

Universidad de Salamanca
Instituto Neurociencias de Castilla y León

Tesis doctoral

**Identificación y caracterización de
desubiquitiniasas que modulan
el receptor de neurotrofinas
TrkA**

Begoña Anta Rodríguez

*Dirigida por:
Juan Carlos Arévalo Martín*

Salamanca, 2014



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



Juan Carlos Arévalo
C/ Pintor Fernando Gallego, 1
Instituto de Neurociencias de Castilla y León
37007 Salamanca, España

Tfno: 34 923 294500 Ext. 1871
Fax: 34 923 294750
Email: arevalojc@usal.es

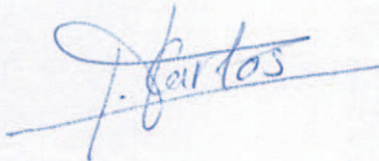
Dr. Juan Carlos Arévalo Martín, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular y Patología y miembro del Instituto de Neurociencias de Castilla y León,

CERTIFICA,

Que D.^a Begoña Anta Rodríguez, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral "Identificación y caracterización de desubiquitininas que modulan el receptor de neurotrofinas TrkA".

Que ha revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y da su conformidad para su presentación y defensa públicas.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Salamanca, a veintitres de octubre de dos mil catorce.



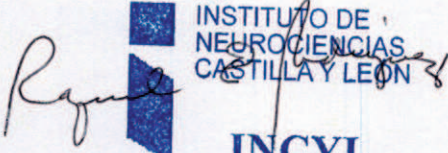
Fdo. Dr. Juan Carlos Arévalo Martín

Dra. Raquel E. Rodríguez Rodríguez, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Directora del Instituto de Neurociencias de Castilla y León,

CERTIFICA,

Que la Tesis Doctoral "Identificación y caracterización de desubiquitinasas que modulan el receptor de neurotrofinas TrkA", ha sido realizada por D.^a Begoña Anta Rodriguez, licenciada en Biología, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Arévalo Martín, y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Salamanca, a veintitres de Octubre de dos mil catorce.



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

INCYL

Fdo. Dr. Raquel E. Rodríguez Rodríguez

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Carlos Arévalo, director de este trabajo de investigación, por darme la grandísima oportunidad de trabajar en su laboratorio y por enseñarme que con persistencia, las rocas que te encuentras en el camino al final se convierten en granos de arena.

También querría dedicar un especial agradecimiento a todos los amigos que han ido pasando a mi lado durante estos cinco años dándome su apoyo incondicional.

A “las chicas JC”: Saray, Cris, Tao, mostrando un especial agradecimiento a “mi Laura”. A los chicos de “al lado”: Saúl y Antonio. A la gente del laboratorio 10: Fernando, Maite, Miguel y, sin duda, mi grandísimo agradecimiento a Marta, “por nada en especial y todo en particular”. Al puertorriqueño del laboratorio 6: Marcelo. A las chicas/o del laboratorio 1y 4: Vero, Yaneri, Flora y destacando mi agradecimiento a Dani. A todos mis “padawanes” (en la versión actual denominados “patitos”) directos e indirectos,: Bea, Carlos, Gloria, Roman, Kike y Julia, de los que he aprendido más, de lo que yo humildemente les he podido enseñar. A la Gran Sociedad del comedor del INCYL, a cada uno en particular, por darme aire fresco cada día. En general a la gente del INCYL que ha hecho que mí día a día en el INCYL sea mucho más alegre: Ana (técnico del INCYL), Ana (la de la limpieza), Irene, Javier Herrero, Carmen (conserjería)...

No me quiero olvidar de aquella gente del gremio que me ha estado apoyando día a día: Seila, Carmen, Patricia, Marta Sánchez, Gelen..., y cómo no, Silvia, uno de mis grandes pilares.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a mi hermana, a mis padres, a mi “cuñado” y a mis tíos, Josefina y Marcelino.

Y lo mejor, siempre para el final. Gracias a Luis, simplemente, por TODO.

Doña Bego

Índice

I. Abreviaturas	I
II. Introducción	5
1. Las neurotrofinas y sus receptores	7
1.1. Neurotrofinas	7
1.1.1. NGF	8
1.2. Receptores de neurotrofinas	10
1.2.1. Receptor de NGF: TrkA	11
1.3. El receptor p75	12
2. Señalización de los receptores TrkA	14
2.1. Ruta de las MAPKs	15
2.2. Ruta PI3K/Akt	17
2.3. Ruta PLC γ	17
3. Regulación post-traducional de los receptores Trks	18
3.1. Ubiquitinación	18
3.1.1. E3 ubiquitina ligasas para TrkA	22
3.1.1.1. TRAF6	22
3.1.1.2. Nedd4-2	23
3.1.1.3. C-Cbl	26
3.2. Desubiquitinación	27
3.2.1. USP36	30
3.2.2. USP8	32
4. Tráfico endosomal de RTKs	34
4.1. Regulación del tráfico de los RTKs: Ubiquitinación / Desubiquitinación	35
III. Justificación y objetivos	37
IV. Material y métodos	41
1. Cultivo celular de líneas celulares	43
1.1. PC12 6/15	43
1.2. Human embryonic kidney (HEK) 293 y 293FT	43
2. Transfecciones	44
2.1. Método basado en lípidos catiónicos: Lipofectamina 2000	44
2.2. Método basado en co-precipitados de sales y DNA usando fosfato cálcico	44
3. Cuantificación de proteínas mediante Bradford	45
4. Inmunoprecipitación	46
4.1. Unión covalente de anticuerpos a proteína A o G - agarosa: "Crosslink"	46

5. Fraccionamiento núcleo / resto de la célula	47
6. Western blot	47
6.1. Electroforesis (SDS-PAGE)	47
6.2. Electro-transferencia húmeda	48
6.3. Inmunodetección	49
6.4. Eliminación de anticuerpos de una membrana usada	51
7. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	51
7.1. Obtención de RNA de células en cultivo	51
7.2. Retrotanscripción	51
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
8. Técnicas de clonación plasmídica	52
8.1. Preparación de bacterias DH5 α competentes	52
8.2. Transformación de bacterias competentes	53
8.3. Lisis bacteriana y extracción del plásmido	53
8.4. Digestión de plásmidos	54
8.5. Purificación de fragmentos de restricción	54
8.6. Ligaciones	54
8.7. Secuenciación	55
9. Generación de partículas lentivirales	55
9.1. Construcción pLVTHM shRNA	55
9.1.1. Anillamiento y fosforilación	55
9.1.2. Confirmación por PCR de la obtención de la construcción	56
9.2. Producción de partículas lentivirales	56
9.3. Uso de las partículas lentivirales	57
10. Mutación puntual	57
11. Síntesis de proteínas recombinantes	58
11.1. Construcción pGEX 6p-1-USP36 (1-120 aa)	58
11.1.1. Diseño de oligonucleótidos para la síntesis del péptido recombinante	58
11.1.2. PCR, Digestión y Ligación	58
11.1.3. Expresión de pGEX 6p-1-USP36 (1-120)	59
11.2. Generación de la proteína recombinante GST-USP36 (1-120)	59
11.3. Lisis de las bacterias y purificación de la proteína recombinante	60
12. Producción de anticuerpos	60
12.1. Preparación de la inmunización	61
12.1.1. Procesado de la sangre	61
12.2. Titulación de los sueros	62
12.3. Purificación de anticuerpos	62
12.3.1. Producción de una columna de afinidad para anticuerpos	62

12.3.2. Purificación de anticuerpos en una columna de afinidad	62
13. Experimentos de interacción de proteínas “Pull-Down”	63
14. Ensayo de desubiquitinación <i>in vitro</i>	63
15. Ensayo de ubiquitinación <i>in vitro</i>	64
16. Ensayo de biotilización	65
17. Inmunofluorescencia	66
18. Soluciones	67
19. Reactivos	70
V. Resultados	71
Capítulo I	73
1. Ensayo de identificación de desubiquitininasas	74
1.1. Selección de desubiquitininasas que modulan la cinética de TrkA activo	77
Capítulo II	81
1. Validación de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de USP8	83
2. USP8 interacciona con TrkA, TrkB y TrkC pero no con p75	84
3. USP8 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA	85
4. USP8 afecta a los niveles de expresión de TrkA	87
5. USP8 interviene en la diferenciación de células PC12 6/15 inducida por NGF	87
Capítulo III	89
1. Validación de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de USP36	91
2. USP36 interacciona con TrkA, TrkB y TrkC pero no con p75	93
3. USP36 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA	94
4. USP36 afecta a los niveles de expresión de TrkA	96
5. USP36 co-localiza con TrkA en el citoplasma	96
6. USP36 interacciona con Nedd4-2	99
7. USP36 no afecta a los niveles de Nedd4-2, pero si a su ubiquitinación	100
8. La expresión de USP36 esta mediada por la actividad catalítica de Nedd4-2	102
9. USP36 interfiere en la interacción entre Nedd4-2 y TrkA	104
10. USP36 modula la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2	107
11. USP36 afecta a los niveles de TrkA de la membrana plasmática	110
12. USP36 no afecta a la diferenciación de células PC12 6/15 inducida por NGF	112
VI. Discusión	113
VII. Conclusiones	125
VIII. Bibliografía	129

Abreviaturas

A (Alanina)

Akt/PKB (*Protein Kinase B*)

AMSH (*Associated Molecule with the SH3-domain of STAM*)

AMSH-LP (*AMSH-Like Protein*)

APS (*Ammonium Persulfate*)

ARMS/Kidins220 (*Ankyrin Repeat-rich Membrane-Spanning protein*)

ATP (*Adenosine Triphosphate*)

BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BEX (*Brain expressed X linked*),

BSA (*Bovine Serum Albumin*)

C o **Cys** (Cisteína)

Ca²⁺ (Cálcio)

c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphomais*)

CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*)

CR (*Cysteine Repeats*)

CREB (*cAMP Response Element Binding*)

CrkL (*v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-Like*)

C-terminal (*Carboxilo terminal*)

CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*)

CYLD (*Cylindromatosis -turban tumor syndrome-*)

DAG (*Diacylglycerol*)

DGK δ (*Diacylglycerol kinase δ*)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO (*Dimetil Sulfoxido*)

DRG (*Dorsal Root Ganglion*)

DTT

DUB (*Desubiquitinasa*)

E (Ácido glutámico)

E1 (*Enzima activadora de la ubiquitina*)

E3 (*Ubiquitin ligase*)

ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)

EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EE (*Early Endosome*)

EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*)

EGF (*Epidermal Growth Factor*)

ENaC (*Epithelial Na Channel*)

ERBB2 (*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*)

ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*)

ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*)

FBS (*Fetal Bovine Serum*)

FRS2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2*)

G o **Gly** (Glicina)

Gab1 (*Grb2 associated binder 1*)

GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*)

GFP (*Green Fluorescent Protein*)

GPCR (*G Protein-coupled Receptors*)

Grb2 (*Protein G related binding 2*)

GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*)

GST (*Glutation S transferasa*)

Hbp (*Hrs-binding protein*)

HECT (*Homologous to E6AP Carboxy Terminus*)

HEK (*Human Embryonic Kidney*)

hERG (*human Ether-à-go-go Related Gene*)

HGF (*Hepatocyte Growth Factor*)

HIF1- α (*Factor hypoxia-inducible factor-1- α*)

HRP (*Horse radish Peroxidase*)

Hrs (*H*epatocyte growth factor-*r*egulated tyrosine kinase *s*ubstrate)

HS (*H*orse *S*erum)

Ig (*I*mmunoglobulinas)

IκB (*NF*-kappa-*B* inhibitor)

ILVs (*I*ntraluminal *V*esicle)

IMD (*I*mmune *D*eficiency)

IP3 (*I*nositol trisphosphate)

IPTG (*I*sopropyl-beta-*D*-thiogalactopyranoside)

Itch (*E3* ubiquitin-protein ligase *I*tchy homolog)

K (*L*isina)

KCNQ1 (*P*otassium voltage-gated channel subfamily *KQT* member *1*)

Kv (*V*oltage-Gated *K*⁺ channels)

LE (*L*ate *E*ndosome)

LPxY (*L*euцина (*L*); *P*rolina (*P*); *X*; *T*irosina (*Y*))

LRIG1 (*L*euцина-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein *1*)

LZ (*L*euцина *Z*ipper)

M o **Met** (*M*etionina)

MAPKs (*M*itogen *A*ctivated *P*rotein *K*inases)

MATH (*M*eprin and *T*RAF-*C* *H*omology)

Mdm2 (*M*urine double minute *2*)

MEK (*M*APK/*E*RK kinase)

MIT (*M*icrotubule *I*nteracting and *T*ransport)

MSKI (*M*itogen- and stress-activated protein kinase-*1*)

MVE (*M*ultivesicular *E*ndosome)

Na⁺ (*S*odio)

NaF (*S*odium *F*luoride)

NaV (*V*oltage-Gated *N*a⁺ channels)

Nedd4-2 (*N*eural precursor cell *E*xpressed *D*evelopmentally *D*own-regulated protein *4-2*)

NF-κB (*N*uclear *E*factor κ-light-chain-enhancer of activated *B* cells)

NGF (*N*erve *G*rowth *F*actor)

NoL (*N*ucleolar *L*ocalization)

NRAGE (*N*eurotrophin receptor interacting *M*AGE homolog)

Nrdp1 (*N*euregulin receptor degradation protein *1*)

NRIF (*N*eurotrophin *R*eceptor *I*nteracting *F*actor)

NT (*N*eurotrophin)

N-terminal (*A*mino terminal)

OTU (*O*varian *T*umor domain)

p75NTR (*p*75 *N*eurotrophin *R*eceptor)

PAR2 (*P*rotease *A*ctivated *R*eceptor *2*)

PC12 (*P*heochromocytoma *12*)

PCNA (*P*roliferating *C*ell *N*uclear *A*ntigen)

PCR (*P*olymerase *C*hain *R*eaction)

PDGF (*P*latelet-*D*erived *G*rowth *F*actor)

PDL (*P*oly-*D*-*L*ysine)

PEST (*P*rolina (*P*); *Á*cido glutámico (*E*); *S*erina (*S*); *T*reonina (*T*))

PFA (*P*araformaldehyde)

pH3 (*P*hospho-*H*istone *3*)

PI3K (*P*hosphoinositol *3* *K*inase)

PI3K (*P*hosphatidylinositol *3* *K*inasa)

PIP2 (*P*hosphatidyl-*i*nositol biphosphate)

PKC (*P*rotein *K*inasa *C*)

PLCγ (*P*hospholipase *C* γ)

PMSF (*P*henylmethylsulfonyl fluoride)

POHI (*P*ad *O*ne *H*omolog-*1*)

PPxY (*P*rolina (*P*); *P*rolina (*P*); *X*; *T*irosina (*Y*))

PTB (*P*hosphotyrosine-binding domain)

PVDF (*P*olyvinylidene *F*luoride)

Rap I (Ras-related Protein I)
Rhod (Rhodanese-like Domain)
RIP (Receptor Interacting Protein)
Rip I (Receptor interacting protein I)
RNAPI (RNA Polimerase I)
Rsk (Ribosomal S6 Kinase)
RTK (Receptors Tyrosin Kinase)
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
SGKI (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase I)
SH (Src Homology)
SHC (Src Homology 2 Domain Containing)
shRNAs (small hairpin RNAs)
siRNA (small interference RNA)
Smurf (Smad ubiquitin regulatory factors)
SNC (Sistema Nervioso Central)
SNP (Sistema Nervioso Periferico)
SNX3I (Sorting Nexin 3 I)
SOD2 (Superoxide Dismutase 2)
SOS (Son of Sevenless)
Src (Rous sarcoma oncogene)

T o Thr (Treonina)
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylene-diamine)
TG (Trigeminal ganglion)
TKB (Tyrosine Kinase Binding)
TLR (Toll-Like Receptor)
TNF (Tumor Necrosis Factor)
TRAF (TNF Receptor-Associated Factor)
Trk (Tropomyosin-related kinase)
UBA (Ubiquitin Associated)
UBC (Ubiquitin-conjugating Enzymes)
RhoA (Ras homolog Family Member A)
UBD (Ubiquitin-Binding Domain)
UBE4B (Ubiquitination factor E4B)
U-box (UFD2 homology)
UBPy (Ubiquitin-Specific processing Protease-y)
UCH (Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase)
USP (Ubiquitin Specific Proteasa)
WWP (WWP Repeating Motif)
Y o Tyr (Tirosina)

Introducción

1. Las neurotrofinas y sus receptores

1.1. Neurotrofinas

Las neurotrofinas constituyen una familia de factores tróficos que intervienen en el desarrollo, mantenimiento, supervivencia y diferenciación de neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Sus funciones son ejercidas a través de dos tipos de receptores transmembrana: 1) los receptores Trk (*Tropomyosin-Related Kinase*), que son miembros de la familia de Receptores Tirosina Quinasas (RTKs) y 2) el receptor p75NTR (*p75 Neurotrophin Receptor*), que pertenece a la superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) (Huang and Reichardt, 2003). En mamíferos, la familia de las neurotrofinas está compuesta por cuatro miembros: NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (*Neurotrophin-3*) (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990) y NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*) (Hallböök et al., 1991). Todas ellas se unen de forma específica a los diferentes receptores Trk, así NGF se une a TrkA (Kaplan et al., 1991), BDNF y NT4 se unen a TrkB (Klein et al., 1991 y 1992) y NT3 se une preferentemente a TrkC (Lamballe et al., 1991), pero también se puede unir a una isoforma de TrkA (Clary and Reichardt, 1994), desencadenándose una señalización diferente a la que se da al unirse a NGF (Harrington et al., 2011), y a TrkB con baja afinidad (Klein et al., 1991). Todas ellas se unen a p75NTR tanto en su forma inmadura, pro-neurotrofina (con alta afinidad), como con su forma madura (con baja afinidad) (Barbacid, 1995; Chao and Hempstead, 1995; Lee et al., 2001) (Figura 1).

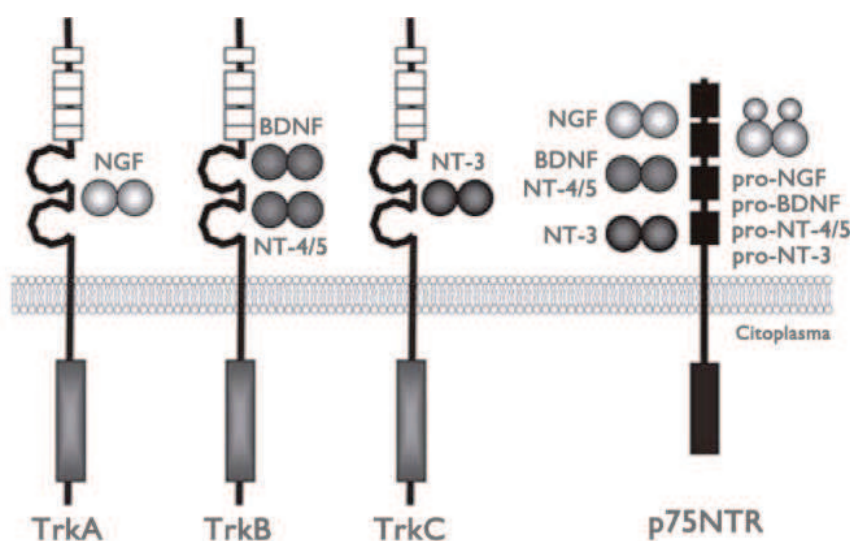


Figura 1. Neurotrofinas y sus receptores: Trk y p75NTR. (Modificado de Arévalo and Wu, 2006).

Introducción

Las neurotrofinas son polipéptidos, de entre 12 a 14 kDa, sintetizados y secretados principalmente por neuronas del SNC y SNP y por células no neuronales de diferentes tejidos. Para su síntesis se parte de un solo exón que codifica para su precursor (pre-pro-neurotrofina) que está constituido por un péptido señal en el extremo N-terminal, un pro-dominio, con regiones muy conservadas, y un extremo C-terminal que formará la molécula madura (Figura 2). Los precursores son procesados en el retículo endoplasmático donde el péptido señal se elimina por proteólisis. Posteriormente, el pro-dominio y la molécula madura se separan mediante un procesamiento endoproteolítico. (Seidah et al., 1996; Shooter, 2001). Las pro-neurotrofinas forman dímeros no covalentes mediante la interacción entre sus dominios maduros generando una estructura de nudo de cisteínas (Bradshaw et al., 1993). Los dímeros formados pueden ser procesados para generar neurotrofinas maduras en el Golgi o en vesículas secretoras mediante proteasas intracelulares, como furina y proconvertasa, o extracelularmente mediante metaloproteasas y plasmina (Pang et al., 2004; Seidah et al., 1996).



Figura 2. Representación de la estructura de las pre-pro-neurotrofinas. (Modificado de Thoenen, 1995). Las pre-pro-neurotrofinas están constituidas por un péptido señal, un pro-dominio y, tras el procesamiento proteolítico, la proteína madura con actividad neurotrófica. La proteína madura posee seis residuos de cisteína (C) conservados en la familia que establecen puentes disulfuro con otra molécula de neurotrofina para formar los dímeros biológicamente activos (Barde, 2000; McDonald and Hendrickson, 1993; McDonald et al., 1991). Triángulo negro: sitio de corte para la obtención de la proteína madura.

1.1.1. NGF

El factor neurotrófico NGF se descubrió a través de una serie de experimentos conducidos por Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger y Stanley Cohen, que culminaron con el aislamiento de la proteína y la producción del primer antisuero anti-NGF (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). A partir de ese momento se propuso “la teoría neurotrófica” en la que se postula que durante el desarrollo del SNP de los vertebrados se produce un exceso de neuronas que proyectan sus axones hacia un

tejido (neuronal o no). Las poblaciones celulares inervadas producirían cantidades limitadas de neurotrofinas, las cuales serían captadas transportadas retrógradamente provocando la supervivencia de las neuronas (Landreth, 1999; Meyer and Rasmussen, 1999). Este proceso asegura que las células diana sean inervadas por el número y tipo correctos de fibras nerviosas. Además de modular la supervivencia, las NTs están implicadas en la proliferación y en la diferenciación celular y en el crecimiento axónico de las neuronas del SN en desarrollo (Korsching and Thoenen, 1985).

Diversos estudios han mostrado que la secuencia del gen para *NGF* está altamente conservada en la escala filogenética (McKay et al., 1999). *NGF* se obtuvo inicialmente de la glándula submaxilar de ratón, donde se encuentra en gran cantidad (Angeletti and Bradshaw, 1971). En el sistema nervioso, *NGF* se expresa tanto en neuronas como en células gliales (Fahnestock, 1991; Shelton and Reichardt, 1986). También se han encontrado altas concentraciones de mRNA de *NGF* en córtex e hipocampo, que son las principales dianas de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales del prosencéfalo que responden a *NGF*. Además, células gliales como astrocitos y microglia tienen una fuerte regulación de la expresión de *NGF* después de un daño tisular e inflamación. *NGF* también se expresa en tejidos que no son del SN como la piel, concretamente, en la epidermis. Además, se ha descrito la regulación de la expresión de *NGF* en mastocitos, keratinocitos, fibroblastos, linfocitos y macrófagos después de un daño tisular (Di Marco et al., 1993).

El efecto neurotrófico de las NTs no es un fenómeno limitado a los estadios embrionarios ya que se ha descrito que en neuronas de organismos adultos se mantiene un suministro estable de NTs (Whittemore et al., 1986). La función biológica de *NGF* es ejercida tanto por su forma de pro-neurotrofina como por su forma madura, ya que estudios previos describen a pro-*NGF* como un inductor de muerte celular al actuar como ligando del receptor p75^{NTR}. Por el contrario, *NGF* tiene funciones como 1) favorecer la supervivencia neuronal (Levi-Montalcini, 1987) en desarrollo y en edad adulta, 2) definir la morfología de las conexiones sinápticas ayudando al reajuste del entorno de las neuronas y contribuyendo a la plasticidad sináptica (Yang et al., 2002). También actúa como mediador de la inflamación promoviendo la degranulación de los mastocitos y la quimiotaxis de los leucocitos, lo que indica que *NGF* está implicado en la inflamación, en la respuesta inmune y en la generación y mantenimiento de determinados tipos de dolor (Pezet and McMahon, 2006).

1.2. Receptores de neurotrofinas Trk

En el año 1986 el Dr. Martín Zanca y colaboradores describieron una nueva forma oncogénica con actividad tirosina quinasa (Martin-Zanca et al., 1986a, 1986b) a la que denominaron Trk y que, posteriormente, pasaría a denominarse TrkA al ser clonados el resto de miembros de la familia. Poco tiempo después, se clonó el receptor TrkB (Klein et al., 1990; Leibrock et al., 1989) y en último lugar fue clonado TrkC (Lamballe et al., 1991). Los receptores Trk se diferencian del resto de componentes de la familia RTK principalmente en la organización estructural de su dominio extracelular. Este dominio está localizado en el extremo N-terminal de la proteína y está constituido por dos regiones ricas en cisteínas que flanquean un dominio con tres motivos ricos en leucinas y dos dominios de tipo inmunoglobulina, responsables del reconocimiento y unión a ligando. La región extracelular está glicosilada, evitando su activación independiente de ligando y promoviendo su localización en la membrana plasmática (Watson et al., 1999). A continuación, presentan un dominio transmembrana, que no está conservada entre los distintos RTKs. Finalmente, en la región intracelular presentan el dominio citoplasmático que contiene el dominio catalítico con actividad tirosina quinasa y un extremo corto carboxilo terminal. En esta región hay diversas tirosinas conservadas que mediante fosforilación regulan su actividad y proporcionan sitios de reclutamiento de moléculas adaptadoras y enzimas que intervienen en la iniciación de las cascadas de señalización intracelular (Figura 3) (Barde, 2000; Huang and Reichardt, 2003; Patapoutian and Reichardt, 2001; Sofroniew et al., 2001).

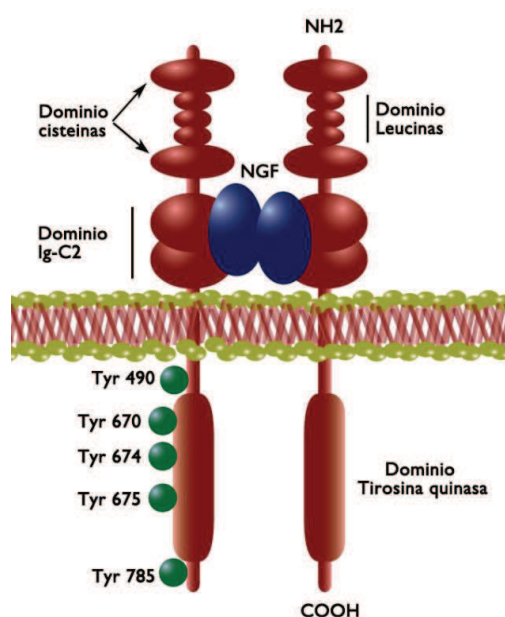


Figura 3. Estructura el receptor de neurotrofinas Trk. El receptor Trk presenta una región extracelular constituida por dos regiones ricas en cisteínas que flanquean un tándem de tres elementos ricos en leucinas y dos dominios globulares similares a los de las inmunoglobulinas (Ig-C2). El dominio transmembrana conecta con la región citoplásmica donde se localiza un dominio tirosina quinasa. En la región citoplásmica del receptor TrkA humano se encuentran indicados los restos de tirosina (Tyr) que una vez fosforilados serán los sitios de anclaje de proteínas que desencadenarán diferentes cascadas de señalización.

Los receptores Trk están en forma de monómeros en la membrana principalmente, pero al unirse las neurotrofinas homodimerizan. Esta dimerización acerca los dominios quinasa permitiendo la fosforilación en trans de residuos de tirosina localizados en el dominio catalítico y de otros dos localizados fuera de él, de manera similar a como ocurre en otros RTKs (Yarden and Schlessinger, 1987a, 1987b). En el caso del receptor TrkA humano, las tirosinas que se fosforilan y están localizadas dentro del dominio quinasa son la Y670, la Y674 y la Y675 mientras que las localizadas fuera del dominio catalítico son la Y490 y la Y785. Los dímeros activos sólo se estabilizan por la unión del ligando, debido a los cambios conformacionales que se inducen para mantener su estado activo y para la transfosforilación de las tirosinas. Sin embargo, se ha descrito que los monómeros de los receptores RTKs que se encuentran en la membrana pueden dimerizar espontáneamente, pero sólo en algunos casos son activos. De ese modo, se produce un equilibrio entre monómeros que pueden dimerizar hacia una conformación activa o hacia una conformación inactiva; sin embargo, en ausencia de ligando el equilibrio está desplazado hacia formas inactivas del receptor (Hubbard and Miller, 2007; Schlessinger, 2000).

Se sabe que la activación de RTKs también puede ser independiente de ligando a través de un fenómeno denominado transactivación que se da en respuesta a distintas señales de estrés, a cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, a despolarización de la membrana o a la activación por ligando de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Prenzel et al., 1999; Zwick et al., 1999). La transactivación de TrkA está más restringida al reservorio intracelular localizado en vesículas del Golgi e induce específicamente vías de supervivencia, aunque, a diferencia de las neurotrofinas, requiere tiempos muy largos de tratamiento (Lee and Chao, 2001; Rajagopal and Chen, 2004)

1.2.1. Receptor de NGF: TrkA

Hasta la fecha se han identificado dos formas del receptor TrkA, denominadas TrkA-I y TrkA-II, que son generadas mediante el procesamiento alternativo del exón 9 del gen *TrkA*. Se diferencian en que TrkA-II tiene añadidos seis aminoácidos situados en la región yuxtamembrana extracelular (Barker et al, 1993). Esto hace que la isoforma TrkA-II tenga más afinidad hacia NT-3 pero, sorprendentemente, no disminuye la afinidad hacia NGF (Clary and Reichardt, 1994).

Introducción

El receptor TrkA se expresa en diferentes tipos celulares. La isoforma TrkA-II se expresa principalmente en el SN (Barker et al., 1993), donde su patrón de expresión solapa en gran medida con el de p75NTR (Ernfors et al., 1989; Friedman et al., 1991a), pero no con el de TrkB o TrkC, a excepción de ciertas etapas tempranas del desarrollo (Cochran et al., 1999; Huang et al., 1999). Aunque el gen *TrkA* se expresa en el SNC su expresión es principalmente en el SNP, localizándose en las neuronas nociceptivas de pequeño tamaño de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), del ganglio del trigémino (TG) y en neuronas simpáticas (Martin-Zanca et al., 1990). En el SNC se expresa de forma muy restringida, concretamente en neuronas colinérgicas del estriado y de los núcleos basales que proyectan hacia el hipocampo y la corteza cerebral (Holtzman et al., 1992; Martin-Zanca et al., 1990). La expresión en el SN no está limitada a las neuronas ya que se ha observado tanto en células gliales como las células de Schwann en el SNP o en astrocitos y en células microgliales del SNC (Savaskan et al., 2000). Se ha descrito la expresión de TrkA-I y de TrkA-II en tipos celulares que no pertenecen al SN, tales como 1) células del sistema inmune (monocitos, linfocitos) donde las neurotrofinas ejercen funciones de supervivencia, proliferación y diferenciación (Coppola et al., 2004), 2) del sistema endocrino, 3) del sistema reproductor (masculino y femenino), donde parece que TrkA está implicado en la maduración de las gónadas durante el desarrollo (Cupp et al., 2002), 4) del riñón, 5) de los pulmones y 6) del sistema cardiaco (Lomen-Hoerth and Shooter, 2002; Tessarollo and Hempstead, 1998).

1.3. El receptor p75NTR

En el año 1986, se clonó el cDNA correspondiente al receptor humano del NGF (Chao et al., 1986) que codifica una proteína transmembrana de 75kDa y que es capaz de unir NGF, a la que se denominó p75NTR puesto que unía todas las neurotrofinas.

El receptor p75NTR pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral debido a su estructura. Está constituido por un dominio extracelular, que presenta cuatro regiones ricas en cisteínas (CRI-CR4 con 6 cisteínas cada una) que forman parte del dominio de unión, un paso transmembrana y un pequeño dominio intracelular, donde se localiza un dominio de muerte celular (Arévalo and Wu, 2006). El receptor p75NTR no posee actividad catalítica intrínseca, por lo que necesita asociarse con proteínas adaptadoras citoplasmáticas que puedan desencadenar una cascada de señalización (Friedman, 2000; Yoon et al., 1998). Hasta la fecha se han descubierto numerosas

proteínas que interactúan con el receptor como son NADE (Bex3), NRIF, NRAGE, SC-1, RhoA, TRAF4 y 6, FAP-1, etc.

El receptor p75NTR presenta una afinidad similar hacia todas las neurotrofinas maduras, sin embargo, es más alta hacia las pro-neurotrofinas (pro-NT) (Lee et al., 2001). Cuando se descubrió el receptor TrkA, se vio que unía NGF con la misma afinidad que con p75NTR y que la presencia/ausencia del receptor p75NTR modulaba la afinidad de las neurotrofinas por los receptores Trks. Así, la presencia de p75NTR disminuye la eficiencia en la unión de NT-3 a TrkA y NT4/5 a TrkB, sin embargo, incrementa la especificidad de TrkA y TrkB hacia sus ligados principales (Figura 4) (Clary and Reichardt, 1994).

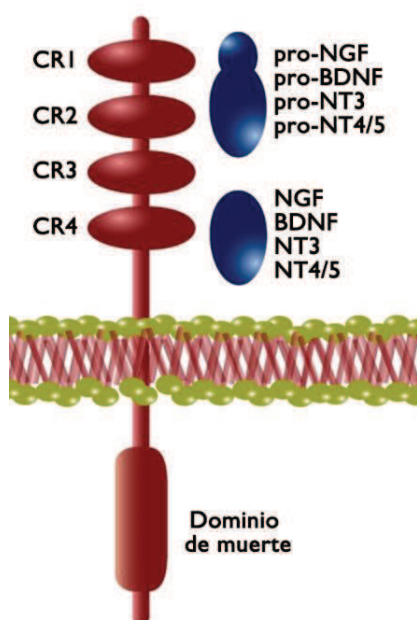


Figura 4. Esquema representativo de la estructura del receptor p75NTR. En su parte extracelular el receptor p75NTR presenta cuatro regiones ricas en cisteínas (CR), un único paso transmembrana y en su parte intracelular contiene un dominio de muerte celular. El receptor p75NTR une todas las neurotrofinas maduras con similar afinidad e incluso una pro-neurotrofinas con una afinidad mayor. CR: dominio rico en cisteínas.

Las neurotrofinas pueden usar la proteólisis intramembrana regulada (RIP) de p75NTR para transmitir señales intracelulares. El receptor p75NTR se escinde por una α -secretasa que provoca la liberación del dominio extracelular (Weskamp et al., 2004). Dicha enzima se activa como consecuencia de su fosforilación tras la activación de los receptores Trk (Kommaddi et al., 2011). Por otro lado, el fragmento C-terminal de p75NTR es escindido por una γ -secretasa, permitiendo la liberación del dominio intracelular al citoplasma con capacidad de señalización (Bronfman, 2007; Bronfman et al., 2003). Se ha descrito que el primer paso del procesamiento proteolítico de p75NTR es mediado por la activación de TrkA y que el segundo paso se da en endosomas (Urra

Introducción

S, et al 2007). Además, también se sugiere que la unión de las neurotrofinas al dominio extracelular del receptor puede inducir la escisión vía γ -secretasa y mediar la translocación del dominio intracelular al núcleo (Frade, 2005).

Al receptor p75NTR se le han atribuido distintas funciones como: 1) ser un co-receptor capaz de favorecer las señales de supervivencia mediadas por los receptores Trk (Hempstead et al., 1991; Mahadeo et al., 1994), 2) mediar la señal de muerte celular, función asociada con las pro-NT y con el receptor sortilina (Arnett et al., 2007; Kalous et al., 2012; Nykjaer et al., 2004; Zhou et al., 2009), 3) jugar un papel importante en la migración celular así como en la elongación y la retracción de neuritas (Ben-Zvi et al., 2007) y 4) regular el ciclo celular y la diferenciación de las células progenitoras (Frade, 2000).

El receptor p75NTR se expresa ampliamente tanto en tejidos neurales como no neurales. Sus niveles de expresión son máximos durante el desarrollo aunque disminuye drásticamente en la etapa adulta (Friedman et al., 1991b). No obstante mantiene una expresión reducida en las neuronas colinérgicas, en las neuronas sensoriales y en las motoneuronas espinales (Ernfors et al., 1988; Verge et al., 1992). Cabe destacar que diferentes tipos de lesión y ciertos factores de estrés celular son potentes inductores de la expresión de p75NTR en las células neuronales y gliales (Ernfors et al., 1989).

2. Señalización de los receptores Trk

Los receptores Trk dimerizan al unirse a su ligando, lo que ocasiona un cambio conformacional que activa su dominio catalítico produciéndose una transfosforilación de residuos de tirosina. En el caso del receptor TrkA humano, tras la unión a NGF se fosforilan residuos tirosina tanto del dominio catalítico (Y670, Y674 y Y675) como fuera de él (Y490 y Y785). La fosforilación de estos residuos de tirosina proporcionan un lugar de anclaje a las proteínas que contienen dominios SH2 (Dominio 2 de Homología a Src) o PTB (de unión a fosfotirosina) que van a transmitir la señal inducida por las neurotrofinas (van der Geer and Pawson, 1995).

Tras la activación de TrkA mediante interacción con NGF, su actividad catalítica es máxima entre los 5 y 10 minutos iniciales, atenuándose posteriormente (Klein et al., 1991a). Ésta reducción de la actividad catalítica se debe a la desfosforilación e

internalización de los receptores (Hempstead et al., 1992). A partir de los receptores Trk activos se desencadena la activación de tres cascadas de señalización: ruta de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), ruta del PI3K (*Phosphoinositol 3 Kinase*)/AKT (PKB, por su nomenclatura anglosajona *Protein Kinase B*) y ruta PLC γ (*Phospholipase C γ*) (Figura 5).

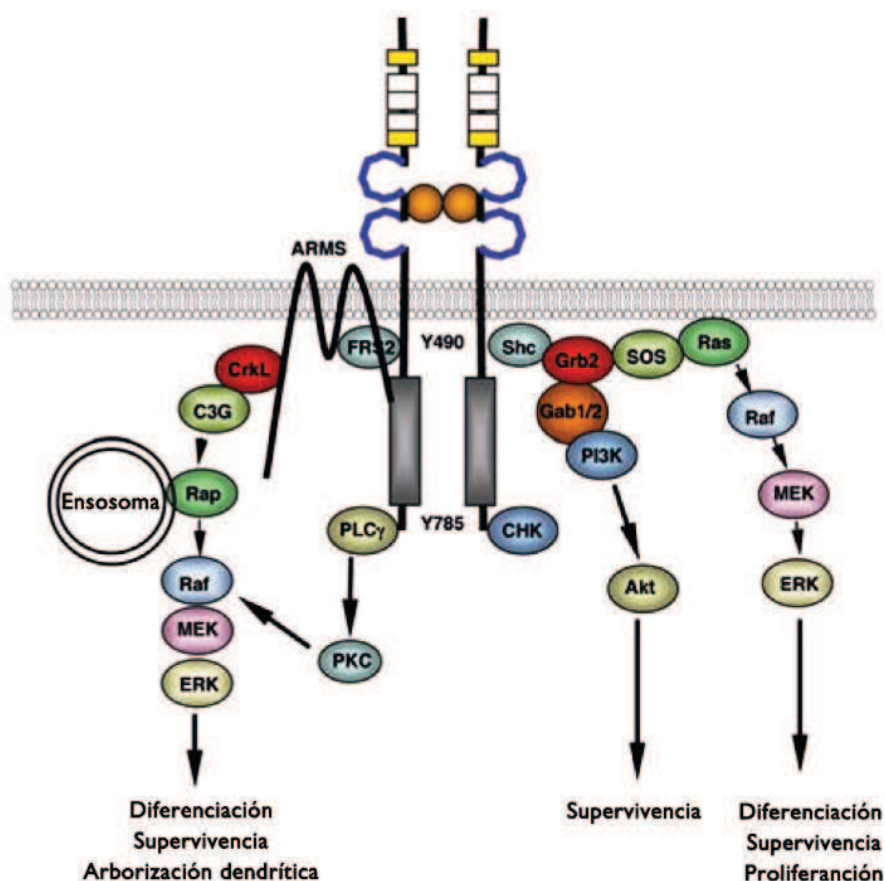


Figura 5. Vías de señalización activadas por el receptor TrkA. (Modificado de Arévalo and Wu, 2006). Esquema representativo de las cascadas de señalización intracelular mediadas por el receptor TrkA tras un estímulo de NGF. Se representan las diferentes proteínas que se asocian con residuos de fosfotirosina específicos (Y490 e Y785) del dominio citoplasmático del receptor TrkA humano. Dichas cascadas de señalización provocarán supervivencia, proliferación, crecimiento de neuritas y transcripción génica.

