

## Parte III

# Annexin 6-mediated *membrane* recruitment of p120<sup>GAP</sup> modulates the activation of Ras and Raf-1

Thomas Grewal<sup>¶‡</sup>, Iñaki de Diego<sup>\*‡</sup>, Matthias F. Kirchhoff<sup>†</sup>,

Rachael Evans<sup>¶</sup>, Francesc Tebar<sup>\*</sup>, Joerg Heeren<sup>†</sup>, Franz Rinninger<sup>§</sup> &

Carlos Enrich<sup>\*#</sup>

<sup>¶</sup> Centre for Immunology. St. Vincent's Hospital. University of New South Wales. Sydney. Australia.

<sup>\*</sup>Departament de Biologia Cel·lular. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Casanova 143. 08036-Barcelona. Spain.

<sup>†</sup>Institute for Medical Biochemistry and Molecular Biology. Department of Molecular Cell Biology and <sup>§</sup>Department of Internal Medicine. University Hospital Eppendorf, Hamburg. Germany.

*Running title:* Annexin 6 modulates Ras and Raf-1 activity.

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

# Corresponding author:

Tel: 34 93 4021908; Fax: 34 93 4021907; E-mail: [enrich@medicina.ub.es](mailto:enrich@medicina.ub.es)

24,956

## **ABSTRACT**

**We have recently demonstrated that high density lipoprotein (HDL) -induced Ras signalling mediates protein kinase C (PKC) -independent activation of Raf-1 and the MAPK pathway. Since EGF- and PDGF-induced activation of Ras and Raf-1 is inhibited in annexin 6 overexpressing cells (CHOanx6), we investigated whether annexin 6 interferes with HDL signalling. We now show that overexpression of annexin 6 causes a significant reduction in HDL-induced activation of Ras and Raf-1, without affecting MAPK activity. The increased assembly of Ras with its negative regulator, GTPase activating protein p120<sup>GAP</sup> (GAP) in CHOanx6 cells may explain annexin 6-mediated inhibition of Ras and Raf-1 activity. Annexin 6 promotes the association of GAP with Ras-containing membrane fractions and the formation of Ras-GAP complexes. This is accompanied by a PKC-dependent activation of Ras and MAPK in CHOanx6 cells. We conclude that overexpression of annexin 6 diverts HDL-induced signalling through PKC-dependent pathways to activate the MAPK pathway.**

*Key words: Annexin 6, GAP, Ras, HDL, PKC.*

## INTRODUCTION

We have recently demonstrated that HDL-induced activation of Ras represents an alternative, and PKC-independent, signalling pathway for subsequent MAPK phosphorylation (Grewal *et al.*, 2003). HDL signalling via PKC- and Ras-dependent pathways appears to co-exist since down-regulation or inhibition of PKC in human skin fibroblasts and CHO cells only partially blocked HDL-induced MAPK activation (Grewal *et al.*, 2003; Deeg *et al.*, 1997). Like all GTP-binding proteins, the activity of Ras is regulated by the local balance between guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase activating proteins (GAPs). Inactivation of Ras requires the translocation and direct binding of GTPase activating proteins (GAPs) such as p120<sup>GAP</sup>, NF1 and CAPRI to Ras proteins at the plasma membrane. GAPs dramatically enhance the GTPase activity of Ras and it has been suggested that inactivation of Ras can occur via the Ca<sup>2+</sup>-dependent association of GAPs with Ras proteins (Donovan *et al.*, 2002; Cullen and Lockyer, 2002). In support of this hypothesis it was demonstrated that increased Ca<sup>2+</sup> levels target CAPRI, a member of the GAP protein family in fibroblasts and epithelial cells, to the plasma membrane, where it inactivates Ras (Lockyer *et al.*, 2001). Little is known about the proteins that mediate the recruitment and binding of GAPs to Ras signalling complexes and/or how this might modulate Ras activity.

Accumulating evidence suggests that annexin 6, a Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane binding proteins, affects Ras signalling pathways. Annexin 6 is found at the plasma membrane, in the endocytic compartment and more recently, has been detected in caveolae (Pol *et al.*, 1999). The Ca<sup>2+</sup>-induced translocation of annexin 6 to lipid rafts has been demonstrated in a number of different cell types (Babiychuk *et al.*, 1999; Orito *et al.*, 2001). Our own group and others have identified an interaction between annexin 6 and p120<sup>GAP</sup> (GAP) (Davis *et al.*, 1996; Chow and Gawler, 1999; Pons *et al.*, 2001). In addition, we demonstrated that overexpression of annexin 6 in CHO cells inhibited EGF- induced Ras and Raf-1 activity (Pons *et al.*, 2001).

In this study we demonstrate that HDL-induced activation of Ras and Raf-1 is inhibited in annexin 6 overexpressing cells. Overexpression of annexin 6 promotes the activity of an alternative pathway, thereby switching HDL-induced Ras activation into a PKC-dependent process. Most importantly, increased binding of GAP to Ras-containing membrane fractions and increased Ras-GAP assembly in annexin 6 overexpressing

cells strongly suggest that annexin 6 acts as a scaffolding protein at the plasma membrane promoting and/or stabilising the formation of Ras-GAP complexes. In light of these results, we discuss the involvement of annexin 6 in the regulation of the MAPK pathway.

## RESULTS and DISCUSSION

### Reduced activation of Ras in annexin 6 overexpressing cells

As shown previously, CHOanx6 cells are characterised by reduced basal levels of Ras-GTP (Pons *et al.*, 2001). Activation of Ras in CHOanx6 cells was similar to controls (CHOwt), but the total amount of Ras-GTP following PDGF induction (100 ng/ml) was reduced in CHOanx6 cells (Fig. 1A). To study the effect of annexin 6 on HDL-induced activation of Ras, Ras-GTP levels were determined in CHOwt and CHOanx6 cells incubated with HDL (40 µg/ml) for 0 – 30 min (Fig. 1B). As with PDGF, incubation with HDL resulted in a strong induction of Ras activity in CHOwt cells after 3 min, returning to basal levels after 10 – 30 min. Similarly, HDL increased Ras-GTP levels in CHOanx6 cells after 3 min and results from 7 independent experiments did not reveal any further significant activation of Ras at later time-points (10 – 30 min) (Fig. 1B). However, although HDL-induced production of Ras-GTP followed similar kinetics in both cell types, the total amount of Ras-GTP in CHOanx6 cells was markedly reduced compared to controls at all time-points analysed (see also Fig. 6B).

### Annexin 6 promotes the association of Ras with its negative regulator GAP

Annexin 6 interacts with the negative regulator of Ras, the GTPase activating protein p120<sup>GAP</sup> (GAP) (Davis *et al.*, 1996; Chow and Gawler, 1999; Pons *et al.*, 2001). GAP is a cytosolic protein and a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation to the plasma membrane is required for Ras-GAP assembly and stimulation of Ras-GTPase activity (Donovan *et al.*, 2002; Cullen and Lockyer, 2002). We therefore compared the Ca<sup>2+</sup>-dependent recruitment of GAP to crude membranes of CHOwt and CHOanx6 cells. Membranes and cytosol from both cell lines were prepared and incubated in the presence of 0 - 2 µM Ca<sup>2+</sup>. After ultracentrifugation, the amounts of membrane-bound GAP were analysed by Western blotting (Fig. 2A). In CHOwt cells the addition of 500 nM – 2 µM Ca<sup>2+</sup> promoted membrane binding of GAP. CHOanx6 are characterised by high amounts of membrane-bound GAP already in the absence of Ca<sup>2+</sup>, which was increased even further upon addition of Ca<sup>2+</sup>. Since association of other proteins, e.g. caveolin or annexin 2, was not affected in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> (Fig. 2A) in either cell type, this suggests that annexin 6 promotes the Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation of GAP to membranes. To confirm these findings, membranes and

cytosol from CHOwt cells were incubated with recombinant GST-annexin 6 (GSTanx6), or GST-anx6<sub>1-175</sub>, a C-terminal deletion mutant of annexin 6 (anx6<sub>1-175</sub>), lacking the GAP interaction domain. Western blot analysis of the membrane-bound material revealed a strong increase of membrane-bound GAP, when incubated with GSTanx6 (Fig. 2B, compare lane 1 and 3). In contrast the deletion mutant GSTanx6<sub>1-175</sub> (lane 2) did not promote membrane binding of GAP, suggesting that the linker domain of annexin 6 mediates the Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane recruitment of p120GAP.).

We then compared the subcellular distribution of GAP in CHOwt and CHOanx6 using Percoll gradients (Smart et al., 1995). Figure 3 shows the distribution, after the fractionation, of GAP and Ras, as well as annexins 2 and 6. Although in previous studies, overexpression of annexin 6 did not significantly affect the subcellular distribution of endosomal proteins like annexin 2 or Rab5 (Grewal et al., 2000) now, we observed increased amounts of Ras (Fig. 3) and PKC $\alpha$  (data not shown) in plasma membrane fractions of CHOanx6 cells, indicating that overexpression of annexin 6 promotes plasma membrane association of its binding partners PKC $\alpha$  (Schmitz-Pfeiffer et al., 1998), Raf-1 (Pons et al., 2001), and possibly also Ras proteins. In addition, whereas in wild-type CHO cells GAP was predominantly found in the cytosolic and endosomal fractions (Fig. 3), it was highly enriched in the Ras-containing plasma membrane fraction in CHOanx6 cells.

