

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES PARA LA PROTEÍNA ARMS/KIDINS220

Laura Colina Freitas

The background of the slide is a dark blue gradient with a grid pattern. Overlaid on this is a complex network of glowing blue circles of various sizes, connected by thin lines, resembling a molecular structure or a data network. Some nodes are highlighted with a double-circle effect.

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

Tel: +34 923 294500 Ext. 1871
e-mail: arevalojc@usal.es

D. 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:

Dña. Laura Colina Freitas, graduada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral: *Identificación de nuevas funciones para la proteína ARMS/Kidins220*

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 surtan los efectos oportunos, firma el presente certificado en Salamanca, a 23 de julio de dos mil veintiuno.

Fdo. D. Juan Carlos Arévalo Martín

ABREVIACIONES

AKT/PKB. Proteína quinasa B

AMP cíclico. Adenosin monofosfato cíclico

AMPA. Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ARMS/Kidins220. Proteína transmembrana rica en repeticiones de anquirina/sustrato funcional de 220 kDa de la quinasa D

BDNF. Factor neurotrófico derivado del cerebro

CaM quinasa. Calcio calmodulina quinasa

CREB. Proteína asociada a elementos de respuesta a AMP cíclico

CRM. Dominio rico en cisteínas

DAG. Diacilglicerol

DIV. Días *in vitro*

DSP. Ditiobis succinimidyl propionato

EPSC. Corrientes postsinápticas excitatorias

ESCRT. Complejo endosomal de clasificación necesario para el transporte

EV. Vesículas extracelulares

FGFR. Receptor del factor de crecimiento fibroblástico

GFP. Proteína verde fluorescente

Grb2. Proteína asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico

GTPasa. Guanidin trifosfatasa

HEK293. Células embrionarias de riñón humano 293

HIV. Virus de inmunodeficiencia humano

HMC-1. Línea celular de mastocitos humanos 1

ILV. Vesículas intraluminales

IP3. Inositol tris-fosfato

ISEV. Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

kDa. Kilodaltons

KIM (dominio). Motivo interactivo con la cadena ligera de la kinesina

LRR. Región rica en leucina

LTD. Depresión a largo plazo

LTP. Potenciación a largo plazo

MAP. Proteína asociada a microtúbulos

MAPK. Proteínas quinasa activadas por mitógenos

MCD. Metil-beta-ciclodextrina

MVB. Cuerpos multivesiculares

NF- κ B. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGF. Factor de crecimiento nervioso

NMDA. Receptor N-metil-D-Aspartato

NSEs. Endosomas de señalización de neurotrofinas

NT. Neurotrofina

NTPasa. Nucleótido trifosfatasa

PC12. Células de feocromocitoma adrenal de rata 12

PI3K. Fosfatidil inositol 3 quinasa

PKC. Proteína quinasa C

PKD. Proteína quinasa D

PLCy. Fosfolipasa C- γ

PTB (dominio). Dominio de unión a fosfotirosina

PTP1B. Proteína tirosina fosfatasa 1 B

PTP σ . Proteína tirosina fosfatasa sigma

P75NTR. Receptor de neurotrofinas p75

RFP. Proteína roja fluorescente

RTK. Receptor Tirosina Quinasa

SAM (dominio). Motivo Alfa Estéril

SH2 (dominio). Dominio 2 de homología a Src

SH3 (dominio). Dominio 3 de homología a Src

SHC. Proteína que contiene un dominio SH2

shRNA. Ácido ribonucleico en horquilla

SNARE. Receptores de proteínas

TNF. Factor de necrosis tumoral

TRK. Receptor quinasa asociado a la tropomiosina

TRPC. Receptor de potencial transitorio canónico

TSG101. Proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101

TTX. Tetrodotoxina

VPS4. Proteína vacuolar asociada a clasificación 4

INTRODUCCIÓN

RECEPTORES TRK Y NEUROTROFINAS

APROXIMACIÓN HISTÓRICA

El estudio de las neurotrofinas comenzó en los años 1930-50s con Hamburger, Levi-Montalcini y Bueker, que observaron la aparición de neuritogénesis en núcleos nerviosos cuando se colocaban cerca explantes de sarcoma de ratón. Después de diversos estudios dedujeron que este fenómeno debía estar provocado por algún factor difusible al que denominaron factor de crecimiento nervioso o NGF (Revisado en Levi-Montalcini, 1987). A este descubrimiento le siguió el del factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF, que parecía tener propiedades neurotróficas similares (Barde et al., 1982), y encontrarse estructuralmente relacionado con NGF (Leibrock et al., 1989; Ullrich et al., 1983). Así comenzó a considerarse la existencia de una familia de factores neurotróficos o neurotrofinas (Thoenen & Edgar, 1985). A esta familia se le han ido añadiendo más miembros a lo largo de los años con el descubrimiento de NT3 (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990) y NT4/5 (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992), en animales mamíferos.

El estudio de esta familia de factores neurotróficos reveló su importante papel como reguladores de funciones tan fundamentales como la supervivencia, crecimiento, diferenciación y apoptosis de las células del sistema nervioso (Barde, 1990; Butte, 2001; Ernfors, 2001; Hofer & Barde, 1988). El incremento en el estudio de las neurotrofinas y los descubrimientos sobre su importancia propiciaron que se incrementaran los esfuerzos para identificar su mecanismo de acción, y encontrar los receptores de membrana que pudieran transmitir la señal inducida por las neurotrofinas. El primer receptor identificado como candidato para unirse a la primera neurotrofina descubierta, NGF, fue la proteína perteneciente a la superfamilia de factores de necrosis tumoral Fas/TNF, p75^{NTR} (Chao et al., 1986; Hempstead & Chao, 1989; Johnson et al., 1986). Sin embargo, la afinidad de NGF por p75^{NTR} era menor de la esperada (Radeke et al., 1987), por lo que se continuó la búsqueda de un receptor distinto de alta afinidad que pudiera ser responsable de las respuestas que se estaban observando (Meakin & Shooter, 1991). Casi simultáneamente, se identificó una forma oncogénica de una nueva tirosina quinasa. El receptor que más adelante se pasaría a llamar TrkA se describió originalmente como un oncogén aislado de un carcinoma de colon humano. Esta forma constitutivamente activa se había generado como consecuencia de un reordenamiento genético que fusionaba el dominio quinasa con tropomiosina no muscular (Martin-Zanca et al., 1986). La clonación y el análisis de la secuencia encontrada demostró que ese proto-oncogén que se había aislado codificaba un nuevo receptor tirosina quinasa (Martin-Zanca et al., 1989). Unos años más tarde, en 1991, se identificó como el receptor de alta afinidad de NGF que se estaba buscando, al demostrarse que concentraciones nanomolares de dicho factor podían inducir la actividad tirosina quinasa del receptor Trk en células PC12 (Kaplan et al., 1991).

Poco después se aislaron y caracterizaron el resto de receptores de la familia Trk, a los que se les denominó TrkB y TrkC, pasando así el primer receptor descubierto a llamarse TrkA (Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991). Y finalmente, un estudio tras otro, se consiguió asociar el resto de miembros de la familia de las neurotrofinas con sus respectivos receptores específicos. De esta manera se demostró que TrkB es el receptor específico de BDNF y NT4 (Klein et al., 1991, 1992), y que NT3 es el ligando específico de TrkC (Lamballe et al., 1991). Por su parte, distintos estudios demostraron que p75^{NTR} ejerce como receptor de baja afinidad para todas las neurotrofinas maduras (Rodríguez-Tébar et al., 1992; Rodríguez-Tebar & Barde, 1988), y como receptor de alta afinidad para las proneurotrofinas (Lee, 2001; Teng, 2005).

ESTRUCTURA DE LAS NEUROTROFINAS Y PRONEUROTROFINAS

Todas las neurotrofinas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso como pre-proneurotrofinas, y en su lumen la pre-secuencia es eliminada, generando las proneurotrofinas (Lessmann & Brigadski, 2009). Las proneurotrofinas son proteínas precursoras de unos 30-35 kDa que contienen sitios de glicosilación y secuencias de aminoácidos que son reconocidas por enzimas procesadoras del aparato de Golgi, donde el precursor sufrirá distintas modificaciones postranscripcionales (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). Una de estas modificaciones consiste en el corte enzimático de la proteína precursora, obteniendo la neurotrofina madura de unos 12-15 kDa de tamaño. Tanto las neurotrofinas como sus precursores pueden ser transportados por dos poblaciones diferentes de vesículas pertenecientes a la red vesicular del aparato de Golgi, que mediarán su secreción a través de dos vías distintas. En la vía de secreción constitutiva las proteínas son liberadas a medida que se producen, y en la vía de secreción regulada las proteínas sintetizadas se almacenan a la espera de un estímulo específico para ser secretadas. NGF y NT-3 pueden secretarse por cualquiera de las dos vías (Mowla et al., 1999), pero BDNF es secretado mayoritariamente por la vía regulada (Brigadski, 2005). Es importante destacar que ARMS modula de manera negativa la secreción regulada de BDNF en neuronas tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico (López-Benito et al., 2018).

A pesar de que la existencia de las neurotrofinas se descubrió a principios de los años 50, la actividad biológica de las proneurotrofinas no se reveló hasta 2001 (Lee, 2001). Actualmente se sabe que tanto las proteínas precursoras como la forma madura de las neurotrofinas están implicadas en numerosos aspectos fundamentales del sistema nervioso, como la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica (Costa et al., 2018; Schweigreiter, 2006). Las neurotrofinas se sintetizan mayoritariamente en el sistema nervioso central, pero también en gran cantidad de células periféricas, como los monocitos, linfocitos, el endotelio vascular y las células del músculo esquelético (Palasz et al., 2020).

ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES TRK, LOCALIZACIÓN Y TRANSPORTE RETRÓGRADO.

Los miembros de la familia Trk presentan la estructura clásica de los receptores tirosina quinasa (RTK), que consiste en tres regiones diferenciadas. La parte extracelular es la responsable de la unión y la especificidad por las neurotrofinas, y está formada por tres regiones ricas en leucina (LRR) flanqueadas por dos dominios ricos en cisteínas (CRM), seguidos por dos dominios de tipo inmunoglobulina. Tras el dominio inmunoglobulina se encuentra el dominio transmembranal, que permite la integración del receptor en la membrana plasmática, y finalmente, el receptor tiene una región citoplasmática en la que se encuentra el dominio catalítico tirosina quinasa (Ullrich & Schlessingert, 1990) (**Figura I1**).

