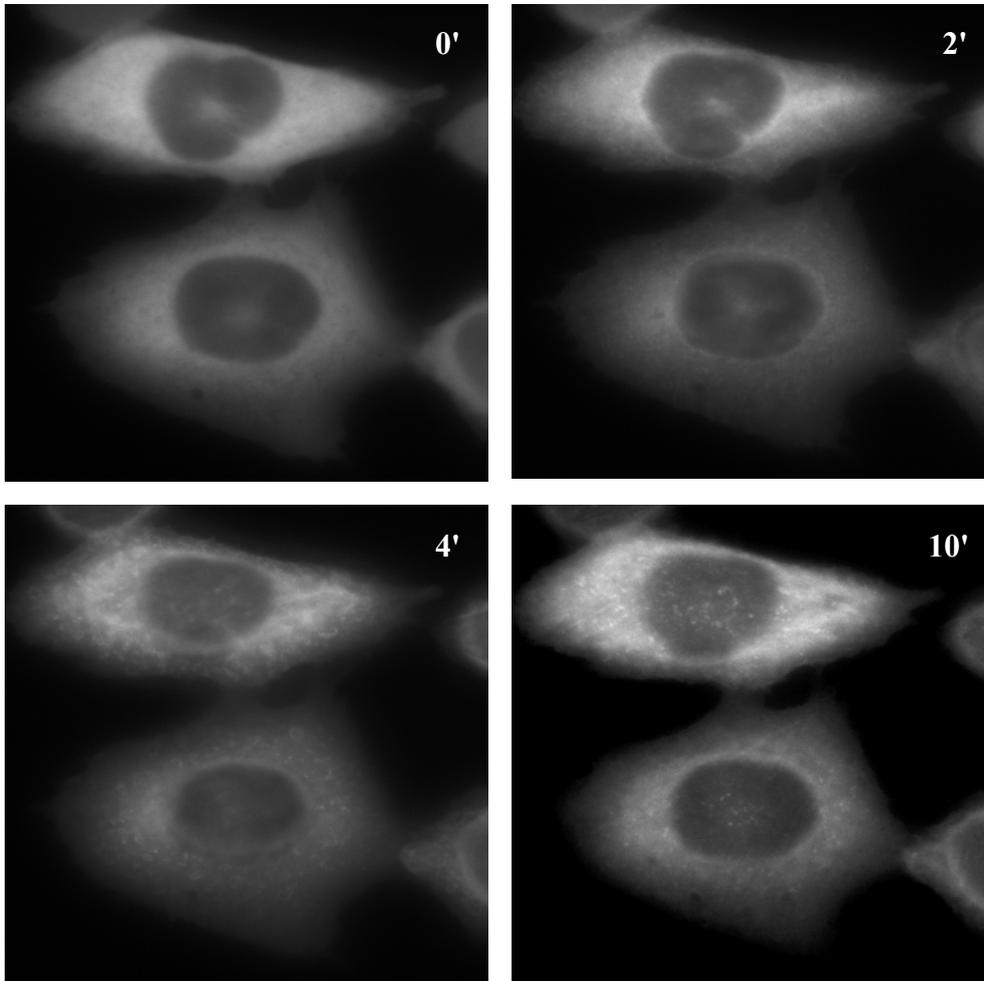


Figura 6. El pretratamiento con β -metil-ciclodextrina interfiere en la translocación de la anexina A6 hacia la membrana. Células CHO que sobreexpresan establemente la anexina A6 se deprivan y preincuban con un 2 % de ciclodextrina diluido en el medio, durante 30 min a 37°C. Después de lavar las células en DMEM-Hepes-0.1%BSA, se añade W13 (o IONOMICINA), por los tiempos indicados. La microscopía in-vivo muestra, en estas condiciones, una translocación deficiente de la anexina A6 hacia la membrana plasmática.

Las imágenes de videomicroscopía obtenidas en el microscopio de epifluorescencia invertido (ver *Figura 6*) muestran un deficiente grado de translocación de la anexina A6-GFP hacia la membrana.

Estos resultados indican que la extracción del colesterol de la membrana inhibe codistribución de anexina en estos *lipid rafts*. Esta observación había sido descrita en células musculares (Draeger A en: "*Molecular and Cellular Physiology of the Annexins*", Banff 22-25/03/2003), en las cuáles las anexinas A6 y A2 se asocian de forma dependiente de colesterol a *lipid rafts* no caveolares.

En el presente trabajo observamos que existe un inicio de translocación generalizada hacia la membrana en las células tratadas con ciclodextrina, que no progresa hacia la redistribución dentro de la membrana, sino que la anexina A6 retorna rápidamente al citosol, o, en menor grado, permanece retenida en membranas de compartimentos intracelulares. Postulamos que los mecanismos que regulan el anclaje (pero no la translocación inicial) de la anexina a la membrana plasmática son dependientes de la presencia de colesterol e independientes de calcio.

Lenta recuperación del pool citosólico de la anexina A6 a través de un mecanismo asociado a membranas

Después del tratamiento descrito anteriormente se realiza un lavado de las células y se deja recuperar el cultivo en medio DMEM-Hepes-0.1% BSA por los tiempos indicados. Se observa (*Figura 7*) como, contrariamente a la rápida translocación hacia la membrana plasmática, el retorno de la molécula desde los microdominios descritos al citosol se realiza a través de un proceso más lento, y parcialmente asociado a membranas. En este sentido, se observan algunas vesículas conteniendo la anexina A6-EGFP que viajan desde las zonas de concentración de la membrana plasmática hacia compartimentos perinucleares por determinar (flechas).