Taken together, these results suggested increased association of p120GAP with Ras in CHOanx6 cells. Therefore p120GAP immunoprecipitates from CHOwt and CHOcells were analyzed for the presence of Ras and annexin 6 by western blot analysis (Fig. 3B). These experiments revealed increased co-immunoprecipitation of Ras with p120GAP in CHOanx6 cells (compare lane 2 and 4). p120GAP immunoprecipitates also contained annexin 6 in CHOanx6 cells.

Taken together our findings suggest that annexin 6 promotes association of p120GAP with Ras proteins probably being part of a p120GAP-HRas complex at the plasma membrane.

## **Reduced Ras and Raf-1 signalling in CHOanx6 cells does not affect MAPK activity**

Since HDL-induced Ras signalling is followed by Raf-1 kinase activation (Grewal *et al.*, 2003) and EGF- or TPA-induced activation of Raf-1 was inhibited in CHOanx6 cells (Pons *et al.*, 2001), we compared HDL-induced activation of Raf-1 in CHOwt and CHOanx6 cells. Incubation of CHOwt cells with HDL resulted in an increase ( $70 \pm 10\%$ ) of Raf-1 activity within 3 min (Fig. 4A). In these cells, elevated levels of Raf-1 kinase activity compared to the non-stimulated control ( $t = 0$  min) were observed at all time-points (3 – 30 min). In contrast, incubation of CHOanx6 with HDL did not activate Raf-1 activity at any time-point analysed.

This inhibitory effect of annexin 6 overexpression on Ras and Raf-1 activity was not due to altered protein expression, since protein levels of Ras isoforms (H-, K-, N-Ras) and Raf-1 were comparable in both cell lines (Fig. 4B). Furthermore the expression of endogenous SR-BI as judged by western blot analysis of total cell lysates and plasma membrane-enriched fractions were similar (Fig. 4C), thus excluding a possibly down-regulation or mistargeting of SR-BI in CHOanx6 cells.

To identify the Ras-isoform involved in HDL signalling, CHOwt and CHOanx6 cells were pre-treated with  $\beta$ -Methyl-cyclodextrin (CD), shown to abrogate H-Ras, but not K-Ras, mediated activation of Raf-1 (Roy *et al.*, 1999), and then incubated with HDL for 3 min. Figure 5 shows that cholesterol depletion, by CD treatment, almost completely inhibited the HDL-induced Ras and MAPK activation in both cell types. In agreement with Matveev *et al.* (2001), CD treatment did not affect cell surface binding of HDL, as determined by cell surface binding experiments with fluoro- or radio-labelled HDL (data not shown). Taken together these data strongly suggest that H-Ras, but not K-Ras, is involved in HDL signalling events leading to MAPK activation.

We then analysed HDL-induced activation of the MAPK pathway in CHOwt and CHOanx6 cells (Fig. 6). Despite the low activation of Ras in CHOanx6 cells they revealed a similar magnitude of Mek and Erk1/2 (P-MAPK) activation upon HDL stimulation compared to CHOwt controls. Thus, in CHOanx6 cells an alternative pathway compensates for the loss of Ras and Raf-1 signalling to ensure HDL-induced activation of Mek and Erk1/2.



### **PKC-dependent activation of Ras in CHOanx6 cells**

To assess the possible involvement of PKC in HDL-induced activation of MAPK in CHOanx6, cells were pre-incubated with TPA overnight to inhibit PKC activity and treated with HDL for 3 min prior to analysis of cell lysates for the activation of Ras and MAPK (Fig. 7B).

As shown previously (Grewal *et al.*, 2003), HDL-induced activation of Ras and Erk1/2 (P-MAPK) was not inhibited in CHOwt under these conditions (Fig. 7A). In contrast inhibition of PKC reduced Ras and Erk1/2 activation in CHOanx6, suggesting that HDL-induced activation of Ras and the MAPK is PKC-dependent in CHOanx6 cells. Quantification of the results (Fig. 7B) confirmed these data as significant.

Taken together, these results suggest that decreased Ras signalling and increased Ras-GAP complex formation in CHOanx6 cells are likely to be responsible for the establishment of PKC-dependent pathway to activate Ras and the MAPK. In support of this interpretation, PKC-mediated activation of Ras has been described in other cell types (Marais *et al.*, 1998, Chiloehes *et al.*, 1999; Villalonga *et al.*, 2002). Alternatively, PKC-mediated and Ras-independent activation of MAPK (Schonwasser *et al.*, 1998, Ueda *et al.*, 1996) could explain similar activity of MAPK in CHOwt and CHOanx6 cells.

Annexin 6 and PKC $\alpha$  are both Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid-binding proteins which translocate to lipid rafts in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Orito *et al.*, 2001) suggesting that a direct interaction of both proteins (Schmitz-Pfeiffer *et al.*, 1998) could promote/potentiate the involvement of PKC for HDL-induced Ras activation.

The localisation of GAP at the plasma membrane is transient and the fact that the Ras signalling machinery, including GAP (Wang *et al.*, 1996) and Raf-1 (Rizzo *et al.*, 2001) have been found in endosomes indicate that proteins cycle between the endocytic compartment, the cytosol and the cell surface. The binding of GAP to Rab5 (Liu and Li, 1998) and the requirement of raft-associated trafficking of Ras and Raf-1 for the activation of the MAP kinase pathway seems to support this model (Rizzo *et al.*, 2001). Annexin 6 is a highly dynamic protein involved in the formation of lipid rafts (Babiychuk *et al.*, 1999; Orito *et al.*, 2001), but also the regulation of endosomal transport (Grewal *et al.*, 2000). We propose that annexin 6 possibly acts as a membrane scaffold for GAP and other members of the Ras signalling machinery in these cellular locations. Thus

temporal and spatial changes in annexin 6 localisation/concentration could influence the composition and interaction of proteins in membrane subdomains in the endosomal compartment and at the plasma membrane. The modification of these specific microdomains ultimately modulates the activity of signal transduction pathways.

## METHODS

**Lipoproteins and antibodies.** High density lipoproteins (density 1,125 - 1,21 g/ml) were isolated as described in Rinninger *et al.*, (1994). Sources of antibodies in Table 1.

**Cell culture.** CHO cells were grown in Ham's F-12, 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The annexin 6 overexpressing cell line CHOanx6 has been described in Grewal *et al.* (2000).

**Measurement of Ras activation.** Cells were harvested and 600 µg of the post-nuclear supernatant (PNS) was incubated for 2 h at 4 °C with glutathione sepharose-4B beads pre-coupled with GST-RBD (Ras binding domain) (de Rooij and Bos, 1997).

**Raf-1 kinase activity assays.** The PNS was immunoprecipitated for 2 h at 4°C with 2 µg of anti-Raf-1 pre-coupled with 20 µl of protein G-sepharose. Raf-1 activity in the immunoprecipitates was then determined by quantitating the amount of phosphorylated MBP (myelin basic protein) (Marais *et al.*, 1998).

**GAP membrane binding assay.** Cells were starved overnight and scraped in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 1 mM DTT plus protease inhibitors). The pellet was resuspended and homogenized in 1 ml cold lysis buffer. After low speed centrifugation the PNS was spun at 100.000 g for 30 min at 4 °C. The supernatants (S100) containing cytosolic proteins were collected and the pellets containing cellular membranes (P100) were resuspended in 100 µl of lysis buffer (Jaumot and Hancock, 2001). The protein content was measured and then 100 µg of membranes were incubated with 300 µg of cytosol at 30 °C for 30 min in the presence of either 0 – 2 µM Ca<sup>2+</sup>, 5 µg GSTanx6 or GSTanx6<sub>1-175</sub>, respectively. The samples were spun at 100.000 g at 4 °C for 15 min, the supernatants were discarded and the membrane pellets were resuspended by sonication in 50 µl lysis buffer. Aliquots were analyzed by western blotting (for p120GAP and caveolin).

**Subcellular fractionations.** 1x10<sup>7</sup> cells were starved overnight, washed and scraped in buffer A (0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8 plus protease inhibitors). After centrifugation for 5 min at 1.400 g, the pellet was resuspended in 1 ml of buffer A, homogenized by 20 strokes through a 23 gauge needle and centrifuged. The postnuclear supernatant (PNS) was layered on top of 10 ml of 30 % Percoll in buffer A and centrifuged at 84.000 g for 30 min in a Beckman 70.1 Ti rotor (Smart *et*

*al.*, 1995). 1 ml fractions were taken from the bottom to the top of the gradient and aliquots were analyzed by Western blotting for the distribution of p120GAP, Ras, annexin 6 and annexin 2.

**Immunoprecipitation.**  $1 \times 10^7$  cells were starved overnight, washed in 5 ml of buffer HB (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) and scraped in 1 ml of lysis buffer (HB plus 5 mM NaF, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.1% (v/v) Triton X-100 and protease inhibitors). Cells were homogenised and centrifuged for 5 min at 14.000 g. The PNS was removed and centrifuged again. Then 500  $\mu\text{g}$  of cell lysate was incubated with 1  $\mu\text{g}$  of anti-GAP (rabbit) in 500  $\mu\text{l}$  lysis buffer for 120 min at 4 °C. Samples were incubated with 2.5  $\mu\text{l}$  of Protein G sepharose for 45 min at 4 °C, centrifuged and washed 3 times in buffer HB and the immunoprecipitates analysed.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants for C.E. and T.G. (Acciones Integradas HA2002-0055), C.E. (FIS01/1527 and G03/015 from Ministerio de Sanidad y Consumo, BMC2003-04754 from Ministerio de Ciencia y Tecnología) and T.G. (Gretl Raymond Foundation).