Al ser proteínas transmembrana, los receptores Trk se encuentran fundamentalmente en la membrana plasmática y en ciertas membranas de compartimentos intracelulares. La función de los receptores Trk depende en gran medida de su disponibilidad a ser activados por sus ligandos. Señales como la aparición de AMP cíclico o el incremento de calcio intracelular, promueven la inserción de estos receptores en la membrana plasmática, donde estarán accesibles para su unión a las neurotrofinas (Du et al., 2000; Meyer-Franke et al., 1998). TrkB, en particular, es reclutado a balsas lipídicas, zonas de la membrana plasmática ricas en colesterol. La destrucción de estas balsas lipídicas supone una disminución considerable de la señalización del receptor (Suzuki et al., 2004). La endocitosis y el transporte de los receptores Trk a diferentes compartimentos de la célula están mediados por proteínas adaptadoras localizadas en compartimentos específicos de la membrana, que controlan de esta manera la eficiencia y la duración de la señal del receptor (York et al., 2000).

Varias líneas de investigación apoyan el papel de los cuerpos multivesiculares (MVB) en el transporte de neurotrofinas y receptores de neurotrofinas. Sobre estas estructuras hablaré más extensamente en el apartado relacionado con los exosomas, ya que forman parte de su

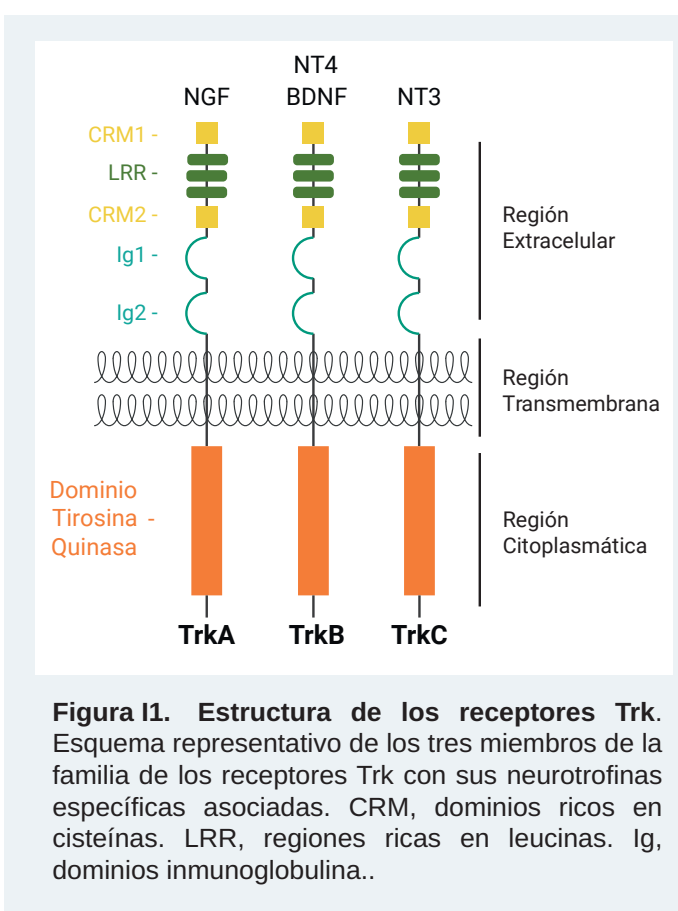


Figura I1. Estructura de los receptores Trk. Esquema representativo de los tres miembros de la familia de los receptores Trk con sus neurotrofinas específicas asociadas. CRM, dominios ricos en cisteínas. LRR, regiones ricas en leucinas. Ig, dominios inmunoglobulina..

origen. A principios de los 80 se describió a los MVB como la principal población endosomal que contiene NGF en neuronas simpáticas (Claude et al., 1982). Desde entonces otros grupos han encontrado receptores Trk asociados a MVB, y se ha sugerido que NGF asociado a TrkA es transportado en subpoblaciones específicas de MVB. A la luz de estos descubrimientos se ha sugerido el papel de ciertos MVB como transportadores retrógrados, que permiten que moléculas señalizadoras alcancen el soma celular desde el extremo axonal (Weible & Hendry, 2004). Este transporte vendría precedido por la internalización de los receptores Trk unidos a neurotrofinas formando los denominados endosomas de señalización de neurotrofinas (NSE). Estos serían englobados por un endosoma temprano en el terminal sináptico, dando lugar a MVB. Es interesante destacar la mención a proteínas de andamiaje como ARMS entre las proteínas que podrían asociarse a los receptores de neurotrofinas activos presentes en los NSE (Schmieg et al., 2014). Los receptores Trk podrían transportarse formando complejos, como el complejo trimérico compuesto por EGFR, TrkB y sortilin, que parece encontrarse en exosomas y que es capaz de incrementar la señalización de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) y AKT en las células diana de estas vesículas (Wilson et al., 2014).

EL RECEPTOR P75^{NTR}

El receptor p75^{NTR} tiene una estructura diferente a la de los receptores Trk. p75^{NTR} es un miembro de la superfamilia de los receptores de necrosis tumoral, que se caracteriza por poseer un dominio extracelular con cuatro motivos ricos en cisteína, un solo dominio transmembrana y una región citoplásmica que contiene un dominio de muerte (He & Garcia, 2004; Liepinsh et al., 1997). A pesar de que p75^{NTR} no tiene un motivo catalítico, es capaz de modular la actividad de gran variedad de proteínas que transmiten señales importantes para la regulación de la supervivencia celular, la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica. El receptor p75^{NTR} es capaz de unirse a las cuatro neurotrofinas conocidas (Bothwell, 1995; Chao & Hempstead, 1995), y puede regular la actividad de los receptores Trk de diversas maneras:

- » Dificulta la activación de los receptores Trk por neurotrofinas no específicas, controlando así su especificidad (Benedetti et al., 1993; Bibel et al., 1999; Brennan et al., 1999).
- » Promueve el transporte retrógrado de BDNF y NT-4 (Curtis et al., 1995)
- » Suprime la ubiquitinación de TrkA y TrkB (Makkerh et al., 2005).
- » Facilita la endocitosis de los receptores Trk mediante el reclutamiento de E2 y E3 ubiquitina ligasas (Geetha et al., 2005).

ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR

El modelo canónico de activación de los RTK establece que estos se encuentran en su mayor parte como monómeros en la membrana, y se activan mediante la dimerización inducida por la unión del ligando específico (Yarden & Schlessinger, 1987). Hay evidencias de la existencia de dímeros inactivos de receptores tirosina quinasa en la membrana plasmática, como el receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) (Comps-Agrar et al., 2015), el receptor EphA3 de efrinas (Singh et al., 2015) y los receptores TrkA y TrkB (Shen & Maruyama, 2011, 2012). La unión del ligando al receptor, con el dímero preformado o no, provoca un cambio conformacional que acerca los dominios quinasa del receptor permitiendo la autofosforilación en trans de residuos de tirosina. Esto desencadena otra serie de cambios en la estructura del receptor que sirven para estabilizar el estado activo de la quinasa y para fosforilar otras moléculas transmisoras de la señal (Lemmon & Schlessinger, 2010). Los residuos de tirosina fosforilados permiten a los RTK unirse a proteínas con dominios SH2 o PTB, tales como la fosfolipasa C-γ (PLCγ), las quinasas Raf, Src o la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K). También favorecen el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como Grb2 o SH2B, que facilitan la unión de otras proteínas señalizadoras. Los receptores Trk se activan de la misma manera que el resto de RTK. La unión de su ligando específico activa el dominio quinasa del homodímero. Esto desencadena la transfosforilación de tres residuos de tirosina específicos dentro del dominio catalítico (Y670, Y674 e Y675 en el receptor TrkA y los correspondientes en TrkB y TrkC), y dos residuos fuera de este dominio (Y490 e Y785 en el receptor TrkA y los correspondientes en TrkB y TrkC). Estos últimos residuos de tirosina fosforilados han sido los más estudiados, ya que son los responsables de la mayoría de las cascadas de señalización mediadas por la unión neurotrofinas a su receptor.

Como ya hemos establecido, cada uno de los cinco residuos de tirosina capaces de fosforilarse en respuesta a BDNF en el receptor TrkB proporciona un sitio de unión a distintas proteínas. La tirosina Y484 se encuentra en la región más cercana a la membrana, pero todavía en el interior de la célula, y es el sitio de unión al dominio PTB de la proteína adaptadora SHC, al igual que su análogo Y490 en TrkA (McCarty & Feinstein, 1998; Obermeier et al., 1993b). La tirosina Y785 se encuentra en el extremo C-terminal de TrkB, y funciona como sitio de unión para PLCγ (Middlemas et al., 1994; Obermeier et al., 1993a). Las últimas tres tirosinas, Y670, Y674 y Y675 se encuentran dentro del dominio catalítico de TrkB, en una estructura llamada “lazo de activación o activation loop” (McCarty & Feinstein, 1998). **(Figura I2).** La fosforilación de tirosinas del receptor es secuencial, siendo las tirosinas de este último dominio las más rápidas en fosforilarse. Una vez se fosforilan provocan cambios conformacionales en el dominio tirosina quinasa,

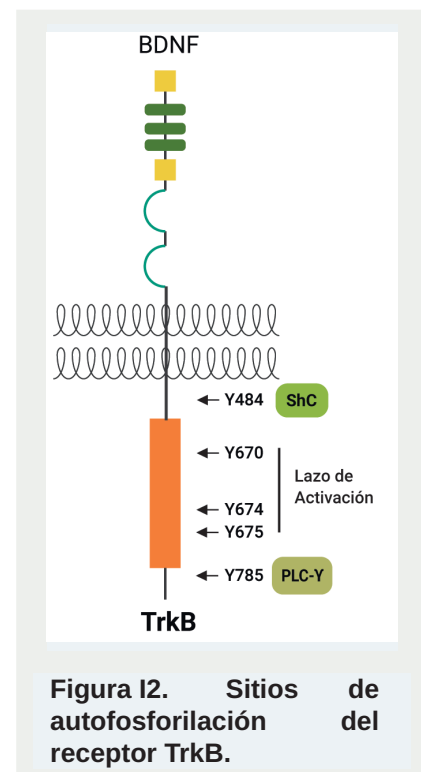


Figura I2. Sitios de autofosforilación del receptor TrkB.

que proporcionan una mayor disponibilidad a la entrada de sustratos, como las proteínas adaptadoras Grb2 o SH2B (Segal et al., 1996). Los receptores tirosina quinasa también son capaces de activarse en ausencia de su ligando específico mediante otras señales de la célula, como cambios en la concentración de calcio intracelular o en respuesta a la activación por ligando de receptores acoplados a proteínas G. Este tipo de activación independiente de ligando se denomina transactivación (Zwick et al., 1999). La adenosina, por ejemplo, es capaz de activar los receptores Trk y su cadena de señalización de forma parecida a NGF pero mucho más lenta (Lee et al., 2002). La transactivación de TrkB ocurre comúnmente en compartimentos del aparato de Golgi en vez de en la superficie celular, lo cual genera una señalización funcionalmente distinta (Bothwell, 2016).