2.2. Ruta de las MAPKs

Está establecido que la activación mediada por neurotrofinas de la cascada de señalización de las MAPKs puede desencadenar dos rutas que se diferencian por el tiempo que se mantienen activadas: la ruta transitoria (1-2h aproximadamente) y la ruta prolongada (7h aproximadamente) (Marshall, 1995). La ruta de activación transitoria

Introducción

está mediada por la activación rápida y momentánea de la GTPasa Ras. La fosforilación del residuo Y490 del receptor facilita el acoplamiento de la proteína Shc (*Src Homology 2 Domain Containing*) mediante su dominio PTB, que a su vez reclutará la proteína adaptadora Grb2 (*Protein G related binding 2*) para formar un complejo con SOS, que es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que activa la vía de la GTPasa Ras (Dikic et al., 1995). Esta vía activa a tres proteínas quinasas que actúan de manera secuencial: Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y culminando con la activación de ERK (MAPK) (Kaplan and Miller, 2000). La activación de la GTPasa Ras necesita la interacción de Shc con p-Y490, pero es independiente de la unión de PI3K (Hallberg et al., 1998). La ruta de activación prolongada es mediada por el adaptador CrkL (*v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-Like*), que activa el intercambiador de nucleótidos C3G que se encarga de activar a la GTPasa Rap1 que a su vez activará la serin-treonin quinasa B-Raf promoviendo una activación sostenida de las MAPKs (Wu et al., 2001; York et al., 1998). Para que se de esta ruta se requiere de la internalización del receptor Trk en el compartimiento endosomal (Arévalo and Wu, 2006; Wu et al., 2001; York et al., 1998, 2000). Existe cierta controversia sobre cómo la señal se transmite desde el receptor hasta la proteína CrkL. Por un lado, se ha propuesto la proteína ARMS como una proteína adaptadora para la señalización prolongada de la ruta de las MAPKs (Arévalo et al., 2004). Tras el tratamiento con NGF, ARMS se fosforila rápidamente en tirosina y proporciona un sitio de unión para el complejo CrkL-C3G, lo que conlleva a la activación sostenida de la ruta (Arévalo et al., 2006a). Por otro lado, otros grupos han propuesto que la activación de Trk y la fosforilación en el residuo Y490 provoca el reclutamiento y la fosforilación del adaptador FRS2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2*), que proporciona sitios de unión a diversas proteínas incluyendo Grb2. Ensayos *in vitro* muestran que FRS2 se puede unir al residuo Y490 fosforilado de TrkA y también puede interactuar con CrkL (Kao et al., 2001; Meakin et al., 1999; Yan et al., 2002).

La activación de la ruta de las MAP quinasas se ha relacionado con la señalización y la regulación de la transcripción implicada en la supervivencia neuronal y la diferenciación (Hagag et al., 1986; Szeberenyi et al., 1990). Entre los sustratos de esta ruta cabe destacar las quinasas Rsk y MSK1 que activan el factor de transcripción CREB (*cAMP Response Element Binding*), el cual controla la expresión de genes esenciales para la

supervivencia/muerte neuronal y la diferenciación (Deak et al., 1998; Ginty et al., 1994; Xing and Insel, 1996).

2.3. Ruta PI3K/Akt

Esta cascada de señalización se inicia cuando Shc se une al residuo Y490 fosforilado del receptor mediante su dominio PTB. Shc forma un complejo proteico con Grb2 y Gab1 a través de sus dominios SH2, lo que promueve la activación de la quinasa PI3K y ésta a su vez a Akt (Holgado-Madruga et al., 1997). Esta ruta desempeña un papel fundamental en la supervivencia neuronal durante el desarrollo. Entre los sustratos de Akt se incluyen proteínas implicadas en muerte celular. Así la proteína Akt fosforila e inactiva la proteína pro-apoptótica Bad (Datta et al., 1997). Del mismo modo, Akt inactiva el factor de transcripción *forkhead* (FKHRL1) que regula la expresión de varios genes implicados en la muerte celular, como por ejemplo el ligando Fas (Brunet et al., 1999; Zheng, 2002). Por otra parte, la supervivencia vía NF- κ B (*Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*) se activa a través de Akt, ya que Akt fosforila la subunidad inhibidora de NF- κ B (I κ B) liberando así el factor transcripcional y permitiendo su migración al núcleo. Además, Akt se encuentra activa en el cono de crecimiento donde favorece el crecimiento y la ramificación del axón en neuronas sensoriales mediante la fosforilación e inactivación de GSK-3 β a nivel local, lo que lleva al ensamblaje de los microtúbulos que promueven el crecimiento axonal (Markus et al., 2002; Zhou et al., 2004).

2.4. Ruta PLC γ

PLC- γ es una enzima cuya actividad es inducida por las neurotrofinas al unirse al residuo Y785 fosforilado mediante su dominio SH2 (Vetter and Martin-Zanca, 1991). Tras su activación, PLC- γ hidroliza fosfatidil-inositoles bifosfato (PIP2) generando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) que son dos importantes segundos mensajeros (Obermeier et al., 1993). IP3 estimula la liberación de Ca²⁺ intracelular que activará la proteína calmodulina así como quinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina. DAG por su parte activa diferentes isoformas de la enzima PKC y, finalmente, la vía de las MAPK (Corbit et al., 1999).

3. Regulación post-traducciona de los receptores Trks

Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas modulan de manera muy significativa las cascadas de señalización en las células. Hay dos modificaciones post-traduccionales claves en la regulación de las vías de señalización intracelular que son la fosforilación, en la que se incorpora un grupo fosfato a las proteínas, y la ubiquitinación, que es un proceso más complejo en el que se unen ubiquitinas pudiendo incluso formar cadenas. Nos centraremos en la descripción de la ubiquitinación y todas sus implicaciones.

3.2. Ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona reversible muy conservada en la escala evolutiva en la que se unen ubiquitinas al sustrato mediante uniones covalentes. La ubiquitina es una proteína globular de 76 aminoácidos que está expresada de forma constitutiva y se encuentra altamente conservada en todas las células eucariotas. La ubiquitina está codificada por cuatro genes que se traducen como precursores que son procesados proteolíticamente con proteasas específicas de ubiquitina (USP), hasta formar una molécula de ubiquitina del tamaño adecuado (Kalderon, 1996; Weissman, 2001). La ubiquitina posee siete residuos de lisinas en su secuencia (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y todos ellos pueden conjugar ubiquitina uniéndose mediante un enlace peptídico a la glicina del grupo C-terminal de otra molécula de ubiquitina. Este proceso puede dar lugar a siete posibles tipos de enlace homotípicos y múltiples cadenas heterotípicas, con la excepción de la metionina I del grupo N-terminal, que al unirse a la glicina de otra ubiquitina sólo forma cadenas lineales (Figura 6) (Dikic et al., 2009; Ikeda et al., 2010).

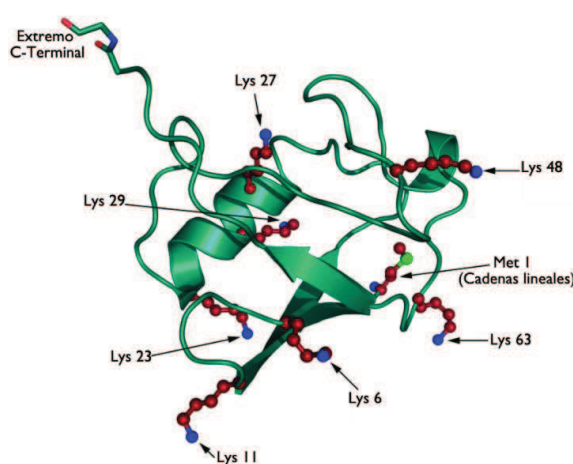


Figura 6. Molécula de ubiquitina. (Modificado de Komander, 2009). La estructura de ubiquitina muestra siete residuos de lisinas (Rojo, con el átomo de nitrógeno azul), dispuestas por diferentes lugares de la molécula, y la Met I (Rojo, con el átomo de sulfuro verde) que es el lugar de anclaje para la formación de cadenas lineales. El motivo C-terminal (Gly75-Gly76) está implicado en la unión peptídica (Rojo, oxígeno y Azul, átomos nitrógeno).

La ubiquitinación es un proceso que se compone de un complejo sistema enzimático que está constituido por tres tipos de proteínas que actúan de forma secuencial. Primero, la enzima activadora de la ubiquitina (E1) activa la ubiquitina libre mediante una reacción dependiente de adenosina trifosfato (ATP). De ese modo, se forma un enlace tioéster entre un residuo de cisteína de la E1 y la glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina. Después, la proteína E1 transfiere la ubiquitina activada a un residuo de cisteína de la enzima conjugadora de ubiquitina (UBC), también conocida como E2. Y finalmente, la ubiquitina es transferida por E2 al sustrato gracias a la acción de una proteína E3 ubiquitina ligasa (E3), formándose un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y el grupo amino de un residuo de lisina del sustrato (Figura 7) (Hershko and Ciechanover, 1998; Welchman et al., 2005).

En el genoma de mamíferos solo se codifican una o dos enzimas E1, docenas de enzimas E2 y más de 600 E3 (Kawabe and Brose, 2011). Esta abundancia de E3 ubiquitina ligasas, les permite poseer una elevada especificidad para el reconocimiento de proteínas que serán su sustrato. Esta clase de enzimas se dividen principalmente en tres grandes familias de acuerdo al dominio de ubiquitinación presente en ellas. Así podemos diferenciar a la familia de las RING (*Really Interesting New Gene*)-finger, la familia de las HECT (*Homologous to E6AP Carboxy Terminus*) y la familia de las U-box (*UFD2 homology*). Los tres dominios están altamente conservados en los eucariontes, desde las levaduras hasta los humanos (Deshaies and Joazeiro, 2009; Hatakeyama and Nakayama, 2003; Rotin and Kumar, 2009). Existen diferencias funcionales entre la familia RING-finger y U-box y la familia HECT de E3 ubiquitina ligasas. Así, las proteínas de la familia RING y U-box se unen a la E2 para que ésta sea la que transfiera la ubiquitina al sustrato que se encuentra unido a la E3. En el caso de la familia de las HECT, las E2 transfieren la ubiquitina a la E3, siendo la E3 quien la transfiere al sustrato que tenga unido. Por lo tanto, las proteínas de la familia HECT cumplen un papel catalítico durante la ubiquitinación, sin embargo, las familias RING finger y U-box facilitan la ubiquitinación de sustratos actuando como soporte (Figura 7). A diferencia de las proteínas que componen la familia RING que pueden actuar solas, las proteínas de la familia U-box suelen formar parte de grandes multi-complejos de proteínas (Ardley and Robinson, 2005).

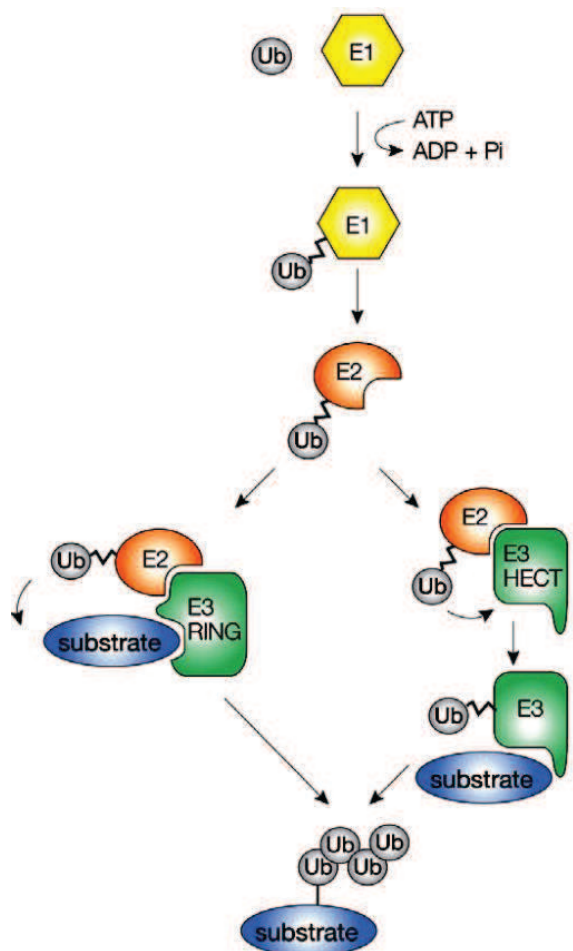


Figura 7. Conjugación de ubiquitina a su sustrato. (Woelk et al., 2007). La ubiquitina libre es activada por la E1 en una reacción dependiente de ATP. Posteriormente es transferida a la proteína conjugadora de ubiquitina E2. La transferencia de la ubiquitina desde el complejo formado por E2-ubiquitina activada a la E3 varía dependiendo del su dominio catalítico. En el caso de las E3 con el dominio RING finger, la E2 transfiere la ubiquitina activa directamente al sustrato unido a la E3, sin embargo en el caso de las E3 con el dominio HECT, la E2 transfiere la ubiquitina a la E3 y ésta a su vez al sustrato que tenga unido.

La modificación de las proteínas por la unión de ubiquitinas puede ser de diferentes tipos. La unión de una sola molécula de ubiquitina a una lisina de la proteína diana se define como mono-ubiquitinación, pero si esta misma unión se realiza en varios residuos de lisina, entonces se trata de multi-mono-ubiquitinación. Como hemos mencionado anteriormente la ubiquitina posee siete residuos de lisina a través de los cuales se pueden formar cadenas de varias unidades mediante un enlace isopeptídico con el residuo de glicina Gly76 del extremo C-terminal de otra molécula de ubiquitina, lo que se denomina poli-ubiquitinación. A su vez la poli-ubiquitinación puede ser de diferentes tipos dependiendo del tipo de lisina con la que se unan las ubiquitinas. La propiedad de decidir el tipo de poli-ubiquitinación que se va a dar la tienen las enzimas E2, ya que promueven cambios en la orientación del aceptor de ubiquitina con el fin de exponer la lisina apropiada al sitio activo de la E2 (Ye and Rape, 2009).

El tipo de ubiquitinación determina en que procesos biológicos van a estar involucradas las proteínas ubiquitinadas. La mono-ubiquitinación no está implicada ni en la degradación ni en la renovación proteica, pero sí lo está en la regulación de la

localización subcelular, la conformación, la actividad y la interacción de proteínas en la célula (Hicke, 2001). La mono-ubiquitinación interviene en la regulación de histonas y otras proteínas nucleares, en respuesta al daño del DNA, y en supresión de tumores (Ikeda and Longnecker, 2009; Sigismund et al., 2004). Además, para darse la elongación de las cadenas de ubiquitina, se requiere de un evento de mono-ubiquitinación previo (Rodrigo-Brenni and Morgan, 2007). Sin embargo, en el caso de la poli-ubiquitinación está establecido que la cadena unida a través de la K48 es una señal de reconocimiento para la degradación de la proteína sustrato en el proteasoma (26S) (Hershko and Ciechanover, 1998). Este proceso también está dirigido a la degradación y al reciclaje de ubiquitina para reemplazar los reservorios de monómeros de ubiquitina mediante la asociación de enzimas asociadas al proteosoma (Komander et al., 2009). Las cadenas de poliubiquitina unidas a través de la K63 al sustrato median señales que regulan procesos como endocitosis y tráfico de proteínas de membrana, respuesta inflamatoria, función ribosomal y reparación del DNA (Duncan et al., 2006; Geetha et al., 2005a; Huang et al., 2006; Komander, 2009; Pickart and Fushman, 2004). Aún se sabe poco sobre el resto de tipos de poliubiquitinación, pero en el caso de la señalización mediada por las cadenas de poliubiquitinación de la K11 y la K29 se ha descrito su implicación en la degradación de proteínas en el proteosoma, en el lisosoma y en el retículo endoplasmático (Figura 8) (Bremm and Komander, 2011).

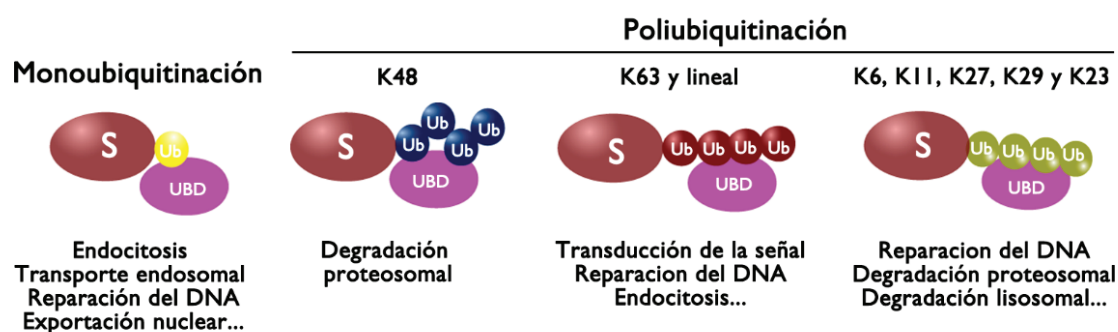


Figura 8. Tipos de ubiquitinación y procesos que regulan. La mono-ubiquitinación es la unión de una única molécula de ubiquitina a un residuo de lisina en el sustrato. La poli-ubiquitinación es mucho más variada debido a que la ubiquitina contiene siete residuos de lisina y un residuo de Met, mediante los cuales se pueden formar diferentes tipos de cadenas de ubiquitinación con distinta topología, las cuales pueden ser reconocidas específicamente por diferentes proteínas que contengan dominios UBD (*Ubiquitin-Binding Domain*) y así entrar a formar parte de diferentes procesos celulares. Ub: ubiquitina; S: sustrato.

Introducción

3.2.1. E3 ubiquitina ligasas para TrkA

Está establecido que el receptor de neurotrofinas TrkA es ubiquitinado después de unirse a su ligando, lo que promueve su internalización y posterior incorporación al tráfico endosomal (Arévalo et al., 2006b; Geetha et al., 2005b; Makkerh et al., 2005). Hasta la fecha varios grupos han descrito diferentes E3 ubiquitina ligasas implicadas en la ubiquitinación de TrkA cómo son TRAF6 (Geetha 2005), Nedd4-2 (Arévalo et al., 2006b; Georgieva et al., 2011; Yu et al., 2011, 2014) y c-Cbl (Takahashi et al., 2011).

3.2.1.1. TRAF6

TRAF6 pertenece a la familia de los TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factor*), que es una familia de proteínas que median la señalización de superfamilias de receptores como la de TNFRs y los TLRs (*Toll-Like Receptor*) al unirse a su dominio de muerte (Bradley and Pober, 2001). TRAF6 tiene un dominio RING y cinco repeticiones de dominios de dedos de Zinc, situados en su extremo N-terminal y en su extremo C-terminal se encuentra un dominio “coiled-coil” y el dominio TRAF/MATH en el N-terminal (Figura 9). El dominio TRAF/MATH es requerido para la interacción de TRAF6 con receptores, con componentes de las cascadas citoplasmáticas y con otros TRAFs para formar oligómeros (Dempsey et al., 2003). La actividad E3 ubiquitina ligasa viene dada por el dominio RING que cataliza la formación de una única cadena de ubiquitinas que se une mediante la K63. Este procesamiento está implicado en la mediación de la activación de quinasas (Deng et al., 2000), reparación del DNA (Hofmann and Pickart, 1999; Spence et al., 1995) y regulación de proteínas implicadas en el tráfico intracelular (Galan and Hagenauer-Tsapis, 1997). El dominio “coiled-coil” ha sido implicado en funciones de autorregulación de la actividad mediante autoubiquitinación (Walsh et al., 2008; Yang et al., 2004).



Figura 9. Estructura de TRAF6. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio RING-finger, implicado en la ubiquitinación, posteriormente cinco dominios “zinc finger” y en el extremo C-terminal el dominio TRAF que está constituido por el dominio “coiled-coil” y por el dominio MATH y está implicado en interacción proteica.

TRAF6 actúa como un transductor de la señal mediada por NGF a través de p75NTR (Khursigara et al., 1999). Además, TRAF6 forma un complejo con p75NTR y p62 para ubiquitina los receptores de neurotrofinas en la lisina 485, situada en la región yuxtamembrana (Geetha et al., 2005a). A través de la ubiquitinación de los receptores Trks, TRAF6 ha sido descrito como una E3 ubiquitina ligasa para Akt. Al parecer esta ubiquitinación dependiente de la estimulación con factores de crecimiento es esencial para su reclutamiento a la membrana y para su posterior fosforilación (Namjou et al., 2012). Además, promueve la unión específica de cadenas de K63 en la transducción de las cascadas de señalización, lo que conlleva, por ejemplo, a la activación de NFκB (Chen et al., 2005). TRAF6 está implicada en patologías como atrofia muscular (Paul et al., 2012), en muerte celular mediada por CD40 (Jundi et al., 2012), en Huntington (Zucchelli et al., 2011) y en cáncer (Mu et al., 2011; Starczynowski et al., 2011). Es de destacar su localización en inclusiones de Tau y cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con Alzheimer y con Parkinson, respectivamente (Babu et al., 2005; Zucchelli et al., 2010).

3.2.1.2. Nedd4-2

Nedd4-2 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4-2*) pertenece a la familia de Nedd4 que forma parte del grupo de E3 ubiquitina ligasas que poseen el dominio HECT y que incluyen Nedd4-1, Itch, Smurf1, Smurf2, WWPI, WWP2, NedL1 y NedL2 (Yang and Kumar, 2010a). Se ha descrito que actúa sobre proteínas de membrana como canales de iones, receptores o transportadores (Guo et al., 2012; Kimura et al., 2011; Rotin and Staub, 2012).

Nedd4-2 está constituido por un dominio C2, cuatro dominios WW y un dominio HECT (Figura 10). El dominio C2 se une a fosfolípidos de manera dependiente de Ca^{2+} (Coussens et al., 1986; Knopf et al., 1986). Éste dominio está involucrado en la localización de la proteína y en su tráfico al ser el responsable de la localización de la proteína Nedd4-2 en la cara interior de la membrana plasmática (Ingham et al., 2004; Suzuki et al., 2002). Además, se ha descrito que el dominio C2 de Nedd4-2 media la localización apical dependiente de Ca^{2+} en células epiteliales polarizadas, facilitando la interacción con proteínas asociadas a balsas lipídicas apicales (Plant, 2000; Plant et al., 1997). Los cuatro dominios WW son responsables de reconocer e interaccionar con los sustratos de Nedd4-2 mediante motivos denominados PY situados en las proteínas

Introducción

diana que suelen ser secuencias PPxY o, en algunos casos, LPxY (Kanelis et al., 2001; Kasanov et al., 2001; Staub et al., 1996). El dominio HECT está situado en su parte C-terminal (Harvey and Kumar, 1999; Ingham et al., 2004; Shearwin-Whyatt et al., 2006) y es el que confiere la actividad E3 ubiquitina ligasa a Nedd4-2. Participa principalmente en la aceptación de la ubiquitina procedente de la E2 y en la posterior transferencia de la ubiquitina al sustrato (Yang and Kumar, 2010a). La función de transferir la ubiquitina la lleva a cabo la cisteína catalítica situada en el dominio HECT (Figura 7) (Chen and Matesic, 2007). Después de interactuar con su sustrato Nedd4-2 se auto-ubiquitina, lo que conlleva que Nedd4-2 se dirija a degradación (Bruce et al., 2008). Bajo condiciones normales, Nedd4-2 se protege de su degradación mediante la unión entre sus propios dominios WW y el dominio HECT. Cuando Nedd4-2 se pone en contacto con su sustrato, la débil interacción entre sus dominios se rompe y de ese modo los dominios WW se unen al motivo PY del sustrato. El motivo PY, que se encuentra dentro del dominio HECT de Nedd4-2, es expuesto a los dominios WW de una Nedd4-2 vecina, dándose su ubiquitinación (Figura 10) (Cui and Zhang, 2013).

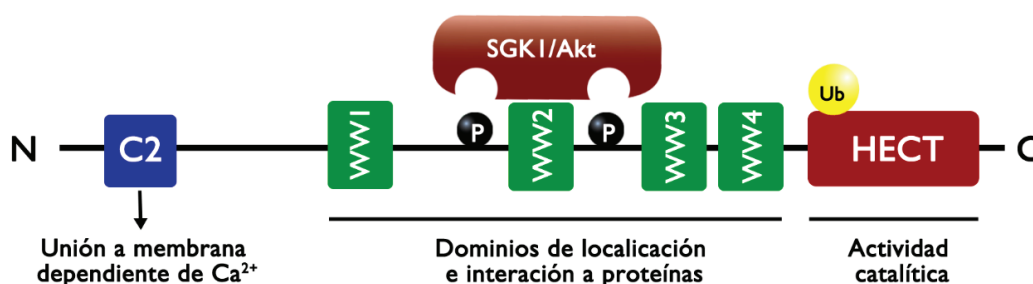


Figura 10. Estructura de Nedd4-2. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio C2 que se une a la membrana de forma dependiente de Ca^{2+} . En el interior de la proteína hay 4 dominios WW implicados en la unión al sustrato. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico HECT, que esta ubiquitinado cuando está activo. Las quinasa SGK1 y Akt fosforilan Nedd4-2 afectando a su actividad.

La actividad catalítica de Nedd4-2 puede ser modificada mediante la acción de diferentes proteínas. La quinasa serina/treonina SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*) fosforila a Nedd4-2 en la serina 444 y en la 338 para regular su actividad. También se ha descrito que Akt fosforila a Nedd4-2 en los mismos residuos de serina que SGK1 (Dieter et al., 2004). Además, ésta fosforilación puede ser prolongada debido a la interacción de Nedd4-2 fosforilado con la proteína 14-3-3, bloqueando el

reconocimiento y posterior unión al sustrato de Nedd4-2 (Chandran et al., 2011; Yang and Kumar, 2010a). El dominio C2 también afecta a la auto-activación de Nedd4-2, ya que cuando el dominio C2 se une al Ca^{2+} , se da un cambio conformacional que no permite la unión entre los dominios C2 y HECT, promoviéndose la activación de Nedd4-2 (Wang et al., 2010).

En el año 2006, Arévalo y colaboradores, describieron a Nedd4-2 como una E3 ubiquitina ligasa que multi-mono-ubiquitinaba TrkA. Nedd4-2 se une específicamente a TrkA y es fosforilada después de un estímulo con NGF. Esta unión se da mediante el reconocimiento del motivo PPXY que no está presente en TrkB (Arévalo et al., 2006b). La ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2 regula la supervivencia de neuronas sensoriales (Arévalo et al., 2006b). El sustrato mejor caracterizado de Nedd4-2 ha sido el canal epitelial de Na^+ , ENaC (*Epithelial Na Channel*). Nedd4-2 cataliza la mono- y poli-ubiquitinación de ENaC (Zhou et al., 2007) bloqueando su actividad y disminuyendo su estabilidad en la membrana plasmática, ya que la ubiquitinación del canal promueve su internalización y posterior degradación en los lisosomas (Abriel et al., 1999; Kamynina et al., 2001; Lu et al., 2007; Plant et al., 1997). El ENaC es responsable de la reabsorción de sales y líquidos en la nefrona distal, colon distal y el epitelio pulmonar. Su función es muy importante ya que el correcto transporte de Na^+ en el riñón es imprescindible para el mantenimiento de su balance en todo el cuerpo y en los niveles normales de la presión sanguínea (Garty and Benos, 1988), además, es fundamental para el intercambio adecuado de aire en los pulmones (Matalon and O'Brodvich, 1999). Varios trabajos describen que una mutación en el sitio de unión de Nedd4-2 a ENaC situado en su motivo PY, provoca un aumento en la absorción de Na^+ , causando el Síndrome de Liddle's (Knight et al., 2006). Además, Nedd4-2 ha sido implicado en la regulación de protección contra el desarrollo de fibrosis quística en pulmón a través de la regulación de la función de ENaC (Zhang et al., 2010).

Otras proteínas como los canales de Na^+ y K^+ cardiacos, Nav1.5 y Kv7.1, los canales hERG (*human Ether-à-go-go Related Gene*), los canales KCNQ1 y los canales NaV (*Voltage-Gated Na⁺ channels*) están regulados por la ubiquitinación mediada por Nedd4-2 (Albesa et al., 2011; van Bemmelen et al., 2004; Fotia et al., 2004; Jespersen et al., 2007; Staub and Rotin, 2006; Zhou et al., 2007), mediante un mecanismo similar al descrito para la regulación de ENaC (Abriel et al., 1999).

Introducción

3.2.1.3. c-Cbl

c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphomais*) es una proteína adaptadora capaz de interactuar con una gran cantidad de proteínas y se identificó como una E3 ubiquitina ligasa tipo RING que promueve la ubiquitinación de RTKs actuando sobre su señalización y su degradación vía lisosomal (Thien and Langdon, 2001). c-Cbl posee una secuencia en la parte N-terminal muy conservada en la que se encuentra el dominio de unión a RTKs, TKB (*Tyrosine kinase binding*) (Meng et al., 1999), y el dominio RING, en el centro posee una región rica en prolina y en su extremo C-terminal tiene un dominio de asociación a ubiquitina (UBA) (Bertolaet et al., 2001; Chen et al., 2001; Wilkinson et al., 2001) y otro dominio que media la dimerización, LZ (*Leucine Zipper*) (Alber, 1992; Busch and Sassone-Corsi, 1990). Se han descrito dos mutaciones puntuales G306E y C381A (Mao et al., 2010), importantes para la función del dominio TKB y RING, respectivamente. En la parte C-terminal cerca de la región rica en prolina se encuentran los principales sitios de fosforilación para las RTKs (Tyr-700, -731, y -774) que podrían mediar interacciones con los dominios SH3 y SH2 de proteínas de señalización, respectivamente (Figura 11)(Blake et al., 1991).



Figura 11: Estructura de la proteína c-Cbl. En el extremo N-terminal tiene el dominio TKB y el dominio RING. El centro de la proteína se encuentra una región rica en prolina y los principales sitios de fosforilación de proteínas con actividad quinasa. En el extremo C-terminal se encuentra un dominio UBA y un dominio LZ.

La proteína c-Cbl se encuentra en la membrana plasmática y en el citoplasma, siendo esta localización importante para mediar sus funciones. Muchas RTKs tales como los receptores de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) y PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), una vez unidos a su ligando son rápidamente ubiquitinados por c-Cbl e internalizados, lo que desencadena su degradación en el lisosoma (Miyake et al., 1998; Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002). En 2011, Takahashi describió que c-Cbl podía promover la ubiquitinación de TrkA dependiente de ligando, lo que conllevaba a la degradación del receptor. Después de la estimulación

con NGF, TrkA es internalizado de la membrana plasmática en pocos minutos, provocando su ubiquitinación parcial por c-Cbl. Cuando se da una estimulación prolongada de NGF, c-Cbl y TrkA ubiquitinado forman un complejo que es degradado en lisosomas (Takahashi et al., 2011).

La inhibición de la E3 ubiquitina ligasa c-Cbl promueve la diferenciación a osteoblastos (hacia la regeneración ósea) a través de la caída en la degradación de RTKs. En el caso de tumores óseos y en osteosarcoma disminuye la expresión de c-Cbl, por lo que actúa como un supresor de tumores. La aplicación ectópica de c-Cbl disminuye los niveles de RTK reduciendo el crecimiento del tumor y la metástasis ya que inhibe la proliferación, la migración y la invasión celular (Sévère et al., 2012, 2013).

3.3. Desubiquitinación

La desubiquitinación es el proceso inverso a la ubiquitinación, en el cual se retiran las ubiquitinas de proteínas previamente ubiquitinadas y que está mediado por unas proteasas denominadas desubiquitininasas (DUBs) que catalizan específicamente la ruptura de enlaces péptidos entre residuos de lisina de una proteína ubiquitinada y el extremo C-terminal de una ubiquitina. Existen alrededor de 100 DUBs codificadas en el genoma humano (Reyes-Turcu et al., 2009) que constituyen una superfamilia de isopeptidasas compuesta por cinco grandes familias, como son 1) la familia ubiquitina proteasa C-terminal (UCHs), 2) la familia ubiquitina proteasa específica (USPs), 3) la familia proteasa de tumor ovárico (OTUs) 4) la familia Josephins, formadas por cisteína (Cys) proteasas (Amerik and Hochstrasser, 2004), y 5) la familia JAMM/MPN+, constituida por metaloproteasas dependientes de zinc (Maytal-Kivity et al., 2002).

Las DUBs son específicas de sustrato, por lo que diferencian la ubiquitina de otras modificaciones similares como son la SUMOilación y la NEDDilación. Esto es debido a que las DUBs son capaces de reconocer específicamente los residuos Arg74 y Gly75 del extremo C-terminal de una molécula de ubiquitina (Drag et al., 2008). Además, se han descrito DUBs específicas de cadenas de poliubiquitina unida a través de Lys48 y otras de Lys63, pero la mayoría actúan sobre los diferentes tipos de cadenas de poliubiquitinación (Hu et al., 2005; Komander et al., 2008 y Komander et al., 2009). También existe una especificidad por ubiquitinas situadas en una posición concreta en la cadena de poliubiquitina lo que viene dado por la estructura del dominio catalítico de la DUB. Así, se pueden diferenciar a las exo-proteasas y a las endo-proteasas. Las exo-

Introducción

proteasas son aquellas que tienen afinidad por la ubiquitina que está unida al sustrato ubiquitinado, cómo es el caso de las DUBs implicadas en la degradación proteosomal (USP14), dándose la retirada de toda la ubiquitina unida al sustrato antes de su degradación (Hu et al., 2005). Las endo-proteasas actúan sobre las ubiquitinas situadas en el interior de la cadena, cómo es el caso de proteínas que poseen el dominio *finger* (CYLD), actuando como editoras de cadenas de poli-ubiquitinación (Komander et al., 2008). Las DUBs se encuentran implicadas en determinadas funciones mediante la regulación de la ubiquitinación de proteínas ubiquitinadas. De las primeras funciones que se describieron para las DUBs debido a su actividad proteasa fue su implicación en procesamiento de los precursores de la ubiquitina. La ubiquitina se transcribe como una pro-proteína multimérica y fusionada a proteínas ribosomales (Kimura and Tanaka, 2010) dándose un procesamiento en el proteosoma con el que se obtienen las ubiquitinas individuales. Este proceso no está restringido a una DUB concreta, ya que las proteasas implicadas intervienen en otros procesos (Wilkinson, 1997). Otra función muy caracterizada de las DUBs es la retirada de la ubiquitina en el proteosoma de proteínas marcadas previamente para su degradación proteosomal (Song and Rape, 2008). Se han descrito varias DUBs asociadas a este proceso como son USP14, UCH37 y POHI (Schmidt et al., 2005; Ventii and Wilkinson, 2008). Las DUBs no son requeridas en el caso de la degradación lisosomal, ya que las hidrolasas ácidas que se encuentran en los orgánulos citoplasmáticos son las encargadas de este tipo de degradación proteica (Komander et al., 2009). Como hemos mencionado anteriormente, algunas DUBs pueden editar cadenas poli-peptídicas y alterar su estructura, rompiendo enlaces isopeptídicos entre ubiquitinas y así modificar el tipo de marcaje de la proteína. Por ejemplo, en el daño del DNA las cadenas de K63-poliubiquitinación de proteínas ubiquitinadas pueden ser editadas pasando a ser mono-ubiquitinadas, lo que promueve un cambio en la señalización de estas proteínas (Hicke, 2001; Weissman, 2001). Todos estos procesos tienen un papel importante en la regulación del ciclo de la ubiquitina ya que retiran la ubiquitina de proteínas ubiquitinadas (Wilkinson, 1997), regulando la tasa de renovación del sustrato y manteniendo una reserva de ubiquitina libre (Figura 12) (Amerik and Hochstrasser, 2004).

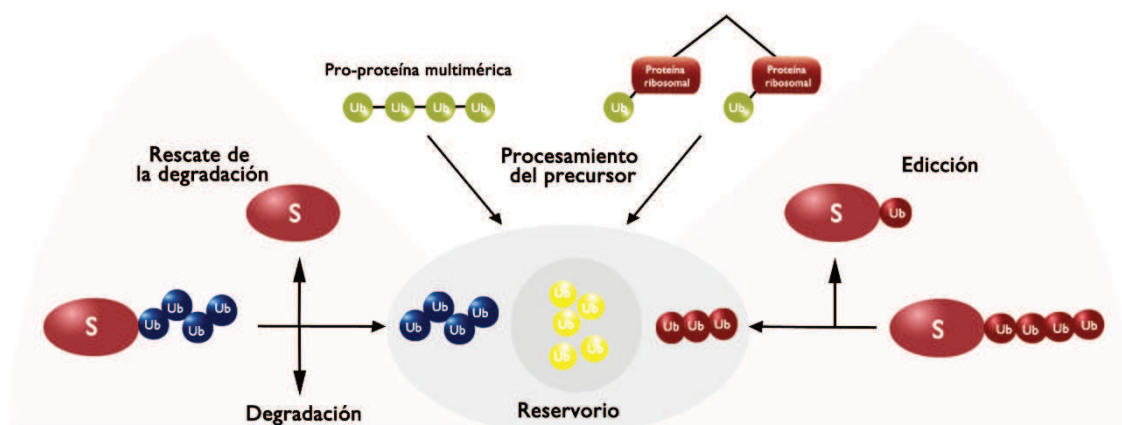


Figura 12. Funciones generales de las desubiquitininas. S: sustrato; Ub: ubiquitina.

Por otra parte, las DUBs pueden asociarse a E3 ubiquitina ligasas actuando de forma recíproca para ejercer un control más fino sobre las proteínas ubiquitinadas (Figura 13) (Komander et al., 2009). Las E3 ubiquitina ligasas pueden actuar sobre las DUBs y sobre sí mismas (auto-ubiquitinación) promoviendo en ambos casos la degradación. Sin embargo, las DUBs al retirar la ubiquitina pueden ejercer una función estabilizadora sobre las E3 ubiquitina ligasas. Se conocen varios casos que describen esta regulación recíproca. Se ha descrito que USP8 mantiene activa a Nrdp1 (*Neuregulin receptor degradation protein 1*) que es una reguladora negativa del receptor tirosina quinasa (Cao et al., 2007). En el caso de CYLD, cumple la función opuesta a E3 ubiquitina ligasa TRAF2 en la señalización de NFκB (Kovalenko and Chable-bessia, 2003). Hay casos en los que los procesamientos son más complicados, como es el caso de la interacción de entre USP7 y Mdm2, en el que USP7 bloquea la degradación del sustrato de ambos, p53, mediante la desubiquitinación tanto de Mdm2 como de p53 (Brooks et al., 2007). También puede suceder que ambas funciones las ejerza una misma proteína, cómo en el caso de la proteína A20 cuya función es la edición de cadenas. Se ha descrito su implicación en la ruta del NF-κB mediante su acción sobre el adaptador Rip1 (*Receptor interacting protein 1*) (Figura 13) (Heyninck and Beyaert, 2005).