## REFERENCES

- Babiychuk, E.B., Palstra, R.J., 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**: 35191-35195.
- Chiloeches, A., Paterson, H.F., Marais, R., Clerk, A., Marshall, C.J. & Sugden, P.H. (1999). Regulation of Ras-GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J. Biol. Chem.*, **274**: 19762-19770.
- Cullen, P.J. & Lockyer, P.J. (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**: 339-348.
- Davis, A.J., Butt, J.T., Walker, J.H., Moss, S.E. & Gawler, D.J. (1996). The Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid binding domain of P120GAP mediates protein-protein interactions with Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane-binding proteins. Evidence for a direct interaction between annexin VI and P120GAP. *J. Biol. Chem.*, **271**: 24333-24336.
- de Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Heeren, J., Beisiegel, U. et al. (2002). Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J. Biol. Chem.*, **277**: 32187-32194.
- Deeg, M.A., Bowen, R.F., Oram, J.F. & Bierman, E.L. (1997). High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**: 1667-1674.
- de Rooij, J. & Bos, J.L. (1997). Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene*, **14**: 623-625.
- Donovan, S., Shannon, K.M. & Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signalling. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1602**: 23-45.
- Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G. et al. (2000). Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J. Biol. Chem.*, **275**: 33806-33813.
- Grewal, T., de Diego, I., Kirchhoff, M.F., Tebar, F., Heeren, J., Rinninger, F. et al. (2003). High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves

scavenger receptor type I-mediated activation of Ras. *J. Biol. Chem.*, **278**: 16478-16481.

Jaumot, M. & Hancock, J.F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* , **20**: 3949-3958.

Liu K. & Li G. (1998). Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to Rab5 and stimulates its GTPase activity. *J. Biol. Chem.*, **273**: 10087-10090.

Lockyer, P.J., Kupzig, S. and Cullen, P.J. (2001). CAPRI regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway . *Curr. Biol.*, **11**: 981-986.

Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H.F., Olson, M.F. & Marshall, C.J. (1998). Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science*, **280**: 109-112.

Matveev, S., Uittenbogaard, A., van der Westhuyzen, D. & Smart, E.J. (2001). Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 5609-5615.

Orito, A., Kumanogoh, H., Yasaka, K., Sokawa, J., Hidaka, H., Sokawa, Y. et al. (2001). Calcium-dependant 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**: 235-241.

Pol, A., Calvo, M., Lu, A. & Enrich, C. (1999). The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology*, **29**: 1848-1857.

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

Rinninger, F., Brundert, M., Jäckle, S., Galle, P.R., Busch, C., Izbicki, JR. et al. (1994). Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, **19**: 1100-1114.

Rizzo, M.A., Kraft, C.A., Watkins, S.C., Levitan, E.S. & Romero, G. (2001). Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.*, **276**: 34928-34933.

Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F. & Parton, R.G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras

function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.*, **1**: 98-105.

Schmitz-Peiffer, C., Browne, C.L., Walker, J.H. & Biden, T.J. (1998). Activated protein kinase C alpha associates with annexin VI from skeletal muscle. *Biochem J.*, **330**: 675-81.

Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. & Parker, P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 790-798.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C. & Anderson, R.G.W. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 10104-10108.

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

Villalonga, P, López-Alcalá, C., Chiloeches, A., Gil, J., Marais, R., Bachs, O. and Agell, N. (2002). Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts *J. Biol. Chem.*, **277**: 37929-37935.

Wang, Z., Tung, P.S. and Moran, M.F. (1996). Association of p120 ras GAP with endocytic components and colocalization with epidermal growth factor (EGF) receptor in response to EGF stimulation. *Cell Growth Differ.*, **7**: 123-133.

## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. **Annexin 6 inhibits HDL-induced activation of Ras.** Controls (CHOwt) and annexin 6 overexpressing CHO cells (CHOanx6) were starved overnight and incubated for (A) 3 min +/- 100 mM PDGF or (B) 0 – 30 min with 40 µg/ml HDL<sub>3</sub>. Lysates were subjected to RBD pulldown to analyse the amount of activated Ras (RasGTP). Reduced basal levels of Ras-GTP in CHOanx6 cells have already been described (Pons et al., 2001). For quantification of HDL-induced Ras activation in CHOwt and CHOanx6 cells see Fig. 6C.

FIG. 2. **Annexin 6 promotes the membrane binding of GAP.** (A) Membranes from CHOwt and CHOanx6 cells were incubated with cytosol and 0 – 2µM Ca<sup>2+</sup>. The membrane-bound proteins were isolated and analysed by Western blotting for GAP, Annexin 2 (Anx2) and caveolin (Cav). (B) Membranes and cytosol from CHOwt cells were incubated with recombinant GST-annexin 6 (GSTanx6) and GST-annexin 61-175 (GSTanx61-175) in the presence of 2 µM Ca<sup>2+</sup> as described above. The membrane-bound proteins were analysed by western blotting for p120GAP and caveolin (Cav).

FIG. 3. **Annexin 6 stimulates Ras-GAP assembly.** (A) Serum-starved CHOwt and CHOanx6 cells were subjected to subcellular fractionation through Percoll gradients. Fractions were collected from the bottom to the top and analysed for the distribution of GAP, Ras, Raf-1, PKC $\alpha$ , Anx6 and Anx2. (B) Cell lysates from CHOwt and CHOanx6 were immunoprecipitated with anti-GAP antibody and then analysed for Annexin 6 and Ras by Western blot as indicated.

FIG. 4. **Annexin 6 overexpression inhibits HDL-induced Raf-1-activation.** (A) After overnight serum deprivation, cells were incubated with HDL<sub>3</sub> (40 µg/ml) for 0 - 30 min at 37 °C and Raf-1 activity assays were performed (see 'Methods'). The Raf-activity for 3 independent experiments (mean  $\pm$  S.D.) is shown. (B) Control Western blot analysis of Raf-1, Ras-isoforms (H-, N-, K-Ras), GAP and caveolin in duplicate cell lysates from CHOwt (lane 1, 2) and CHOanx6 cells (lane 3, 4). (C) Western blot analysis of SR-BI and annexin 2 (Anx2) in total cell lysates and plasma membrane fractions isolated from Percoll gradients (see 'Methods') in CHOwt and CHOanx6 cells.

FIG. 5. **Cyclodextrin treatment inhibits HDL-induced activation of H-Ras and MAPK.** CHOwt and CHOanx6 cells were starved overnight and pre-treated +/- 1%  $\beta$ -



Methyl-cyclodextrin for 45 min at 37 °C. Cells were then incubated with HDL (40 µg/ml) for 3 minutes at 37 °C and Ras and MAPK activation in the lysates was determined.

**FIG. 6. Alternative pathways can activate MEK and MAPK in CHOAnx6 cells.**

Serum starved CHOwt and CHOAnx6 cells were incubated with HDL (40 µg/ml) for 0 - 10 min as indicated. Western blot analysis of RBD pulldowns or total cell lysates was used to determine the activation of Ras (Ras-GTP), Mek (P-MEK) and MAPK (P-MAPK).

**FIG. 7. HDL-induced activation of MAPK is PKC-dependent in CHOAnx6 cells.**

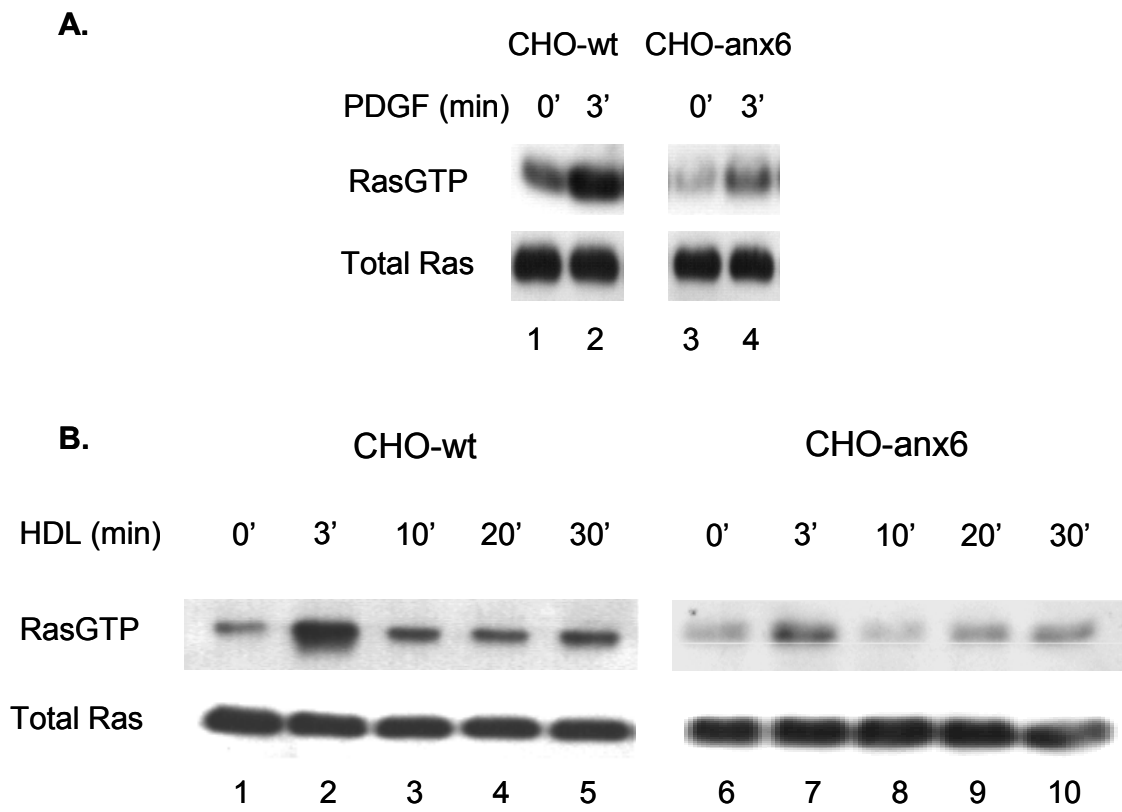
(A) CHOwt (lane 1-3) and CHOAnx6 cells (lane 4-6) were starved and incubated overnight ± 500 nM TPA to inhibit PKC $\alpha$  activity. Cells were then incubated with HDL (40 µg/ml) for 3 min at 37 °C, and lysates were tested for Ras (Ras-GTP and Total), MEK (P-MEK), MAPK (P-MAPK), PKC $\alpha$  and Annexin 6. (B) HDL-induced activation of Ras in CHOwt cells ( $p=0.0104$ , column 1 vs 2) and CHOAnx6 cells ( $p=0.0058$ , column 4 vs 5) was quantified. The loss of Ras activity in TPA-treated CHOAnx6 cells is significant ( $p=0.0392$ , column 2 vs 5). Bars represent the mean ± S.D. of 8 independent experiments (t test).