La transfosforilación de los receptores Trk provoca la endocitosis mediada por clatrina del complejo receptor-ligando (Grimes et al., 1996; Zheng et al., 2008). Una vez internalizadas, las vesículas cubiertas de clatrina se fusionan con vesículas internas formando endosomas, donde los receptores son capaces de seguir señalizando. Los receptores endocitados pueden ser degradados, reciclados a la membrana plasmática, o incluso transportados a grandes distancias dentro de las neuronas. El reciclaje y degradación del receptor controlará la intensidad y duración de su señalización, y por tanto la respuesta de la célula al ligando. Ambos procesos son fundamentales en la señalización de los receptores Trk, y constituyen alguno de los factores que más diferencian unos receptores Trk de otros, permitiendo así que tengan respuestas biológicas diferentes.

Las cascadas de señalización que tienen lugar como consecuencia de la unión del receptor Trk con su ligando específico están controladas de manera muy precisa tanto por quinasas como por fosfatasas. En concreto se conoce el papel de las tirosina fosfatasas (PTP), cuya inhibición se ha descrito que activa la señalización de Trk y promueve el crecimiento y la supervivencia neuronal (Gerling et al., 2004). Un ejemplo es la fosfatasa PTP1B, mejor conocida por su papel en el control metabólico a través del receptor de la insulina, que es capaz de desfosforilar el receptor TrkB, controlando su activación en respuesta a BDNF (Ozek et al., 2014). Es importante destacar que las tirosinas fosfatasas también pueden aumentar la señalización del receptor, como hace LAR defosforilando la proteína adaptadora Src (Yang et al., 2006). A pesar de que el rol de algunas fosfatasas en la señalización de los receptores Trk sí que ha sido estudiado en detalle, aún no se conoce el mecanismo de la mayoría de las fosfatasas involucradas.

RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE ACTIVAN LOS RECEPTORES TRK

Ruta de PLC γ

La fosforilación del residuo de tirosina Y785 de TrkB provoca el reclutamiento y la activación de PLC γ , proteína capaz de hidrolizar el fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PI(4,5)P₂) a diacilglicerol (DAG) e inositol tris-fosfato (IP₃) (Obermeier et al., 1993b). IP₃ provoca la

liberación de calcio intracelular, que activa enzimas dependientes de calcio como las quinasas reguladas por calmodulina (CaM quinasas) y la calcineurina. Estas enzimas finalmente activan el factor de transcripción CREB (Finkbeiner et al., 1997). La liberación de calcio y la producción de DAG también activa la proteína quinasa C (PKC), que estimula la señalización por MAPK, al canal de capsaicina VR1 (Chuang et al., 2001) y a la familia de receptores catiónicos TRPC (*transient receptor potential channel*), que contribuyen al incremento de la secreción de BDNF dependiente de calcio en los conos de crecimiento y las sinapsis. La señalización a través de PLC γ , en respuesta tanto a NGF como a BDNF, se ha asociado al fenómeno de quimioatracción en los conos de crecimiento (Toledo-Aral et al., 1995). También parece importante en la mediación de la plasticidad sináptica regulada por BDNF en el hipocampo (Minichiello et al., 2002).

Ruta de PI3K-Akt

La fosforilación del residuo de tirosina Y484 permite la unión de la proteína adaptadora SHC. Una vez unida, esta proteína es capaz de activar la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) con ayuda de la molécula adaptadora Gab-1 y Grb2. La activación de esta quinasa provoca la fosforilación de fosfatidilinositol en la posición 3', desencadenando un cambio en la composición local de la membrana plasmática. Como consecuencia de esto, AKT se ve translocado de la membrana plasmática y se activa. Esto provoca la activación de la quinasa mTOR y la posterior fosforilación de 4E-BP1, lo que se traduce en un incremento de la traducción proteica y un aumento del crecimiento axonal (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). La activación de la ruta de PI3K-AKT promueve también la supervivencia neuronal inhibiendo el factor de transcripción FKHRL1, que regula la expresión de genes pro-apoptóticos. Inhibe

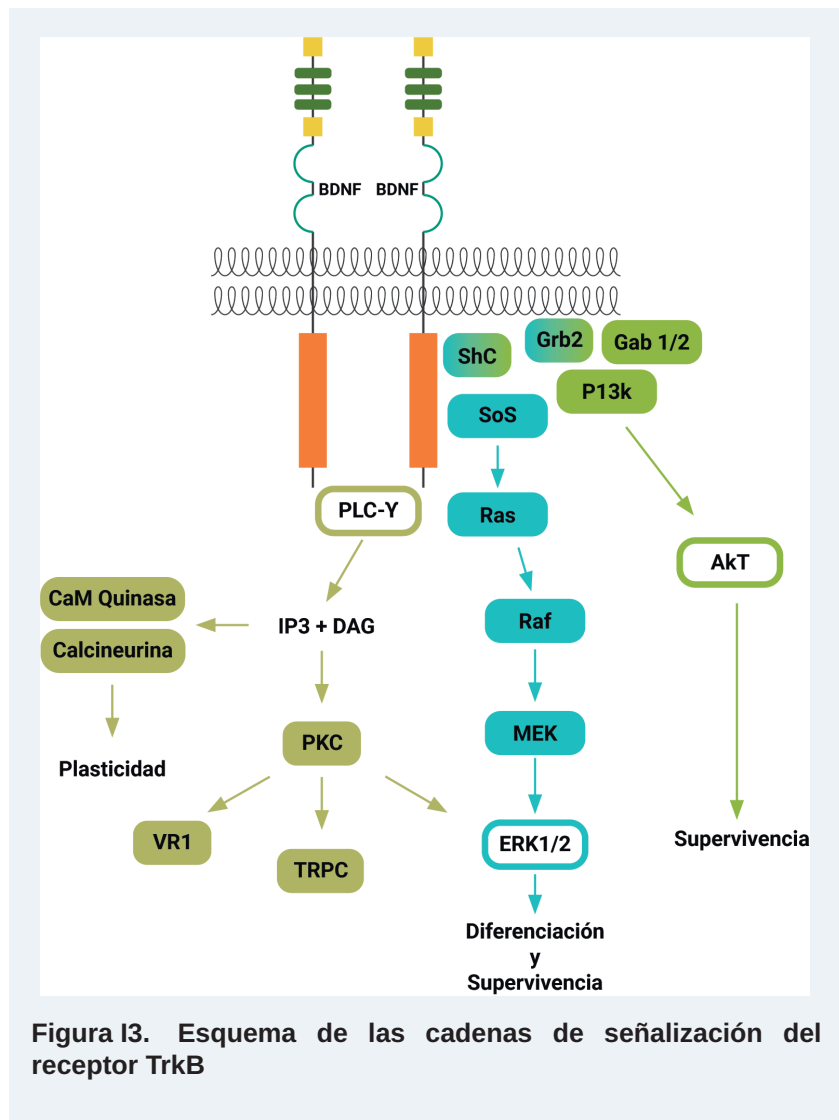


Figura I3. Esquema de las cadenas de señalización del receptor TrkB

también la proteína pro-apoptótica Bad y desencadena la degradación del inhibidor del factor pro-supervivencia NF- κ B, I κ B (Baydyuk & Xu, 2014; Gonzalez et al., 2016; Park & Poo, 2013)

Ruta de MAPK

Cuando se fosforila el residuo de tirosina Y484 y recluta la proteína adaptadora SHC, también crea un complejo con Grb2 y SOS, un activador de Ras, que a su vez inicia la señalización de MAPK. Ras participa fundamentalmente en la diferenciación neuronal, pero también es capaz de promover la supervivencia neuronal mediante la activación de PI3K o la cascada c-Raf/MEK/ERK (Patapoutian & Reichardt, 2001). Que la estimulación por neurotrofinas induzca la proliferación o la diferenciación parece depender de si la activación de la cadena de señalización de MAPK es puntual o prolongada (Grewal et al., 1999). La activación prolongada de MAPK puede conseguirse con la ayuda de la proteína ARMS/Kidins220, la cual se fosforila rápidamente en respuesta a la activación de TrkA por NGF, interacciona con CrkL, induciendo así la activación de Rap1, responsable de la activación sostenida de MAPK (Arévalo et al., 2004).

En resumen, existe una compleja red de proteínas adaptadoras que transportan y traducen la activación de los receptores Trk en cambios en la morfología y en el genoma de la célula (**Figura I3**). Esta red es probablemente mucho más compleja de lo que ya conocemos, y tenga diferencias sustanciales entre diferentes subpoblaciones de neuronas, permitiendo traducciones distintas de la misma señal.

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES TRKB Y TRKC EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Como ya hemos ido mencionando, los receptores Trk están involucrados en una gran diversidad de funciones neuronales, tales como la supervivencia, la diferenciación y crecimiento tanto axonal como dendrítico, la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica. La mayoría de los estudios iniciales sobre las posibles funciones de los receptores Trk se realizaron en células PC12, las cuales expresan TrkA y p75^{NTR}, pero no TrkB ni TrkC (Canossa et al., 1996), por lo que al principio los resultados obtenidos en TrkA eran extrapolados a los otros miembros de la familia. Pero con el tiempo y la utilización cada vez más generalizada de cultivos primarios, se ha ido comprobando que, aunque las cascadas de señalización de los tres receptores Trk son muy similares, tienen diferencias importantes.