Introducción

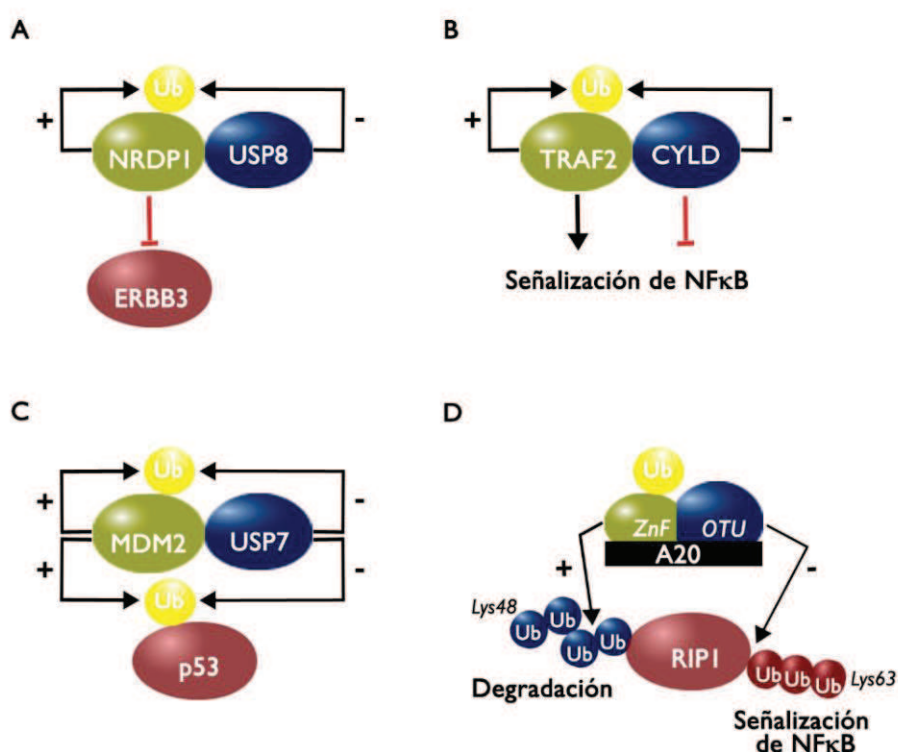


Figura 13. Funciones de la relación entre DUBs y E3 ubiquitina ligasas: regulación recíproca.

+: adición de ubiquitina; -: retirada de ubiquitina; Ub: Ubiquitina.

3.3.1. USP36

La desubiquitinasa USP36 pertenece a la familia de las cisteína proteasas USP y también es conocida como Ubp10 en *Saccharomyces* y dUSP36/ Scny (*Scrawny*) en *Drosophila*. El dominio catalítico USP de dUSP36/Scny tiene una homología del 57% con USP36 humano y un 49% con Ubp10 (Buszczak et al., 2009). Este dominio contiene un residuo de cisteína, uno de histidina y uno aspartato/arginina importantes en su función catalítica (Nijman et al., 2005). Posee una estructura similar a una mano con una palma, un pulgar y unos dedos, situándose el sitio catalítico entre los dominios que forman la palma y el pulgar (Hu et al., 2002). El papel de los dedos es interactuar con la zona más distal de la cadena de ubiquitina, lo que es característico de exo-proteasas (Komander et al., 2009). La unión de USP36 al sustrato provoca un cambio en su conformación y de ese modo los residuos de la triada catalítica se alinean haciendo más accesible el sitio catalítico (Amerik and Hochstrasser, 2004). USP36 está constituida por su dominio USP (sitio catalítico en la cisteína 131) que está situado en el extremo N-terminal, por secuencias PEST (secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)) implicadas en su degradación (Kim et al., 2005) y una secuencia de

localización nucleolar (NoL,) situada en el extremo C-terminal (Figura 14) (Endo et al., 2009a; Scott et al., 2010).

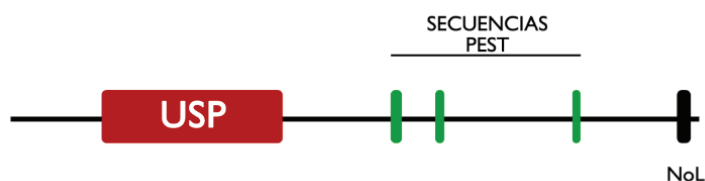


Figura 14 Estructura de USP36. Está constituida por el dominio USP, varias secuencias PEST y una secuencia de localización nucleolar situada en su extremo C-terminal.

Se sabe poco sobre las modificaciones post-traduccionales de USP36. Hasta la fecha se ha descrito que USP36 puede ser poliubiquitinado, pudiendo ser uno de sus mecanismos de degradación (Kim et al., 2005). Además, se ha descrito que USP36 se localiza en el nucléolo y en mitocondrias (Endo et al., 2009a, 2009b; Kim et al., 2011). Su localización en el nucléolo tiene implicaciones en la regulación de la estructura y función del mismo, debido a su acción sobre nucleofosmina/B23 y sobre fibrilarina (Endo et al., 2009b). Otras funciones incluyen: 1) dUSP36/Scny bloquea la función de la Histona H2B desubiquitinándola, lo que promueve que no se dé la expresión prematura de genes clave en la diferenciación celular (Buszczak et al., 2009), 2) Ubp10 regula la tolerancia al daño del DNA mediada por PCNA en *Saccharomyces cerevisiae* (Gallego-Sánchez et al., 2012) y está implicada en el control del crecimiento celular mediante la estabilización de RNAPI (RNA Polimerasa I), clave en la regulación de la producción de rRNA (Richardson et al., 2012), 3) en humanos, USP36 es necesaria para inhibir la autofagia celular (Taillebourg and Gregoire, 2012) 4) en la mitocondria, USP36 desubiquitina SOD2 (*Superoxide Dismutase 2*) humano lo que conlleva a un aumento en su estabilidad, y un mantenimiento de su función en el estrés oxidativo (Kim et al., 2011)

Se ha implicado a USP36 en diferentes patologías como 1) en cáncer de ovarios, dándose un incremento en la expresión génica de *USP36* con respecto a un ovario sano por lo que puede mostrándola como un posible biomarcador (Li et al., 2008), 2) en inmunodeficiencia, ya que dUSP36 actúa como represor de la proteína IMD (*Immune Deficiency*) (Taillebourg and Gregoire, 2012; Thevenon et al., 2009) y 3) en diabetes tipo 2 debido a la expresión de polimorfismos de un nucleótido en *USP36* (Greenawalt et al., 2012).

Introducción

3.3.2. USP8

La desubiquitinasa USP8 pertenece a la familia de desubiquitinases USP e inicialmente era conocida como UBPY (*Ubiquitin-Specific processing Protease-y*) y se expresa en mieloblastomas humanos (hUBPY). Al ortólogo de USP8 en levadura se le denomina Ubp4/Doa4 (Naviglio et al., 1998). USP8 está constituida por un dominio MIT (*Microtubule Interacting and Transport*) y un dominio Rhod (*Rhodanese-like*) en el extremo N-terminal, por dos dominios SH3, en la zona central, y en el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico USP (Figura 15). El dominio MIT está implicado en la localización de USP8 en los endosomas (Row et al., 2007). El dominio Rhod no posee actividad catalítica (transferencia de grupos sulfuro) debido a que ha perdido el sitio catalítico. Éste dominio está implicado en la interacción con la E3 ubiquitina ligasa Nrdp1, lo que desencadena la desubiquitinación y estabilización de Nrdp1, sugiriendo que USP8 y Nrdp1 pueden actuar como antagonistas de su propia degradación (Avvakumov et al., 2006; Cao et al., 2007; Wu et al., 2004a). Kato y colaboradores describen que USP8 interacciona con Hrs (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), una proteína implicada en el tráfico endosomal, mediante los dos motivos SH3 del tipo Hbp (*Hrs-binding protein*) tanto *in vivo* como *in vitro* (Kato et al., 2000).

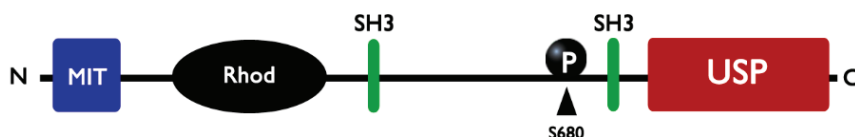


Figura 15. Estructura de USP8. Está constituido por el dominio MIT, de unión a microtúbulos y de transporte, y por el dominio Rhod situados en su extremo N-terminal. En el centro de la proteína se encuentran dos dominios SH3 de unión a proteínas. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico USP. La fosforilación en el aminoácido serina 680 (S680) tiene una gran relevancia funcional en USP8 (Meijer et al., 2013).

Se ha demostrado que USP8 sufre modificaciones post-traduccionales como 1) su ubiquitinación dependiente de la estimulación de EGF (Mizuno et al., 2005), 2) la fosforilación en tirosina dependiente del receptor de EGF y la quinasa Src mediada por la estimulación de EGF (Alwan, 2007; Meijer and van Leeuwen, 2011), 3) la fosforilación en la treonina 907 (T907) dependiente de Akt en respuesta a la estimulación de neuregulina, lo que contribuye a la estabilización de los niveles de USP8 (Cao et al.,

2007) y 4) la fosforilación en la serina 680 que afecta la interacción entre USP8 y a la proteína 14-3-3 (Ballif et al., 2006; Meijer et al., 2013; Mizuno et al., 2007), cuya unión afecta a la actividad enzimática, a la localización subcelular, a sus interacciones proteína-proteína, a su estado de fosforilación y al ciclo celular (Ballif et al., 2006; Dougherty and Morrison, 2004; Mizuno et al., 2007; Mukai et al., 2008).

USP8 es una proteína muy activa y es bastante promiscua con respecto al tipo de cadenas de ubiquitinas sobre las que actúa (Faesen et al., 2011; Komander, 2009; McCullough et al., 2006; Sato et al., 2008). Hasta la fecha se han descrito múltiples sustratos para USP8: CXCR4 (Berlin et al., 2010), PAR2 (Hasdemir et al., 2009), EGFR (Alwan and van Leeuwen, 2007), ERBB2 (Meijer and van Leeuwen, 2011), LRIG1 (Oh et al., 2014), 14-3-3, Nrdp1 (Wu et al., 2004b), Hrs (Zhang et al., 2014), HIF1- α (Troilo et al., 2014), UBE4B (Sirisaengtaksin et al., 2014), DGK δ , PKC (Cai et al., 2010) y E3 ubiquitina ligasa parkin (Dikic and Bremm, 2014).

Entre las funciones de USP8 destacan la inhibición de la degradación de los RTKs y la desestabilización de los componentes del complejo ESCRT-0 (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) (Mizuno et al., 2006; Row et al., 2006). Además, estabiliza la proteína SNX31 (*Sorting Nexin 31*) que es un regulador positivo del reciclaje endosomal y del incremento de la cantidad de ENaC en la membrana plasmática (Boulkroun et al., 2008). Otro papel importante es mantener la homeostasis de la ubiquitina mediante el reciclaje de ubiquitina de receptores que han sido dirigidos a la degradación (Clague et al., 2012; Kimura et al., 2009).

Existe una relación entre USP8 y AMSH en la desubiquitinación de RTKs internalizados (Wu et al., 2004b). Ambas desubiquitinasas, junto con *AMSH-LP* (*AMSH-Like Protein*), son claros ejemplos de DUBs endosomales (Urbé et al., 2012). Los ratones *knockout* de *USP8* son letales para los embriones, mientras que la eliminación de *USP8* en los ratones condicionales, provoca su muerte a los 4-6 días después de la inducción, pudiéndose observar una reducción de los niveles de EGFR y ESCRT-0 (Niendorf et al., 2007). Las funciones *in vivo* de *USP8* no son remplazadas por otras desubiquitinasas (Gnesutta et al., 2001), lo que indica su especificidad.

Estudios *in vitro*, en los que se sobreexpresa *USP8* o su dominante negativo, muestran que *USP8* tiene múltiples funciones en los compartimentos endosomales como 1) la regulación de la degradación de RTKs (Alwan and van Leeuwen, 2007; Row et al.,

Introducción

2006), 2) la protección de proteínas de la maquinaria de transporte endosomal de su degradación en el proteosoma (Mizuno et al., 2006), 3) el control del número y tamaño de vesículas endocitadas (Alwan and van Leeuwen, 2007; Mizuno et al., 2005; Niendorf and Oksche, 2007; Row et al., 2006) y 4) a la mitofagia (Dikic and Bremm, 2014). USP8 se ha visto implicada en la biogénesis del acrosoma de ratón (Berruti et al., 2010), en neuroinflamación y neurodegeneración (Zhu et al., 2014), enfermedad de Crohns (Warner et al., 2014), psoriasis (Schrodi, 2008), en mieloma múltiple (Tiedemann et al., 2012) y cáncer de pulmón (Baykara et al., 2013).

4. Tráfico endosomal de RTKs

Como se ha descrito anteriormente, los receptores RTKs que se encuentran en la membrana plasmática, al unirse a su ligando se activan, se internalizan y se incorporan al sistema endosomal que está compuesto por diferentes compartimentos intracelulares. En el caso del receptor TrkA su internalización se puede dar por mecanismos dependientes de clatrina (Bilderback et al., 1999; Zweifel et al., 2005), dependientes de caveolas (Peiró et al., 2000) y/o por macropinocitosis (Shao et al., 2002). Posteriormente, las vesículas endocitadas se fusionan con endosomas tempranos (EE, por su nomenclatura anglosajona *Early Endosome*). En este momento, los receptores que se encuentran en los EEs pueden volver a la membrana plasmática en endosomas de reciclaje mediante un reciclaje rápido o formar endosomas multivesiculares (MVE, por su nomenclatura anglosajona *Multivesicular Endosome*) que son compartimentos intermedios entre EEs y endosomas tardíos (LE, por su nomenclatura anglosajona *Late Endosome*) (Figura 16) (Goh and Sorkin, 2013). En los MVEs se encuentra el complejo de transporte ESCTR que está constituido por ESCTR-0, -I, -II y -III que son subcomplejos encargados de desencadenar la formación de invaginaciones en el endosoma hasta formar vesículas intraluminales (ILVs) y posteriormente, se generan los LEs desde donde se dirigirán a la degradación lisosomal. El reciclaje también puede darse desde compartimentos posteriores a los EEs, lo que se ha denominado reciclaje tardío (Goh and Sorkin, 2013). El paso de un compartimento a otro está regulado por miembros de la familia de Ras que son GTPasas denominadas Rab GTPasas (Schwartz et al., 2007). Estas proteínas garantizan el correcto destino los receptores endocitados, controlando

la identidad de cada compartimento, su fusión y su movilidad. Así, Rab5 y un efector de Rab5 (EEA1, por su nomenclatura anglosajona *Early Endosome Antigen 1*) (Mishra et al., 2010), son marcadores de EEs, Rab4 es marcador de endosomas de reciclaje rápido, Rab11 de endosomas de reciclaje lento y la proteína Rab7 lo es de los LEs (Stenmark, 2009).

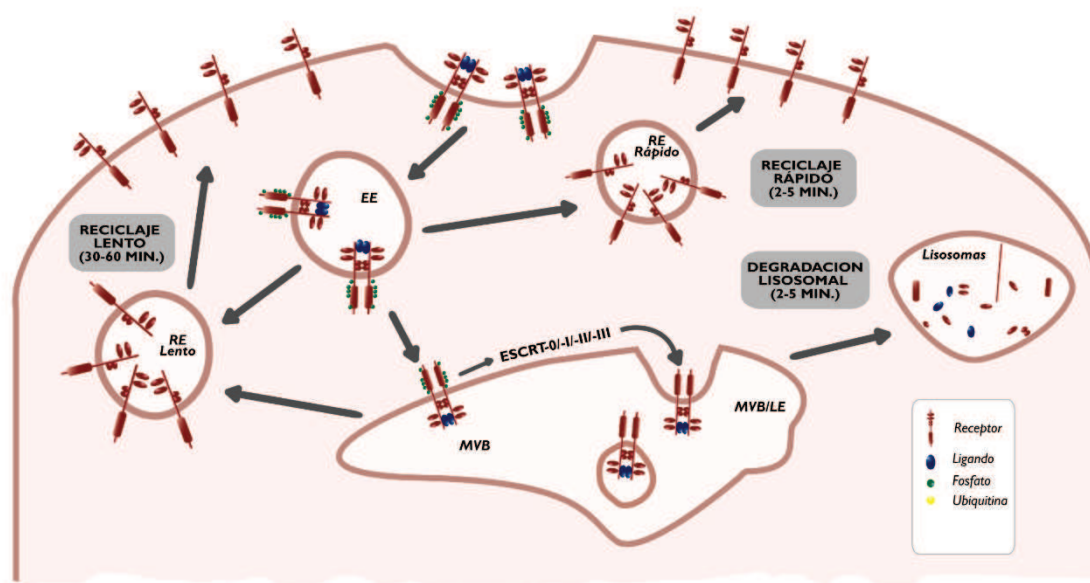


Figura 16. Tráfico endosomal de los receptores RTKs.

4.2. Regulación del tráfico de los RTKs: Ubiquitinación / Desubiquitinación

Existe un importante mecanismo de regulación del tráfico endosomal en el que se controla la duración de la señalización del receptor y el mantenimiento de la homeostasis de la célula. De ese modo se previene una activación prolongada y excesiva de las cascadas de señalización del receptor que podrían contribuir al desarrollo de patologías (Abella and Park, 2009; Bache et al., 2004; Haglund et al., 2007; Mosesson et al., 2008). La ubiquitinación/desubiquitinación es uno de los mecanismos implicados en el control de los procesos dados en el tráfico endosomal, siendo el caso de la familia de los RTKs de los más caracterizados (Haglund and Dikic, 2012). Los RTKs son ubiquitinados (monoubiquitinados o poliubiquitinados con cadenas K63) en la membrana plasmática donde, una vez unido a su ligando, se internalizan y llegan a los EE. En este punto, las DUBs juega un papel muy importante determinando el destino del receptor de membrana, ya que si el receptor es desubiquitinado vuelve a la membrana plasmática

Introducción

para su reciclaje, pero, si por el contrario, no es desubiquitinado, continuará con su transporte endosomal (Row et al., 2006). Los RTKs ubiquitinados son reconocidos por proteínas de unión a ubiquitina (contienen dominios UBDs) que pertenecen al complejo ESCRT, entrando a formar parte del MVE donde continúan hacia el reciclaje lento o donde son desubiquitinado antes de incorporarse en las ILVs para ser degradados en lisosomas (Figura 17) (Goh and Sorkin, 2013; Haglund and Dikic, 2012).

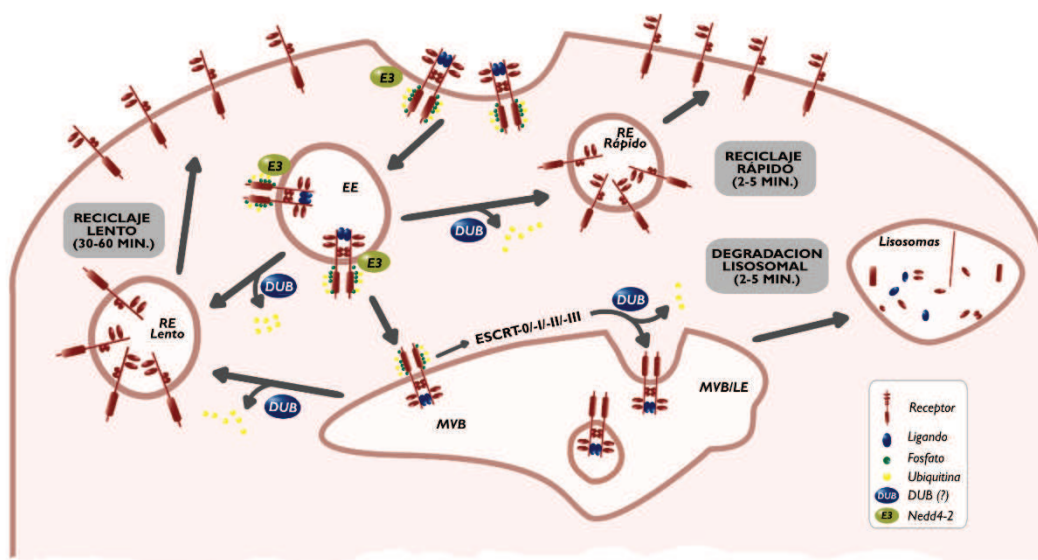


Figura 17. Regulación del tráfico de receptores RTKs por ubiquitinación/desubiquitinación.

En el caso del receptor TrkA, se han descrito a varias E3 ubiquitina ligasas implicadas en la regulación de su tráfico endosomal a distintos niveles: 1) Se sabe que cuando TrkA no está activo, está unido a Nedd4-2 (Arévalo et al., 2006b) y que Nedd4-2 regula el transporte endosomal de TrkA en EEs y LEs, lo que promueve un efecto en su reciclaje y degradación (Yu et al., 2011, 2014), 2) c-Cbl también está implicado en el tráfico de TrkA, ya que el receptor una vez activado, es ubiquitinado parcialmente por c-Cbl, 3) Geetha y colaboradores describen que TRAF6 ubiquitina a TrkA lo que induce su internalización (Geetha et al., 2005a).

Hasta la fecha, no es muy conocida la regulación de TrkA mediada por DUBs. Sólo se ha implicado a la deubiquitinasa CYLD (perteneciente a la familia USP) en la modulación de los niveles de ubiquitinación de TrkA (Geetha et al., 2005a; Wooten et al., 2008a).

Justificación y objetivos

Estudios previos muestran que la cinética de activación del receptor TrkA está regulada por su degradación en respuesta a la unión de ubiquitina mediante la acción de E3 ubiquitinas ligasas como Nedd4-2 (Arévalo JC. et al., 2006; Yu T. et al., 2011; Yu et al., 2014), TRAF6 (Geetha T. et al., 2005) y c-Cbl (Georgieva MV. et al., 2011; Takahashi Y. et al., 2011). Sin embargo, se desconoce qué desubiquitinasas pudieran participar en este proceso.

En este trabajo de investigación, queremos identificar desubiquitinasas implicadas en la cinética de activación de TrkA utilizando un kit basado en la tecnología del siRNA (Duex JE. et al., 2009), y de ese modo poder ampliar el conocimiento en la modulación de las funciones TrkA mediante su desubiquitinación.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos planteamos dos objetivos:

1. Identificar desubiquitinasas que puedan estar implicadas en la desubiquitinación del receptor TrkA activo.

2. Caracterizar las desubiquitinasas seleccionadas estudiando:
 - 2.1. Sus efectos en la señalización de TrkA mediada por NGF.
 - 2.2. Sus mecanismos de acción sobre TrkA.
 - 2.3. Sus implicaciones en las funciones de TrkA mediadas por NGF.

Material y métodos

1. Cultivo celular de líneas celulares

Los sueros empleados se inactivaron antes de su uso, incubándolos a 56°C durante 30 minutos. Las células se mantuvieron a 37°C con una humedad relativa del 95% y en una atmosfera con el 5% de CO₂. Para la realización de los experimentos, las células se sembraron en placas de cultivo tratadas con 0,1 mg/ml poli-D-lisina o en cubres tratados con 1mg/ml de poli-D-lisina, con el objeto de que no se despegaran durante su manipulación.

1.1. PC12 6/15

Las células PC12 6/15 son un clon estable que sobreexpresa el receptor TrkA humano (Hempstead et al., 1992) y que proceden de la línea celular PC12. Esta línea celular deriva de un feocromocitoma de médula supradrenal de rata, la cual responde a NGF adquiriendo un fenotipo neuronal (Greene and Tischler, 1976). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo (HS), 5% de suero bovino fetal (FBS), 1 mM de piruvato y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Para la realización de experimentos, las células fueron cultivadas en un medio bajo en suero (1% HS y 0.5% FBS) durante una noche.

1.2. Human embryonic kidney (HEK) 293 y 293FT

Las células HEK-293 se generaron transformando células renales de embriones humanos con DNA de adenovirus humano tipo 5 (Graham et al., 1977). Las células HEK-293FT expresan de forma estable el antígeno SV40 large T que está bajo el promotor de citomegalovirus humano-virus (CMV) expresándose de forma elevada y constitutiva. Ambos tipos celulares se utilizan en aquellos procedimientos que requieren de altos niveles de expresión, por su facilidad de transfección. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino (BS), 1 mM piruvato y 100 U/ml penicilina/estreptomicina.

2. Transfecciones

2.1. Método basado en lípidos catiónicos: Lipofectamina 2000

La lipofectamina es un lípido catiónico comercial que forma complejos con el DNA, denominados lipocomplejos, los cuales se introducen en la célula mediante fusión con la membrana plasmática o mediante endocitosis. Este método de transfección, se usó principalmente para la transfección de células PC12 6/15. Para ello, se utilizó una placa con una confluencia celular del 70%-90%, a la que se cambió el medio de cultivo por medio OPTIMEM. Se prepararon dos tubos para cada placa, como se describe en la Tabla MI, que se mezclaron y esta mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

	Tubo A		Tubo B		N° de Células
	OPTIMEM	Lipofectamina	OPTIMEM	Ácido Nucleico	
Placas de 96 pocillos	25µl	1µl	25µl	siRNA: 0.5µg	5.000
Placas de 24 pocillos	50µl	2µl	50µl	Plásmidos: 1 µg	100.000

Tabla MI. Cantidades usadas en la transfección celular en diferentes placas.

Los lipocomplejos formados se añadieron a las células distribuyéndolos homogéneamente por toda la placa, y se incubaron durante un tiempo no superior a 6 horas. Finalmente, se retiró el medio OPTIMEM y se añadió medio PC12 6/15.

2.2. Método basado en co-precipitados de sales y DNA usando fosfato cálcico.

Es un método de transfección que está basado en la formación de complejos constituidos por CaCl_2 y DNA que forman precipitados insolubles en una solución salina de fosfatos. Estos precipitados ejercen un efecto protector sobre la degradación mediada por nucleasas del DNA cuando son endocitados por las células. Este método se usó principalmente para la transfección de células HEK-293 y HEK-293FT. Para lograr una transfección eficiente, se utilizaron placas con una confluencia celular del 70%-90%. Primero, se prepararon dos soluciones, como indica la Tabla M2, que se mezclaron añadiendo gota a gota de la solución A a la solución B que se mantuvo en

agitación usando un vórtex. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente y los precipitados formados se añadieron a las células, distribuyéndolos homogéneamente por toda la placa.

	Mezcla A		Mezcla B	
	CaCl ₂ (1M)	H ₂ O MiliQ	2 x HBS pH 7.05	
<i>Placas de 12 pocillos</i>	30µl	70µl	100µl	10 ⁵ Células
<i>Placas de 6cm</i>	90µl	210µl	300µl	10 ⁶ Células
<i>Placas de 10cm</i>	150 µl	350 µl	500 µl	2.5x10 ⁶ Células

Tabla M2. Cantidades usadas en la transfección celular en diferentes placas.

Tanto en el método de transfección usando Lipofectamina como en el que se usó fosfato cálcico, siempre se añadió una pequeña cantidad de plásmido pEGFP para que, una vez pasados 1 o 2 días, pudiéramos observar la eficiencia de la transfección mediante la expresión de GFP usando un microscopio de fluorescencia.

3. Cuantificación de proteínas mediante Bradford

El método de Bradford es un método rápido y sensible para la cuantificación de proteínas mediante la unión de colorante a las proteínas. Primero, se diluyó el reactivo Bradford (Bio-rad), según las especificaciones de la casa comercial. La reacción se produjo en una placa de 96 pocillos, donde a su vez se realizó una recta patrón para la determinar la concentración de las muestras. Para generar la recta patrón, se diluyeron cantidades seriadas de BSA (Bovine serum albumin) en el reactivo de Bradford hasta 200 µl de volumen total. Para el estudio de las muestras, un volumen determinado de lisados se diluyó, por duplicado, en reactivo de Bradford hasta un volumen total de 200 µl. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 595nm en un lector de placas (Microplate Reader LT4000_ Labtech).

4. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es un método por el que se aísla una proteína a partir de lisados celulares. Se basa en la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se purifican usando proteína A/G acoplada a bolas que reconoce el anticuerpo. Las células utilizadas se recogieron en hielo añadiendo tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados celulares obtenidos, que contienen la proteína de interés de forma endógena o expresada exógenamente, se centrifugaron a 11000g a 4°C durante 10 minutos. Después, se recogió una alícuota de los lisados a la que se consideró lisados totales. Al resto de lisados se les añadió el anticuerpo primario y se incubaron a 4°C durante una noche en agitación. Para los casos en los que el anticuerpo primario no estuviera unido covalentemente a proteína A o G-agarosa, los lisados se incubaron con proteína A-agarosa, si el anticuerpo primario procedía de conejo, y con proteína G-agarosa, si procedía de ratón. En ambos casos, la proteína A o G fue previamente bloqueada con 2% de BSA en PBS a 4°C durante una noche en agitación. Al día siguiente, se realizaron 3-5 lavados con tampón de lisis centrifugando a 3000g durante 1 minuto. Finalmente, se retiró todo el tampón de lisis y se añadieron 15 µl de tampón de carga.

4.1. Unión covalente de anticuerpos a proteína A o G- agarosa: “Crosslink”

Es un proceso por el cual la interacción del anticuerpo a la proteína A o G-agarosa se hace covalente y, de ese modo, se evita que las inmunoglobulinas entren en el gel de acrilamida, lo que disminuye la interferencia en el Western blot. Para ello, 300 µl de proteína A o G-agarosa bloqueada con BSA se incubó con 100 µg de anticuerpo purificado o 100 µl de suero crudo a 4°C con agitación durante toda una noche. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 0.2 M borato sódico pH 9 centrifugando a 3000g a 4°C durante 10 minutos. Los complejos anticuerpo-Proteína A/G se resuspendieron con 0.2 M borato sódico pH 9 que contenía 20 mM dimetilpimelimidato (DMP), agente químico para unir covalentemente la proteína A o G al anticuerpo, y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Después, se centrifugaron a 3000 g a 4°C durante 10 minutos y se añadió 0.2 M etanolamina pH 8 durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró la etanolamina mediante centrifugación, se añadió tampón de lisis y se guardaron a 4°C.

5. Fraccionamiento núcleo / resto de la célula

Para obtener fracciones nucleares y no nucleares a partir de células, se utilizó un método en el que, mediante una concentración baja de un detergente no iónico (0,1% NP-40 [IGEPAL]) y con ayuda mecánica, se rompieron las membranas de las células, sin dañar los núcleos. Se partió de una placa confluyente de 6 cm que se lavó con PBS y se puso en hielo. Para la ruptura de las membranas plasmáticas se añadieron a las células 300 μ l de tampón de lisis de citoplasma con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Luego se pipetearon hasta que sólo se observaron núcleos aislados, usando un microscopio de campo claro. Después, se centrifugaron a 500g durante 10 minutos quedando en el sobrenadante la fracción citoplasmática junto con el resto de orgánulos y en el pellet la fracción nuclear. El pellet se resuspendió con 100 μ l de tampón de lisis de núcleos mediante pipeteo. Posteriormente, se incubó durante 1 hora en hielo y una noche a -80°C . Finalmente, se hirvieron las dos fracciones durante 5 minutos y se cuantificaron las proteínas.

6. Western blot

La técnica de Western blot es una técnica analítica que permite la detección de proteínas. Las proteínas son separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes usando un gel de poliacrilamida, después son transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon[®]) y, finalmente, las proteínas de interés son detectadas mediante la utilización de un anticuerpo.

6.1. Electroforesis (SDS-PAGE)

Una vez obtenidas las muestras, se les añade tampón de carga que contiene β -mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro de las proteínas, y SDS, que desnaturiza las proteínas uniéndose a las zonas apolares de los polipéptidos y proporcionándoles una carga negativa. De ese modo, cuando se aplica una corriente a las proteínas, estas migraran hacia el polo positivo en función de su tamaño molecular. Las muestras se hirvieron durante 5-10 minutos y fueron cargadas en el gel. Los geles usados están constituidos por dos porciones de gel diferentes. Uno es el gel de concentración, en el que se acumulan todas las proteínas que se han cargado en el

Material y métodos

pocillo, y el otro es el gel de separación, que separa las proteínas acorde a su peso molecular. Ambos se forman por la polimerización de diferentes concentraciones finales de un mezcla de acrilamida y bis-acrilamida (Ultra Pure Protogel® 30% acrilamida y 0.8% bisacrilamida) en presencia de catalizadores de la reacción: TEMED (N, N, N, N'-Tetrametilnediamina) y de APS (Persulfato Amónico) en un tampón Tris-HCl con un pH determinado (Tabla M3). Después de añadir el gel separador se añade isopropanol para evitar la formación de burbujas. El porcentaje del gel de separación a usar viene dado por el tamaño de las proteínas a analizar, siendo que, para la detección de proteínas pequeñas se utilizaron porcentajes de acrilamida altos, mientras que para proteínas más grandes se utilizaron porcentajes bajos.

	Gel de Concentración (4%)	Gel de Separación (8%)
30% Acrilamida: 0.8% Bis-acrilamida (ml)	2.7	0.52
1.5M Tris-HCl, pH 8.8 +SDS (ml)	2.5	X
0.5M Tris-HCl pH 6.8 +SDS (ml)	X	1
H2O (ml)	4.8	2.5
10% APS (μ l)	100	30
TEMED (μ l)	10	3

Tabla M3. Volúmenes de los reactivos usados para hacer dos geles del 8%.

Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis a la cual se le añade el tampón de electroforesis. Finalmente, la electroforesis se corrió a 90 voltios durante 2 horas.

6.2. Electrotransferencia húmeda

Las proteínas separadas por electroforesis que quedaron en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF. Para ello, la membrana se activó con metanol y se equilibró con tampón de transferencia. La transferencia se realizó mediante electroforesis en tampón de transferencia a 4°C durante 2-3 horas a 250 mA.

6.3. Inmunodetección

Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron incubadas con agitación en tampón de bloqueo, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo a la membrana, durante 1 hora a temperatura ambiente o una noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo primario que se fuese a usar (Tabla M4). Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo a la concentración adecuada durante toda la noche a 4°C con agitación. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, se bloquearon con TBST + 5% de leche en polvo durante 2 minutos, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con HRP y se incubaron durante 35 minutos con agitación. En el caso de muestras obtenidas de inmunoprecipitaciones, para no tener problemas con las IgG durante la emisión de señal en el proceso de revelado, se usó como anticuerpo secundario proteína A o G conjugada con HRP, que sólo se une a los anticuerpos no desnaturalizados con los que se incubó la membrana. Las membranas se volvieron a lavar con el mismo procedimiento antes mencionado. Finalmente, se reveló empleando ECL al que se añadió H₂O₂, lo que produjo una reacción quimioluminiscente que se detectó mediante exposición de una película fotográfica o usando una máquina de detección de quimioluminiscencia (MicroChem 4.2_Bio-Imagin Systems).

Material y métodos

	Anticuerpos	Origen	Casa comercial	Dilución	Peso (KDa)
ANTICUERPOS PRIMARIOS	USP36	Conejo	Arevalo J.C.	WB 2µg/ml	123
	USP36	Conejo	Komada M.	WB 1:1000	123
	Nedd4-2	Conejo	Arevalo J.C.	WB 1µg/ml	120/140
	TrkA (203)	Conejo	Martin Zanca D.	WB 1:3000	110/140
	Trk (C-14)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology®	WB 1:400	110/140
	RTA (TrkA)	Conejo	Reichardt L.	WB 1:2000	110/140
	p75 (9992)	Conejo	Chao M.	WB 1:2000	75
	Akt	Ratón	Santa Cruz®	WB 1:200	60
	MAPK	Conejo	Cell Signaling®	WB 1:1000	42/44
	pTrk (Y490)	Conejo	Cell Signaling®	WB 1:1000	140
	pAkt (Ser473)	Ratón	Update®	WB 1:1000	60
	pMAPK	Ratón	Cell Signaling®	WB 1:2000	42/44
	pH3	Ratón	Abcam®	WB:1000	17
	P4DI (ubiquitina)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology®	WB 1:1000	-
	FK1 (poliubiquitina)	Ratón	nombre	WB 1:num	-
	β-Tubulin III	Conejo	Sigma®	WB 1:10000	50
	β-Actina	Ratón	Sigma®	WB 1:5000	42
	GFP	Ratón	Clontech®	WB 1:3000	27
Flag	Conejo	Sigma®	WB:1000	-	
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	Protein A-HRP		Molecular Probes™	1:10000	-
	Protein G-HRP		Molecular Probes™	1:10000	-
	Anti-mouse HRP		Jackson ImmunoResearch	1:20.000	-
	Anti-rabbit HRP		Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:10000	-

Tabla M4. Anticuerpos primarios usados en el trabajo.

6.4. Eliminación de anticuerpos de una membrana usada

Para retirar los anticuerpos de la membrana y poder incubar con otros anticuerpos, primero, se lavó con TBST y después, se incubó con 0.1 M Glicina pH 2.5 con agitación durante 10 minutos. Seguidamente, se incubó con 1% SDS durante 10 minutos y luego se volvió a lavar con TBST para, finalmente, ser bloqueada como se ha descrito previamente.

7. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

7.1. Obtención de RNA de células en cultivo

Las células se lavaron con PBS y después se les añadió TRIZOL[®], que es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que mantiene la integridad del RNA durante la lisis de la muestra. Posteriormente, a la muestra obtenida se le añadió cloroformo y se centrifugó, separándola en dos fases, una acuosa, donde se encuentra el RNA, y otra orgánica, donde se encuentran las proteínas y el DNA. Finalmente, el RNA se precipitó usando isopropanol y los restos se limpiaron con etanol al 70%. El RNA se resuspendió en H₂O y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

7.2. Retrotanscripción

La retrotranscripción es un proceso por el cual se sintetiza DNA complementario (cDNA) a partir de RNA. Para ello, el RNA se cuantificó en un *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* y se comprobó su calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Posteriormente se realizó la retrotanscripción mediante un kit comercial *ImProm-IITM Reverse Transcription System*, usando *Random primers*. A la mezcla se le realizó un único ciclo: 70°C durante 5 minutos (desnaturalización), 25°C durante 5 minutos (anillamiento de cebadores) y 42°C durante 1 hora (elongación).

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El objetivo de esta técnica es sintetizar múltiples cadenas de un fragmento de DNA partiendo de un DNA que está flanqueado por unos cebadores previamente diseñados (Tabla 5). Para ello se hizo uso de una polimerasa procedente de la bacteria *Thermus*

Material y métodos

aquaticus que puede trabajar a temperaturas muy altas. Para la realización de la técnica, en algunos casos, se usó *PCR Master mix* que contenía la polimerasa, dNTPs y el tampón y, en otros casos, se usaron los componentes por separado procedentes del *Kit PCR extender System*. Las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis mediante un gel de agarosa con una determinada concentración que dependió del tamaño del fragmento a analizar.

Cebadores	Secuencia	T _m *	Amplicon
USP36 F	5'- TCCCTCAAGCGCTTTGCCAAC- 3'	53°C	200pb
USP36 R	5'- CTGGTACCACTGTCCATTGC- 3'		
β -Actina F	5'- AGCCATGTACGTAGCCATCC - 3'	52°C	100pb
β -Actina R	5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'		

Tabla M5. Cebadores usados y sus características.