**Table 1. Antibodies used in this study**

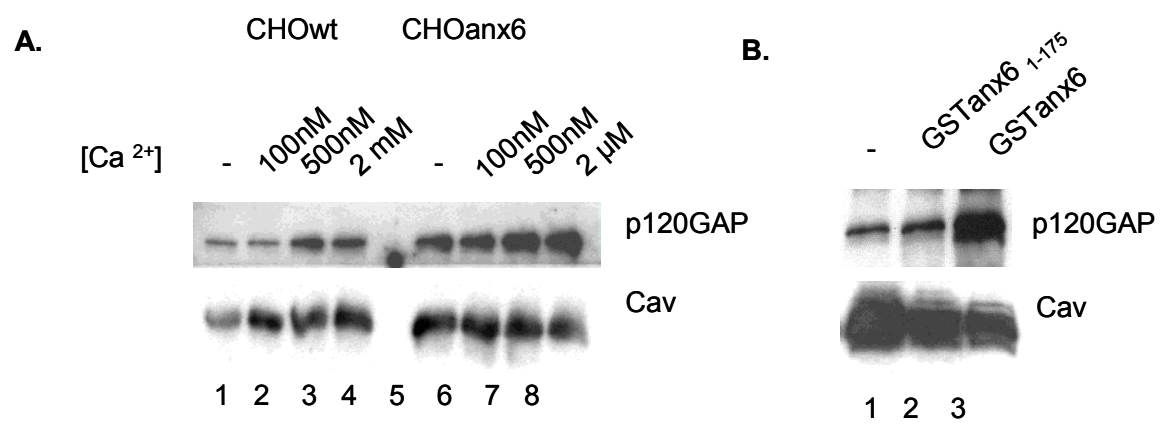
Target	Host	Specificity	Source
Pan-Ras	m	m	Santa Cruz
Caveolin	r	p	Transduction Laboratories
Raf-1	m	m	Transduction Laboratories
Mek-P	m	m	Cell Signalling
MAPK-P	r	p	Cell Signalling
GAP	m	m	BD Bioscience
PKC-alfa	m	m	BD Bioscience
Annexin 2	m	m	BD Bioscience
Annexin 6	r,sh	p	Grewal and Enrich
MARCKS-P	r	p	Cell Signalling
H, K, N-Ras	m	m	Santa Cruz

Note: Host: m, mouse; r, rabbit; sh, sheep. Specificity: m, monoclonal; p, polyclonal