En primer lugar, cada receptor Trk se expresa en poblaciones neuronales determinadas. TrkB y TrkC se expresan predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que TrkA está mucho más representado en el sistema nervioso periférico (Tessarollo et al., 1993). Esta observación puede corroborarse con las grandes diferencias observadas en los fenotipos de los ratones *knockout* para los distintos receptores.

- » Los ratones que no expresan TrkA tienen neuropatías sensoriales y del sistema simpático, pero no motoras ni problemas en el sistema nervioso central (Crowley et al., 1994). Las neuronas positivas para TrkA del sistema nervioso central no requieren de NGF para sobrevivir como sí ocurre con sus homólogas de la periferia (Smeyne et al., 1994).
- » Los ratones que no expresan TrkC tienen fundamentalmente la propiocepción afectada, y en menor medida las aferencias motoras (Klein et al., 1994).
- » Los ratones que no expresan TrkB mueren después de 24-48 horas de nacer ya que no se alimentan. Esto podría deberse fundamentalmente a una desaparición de neuronas motoras de la cabeza, pero también a pérdidas en la sensibilidad de los bigotes y de aferencias viscerales. (Klein et al., 1993).

También es muy significativa la diferente modulación de la supervivencia de subpoblaciones específicas de neuronas. Por ejemplo, TrkA y TrkC dependen de la unión del ligando para promover la supervivencia neuronal en el sistema nervioso periférico, y son capaces de inducir muerte neuronal si no hay suficiente neurotrofina, pero esto no ocurre con TrkB, cuyas poblaciones de neuronas positivas para el receptor sobreviven en su mayor parte en los ratones *knockout* (Nikoletopoulou et al., 2010). En cuanto al sistema nervioso central, un estudio con un modelo de ratón *knockout* para BDNF específicamente en células post-mitóticas reveló que la ausencia de BDNF no impedía la supervivencia de las neuronas, pero sí reducía el tamaño y la complejidad dendrítica de zonas específicas del cerebro, destacando el estriado como la zona del cerebro más afectada (Rauskolb et al., 2010). En el sistema nervioso central la modulación del crecimiento neuronal y el potenciamiento sináptico son las funciones principales de los receptores Trk.

El receptor más importante a nivel de sistema nervioso central es el receptor TrkB. El eje de señalización que forma con su ligando BDNF tiene un papel fundamental en la plasticidad sináptica. La importancia de este eje abarca todas las etapas de formación del sistema nervioso, ya que regula la supervivencia de células madre y progenitores neurales, la diferenciación neuronal y la formación y maduración de espinas dendríticas y conexiones sinápticas (Park & Poo, 2012). En las sinápsis, el eje TrkB/BDNF regula tanto eventos presinápticos como postsinápticos (Manabe, 2002). Esta regulación ha sido especialmente estudiada en células del hipocampo, donde afecta funciones cognitivas tan importantes como el aprendizaje y la memoria (Alonso et al., 2002).

En el sistema nervioso central adulto, TrkC se expresa sobretodo en el hipocampo (Friedman et al., 1991; Maisonpierre et al., 1990), y más concretamente en el giro dentado (Lauterborn et al., 1994). Allí TrkC modula la eficacia sináptica a través de NT3 (Lu, 2004; Wang et al., 1995; Je et al., 2011). Al igual que TrkB y BDNF, TrkC y NT3 se han asociado de forma consistente con la neurogénesis y el establecimiento de conexiones sinápticas (McAllister et al., 1999), pero el papel de TrkC y NT3 en la plasticidad sináptica sigue estando menos estudiado. Es importante destacar que el receptor TrkC ha sido identificado como

una molécula sinaptogénica (Takahashi et al., 2011) Esta actividad sinaptogénica se basa en su interacción con la fosfatasa PTP σ , sin el requerimiento de la unión de NT3, aunque su presencia fortalece la interacción con la fosfatasa (Ammendrup-Johnsen et al., 2015; Han et al., 2016).

ISOFORMAS Y FORMAS TRUNCADAS

A parte de los receptores completos, existen isoformas truncadas de los receptores Trk sin el dominio tirosina quinasa intracelular. Estas isoformas son muy comunes en el sistema nervioso maduro, pero todavía no se sabe mucho sobre cuál es exactamente su función biológica. Al principio se creía que actuaban como formas dominantes negativas, pero con el tiempo se ha ido descubriendo que son moléculas que tienen su propia señalización (Fenner, 2012).

En el caso de TrkB, se han descrito dos formas truncadas, sin el dominio tirosina quinasa, pero con una secuencia citoplasmática, denominadas TrkB.T1 y TrkB.T2 (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991). En neuronas, TrkB.T1, la forma truncada de TrkB más abundante y mejor caracterizada, actúa como un modulador negativo de la función de BDNF, compitiendo con el receptor completo por el ligando. Pero, esta forma truncada también parece tener algunas funciones específicas. Es capaz de participar en la señalización en respuesta al aumento de calcio dependiente de BDNF (Rose et al., 2003), y contribuye en la internalización de BDNF, previniendo incluso más la acción de la neurotrofina (Cao et al., 2020).

Se han descrito 4 formas truncadas de TrkC generadas por procesamiento alternativo. Estudios de hibridación in situ muestran que, en algunas células, las formas truncadas de TrkC se coexpresan con la forma completa por lo que se ha propuesto que pudieran funcionar como dominantes negativos dimerizando con el receptor completo o secuestrando el ligando en la superficie celular impidiendo su unión a la forma completa (Tsoulfas et al., 1993). TrkC tiene además isoformas creadas por insertos en el dominio citoplasmático, tanto fuera como dentro de la región tirosina quinasa, inmediatamente después del sitio de autofosforilación (Lamballe et al., 1993; Valenzuela et al., 1993). Estudios realizados con estas isoformas parecen indicar que la presencia de estos insertos en el dominio quinasa afecta negativamente a la accesibilidad de algunos sustratos, impidiendo la realización de ciertas funciones propias de la isoforma clásica, como la supervivencia mediada por NT3 (Tsoulfas et al., 1996).

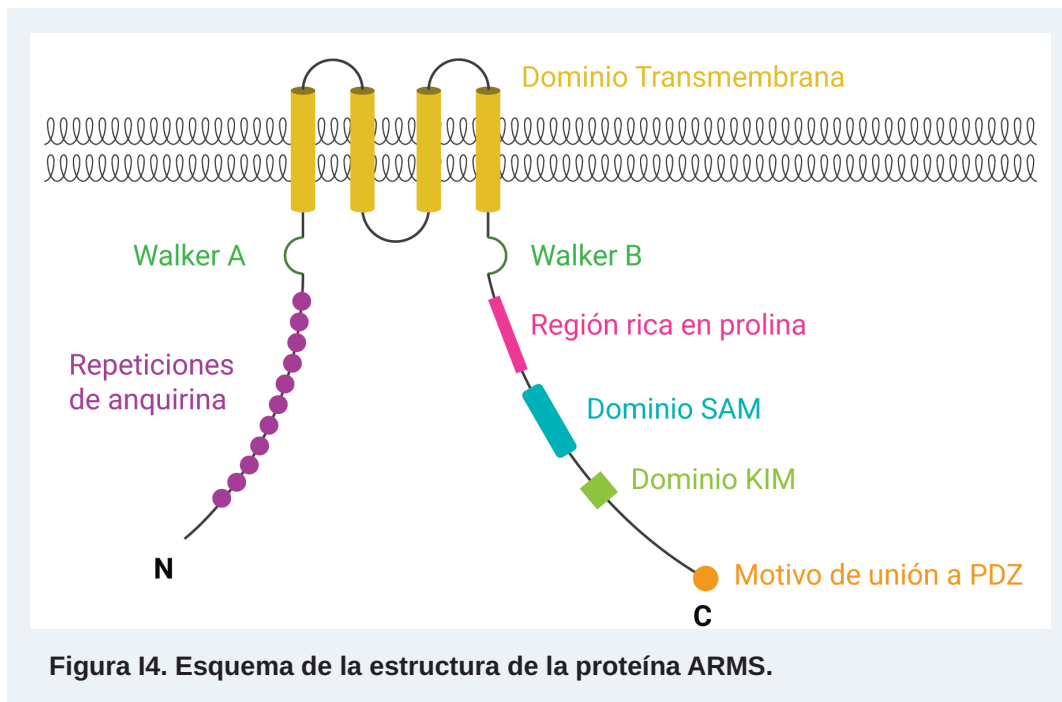
ARMS/KIDINS220

DESCUBRIMIENTO Y ESTRUCTURA.

La proteína ARMS/Kidins220 se identificó como el primer sustrato conocido de la proteína quinasa D (PKD) en células neuronales, y se nombró como Kidins220 (kinase D-interacting substrate of 220 kDa) (Iglesias et al., 2000). PKD es una proteína quinasa de residuos de serina y treonina, relacionada con la familia de las proteínas quinasas C (PKC), que comenzó a ganar popularidad por ser un elemento fundamental en la cascada de señalización del diacilglicerol (DAG), y por su extensa participación en funciones neuronales. Casi simultáneamente, la proteína protagonista de este trabajo fue identificada como una nueva diana de la señalización mediada por neurotrofinas y efrinas, recibiendo el nombre de ARMS (*Ankyrin repeat-rich and membrane spanning*), debido a su estructura (Kong et al., 2001). A lo largo de este trabajo nos referiremos a ARMS/Kidins220 como ARMS, para abreviar.