8. Técnicas de clonación plasmídica

8.1. Preparación de bacterias DH5 α competentes

Para la obtención de bacterias competentes se empleó el protocolo adaptado de Inoue et al., 1990. Se estriaron bacterias DH5 α en LB agar y se incubaron a 37°C durante una noche. Posteriormente, se inocularon 20-30 colonias en 250 ml de medio SOC y se incubaron a 25°C con agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica de ≈ 0.6 , a 650 nm. Posteriormente, las bacterias se incubaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm (Rotor TJ-6) durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 80 ml de TB frío y se incubó en hielo durante 10 minutos para volver a centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender en 20 ml de TB frío al que se le añadió a una concentración final del 7%. Las bacterias resuspendidas se incubaron en hielo durante 10 minutos, después, se hicieron alícuotas sobre hielo seco que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

8.2. Transformación de bacterias competentes

Se han realizado dos tipos de transformación:

- Transformación Bacteriana “Lenta”:

Este tipo de transformación se usa para transformar una ligación entre un inserto y un vector previamente cortado con enzimas de restricción. Para ello, se añadieron 5 µl de la mezcla de ligación a 90 µl de bacterias DH5α y se mantuvieron durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras se sometieron a un “shock térmico” en un baño a 42°C durante 90 segundos y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 700 µl de LB a las muestras y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Finalmente, se centrifugaron y se dejaron 100 µl de medio LB, aproximadamente, en el que las bacterias se resuspendieron.

- Transformación Bacteriana “Rápida”:

Este tipo de transformación se usó para transformar plásmidos que se querían amplificar. Para ello, se añadieron 50 ng de plásmido a 10 µl de bacterias DH5α y se mantuvieron durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, se dio un “shock térmico” en un baño a 42°C durante 90 segundos, se incubaron en hielo durante 5 minutos y finalmente se resuspendieron suavemente en 100 µl de LB.

En ambos casos, las bacterias se añadieron a placas de LB Agar con el antibiótico correspondiente, ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (30 µg/ml) y se distribuyeron por toda la placa usando bolas de vidrio. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 12-16 horas.

8.3. Lisis bacteriana y extracción del plásmido

Para la lisis bacteriana y la extracción del plásmido previamente se inoculó una colonia en LB con el correspondiente antibiótico y se dejó crecer durante una noche a 37°C con agitación. La extracción del plásmido se realizó mediante kits comerciales o mediante “Boiling method” (Holmes and Quigley, 1981):

- Lisis bacteriana y extracción del plásmido mediante “Boiling method”:

Se inoculó una colonia en 1 ml de cultivo bacteriano, se dejó crecer a 37°C con agitación, se centrifugó y se resuspendió en tampón “boiling” con lisozima (0,7 µg/µl).

Material y métodos

Posteriormente, las bacterias se lisaron con calor a 100°C durante 1 minuto, se centrifugaron a 16000 g durante 10 minutos y se descartaron los pellets con un palillo. Para precipitar el DNA se añadió al volumen del sobrenadante el mismo volumen de isopropanol y se centrifugó a 16.000 g durante 10 minutos descartándose el sobrenadante. El DNA precipitado se lavó mediante la resuspensión del pellet con etanol al 70% y su posterior centrifugación a 16.000 g durante 10 minutos. Finalmente, se retiró todo el etanol y se resuspendió el pellet con 1/10 de TE + RNAsa (30 µg/ml).

- Lisis bacteriana y extracción del plásmido mediante Kits comerciales

Los kits comerciales usados fueron Wizard® plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) para realizar Miniprep y Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) para la realización de Midiprep. Se siguieron los protocolos descritos por las casas comerciales.

8.4. Digestión de plásmidos

Para digerir los plásmidos se usaron endonucleasas de restricción a su temperatura óptima de funcionamiento empleando un tampón universal. Para la obtención de los fragmentos de restricción de interés, previamente se diseñaron las estrategias mediante el uso del programa informático *Serial Cloner 1-3*.

8.5. Purificación de fragmentos de restricción

Los fragmentos generados después del tratamiento con enzimas de restricción fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa, de donde se extrajo la banda de interés. Para purificar la banda extraída se usó un *Kit Comercial GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich®) siguiendo el protocolo del fabricante.

8.6. Ligaciones

La ligación es un proceso mediante el cual se unió un inserto de DNA que contenía la secuencia de interés y un vector cortado y desfosforilado en los extremos 5'. La desfosforilación mediante la fosfatasa CIP (*Calf Intestinal Alkaline phosphatase*) (New England Biolabs®) se realiza para que el vector no recircularice. Posteriormente, se realizó la ligación usando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs®), la cual cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre el grupo fosfato del extremo 5' del

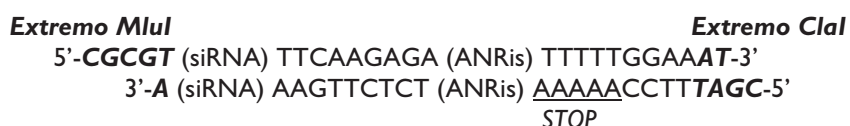
inserto y el grupo hidroxilo del extremo 3' del vector. Ambas enzimas se usaron según las especificaciones de la casa comercial. Se realizó un control de la reacción en el cual no se añadió inserto, para comprobar la posible recircularización del vector causada por una desfosforilación incompleta.

8.7. Secuenciación

Todas las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciación. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada caso. La secuenciación fue efectuada por el Servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca.

9. Generación de partículas lentivirales

El silenciamiento específico de la expresión de la proteína de interés se realizó mediante el uso de shRNAs (*small hairpin RNAs*) que se diseñaron a partir de los siRNA (*small interference RNA*) previamente seleccionados. Para el diseño de los oligonucleótidos se hizo que los extremos fueran cohesivos con los del vector pLVTHM que previamente se había cortado con las enzimas de restricción MluI y ClaI. La estructura del oligonucleótido sería de la siguiente forma:



9.1. Construcción pLVTHM shRNA

9.1.1. Anillamiento y fosforilación

Para el anillamiento, 5 µl de los oligonucleótidos (100 µM) se diluyeron en tampón de anillamiento y se incubaron durante 6 minutos a 100°C (Tabla M6). Para que el anillamiento fuera más eficiente, se pusieron en un vaso de precipitados con agua a 95°C que se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente. Posteriormente, los oligonucleótidos anillados se fosforilaron en presencia de ATP usando la enzima T4 polinucleótido quinasa (Fermentas) según especificaciones de la casa comercial. La enzima se inactivó a 72°C durante 20 minutos, antes de que los oligonucleótidos fueran

Material y métodos

utilizados como inserto. Finalmente, el inserto se ligó con el vector y la mezcla se transformó en bacterias DH5 α como previamente se ha descrito.

9.1.2. Confirmación por PCR de la obtención de la construcción

Se picaron varias colonias usando un palillo estéril, se generó una placa replica con el antibiótico correspondiente y se introdujo el palillo en un eppendorf con 10 μ l de agua MiliQ. Las bacterias se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 15000 g durante 10 minutos. En un volumen final de 12 μ l se añadieron 5 μ l de cada muestra, 6 μ l de 2X PCR y 0.5 μ l de los cebadores (25 μ M) (pLVTHM-2F: ggatctcgacggatgcatg y pLVTHM-2R: ggtctaaccagagagacc), que reconocen los flancos de inserción en el vector, en un volumen final de 12 μ l. El programa de PCR utilizado fue el estándar con una temperatura de anillamiento de 45°C y con 38 ciclos. Finalmente, el producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Las colonias que poseían la construcción se confirmaron realizando digestiones con MluI y ClaI.

Construcciones	Secuencia
pLVTHM- ShRNA USP36-1	5'-GAGCAAATATGTACTIONGTTG- 3'
pLVTHM- ShRNA USP36-2	5'-GAGAACGCCTATATGTGTG- 3'
pLVTHM- ShRNA USP36-3	5'-GAATGGCTATGCTAAGTTG- 3'
pLVTHM- ShRNA USP36-4	5'-CGACAAGACTCTCTAATGA- 3'
pLVTHM- ShRNA Usp8-5	5'-CTGGTTTAGTTCAGCGAAA- 3'
pLVTHM- ShRNA Control*	5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCG- 3'

Tabla M6. Secuencias de shRNA utilizados en el estudio.

*El pLVTHM-shRNA Control fue generando usando una secuencia de DNA del cloroplasto de *Euglena gracilis*.

9.2. Producción de partículas lentivirales

Los lentivirus se generaron en células HEK-293FT. Para ello, 2.5 x 10⁶ células se transfectaron con 9 μ g de pLVTHM con el shRNA Control o con el shRNA correspondiente, 6 μ g de psPAX2 (que contiene la secuencia para proteínas de empaquetamiento) y 5 μ g de pMD.2G (que contiene la secuencia para proteínas de la envuelta) mediante la técnica de fosfato cálcico. Al día siguiente, se cambió el medio y se

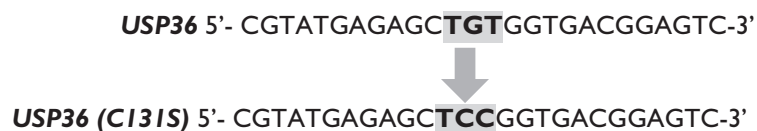
añadió medio sin antibiótico. Después de 48 h se recogió el medio y se centrifugó durante 10 minutos a 500 rpm (Rotor ST16) para retirar restos celulares. El sobrenadante se filtró mediante filtros PVDF con un poro de 45 µm. Posteriormente, se procedió a concentrar las partículas lentivirales mediante ultracentrifugación a 26000 rpm (Rotor ST16) durante 2 horas o con *LENTI-X* (Clontech) cómo indica la casa comercial. Finalmente, los lentivirus se resuspendieron con PBS estéril y se almacenaron en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

9.3. Uso de las partículas lentivirales

Para la infección de células PCI2 6/15, se sembraron 10⁶ células en una placa de 6 cm. Al día siguiente se cambió el medio por medio sin suero y se añadieron 100 µl de virus concentrados que se mantuvieron con las células durante 5-7 días. Cuando se observó el 80-90% de las células infectadas por expresión de GFP, se procedió a distribuir las células en diferentes placas para realizar los experimentos. La eficiencia de la infección se analizó mediante Western blot, confirmando el silenciamiento de la proteína de interés.

10. Mutación puntual

Para la generación del mutante catalítico inactivo de USP36 se procedió a mutar el codón codificante correspondiente a la cisteína 131 (Endo et al., 2009a) y se diseñaron unos cebadores que contenían el codón de DNA que codifica para la cisteína 131 y que fue sustituido por el correspondiente codificante para una serina, ya que los dos aminoácidos son polares y el cambio afectaría menos a la conformación proteica.



El siguiente paso a seguir fue realizar una PCR usando la *Polimerasa Pfu Ultra II fusion Hs DNA Polymerase* que posee una gran fidelidad. Para ello, se utilizó el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos, 14 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 43°C durante 30 segundos, 68°C durante 20 minutos y la elongación final fue de 68°C durante 4 minutos. La reacción de la PCR se digirió con la enzima de restricción *DpnI* que sólo reconoce

Material y métodos

secuencias metiladas con el objeto de eliminar el DNA parental que se utilizó como molde. Se usó el DNA parental como control de la digestión. Finalmente, se amplificó el plásmido transformando bacterias DH5 α y se confirmó que se había realizado una mutación puntual mediante secuenciación. Finalmente, se subclonó en el vector parental un fragmento flanqueado por los sitios de restricción *AscI* y *BspE* que contenía la mutación, de ese modo, se eliminaron las posibles mutaciones no deseadas introducidas por la polimerasa en otras zonas del plásmido.

11. Síntesis de proteínas recombinantes

11.1. Construcción pGEX 6p-1-USP36 (1-120 aa)

11.1.1. Diseño de oligonucleótidos para la síntesis del péptido recombinante

Para la generación de anticuerpos específicos contra USP36, se seleccionó una región que se encontraba en una zona de la proteína USP36 que no estuviese conservada en la familia de desubiquitininas. Por ello, se escogieron los primeros 120 aminoácidos del extremo N-terminal que se denominó polipéptido USP36 (1-120). En el diseño de los oligonucleótidos para amplificar por PCR, se añadió una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* en el extremo 5', en el caso de la secuencia sentido, y un codón de parada y la secuencia para la enzima de restricción *XhoI*, en el caso de la secuencia antisentido. En ambos casos se añadió una secuencia final ATATA para un mejor anclaje de las enzimas de restricción (Tabla M7).

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm
USP36- <i>EcoRI</i> - F	5'-AT ATA GAA TTC ATG CCC ATC GTG GAT AAG C-3'	58
USP36- <i>XhoI</i> STOP- R	5'-AT ATA CTC GAG TCA TCG GAA TAC GCG TTC CCA C-3'	64

Tabla M7. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la generación del plásmido implicado en la síntesis de la proteína recombinante USP36 (1-120).

11.1.2. PCR, Digestión y Ligación

Para realizar la PCR se usó como DNA molde el cDNA obtenido de células PC12 6/15 y se realizó con un gradiente de temperatura de ocho Tm diferentes, con el objetivo de

obtener el inserto y así poder seleccionar la condición más adecuada. El programa seleccionado fue 94°C durante 5 minutos de desnaturalización, 28 ciclos con 94°C durante 15 segundos de desnaturalización, un gradiente de temperaturas de anillamiento entre 52,4°C-65°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos de elongación. Se corrió un gel de agarosa y se purificó con el Kit Comercial GenElute™ Gel Extraction Kit. Posteriormente, se digirió con XhoI y EcoRI para eliminar los extremos TATAT, y se inactivaron las enzimas de restricción a 70°C durante 20 minutos. Finalmente, se realizó una ligación con el vector pGEX 6P-I, previamente digerido con XhoI y EcoRI y desfosforilado.

11.1.3. Expresión de pGEX 6pI-USP36 (1-120)

Se transformaron 4 µl de la mezcla de ligación en 80 µl de bacterias que se plaquearon en una placa de LB- Agar con ampicilina. Se extrajo el plásmido mediante la técnica de “boiling” y se confirmó la construcción mediante digestión con XhoI/ EcoRI.

11.2. Generación de la proteína recombinante GST-USP36 (1-120)

La proteína recombinante GST-USP36 (1-120) se generó usando bacterias DH5α. Para confirmar que la proteína se sintetizaba correctamente se realizó una prueba a pequeña escala con varios clones que se inocularon en 2 ml de LB con ampicilina y se incubaron con agitación vigorosa durante 5 horas a 37°C. Se separó 1 ml del inóculo al que se le añadió 0.1 mM de IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), que es un azúcar sintético análogo de la lactosa, para inducir la expresión de proteína durante 2,5 horas. El resto del inóculo se consideró como control negativo de la inducción. Tanto las bacterias inducidas como las no inducidas se centrifugaron, se resuspendieron en 60-100 µl de tampón de carga, se hirvieron durante 7 minutos y se analizaron mediante electroforesis en un gel del 10% de poliacrilamida. El gel fue teñido con solución de tinción Coomassie durante 10 minutos con agitación para luego ser desteñido con solución de lavado, quedando las proteínas teñidas de azul. El tamaño del péptido esperado fue de 38-40 KDa. Una vez confirmada la inducción, un clon se estrió en una placa de LB-Agar con ampicilina durante una noche a 33°C. Posteriormente, se inocularon varias colonias en 10 ml de LB con ampicilina y se incubaron a 35°C durante una noche en agitación. A la mañana siguiente, el inóculo se diluyó 10 veces con LB con antibiótico y se repartió en dos matraces que se incubaron con agitación vigorosa a

Material y métodos

37°C hasta que la absorbancia a 600 nm estuvo entre 0.4 y 0.6. Llegado ese momento, la temperatura se bajó a 30°C y cuando las muestras estuvieron atemperadas, se tomó una muestra y se añadió IPTG (0,5 mM). Se dejó incubando durante 3 horas a 30°C y se tomó otra muestra antes de centrifugar el cultivo. El pellet se guardó a -20°C.

11.3. Lisis de las bacterias y purificación de la proteína recombinante

Las bacterias se descongelaron en hielo, se resuspendieron con tampón de lisis bacteriano frío (Park et al., 2011), se incubaron 30 minutos en hielo y se sonicaron (Ultrasound technology_Hielscher) (CYCLE: 1; AMPLITUDE: 80%) haciendo ciclos de 15 segundos de sonicación, 15 segundos de descanso. En el momento en el que se observó que los lisados eran translucidos se añadió TritonX-100 100 para una concentración final del 1%, se tomó una muestra y los lisados se centrifugaron a 5000 rpm (Rotor 20-R) a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió, se le añadieron 500 µl de bolas de *Glutathione Sepharose 4B* previamente equilibradas con PBS y la mezcla se incubó a 4°C durante una noche en agitación. Se recogió una muestra que se centrifugó a 800 rpm (Rotor ST16R) durante 5 minutos y las bolas se lavaron 3 veces con PBS frío. Se retiró minuciosamente todo el sobrenadante y se incubaron con 1,5 ml de 0.1 M Glicina pH 2,5 durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente para soltar la proteína recombinante. Se tomó una muestra de la elución y se volvió a centrifugar, se recogió el sobrenadante, se neutralizó con Tris pH 9.0 y se añadió NaCl (concentración final 50 mM) para mantener la proteína estable en solución.

Todas las muestras recogidas fueron analizadas mediante el proceso previamente descrito en la inducción a pequeña escala.

12. Producción de Anticuerpos

Durante todo el proceso de cuidado de conejos, sangrados e inoculaciones se hizo uso del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Para la producción de anticuerpos policlonales se inmunizaron dos conejos. Antes de realizar la inmunización de los conejos, se realizó un sangrado para la obtención de los sueros pre-inmunes que fueron usados como control negativo. Para la primera inoculación, las proteínas recombinantes se mezclaron con el *Adyuvante Completo de Freund*, y para los recuerdos, los inóculos se mezclaron con *Adyuvante Incompleto de Freund*.

12.1. Preparación de la inmunización

Para cada conejo, la proteína recombinante GST-USP36 se diluyó en 400 µl de PBS estéril y luego, se mezcló con 400 µl *Adyuvante Completo de Freund* (Tabla M8). La mezcla se introdujo en una jeringuilla de 5ml y se unió a otra jeringuilla mediante un tubo que se sujetó con un hilo de sutura:



Se hicieron pases del inóculo de una jeringuilla a otra hasta que se obtuvo una solución muy densa que no se dispersaba en agua. Finalmente, se trasvasó a una jeringa de insulina, mediante una aguja de 21G.

	CONCENTRACIÓN	DIAS
SANGRADO PREINMUNE	-	0
1° INMUNIZACIÓN	500µg	0
1° RECUERDO	250 µg	14
2° RECUERDO	250 µg	28
1° SANGRADO	-	38
3° RECUERDO	250 µg	49
2° SANGRADO	-	59
4° RECUERDO	250 µg	70
3° SANGRADO	-	80
5° RECUERDO	250 µg	91
SANGRADO	-	100

Tabla M8. Calendario de sangrados e inmunizaciones de los conejos.

12.1.1. Procesado de la sangre

Las muestras de sangre obtenidas de los conejos inoculados se incubaron, para su coagulación, durante 30 minutos a 37°C o durante 2 horas a temperatura ambiente. Se recogió el suero y, para retirar los desechos, se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm (Rotor ST16R). Finalmente, se realizaron alícuotas que se guardaron a -80°C, hasta su uso.

12.2. Titulación de los sueros

Para la titulación de los sueros se obtuvieron lisados de células HEK-293 transfectadas con pCDNA-3 o con pCDNA-3-FLAG-HA-USP36 en tampón de carga que se analizaron mediante la técnica del Western Blot. Las membranas se cortaron en varias tiras en las que había un marcador, una muestra de HEK-293 control y una muestra de HEK-293 transfectadas con Flag-USP36 y se incubaron con diferentes concentraciones de los sueros.

12.3. Purificación de Anticuerpos

Para purificar anticuerpos se generaron dos columnas de afinidad, una que posee la proteína recombinante GST-USP36 (1-120), que se inoculó en los conejos, y otra que posee la proteína GST. Esta última, se usó para eliminar los anticuerpos contra GST antes de purificar los anticuerpos generados contra USP36.

12.3.1. Producción de una columna de afinidad para anticuerpos

Las proteínas recombinantes GST o GST-USP36 fusionadas a bolas de *Glutathione Sepharose 4B* se unieron covalentemente mediante la técnica de “Crosslink”, descrita anteriormente, para evitar que se separen durante el proceso de purificación. Después, se introdujeron en columnas que se conservaron a 4°C con PBS y 0,1% de azida sódica.

12.3.2. Purificación de anticuerpos en una columna de afinidad

Para purificar los anticuerpos, primero se lavó la columna de GST con TBST, luego, se añadió el suero y se dejó a 4°C en agitación toda la noche. Al día siguiente, se retiró el suero aclarado, sin anticuerpos contra GST, y se guardó a 4°C. La columna fue equilibrada lavándola repetidas veces con TBST y se eluyó con 0.1M Glicina pH 2,5 en fracciones de 0,5 ml que se neutralizaron y se cuantificaron. Cuando las fracciones obtenidas no contenían proteínas se consideró que la columna estaba limpia. Se repitió la incubación del suero aclarado en la columna de GST una segunda vez para eliminar los anticuerpos contra GST no retenidos en la primera incubación. Una vez retirados todos los anticuerpos contra GST, el suero se incubó con la columna del GST-USP36, del mismo modo que se hizo con la columna de GST. Los anticuerpos unidos fueron eluidos como se ha indicado previamente y las fracciones obtenidas se guardaron a -80°C hasta su uso.

13. Experimentos de interacción de proteínas “Pull-Down”

Los distintos fragmentos recombinantes de Need4-2 fusionados a GST (Figura M1) se unieron covalentemente a bolas de *Glutathione Sepharose 4B* mediante la técnica de “Crosslink”, descrita anteriormente. Las proteínas recombinantes unidas a bolas se incubaron con lisados de células HEK-293 que sobreexpresaban USP36, durante una noche con agitación a 4°C. Al día siguiente, los complejos proteicos formados se lavaron con tampón de lisis y luego se resuspendieron con tampón de carga.

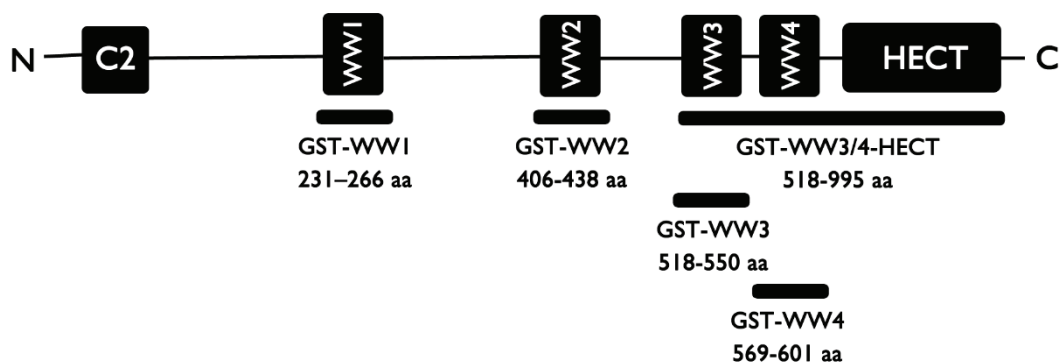


Figura M1. Fragmentos recombinantes de Nedd4-2 utilizados para los experimentos de “pull down”.

14. Ensayo de desubiquitinación “in vitro”

Para estudiar la actividad desubiquitinasa de las DUBs en estudio, se realizó un ensayo de desubiquitinación *in vitro*. Mediante la técnica de fosfato cálcico, se transfectaron 3×10^5 células HEK-293 con pCDNA, pCDNA-TrkA / 6His-Myc-Ubiquitina o pCDNA-FLAG-HA-USP36 (Tabla M10). Al día siguiente se añadieron inhibidores de degradación proteosomal (20 μ M MG132) y lisosomal (50 μ M Cloroquina) durante 5-6 horas. Las células se lavaron con PBS y se recogieron en hielo con 1 ml tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas (exceptuando el inhibidor de la actividad cisteína, PMSF) y sarcosil al 0.2%. Las muestras se procesaron como previamente se ha descrito. Posteriormente, se añadieron a los lisados con FLAG-USP36 y con TrkA los anticuerpos anti-FLAG-proteína A-agarosa y anti-203-proteína A-agarosa, respectivamente, y se incubaron durante una noche a 4°C con agitación. Por una parte, FLAG-USP36 unido a anti-FLAG-proteína A-agarosa se lavó varias veces con tampón de

Material y métodos

lisis y el último lavado se realizó con tampón TBS. Posteriormente, FLAG-USP36 se eluyó con 200 µg de péptido FLAG (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C) por muestra, en un volumen total de 30 µl a 4°C durante 4 horas con agitación. Por otra parte, se procedió a realizar lavados con tampón lisis a TrkA unido a anti-203-proteína A-agarosa, haciendo un último lavado con TBS. La proteína FLAG-USP36 eluida se añadió a TrkA unido a anti-203-proteína A-agarosa y se añadieron 5 µl de tampón DUB-Mg²⁺ (10x). La reacción se realizó en un medio rico en cationes bivalentes que son imprescindibles para la actividad catalítica de USP8 y de USP36, ya que ambas poseen sitios de unión a zinc, “Zinc-Finger”, con motivos Cys-X-X-Cys implicados en su actividad enzimática (Ye et al., 2009). Como control se utilizó la elución de la inmunoprecipitación con anti-FLAG-proteína A-agarosa de los lisados en los que se transfectó únicamente pCDNA (Tabla M9). Las muestras se incubaron a 37°C durante 4 horas con agitación. Finalmente, para parar la reacción se añadió tampón de carga a todas las muestras, para ser analizadas mediante Western blot.

Placa	Plásmido	Cantidad	IP
1	pCDNA	4µg	FLAG-proteína A-agarosa*
2	pCDNA/ pCDNA-TrkA/ 6His-Myc-Ub	1µg/ 2µg/ 1µg	TrkA (α203)
3	pCDNA/ pCDNA-TrkA/ 6His-Myc-Ub	1µg/ 2µg/ 1µg	TrkA (α203)
4	pCDNA-FLAG-HA-USP36	4µg	FLAG-proteína A-agarosa

Tabla M9. Diseño experimental de los plásmidos transfectados. * Control negativo. Ub: Ubiquitina.

15. Ensayo de ubiquitinación “in vitro”

El ensayo de ubiquitinación *in vitro* mediada por Nedd4-2 se realizó basándose en una adaptación del protocolo de Arévalo et al., 2006. Para ello, se sembraron 3x10⁶ células en 7 placas de 10 cm, de las cuales, 4 placas fueron transfectadas con 4 µg de pCDNA-TrkA y las otras 3 placas con 4 µg de pCDNA-FLAG-HA-USP36 mediante la técnica de fosfato cálcico. Al día siguiente, se recogieron con tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa (exceptuando el inhibidor PMSF) y sarcosil al 0.2%. Las muestras se procesaron como previamente se ha descrito. Se obtuvo USP36 eluido y TrkA unido

a anti-203-proteína A-agarosa como previamente se ha descrito en el ensayo de desubiquitinación. Se realizó el último lavado de TrkA unido a anti-203-proteína A-agarosa con tampón de ubiquitinación y se resuspendió con tampón de ubiquitinación (1x), 2 mM ATP, 500 mM DTT y 500 ng/ml ubiquitina, E1 de conejo (150 ng) y UbcH5b (300 ng), en cada una de las reacciones. Finalmente, se añadió 1 µg de GST-WW3/4-HECT y GST, que fueron previamente eluidos en tampón de elución glutatión reducido a 4°C con agitación durante 20 minutos, y FLAG-HA-USP36, eluido cómo se ha descrito previamente. La reacción se realizó a 30°C durante 2 horas y se detuvo añadiendo tampón de carga. Las muestras fueron analizadas mediante Western blot.

16. Ensayo de biotinización

Para el estudio del tráfico de TrkA mediado por USP36, se realizaron estudios de biotinización, en los que se marcan las proteínas de la membrana plasmática con Sulfo-NHS-SS-Biotina que es un compuesto impermeable a las membranas celulares y que se une a los grupos amino de las proteínas. Para ello, se sembraron 3×10^5 células PC12 6/15 en placas de 12 pocillos y se infectaron con partículas lentivirales que contenían shRNA Control o shRNA-I contra USP36. Las células, que se encontraban en medio sin suero, se estimularon con NGF (100 ng/ml) a diferentes tiempos (0, 15 y 60 minutos). Las células se lavaron con PBS, 1 mM CaCl_2 y 0.5 mM MgCl_2 en hielo y, posteriormente, se incubaron con 0.5 µg/ml Sulfo-NHS-SS-biotina durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadió 0.1 M Glicina a 4°C durante 15 minutos para bloquear la biotina no unida a las proteínas. Finalmente, las células se lavaron varias veces con PBS, 1 mM CaCl_2 y 0.5 mM MgCl_2 en hielo y se lisaron con tampón de lisis con inhibidores (Figura M2). Las muestras se procesaron como previamente se ha mencionado en el apartado de inmunoprecipitación (página 5).

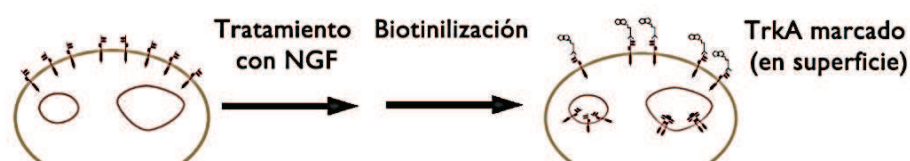


Figura M2. Esquema representativo del ensayo de biotinización de proteínas de superficie.

17. Inmunofluorescencia

Para realizar inmunofluorescencias se sembraron células en una placa de 24 pocillos en la que se han incorporado cubres tratados con PDL. Las células pegadas a los cubres, se lavaron con PBS y posteriormente se fijaron en 4% paraformaldehído + 20% de sacarosa durante 5 minutos, se lavaron con PBS durante 1 minuto y con PBS + 50 mM NH₄Cl durante 10 minutos, para eliminar la autofluorescencia del PFA. En una cámara húmeda se bloquearon para posteriormente incubarse con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo con Triton X-100 al 0.1% a 4°C toda la noche. Al día siguiente se realizó un lavado con PBS de 20 minutos, y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 40 minutos. Se realizó otro lavado con PBS, se incubó con Hoechst 33342 diluido en PBS durante 4 minutos y se volvió a lavar con PBS durante 40 minutos. Finalmente, se montaron los cubres en portas con *ProLong® Gold*. La visualización y captación de imágenes de las muestras se hizo con un microscopio de fluorescencia y un microscopio laser confocal *Leica*. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el uso del programa *ImageJ* del NIH (National Institutes for Health) y *Adobe Photoshop CS5*.

18. Soluciones

- PBS 1X (Phosphate Buffered Saline): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ disuelto en H₂O, con pH 7.4.
- 2 × HBS: 140 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.05.
- Tampón de lisis (NP-40): 20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 2mM EDTA con Inhibidores de Proteasas y Fosfatasas:

<i>Inhibidor</i>	<i>Actividad</i>	<i>Concentracion final</i>
<i>Aprotinina</i>	Proteasas	1 µg/ml
<i>Leupeptina</i>	Degradación Lisosomal	2 µg/ml
<i>B- Glicerofosfato</i>	Proteasas: Aspártico	10 mM
<i>PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)</i>	Proteasas: Serinas y Cisteinas	1 mM
<i>NaF</i>	Fosfatasas: Serina/Treonina	10 mM
<i>Orthovanadato Na</i>	Fosfatasas: Tirosina	1 mM

Tabla M10. Inhibidores de degradación proteica.

Western Blot

- Tampón de Carga (5xSDS): 100 mM Tris pH 7.5, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% Azul de Bromofenol.
- Tampón de Electroforesis: 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glicina y 0.1% SDS.
- Tampón de Transferencia: 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glicina y 10%-20% Metanol, a 4°C.
- Tampón TBST (Tris Buffered Saline with Tween[®]-20): 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.1% Tween[®]-20.
- Tampón de Bloqueo: 2% BSA o 3% de leche en polvo diluidos en TBST.
- Tampón ECL (Enhanced Chemiluminescent): 12.1 g/L Tris, 390 mg/L Luminol, 474 mg/L Para-iodofenol, con pH 9.35.

Material y métodos

Fraccionamiento Núcleo/Citoplasma

- Tampón de lisis Citoplásmico: 10 mM HEPES pH 7, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA y 0.1% NP-40.
- Tampón de lisis Nuclear: 50 mM HEPES pH 7, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1% NP-40.

Células Competentes

- LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 /L NaCl con pH 7.0. Se esterilizó en autoclave.
- LB agar: A un litro de medio LB se le añade 15 g *Bacto-Agar*. Se esterilizó en autoclave.
- Medio SOC: Medio SOB con 40% de glucosa.
- Medio SOB (Super optimal Broth): 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0.5 g/L NaCl, 2.5 ml/L de 1M KCl, con pH 7. Después de esterilizar en autoclave se añade 10 ml/L de 1M MgCl₂.
- Tampón TB (Transformation Buffer): 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, con pH 6.7. Se añadió 30 mM MnCl₂·H₂O. Se filtró y se mantuvo a 4°C.

Construcciones plasmídicas

- Tampón "Boiling" (para 100ml): 8 g Sacarosa, 5 ml Tritón X-100, 10 ml de 5M EDTA, 5 ml de 1M Tris pH 8.0, se guarda a 4°C. Añadir 0.7 mg/ml I TE + RNAsa
- Tampón Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl pH 8.1 y 1mM EDTA.
- Tampón Universal: Está compuesto por tres componentes:
 1. 10 mM DTT (10X).
 2. 30 mM espermidina (10X).
 3. "Carlos Buffer": 330 mM Tris Acetato pH: 7.5, 100 mM Mg Acetato, 660 mM K Acetato y 1 mg/ml BSA Fracción V.
- Tampón de Anillamiento: 100 mM CH₃CO₂K, 30 mM HEPES pH: 7,4 y 2 mM (CH₃COO)₂ Mg.

Síntesis de proteína recombinante

- Solución de Lavado: 40% MetOH, 10% Ácido acético y 50% H₂O MiliQ.
- Solución de Tinción Coomassie: 0,1% de Coomassie Blue en Solución de lavado.
- Tampón de lisis Bacteriano: en PBS frío con 2% de Sarkosyl (Sodium Lauroyl Sarcosinate) e Inhibidores de Proteasas y Fosfatasas.

Ensayo de Desubiquitinación y de Ubiquitinación “in vitro”

- Tampón de lisis con Sarkosyl: 20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2% Sarkosyl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM K Ortovanadato, 1 mg/ml Apoproteína, 10 M NaF, 10 M β-Glicerol fosfato.
- Tampón TBS (Tris Buffered Saline): 10 mM Tris- HCl y 150 mM NaCl, pH 7.4.
- Tampón DUB-Mg²⁺ (10x): 400 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM DTT y 50 mM MgCl₂.
- Tampón de Ubiquitinación: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 2 Mm MgCl₂, 2 mM ATP, 500 mM di- thiothreitol y 500 ng/ml de ubiquitina.
- Tampón de elución: 75 mM HEPES 7.4, 150mM NaCl, 10mM L-Glutathione reduced, minimun 99%.

19. Reactivos

Acrilamida y Bis-acrilamida (Ultra Pure Protogel[®] 30% acrilamida y 0.8% bisacrilamida): National Diagnostics

Adyuvante Completo e

Incompleto de Freund: Thermo Scientific

Ampicilina y Kanamicina: Sigma-Aldrich[®]

APS (Persulfato Amónico): Sigma Aldrich

Ázida Sódica: MERK

Bromuro de Etidio: Bio-Rad

BSA (Bovine Serum Albumin): Sigma-Aldrich

CIP (Calf Intestinal Alkaline phosphatase): New England Biolabs[®]

Cloroquina: Sigma

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*): Lonza

DMSO (Dimetil Sulfóxido): Sigma

Dpnl: New England Bio Labs

EI de conejo: Sigma

Glutathione Sepharose 4B: Pharmacia, Code No. 17-0756-01

IGEPAL (NP-40): Sigma Aldrich

ImProm-II[™] Reverse

Transcription System: Promega[®]

IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside): VWR

Lipofectamina[™] 2000: Invitrogen

Líquidos de revelado: Kodak[®]

MGI 32: Biochem

Neuroavidina: Thermo Scientific

NGF (*Factor de Crecimiento Nervioso_mNGF 2.5S Grade II*): Alomone Labs.

OPTIMEM: Gibco

PCR extender System: 5-PRIME

PCR Master mix: Promega

PDL (Poli-D-lisina): Sigma

Penicilina/Estreptomina: Gibco

Péptido FLAG (FLAG[®]PEPTIDE F3290. N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C): Sigma- Aldrich[®]

Piruvato: Gibco

Polimerasa Pfu Ultra II fusion Hs

DNA Polymerase: Agilent Technologies

ProLong[®] Gold: Invitrogen[™]

PVDF (Immobilon[®]): Millipore[™]

Random primers: Promega[®]

Suero de Caballo: Gibco

Suero Fetal Bovino: Gibco

Sulfo-NHS-SS-Biotina: Pierce.

TEMED (N, N, N, N'-Tetrametilnediamina): BDH Prolabo - VWR International

TRIZOL[®] Reagent: Invitrogen[®] Life technologies

UbcH5b: Sigma

Ubiquitina: Sigma

Resultados

Capítulo I:

Identificación de desubiquitinadas implicadas en la regulación de los niveles de TrkA activo

I. Ensayo de identificación de desubiquitinatas

Para determinar que desubiquitinatas (DUBs) están implicadas en la retirada de ubiquitina de TrkA, se desarrolló un ensayo de identificación de DUBs utilizando un kit basado en la tecnología del siRNA (Duex and Sorkin, 2009). Para ello, se analizaron los niveles de activación del receptor TrkA a diferentes tiempos de estimulación con NGF en células PC12 6/15. Se estableció un único tiempo de estímulo con NGF de 10 minutos, el cual es suficiente para que se dé la activación de TrkA y su posterior internalización. Tras el pulso de 10 minutos con NGF, se recogieron muestras a distintos tiempos post-estímulo que se analizaron mediante Western blot (Figura R1). De este modo, se seleccionaron dos tiempos después del estímulo con NGF que proporcionaran suficiente información sobre la cinética de activación de TrkA (pTrkA) como para que, una vez disminuida la expresión de las DUBs estudiadas, pudiéramos identificar aquellas que afectaran dicha cinética. Los tiempos seleccionados fueron 15 minutos, momento en el que los receptores estimulados se encuentran en el tráfico endosomal (Tjelle et al., 1996), y 60 minutos, momento aproximado en el que se ha descrito que se produce la degradación del receptor TrkA (Chen et al., 2005) (Figura R1).

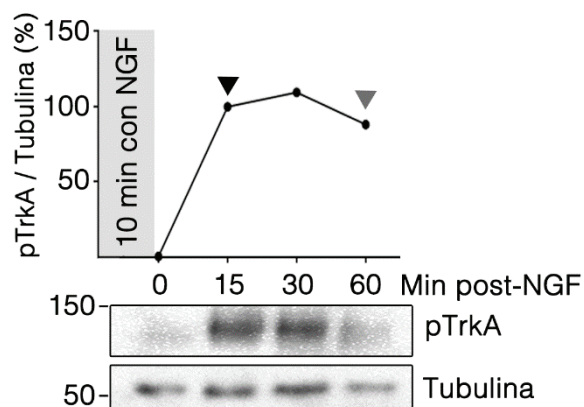


Figura R1. Cinética de la activación del receptor TrkA tras un estímulo de NGF durante 10 minutos. En el panel superior se representa mediante una gráfica la cuantificación de la intensidad de pTrkA normalizada frente a tubulina. Se muestra la media de 2 experimentos independientes. Flecha negra: niveles del % de pTrkA/Tubulina a 15 minutos. Flecha gris: niveles del % de pTrkA /tubulina a 60 minutos. En los

paneles inferiores se muestra un Western blot representativo de la cinética de pTrkA a diferentes tiempos después de un pulso de 10 minutos con NGF (100 ng/ml) en células PC12 6/15.