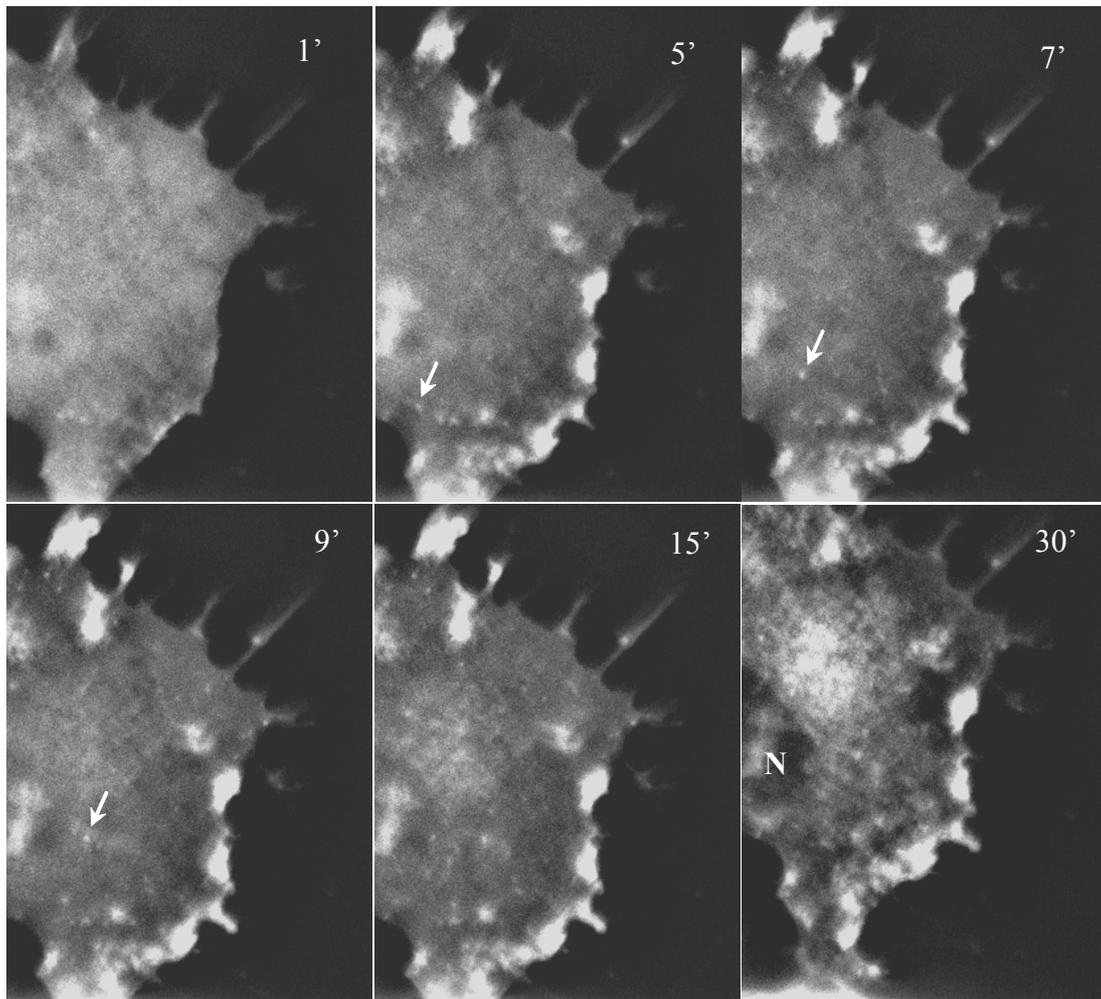


Figura 7. A tiempos posteriores se observa anexina A6 asociada a vesículas de apariencia endosomal. Células CHOwt transfectadas establemente con pcDNA-anexina A6-EGFP se deprivan y tratan con W13. Con posterioridad al reclutamiento calcio-dependiente hacia la membrana, se lava la monocapa en DMEM-Hepes-0.1% BSA y se mantiene a 37 °C. Una parte de la anexina A6 se observa ($t > 10$ min desde la adición de W13) asociada estructuras de apariencia endosomal (flechas). Esta asociación precede a la recuperación lenta del pool intracelular de anexina A6 ($t = 30$ min).

Postulamos que estas vesículas podrían ser endosomas, al observar su movilidad, si bien se requieren evidencias adicionales confirmando esto último.

Así, nuestra hipótesis es que la translocación hacia la membrana en respuesta a calcio así como la redistribución modulada por el colesterol podrían constituir, además, un mecanismo para incorporar, de forma moderada y en un proceso más lento (>30 minutos), parte de la anexina A6 al compartimento endocítico, en el cuál ha sido ampliamente demostrado el papel de la anexina A6. Los resultados obtenidos recientemente en células acinares (Thomas DD et al., 2002), en las cuáles la translocación calcio-dependiente de la anexina A6 hacia los *lipid rafts* podría servir para modular procesos de secreción, apunta en este mismo sentido.