ARMS es una proteína de 1751 aminoácidos caracterizada por tener cuatro dominios transmembrana y largas colas C y N terminales citoplasmáticas. La región N-terminal contiene 11 repeticiones de anquirina, que permiten su interacción con la proteína Trio, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para las GTPasas RhoG (*Ras-homologous member G*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y RhoA (*Ras-homologous member A*) (Neubrand et al., 2010). También se han identificado, en las secuencias más próximas a la membrana tanto en la cola N-terminal como en la C-terminal, los motivos Walker A y Walker B, asociados a P-Loop nucleótido fosfatasas (NTPasas). Estos motivos proporcionan a ARMS de un espacio donde formar complejos con otras proteínas asociadas con la cara citoplasmática de la membrana celular (Aravind et al., 2004). La cola C-terminal contiene una cantidad considerable de aminoácidos expuestos a cambios postraduccionales, como la fosforilación (Neubrand et al., 2012). También posee varios dominios que le permiten interactuar con otras proteínas, como una región rica en prolinas capaz de unir la proteína adaptadora CrkL (Arévalo et al., 2006), un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*) (Iglesias et al., 2000; Kong et al., 2001) y un dominio KIM (*kinesin light chain interacting motif*), capaz de unirse a los complejos motores kinesina-1 (Bracale et al., 2007). Los cuatro últimos aminoácidos del extremo C-terminal de ARMS forman un motivo de unión a dominios PDZ, involucrados en la asociación con receptores de efrinas (Luo et al., 2005). La región transmembrana también es capaz de interactuar con proteínas importantes, como son los receptores Trk o los receptores AMPA (Arévalo et al., 2004, 2010) (**Figura I4**).

Es importante destacar que a pesar de que ARMS es capaz de ser fosforilada por los receptores Trk en respuesta a NGF y BDNF (Kong et al., 2001), tal y como hablaremos más adelante, no se conoce que tenga ninguno de los motivos normalmente asociados con sustratos de tirosinas quinasas, como son el dominio 2 de homología a Src (SH2) o el dominio de unión a fosfotirosina (PTB).



La gran cantidad de dominios con capacidad para interactuar con otras proteínas hacen de ARMS un candidato importante para actuar como plataforma señalizadora, ya que es capaz de reclutar adaptadores específicos y asociarlos a distintos receptores, como los receptores Trk, receptores de glutamato, de efrinas o receptores VEGF (Arévalo et al., 2010; Cesca et al., 2012; López-Menéndez et al., 2009; Luo et al., 2005). De esta manera se posiciona como un punto de convergencia entre diferentes cascadas de señalización, posibilitando su integración.

Se han descrito dos isoformas de ARMS en cerebro de ratón y humano adulto, que son el resultado de un procesamiento alternativo de los exones 31, 32 y 33. Estas dos variantes son la isoforma completa y la isoforma C2, y se diferencian fundamentalmente en la secuencia de su cola C-terminal. La isoforma C2 pierde el sitio de unión a p75NTR, el motivo KIM y el motivo de unión a dominios PDZ (Schmiege et al., 2015). Estos dos últimos dominios son necesarios para la modulación de ARMS del transporte dependiente de kinesina, y de la transducción de la señal proveniente de la estimulación de los receptores Trk (Bracale et al., 2007; Hisata et al., 2007).

DISTRIBUCIÓN.

ARMS se expresa principalmente en el sistema nervioso, tanto central como periférico, donde es capaz de modular la supervivencia y fisiología neuronal, así como su diferenciación y plasticidad sináptica (Neubrand et al., 2012). En los primeros estudios de hibridación in situ realizados para describir la distribución de ARMS se vio como esta proteína se expresa en las regiones del sistema nervioso central con una mayor plasticidad neural, como el bulbo olfatorio, el hipocampo, las células de Purkinje y las neuronas motoras de la espina dorsal (Kong et al.,

2001). Dentro de la célula, ARMS se localiza en la membrana plasmática y en vesículas internas (Iglesias et al., 2000; Kong et al., 2001). Mediante análisis inmunohistoquímicos se ha podido ver que la expresión de ARMS es más elevada alrededor de proteínas asociadas con balsas lipídicas (Riol-Blanco et al., 2004). Estas pequeñas y dinámicas regiones de la membrana plasmática se caracterizan por acumular proteínas y lípidos específicos que forman parte de la regulación de la señalización celular. Una destrucción de las balsas lipídicas provoca la desaparición de ARMS de los límites polarizados de las células donde normalmente se encuentra (Cabrera-Poch et al., 2004; Riol-Blanco et al., 2004).

ARMS Y LA SEÑALIZACIÓN POR NEUROTROFINAS

La proteína ARMS es capaz de interactuar con los receptores Trk, incluso en ausencia de ligando (Arévalo et al., 2004), pudiendo también formar un complejo ternario con TrkA y el receptor p75^{NTR} (Chang et al., 2004). El cuarto dominio transmembrana de ARMS se asocia al dominio transmembrana de Trk (Arévalo et al., 2004), y los últimos 250 aminoácidos de la cola C-terminal de ARMS se asocian con el dominio intracelular del receptor p75^{NTR} (Chang et al., 2004; Kong et al., 2001).

ARMS no tiene actividad catalítica propia, pero su interacción con algunas proteínas depende de su fosforilación. Como ya hemos mencionado en el apartado sobre los receptores Trk, ARMS se fosforila en cuestión de segundos en residuos de tirosina en respuesta a la unión de NGF y BDNF a su receptor específico, siguiendo una dinámica similar a la autofosforilación de Trk, lo que nos evidencia que ARMS es un sustrato de los receptores y que se encuentra muy próximo a ellos (Arévalo et al., 2004; Kong et al., 2001). La fosforilación de ARMS en el residuo de tirosina Y1096 como consecuencia a la estimulación con NGF provoca un cambio conformacional que le permite reclutar a CrkL a través de su dominio SH2, liberando así su dominio SH3 e incorporando en consecuencia moduladores de la cadena de las MAPK (Arévalo et al. 2006). Esta modulación de ARMS permite mantener la activación sostenida de las MAPK en endosomas tardíos. Estos datos han sido posteriormente confirmados por otros grupos de investigación (Bracale et al., 2007; Hisata et al., 2007; Liao et al., 2007; López-Menéndez et al., 2009; Sniderhan et al., 2008) y sugieren que ARMS podría ser un componente importante en la coordinación de la señalización mediada por neurotrofinas y los procesos de modulación de la actividad sináptica.

ARMS COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

Estudios con tetrodotoxina (TTX), una neurotoxina que previene la creación de potenciales de acción, y con bicuculina, capaz de bloquear la transmisión inhibitoria de GABA, han demostrado que los niveles de expresión de la proteína ARMS se encuentran regulados por la actividad neuronal. Un descenso de la actividad neuronal incrementa la expresión de ARMS, mientras que un aumento de la actividad provoca todo lo contrario (Cortés et al., 2007). En

consonancia con esos resultados, en neuronas del hipocampo ARMS es más abundante durante las primeras etapas de desarrollo y diferenciación en comparación con etapas posteriores, en las que comienzan la sinaptogénesis y la actividad neuronal es mayor (Cortés et al., 2007; Higuero et al., 2010). Durante estas primeras etapas de diferenciación, ARMS parece ser capaz de asociarse con la subunidad GluA1 de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA, y regular tanto su localización como su fosforilación (Arévalo et al., 2010). Una reducción de los niveles de ARMS provoca un incremento en la expresión de GluA1 en la membrana plasmática, que puede observarse también como un aumento en las corrientes mediadas por el receptor AMPA y por tanto un aumento en la transmisión sináptica. La sobreexpresión de ARMS provoca el efecto contrario, una reducción de la cantidad de subunidad GluA1 en la superficie de la membrana plasmática. Sorprendentemente, los niveles de GluA2 no se vieron alterados en ningún caso, lo que indica que este fenómeno tiene un carácter muy específico (Arévalo et al., 2010). Estos datos llevan a especular que los altos niveles de ARMS en las primeras etapas de diferenciación permiten tener las subunidades de GluA1 en unos niveles controlados mientras se lleva a cabo la diferenciación del sistema nervioso. Cuando llega el momento de crear uniones sinápticas funcionales, los niveles de ARMS disminuyen, permitiendo la inserción de los receptores AMPA en membrana. Cuando se habla de los receptores AMPA no se puede ignorar su papel vital en la potenciación excitatoria a largo plazo (LTP) (Lee & Kirkwood, 2011). Por lo tanto, se ha estudiado la posibilidad de relacionar la asociación entre ARMS y GluA1 con la LTP. Hasta el momento no se ha demostrado una conexión directa entre la relación de estas dos proteínas con el fenómeno de LTP, pero sí que se ha observado que una reducción de los niveles de ARMS dependiente de calpaínas, desencadena un aumento del LTP (Wu et al., 2010). Esto, junto con la implicación de ARMS en la señalización del eje neurotrófico BDNF/TrkB, otro regulador muy importante del LTP en el hipocampo (Leal et al., 2015), hace pensar en el posible papel de ARMS en este fenómeno.

ARMS también es capaz de asociarse con otros receptores glutamatérgicos a parte de los receptores AMPA. Está descrita su asociación con las unidades NR1, NR2A y NR2B de los receptores ionotrópicos NMDA de glutamato (López-Menéndez et al., 2009), receptor también clave en la inducción de los LTP. La estimulación de los receptores NMDA provoca un incremento de Ca^{2+} en el citoplasma, que disminuye de manera significativa los niveles de la proteína ARMS en neuronas corticales de un modelo de isquemia cerebral. Esta reducción se lleva a cabo mediante dos mecanismos simultáneos, el silenciamiento de la transcripción del gen codificante para ARMS, y la escisión de la proteína por la acción de la calpaína, una proteasa dependiente de Ca^{2+} .

Se necesitan más estudios para aclarar el papel concreto que juega ARMS y los mecanismos exactos en los que participa en estas cascadas de señalización, pero las observaciones realizadas hasta el momento parecen indicar de manera clara una modulación de la transmisión sináptica a través de esta proteína adaptadora. La mayoría de los datos sobre la importancia de ARMS en la actividad neuronal se han obtenido inicialmente mediante manipulación aguda de los niveles de ARMS, pero han sido posteriormente confirmados mediante el uso de líneas

de ratones transgénicos *knockout* para ARMS. En la primera línea de ratones *knockout* que se generó, los embriones homocigotos morían en estadios muy tempranos del desarrollo, dificultando su estudio (Wu et al., 2009). Los ratones heterocigotos con una reducción de entre 30 y 40% de ARMS mostraban defectos en la creación de memoria espacial (Duffy et al., 2011), un proceso en el que el correcto equilibrio entre la LTP y la LTD (Depresión a largo plazo) es de gran importancia (Ge et al., 2010; Kemp & Manahan-Vaughan, 2007). Además, estos ratones heterocigotos exhibían una menor complejidad dendrítica a partir de los 3 meses, evidenciando un rol de ARMS en el refinamiento y estabilización de las espinas dendríticas en el desarrollo postnatal (Wu et al., 2009). A pesar de este fenotipo neuronal, está bastante aceptado que la alta mortalidad de estos *knockout* en etapas anteriores a la formación del sistema nervioso se debe al papel que ARMS juega durante el desarrollo embrionario. Más adelante se desarrolló otro modelo *knockout* en el que los embriones eran capaces de sobrevivir hasta los estadios más tardíos de la gestación, aunque en ningún caso sobrevivían el parto (Cesca et al., 2011, 2012). Estos últimos embriones presentaban, entre otros fenotipos, una importante muerte neuronal en el sistema nervioso central, una simplificación del circuito neuronal en cuanto a número, longitud y complejidad de las dendritas, e impedimentos en la respuesta a estímulos neurotróficos, lo que apoya la teoría sobre la importancia de esta proteína en el desarrollo neuronal temprano.