Para la puesta a punto del ensayo de identificación de DUBs, se usó un kit de optimización (*Thermo Scientific Dharmacon® siGENOME® RTF Optimization Kit*) que está diseñado para obtener las condiciones más adecuadas de transfección, en nuestro caso, en células PC12 6/15. El kit estaba constituido por dos placas de 96 pocillos que

Resultados I

contenían pocillos 1) sin siRNA, 2) con siRNA control, que no reconoce ninguna diana (siGLO, siGLO[®] RISC-Free[™] Control siRNA), o 3) con siRNA para GAPDH. La manipulación del kit se realizó según las especificaciones de la casa comercial (Thermo Scientific Dharmacon).

Los parámetros que se pusieron a punto fueron el número de células y el tipo de producto de transfección. Con respecto al número de células, se determinó que 5000 células por pocillo era adecuado para obtener una transfección eficiente que no afectara a la viabilidad celular y que nos permitiera obtener suficiente material para realizar el estudio. En el caso de la selección del producto de transfección, se probaron diferentes cantidades de 5 productos de transfección distintos (Figura R2A), y se determinó que la Lipofectamina 2000[®] producía una transfección más eficiente para nuestro tipo celular. Así pues, para que se diese una transfección eficiente que no fuera tóxica para las células se utilizaron 2µl de Lipofectamina 2000[®] por pocillo (Figura R2B).

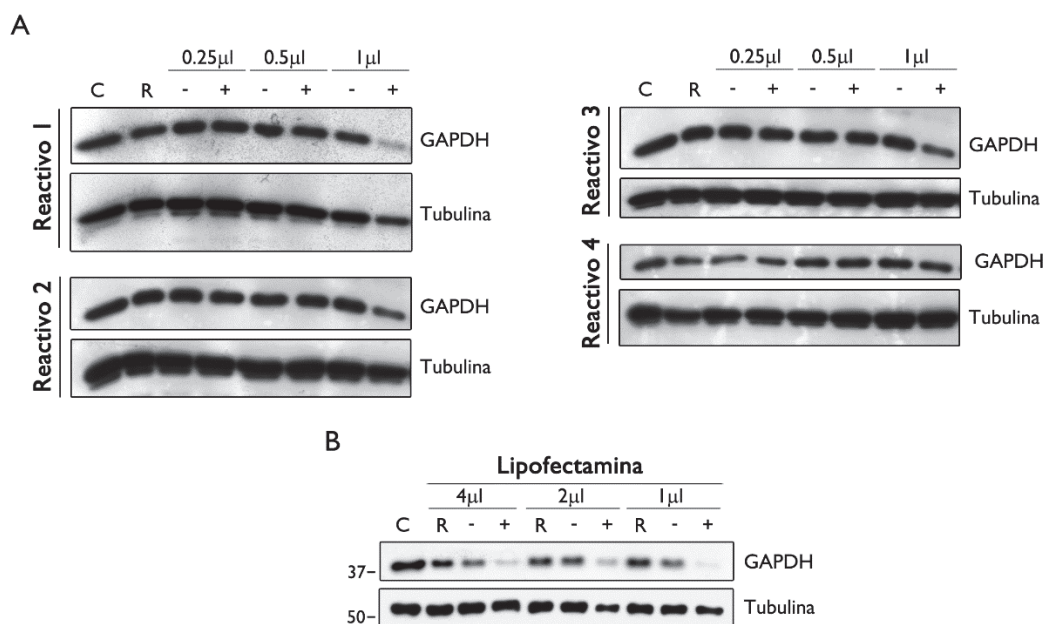


Figura R2. Selección de Lipofectamina 2000[®] como producto de transfección más eficiente para nuestro modelo experimental. **A.** Western blot que representa la eficacia de los Reactivos 1, 2, 3 y 4 (Thermo Scientific Dharmacon[®]). Las células PC12 6/15 fueron tratadas con 0.25 µl, 0.5 µl y 1 µl de los diferentes reactivos según las recomendaciones de la casa comercial. Se analizó la eficacia del silenciamiento de GAPDH y se utilizó tubulina como control de carga. **B.** Resultados obtenidos en el silenciamiento de GAPDH en células PC12 6/15 usando diferentes cantidades de Lipofectamina 2000 (4 µl, 2 µl y 1 µl). C: Células sin tratar; R: Células tratadas con el reactivo correspondiente; (-): siGLO; (+): siGAPDH.

1.1. Selección de desubiquitininas que modulan la cinética de TrkA activo

Se analizaron 54 DUBs mediante el uso de SMARTpool siRNA, un kit que contiene 4 siRNAs que reconocen 4 regiones diferentes de cada RNA mensajero diana, con lo que se asegura una eficiencia elevada en el silenciamiento del gen. Como control, se utilizó siRNA que no tenía RNA mensajero diana, siGLO. Para la realización del experimento se sembraron 5000 células PC12 6/15 por pocillo en placas de 96 pocillos previamente tratadas con Poli-D-Lisina. Después de 24h, se rehidrató el siRNA liofilizado añadiendo 25 μ l/pocillo de OPTIMEM y 2 μ l/pocillo de Lipofectamina, que se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron los complejos Lipofectamina-siRNA a las células y después de 48 h se cambió el medio por medio PC12 6/15 bajo en suero (medio PC12 6/15 BS) durante 24h, momento en el que se realizó un estímulo de 10 minutos con 100 ng/ml de NGF, tras el cual, se cambió el medio a las células. A partir de este momento se recogieron las células con tampón de carga de proteínas 15 y 60 minutos después del estímulo con NGF (Figura R3). Para el desarrollo del Western blot en cada gel se cargaron lisados de células sin estimular y lisados de células estimuladas a las que se les había transfectado siGLO o los siRNAs contra una DUB determinada (Figura R3).

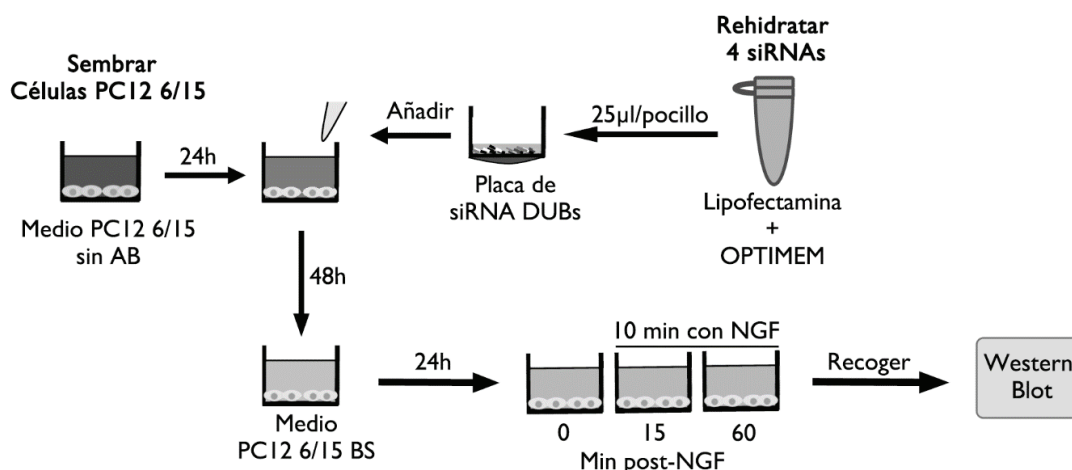


Figura R3. Esquema del protocolo utilizado para el desarrollo del ensayo de identificación de desubiquitininas. AB: Antibiótico; BS: bajo en suero.

El ensayo de identificación de DUBs se realizó por duplicado. Se obtuvieron diferentes cinéticas de pTrkA para cada DUB, pudiéndose observar que el silenciamiento de cada DUB alteraba los niveles de pTrkA a 15 minutos, a 60 minutos o a ambos tiempos a la

Resultados I

vez. En la figura R4 se muestran varios ejemplos en los que, comparándolos con el control, se ve que cuando se silencia DUB A hay menos pTrkA a 15 y a 60 minutos, cuando es el caso de DUB B, pTrkA se comporta como en la situación control y cuando analizamos el silenciamiento de DUB C vemos que pTrkA se ve incrementado en ambos tiempos siendo mucho mayor el incremento a 15 minutos (Figura R4).

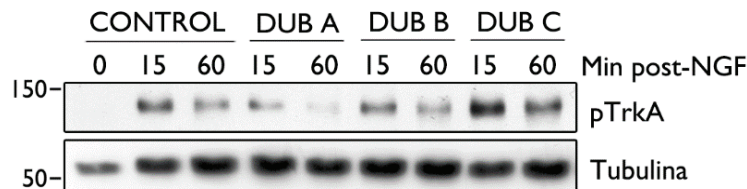


Figura R4. Efecto del silenciamiento de diferentes desubiquitininas sobre la cinética de TrkA activo. Western blot que muestra la cinética de TrkA una vez silenciadas diferentes DUBs.

Para seleccionar las DUBs de nuestro interés se tuvo en cuenta que una vez internalizado pTrkA, éste se transloca a los endosomas tempranos donde se encuentra fosforilado y ubiquitinado. Posteriormente, pTrkA puede seguir dos vías: 1) la de reciclaje, por la que volvería a la membrana plasmática, o 2) la de degradación lisosomal. En ambos casos, las DUBs juegan un papel fundamental, ya que para que el receptor pueda continuar por cualquiera de los dos procesos mencionados, la ubiquitina tiene que ser previamente retirada del receptor (Clague and Urbé, 2006) (Figura R5A). Por todo esto, el silenciamiento de las DUBs implicadas en el reciclaje de TrkA, conducirá al incremento de la degradación del receptor, disminuyendo los niveles de pTrkA. Por este motivo, se consideró que las DUBs de nuestro interés serían aquellas en las que su silenciamiento provocase una disminución de los niveles de pTrkA a 60 minutos superior a los que se dieran en la situación control.

Para el análisis de los resultados, se cuantificó la intensidad de las bandas de pTrkA y de β -tubulina III, mediante el uso del programa *ImageJ* del NIH (National Institutes for Health) y se normalizó la cuantificación de los niveles de proteína de pTrkA frente a la de β -tubulina III. Finalmente, se acogieron a nuestro patrón de selección, las DUBs en las que la diferencia existente entre los niveles de pTrkA entre 15 y 60 minutos fuese superior a la diferencia existente en el control (Figura R5B).

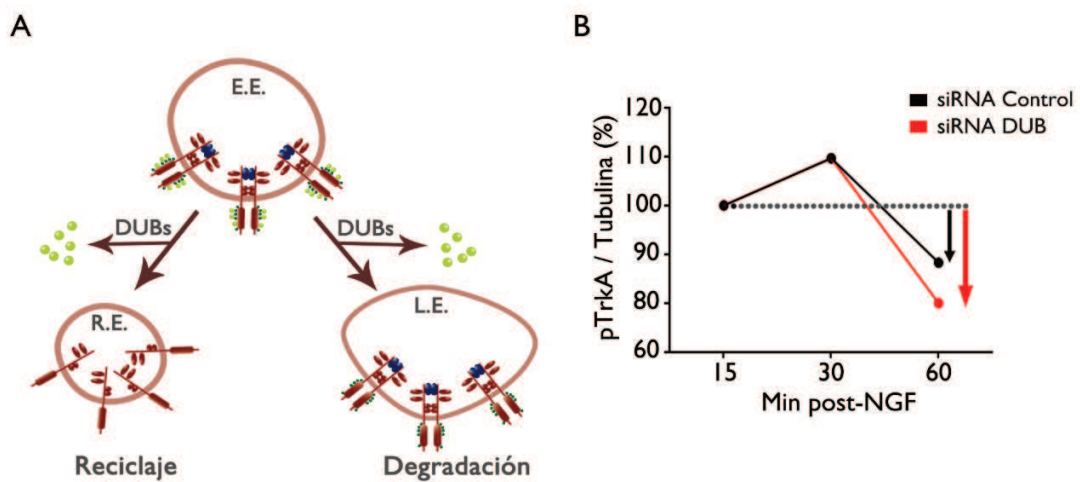


Figura R5. Modelos representativos de la actuación de las desubiquitininas de interés. A. Modelo representativo de los puntos de actuación de las DUBs de interés. E.E.: *Early endosomes* (Endosomas tempranos); L.E.: *Late endosomes* (Endosomas tardíos); R.E.: *Recycling endosomes* (Endosomas de reciclaje). **B.** Representación gráfica del efecto del silenciamiento de las DUBs de interés sobre la cinética de TrkA activo con respecto al control. Flecha negra: diferencia entre 15 y 60 minutos en la condición siRNA Control. Flecha Roja: diferencia entre 15 y 60 minutos en la condición siRNA DUB.

De las 54 DUBs analizadas USP3, USP8, USPII, USP36, USP49, PMSD14 y FBXO8 tuvieron una mayor diferencia de los niveles de TrkA activo entre 15 minutos y 60 minutos que la condición control (Figura R6).

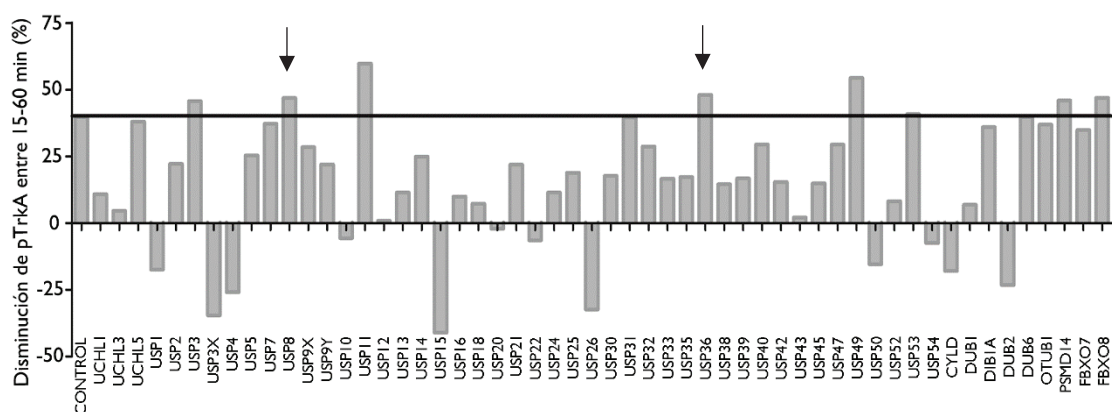


Figura R6. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs. La gráfica representa la diferencia entre los niveles del receptor TrkA activado, que está normalizado con respecto a tubulina, entre 15 y 60 minutos después de realizar un pulso con NGF (100 ng/ml) durante 10 minutos para cada una de las DUBs estudiadas. Se muestra la media de dos experimentos independientes. Los resultados del control se obtuvieron de la media del resultado obtenido al realizar la media de las diferencias de pTrkA entre 15 y 60 min de los controles de cada experimento.

Resultados I

De todas ellas, para la realización de la presente tesis doctoral hemos estudiado dos: **USP8**, que es una proteína muy implicada en el tráfico de diferentes receptores tirosina quinasa (Niendorf et al., 2007) y de **USP36**, proteína implicada en diferenciación celular (Buszczak et al., 2009)(Greenawalt et al., 2012), proceso en el que se encuentra implicado TrkA a través de su cascada de señalización (Hagag et al., 1986).

Capítulo II:

Papel de USP8 sobre TrkA

I. Validación de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de USP8.

Para la confirmación de los resultados de USP8 obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs, se utilizó un shRNA (shRNA-5 contra USP8) diseñado de forma independiente a los usados en el ensayo de identificación de DUBs. Se infectaron células PC12 6/15 con partículas lentivirales y se confirmó mediante RT-PCR la caída de la expresión del mRNA de *USP8* en células PC12 6/15 (Figura R7A), observándose una reducción de la expresión del mRNA *USP8* superior al 50% (Figura R7B). Además, recientemente en nuestro laboratorio, se han generado recientemente anticuerpos contra la proteína USP8 que han permitido confirmar la reducción de los niveles proteicos de USP8 en células PC12 usando el shRNA mencionado (datos no mostrados).

Una vez confirmada la eficacia del shRNA se procedió a estimular las células con NGF durante 10 minutos y se recogieron muestras a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos en la validación de USP8 respecto a la activación de TrkA no mostraron unas diferencias tan claras entre las células con USP8 reducido y las células control como las obtenidas el ensayo de identificación de DUBs. (Figura R7C). Esto pudo ser debido a que en el ensayo de validación se utilizó un único shRNA, dándose un descenso parcial de USP8, sin embargo, en el ensayo de identificación de DUBs la reducción de USP8 fue posiblemente mucho mayor debido a que se usaron cuatro siRNAs, lo que hizo que se viese un mayor efecto sobre pTrkA.

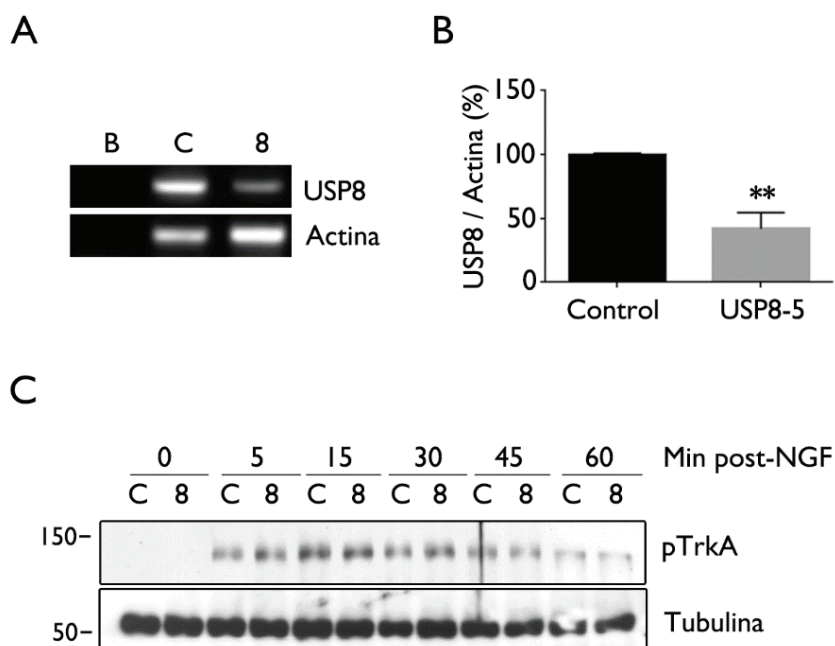


Figura R7. Validación del efecto del silenciamiento de USP8 sobre la cinética de TrkA activo. **A.** Disminución de los niveles de RNA mensajero de *USP8* mediante el uso de shRNA en células PC12 6/15. **B.** Gráfica que representa la caída de los niveles del RNA mensajero de *USP8*, mediante el uso de shRNA en células PC12 6/15. Se muestra la media de tres experimentos independientes \pm s.e.m. Los resultados se analizaron mediante la prueba de *t* de Student de 2 colas. **: $p < 0.01$. Negro: shRNA Control. Gris: shRNA-5 contra *USP8*. **C.** Resultados obtenidos mediante Western blot del ensayo de validación usando el shRNA-5 contra *USP8*.

2. *USP8* interacciona con *TrkA*, *TrkB* y *TrkC*, pero no con *p75*

A la vez que se realizaron los experimentos de validación de *USP8*, decidimos estudiar si existía una interacción entre *TrkA* y *USP8*. Para ello, se co-transfectaron células HEK-293 con el plásmido pFLAG-*USP8* junto con diferentes receptores de neurotrofinas y se inmunoprecipitó *USP8* usando FLAG-proteína A-agarosa a partir de los lisados celulares. Se pudo observar que *USP8* no sólo interaccionaba con *TrkA*, sino que también lo hacía con *TrkB* y *TrkC* (Figura R8A), mostrándose una mayor interacción con *TrkB* que con *TrkA* y *TrkC*. Además, dado que el estímulo con NGF en el ensayo de identificación de DUBs se realizó con una concentración de 100 ng/ml, suficiente como para estimular el receptor de neurotrofinas de baja afinidad, *p75NTR*, se quiso descartar su relación con *USP8*. Para ello, mediante un ensayo de co-

inmunoprecipitación se observó que USP8 no interaccionaba con el receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75 (Figura R8B).

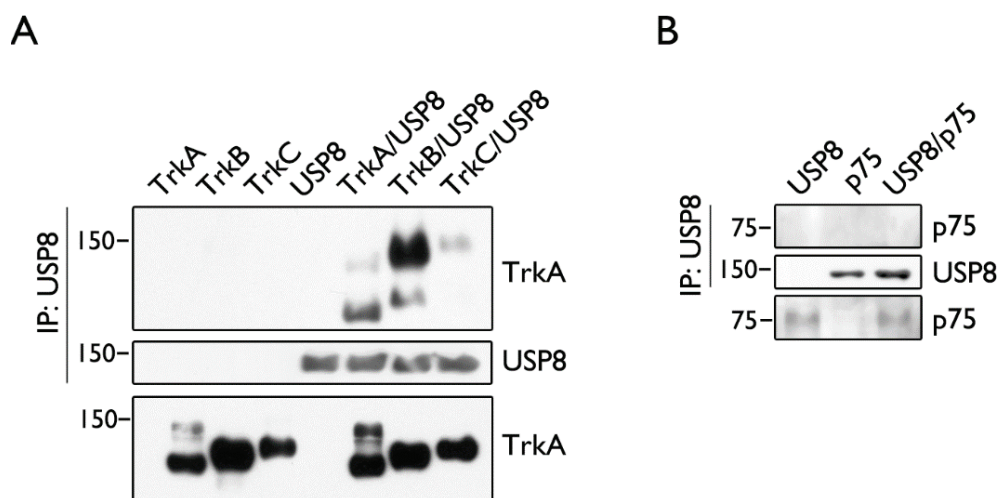


Figura R8. USP8 interacciona con los receptores TrkA, TrkB y TrkC, pero no con el receptor p75. A. Ensayo de interacción de USP8 y TrkA, TrkB y TrkC en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP8 usando FLAG-Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de TrkA, TrkB y TrkC que interaccionaban con USP8 (panel superior). **B.** Ensayo de interacción de USP8 con p75 en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP8 usando FLAG-Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de p75 que interaccionaban con USP8 (panel superior).

3. USP8 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA

Para determinar si USP8 desubiquitinaba TrkA se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA de células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos pCDNA-TrkA y pFLAG-USP8. Al día siguiente de la transfección, las células se trataron con cloroquina (10 μ M) y MG132 (50 μ M) durante 5-6 h para bloquear la degradación lisosomal y proteosomal, respectivamente. Así se obtuvo una acumulación de proteínas ubiquitinadas, lo que nos proporcionó una mayor eficiencia en la detección de TrkA ubiquitinado. Los resultados obtenidos nos mostraron que los niveles de ubiquitinación de TrkA disminuyeron en presencia de USP8 (Figura R9).

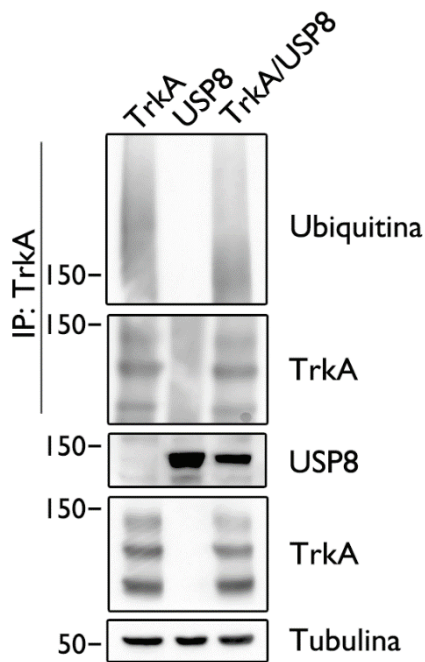


Figura R9. USP8 regula el nivel de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP8. Se inmunoprecipitó TrkA usando el anticuerpo contra TrkA (203). Se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4D1 (panel superior).

Para determinar si el efecto de USP8 sobre TrkA era directo se desarrolló un ensayo de desubiquitinación *in vitro*. Para ello, se purificaron las proteínas USP8 y TrkA a partir de células HEK-293 transfectadas. Posteriormente, se incubó TrkA en presencia de USP8 en un medio rico en cationes bivalentes, como se describe en materiales y métodos. Se pudo observar que en presencia de USP8 los niveles de ubiquitinación de TrkA disminuyen, lo que sugiere un efecto directo (Figura R10).

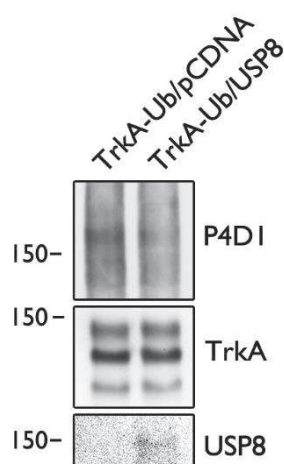


Figura R10. USP8 desubiquitina TrkA *in vitro*. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP8. Se desarrolló un ensayo *in vitro* de desubiquitinación. Se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia o ausencia de USP8 mediante el anticuerpo P4D1 (panel superior).

4. USP8 afecta a los niveles de expresión de TrkA

Hasta ahora nuestros resultados nos han indicado que USP8 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293 e *in vitro*. Por ello, queríamos saber si la actividad de USP8 podría afectar a los niveles de expresión de TrkA en células HEK-293 transfectadas con una cantidad constante del plásmido pCDNA-TrkA, sólo o junto con cantidades crecientes de pFLAG-USP8. Los resultados obtenidos mostraron que cuando la expresión de USP8 se incrementaba, los niveles de TrkA eran mayores (Figura R11).

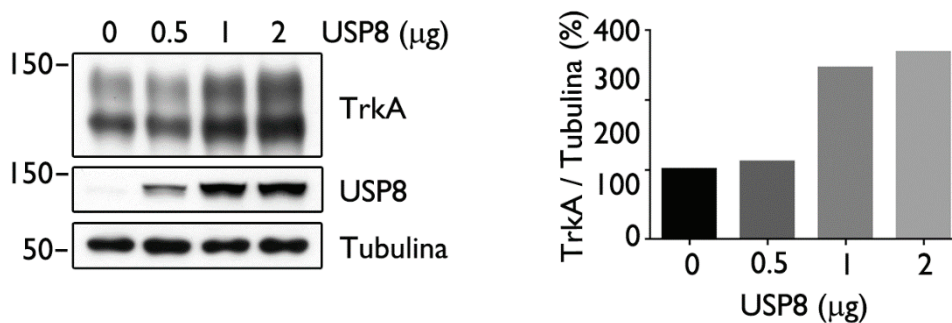


Figura R11. USP8 afecta a los niveles de expresión de TrkA. Ensayo de expresión de TrkA en células HEK-293 co-transfectadas. La cantidad de TrkA transfectado en cada condición es constante, mientras que la cantidad de USP8 transfectado se incrementa (0, 0.5, 1 y 2 μg de plásmido). Gráfica que representa la media de 2 experimentos.

5. USP8 interviene en la diferenciación de células PC12 6/15 inducida por NGF

Los resultados obtenidos hasta ahora nos muestran que USP8 interacciona y disminuye los niveles de ubiquitina de TrkA pero no se sabe cómo afecta a las funciones de TrkA después de ser estimulado con NGF a tiempos largos. Para abordar esto, tuvimos en cuenta que una de las principales funciones mediadas por NGF a través del receptor TrkA es la diferenciación neuronal (Korsching and Thoenen, 1985) y que esta función es debida a un estímulo prolongado de NGF (Jullien et al., 2003). De este modo quisimos comprobar si la diferenciación en célula PC12 6/15 se veía afectada por la reducción de los niveles de USP8. Para ello, células infectadas con partículas lentivirales expresoras de shRNA Control o shRNA-5 contra USP8, que estuvieron en presencia de NGF (100ng/ml) durante varios días, se fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia.

Resultados II

Posteriormente, las células infectadas, que se detectaron mediante la expresión de GFP, se cuantificaron y se consideraron diferenciadas aquellas que una de sus neuritas tenía una longitud dos veces superior al diámetro de su soma. Los datos obtenidos nos mostraban que el tanto por ciento de células diferenciadas con respecto al total de células infectadas en células con USP8 reducido era mayor que en células control a 96 horas con NGF. (Figura R12). Por lo tanto, USP8 afecta a la diferenciación de células PC12 6/15 mediada por NGF.

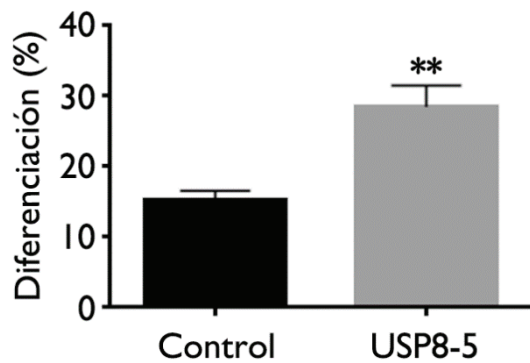


Figura R12. La ausencia de USP8 incrementa la diferenciación mediada por NGF en células PC12 6/15. Gráfica que representa la cuantificación de los niveles de diferenciación a 96h de células PC12 6/15 en presencia de NGF. Se muestra la media de los resultados de 3 experimentos independientes con un total de 365 células contadas en el grupo control y 439 células en el grupo donde se redujo

los niveles de USP8. Los resultados fueron analizados usando la prueba de t de Student de 2 colas. **: $p < 0.001$. Control: shRNA Control; USP36-I: shRNA-I contra USP36.

Capítulo III:

Papel de USP36 sobre TrkA

I. Validación de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de USP36

Para confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs, se procedió a validar los resultados mediante el uso de partículas lentivirales que expresaban secuencias de shRNA para el silenciamiento de USP36. Para su síntesis, se diseñaron oligonucleótidos que contenían la secuencia de los siRNAs procedentes del ensayo de identificación de DUBs y se clonaron en el vector lentiviral pLVTHM. Posteriormente, se produjeron las partículas lentivirales que contenían las secuencias de shRNA con las que se infectaron las células PC12 6/15. Pasados 5-7 días se procedió a evaluar la eficiencia del silenciamiento de cada uno de los shRNAs mediante Western blot usando un anticuerpo que generamos y purificamos (ver materiales y métodos). La mayor caída de la expresión de USP36 se observó en las células que expresaban el shRNA-1 contra USP36 (Figura R13A). Para observar si la eliminación de USP36 en células PC12 6/15 afectaba a la cinética de TrkA activo, y por ende, a su señalización, se recogieron muestras a 6 tiempos diferentes después de estimular con NGF durante 10 min (Figura R13B). Los datos observados nos muestran que la diferencia existente en los niveles de pTrkA entre 15 y 60 minutos era superior en células con los niveles USP36 reducidos que en las células control. Sin embargo, esta diferencia venía dada porque en células con USP36 reducido había un incremento de los niveles de pTrkA a 15 minutos y no un descenso a 60 minutos, cómo previamente se había planteado en el ensayo de identificación de DUBs. En las células con los niveles de USP36 reducido se pudo observar más cantidad de pTrkA a tiempos tempranos, después de la estimulación con NGF, que en las células control. Esta diferencia fue desapareciendo hasta que a 60 minutos los niveles de pTrkA de células control eran similares a los niveles de pTrkA de las células con los niveles de USP36 reducidos. Además, analizando el nivel de pTrkA con respecto al nivel de TrkA total se pudo observar que los niveles de pTrkA eran dependientes de los niveles de TrkA total (Figura R13B y C). Del mismo modo, la cascada de señalización de TrkA también se vio afectada por el silenciamiento de USP36, tanto para la activación de las MAPKs como para la activación de Akt, observándose en esta última un efecto más drástico (Figura R13B).

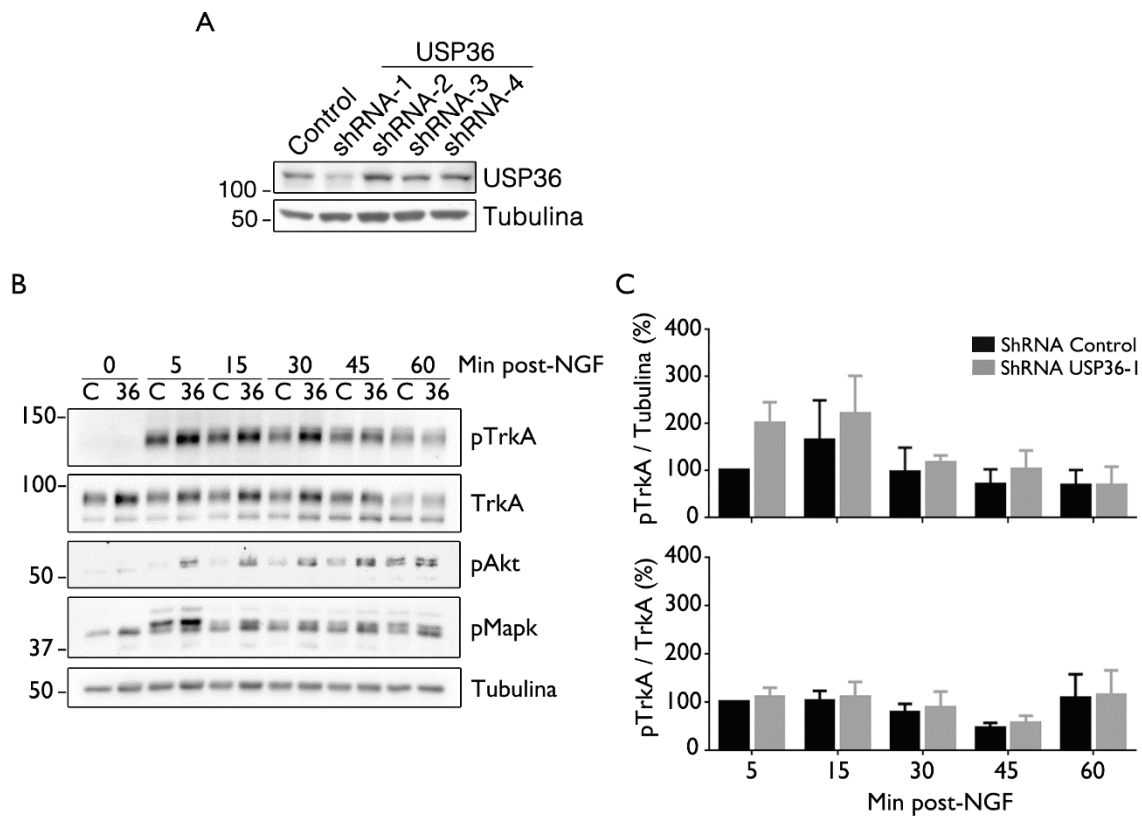


Figura R13. Validación del efecto del silenciamiento de USP36 sobre la cinética de TrkA activo. **A.** Disminución de los niveles de la proteína USP36 mediante el uso de shRNAs en células PC12 6/15. **B.** Western blot representativo que muestra el efecto del shRNA-1 contra USP36 sobre TrkA, pTrkA, pMAPK y pAkt después de un pulso con NGF (100 ng/ml) durante 10 minutos, en células PC12 6/15. **C.** Gráfica que representa los niveles de pTrkA normalizado con tubulina (panel superior) y pTrkA total normalizado con TrkA total (panel inferior). Se muestra la media de tres experimentos independientes \pm s.e.m.

Tras confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs, se realizó un control negativo del ensayo de validación utilizando el shRNA-4 contra USP36, que era uno de los cuatro shRNAs que se utilizaron para el ensayo de identificación, el cual no reducía los niveles de USP36. En este caso se pudo observar que ni los niveles de pTrkA ni de TrkA total se vieron afectados. De este modo se pudo confirmar que los resultados obtenidos en la cinética de activación de TrkA eran dependientes del silenciamiento de USP36 (Figura R14).

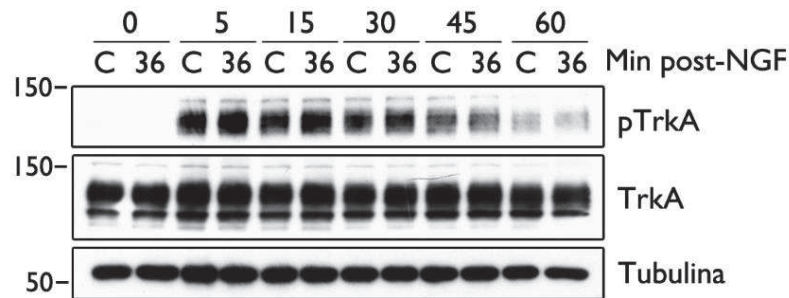


Figura R14. El efecto en la cinética de TrkA activo es dependiente del silenciamiento de USP36. Control negativo del ensayo de validación utilizando partículas lentivirales que expresan el shRNA-4 contra USP36 en células PC12 6/15. C: shRNA Control; 36: shRNA-4 contra USP36.

2. USP36 interacciona con TrkA, TrkB y TrkC, pero no con p75

Una vez confirmados los resultados del ensayo de identificación de DUBs decidimos estudiar si existía una interacción entre TrkA y las DUBs seleccionadas. Para ello, se co-transfectaron células HEK-293 con los plásmidos pCDNA-FLAG-HA-USP36 junto con diferentes receptores de neurotrofinas y se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, se realizó la inmunoprecipitación de USP36 usando FLAG-proteína A-agarosa a partir de los lisados celulares y se analizó la interacción con cada uno de los receptores de neurotrofinas mediante Western blot. Se pudo observar que USP36 no sólo interaccionaba con TrkA, sino que también lo hacía con TrkB y TrkC (Figura R15A y B). Además, dado que el estímulo con NGF en el ensayo de identificación de DUBs se realizó con una concentración de 100 ng/ml, suficiente como para estimular el receptor de neurotrofinas de baja afinidad, p75NTR, se quiso descartar su relación con USP36. Para ello, mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación se pudo observar que USP36 no interacciona con p75 (Figura R15C).

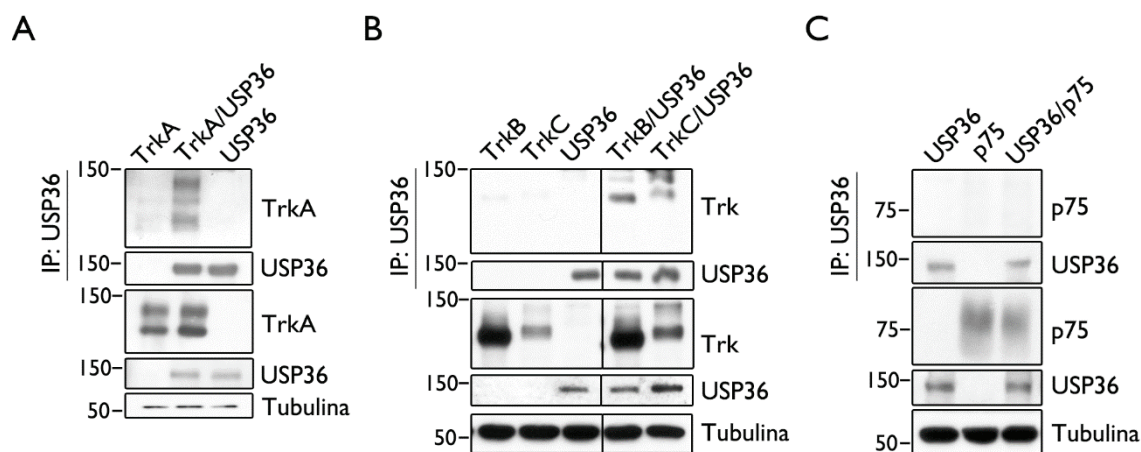


Figura R15. USP36 interacciona con los receptores de neurotrofinas TrkA, TrkB y TrkC, pero no con el receptor de neurotrofinas p75. A. Ensayo de interacción de USP36 y TrkA en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG- Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de TrkA que interaccionaban con USP36 (panel superior). **B.** Ensayo de interacción de USP36 y TrkB y TrkC en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG- Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de TrkB y TrkC que interaccionaban con USP36 (panel superior). **C.** Ensayo de interacción de USP36 con p75NTR en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG- Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de p75 que interaccionaban con USP36 (panel superior).