**Figure 1**

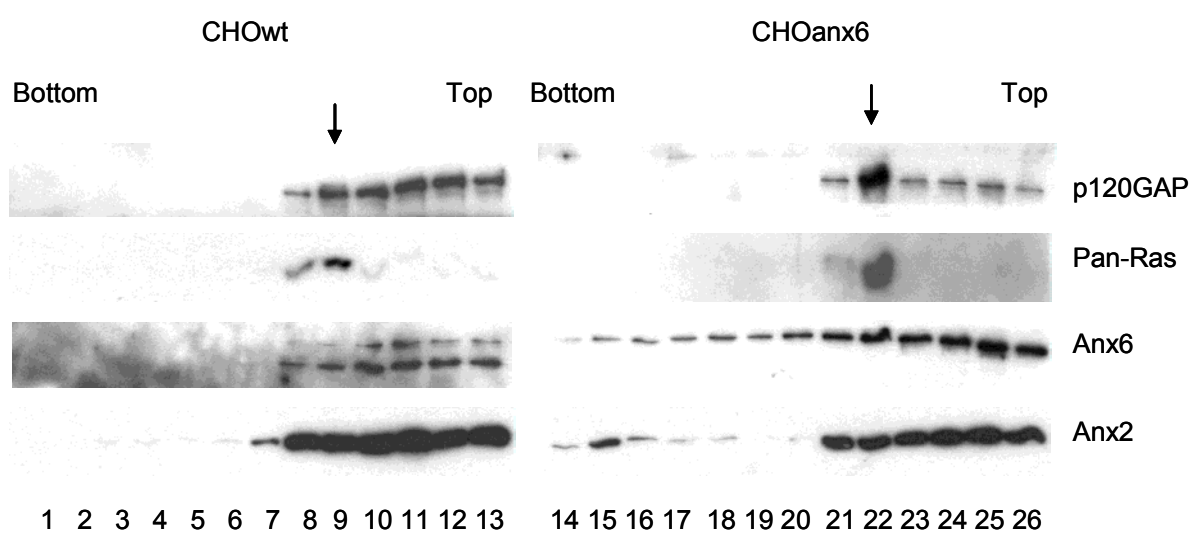


**Figure 2**

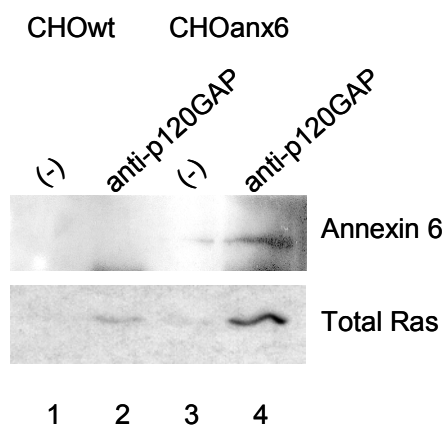


**Figure 3**

**A.**

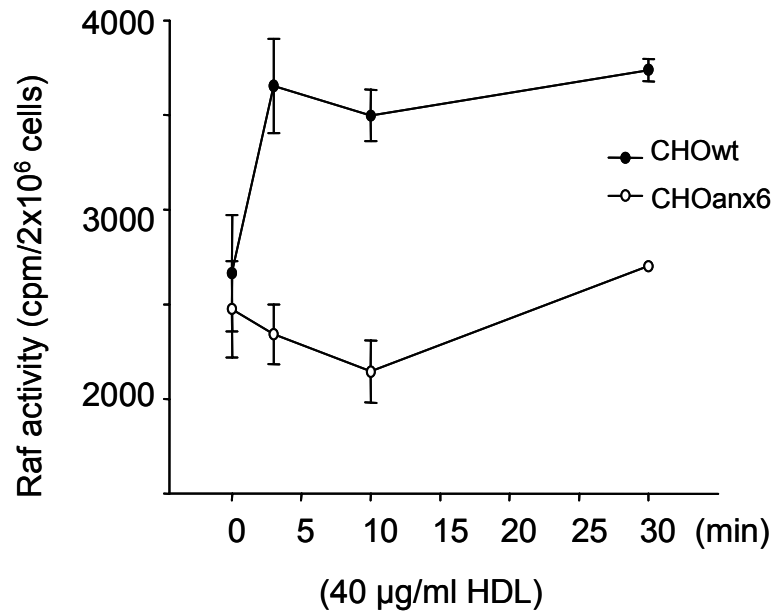


**B.**

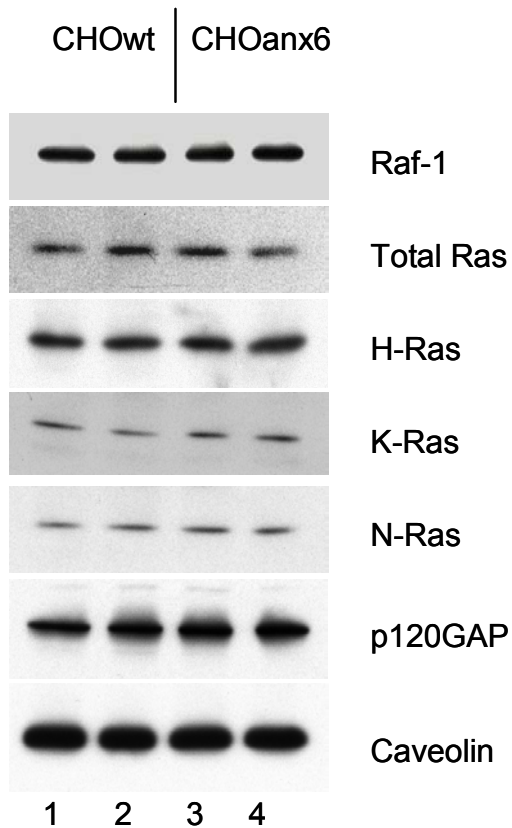


**Figure 4**

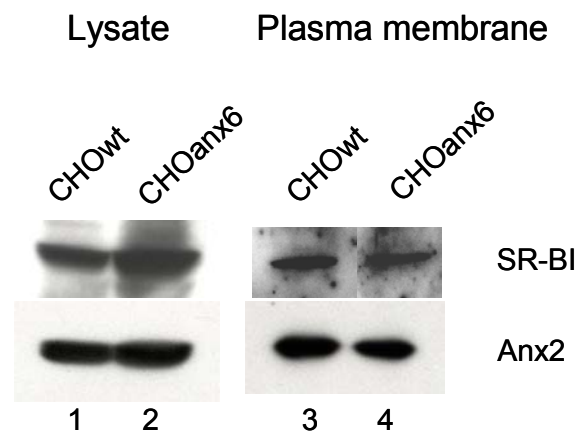
**A.**



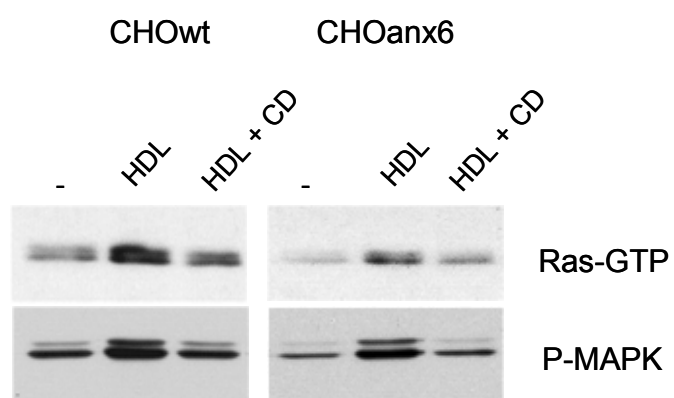
**B.**



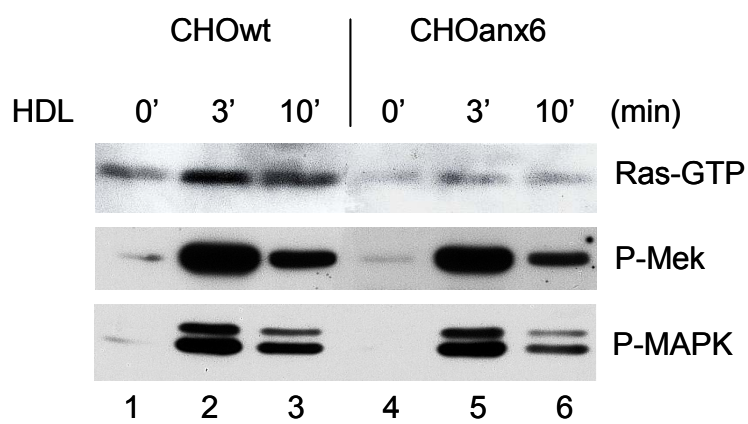
**C.**



**Figure 5**

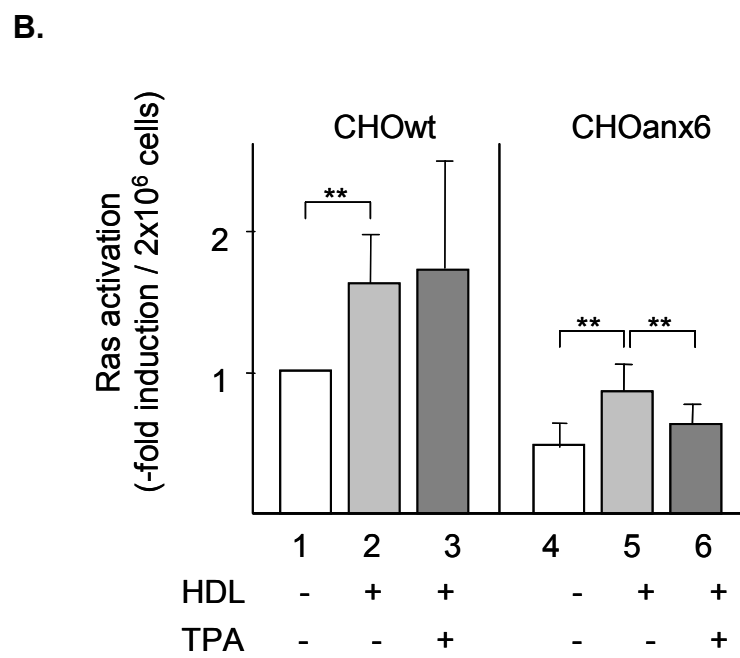
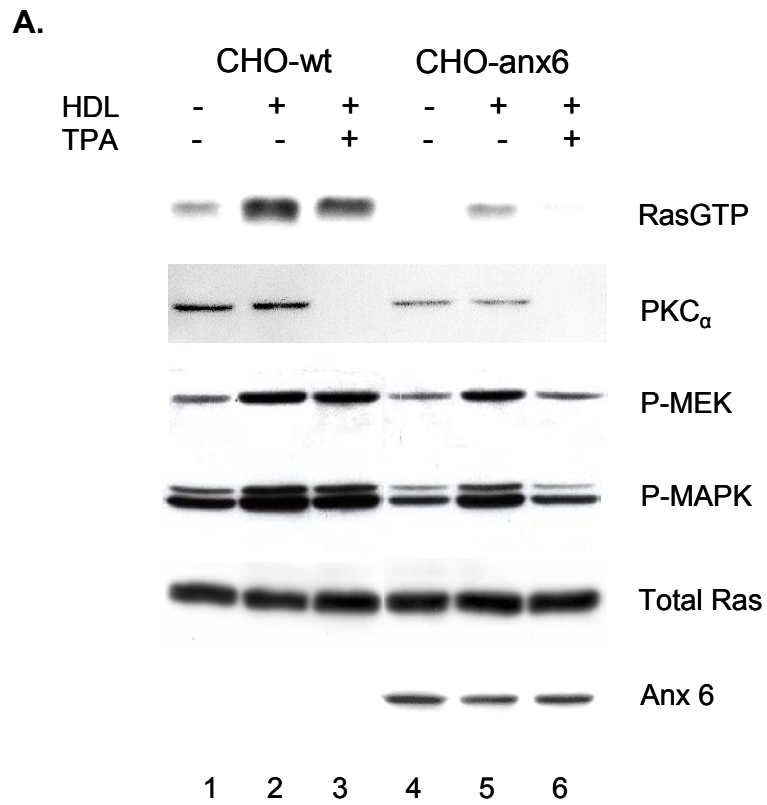


**Figure 6**





**Figure 7**



## **RESUMEN PARTE III:**

### **ANNEXIN 6-MEDIATED MEMBRANE RECRUITMENT OF p120GAP MODULATES THE ACTIVATION OF RAS AND RAF**

#### **Antecedentes**

La señalización proliferativa a través de las MAPKs se encuentra inhibida, a diferentes niveles, por la sobreexpresión de anexina A6. En concreto, ha sido observada la menor activación de Ras, y la nula actividad Raf, en respuesta a diversos estímulos mitogénicos, como EGF, FCS o TPA, en células CHO-Anx6. Sorprendentemente, en éstas células, la señalización a través de MEK y ERK no se encuentra afectada.

Las lipoproteínas HDL ha sido recientemente descrito que activan la señalización mitogénica de Raf / MEK / MAPK de forma dependiente de proteínas G y con una contribución importante del enzima PKC.

Uno de los mecanismos reguladores clave en la cascada de las MAPKs es el ciclo de activación-desactivación de la GTPasa Ras, la cuál es capaz de activar potentemente a Raf-1. En este ciclo de Ras, que acontece en la cara citoplasmática de las membranas celulares, colaboran moléculas citosólicas accesorias, principalmente los factores GEFs (que activan a Ras) y GAPs (que lo inhiben). Ha sido descrita la formación de un complejo entre la anexina A6 y p120GAP, uno de los reguladores negativos de Ras; la colaboración entre GAP y anexina A6 representa una de las explicaciones más plausibles a los efectos de la anexina A6 en la señalización de las MAPKs.

#### **Objetivos**

1. Observar el efecto de la anexina A6 en la señalización mitogénica a partir de HDL y PDGF.
2. Dilucidar el papel de la PKC sobre la señalización de MAPKs en células CHO y CHO-Anx6.

3. Determinar los mecanismos que explica la inhibición, mediada por anexina A6, de Ras y MAPKs, a través del análisis de la asociación de p120GAP a las membranas donde se encuentra Ras.

## Resultados

De forma similar a lo descrito anteriormente, observamos como ante estímulos mitogénicos diferentes, como las HDL o el PDGF, la activación de Ras y Raf se encuentra inhibida por la sobreexpresión de anexina A6, sin afectarse la activación de MEK y MAPK. La sobreexpresión de anexina A6 no induce en cambio modificaciones de la cinética de activación de estas moléculas.

El análisis de la asociación de p120GAP a la membrana de células CHO y CHO-Anx6 revela un incremento de esta asociación en presencia de la anexina, en respuesta a calcio pero también en condiciones basales. La asociación in-vitro de GAP a la membrana depende, además, de la presencia del núcleo C-terminal intacto de la anexina A6.