ARMS EN LA REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO

Las neuronas necesitan tener una morfología polarizada para poder realizar sus funciones. La acción de neurotrofinas y otros factores de crecimiento permite inducir cambios en el citoesqueleto de los conos de crecimiento y crear esa morfología propia (Huber et al., 2003). La proteína ARMS tiene todas las características necesarias para participar en la regulación de este moldeado, ya que está implicada en la señalización de neurotrofinas e interacciona con componentes del citoesqueleto (Higuero et al., 2010; Neubrand et al., 2010; Park et al., 2010). El desarrollo de neuritas requiere de la formación de F-actina, proteína que colocaliza con ARMS en células PC12 diferenciadas mediante NGF (Neubrand et al., 2010; Park et al., 2010) y en neuronas de hipocampo (Higuero et al., 2010). De hecho, la cantidad de F-actina y de ARMS presentes en los conos de crecimiento está correlacionada, evidenciando la importancia de esta proteína en el remodelado del citoesqueleto en neuronas en desarrollo (Higuero et al., 2010). Como ya se ha mencionado previamente al hablar de la estructura de ARMS, esta interacciona y activa Trio, un intercambiador de nucleótidos de guanina que activa Rho GTPasas, a través de las repeticiones de anquirina de su cola N-terminal (Neubrand et al., 2010). Trio es capaz de promover el crecimiento de las neuritas mediante el remodelado del citoesqueleto (Dickson, 2001; Estrach et al., 2002; Govek et al., 2005). Una sobreexpresión de las repeticiones de anquirina en ARMS inhibe el crecimiento de neuritas en células PC12 y neuronas del hipocampo, demostrando la conexión entre estas dos proteínas (Neubrand et al., 2010).

ARMS también es capaz de interactuar con microtúbulos, asociándose con tubulina, y más específicamente con las proteínas asociadas a microtúbulos MAP1a, MAP1b y MAP2, así como las proteínas Stathmin, SCG10 y SCLIP (También conocidos con los nombres de STMN1, STMN2 y STMN3, respectivamente) (Higuero et al., 2010). Esta familia de proteínas tiene un rol muy bien estudiado en la morfogénesis neuronal (Poulain & Sobel, 2010), y su habilidad para modular la dinámica de los microtúbulos es dependiente de su fosforilación (Owen & Gordon-Weeks, 2003). Sabiendo esto se quiso conocer si la expresión de ARMS alteraba la activación de estas proteínas y se descubrió que una bajada de los niveles de ARMS reduce su fosforilación. Esta disminución de la fosforilación de la familia de proteínas STMN favorece la formación de procesos axonales en neuronas hipocampales jóvenes, y crea un árbol dendrítico aberrante en cultivos más maduros (Higuero et al., 2010). Todos estos resultados demuestran que ARMS es capaz de modular la maduración axonal y dendrítica afectando directamente a la dinámica del citoesqueleto.

EXOSOMAS

APROXIMACIÓN HISTÓRICA.

Las vesículas extracelulares (EV) fueron observadas y descritas por primera vez hace 50 años como “polvo de plaquetas” (Wolf, 1967), y la liberación de pequeñas vesículas provenientes de células tumorales fue descrita hace 40 años (Dvorak et al., 1981). En un principio se creía que estas vesículas extracelulares, que más tarde recibirían el nombre de exosomas, provenían de la evaginación de la membrana plasmática, pero poco después dos grupos distintos demostraron la existencia de un origen más complejo, una invaginación en la membrana de un endosoma, capaz de atrapar componentes del citoplasma y generar lo que se denominó vesículas intraluminales (ILV) (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985). Las vesículas intraluminales y la membrana que las rodea recibieron el nombre de cuerpos multivesiculares (MVB). En 1987 se propuso la palabra “exosomas” por primera vez para denominar a estas EVs de origen endosómico que se creía que tenían como función desechar residuos celulares (Johnstone et al., 1987). Esta función de los exosomas como vía alternativa para la eliminación de residuos ha sido apoyada a lo largo de los años (Baixauli et al., 2014; Hessvik et al., 2016), pero también se ha profundizado en su capacidad para actuar como un nuevo método de comunicación intercelular, descubriendo su participación en numerosas funciones tanto fisiológicas como patológicas (Mathivanan et al., 2010; Raposo & Stoorvogel, 2013; Record et al., 2014).

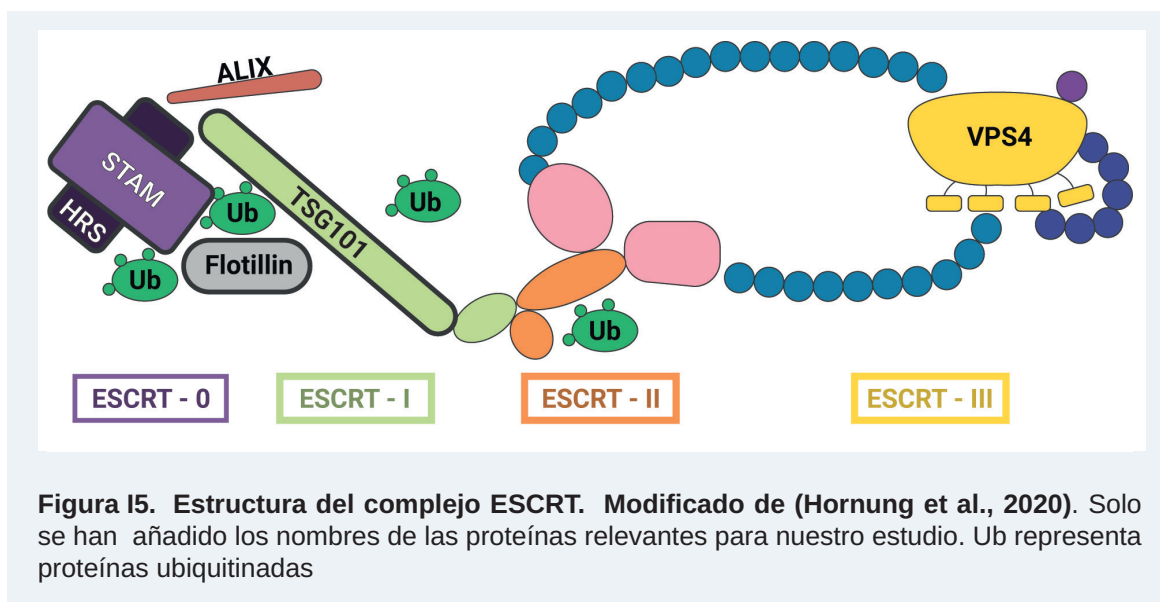
Desde estos primeros estudios se han encontrado vesículas extracelulares en una amplia variedad de fluidos corporales (semen, sangre, orina, saliva, leche, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, heces, líquido nasal, bilis, entre otros) y en todas las líneas celulares que se han estudiado hasta el momento (Raposo & Stoorvogel, 2013; Yáñez-Mó et al., 2015). Actualmente, las vesículas extracelulares se clasifican en tres grandes grupos dependiendo de su mecanismo de liberación y de su tamaño: exosomas (con menos de 150 nm de diámetro), microvesículas (con entre 100 y 1000 nm de diámetro) y cuerpos apoptóticos (con más de 1000 nm de diámetro) (Gurunathan et al., 2019).

BIOGÉNESIS DE EXOSOMAS.

Hasta que se produce la liberación de los exosomas al medio extracelular deben darse varios pasos previos: la formación de vesículas intraluminales en los cuerpos multivesiculares, el transporte de estos cuerpos multivesiculares a la membrana plasmática, y finalmente su fusión con la misma y liberación de su contenido al exterior.

La biogénesis de exosomas comienza con la formación de las ILV mediante una invaginación de la membrana de endosomas primarios, proceso que tiene lugar durante su maduración a

cuerpos multivesiculares (Huotari & Helenius, 2011). Los mecanismos moleculares encargados de la formación de ILV han sido objeto de muchos estudios, los nombrados a continuación son los mecanismos más importantes que se han descrito hasta el momento en la formación de exosomas. El mecanismo más estudiado es el complejo endosomal de clasificación necesario para el transporte (ESCRT) cuya implicación en la formación de ILV y su maquinaria comenzó a estudiarse a principios de los años 2000 (Katzmann et al., 2001). ESCRT está formado por cuatro complejos proteicos y una AAA ATPasa asociada a la proteína Vps4 (Henne et al., 2013). Una de las particularidades más importantes de estos complejos es su división en las funciones. ESCRT -0, -I y -II forman hetero-oligómeros que trabajan juntos en el reconocimiento de moléculas de ubiquitina y de PI3P en la superficie del endosoma (Raiborg et al., 2001; Katzmann et al., 2003; Teo et al., 2006). La falta de alguno de los componentes de estos complejos, como HRS o TSG101 provoca un descenso considerable en la secreción de exosomas (Colombo et al., 2013). ESCRT-II también inicia el ensamblaje del complejo ESCRT-III (Teis et al., 2008). Este complejo no es estable como los anteriores, se ensambla de manera transitoria durante la fase de remodelamiento de la membrana del endosoma, e inicia la invaginación de la membrana para formar la vesícula intraluminal. La proteína VPS4 se encarga de los últimos pasos de la formación de vesículas intraluminales, el desensamblaje del complejo ESCRT-III y la escisión de la membrana. (Hanson & Cashikar, 2012). Finalmente, existen proteínas que actúan de manera paralela, y utilizan parte del mecanismo del complejo ESCRT, pero no siguen el modelo mencionado anteriormente. Por ejemplo, ALIX permite un puente entre ESCRT-0 y ESCRT-III, independiente de ESCRT-I y -II. La clasificación del cargamento en este caso es independiente de ubiquitinación y dependiente de sintenina (Teng & Fussenegger, 2021). **(Figura I5).**