3. USP36 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA

Para determinar si USP36 desubiquitinaba TrkA se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA de células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos pCDNA-TrkA y pCDNA-FLAG-HA-USP36. Al día siguiente de la transfección, las células se trataron con cloroquina (10 μ M) y MG132 (50 μ M) durante 5-6 h para bloquear la degradación lisosomal y proteosomal, respectivamente. Así, se obtuvo una acumulación de proteínas ubiquitinadas lo que nos proporcionó una mayor eficiencia en la detección de TrkA ubiquitinado. Los resultados obtenidos nos mostraron que los niveles de ubiquitinación de TrkA disminuyeron en presencia de USP36 (Figura R16).

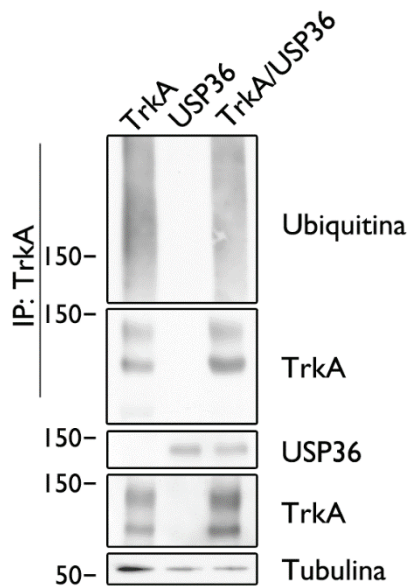


Figura R16. USP36 regula el nivel de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP36. Se inmunoprecipitó TrkA usando un anticuerpo contra TrkA (203). Se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4DI (panel superior).

Para determinar si el efecto de USP36 sobre TrkA era directo se desarrolló un ensayo de desubiquitinación *in vitro*. Para ello, se purificaron las proteínas USP36 y TrkA a partir de células HEK-293 transfectadas. Posteriormente, se incubó TrkA en presencia de USP36 en un medio rico en cationes bivalentes, como se describe en materiales y métodos. Se pudo observar que en presencia de USP36 los niveles de ubiquitinación de TrkA no se vieron afectados (Figura R17), lo que sugirió que el efecto observado en el ensayo de ubiquitinación en células HEK-293 transfectadas podría ser debido a un efecto indirecto mediado por otras proteínas, las cuales no se encontraban en la reacción *in vitro*.

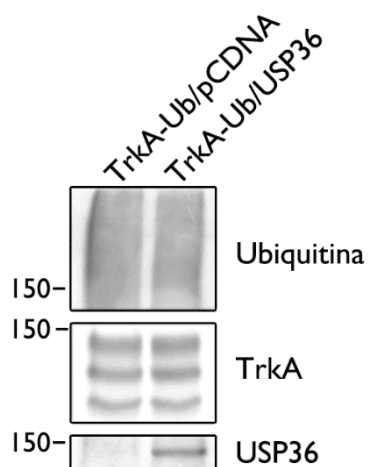


Figura R17. USP36 no desubiquitina TrkA *in vitro*. A. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP36. A partir de células HEK-293 transfectadas se purificaron USP36 y TrkA. Se desarrolló un ensayo *in vitro* de desubiquitinación. Se analizaron los niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia o ausencia de USP36 mediante el anticuerpo P4DI (panel superior).

4. USP36 no afecta a los niveles de expresión de TrkA

Hasta ahora nuestros resultados nos han indicado que USP36 afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293. Por ello, queríamos saber si la expresión de USP36 podría afectar a los niveles de expresión de TrkA. Para ello, se transfectaron células HEK-293 con una cantidad constante del plásmido pCDNA-TrkA, sólo o junto con cantidades crecientes de pCDNA-FLAG-HA-USP36. Los resultados obtenidos mostraron que cuando la expresión de USP36 se incrementaba, los niveles de TrkA no se veían afectados de forma significativa (Figura R18).

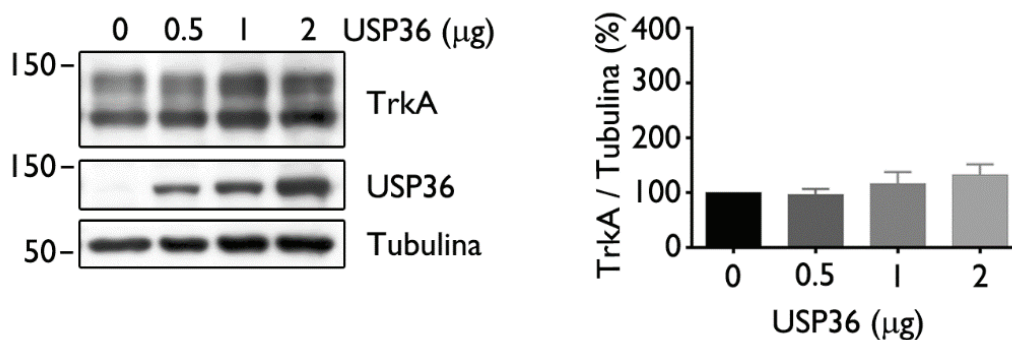


Figura R18. La sobre-expresión de USP36 no afecta a los niveles de expresión de TrkA.

Ensayo de expresión de TrkA en células HEK293 co-transfectadas. La cantidad de TrkA transfectado en cada condición es constante, mientras que la cantidad de USP36 transfectado se incrementa (0, 0.5, 1 y 2 µg de plásmido). Gráfica que representa la media \pm s.e.m. de 5 experimentos.

5. USP36 co-localiza con TrkA en el citoplasma de células PC12 6/15

Estudios previos han descrito que USP36 es una proteína que se encuentra en el nucléolo (Endo et al., 2009a) y en mitocondria (Kim et al., 2011). Sin embargo, el receptor de neurotrofinas TrkA es una proteína asociada a membrana, tanto a membrana plasmática como a las membranas del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi y de los endosomas. Para que USP36 pueda realizar su función sobre TrkA, ambas proteínas deben encontrarse en los mismos compartimentos. Además, haciendo uso de programas bioinformáticos para determinar la localización de USP36 en la célula, se ha descrito que el 4,3% del total de USP36 podría encontrarse en el citoesqueleto (Kim et al., 2005). Por lo tanto, estudiamos la localización endógena de USP36 en las células PC12 6/15. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo

generado por nuestro laboratorio contra la proteína USP36 expresada endógenamente en células PC12 6/15 (USP36¹). Las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia mostraron que USP36 se encontraba en el nucléolo y en otros compartimentos (Figura R19A). Además, para confirmar que nuestro anticuerpo funcionaba correctamente se optó por usar un anticuerpo que ya había sido descrito (USP36²) (Endo et al., 2009a). Las imágenes obtenidas usando el microscopio de laser confocal mostraron que los anticuerpos USP36¹ y USP36² reconocían la proteína USP36 en los nucléolos pero también en otras localizaciones de las células PC12 6/15 (Figura R19B). Los resultados obtenidos se quisieron confirmar mediante un ensayo de fraccionamiento subcelular en el que se obtenían por una parte los núcleos y por otra el resto de los componentes celulares de células PC12 6/15. Con estos experimentos, se observó que USP36 estaba presente en otros compartimentos celulares que no eran el núcleo. Sin embargo, no se observó la presencia de USP36 en los lisados de núcleos, pudiendo ser debido a que la concentración de USP36 en el nucléolo es muy inferior a la existente en el resto de la célula, por lo que el anticuerpo no pudo reconocer cantidades tan pequeñas de proteína (Figura R19C).

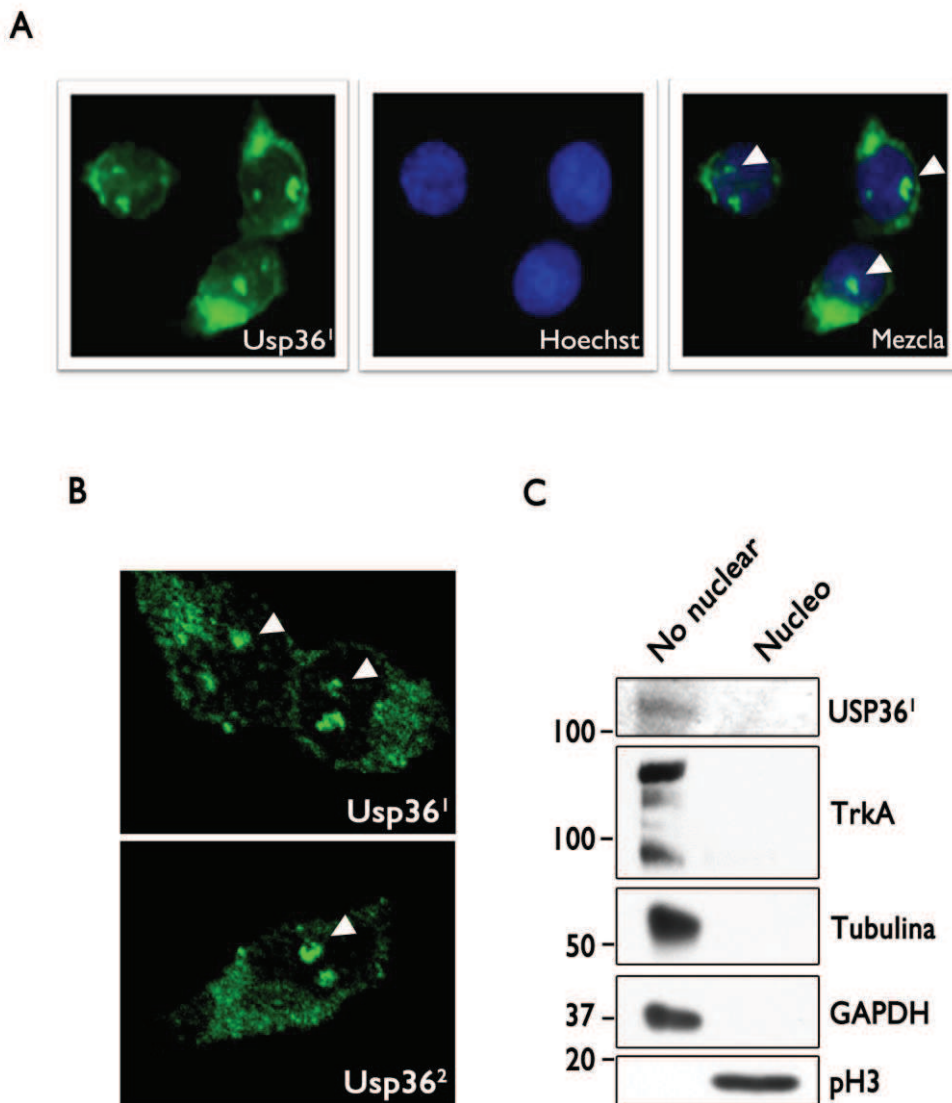


Figura R19. USP36 se localiza en el nucléolo y en compartimentos no nucleares de las células PC12 6/15. A. Localización de USP36 endógeno en el nucléolo y fuera del núcleo. Inmunofluorescencia de USP36 endógeno en células PC12 6/15. Los núcleos fueron marcados con Hoechst. Imágenes tomadas con un microscopio de epifluorescencia. Cabeza de flecha: Nucléolo. **B.** Localización de USP36 en células PC12 6/15 usando dos anticuerpos diferentes contra USP36 endógeno. Inmunofluorescencias realizadas contra USP36¹ y USP36². Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal. **C.** Fraccionamiento subcelular en el que se aislaron los núcleos del resto de componentes celulares. Se empleó TrkA como marcador membrana, β -III tubulina y GAPDH como marcadores de citoplasma y pH3 como marcador de núcleos. USP36¹: USP36 (Laboratorio JC Arévalo); USP36²: USP36 (Endo et al., 2009a).

Posteriormente, se quiso determinar si USP36 y TrkA co-localizaban en células PC12 6/15. Para ello, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia, en los que para detectar USP36 se utilizó un anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio y para la identificación de TrkA se utilizó un anticuerpo monoclonal. Mediante el uso de un microscopio de laser confocal pudimos observar cierta co-localización de USP36 y TrkA (Figura R20).

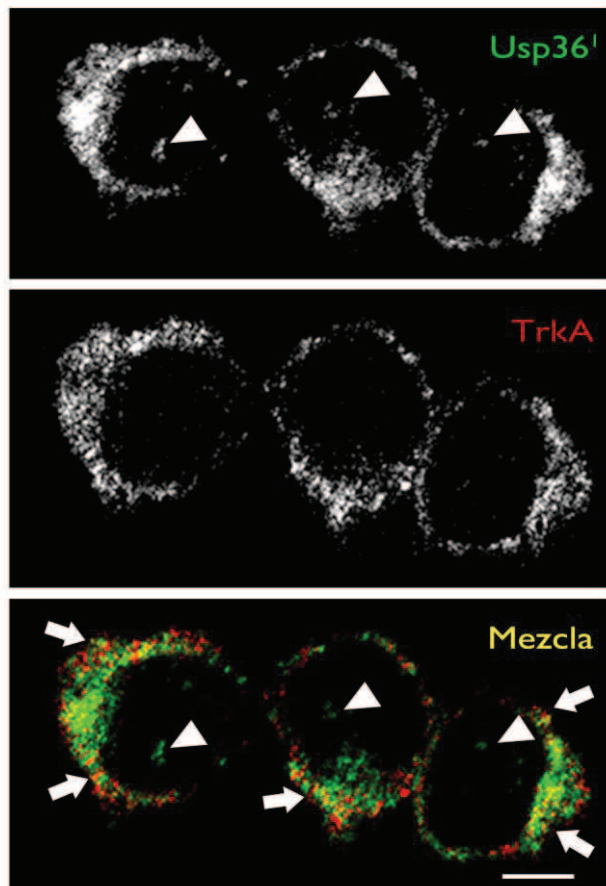


Figura R20. USP36 y TrkA co-localizan en las células PC12 6/15. Inmunofluorescencias de USP36 (panel superior), de TrkA (panel central) y ambas juntas (panel inferior, USP36: Verde; TrkA: rojo) en células PC12 6/15. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de laser confocal. Cabeza de flecha: Nucléolo. Flechas: zonas de co-localización de TrkA y USP36. USP36^l: USP36 (Laboratorio JC Arévalo)

6. USP36 interacciona con Nedd4-2

Los resultados obtenidos hasta el momento nos sugieren que la disminución de los niveles de ubiquitinación de TrkA no está mediada de forma directa por USP36. Por ello quisimos estudiar si el efecto de USP36 sobre TrkA era debido a la actividad de otra proteína que estuviese implicada en la modulación de los niveles de ubiquitinación de TrkA. Teniendo en cuenta estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que se describe a la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2 como una proteína que ubiquitina a TrkA (Arévalo et al., 2006b; Yu et al., 2011, 2014), decidimos comprobar si Nedd4-2

Resultados III

interaccionaba con USP36 y de esta manera pudiera ser partícipe en la acción de USP36 sobre TrkA. Para ello, lisados de células HEK-293 transfectadas con pCDNA-FLAG-HA-USP36 junto con pEGFP-Nedd4-2 se inmunoprecipitaron usando FLAG- Proteína A- Agarosa. De ese modo se pudo observar que Nedd4-2 interaccionaba con USP36 (Figura R21).

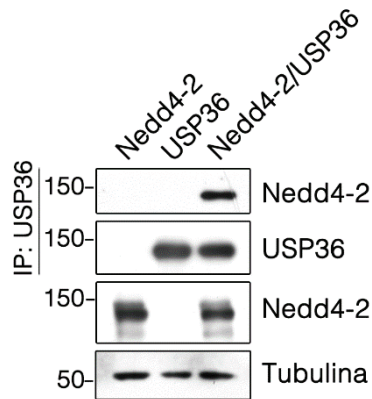


Figura R21. USP36 interacciona con Nedd4-2. Ensayo de interacción entre USP36 y Nedd4-2 en células HEK-293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG-Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de Nedd4-2 que interaccionaban con USP36 (panel superior).

7. USP36 no afecta a los niveles de Nedd4-2, pero si a su ubiquitinación

Tras observar la interacción entre Nedd4-2 y USP36, quisimos estudiar si la actividad de USP36 afectaba los niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 utilizando células HEK-293 co-transfectadas. Después de inmunoprecipitar Nedd4-2, se pudo observar que los niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 se ven disminuidos en presencia de USP36 (Figura R22A). Posteriormente, se quiso determinar si la presencia de USP36 podía afectar a la expresión de Nedd4-2. Para ello se realizaron experimentos en células HEK-293 co-transfectadas con cantidades constantes de Nedd4-2 y cantidades crecientes de USP36. Los resultados mostraron que USP36 no afectaba a la expresión de Nedd4-2 (Figura 22B), por lo que el descenso en la ubiquitinación de Nedd4-2 mediado por USP36, no afecta a la expresión de Nedd4-2.

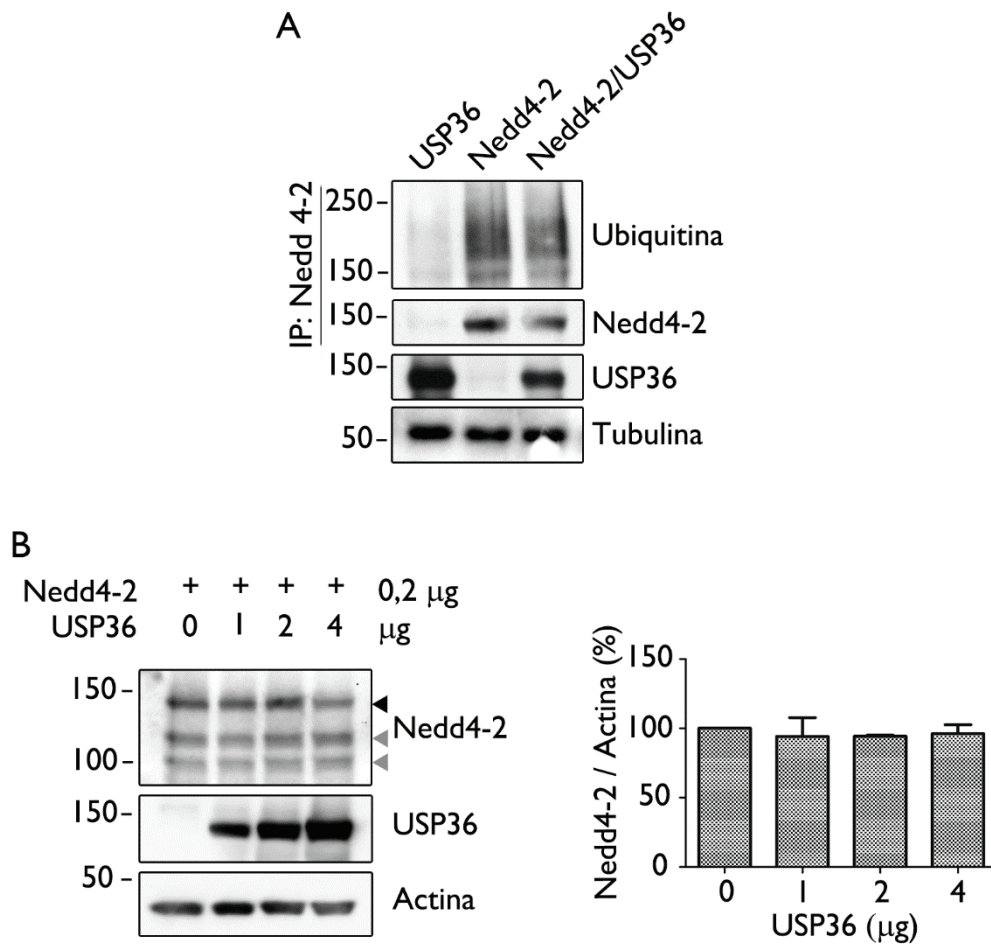


Figura R22. USP36 afecta a la ubiquitinación de Nedd4-2, pero no a sus niveles de expresión.

A. Niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 en presencia de USP36 en HEK293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó Nedd4-2 usando un anticuerpo desarrollado por nuestro laboratorio. Se analizaron los niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 con el anticuerpo P4DI (panel superior). **B.** Ensayo de expresión de TrkA en células HEK-293 co-transfectadas. La cantidad de Nedd4-2 transfectado en cada condición es constante independientemente de la cantidad de USP36 transfectado (0, 0.5, 1 y 2 μ g de plásmido). Gráfica que muestra los niveles de Nedd4-2 normalizados con actina. Se representa la media de 3 experimentos \pm s.e.m. Cabeza de flecha negra: Nedd4-2 transfectado; Cabeza de flecha gris: Nedd4-2 endógeno.

8. La expresión de USP36 esta mediada por la actividad catalítica de Nedd4-2

A pesar de que la expresión de Nedd4-2 no se veía afectada por USP36, decidimos estudiar si existía algún efecto de Nedd4-2 sobre USP36. Para ello, se inmunoprecipitó USP36 de células HEK-293 co-transfectadas con pCDNA-FLAG-HA-USP36 y pEGFP-Nedd4-2. Para el análisis de los niveles de ubiquitinación de USP36 se utilizó el anticuerpo FK1, que es específico para el reconocimiento de poli-ubiquitinación, ya que estudios previos habían descrito que USP36 era poliubiquitinado (Kim et al., 2005). De este modo se observó que los niveles de poli-ubiquitinación de USP36 eran incrementados en presencia de Nedd4-2 (Figura R23).

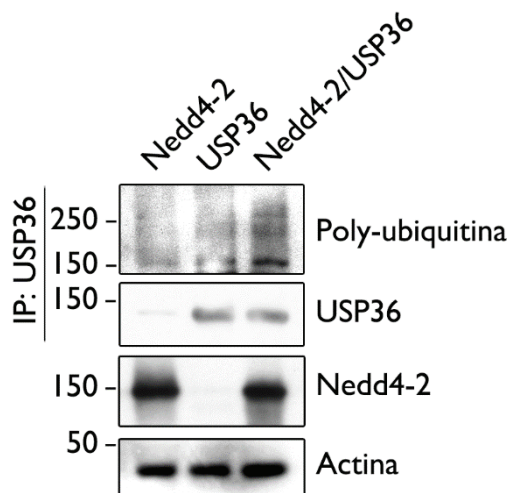
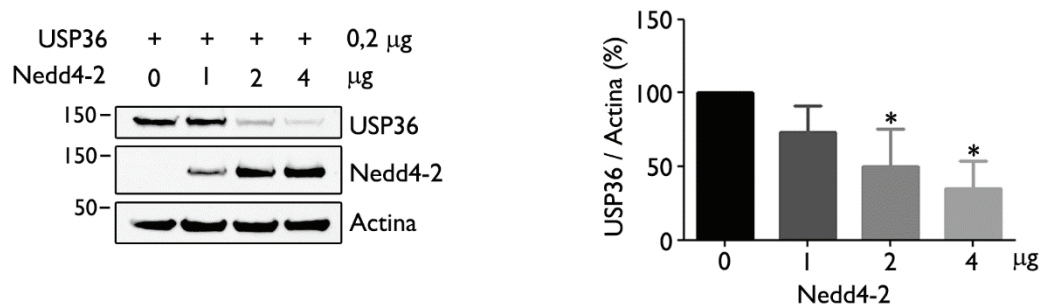


Figura R23. Nedd4-2 incrementa los niveles de poli-ubiquitinación de USP36. Niveles de poli-ubiquitinación de USP36 en presencia de Nedd4-2 en células HEK-293 co-transfectadas con pCDNA-FLAG-HA-USP36 y pEGFP-Nedd4-2. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG-Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de ubiquitinación de USP36 con el anticuerpo FK1 (panel superior).

Posteriormente, se quiso analizar si el aumento de la ubiquitinación de USP36 mediado por Nedd4-2 afectaba a la expresión de USP36. Para ello, se analizó la expresión de USP36 en células HEK-293 co-transfectadas con una concentración constante de pCDNA-FLAG-HA-USP36 y cantidades crecientes de pEGFP-Nedd4-2. Los resultados obtenidos mostraron una disminución drástica de los niveles de USP36 dependiente del incremento de Nedd4-2 (Figura 24A). Teniendo en cuenta estos resultados, quisimos analizar si la caída de los niveles de USP36 estaba relacionada directamente con la actividad catalítica de Nedd4-2. Para ello se desarrolló el ensayo anterior usando cantidades constantes de USP36 y cantidades crecientes del mutante catalítico de Nedd4-2 (Nedd4-2-C962S). En este caso pudimos observar que la expresión de USP36 no se veía afectada por las cantidades crecientes de Nedd4-2-C962S. Además, se

incorporó al estudio la E3 ubiquitina ligasa Itch, perteneciente a la misma familia que Nedd4-2, la cual no ejerció ningún efecto significativo sobre los niveles de USP36 (Figura R24B). Con todo esto se pudo concluir que el efecto de Nedd4-2 ejercido sobre la expresión de USP36 es específico de la actividad catalítica de Nedd4-2.

A



B

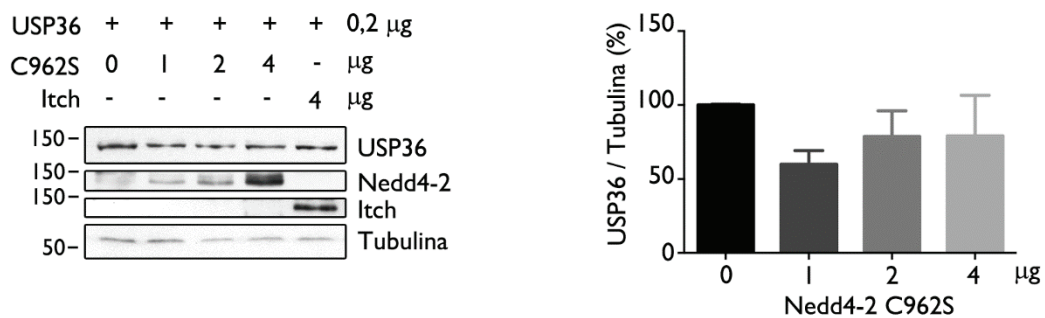


Figura R24. La actividad de Nedd4-2 modula los niveles de USP36. A. Células HEK-293 co-transfectadas con una cantidad constante de USP36 y creciente de Nedd4-2 (0, 1, 2 y 4 μ g de plásmido). Gráfica que representa los niveles de USP36 normalizados con actina. Se muestra la media \pm s.e.m. de 3 experimentos. Los resultados fueron analizados usando la prueba de t de Student de 2 colas. *: $p < 0.05$. **B.** Expresión de USP36 en presencia del mutante catalítico de Nedd4-2-C962S. Células HEK-293 co-transfectadas con una cantidad constante de USP36 y creciente de Nedd4-2 (0, 1, 2 y 4 μ g de plásmido). Gráfica que representa los niveles de USP36 normalizados con tubulina. Se muestra la media \pm s.e.m. de 3 experimentos. Se añadió un control de especificidad en el que se co-transfectaron las células HEK-293 con 4 μ g de la E3 ubiquitina ligasa Itch.

9. USP36 interfiere en la interacción entre Nedd4-2 y TrkA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ahora quisimos analizar las implicaciones que podría tener la interacción entre USP36 y Nedd4-2 sobre TrkA. Primero se investigó a qué dominios de Nedd4-2 se unía USP36 mediante ensayos de “Pull down”. Para ello, se incubaron proteínas recombinantes fusionadas a GST, que correspondían a los diferentes dominios WW y al dominio catalítico (HECT) de Nedd4-2, con lisados de células HEK293 transfectadas con pCDNA-FLAG-HA-USP36. Como controles se utilizaron proteínas recombinantes de GST fusionadas a los dominios de unión a GTPasas de las proteínas Ral y Raf. Se observó que USP36 principalmente se unía con los dominios WW1, WW3 y WW4 (Figura R25). Estudios previos de “Pull down” con los mismos fragmentos de Nedd4-2 mostraron que TrkA principalmente interaccionaba con los dominios WW3 y 4 (Arévalo et al., 2006b). De este modo, USP36 interacciona con Nedd4-2 usando los mismos dominios WW que TrkA, sugiriendo una posible competencia entre TrkA y USP36 por la unión con Nedd4-2.

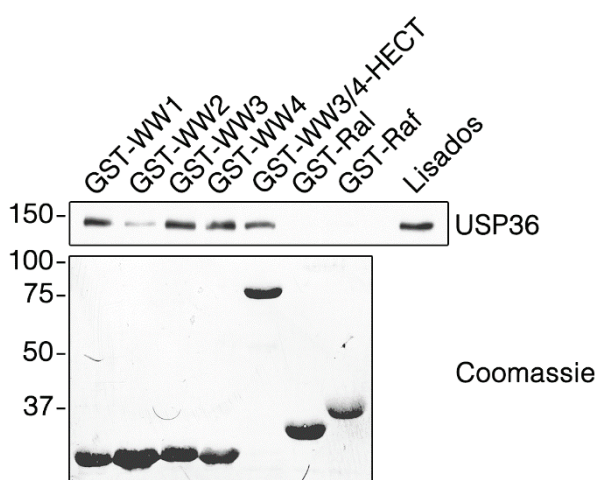


Figura R25. USP36 interacciona con Nedd4-2 mediante los dominios WW1, WW3 y WW4. Ensayo de interacción entre USP36 de células HEK293 transfectadas y fragmentos de Nedd4-2 fusionados a GST: WW1, WW2, WW3, WW4, y WW3/4-HECT. En el panel superior se muestra la unión de USP36 a las distintas proteínas recombinantes mientras que en el inferior se muestran las proteínas recombinantes teñidas con Coomassie.

En base a los resultados anteriores, quisimos determinar si USP36 podría interferir en la interacción entre TrkA y Nedd4-2. Por ello, nos preguntamos si la interacción entre Nedd4-2 y TrkA se veía afectada reduciendo los niveles de USP36 mediante la expresión del shRNA-I contra USP36 en células PC12 6/15. Para ello, se inmunoprecipitó Nedd4-2 de lisados celulares y se analizaron los niveles de TrkA que se encontraban unidos a Nedd4-2 en presencia de niveles normales o reducidos de USP36. De ese modo, se pudo observar más cantidad de TrkA unido a Nedd4-2 cuando los

niveles de USP36 se reducían en células PC12 6/15 (Figura R26). Por lo tanto, USP36 parece interferir en la unión entre Nedd4-2 y TrkA.

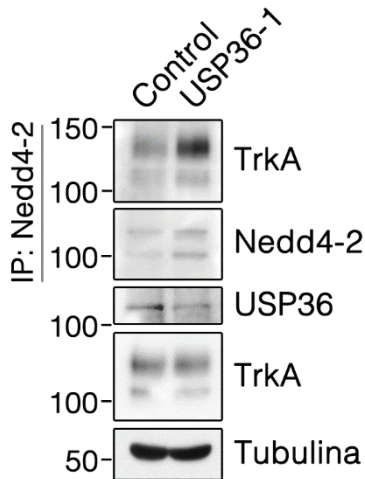


Figura R26. USP36 interfiere en la interacción entre TrkA y Nedd4-2. Ensayo de interacción de Nedd4-2 con TrkA en células PC12 6/15 infectadas con partículas lentivirales que tenían shRNA Control y shRNA-I contra USP36. Se inmunoprecipitó Nedd4-2 con un anticuerpo generado contra el dominio WW1 de Nedd4-2 (Arévalo 2006). En el panel superior se muestran los niveles de TrkA que han interactuado con Nedd4-2.

Hasta la fecha se sabe que Nedd4-2 interactúa con la secuencia PPXY de TrkA que contiene la tirosina 785 sin fosforilar, tirosina que es fosforilada cuando TrkA se activa, lo que hace que Nedd4-2 se suelte (Arévalo et al., 2006b). Ahora nosotros queríamos saber si, como en el caso de Nedd4-2, la interacción entre USP36 y TrkA que hemos descrito dependía de la activación de TrkA. Para ello, se realizó un ensayo de interacción en células HEK-293 co-transfectadas con pCDNA-FLAG-HA-USP36 y con pCDNA-TrkA o pCDNA-TrkA K547R, que es un mutante de TrkA del sitio de unión del ATP, por lo que no tiene actividad tirosina quinasa. Además, se sabe que TrkA está en su forma activa cuando es sobre-expresado en células HEK-293 (Hubbard and Miller, 2007). Se inmunoprecipitó USP36 y se pudo ver que cuando TrkA estaba inactivo (TrkA-K547R) no interactuaba con USP36 (Figura R27A). Por lo tanto, al contrario de lo que sucede con Nedd4-2, USP36 sólo se une a TrkA en su forma activa.

El siguiente punto que quisimos estudiar fue analizar si la interacción entre USP36 y Nedd4-2 era dependiente de la activación de TrkA. Para ello se estimularon células PC12 6/15A con NGF durante distintos tiempos. En este caso, se vio que la interacción entre USP36 y Nedd4-2 era independiente de la activación de TrkA mediada por NGF (Figura R27B). Con todo esto, podemos plantear que USP36 y Nedd4-2 podrían formar un complejo E3 ubiquitina ligasa-desubiquitinasa, como el formado por Nedd4-2 y USP2-45 (Oberfeld et al., 2011).

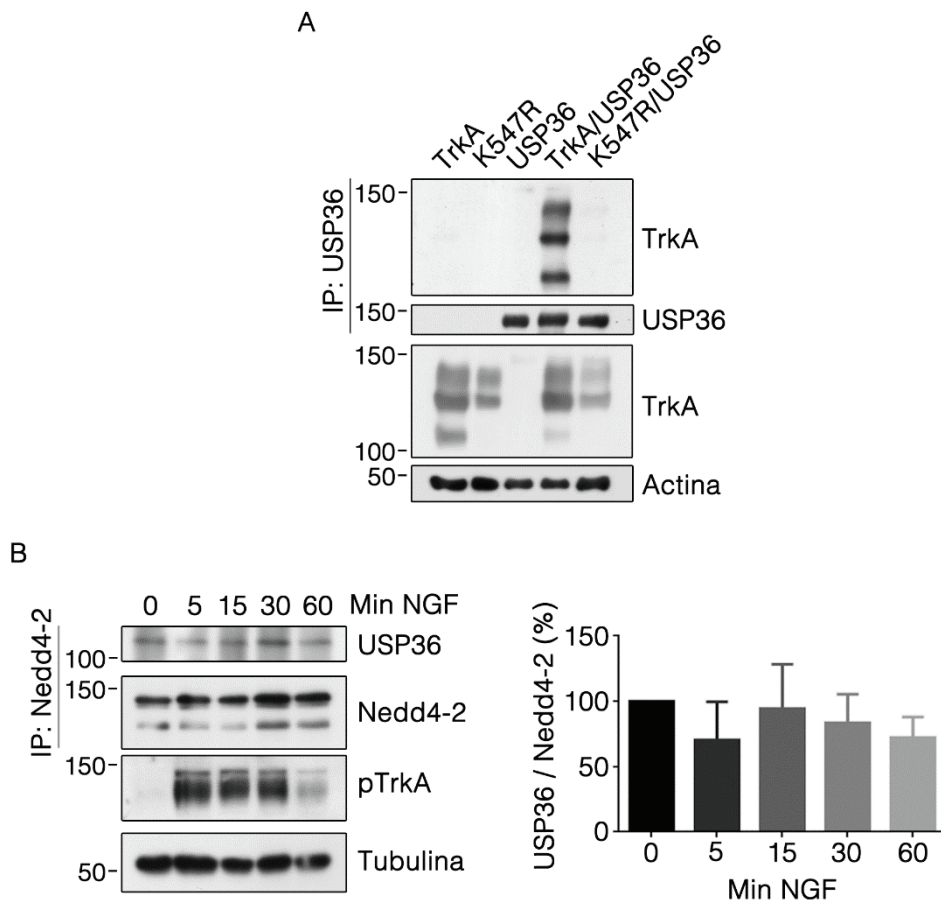


Figura R27. USP36 interacciona con Nedd4-2 independientemente de la activación de TrkA, pero no interacciona con TrkA inactivo. A. Ensayo de interacción de USP36 con TrkA y TrkA K547R (TrkA mutado en el sitio de unión del ATP) en células HEK293 co-transfectadas. Se inmunoprecipitó USP36 usando FLAG-Proteína A-Agarosa y se analizaron los niveles de TrkA que interaccionaban con USP36. **B.** Ensayo de interacción en el que se inmunoprecipita Nedd4-2 de lisados de células PC12 6/15 estimuladas con NGF (100 ng/ml) durante 0, 5, 15, 30 y 60 min y se observaron los niveles de USP36 que se unían a Nedd4-2. La gráfica representa los niveles de USP36 normalizados con Nedd4-2. Se muestra la media de 3 experimentos. Los resultados fueron analizados usando la prueba de *t* de Student de 2 colas.

10. USP36 modula la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2

Los resultados obtenidos anteriormente en los que se observó que los niveles de ubiquitinación de TrkA se veían afectados en presencia de USP36 en células HEK-293 pero no *in vitro*, y que USP36 compite la unión entre TrkA y Nedd4-2, nos sugerían que el efecto de USP36 sobre los niveles de ubiquitinación de TrkA podría estar mediado por Nedd4-2. Para dilucidar este planteamiento, primero se generó un mutante catalítico para USP36 (USP36-C131S), que no posee actividad desubiquitinasa. De ese modo, se podría determinar si la actividad de USP36 afectaba a los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293. Para ello se inmunoprecipitó TrkA de lisados de células HEK-293 co-transfectadas que expresaban TrkA, TrkA /FLAG-HA-USP36 y TrkA/FLAG-HA-USP36-C131S. Se pudo observar que los niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia del mutante catalítico de USP36-C131S eran similares a los que se daba en presencia de USP36 (Figura R28). Por lo tanto, la actividad catalítica de USP36 no era necesaria para la disminución de los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK-293.

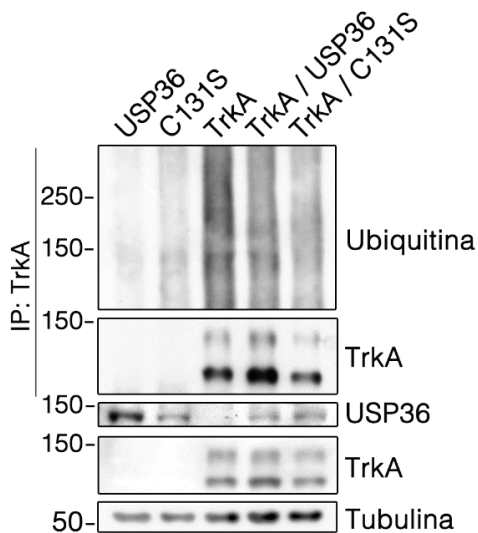


Figura R28. USP36 no necesita su actividad catalítica para regular los niveles de ubiquitinación de TrkA. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP36 o de USP36-C131S, el mutante catalítico inactivo de USP36. Se inmunoprecipitó TrkA de lisados de células HEK-293 que expresaban TrkA y/o USP36 o USP36-C131S. En el panel superior se observan los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4DI.