Al analizar la distribución subcelular de GAP y Ras, se observa que, al sobreexpresar la anexina A6, estas moléculas co-distribuyen en las mismas fracciones del gradiente, sugiriendo la formación de complejos GAP-Ras en las membranas de forma dependiente de anexina A6. Similarmente, la inmunoprecipitación de Ras y GAP se incrementa como resultado de la sobreexpresión de anexina A6, la cuál asimismo se asocia al complejo.

La activación de las MAPKs por las HDL está mediada por H-Ras, ya que el pretratamiento con ciclodextrina, que inhibe específicamente dicha isoforma, bloquea la señalización. Sorprendentemente, al analizar la participación del enzima PKC en la activación de Ras y las MAPKs, observamos que, mientras que ésta es independiente de PKC en células CHO control, pasa a depender parcialmente del enzima en células que sobreexpresan anexina A6. Este hecho sugiere una relación entre la desactivación de Ras, mediada por la formación de complejos con p120GAP y anexina A6, y la participación de la PKC en la vía de las MAPKs.

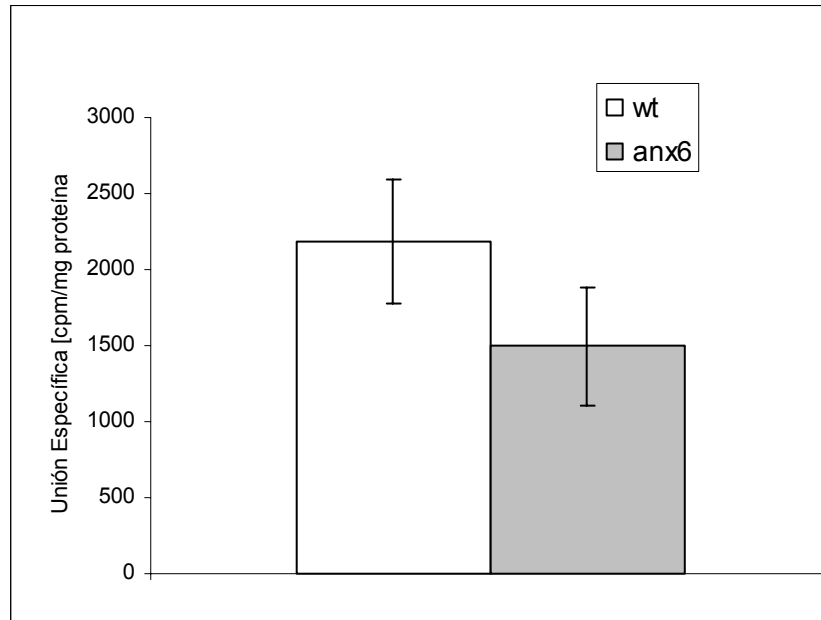
Parte III  
Resultados complementarios

Las células CHO presentan bajos niveles de receptor SR-BI, tanto a nivel de la expresión de la proteína como del mRNA. No obstante, la inhibición de la activación de Ras observada al bloquear la unión de las HDL al receptor SR-BI (Grewal T et al., 2003) sugería que, aún expresándose en bajas cantidades, los niveles de receptor eran suficientes para desencadenar la señalización. Del mismo modo, el efecto observado en células que sobreexpresan anexina A6, con una reducida activación de Ras en respuesta a las HDL, podría ser debido a una menor unión de la partícula al receptor SR-BI.

Para confirmar estos supuestos se realizaron análisis de *binding* con la partícula de HDL marcada radiactivamente ( $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>). La partícula de HDL utilizada había sido previamente purificada para asegurar la carencia de Apo E y Apo B, las cuáles pueden facilitar la unión al receptor de LDL, también presente, en baja cantidad, en las células CHO salvajes. Los resultados obtenidos en 4 experimentos independientes demuestran que, tanto en células CHO-wt como CHO-AnxA6, existe unión específica de la partícula de HDL al receptor SR-BI, capaz de explicar la señalización observada.

Al comparar ambas líneas celulares (CHO-wt y CHO-AnxA6) se observa que la sobreexpresión de anexina A6 conlleva una moderada disminución, de aproximadamente un 25 %, en el porcentaje de unión de HDL a la superficie celular, si bien la estadística no da elevada significación al resultado ( $p=0.0781$ ). En cualquier caso, no parece que disminuciones tan moderadas y de escasa significación puedan servir para explicar las considerables diferencias en cuanto a la actividad Ras y, más evidentemente, Raf-1. Además, la observación de similar grado de inhibición de Ras, en células que sobreexpresan anexina A6, al emplear estímulos distintos como PDGF, EGF o TPA, apoya la existencia de un mecanismo independiente de la mera unión ligando-receptor (ver *Figura 1*).

Las isoformas de Ras difieren en la corta (25 aa) región de unión a la membrana, el extremo C-terminal hipervariable (HVR), a través del cuál reciben



**Figura 1. Unión de  $^{125}\text{I}$ -HDL a la superficie de células CHO-WT y CHO-ANX A6.** Las células, sembradas por triplicado, se deprivan 12 horas en medio HAM's F-12-0.5 % FCS. La unión se realiza durante 1 hora a 4°C en presencia de medio HAM's F-12-0 % FCS-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$   $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>. En paralelo se realiza el mismo ensayo de unión pero añadiendo un exceso de ligando (HDL<sub>3</sub>) no-radiactivo, para determinar la unión inespecífica (no-saturable). Después de lavar extensamente en PBS-2mg/ml BSA a 4 °C, la radiactividad del lisado (en NaOH 0.1 N) se determina en un contador de centelleo. Las barras muestran la media aritmética y la desviación estándar de los valores de unión específica obtenidos a partir de 4 experimentos independientes ( $t$  test =0,0781).

diversas modificaciones post-traduccionales, como palmitoilaciones o farnesilaciones, que las direccionan hacia microdominios distintos de la membrana. Así, la isoforma que esencialmente se asocia a las caveolas es H-Ras. En *lipid rafts* no caveolares, se encuentran principalmente H- y N-Ras, mientras que en membrana no ordenada se concentra K-Ras. Esta diferente localización, además de modular las vías efectoras de cada isoforma, ha sido utilizada para inhibir específicamente a una u otra isoforma. En este sentido, la extracción del colesterol de la membrana de las caveolas con ciclodextrina, inhibe selectivamente a la señalización a partir de H-Ras (Roy S et al., 1999).

La ciclodextrina, al extraer el colesterol de la membrana, puede afectar a la propia estructura de las caveolas, lo cuál en último término podría interferir en la correcta unión de la partícula de HDL al receptor SR-BI, mayormente asociado dominios caveolares (Babitt J et al., 1997). Por otra parte, la depleción de los niveles de colesterol celular inducida por la droga es capaz de activar la síntesis del receptor, en células adrenales (Sun Y et al., 1999). Estas posibles interferencias de la droga se descartaron analizando la unión de la partícula a la superficie de células pretratadas o no con ciclodextrina.

En los ensayos de unión con  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub> no se hallaron alteraciones significativas derivadas del pretratamiento con ciclodextrina. Así, las células CHO salvajes (CHOwt) pretratadas con ciclodextrina ven ligeramente disminuida su asociación a la partícula de HDL, mientras que las células que sobreexpresan anexina A6 incrementan levemente esta unión ante el pretratamiento. Estas mínimas variaciones, obtenidas a partir de tres experimentos independientes, no son estadísticamente significativas. Concluimos así que la inhibición en la señalización de Ras por la droga era específica y no a través de la afectación de las propiedades de unión de las HDL al receptor (ver *Figura 2*).

La observación de la carencia de efecto de la ciclodextrina sobre la unión de HDL a la superficie de células CHO se analizó mediante microscopía de fluorescencia. Así, la misma subfracción de HDL, libre de Apo E y Apo B, se

	% Binding	Desv. Est.	T test
CHO-WT	90,84	10,82	0,429
CHO-Anx A6	107,93	12,16	0,656

**Tabla. Efecto de la ciclodextrina sobre la unión de  $^{125}\text{I}$ -HDL a la membrana.** El protocolo de unión de  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub> se describe en Material y Métodos. La tabla muestra los valores (en %) de unión obtenidos en células pretratadas 45 minutos con un 2% de ciclodextrina en el medio de cultivo, de forma previa a la unión de  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>, con respecto a los obtenidos en los respectivos controles no tratados (que corresponden al 100%). Los datos provienen de 3 experimentos independientes.