Existen también mecanismos de formación de ILV independientes totalmente de ESCRT, capaces de funcionar sin necesidad de este complejo (Stuffers et al., 2009). Algunos de estos mecanismos alternativos incluyen la participación de lípidos como la ceramida, el colesterol

o la fosfolipasa D2 (Laulagnier et al., 2004; Strauss et al., 2010; Trajkovic et al., 2008). Es importante destacar que los exosomas contienen hasta tres veces más densidad de colesterol en membrana que la membrana plasmática, y su formación y expulsión al exterior contribuye en parte a la modulación dependiente de flotilina de la cantidad de colesterol en las membranas de la célula (Strauss et al., 2010). La presencia de flotilina y una alta concentración de lípidos en la membrana de los exosomas recuerda a las balsas lipídicas, y efectivamente, estas zonas específicas de la membrana son capaces de seleccionar cargamento para entrar en exosomas (de Gassart et al., 2003). Por otro lado, ciertas proteínas de la familia de las tetraspaninas, como CD63, una proteína muy utilizada como marcador de exosomas, o CD81, han sido propuestas como capaces de seleccionar el cargamento de los exosomas que van a ser secretados, de manera independiente al complejo ESCRT o a lípidos (Perez-Hernandez et al., 2013; van Niel et al., 2011).

Se desconoce si estos mecanismos pueden darse al mismo tiempo en un mismo MVB o si se trata de diferentes poblaciones independientes de MVB dentro de una misma célula. Por un lado, hay estudios que proponen que podrían trabajar de manera sinérgica (Maas et al., 2017), pero también hay evidencias que sugieren que existe heterogeneidad en los MVB, por lo que la teoría de subpoblaciones independientes es también válida (Buschow et al., 2009). Esta diversidad podría verse reflejada también en la heterogeneidad morfológica que se observa en los exosomas. Estudios morfológicos realizados en exosomas provenientes de la línea celular HMC-1 muestran hasta 9 subpoblaciones de exosomas distintas morfológicamente, que podrían tener funciones y propiedades específicas (Zabeo et al., 2017). Varios estudios han revelado que independientemente del mecanismo, la selección de cargamento al interior de exosomas depende de una gran diversidad de cambios post-traduccionales como ubiquitinación, SUMOilación, ISGilación, fosforilación, oxidación, citrulinación, glicosilación y miristoilación (Szabó-Taylor et al., 2015).

TRÁFICO DE VESÍCULAS INTRALUMINALES.

Una vez formados, los MVB pueden seguir dos rutas. Pueden fusionarse con vesículas provenientes del aparato de Golgi que contengan enzimas líticas, formando lisosomas, y degradar su contenido; o bien pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al espacio extracelular. Las ILV liberadas al exterior de la célula son los denominados exosomas. Se ha sugerido en varias ocasiones en la literatura, que el destino de los cuerpos multivesiculares a degradación o a la membrana plasmática para liberar su contenido depende de la homeostasis de la célula, y que los exosomas juegan un papel en la protección de las células contra el estrés intracelular (Baixauli et al., 2014b; Desdín-Micó & Mittelbrunn, 2017). Por ejemplo, un incremento en el calcio intracelular provoca un aumento en la secreción de exosomas al medio (Savina et al., 2003). No se tiene claro por qué las células responden al estrés liberando más exosomas, pero podría ser una manera alternativa de eliminar productos de desechos. Otra posibilidad es que las células puedan estar comunicándose con otras células vecinas para informarles del estrés intracelular que están sufriendo.

Los mecanismos que dirigen el movimiento de los MVB secretores de exosomas y su fusión con la membrana plasmática han sido descubiertos en los últimos años. El transporte de los cuerpos multivesiculares hasta la membrana plasmática depende de su interacción con actina y con microtúbulos del citoesqueleto (Sinha et al., 2016). Pero parece que el papel más importante en este proceso lo tiene la familia de proteínas Rab, pequeñas GTPasas que controlan diferentes aspectos del tráfico de vesículas intracelulares, como la formación y el movimiento de vesículas, el movimiento de orgánulos por el citoesqueleto y la fusión de vesículas con su diana específica (Stenmark, 2009). Miembros de esta familia de proteínas han sido asociados a exosomas desde los primeros estudios proteómicos (Théry et al., 2001). La familia de proteínas Rab interviene en el acoplamiento de los MVB a la membrana plasmática, requerimiento esencial para la posterior fusión y secreción de las vesículas presentes en su interior. Igual que ocurría con la biogénesis de los MVB, encontramos heterogeneidad en el mecanismo de acoplamiento y fusión de éstos con la membrana plasmática, de hecho, se ha comprobado que la secreción de exosomas regulada por Rab depende del tipo celular, implicándose unas u otras proteínas de la misma familia en distintas líneas celulares (Teng & Fussenegger, 2021). Esta heterogeneidad incluso dentro de la propia célula proporciona un argumento más a la teoría de que existen diferentes subpoblaciones de exosomas (Kowal et al., 2014). Las proteínas SNARE, junto con la familia de las Rab y otras Ras GTPasas, también participan en la fusión de los MVB con la membrana plasmática (Bonifacino & Glick, 2004; Pfeffer, 2007). Una vez liberados, los exosomas pueden viajar a través de los fluidos biológicos hasta tejidos muy alejados de su lugar de origen, donde se fusionarán con sus células diana. La introducción del exosoma en la célula tampoco es homogénea, y se han estudiado mecanismos dependientes e independientes de clatrina, endocitosis mediada por balsas lipídicas, endocitosis dependiente de sulfato de heparina, fagocitosis, fusión con la membrana plasmática o la fusión mediante proteínas de adhesión a receptores celulares (Rashed et al., 2017)

CONTENIDO Y FUNCIONES DE EXOSOMAS.

Los exosomas pueden contener gran variedad de moléculas en su interior, proteínas, lípidos, ARN mensajero o micro ARN, capaces de regular procesos clave en la homeostasis celular y en la diferenciación en su lugar de destino (Clayton et al., 2001). Esta composición parece parcialmente dependiente del tipo celular de origen y puede ser influenciada por ciertos contextos o tratamientos, teniendo en cuenta también que los exosomas liberados por una línea celular son ya de por sí heterogéneos en su contenido (Kowal et al., 2016). Estudios proteómicos realizados en gran variedad de líneas celulares, cultivos primarios y tejidos han proporcionado una gran cantidad de datos sobre las proteínas que pueden transportarse dentro de exosomas. Estos datos han sido catalogados en diversas bases de datos a lo largo del tiempo, como Vesiclepedia (www.microvesicles.org) o ExoCarta (www.exocarta.org) (Yáñez-Mó et al., 2015).

Respecto a las funciones de los exosomas, actualmente se cree que las células utilizan las EV como una forma de comunicación extracelular e intercambio de sustancias con otras células. Esta función permite a los exosomas participar en importantes procesos fisiológicos como el mantenimiento de células madre, reparación de tejidos, vigilancia inmunitaria, coagulación sanguínea, angiogénesis, apoptosis, homeostasis y señalización intercelular (Gurunathan et al., 2019). Pero esta función como intercambiador de sustancias les otorga también un rol en procesos patológicos, como la formación de tumores, expansión de virus (HIV-1) y transporte de agentes patogénicos como α -sinucleína, péptidos amiloides, priones, etc (Alvarez-Llamas et al., 2008; Emmanouilidou et al., 2010; Fevrier et al., 2004).

Los exosomas contienen proteínas de superficie que actúan como marcadores de la identidad del exosoma y de su carga molecular. Estas proteínas de superficie pueden ser una fuente de biomarcadores para condiciones patológicas, ya que durante ciertos procesos patológicos los exosomas sufren cambios en su composición, cantidad y tamaño (Müller, 2012; Wong & Chen, 2019). A parte de su papel en el estudio de ciertas patologías, los exosomas también son potenciales herramientas para tratar enfermedades. Su falta de toxicidad, su baja inmunogenicidad, su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y la posibilidad de producirlos a gran escala también hacen de los exosomas unos potenciales agentes terapéuticos, y abren las puertas del estudio de una nueva estrategia para elaborar sistemas de liberación de drogas muy específicos (Braicu et al., 2015). Por ejemplo, exosomas provenientes de células madre mesenquimales inhiben la expresión de citoquinas proinflamatorias y provocan efectos antiinflamatorios, además de promover la regeneración tisular (Lee et al., 2012; Teng et al., 2015; Willis et al., 2017; Xin et al., 2013; Yu et al., 2015).

VESÍCULAS EXTRACELULARES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Todas las células neuronales estudiadas liberan EV, y es bien sabida la implicación de estas vesículas en procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso como la neuromodulación, la plasticidad sináptica, las interacciones entre neurona y glía y la propagación de agentes neuropatológicos (Saeedi et al., 2019). Las neuronas y los astrocitos son capaces de comunicarse a través de exosomas. Las neuronas secretan exosomas con moléculas reguladoras en su interior, que una vez internalizadas por los astrocitos desencadenan modificaciones de la expresión de transportadores de glutamato en estas células (Morel et al., 2013). Por su lado, exosomas derivados de la glía son capaces de promover el crecimiento de neuritas en neuronas hipocámpales e incrementar la supervivencia de las neuronas corticales, favoreciendo así el desarrollo y el mantenimiento del circuito neuronal (Bavisotto et al., 2019). Existen evidencias también de que EV secretadas por células en la periferia del sistema nervioso pueden entrar al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica para realizar allí diversas funciones (Krämer-Albers & Ping Kuo-Elsner, 2016). Recientemente, las vesículas extracelulares se han relacionado con el transporte de proteínas clave de enfermedades neurológicas entre distintas regiones del cerebro o incluso distintas zonas del sistema nervioso central. Vesículas extracelulares creadas en el sistema

nervioso central son también capaces de verterse en la sangre periférica y proporcionar así una fuente de información accesible del cerebro (Shi et al., 2019)

ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE EXOSOMAS.