Lo siguiente que quisimos estudiar fue si se producía una alteración de la ubiquitinación de TrkA reduciendo los niveles de USP36 en células PC12 6/15. Para ello, se inmunoprecipitó TrkA de lisados de células PC12 6/15 infectadas con shRNA Control o shRNA-1 contra USP36 estimuladas a diferentes tiempos con NGF. Se pudo observar

Resultados III

un incremento en los niveles de ubiquitinación de TrkA en las células con USP36 reducido con respecto a las células control (Figura R29). Estos datos nos están confirmando que USP36 modula la ubiquitinación de TrkA.

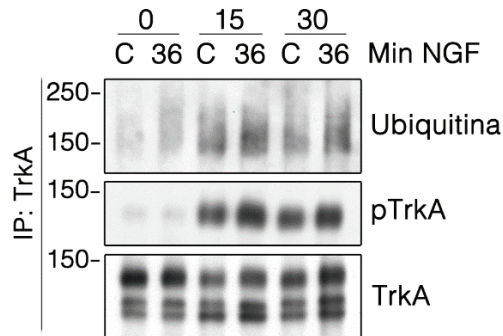


Figura R29. USP36 regula la ubiquitinación de TrkA en respuesta a NGF. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia y ausencia de USP36. Inmunoprecipitación de TrkA usando el anticuerpo 203 (reconoce el dominio citoplasmático de TrkA) de lisados de células PC12 6/15 que han sido infectadas con partículas lentivirales que contenían shRNA Control (C) o shRNA-1 contra USP36 (36) y, además, han sido estimuladas con NGF

(100 ng/ml) durante 15 y 30 minutos. En el panel superior se muestran los niveles de ubiquitinación de TrkA mediante el anticuerpo P4D1.

Para investigar la implicación de USP36 sobre la actividad de Nedd4-2 en la ubiquitinación de TrkA desarrollamos un ensayo en células HEK-293 transfectadas con una cantidad constante de pCDNA-TrkA, pEGFP-Nedd4-2 y cantidades crecientes de pCDNA-FLAG-HA-USP36. Posteriormente, se inmunoprecipitó TrkA y se analizó su ubiquitinación. Se pudo observar que, como se ha descrito previamente (Arévalo et al., 2006b), hay un incremento en los niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de Nedd4-2. Este incremento no se produjo cuando USP36 estaba presente, lo que hace que el nivel de ubiquitinación de TrkA sea similar al que tiene cuando sólo está en presencia de USP36. Además, se observó que la expresión del mutante catalítico inactivo de USP36 (USP36-C131S) tenía el mismo efecto sobre la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2 que la expresión de USP36 silvestre (Figura R30A). Por lo tanto, la presencia de USP36 parece alterar el efecto de Nedd4-2 sobre TrkA, un efecto que es independiente de la actividad de USP36.

Posteriormente, para confirmar estos resultados se desarrolló un ensayo de ubiquitinación *in vitro* en el que se purificó TrkA y USP36 a partir de células HEK-293 transfectadas y se utilizó un fragmento recombinante de Nedd4-2 fusionado a GST que posee la actividad catalítica, constituido por los dominios WW 3 y 4 y el dominio HECT (Arévalo et al., 2006b). Pudimos observar un aumento en la ubiquitinación de TrkA en presencia de Nedd4-2 que no se produjo al tener USP36 presente en la reacción (Figura

R30B). De este modo, podemos decir que los resultados obtenidos tanto en células HEK293 como en condiciones *in vitro* nos indican que USP36, independientemente de su actividad, bloquea la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA.

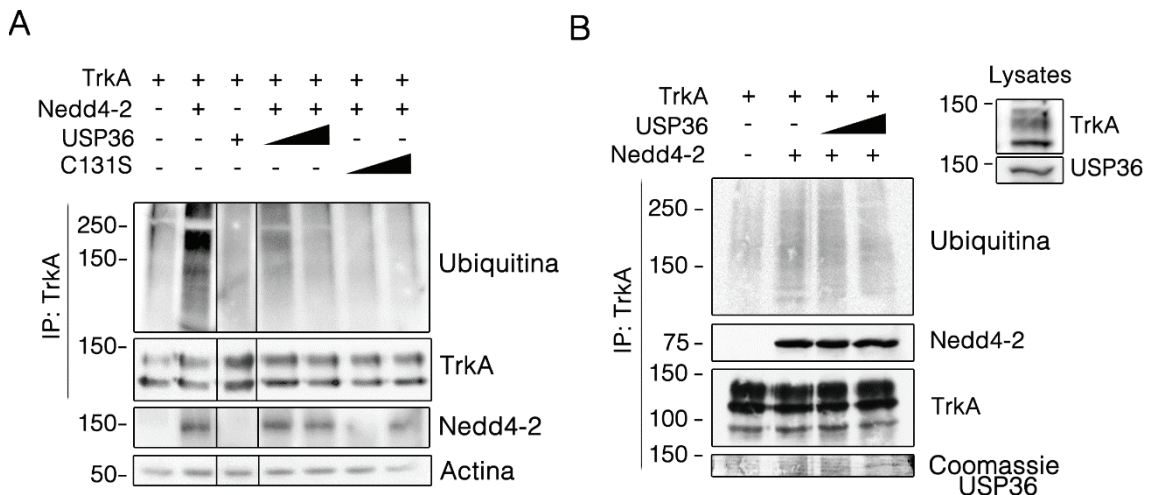


Figura R30. USP36 bloquea la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA. **A.** Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de Nedd4-2 y/o USP36 o USP36-C131S en células HEK-293. Se transfectaron células HEK293 con pCDNA-TrkA y pEGFP-Nedd4-2 constante y cantidades crecientes de pCDNA-FLAG-HA-USP36 o de pCDNA-FLAG-HA-USP36-C131S. Se inmunoprecipitó TrkA con el anticuerpo 203 (contra el dominio citoplasmático de TrkA). En el panel superior se observan los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4D1. **B.** Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de Nedd4-2 y/o USP36 en un ensayo *in vitro*. Se purificó TrkA y USP36 de células HEK-293 transfectadas con pCDNA-TrkA o pCDNA-FLAG-HA-USP36, respectivamente. En un medio apropiado para el ensayo de ubiquitinación *in vitro* se añaden TrkA en cantidad constante, el fragmento recombinante fusionado a GST, WW3/4-HECT, y cantidades crecientes de USP36. En el panel superior se observan los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4D1. En el panel inferior se presenta un gel teñido con Coomassie donde se ven los niveles de USP36.

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que USP36 interacciona con Nedd4-2 (Figura R21) compitiendo con TrkA (apartado 9) y que USP36 modula los niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 (Figura R22A). Por todo esto, quisimos estudiar si la regulación de la ubiquitinación de Nedd4-2 mediada por USP36 afecta a la ubiquitinación de TrkA. Para ello, realizamos un ensayo de ubiquitinación *in vitro* en el que a partir de lisados de células HEK293 transfectadas se purificó TrkA, Nedd4-2 y Nedd4-2 que se había co-transfectado con USP36, por lo que éste último Nedd4-2 estaría menos

Resultados III

ubiquitinado (Nedd4-2*). Posteriormente, se eluyó Nedd4-2 con el péptido que contenía la secuencia del dominio WWI de Nedd4-2 (epítipo de reconocimiento del anticuerpo usado para purificar Nedd4-2). Se incubó TrkA en presencia de Nedd4-2 o de Nedd4-2* en las condiciones adecuadas para que la reacción de ubiquitinación se desarrollase. Los resultados obtenidos mostraron que TrkA estaba menos ubiquitinado en presencia de Nedd4-2* que en presencia de Nedd4-2 (Figura R31). Por lo tanto, podemos decir que la reducción de la ubiquitinación de Nedd4-2 mediada por USP36 podría bloquear la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA en un sistema *in vitro*.

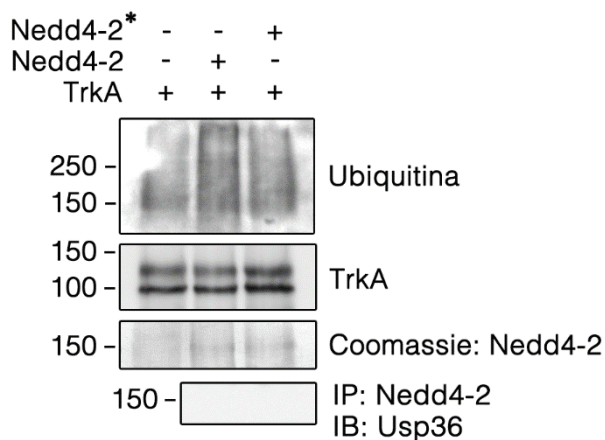


Figura R31. La ubiquitinación de Nedd4-2, regulada por USP36, controla su actividad *in vitro* sobre TrkA. Niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de Nedd4-2 o de Nedd4-2* en un ensayo *in vitro*. Se purificaron TrkA, Nedd4-2 y Nedd4-2* de células HEK293 transfectadas con pCDNA-TrkA, con pEGFP-Nedd4-2 y con pEGFP-Nedd4-2/pCDNA-FLAG-HA-USP36. En un medio apropiado para el ensayo de ubiquitinación *in vitro* se añadió TrkA en presencia de Nedd4-2 o Nedd4-2*.

En el panel superior se observan los niveles de ubiquitinación de TrkA con el anticuerpo P4D1. En el panel inferior se presenta un Western blot de la inmunoprecipitación de Nedd4-2 donde se ve que USP36 no ha inmunoprecipitado junto a Nedd4-2.

11. USP36 afecta a los niveles de TrkA de la membrana plasmática.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio atribuyen a Nedd4-2 un papel importante en el reciclaje de TrkA en neuronas de los ganglios de raquídeos (DRGs). En ausencia de Nedd4-2, los niveles de TrkA en membrana plasmática y en endosomas de reciclaje después de estimular con NGF durante 60 y 30 minutos, respectivamente, se ven incrementados con respecto a una situación control (Yu et al., 2011, 2014). Por ello, según los resultados obtenidos en los que USP36 podría ser un regulador de la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2, nos planteamos estudiar si USP36 estaba implicada en la regulación de los niveles de TrkA en la membrana plasmática. Para ello realizamos un ensayo de biotinización en el que células PC12 6/15 control o con

niveles de USP36 reducidos que se estimularon durante 0, 15 y 60 min y después se marcaron las proteínas de la membrana plasmática con Sulfo-NHS-SS-Biotina. Todas las proteínas marcadas se purificaron mediante el uso de neutroavidina unida a agarosa (Figura R32A). Se analizaron los niveles de TrkA de la condición control, donde se observó un descenso según aumentaba el tiempo de estímulo. Sin embargo, en células con USP36 reducido se observó que cuando las células no estaban estimuladas tenían un 50% más de TrkA en membrana y, una vez estimuladas, la cantidad de TrkA en membrana fue disminuyendo según se aumentaba el tiempo de estímulo, hasta llegar a igualarse a la condición control a los 60 minutos (Figura R32B). Estos resultados nos indican que USP36 está ejerciendo un papel importante en la incorporación de TrkA en la membrana en condiciones basales ya que cuando se silencia USP36, TrkA se acumula en la membrana plasmática y una vez que TrkA es activado, los niveles de TrkA disminuyen hasta llegar a normalizarse.

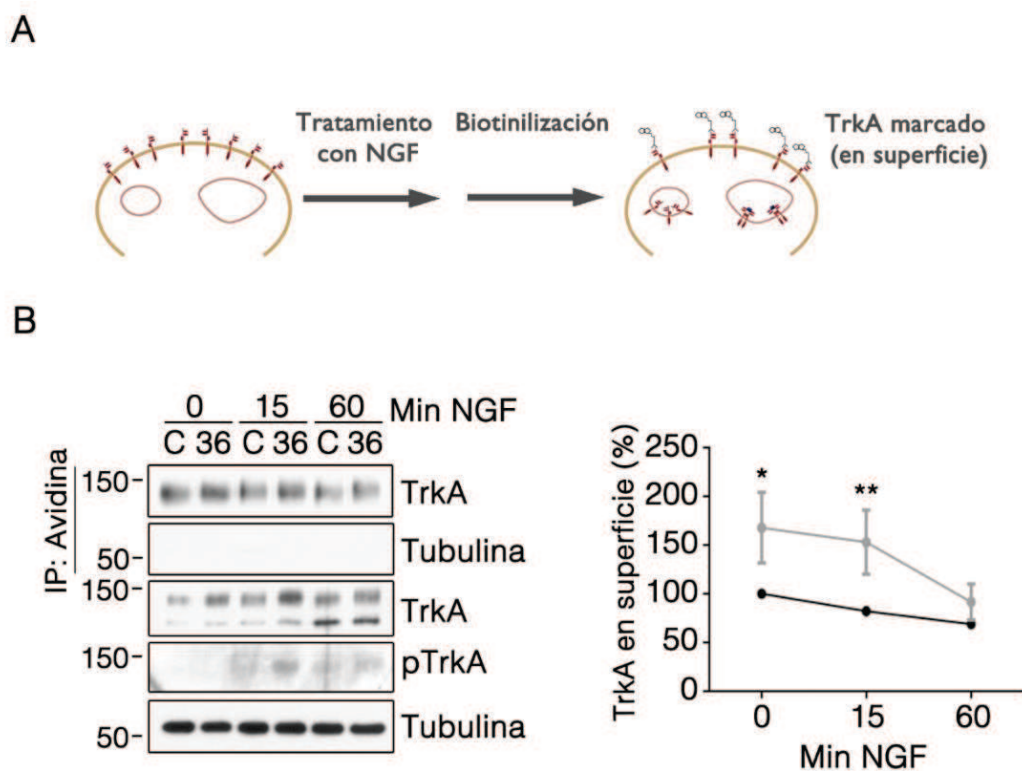


Figura R32. Incremento de TrkA en superficie en células con USP36 reducido. A. Esquema que representa el ensayo de biotilización de proteínas de la membrana plasmática en respuesta a NGF. **B.** Las células PC12 6/15 infectadas con partículas lentivirales con shRNA Control (C) y shRNA-I contra USP36 (36) se estimularon con NGF (100 ng/ml) durante 15 y 60 minutos. En el panel de la izquierda se muestra un Western blot que representa los niveles de TrkA y pTrkA (TrkA activo). Los niveles de

tubulina se usaron como control de carga y como control negativo de que las que no había proteínas intra-celulares biotiniladas. En el panel de la derecha se muestra la cuantificación del Trk que se encontraba en la superficie celular. La gráfica representa la media de tres experimentos representativos \pm s.e.m. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student de 2 colas: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

12. USP36 no afecta a la diferenciación de células PC12 6/15 inducida por NGF

Los resultados obtenidos hasta ahora nos muestran que el efecto de USP36 sobre TrkA esta mediado por Nedd4-2 y que después de un estímulo con NGF este efecto desaparece a los 60 minutos. Teniendo en cuenta que una de las principales funciones mediadas por NGF a través del receptor TrkA es la diferenciación neuronal (Korsching and Thoenen, 1985) y que esta función es debida a un estímulo prolongado de NGF (Jullien et al., 2003), quisimos comprobar si esta función se ve afectada por la reducción de los niveles de USP36. Para ello, células partículas lentivirales expresando shRNA Control o shRNA-I contra USP36 estuvieron en presencia de NGF (100ng/ml) y se hicieron fotos con el microscopio de epifluorescencia. Se cuantificaron las células infectadas que sobreexpresaban GFP y se consideró que las células diferenciadas poseían una de sus neuritas con una longitud dos veces superior al diámetro su soma. Los datos obtenidos nos mostraban que el tanto por ciento de células diferenciadas con respecto al total de células infectadas era similar en células con USP36 reducido y en células control (Figura R33). Por lo tanto, confirmamos que el efecto indirecto de USP36 sobre TrkA no se mantiene el suficiente tiempo como para que se vea afectada la diferenciación de células PC12 6/15 mediada por NGF.

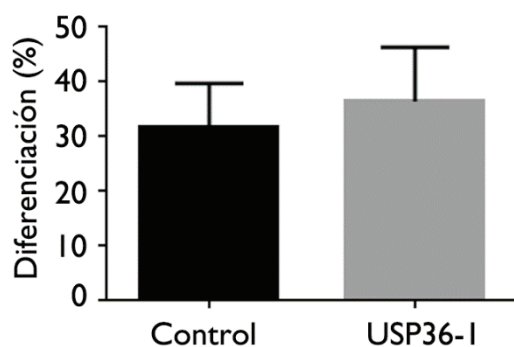


Figura R33. La ausencia de USP36 no afecta a la diferenciación mediada por NGF en células PC12 6/15. Gráfica que representa la cuantificación de los niveles de diferenciación a 48 horas de células PC12 6/15 en presencia de NGF. Se muestra la media de los resultados de 3 experimentos independientes con un total de 998 células contadas en el grupo control y 1110 células

en el grupo donde se redujo los niveles de USP36. Control: shRNA Control; USP36-I: shRNA-I contra USP36.

Discusión

NGF y su receptor TrkA están implicados en el desarrollo, mantenimiento, supervivencia y diferenciación de neuronas del SNC y del SNP (Huang and Reichardt, 2003). Estas funciones son reguladas mediante modificaciones post-traduccionales como son la fosforilación y la ubiquitinación. Se han descrito varias enzimas E3 ubiquitina ligasas, entre las que se encuentran TRAF6, Nedd4-2 y c-Cbl, que están implicadas en la ubiquitinación de TrkA regulando su señalización y su tráfico endosomal (Geetha et al., 2005a; Arévalo et al., 2006; Georgieva et al., 2011; Yu, 2011; Yu et al. 2014; Takahashi et al., 2011). En respuesta a la unión de NGF, TrkA es internalizado en endosomas que, posteriormente, se fusionaran a endosomas tempranos, desde donde el receptor TrkA activado y ubiquitinado puede volver a la membrana plasmática mediante un proceso de reciclaje o continuar hacia su degradación lisosomal. En ambos casos, las DUBs juegan un papel fundamental, ya que el receptor debe ser desubiquitinado antes de continuar por cualquiera de los dos procesos mencionados (Clague & Urbé, 2006). De este modo, las DUBs funcionan como mecanismos de regulación de la señal de los receptores activos. Hasta la fecha, se ha descrito la implicación de CYLD en la modulación de la ubiquitinación de TrkA dependiente de NGF (Geetha et al., 2005b). Este resultado, muestra al adaptador p62 como una pieza imprescindible para la formación del complejo formado entre CYLD y TRAF6, necesario para la actividad desubiquitinasa de CYLD y E3 ubiquitina ligasa de TRAF6, entre otros sustratos, sobre TrkA (Wooten et al., 2008).

En este trabajo de tesis quisimos determinar que DUBs estaban directamente implicadas en la regulación del tráfico endosomal de TrkA mediante el desarrollo de un ensayo de identificación de DUBs. Para ello, hemos utilizado un kit basado en la tecnología del siRNA (Duex JE. et al., 2009) compuesto por cuatro siRNAs diferentes para cada DUB, lo que nos garantizó una alta eficacia de silenciamiento. Como modelo celular se utilizaron células PC12 6/15 que proceden de un clon estable de células PC12 que sobre-expresa TrkA (Hempstead et al., 1992), por lo que el efecto en la regulación de TrkA que observaríamos por la caída de la expresión de las DUBs implicadas sería más drástico.

Discusión

El ensayo de identificación de DUBs mediante el uso de siRNA se planteó para identificar, entre múltiples DUBs, las que afectaran a la cinética de TrkA de una forma concreta, para lo que se mantuvieron las condiciones más homogéneas posibles en todo el conjunto de muestras y, además, se aseguró el máximo silenciamiento mediante el uso de cuatro siRNAs para cada DUB. Los resultados obtenidos nos aportaron mucha información que fue difícil de analizar: 1) no se pudo discernir el nivel concreto en el que cada DUB podía actuar sobre la cinética de TrkA, 2) ni si la DUB en estudio tenía un efecto directo o indirecto sobre TrkA, ya que esa DUB podría actuar sobre otra proteína que modulase los niveles de ubiquitinación de TrkA, 3) y, tampoco, si la DUB en estudio podía tener diferentes sustratos afectando a funciones importantes de la célula, lo que promovería la alteración de las células y con ello la cinética de TrkA, llevándonos todo ello a la obtención de falsos positivos.

Para disminuir la obtención de falsos positivos, realizamos un análisis en el que nos centramos en unos parámetros concretos que nos mostraran DUBs que estuvieran implicadas en el reciclaje de TrkA. Por ello, se optó por realizar un único estímulo con NGF durante 10 minutos con el que provocamos la internalización de TrkA de la membrana plasmática. Posteriormente, se recogieron muestras a 15 minutos, momento en el que TrkA se encuentra en el tráfico endosomal (Tjelle et al., 1996), y a 60 minutos, momento en el que se inicia la degradación de TrkA (Chen et al., 2005) (Figura R1). De ese modo, cuando se disminuyó la expresión de las DUBs que actúan sobre la regulación del reciclaje de TrkA, se observó una mayor degradación del receptor, por lo que había menos pTrkA, es decir, provocaban una mayor disminución de los niveles de pTrkA a 60 minutos que en la situación control. Los resultados obtenidos mostraron una gran variedad de cinéticas, ya que el silenciamiento de cada DUB alteraba los niveles de pTrkA de un modo diferente (Figura R4). Para un mejor análisis de los resultados, se obtuvieron las diferencias de los niveles de pTrkA entre 15 y 60 minutos para cada DUB (Figura R5B) y se optó por seleccionar aquellas DUBs cuya diferencia de pTrkA entre 15 y 60 minutos superaba a la del control (Figura R6A). De las 54 DUBs analizadas USP3, USP8, USPI I, USP36, USP49, PMSD14 y FBXO8 superaron al control, continuándose con el estudio de USP8 y USP36.

El paso siguiente fue validar los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs. Para ello, se generaron partículas lentivirales que expresaban secuencias de shRNA para el silenciamiento de las DUBs de interés. Para el desarrollo de shRNA contra USP8, al no conseguir una reducción adecuada con los shRNAs individuales procedentes del siRNA del ensayo de identificación, se optó por diseñar una secuencia que demostrase una mayor eficiencia en la reducción de la expresión de USP8. Se consideró que esta menor eficacia era debida al uso de las secuencias de siRNAs por separado, no como en el ensayo de identificación que se utilizaban los cuatro a la vez. Posteriormente, se confirmó la eficacia del shRNA-5 contra USP8 por RT-PCR (Figura R7A) y por WB (datos no mostrados). Finalmente, aunque USP8 interactuaba y desubiquitinaba TrkA, lo que promovía un incremento de los niveles de TrkA (Figura R8A, R9, R10 y R11), y estaba implicado en la diferenciación de células PC12 6/15 (Figura 12), los resultados obtenidos en la validación mostraron que la caída de la expresión de USP8 no afectaba a los niveles de pTrkA de forma clara (Figura 7B). Por lo tanto, concluimos que USP8 no se ajustaba a nuestro patrón preestablecido, ya que estábamos buscando un tipo concreto de DUBs que afectase a TrkA en el reciclaje a tiempos cortos. Sin embargo, un resultado que nos llamó la atención fue la marcada interacción entre USP8 y TrkB, por lo que se realizaron experimentos preliminares en células de corteza cerebral que sugirieron que USP8 podría ser un componente importante en la regulación del TrkB en la membrana plasmática (datos no mostrados). Estos resultados han sido el inicio de una nueva línea de investigación que en la actualidad se está desarrollando en nuestro laboratorio.

Para la validación de los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs se generaron partículas lentivirales que expresaban shRNAs contra USP36 a partir de las cuatro secuencias de siRNAs que se utilizaron en el ensayo de identificación de DUBs. Sólo en el caso de shRNA-1 contra USP36 se observó una caída clara de la expresión de USP36 (Figura R13A). En el caso de la validación de USP36, se pudieron confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de identificación de DUBs (Figura R13B), es decir, que la diferencia existente en los niveles de pTrkA entre 15 y 60 minutos era superior cuando se reducían los niveles de USP36 que en la condición control. Sin embargo, esta diferencia era debida a un incremento de los niveles de pTrkA a 15 minutos cuando los

Discusión

niveles de USP36 estaban reducidos y no por su descenso a 60 minutos, cómo nos habíamos planteado en el ensayo de identificación de DUBs. Además, la cinética de activación de TrkA a diferentes tiempos mostraba más cantidad de pTrkA en células con USP36 reducido que en las células control. Esta diferencia fue desapareciendo hasta que a 60 minutos los niveles de pTrkA de células USP36 con reducido eran similares a los de las células control. Las variaciones de pTrkA se correlacionaron con los niveles de TrkA total, mostrándonos que USP36 afecta a los niveles de TrkA totales e indirectamente a los de pTrkA y, por tanto, a sus rutas de señalización mediadas por MAPK y por Akt, observándose un efecto más drástico en Akt (Figura R13B).

Akt es un componente de una de las rutas de señalización que llevan a supervivencia celular (Zhang et al., 2000). Por ello, desarrollamos experimentos de muerte celular en neuronas de DRG, dependientes de NGF para su supervivencia, en los que vimos que en ausencia de NGF las células entraban en apoptosis independientemente de la presencia o ausencia de USP36 (datos no mostrados). Esto pudo ser debido a que el efecto de USP36 sobre TrkA se producía a tiempos cortos, normalizándose a 60 minutos.

USP36 es una proteína que se ha localizado en el nucléolo (Endo et al., 2009b) y en las mitocondrias (Kim et al., 2011). Además, mediante el uso de programas bioinformáticos, se ha identificado a USP36 como una proteína que podría encontrarse en el citoesqueleto (Kim et al., 2005). Nosotros hemos descrito mediante fraccionamiento subcelular e inmunofluorescencia, utilizando dos anticuerpos diferentes, que USP36 se encuentra en el nucléolo y fuera del núcleo de células PC12 6/15 (Figura R19). Además hemos podido observar que USP36 y TrkA co-localizan fuera del núcleo en células PC12 6/15 (Figura R20). También hemos confirmado que USP36 interacciona con TrkA (Figura R19), lo que promueve la disminución de los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK293 co-transfectadas (Figura R16), pero no sucedía lo mismo en ensayos *in vitro* (Figura R17). Por lo tanto, los resultados obtenidos hasta ese momento nos sugirieron que USP36 disminuye indirectamente los niveles de ubiquitinación de TrkA.

Como hemos mencionado en la introducción, la formación de complejos E3 ubiquitina ligasa/DUB (E3/DUB), que actúan recíprocamente para ejercer un control más fino

sobre sus sustratos, está muy establecida (Komada 2009). Por todo esto, decidimos continuar nuestro trabajo por esta nueva línea. Para ello, tuvimos en cuenta estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que se describe a la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2 como una proteína que ubiquitina a TrkA (Arévalo et al., 2006b; Yu et al., 2011, 2014) y decidimos comprobar si Nedd4-2 participaba en la acción de USP36 sobre TrkA. Para ello, analizamos cómo era la relación existente entre USP36 y Nedd4-2 y observamos que USP36 y Nedd4-2 interaccionan, lo que promovía la alteración de los niveles de ubiquitinación de cada una de ellas (Figura R R21, R22, R23 y R24). Esto afectó a los niveles de USP36 pero no a los de Nedd4-2, siendo la acción de Nedd4-2 sobre los niveles de USP36 dependiente de la actividad catalítica de Nedd4-2. Esto nos indujo a pensar que el efecto de USP36 sobre Nedd4-2 podría ser modular la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA. Por lo tanto, el siguiente paso a seguir fue dilucidar el mecanismo de acción entre USP36 y Nedd4-2 para modular la ubiquitinación de TrkA. Para ello, la primera pregunta que nos planteamos fue: ¿bloquea USP36 la unión de Nedd4-2 con TrkA mediante la competición por el sitio de unión a Nedd4-2? Para contestar esta pregunta lo primero que estudiamos fue determinar los dominios de Nedd4-2 a los que se unía USP36. Arévalo y colaboradores describieron que TrkA se unía principalmente a los dominios WW 3 y 4 de Nedd4-2, los más cercanos al sitio catalítico (Arévalo et al., 2006b). Realizando el mismo ensayo, hemos determinado que USP36 se une a los dominios WW1, 3 y 4, por lo que podría darse una competencia entre TrkA y USP36 por la unión con Nedd4-2 (Figura R25). Para corroborar estos indicios, estudiamos si USP36 interfería en la interacción entre TrkA y Nedd4-2 en células PC12 6/15 a las que se les había reducido los niveles USP36. De este modo observamos que TrkA y Nedd4-2 se unen más en ausencia de USP36 (Figura R26).

Todo esto nos llevó a pensar si esta relación tripartita podría estar regulada por la activación de TrkA mediada por su unión a NGF. Estudios previos demostraron que Nedd4-2 tiene preferencia por TrkA inactivo, uniéndose al motivo PPXY que contiene la tirosina 785 sin fosforilar, tirosina que se fosforila cuando TrkA se activa (Arévalo et al., 2006b). En este trabajo hemos descrito que USP36 se une a TrkA activo, en células HEK293, pero no al TrkA inactivo (Figura R27A). Además, hemos podido comprobar que la interacción entre USP36 y Nedd4-2 es independiente de la activación de TrkA

mediada por NGF (Figura R27B). De este modo, podríamos decir que Nedd4-2 y USP36 podrían estar formando un complejo E3/DUB cuya conformación podría variar dependiendo de la activación de TrkA, permitiendo, de ese modo, que TrkA inactivo interaccione con Nedd4-2 y TrkA activo interaccione con USP36. Se ha descrito que Nedd4-2 tiene dos conformaciones estructurales, la inactiva, en la que sus dominios WW y C2 interaccionan con su dominio catalítico HECT, y la activa, en la que sus dominios WW, C2 y el dominio catalítico están libres cuando Nedd4-2 se pone en contacto con su sustrato (Cui and Zhang, 2013). Además, en la conformación activa el dominio C2 une Ca^{2+} , lo que provoca la unión de Nedd4-2 a la membrana provocando un cambio conformacional que no permite la unión entre los dominios C2 y HECT (Wang et al., 2010). En el dominio HECT se encuentra un dominio de unión PY con el que Nedd4-2 es reconocido como sustrato de otra molécula vecina de Nedd4-2, mono-ubiquitinando el sitio catalítico de la primera (Cui, Zhi 2013). Por todo esto, planteamos que USP36 al interactuar con los dominios WW3 y 4 podría estar ejerciendo un control de la actividad de Nedd4-2 inactivo/plegado manteniendo su conformación plegada, ya que USP36 también interactúa con el dominio WW1 (Figura R25). De este modo, USP36 podría estar actuando como protector de la ubiquitinación de Nedd4-2, pero, una vez que Nedd4-2 es activado/desplegado, éste actuaría sobre USP36 poli-ubiquitinándolo y llevándolo a degradación (Figura R24). En todo este mecanismo, ¿cuál es el lugar de TrkA? Como hemos mencionado anteriormente, una vez que NGF se une a TrkA se activan una serie de cascadas de señalización que incluyen la de Akt. Estudios previos han descrito que Akt fosforila a Nedd4-2 (Dieter et al., 2004; Lee et al., 2007), lo que conlleva a la unión de la proteína 14-3-3 a Nedd4-2 prolongando esta fosforilación y, con ello, la inactividad de Nedd4-2 (Chandran et al., 2011; Yang and Kumar, 2010b). Por ello, podríamos decir que la activación de TrkA promueve la activación de Akt que fosforilará a Nedd4-2 desencadenando su inactivación/plegamiento.

Pero, ¿cómo se vería afectada la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2 con la presencia de USP36? Para responder a esta pregunta lo primero que hicimos fue generar un mutante catalítico de USP36 (USP36-C131S) con el que pudimos descartar que la actividad catalítica de USP36 afectase a la ubiquitinación de TrkA (Figura R28).

Además, pudimos demostrar que en células PC12 6/15 con USP36 reducido, TrkA estaba más ubiquitinado (Figura R29). Ambas aproximaciones nos indicaron que USP36 bloquea la ubiquitinación de TrkA. Pero, para saber que sucede de forma más específica, lo que hicimos fue observar cómo eran los niveles de ubiquitinación de TrkA en presencia de USP36 y de Nedd4-2. De ese modo, pudimos confirmar que el incremento de los niveles de ubiquitinación de TrkA mediados por la actividad de Nedd4-2 era bloqueado por la presencia de USP36 silvestre, tanto en células HEK-293 co-transfectadas como *in vitro*, y por la presencia del mutante inactivo de USP36, en células HEK-293 (Figura R30). Con todo esto, podemos afirmar que, independientemente de su actividad catalítica, USP36 modula los niveles de ubiquitinación de TrkA mediante el bloqueo de Nedd4-2.

Pero, ¿modula USP36 la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA mediante la regulación de la ubiquitinación de Nedd4-2? Los resultados obtenidos en este trabajo, nos sugieren que USP36 disminuía los niveles de ubiquitinación de Nedd4-2 sin afectar a su estabilidad (Figura R22). Como ya hemos mencionado anteriormente, Nedd4-2 ubiquitina su sustrato y después se auto-ubiquitina en el dominio HECT (Bruce et al., 2008), mecanismo que no se da cuando Nedd4-2 está en su conformación inactiva/plegada (Cui and Zhang, 2013), lo que hace que Nedd4-2 esté menos ubiquitinado. USP36 podría estar actuando como un bloqueo de la actividad de Nedd4-2, manteniendo su conformación plegada. Por ello, nosotros quisimos estudiar si la acción de USP36 sobre la ubiquitinación de Nedd4-2 podría afectar a la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA mediante un experimento *in vitro*. En este experimento se observó que cuando Nedd4-2 había estado en presencia de USP36, disminuía su actividad catalítica sobre TrkA (Figura R31), lo que nos confirmó que USP36 podría regular la actividad de Nedd4-2 mediante la regulación indirecta de su ubiquitinación.

Con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nosotros estamos describiendo un posible mecanismo de acción de USP36 sobre la ubiquitinación de TrkA mediada por Nedd4-2, en el que USP36, independientemente de su actividad catalítica, actúa sobre la unión de Nedd4-2 y TrkA y también sobre la ubiquitinación de Nedd4-2, lo que promueve el bloqueo de la actividad de Nedd4-2 sobre TrkA. Este mecanismo podría estar regulado por la activación/ inactivación de TrkA dependiente de NGF, en el que:

Discusión

1) en presencia de NGF, USP36 y TrkA estarían unidos y Nedd4-2 estaría inactivo/plegado y unido a USP36 y 2) en ausencia de NGF, Nedd4-2 estaría activo/desplegado pudiendo degradar a USP36 que se encontraba unido a TrkA y así poder actuar sobre TrkA.

Finalmente, quisimos ver qué implicaciones podía tener la regulación de la ubiquitinación de TrkA mediada por USP36. Resultados previos, obtenidos en nuestro laboratorio, demostraron que neuronas de DRGs con los niveles de Nedd4-2 reducidos tienen los niveles de TrkA incrementados con respecto a DRGs control, lo que es debido al incremento del reciclaje y a una menor degradación del receptor (Yu T, 2011; Yu T y Calvo L 2014). Por ello, nosotros estudiamos cómo se veían afectados los niveles de TrkA en la membrana plasmática de células PC12 6/15 con USP36 reducido, pudiendo comprobar que los niveles de TrkA en ausencia de USP36 están incrementados en la membrana plasmática en condiciones basales, pero una vez que las células se estimulan con NGF, los niveles se van reduciendo hasta que a 60 minutos se igualan a los observados en el control (Figura 32). Estos resultados nos indican que USP36 podría estar ejerciendo un papel importante en la incorporación de TrkA en la membrana plasmática. Además, resultados preliminares no mostrados, nos indican que USP36 no interviene en la degradación de TrkA después de ser estimulado, pudiendo descartarse que el acúmulo de TrkA sea debido a la pérdida de degradación. Arévalo y colaboradores, mostraron que Nedd4-2 se fosforila en Ser/Thr cuando células PC12 6/15 se estimulan con NGF, lo que conlleva a la disminución de los niveles de Nedd4-2 fosforilada hasta que a 60 minutos desaparece (Arevalo 2006). Este patrón es similar al que hemos observado en los niveles de pTrkA y los de TrkA de la membrana plasmática cuando estimulamos células PC12 6/15 con USP36 reducido (Figura 13). Además, TrkA presente en la membrana plasmática y TrkA activo se incrementan gradualmente después de estimular neuronas con Nedd4-2 reducido (Yu 2011). Por lo tanto, podríamos decir que a tiempos cortos de estímulo USP36 podría estar actuando sobre Nedd4-2 fosforilado/inactivo/plegado, modulando los niveles de TrkA en la membrana.

Todos los resultados obtenidos hasta ahora, nos han mostrado un efecto indirecto de USP36 sobre TrkA a tiempos cortos. Por ello quisimos analizar si los niveles reducidos de USP36 afectaban a funciones importantes de TrkA en las que es necesaria la

activación prolongada de TrkA, como es el caso de la diferenciación celular. Los resultados obtenidos en la diferenciación de células PC12 6/15 inducida por NGF, no nos mostraron diferencias entre células con USP36 reducido y las células control (Figura R33). De ese modo, pudimos descartar un efecto de USP36 en la activación prolongada de TrkA.

Con todo esto podríamos estar ante una posible regulación de los niveles TrkA de membrana mediada por un complejo E3/DUBs, en el que después de un estímulo de NGF, USP36 mantendría a Nedd4-2 inactiva y, cuando TrkA se incorpora al tráfico endosomal, Nedd4-2 se desfosforilaría y se activaría para, posteriormente, ubiquitinar a USP36, para degradarlo, y a TrkA, para regular su tráfico endosomal. De ese modo, USP36 podría estar actuando a tiempos cortos de estímulo con NGF y Nedd4-2 a tiempos más largos.

Conclusiones

1. La realización de un ensayo de identificación de desubiquitinasas que pudieran estar implicadas en la regulación de la cinética del receptor TrkA activo nos ha permitido identificar numerosas desubiquitinasas, de las cuales, se estudiaron USP8 y USP36.
2. USP8 desubiquitina TrkA modulando los niveles de expresión del receptor lo que afecta a la diferenciación de células PC12 6/15 mediada por NGF/TrkA.
3. USP36 modula la ubiquitinación de TrkA en células, aunque los ensayos *in vitro* indican que no desubiquitina el receptor, lo que nos sugirió un efecto indirecto de USP36 sobre TrkA.
4. El mecanismo de acción de USP36 sobre la ubiquitinación de TrkA implica a la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2, de manera que USP36 compite con TrkA por la unión a Nedd4-2. Además, el complejo USP36 y Nedd4-2 afecta a la ubiquitinación de cada una de ellas regulando los niveles de expresión de USP36 y la actividad catalítica de Nedd4-2.
5. La expresión de USP36 regula la señalización de TrkA a tiempos tempranos de estimulación con NGF pero no a tiempos prolongados, por lo que la reducción de los niveles de USP36 no afecta a la diferenciación de las células PC12 6/15.