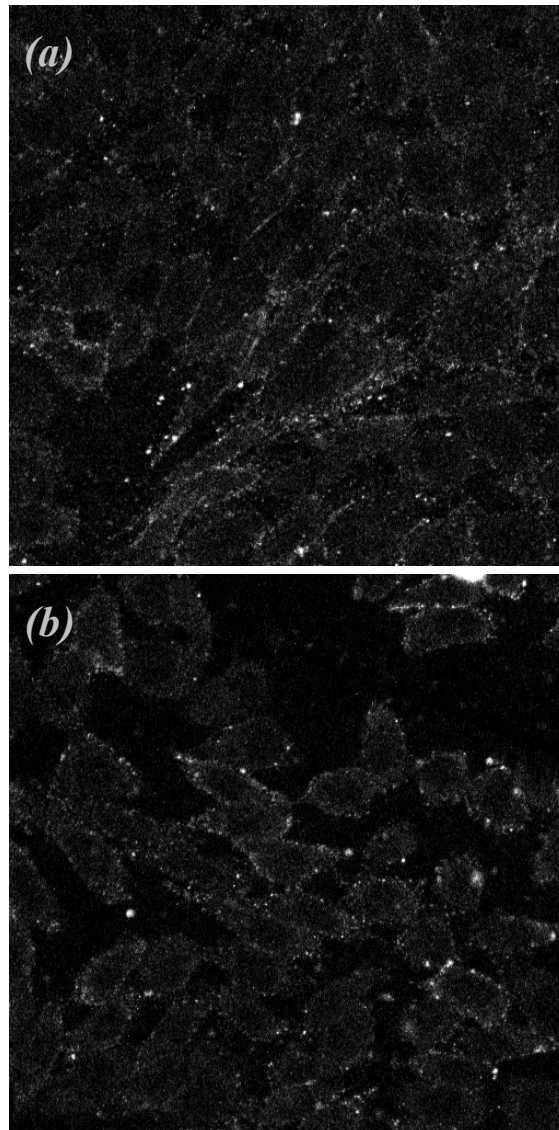


conjugó con el fluorocromo Cy3. En concreto, dicha conjugación se realiza entre el fluorocromo y la cubierta proteica de las HDL, principalmente constituida por Apo-A<sub>1</sub>. Mientras que los lípidos transportados en el interior de la partícula son eficientemente internalizados por la célula en respuesta a la unión al receptor SR-BI, la partícula (conteniendo su cubierta proteica) se internaliza pobremente manteniéndose mayoritariamente unida a la membrana (revisado en Krieger M, 1999). De esta manera, la partícula completa constituye un marcador idóneo de la unión al receptor SR-BI de las caveolas. Las imágenes obtenidas revelan que existe unión de la partícula a la superficie de células CHO. Esta unión, no obstante, es baja, como corresponde a la escasa expresión de SR-BI en estas células. Al igual que lo que ocurría al analizar el binding de <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>, no se observan diferencias en esta moderada unión al pretratar las células con ciclodextrina, descartando así la interferencia de la droga a este nivel (ver *Figura 3*).

Ha sido desarrollada una línea celular derivada de CHO que sobreexpresa el receptor SR-BI (CHO-SRBI), con el fin de analizar detalladamente aspectos como la localización subcelular del receptor, la afinidad por la partícula de HDL, la captación selectiva de lípidos así como el desarrollo de herramientas capaces de modular estos procesos (Krieger M, 1999). Esta línea celular, además, carece del receptor de LDL el cuál, si bien no compite con receptores específicos de la partícula de HDL, sí que se une a ésta con elevada afinidad.

Las lipoproteínas HDL no son los únicos ligandos del multi-receptor SR-BI (Krieger M and Herz J, 1994). Entre otros ligandos, se encuentra la albumina sérica, las lipoproteínas LDL y VLDL e incluso los fosfolípidos aniónicos.

El receptor SR-BI es palmitoilado en cisteínas transmembrana y este hecho concentra al receptor en las caveolas, desde donde se une a la partícula de HDL y media la transferencia selectiva de ésteres de colesterol (Urban S et al., 2000). Quisimos determinar esta localización mediante inmunofluorescencia



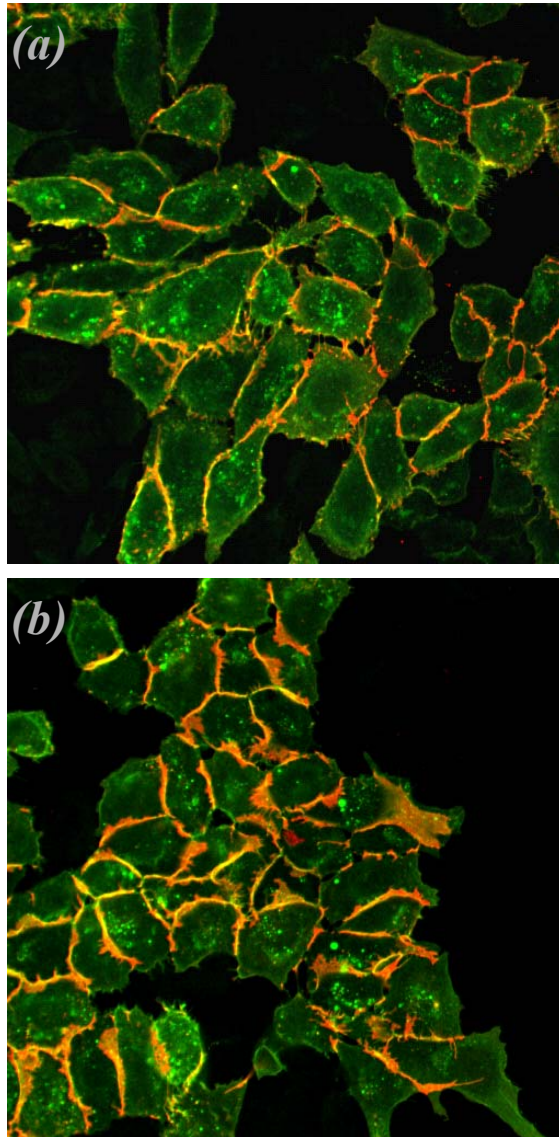
**Figura 3. Efecto de la ciclodextrina sobre la unión de HDL-Cy3 a la superficie de células CHO.** Brevemente, células CHO-WT deprivadas O/N en medio HAM's-F12-0.5 % FCS son pretratadas, en medio HAM's-F-12-0% FCS, en presencia (a) o ausencia (b) de 2% ciclodextrina durante 45 minutos a 37 °C. A continuación se incuban, durante 1 hora a 4 °C, en medio HAM's-F12-0% FCS-200 µg/ml HDL<sub>3</sub>-Cy3. Por último, la monocapa se lava en PBS y fija en PBS-4% PFA. Las imágenes son captadas en un microscopio confocal espectral (Leica® TCS SL).

con anticuerpos específicos (KKB.1) contra el dominio extracelular del receptor (Gu X et al., 2000), en las células CHO que sobreexpresan SR-BI.

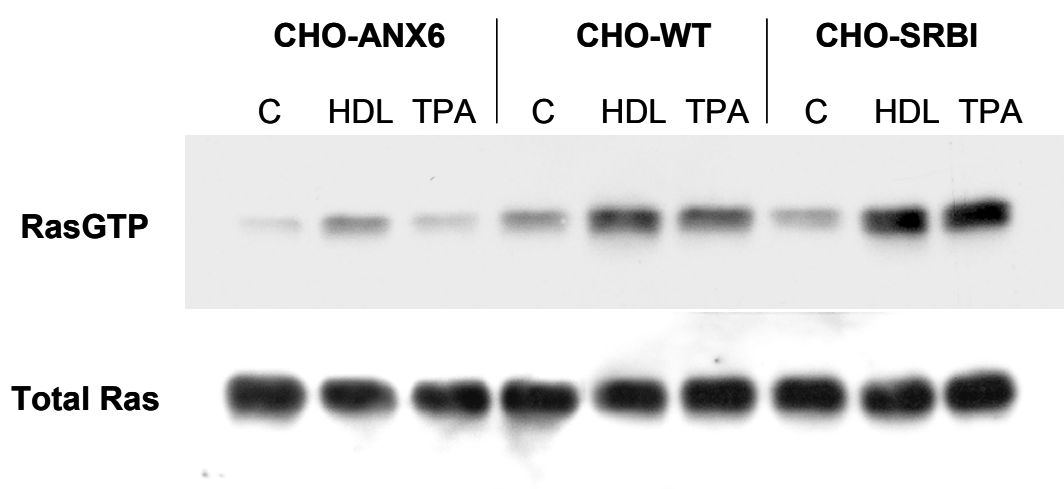
Las imágenes captadas por microscopía confocal revelan un elevado grado de colocalización entre la partícula de HDL (conjugada con Cy3) y el receptor SR-BI. El marcaje de SR-BI se asemeja al descrito en esta línea celular (Eckhardt ER et al., 2004). Esta elevada colocalización, en presencia de grandes cantidades de receptor en la membrana, indica que las HDL utilizadas mantienen una elevada afinidad por el receptor y que dicho receptor se une escasamente a otros componentes del medio extracelular. Este hecho permite confirmar que, en nuestro sistema de células CHO, la unión de la partícula a la membrana así como la activación observada ante el pretratamiento con HDL son mediados por dicho receptor (ver *Figura 4*).

Además de los experimentos de inmunocitoquímica que demuestran la elevada asociación de las HDL utilizadas al receptor SR-BI, se realizaron ensayos de pull-down para determinar el grado de actividad Ras, en respuesta a HDL, en las células que sobreexpresan el receptor SR-BI (CHO-SRBI). En paralelo se analizó la activación en los sistemas utilizados hasta el momento en nuestro estudio, las células CHO-wt y CHO-AnxA6. Estos ensayos de *pull-down* con GST-RBD revelan como la sobreexpresión del receptor en la membrana de células CHO conlleva un incremento, de aproximadamente un 100 %, en la activación de Ras en respuesta a HDL, con respecto a células CHO control. El conjunto de estos resultados demuestra que el receptor SR-BI participa, a través de su unión a las HDL, en la activación de Ras (ver *Figura 5*).