A pesar de las importantísimas potenciales aplicaciones para los exosomas, su utilización trae consigo desafíos tanto técnicos como biológicos, destacando la dificultad para obtener una cantidad suficiente de exosomas, y que las muestras no tengan demasiadas impurezas o artefactos (Yamashita et al., 2018)

El estudio de las moléculas involucradas en el proceso de biogénesis de exosomas y cómo interactúan entre sí es muy complejo debido a que no existe un consenso en la literatura sobre la metodología y las condiciones adecuadas para estudiarlo. El estudio de los exosomas es un campo muy nuevo, la metodología evoluciona de manera muy rápida, y numerosos errores o problemas son continuamente descubiertos y tratados de solucionar. La heterogeneidad en la metodología utilizada provoca un notable problema de reproducibilidad en los estudios sobre exosomas (Hessvik & Llorente, 2018). Algunos de los problemas más acuciantes a la hora de estudiar el campo de los exosomas son los siguientes:

- » Estudios comparativos sugieren que distintas líneas celulares liberan diferentes cantidades de exosomas, incluso podrían llegar a tener mecanismos moleculares específicos (Hosseini-Beheshti et al., 2012). Esto hace plantearse la necesidad de estudiar varias líneas celulares a la hora de generalizar sobre la función de una molécula específica en el proceso de liberación de exosomas.
- » La metodología más utilizada a la hora de purificar exosomas es la centrifugación secuencial del medio extracelular en el que crece el cultivo celular. Este método incluye 2 o 3 pasos de centrifugación a bajas velocidades para quitar restos de células y microvesículas, seguidas por una ultracentrifugación (Théry et al., 2006). El pellet conseguido después de la ultracentrifugación es todavía bastante heterogéneo, y en él se pueden encontrar tanto exosomas como otras microvesículas de un tamaño similar, juzgando por los marcadores específicos encontrados (Kowal et al., 2016). Además de esto, los autofagosomas pueden contener gotas de lípidos en su interior que serán liberadas al exterior y purificadas mediante este método junto con los exosomas, provocando contaminaciones en los estudios proteolipídicos de estas vesículas (Hessvik et al., 2016; Skotland et al., 2017).
- » Métodos de purificación de exosomas alternativos a la centrifugación seriada, como la utilización de centrifugaciones con gradientes de densidad, o métodos que se basan en inmunoafinidad, permiten obtener un mayor nivel de pureza, pero la cantidad de muestra obtenida es muy baja y requiere de protocolos más extensos que necesitan de optimización y mayores recursos (Mathivanan et al., 2010; van Deun et al., 2014).

Es evidente que el método de recuperación de exosomas que se elija puede afectar en gran medida a los resultados obtenidos, y por lo tanto es determinante tenerlo en cuenta. Con el fin de conseguir estandarizar los métodos utilizados en la literatura y de solucionar el problema de reproducibilidad que ha aparecido en muchos estudios realizados hasta la fecha, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) ha escrito varios artículos estableciendo requisitos mínimos para el estudio de estas microvesículas (Lötvald et al., 2014; Théry et al., 2018), y en 2017 lanzaron la plataforma EV-TRACK (van Deun et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

ARMS/Kidins220 es una proteína adaptadora transmembrana cuya estructura y distribución le posibilitan participar en importantes funciones celulares. Hasta el momento se ha estudiado la implicación de ARMS en la señalización por neurotrofinas (Arévalo et al., 2004, 2006; Hisata et al., 2007), en la actividad neuronal (Arévalo et al., 2010; Cortés et al., 2007; López-Menéndez et al., 2009; Wu et al., 2010), y en la regulación del citoesqueleto (Higuero et al., 2010; Neubrand et al., 2010), pero todavía existen muchas potenciales funciones por identificar para esta proteína.

En 2013 se llevó a cabo una espectrometría de masas para identificar proteínas capaces de interactuar con ARMS en neuronas corticales, con la finalidad de encontrar indicios de posibles nuevas funciones. Entre la extensa cantidad de datos que proporcionó el experimento se identificaron las proteínas HRS, STAM, TSG101 y VPS4, todas ellas miembros del complejo ESCRT, y fundamentales para la biogénesis de exosomas (Colombo et al., 2013). El estudio de estas vesículas está creciendo exponencialmente en la última década debido a su importancia biológica y a su potencial terapéutico y los datos obtenidos parecían indicar que ARMS podría estar relacionado con su formación. Por todo ello, decidimos establecer el siguiente objetivo, y planteamos distintas aproximaciones para abordarlo.

Objetivo 1. Estudiar el papel de ARMS en la biogénesis y secreción de exosomas.

- » Comprobar si existe una regulación e interacción entre ARMS y cuatro proteínas clave en la biogénesis de exosomas (HRS, STAM, TSG101 y CD63).
- » Analizar la cantidad de exosomas secretados por distintas líneas celulares cuando se alteran los niveles de expresión de ARMS.

La proteína ARMS se identificó por primera vez por su relación con los receptores de neurotrofinas y la señalización mediada por estas (Kong et al., 2001). Esta interacción ha sido estudiada en profundidad con respecto al receptor TrkA. Se sabe que ARMS es capaz de formar un complejo ternario con TrkA y el receptor p75^{NTR} (Chang et al., 2004), y se ha estudiado la implicación de ARMS en la activación de las MAPK dependiente del eje NGF/TrkA (Arévalo et al., 2004, 2006; Hisata et al., 2007). Sin embargo, su relación con los receptores TrkB y TrkC ha recibido mucha menos atención. Sabemos que ARMS se fosforila en respuesta a la estimulación por BDNF del receptor TrkB (Arévalo et al., 2004), y observaciones previas en el laboratorio nos sugerían que ARMS podría estar a su vez modulando la fosforilación del receptor. Teniendo todo esto en cuenta nos planteamos el siguiente objetivo, y lo abordamos siguiendo las aproximaciones detalladas a continuación:

Objetivo 2. Estudiar el papel de ARMS en la regulación de la activación de los receptores TrkB y TrkC e identificar de sus posibles mecanismos.

- » Caracterizar la modulación de la activación dependiente de ligando de TrkB y TrkC dependiente de ARMS en neuronas corticales.
- » Comprobar si ARMS está modulando la cantidad de TrkB y TrkC en la membrana plasmática.
- » Estudiar si ARMS requiere de las balsas lipídicas para ejercer su modulación sobre la activación de TrkB y TrkC.
- » Investigar si las fosfatasa de tirosina están involucradas en la modulación que ejerce ARMS sobre la activación de TrkB y TrkC.
- » Analizar el posible papel de la fosfatasa PTP1B en la modulación de la activación de TrkB por parte de ARMS.

AGRADECIMIENTOS

La vida del investigador puede parecer una vida solitaria, juzgando por las largas jornadas en la sala de cultivos o delante del ordenador, pero requiere de una importante red de apoyo. Requiere de gente con la que compartir tus ideas, tus sentimientos, en la que apoyarte si las cosas van mal y con la que compartir las cosas que van bien. En este apartado quería mencionar a todos aquellos que han formado parte de mi red de apoyo, y sin los que este trabajo probablemente no existiría.

En primer lugar debo agradecer sin duda a **Juan Carlos**, mi director de tesis, quien confió en mí desde el primer momento y me dio la oportunidad y los medios para poder introducirme en el mundo de la investigación. Sus enseñanzas y su apoyo han sido indispensables para poder realizar este trabajo. Inmediatamente después tengo que agradecer a mis compañeros de laboratorio. A **Julia** y a **Cris**, con quien he compartido estos 5 años, el corazón y el alma de este laboratorio, más necesarias para que todo funcione que las pipetas, os echaré de menos. A **Dani**, **Carlos**, a **Saray** y a **Silvia**, compañeros de viaje, de los que he aprendido muchísimo, tanto a nivel científico como personal. Hablando de aprender, debo mencionar a **Dionisio** y a **Rubén**, fuentes incansables de sabiduría y conocimiento con los que siempre puedes contar para recibir buenos consejos. Y finalmente a mis **compañeros** del centro, a las personas con las que he compartido tantas comidas, tantas conversaciones y buenos momentos de desconexión, la pandemia ha truncado esos momentos que teníamos, pero no ha hecho que me olvide de ellos.

Si el apoyo dentro del laboratorio ha sido importante, el de fuera ha sido fundamental. Empezando por **mis padres**, mi familia, que me apoya en todos y cada uno de los pasos que doy, su orgullo me da fuerzas para seguir adelante. Tengo que agradecer a la gente que realmente ha tenido que aguantarme en los peores momentos. La gente habla de que las amistades a distancia no son de verdad, y yo tengo tantos argumentos en contra de esa teoría que podría escribir otra tesis. De entre todas las personas que me han escuchado y me han apoyado y a las que agradezco estar ahí con todo mi corazón, me gustaría destacar algunos nombres. A **Marta**, por estar siempre, todas las noches, sin falta. A **Érika**, por ser mi hermana de tesis. A **Clau** y **David**, mis confidentes. A **Blanca**, mi compañera de aventuras. Y a **Cris**, porque sin su ayuda este trabajo habría sido mucho más feo, mi salvadora.

También quería aprovechar para dejar constancia de la importancia de la vida fuera de la investigación, del trabajo. Esta es una carrera que absorbe, que exige, y tener cosas fuera que realmente te importan es imprescindible. Yo en estos años de doctorado he encontrado dos cosas muy importantes que me han ayudado probablemente más de lo que sé, el boxeo y los juegos de rol. Me han ayudado a evadirme, me han permitido acercarme al grupo de personas más increíbles que he conocido y me han permitido ver la vida con otra perspectiva.

Yo entré en el programa de doctorado con la intención de aprender, y sin duda es un objetivo que he alcanzado con creces. No solo he aprendido sobre técnicas de laboratorio, moléculas, resolución de problemas, si no que he aprendido sobre mi misma y sobre cómo vivir en el mundo que me rodea. Ha sido una experiencia. Toca descubrir cuál será la siguiente. Este trabajo se terminó a fecha veintiséis de mayo de dos mil veintiuno, en el

Este trabajo se terminó a fecha veintitrés de Julio de dos mil veintiuno, en el
Instituto de Neurociencias de Castilla y León,
Salamanca