Bibliografía

- Abella, J. V, and Park, M. (2009). Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E973–84.
- Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J.F., Pratt, J.H., Schild, L., Horisberger, J.D., Rotin, D., and Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J. Clin. Invest.* 103, 667–673.
- Alber, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 205–210.
- Albesa, M., Grilo, L.S., Gavillet, B., and Abriel, H. (2011). Nedd4-2-dependent ubiquitylation and regulation of the cardiac potassium channel hERG1. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 90–98.
- Alwan, H.A.J. (2007). UBPY-dependent deubiquitination as a means to control EGFR signaling. [S.l. : s.n.].
- Alwan, H. a J., and van Leeuwen, J.E.M. (2007). UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 1658–1669.
- Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 189–207.
- Angeletti, R.H., and Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 2417–2420.
- Ardley, H., and Robinson, P. (2005). E3 ubiquitin ligases.
- Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1523–1537.
- Arévalo, J.C., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M. V (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J.* 23, 2358–2368.
- Arévalo, J.C., Pereira, D.B., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M. V (2006a). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 1001–1007.
- Arévalo, J.C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., and Chao, M. V (2006b). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* 50, 549–559.
- Arnett, M.G., Ryals, J.M., and Wright, D.E. (2007). Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain Res.* 1183, 32–42.
- Avvakumov, G. V, Walker, J.R., Xue, S., Finerty, P.J., Mackenzie, F., Newman, E.M., and Dhe-Paganon, S. (2006). Amino-terminal dimerization, NRDPI-rhodanese interaction, and inhibited catalytic domain conformation of the ubiquitin-specific protease 8 (USP8). *J. Biol. Chem.* 281, 38061–38070.
- Babu, J.R., Geetha, T., and Wooten, M.W. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* 94, 192–203.
- Bache, K.G., Slagsvold, T., and Stenmark, H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J.* 23, 2707–2712.
- Ballif, B. a, Cao, Z., Schwartz, D., Carraway, K.L., and Gygi, S.P. (2006). Identification of 14-3-3epsilon substrates from embryonic murine brain. *J. Proteome Res.* 5, 2372–2379.
- Barbacid, M. (1995). Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 442–458.
- Barde, M.B. and Y.-A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919–2937.
- Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., and Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 15150–15157.
- Baykara M, Buyukberber S, Ozturk B, Coskun U, Kaplan MA, Unsal DK, Dane F, Demirci U, Bora H, B.M. (2013). Efficacy and safety of concurrent chemoradiotherapy with cisplatin and docetaxel in patients with locally advanced nasopharyngeal cancers. *Tumori.* 18, 921–927.
- Van Bemmelen, M.X., Rougier, J.-S., Gavillet, B., Apothéloz, F., Daidié, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M.A., Kass, R.S., Staub, O., et al. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ. Res.* 95, 284–291.
- Ben-Zvi, A., Ben-Gigi, L., Klein, H., and Behar, O. (2007). Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning. *J. Neurosci.* 27, 13000–13011.
- Berlin, I., Higginbotham, K.M., Dise, R.S., Sierra, M.I., and Nash, P.D. (2010). The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome. *J. Biol. Chem.* 285, 37895–37908.

Bibliografia

- Berruti, G., Ripolone, M., and Ceriani, M. (2010). USP8, a regulator of endosomal sorting, is involved in mouse acrosome biogenesis through interaction with the spermatid ESCRT-0 complex and microtubules. *Biol. Reprod.* 82, 930–939.
- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G., and Reed, S.I. (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat. Struct. Biol.* 8, 417–422.
- Bilderback, T.R., Gazula, V.-R., Lisanti, M.P., and Dobrowsky, R.T. (1999). Caveolin Interacts with Trk A and p75NTR and Regulates Neurotrophin Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 257–263.
- Blake, T.J., Shapiro, M., Morse, H.C., and Langdon, W.Y. (1991). The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif. *Oncogene* 6, 653–657.
- Boulkroun, S., Ruffieux-Daidié, D., Vitagliano, J.-J., Poirot, O., Charles, R.-P., Lagnaz, D., Firsov, D., Kellenberger, S., and Staub, O. (2008). Vasopressin-inducible ubiquitin-specific protease 10 increases ENaC cell surface expression by deubiquitylating and stabilizing sorting nexin 3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295, F889–900.
- Bradley, J.R., and Pober, J.S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482–6491.
- Bradshaw, R.A., Blundell, T.L., Lapatto, R., McDonald, N.Q., and Murray-Rust, J. (1993). Nerve growth factor revisited. *Trends Biochem. Sci.* 18, 48–52.
- Bremm, A., and Komander, D. (2011). Emerging roles for Lys1-linked polyubiquitin in cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 36, 355–363.
- Bronfman, F.C. (2007). Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J. Neurochem.* 103 Suppl, 91–100.
- Bronfman, F.C., Tcherpakov, M., Jovin, T.M., and Fainzilber, M. (2003). Ligand-Induced Internalization of the p75 Neurotrophin Receptor: A Slow Route to the Signaling Endosome. *J. Neurosci.* 23, 3209–3220.
- Brooks, C.L., Li, M., Hu, M., Shi, Y., and Gu, W. (2007). The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26, 7262–7266.
- Bruce, M.C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O., and Rotin, D. (2008). Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem. J.* 415, 155–163.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 96, 857–868.
- Busch, S.J., and Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* 6, 36–40.
- Buszczak, M., Paterno, S., and Spradling, A.C. (2009). Drosophila stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease scrawny. *Science* 323, 248–251.
- Cai, J., Crotty, T., and Reichert, E. (2010). Diacylglycerol kinase δ and protein kinase C α modulate epidermal growth factor receptor abundance and degradation through ubiquitin-specific protease 8. *J. Biol.*
- Cao, Z., Wu, X., and Yen, L. (2007). Neuregulin-induced ErbB3 downregulation is mediated by a protein stability cascade involving the E3 ubiquitin ligase Nrdp1. *Mol. Cell.*
- Chandran, S., Li, H., Dong, W., Krasinska, K., Adams, C., Alexandrova, L., Chien, A., Hallows, K.R., and Bhalla, V. (2011). Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4-2 (Nedd4-2) regulation by 14-3-3 protein binding at canonical serum and glucocorticoid kinase 1 (SGK1) phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 286, 37830–37840.
- Chao, M. V., and Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.
- Chao, M. V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518–521.
- Chen, C., and Matesic, L.E. (2007). The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 587–604.
- Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G., and Madura, K. (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep.* 2, 933–938.
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Tanowitz, M., and Lee, F.S. (2005). A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol. Biol. Cell* 16, 5761–5772.
- Clague, M., and Urbé, S. (2006). Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol.*

- Clague, M.J., Liu, H., and Urbé, S. (2012). Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Dev. Cell* 23, 457–467.
- Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11133–11137.
- Cochran, S.L., Stone, J.S., Bermingham-McDonogh, O., Akers, S.R., Lefcort, F., and Rubel, E.W. (1999). Ontogenetic expression of trk neurotrophin receptors in the chick auditory system. *J. Comp. Neurol.* 413, 271–288.
- Coppola, V., Barrick, C.A., Southon, E.A., Celeste, A., Wang, K., Chen, B., Haddad, E.-B., Yin, J., Nussenzweig, A., Subramaniam, A., et al. (2004). Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 131, 5185–5195.
- Corbit, K.C., Foster, D.A., and Rosner, M.R. (1999). Protein Kinase C δ Mediates Neurogenic but Not Mitogenic Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Neuronal Cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4209–4218.
- Coussens, L., Parker, P., Rhee, L., Yang-Feng, T., Chen, E., Waterfield, M., Francke, U., and Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* (80-.). 233, 859–866.
- Cui, Z., and Zhang, S. (2013). Regulation of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) channel by Rab4 protein through neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4-2 (Nedd4-2). *J. Biol. Chem.* 288, 21876–21886.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17, 4426–4441.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193–209.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* 103, 351–361.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399–434.
- Dieter, M., Palmada, M., Rajamanickam, J., Aydin, A., Busjahn, A., Boehmer, C., Luft, F.C., and Lang, F. (2004). Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes. Res.* 12, 862–870.
- Dikic, I., and Bremm, A. (2014). DUBs counteract parkin for efficient mitophagy. *EMBO J.* 1–2.
- Dikic, I., Batzer, A.G., Blaikie, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Margolis, B. (1995). Shc Binding to Nerve Growth Factor Receptor Is Mediated by the Phosphotyrosine Interaction Domain. *J. Biol. Chem.* 270, 15125–15129.
- Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 659–671.
- Dougherty, M.K., and Morrison, D.K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J. Cell Sci.* 117, 1875–1884.
- Duex, J., and Sorkin, A. (2009). RNA interference screen identifies Usp18 as a regulator of epidermal growth factor receptor synthesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1833–1844.
- Duncan, L.M., Piper, S., Dodd, R.B., Saville, M.K., Sanderson, C.M., Luzio, J.P., and Lehner, P.J. (2006). Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J.* 25, 1635–1645.
- Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. (2009a). Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J. Cell Sci.* 122, 678–686.
- Endo, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2009b). Nucleophosmin/B23 regulates ubiquitin dynamics in nucleoli by recruiting deubiquitylating enzyme USP36. *J. Biol. Chem.* 284, 27918–27923.
- Ernfors, P., Hallbook, F., Ebendal, T., Shooter, E.M., Radeke, M.J., Misko, T.P., and Persson, H. (1988). Developmental and regional expression of β -nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* 1, 983–996.
- Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L., and Persson, H. (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2, 1605–1613.

Bibliografía

- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., and Persson, H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5, 511–526.
- Faesen, A.C., Luna-Vargas, M.P.A., Geurink, P.P., Clerici, M., Merckx, R., van Dijk, W.J., Hameed, D.S., El Oualid, F., Ovaa, H., and Sixma, T.K. (2011). The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chem. Biol.* 18, 1550–1561.
- Fahnestock, M. (1991). Detection and assay of nerve growth factor mRNA. *Methods Enzymol.* 198, 48–61.
- Fotia, A.B., Ekberg, J., Adams, D.J., Cook, D.I., Poronnik, P., and Kumar, S. (2004). Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 279, 28930–28935.
- Frade, J.M. (2000). NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci.* 23, 591–592.
- Frade, J.M. (2005). Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *J. Neurosci.* 25, 1407–1411.
- Friedman, W.J. (2000). Neurotrophins Induce Death of Hippocampal Neurons via the p75 Receptor. *J. Neurosci.* 20, 6340–6346.
- Friedman, W.J., Ernfors, P., and Persson, H. (1991a). Transient and persistent expression of NT-3/HDNF mRNA in the rat brain during postnatal development. *J. Neurosci.* 11, 1577–1584.
- Friedman, W.J., Olson, L., and Persson, H. (1991b). Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Dev. Brain Res.* 63, 43–51.
- Galan, J.M., and Haguenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16, 5847–5854.
- Gallego-Sánchez, A., Andrés, S., Conde, F., San-Segundo, P. a, and Bueno, A. (2012). Reversal of PCNA Ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 8, e1002826.
- Garty, H., and Benos, D.J. (1988). Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev* 68, 309–373.
- Van der Geer, P., and Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 20, 277–280.
- Geetha, T., Jiang, J., and Wooten, M.W. (2005a). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol. Cell* 20, 301–312.
- Geetha, T., Kenchappa, R.S., Wooten, M.W., and Carter, B.D. (2005b). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J.* 24, 3859–3868.
- Georgieva, M. V, de Pablo, Y., Sanchis, D., Comella, J.X., and Llovera, M. (2011). Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *J. Neurochem.* 117, 479–493.
- Ginty, D.D., Bonni, A., and Greenberg, M.E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77, 713–725.
- Gnesutta, N., Ceriani, M., Innocenti, M., Mauri, I., Zippel, R., Sturani, E., Borgonovo, B., Berruti, G., and Martegani, E. (2001). Cloning and characterization of mouse UBPY, a deubiquitinating enzyme that interacts with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25(Mm)/Ras-GRF1. *J. Biol. Chem.* 276, 39448–39454.
- Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a017459.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.
- Greenawalt, D.M., Sieberts, S.K., Cornelis, M.C., Girman, C.J., Zhong, H., Yang, X., Guinney, J., Qi, L., and Hu, F.B. (2012). Integrating Genetic Association, Genetics of Gene Expression, and Single Nucleotide Polymorphism Set Analysis to Identify Susceptibility Loci for Type 2 Diabetes Mellitus. *Am. J. Epidemiol.*
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2424–2428.
- Guo, J., Wang, T., Li, X., Shallow, H., Yang, T., Li, W., Xu, J., Fridman, M.D., Yang, X., and Zhang, S. (2012). Cell surface expression of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels is regulated by caveolin-3 protein via the ubiquitin ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 287, 33132–33141.

- Hagag, N., Halegoua, S., and Viola, M. (1986). Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 319, 680–682.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2012). The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.* 125, 265–275.
- Haglund, K., Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2007). Aberrant receptor signaling and trafficking as mechanisms in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.* 13, 39–74.
- Hallberg, B., Ashcroft, M., Loeb, D.M., Kaplan, D.R., and Downward, J. (1998). Nerve growth factor induced stimulation of Ras requires Trk interaction with Shc but does not involve phosphoinositide 3-OH kinase. *Oncogene* 17, 691–697.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron* 6, 845–858.
- Harrington, A.W., St Hillaire, C., Zweifel, L.S., Glebova, N.O., Philippidou, P., Halegoua, S., and Ginty, D.D. (2011). Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell* 146, 421–434.
- Harvey, K.F., and Kumar, S. (1999). Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 9, 166–169.
- Hasdemir, B., Murphy, J.E., Cottrell, G.S., and Bunnett, N.W. (2009). Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284, 28453–28466.
- Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. (2003). Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J. Biochem.* 134, 1–8.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M. V (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678–683.
- Hempstead, B.L., Rabin, S.J., Kaplan, L., Reid, S., Parada, L.F., and Kaplan, D.R. (1992). Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* 9, 883–896.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.
- Heyninck, K., and Beyaert, R. (2005). A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem. Sci.* 30, 1–4.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195–201.
- Hofmann, R.M., and Pickart, C.M. (1999). Noncanonical MMS2-Encoded Ubiquitin-Conjugating Enzyme Functions in Assembly of Novel Polyubiquitin Chains for DNA Repair. *Cell* 96, 645–653.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emler, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12419–12424.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193–197.
- Holtzman, D.M., Li, Y., Parada, L.F., Kinsman, S., Chen, C.-K., Valletta, J.S., Zhou, J., Long, J.B., and Mobley, W.C. (1992). p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: Evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* 9, 465–478.
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.-W., Gu, W., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2002). Crystal Structure of a UBP-Family Deubiquitinating Enzyme in Isolation and in Complex with Ubiquitin Aldehyde. *Cell* 111, 1041–1054.
- Hu, M., Li, P., Song, L., Jeffrey, P.D., Chenova, T.A., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J.* 24, 3747–3756.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.
- Huang, E.J., Wilkinson, G.A., Fariñas, I., Backus, C., Zang, K., Wong, S.L., and Reichardt, L.F. (1999). Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development* 126, 2191–2203.

Bibliografía

- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell* 21, 737–748.
- Hubbard, S.R., and Miller, W.T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 117–123.
- Ikeda, M., and Longnecker, R. (2009). The c-Cbl proto-oncoprotein downregulates EBV LMP2A signaling. *Virology* 385, 183–191.
- Ikeda, F., Crosetto, N., and Dikic, I. (2010). What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell* 143, 677–681.
- Ingham, R.J., Gish, G., and Pawson, T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972–1984.
- Inoue, K., Akita, N., Yamashita, S., Shiba, T., and Fujita, T. (1990). Constitutive and inducible expression of a transgene directed by heterologous promoters in a trout liver cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1311–1316.
- Jespersen, T., Membrez, M., Nicolas, C.S., Pitard, B., Staub, O., Olesen, S.-P., Baró, I., and Abriel, H. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc. Res.* 74, 64–74.
- Jullien, J., Guili, V., Derrington, E.A., Darlix, J.-L., Reichardt, L.F., and Rudkin, B.B. (2003). Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 8706–8716.
- Jundi, M., Nadiri, A., Al-Zoobi, L., Hassan, G.S., and Mourad, W. (2012). CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. *Immunobiology* 217, 375–383.
- Kalderon, D. (1996). Protein degradation: De-ubiquitinate to decide your fate. *Curr. Biol.* 6, 662–665.
- Kalous, A., Nangle, M.R., Anastasia, A., Hempstead, B.L., and Keast, J.R. (2012). Neurotrophic actions initiated by proNGF in adult sensory neurons may require peri-somatic glia to drive local cleavage to NGF. *J. Neurochem.* 122, 523–536.
- Kamynina, E., Debonneville, C., Hirt, R.P., and Staub, O. (2001). Liddle's syndrome: a novel mouse Nedd4 isoform regulates the activity of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel. *Kidney Int.* 60, 466–471.
- Kanelis, V., Rotin, D., and Forman-Kay, J.D. (2001). Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat. Struct. Biol.* 8, 407–412.
- Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., and Landreth, G.E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18169–18177.
- Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381–391.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L.F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252, 554–558.
- Kasanov, J., Pirozzi, G., Uveges, A.J., and Kay, B.K. (2001). Characterizing Class I WW domains defines key specificity determinants and generates mutant domains with novel specificities. *Chem. Biol.* 8, 231–241.
- Kato, M., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2000). A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX (V/I)(D/N) RXXKP. *J. Biol. Chem.*
- Kawabe, H., and Brose, N. (2011). The role of ubiquitylation in nerve cell development. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 251–268.
- Khursigara, G., Orlinick, J.R., and Chao, M. V. (1999). Association of the p75 Neurotrophin Receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* 274, 2597–2600.
- Kim, M.-S., Kim, Y.-K., Kim, Y.-S., Seong, M., Choi, J.-K., and Baek, K.-H. (2005). Deubiquitinating enzyme USP36 contains the PEST motif and is polyubiquitinated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 797–804.
- Kim, M.-S., Ramakrishna, S., Lim, K.-H., Kim, J.-H., and Baek, K.-H. (2011). Protein stability of mitochondrial superoxide dismutase SOD2 is regulated by USP36. *J. Cell. Biochem.* 112, 498–508.
- Kimura, Y., and Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J. Biochem.* 147, 793–798.
- Kimura, T., Kawabe, H., Jiang, C., Zhang, W., Xiang, Y.-Y., Lu, C., Salter, M.W., Brose, N., Lu, W.-Y., and Rotin, D. (2011). Deletion of the ubiquitin ligase Nedd4L in lung epithelia causes cystic fibrosis-like disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3216–3221.

- Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and Tanaka, K. (2009). An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* 137, 549–559.
- Klein, R., Martin-Zanca, D., Barbacid, M., and Parada, L.F. (1990). Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109, 845–850.
- Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189–197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395–403.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., and Barbacid, M. (1992). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8, 947–956.
- Knight, K.K., Olson, D.R., Zhou, R., and Snyder, P.M. (2006). Liddle's syndrome mutations increase Na⁺ transport through dual effects on epithelial Na⁺ channel surface expression and proteolytic cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2805–2808.
- Knopf, J.L., Lee, M.-H., Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M., and Bell, R.M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491–502.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 937–953.
- Komander, D., Lord, C.J., Scheel, H., Swift, S., Hofmann, K., Ashworth, A., and Barford, D. (2008). The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol. Cell* 29, 451–464.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563.
- Kommaddi, R.P., Thomas, R., Ceni, C., Daigneault, K., and Barker, P.A. (2011). *Trk*-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J.* 25, 2061–2070.
- Korsching, S., and Thoenen, H. (1985). Nerve growth factor supply for sensory neurons: Site of origin and competition with the sympathetic nervous system. *Neurosci. Lett.* 54, 201–205.
- Kovalenko, A., and Chable-bessia, C. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination. 801–805.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.
- Landreth, G.E. (1999). *Growth Factors* (Lippincott-Raven).
- Lee, F.S., and Chao, M. V. (2001). Activation of *Trk* neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3555–3560.
- Lee, I.-H., Dinudom, A., Sanchez-Perez, A., Kumar, S., and Cook, D.I. (2007). Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 282, 29866–29873.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* 6, 1145–1154.
- Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116, 321–361.
- Li, J., Olson, L.M., Zhang, Z., Li, L., Bidder, M., Nguyen, L., Pfeifer, J., and Rader, J.S. (2008). Differential display identifies overexpression of the USP36 gene, encoding a deubiquitinating enzyme, in ovarian cancer. *Int. J. Med. Sci.* 5, 133–142.
- Lomen-Hoerth, C., and Shooter, E.M. (2002). Widespread Neurotrophin Receptor Expression in the Immune System and Other Nonneuronal Rat Tissues. *J. Neurochem.* 64, 1780–1789.
- Lu, C., Pribanic, S., Debonneville, A., Jiang, C., and Rotin, D. (2007). The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic* 8, 1246–1264.
- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M. V., and Hempstead, B.L. (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140*trk* binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 6884–6891.

Bibliografia

- Makkerh, J.P.S., Ceni, C., Auld, D.S., Vaillancourt, F., Dorval, G., and Barker, P.A. (2005). p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep.* 6, 936–941.
- Mao, J.-H., Sun, X.-Y., Liu, J.-X., Zhang, Q.-Y., Liu, P., Huang, Q.-H., Li, K.K., Chen, Q., Chen, Z., and Chen, S.-J. (2010). As4S4 targets RING-type E3 ligase c-CBL to induce degradation of BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21683–21688.
- Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R., and De Luca, M. (1993). Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 268, 22838–22846.
- Markus, A., Zhong, J., and Snider, W.D. (2002). Raf and Akt Mediate Distinct Aspects of Sensory Axon Growth. *Neuron* 35, 65–76.
- Marshall, C. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185.
- Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986a). Molecular Characterization of the Human trk Oncogene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 983–992.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., and Barbacid, M. (1986b). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743–748.
- Martin-Zanca, D., Barbacid, M., and Parada, L.F. (1990). Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.* 4, 683–694.
- Matalon, S., and O’Brodivich, H. (1999). Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 627–661.
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., and Glickman, M.H. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem.* 3, 28.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol.* 16, 160–165.
- McDonald, N.Q., and Hendrickson, W.A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421–424.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., and Blundell, T.L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354, 411–414.
- McKay, S.E., Purcell, A.L., and Carew, T.J. (1999). Regulation of Synaptic Function by Neurotrophic Factors in Vertebrates and Invertebrates: Implications for Development and Learning. *Learn. Mem.* 6, 193–215.
- Meakin, S.O., MacDonald, J.I.S., Gryz, E.A., Kubu, C.J., and Verdi, J.M. (1999). The Signaling Adapter FRS-2 Competes with Shc for Binding to the Nerve Growth Factor Receptor TrkA: A MODEL FOR DISCRIMINATING PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION. *J. Biol. Chem.* 274, 9861–9870.
- Meijer, I.M.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2011). ERBB2 is a target for USP8-mediated deubiquitination. *Cell. Signal.* 23, 458–467.
- Meijer, I.M.J., Kerperien, J., Sotoca, A.M., van Zoelen, E.J.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2013). The Usp8 deubiquitination enzyme is post-translationally modified by tyrosine and serine phosphorylation. *Cell. Signal.* 25, 919–930.
- Meng, W., Sawadkiosol, S., Burakoff, S.J., and Eck, M.J. (1999). Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. *Nature* 398, 84–90.
- Meyer, M., and Rasmussen, J.Z. (1999). [Neuronal growth factors--neurotrophins]. *Ugeskr. Laeger* 161, 2063–2070.
- Mishra, A., Eathiraj, S., Corvera, S., and Lambright, D.G. (2010). Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10866–10871.
- Miyake, S., Lupher, M.L., Druker, B., and Band, H. (1998). The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7927–7932.

- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., and Komada, M. (2005). Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol. Biol. Cell* 16, 5163–5174.
- Mizuno, E., Kobayashi, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2006). A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic* 7, 1017–1031.
- Mizuno, E., Kitamura, N., and Komada, M. (2007). 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Exp. Cell Res.* 313, 3624–3634.
- Mosesson, Y., Mills, G.B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850.
- Mu, Y., Sundar, R., Thakur, N., Ekman, M., Gudey, S.K., Yakymovych, M., Hermansson, A., Dimitriou, H., Bengoechea-Alonso, M.T., Ericsson, J., et al. (2011). TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nat. Commun.* 2, 330.
- Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. (2008). Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.* 121, 1325–1333.
- Namjou, B., Choi, C.-B., Harley, I.T.W., Alarcón-Riquelme, M.E., Kelly, J.A., Glenn, S.B., Ojwang, J.O., Adler, A., Kim, K., Gallant, C.J., et al. (2012). Evaluation of TRAF6 in a large multiethnic lupus cohort. *Arthritis Rheum.* 64, 1960–1969.
- Naviglio, S., Matteucci, C., Matoskova, B., Nagase, T., Nomura, N., Di Fiore, P.P., and Draetta, G.F. (1998). UBPY: a growth-regulated human ubiquitin isopeptidase. *EMBO J.* 17, 3241–3250.
- Niendorf, S., and Oksche, A. (2007). Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol.*
- Niendorf, S., Oksche, A., Kissler, A., Löhler, J., Prinz, M., Schorle, H., Feller, S., Lewitzky, M., Horak, I., and Knobeloch, K.-P. (2007). Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5029–5039.
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P. a, Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773–786.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.
- Oberfeld, B., Ruffieux-Daidié, D., Vitagliano, J.-J., Pos, K.M., Verrey, F., and Staub, O. (2011). Ubiquitin-specific protease 2-45 (Usp2-45) binds to epithelial Na⁺ channel (ENaC)-ubiquitylating enzyme Nedd4-2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301, F189–96.
- Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* 12, 933–941.
- Oh, Y.M., Lee, S.B., Choi, J., Suh, H.-Y., Shim, S., Song, Y.-J., Kim, B., Lee, J.M., Oh, S.J., Jeong, Y., et al. (2014). USP8 modulates ubiquitination of LRIG1 for Met degradation. *Sci. Rep.* 4, 4980.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.
- Park, D.-W., Kim, S.-S., Nam, M.-K., Kim, G.-Y., Kim, J., and Rhim, H. (2011). Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins. *BMB Rep.* 44, 279–284.
- Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280.
- Paul, P.K., Bhatnagar, S., Mishra, V., Srivastava, S., Darnay, B.G., Choi, Y., and Kumar, A. (2012). The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1248–1259.
- Peiró, S., Comella, J.X., Enrich, C., Martín-Zanca, D., and Rocamora, N. (2000). PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 37846–37852.
- Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187–190.
- Pezet, S., and McMahon, S.B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 507–538.

Bibliografía

- Pickart, C.M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 610–616.
- Plant, P.J. (2000). Apical Membrane Targeting of Nedd4 Is Mediated by an Association of Its C2 Domain with Annexin XIIIb. *J. Cell Biol.* 149, 1473–1484.
- Plant, P.J., Yeager, H., Staub, O., Howard, P., and Rotin, D. (1997). The C2 Domain of the Ubiquitin Protein Ligase Nedd4 Mediates Ca²⁺-dependent Plasma Membrane Localization. *J. Biol. Chem.* 272, 32329–32336.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884–888.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 363–397.
- Richardson, L. a, Reed, B.J., Charette, J.M., Freed, E.F., Fredrickson, E.K., Locke, M.N., Baserga, S.J., and Gardner, R.G. (2012). A Conserved Deubiquitinating Enzyme Controls Cell Growth by Regulating RNA Polymerase I Stability. *Cell Rep.* 1–14.
- Rithwick Rajagopal, I, and Zhe-Yu Chen, 2 Francis S. Lee, 2 and Moses V. Chao I (2004). Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by.pdf.
- Rodrigo-Brenni, M.C., and Morgan, D.O. (2007). Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* 130, 127–139.
- Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 398–409.
- Rotin, D., and Staub, O. (2012). Nedd4-2 and the regulation of epithelial sodium transport. *Front. Physiol.* 3, 212.
- Row, P., Prior, I., and McCullough, J. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J. Biol.*
- Row, P.E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M.J., Sanderson, C.M., and Urbé, S. (2007). The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 30929–30937.
- Sandeep Robert Datta,* Henryk Dudek,*§ Xu Tao,* Shane Masters,† Haian Fu,† Yukiko Gotoh, and M.E.G. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455, 358–362.
- Savaskan, E., Müller-Spahn, F., Olivieri, G., Bruttel, S., Otten, U., Rosenberg, C., Hulette, C., and Hock, C. (2000). Alterations in trk A, trk B and trk C receptor immunoreactivities in parietal cortex and cerebellum in Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 44, 172–180.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103, 211–225.
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol. Chem.* 386, 725–737.
- Schrodi, S.J. (2008). Genome-wide association scan in psoriasis: new insights into chronic inflammatory disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 4, 565–571.
- Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., and Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 3905–3910.
- Scott, M.S., Boisvert, F.-M., McDowall, M.D., Lamond, A.I., and Barton, G.J. (2010). Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.* 38, 7388–7399.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 379, 247–250.
- Sévère, N., Dieudonné, F.-X., Marty, C., Modrowski, D., Patiño-García, A., Lecanda, F., Fromigué, O., and Marie, P.J. (2012). Targeting the E3 ubiquitin casitas B-lineage lymphoma decreases osteosarcoma cell growth and survival and reduces tumorigenesis. *J. Bone Miner. Res.* 27, 2108–2117.
- Sévère, N., Dieudonné, F.-X., and Marie, P.J. (2013). E3 ubiquitin ligase-mediated regulation of bone formation and tumorigenesis. *Cell Death Dis.* 4, e463.

- Shao, Y., Akmentin, W., Toledo-Aral, J.J., Rosenbaum, J., Valdez, G., Cabot, J.B., Hilbush, B.S., and Halegoua, S. (2002). Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J. Cell Biol.* 157, 679–691.
- Shearwin-Whyatt, L., Dalton, H.E., Foot, N., and Kumar, S. (2006). Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays* 28, 617–628.
- Shelton, D.L., and Reichardt, L.F. (1986). Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2714–2718.
- Shooter, E.M. (2001). Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 601–629.
- Sigismund, S., Polo, S., and Di Fiore, P.P. (2004). Signaling through monoubiquitination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 286, 149–185.
- Sirisaengtaksin, N., Gireud, M., Yan, Q., Kubota, Y., Meza, D., Waymire, J.C., Zage, P.E., and Bean, A.J. (2014). UBE4B protein couples ubiquitination and sorting machineries to enable epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation. *J. Biol. Chem.* 289, 3026–3039.
- Sofroniew, M. V., Howe, C.L., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281.
- Song, L., and Rape, M. (2008). Reverse the curse--the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 156–163.
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y., and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, 183–187.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1265–1273.
- Starczynowski, D.T., Lockwood, W.W., Deléhouzée, S., Chari, R., Wegrzyn, J., Fuller, M., Tsao, M.-S., Lam, S., Gazdar, A.F., Lam, W.L., et al. (2011). TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF- κ B pathways in human lung cancer. *J. Clin. Invest.* 121, 4095–4105.
- Staub, O., and Rotin, D. (2006). Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol. Rev.* 86, 669–707.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., and Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* 15, 2371–2380.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 39919–39925.
- Szeberenyi, J., Cai, H., and Cooper, G. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 10.
- Taillebourg, E., and Gregoire, I. (2012). The deubiquitinating enzyme USP36 controls selective autophagy activation by ubiquitinated proteins. *Autophagy* 1–13.
- Takahashi, Y., Shimokawa, N., Esmaeili-Mahani, S., Morita, A., Masuda, H., Iwasaki, T., Tamura, J., Haglund, K., and Koibuchi, N. (2011). Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl. *FEBS Lett.* 585, 1741–1747.
- Tessarollo, L., and Hempstead, B.L. (1998). Regulation of cardiac development by receptor tyrosine kinases. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 34–40.
- Thevenon, D., Engel, E., Avet-Rochex, A., Gottar, M., Bergeret, E., Tricoire, H., Benaud, C., Baudier, J., Taillebourg, E., and Fauvarque, M.-O. (2009). The *Drosophila* ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling. *Cell Host Microbe* 6, 309–320.
- Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 294–307.
- Thoenen, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593–598.
- Tiedemann, R.E., Zhu, Y.X., Schmidt, J., Shi, C.X., Sereduk, C., Yin, H., Mousses, S., and Stewart, A.K. (2012). Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome. *Cancer Res.* 72, 757–768.
- Tjelle, T.E., Brech, A., Juvet, L.K., Griffiths, G., and Berg, T. (1996). Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 1), 2905–2914.

Bibliografía

- Troilo, A., Alexander, I., Muehl, S., Jaramillo, D., Knobloch, K.-P., and Krek, W. (2014). HIF1 α deubiquitination by USP8 is essential for ciliogenesis in normoxia. *EMBO Rep.* 15, 77–85.
- Urbé, S., Liu, H., Hayes, S.D., Heride, C., Rigden, D.J., and Clague, M.J. (2012). Systematic survey of deubiquitinase localization identifies USP21 as a regulator of centrosome- and microtubule-associated functions. *Mol. Biol. Cell* 23, 1095–1103.
- Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2008). Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem. J.* 414, 161–175.
- Verge, V.M., Merlio, J.P., Grondin, J., Ernfors, P., Persson, H., Riopelle, R.J., Hökfelt, T., and Richardson, P.M. (1992). Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J. Neurosci.* 12, 4011–4022.
- Vetter, M., and Martin-Zanca, D. (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc. ...* 88, 5650–5654.
- Walsh, M.C., Kim, G.K., Maurizio, P.L., Molnar, E.E., and Choi, Y. (2008). TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF κ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One* 3, e4064.
- Wang, J., Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., and Yang, W. (2010). Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J. Biol. Chem.* 285, 12279–12288.
- Warner, N., Burberry, A., Pliakas, M., McDonald, C., and Núñez, G. (2014). A genome-wide siRNA screen reveals NF- κ B independent regulators of NOD2-induced IL-8 secretion. *J. Biol. Chem.*
- Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* 39, 323–336.
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 169–178.
- Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 599–609.
- Weskamp, G., Schlöndorff, J., Lum, L., Becherer, J.D., Kim, T.-W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G., and Blobel, C.P. (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J. Biol. Chem.* 279, 4241–4249.
- Whittemore, S.R., Ebendal, T., Larkfors, L., Olson, L., Seiger, A., Stromberg, I., and Persson, H. (1986). Development and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 817–821.
- Wilkinson, K. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 1245–1256.
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., and Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat. Cell Biol.* 3, 939–943.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* 2, 11.
- Wooten, M.W., Geetha, T., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M.-T., and Moscat, J. (2008a). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 6783–6789.
- Wooten, M.W., Geetha, T., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M.-T., and Moscat, J. (2008b). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 6783–6789.
- Wu, C., Lai, C.-F., and Mobley, W.C. (2001). Nerve Growth Factor Activates Persistent Rap1 Signaling in Endosomes. *J. Neurosci.* 21, 5406–5416.
- Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C., and Carraway, K.L. (2004a). Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7748–7757.
- Wu, X., Yen, L., and Irwin, L. (2004b). Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol. Cell. ...* 24, 7748–7757.
- Xing, M., and Insel, P.A. (1996). Protein kinase C-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 and mitogen-activated protein kinase by alpha 1-adrenergic receptors in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest.* 97, 1302–1310.
- Yan, C., Liang, Y., Nylander, K.D., and Schor, N.F. (2002). TrkA as a Life and Death Receptor: Receptor Dose as a Mediator of Function. *Cancer Res.* 62, 4867–4875.

- Yang, B., and Kumar, S. (2010a). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ.* 17, 68–77.
- Yang, B., and Kumar, S. (2010b). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ.* 17, 68–77.
- Yang, B., Slonimsky, J.D., and Birren, S.J. (2002). A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat. Neurosci.* 5, 539–545.
- Yang, K., Zhu, J., Sun, S., Tang, Y., Zhang, B., Diao, L., and Wang, C. (2004). The coiled-coil domain of TRAF6 is essential for its auto-ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 432–439.
- Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987a). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26, 1443–1451.
- Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987b). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 26, 1434–1442.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 755–764.
- Ye, Y., Scheel, H., Hofmann, K., and Komander, D. (2009). Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. *Mol. Biosyst.* 5, 1797–1808.
- Yoon, S.O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., and Chao, M. V. (1998). Competitive Signaling Between TrkA and p75 Nerve Growth Factor Receptors Determines Cell Survival. *J. Neurosci.* 18, 3273–3281.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626.
- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol. Cell Biol.* 20, 8069–8083.
- Yu, H. (2011). Tango between ubiquitin ligase and deubiquitinase keeps cyclin A tag free. *Mol. Cell* 42, 409–410.
- Yu, T., Calvo, L., Anta, B., López-Benito, S., Southon, E., Chao, M. V, Tessarollo, L., and Arévalo, J.C. (2011). Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions. *Traffic* 12, 521–534.
- Yu, T., Calvo, L., Anta, B., Lopez-Benito, S., Lopez-Bellido, R., Vicente-Garcia, C., Tessarollo, L., Rodriguez, R.E., and Arevalo, J.C. (2014). In Vivo Regulation of NGF-Mediated Functions by Nedd4-2 Ubiquitination of TrkA. *J. Neurosci.* 34, 6098–6106.
- Zhang, J., Du, J., Lei, C., Liu, M., and Zhu, A.J. (2014). Ubpy controls the stability of the ESCRT-0 subunit Hrs in development. *Development* 141, 1473–1479.
- Zhang, W., Na, T., Wu, G., Jing, H., and Peng, J.-B. (2010). Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 285, 36586–36596.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., and Segal, R.A. (2000). Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation. *J. Neurosci.* 20, 5671–5678.
- Zheng, W.-H. (2002). Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Phosphorylation of Transcription Factor FKHRL1 Is Mediated by Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Kinase and Role of This Pathway in Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Survival of Cultured Hippocampal Neurons. *Mol. Pharmacol.* 62, 225–233.
- Zhou, F.-Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.-H., and Snider, W.D. (2004). NGF-Induced Axon Growth Is Mediated by Localized Inactivation of GSK-3 β and Functions of the Microtubule Plus End Binding Protein APC. *Neuron* 42, 897–912.
- Zhou, R., Patel, S. V, and Snyder, P.M. (2007). Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J. Biol. Chem.* 282, 20207–20212.
- Zhou, Y., Lu, T.-J., and Xiong, Z.-Q. (2009). NGF-dependent retrograde signaling: survival versus death. *Cell Res.* 19, 525–526.
- Zhu, L., Bi, W., Lu, D., Zhang, C., Shu, X., Wang, H., Qi, R., Shi, Q., and Lu, D. (2014). Regulation of ubiquitin-specific processing protease 8 suppresses neuroinflammation. *Mol. Cell. Neurosci.*
- Zucchelli, S., Codrich, M., Marcuzzi, F., Pinto, M., Vilotti, S., Biagioli, M., Ferrer, I., and Gustincich, S. (2010). TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3759–3770.
- Zucchelli, S., Marcuzzi, F., Codrich, M., Agostoni, E., Vilotti, S., Biagioli, M., Pinto, M., Carnemolla, A., Santoro, C., Gustincich, S., et al. (2011). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

Bibliografia

- (TRAF6) associates with huntingtin protein and promotes its atypical ubiquitination to enhance aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 286, 25108–25117.
- Zweifel, L.S., Kuruvilla, R., and Ginty, D.D. (2005). Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 615–625.
- Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H., and Ullrich, A. (1999). Distinct Calcium-dependent Pathways of Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and PYK2 Tyrosine Phosphorylation in PC12 Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20989–20996.

Cuando te encuentres de camino a Ítaca, desea que sea largo el camino, lleno de aventuras, lleno de conocimientos.

A los Lestrigones y a los Cíclopes, al enojado Poseidón no temas, tales en tu camino nunca encontrarás, si mantienes tu pensamiento elevado, y selecta emoción tu espíritu y tu cuerpo tiente.

A los Lestrigones y a los Cíclopes, al fiero Poseidón no encontrarás, si no los llevas dentro de tu alma, si tu alma no los coloca ante ti.

Desea que sea largo el camino.

Que sean muchas las mañanas estivales en que con qué alegría, con qué gozo arribes a puertos nunca antes vistos, deténte en los emporios fenicios, y adquiere mercancías preciosas, nácares y corales, ámbar y ébano, y perfumes sensuales de todo tipo, cuántos más perfumes sensuales puedas, ve a ciudades de Egipto, a muchas, aprende y aprende de los instruid.

Ten siempre en tu mente a Ítaca.

La llegada allí es tu destino. Pero no apresures tu viaje en absoluto.

Mejor que dure muchos años, y ya anciano recales en la isla, rico con cuanto ganaste en el camino, sin esperar que te dé riquezas Ítaca. Ítaca te dio el bello viaje. Sin ella no habrías emprendido el camino. Pero no tiene más que darte.

Y si pobre la encuentras, Ítaca no te engañó. Así sabio como te hiciste, con tanta experiencia, comprenderás ya qué significan las Ítacas.

Ítaca, Costantino Cavafis



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA
CAMPOS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