Anteriormente había sido descrito que las HDL, a través de su unión a células CHO-SRBI, eran capaces de activar al enzima eNOS (Yuhanna IS et al., 2001). Las vías de activación de la eNOS comprenden el incremento de calcio citosólico, la activación de la kinasa Akt o la generación de un incremento intracelular de ceramida. Smart y colaboradores (Li X-A et al., 2002) han descrito recientemente que la activación de eNOS, en células CHO-SR-BI, es consecuencia de la generación de ceramida, descartando los efectos del calcio



**Figura 4. Colocalización entre HDL<sub>3</sub>Cy3 y el receptor SR-BI.** Células CHO-SRBI son deprivadas 12 h en medio HAM's-F12-0.5 % FCS y pretratadas durante 45 minutos a 37 °C en presencia (a) o ausencia (b) de 2% ciclodextrina disuelta en HAM's-F-12-0% FCS. Las células se incuban en HAM's-F12-0% FCS-50 µg/ml HDL3-Cy3 a 4 °C durante 1 hora. La monocapa se lava en PBS, fija en PBS-4% PFA y se somete a inmunofluorescencia (sin permeabilizar) con el anticuerpo anti-SRBI (KKB.1; dilución 1/1000).



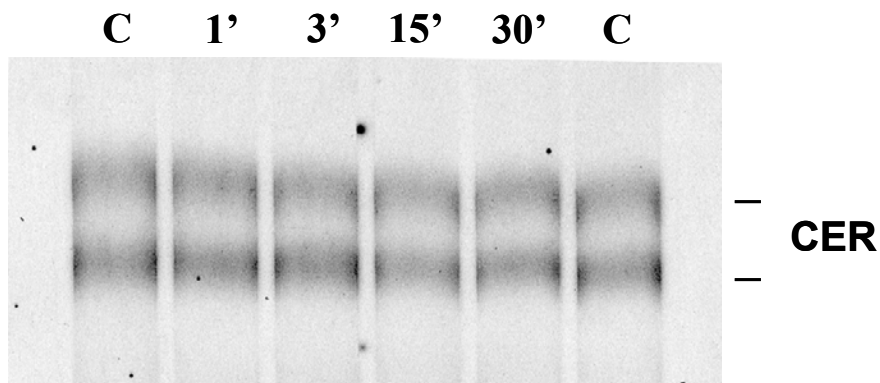
**Figura 5. Activación de Ras por HDL en células CHO-WT, CHO-AnxA6 y CHO-SRBI.** Células deprivadas O/N en medio HAM's F-12 0 % FCS en presencia (TPA) o ausencia (C, HDL<sub>3</sub>) de 500 nM de TPA son activadas (HDL<sub>3</sub>, TPA) o no (C) con 40 µg/ml de HDL<sub>3</sub> durante 3 minutos a 37 °C. A continuación las células se lisan y someten al protocolo de pull-down con GST-RBD (ver Material y Métodos). El anticuerpo primario utilizado es anti-panRas (dilución 1:100).

intracelular o la fosforilación activadora de Akt. Es por ello que, disponiendo del mismo sistema celular, quisimos realizar una aproximación preliminar a estos resultados.

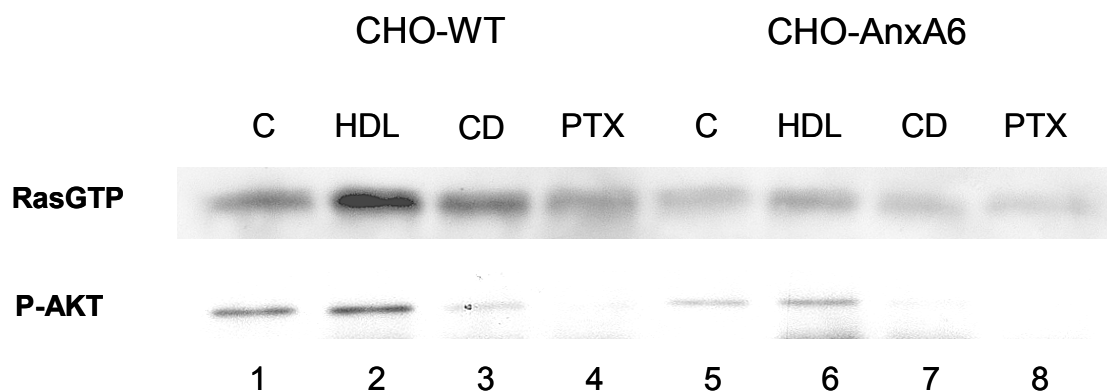
La generación de ceramida se determinó en células CHO-wt, CHO-Anx A6 y CHO-SR-BI, a partir de la hidrólisis de esfingosina radiactiva. Éste método, de elevada sensibilidad, se testó en varias (n=3) ocasiones no observándose incremento de ceramida en ninguna de ellas. Este resultado contradice así lo publicado por Smart y colaboradores. No obstante, cabe mencionar que, para la realización de dicho experimento, las células fueron privadas en ausencia de suero por espacio de 3 horas para evitar una depleción generalizada de los esfingolípidos en cuestión. Esta deprivación, algo más corta que las realizadas en el resto de ensayos (10 horas), podría dar lugar a niveles basales de activación demasiado elevados para observar el efecto de las HDL (ver *Figura 6*).

La activación de H-Ras ha sido ampliamente descrito que activa a la PI3-K, enzima que fosforila y activa a la Akt. Teniendo en cuenta que H-Ras es la isoforma activada por las HDL, analizamos la fosforilación del dominio regulador de la Akt (en ser-473) a partir de lisados celulares pretratados o no con HDL. Nuestros resultados demuestran, de forma consistente y repetitiva, la moderada activación de Akt en respuesta al tratamiento con HDL, contradiciendo lo publicado anteriormente por Smart y colaboradores. Esta activación, en consonancia con lo descrito (Hancock JF, 2003; Yan J et al., 1998), es proporcional a la obtenida para H-Ras, de tal forma que las células CHO-wt generan mayores niveles de Akt activo que las células CHO-AnxA6. En resumen, en nuestro modelo parece que la activación de la eNOS se debe más probablemente a la activación de la PI3-K por parte de H-Ras, y no tanto a la generación de incrementos de ceramida (ver *Figura 7*).

Los resultados mostrados apoyan el modelo de señalización descrito para las HDL a través del receptor SR-BI, en células CHO. Así, la unión de las HDL al



**Figura 6. Niveles de ceramida ante la activación por HDL<sub>3</sub>.** Células CHO-SR-BI, incubadas O/N en presencia de <sup>14</sup>C-esfingosina (1 µCi/ml) en el medio de cultivo, se deprivan 2 horas en medio HAM's-F-12-0% FCS de forma previa a la activación por HDL<sub>3</sub> (3 min a 37 °C). Se añade 1.5 ml de metanol:cloroformo (1:2) a la resuspensión de células (0.5 ml en PBS), se mezcla y se centrifuga 5 min a 1000 g. La fase inferior se evapora y se realiza hidrólisis alcalina (1h en metanol-0.1 M KOH a 37 °C) del precipitado. Se repite el proceso y el precipitado se resuspende en metanol:cloroformo (1:1), que se carga en una placa de TLC (thin layer chromatography) preequilibrada en cloroformo:acético (90:10). La radiactividad de la <sup>14</sup>C-ceramida separada en la cromatografía se captura en phosphoimager por espacio de 72 horas. Los marcadores se revelan con spray de sulfato cúprico al 10 % (disuelto en ácido ortofosfórico).



**Figura 7. Activación de Akt por el tratamiento con HDL.** Células CHO-wt y CHO-AnxA6 son deprivadas O/N en medio HAM's F-12-0% FCS. En los carriles 4 y 8 se añadió además, al medio de deprivación, toxina pertussis (PTX, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) para inhibir la señalización de proteínas  $G_i$ . Los carriles 3 y 7 corresponden a células tratadas, en los últimos 45 minutos de deprivación, con un 2 % de ciclodextrina añadida al medio. Finalmente, las células (carriles 1-8) fueron activadas con HDL (40  $\mu\text{g/ml}$ ) disueltas en el medio de cultivo, por espacio de 3 minutos a 37 °C. La actividad Akt se determinó, a partir de 30  $\mu\text{g}$  del lisado, mediante western blot con anticuerpos específicos contra la forma fosforilada en ser-473 (anti-Akt, ver Tabla Anticuerpos). La actividad Ras se cuantificó mediante ensayo pulldown con GST-RBD (ver Material y Métodos) seguido de un western blot con anticuerpos anti-panRas (ver Tabla Anticuerpos).



receptor SR-BI, en la membrana de células CHO-wt ó CHO-AnxA6 se correlaciona con el incremento de actividad Ras y la final activación de las MAPKs. La colocalización del receptor y la partícula de HDL en la membrana plasmática y la activación específica de H-Ras concuerdan con una señalización a partir de *lipid rafts* caveolares. Del mismo modo, la sobreexpresión en CHO del receptor SR-BI potencia esta señalización a partir de HDL.

La sobreexpresión de anexina A6 inhibe parcialmente la activación de Ras y totalmente la de Raf-1, en respuesta a HDL, de tal forma que se incrementa la participación del enzima PKC $\alpha$  en dicha señalización. Esta intervención, en último término, da lugar a niveles normales de actividad MEK y MAPK, si bien los efectos derivados de esta divergencia quedan por esclarecer. Igualmente queda por esclarecer el papel exacto del calcio intracelular.

Por último, observamos como la activación de H-Ras en respuesta a las HDL se acompaña de un incremento de la fosforilación de la kinasa AKT/PKB, la cuál podría participar en la descrita activación de la eNOS. En este sentido, el incremento de la ceramida no parece, en nuestro sistema, contribuir tan significativamente en la actividad del enzima endotelial.