



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Regulación del receptor de neurotrofinas TrkA mediante la proteína Bex3

Laura Calvo Enrique

Tesis Doctoral

Salamanca, 2013

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

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

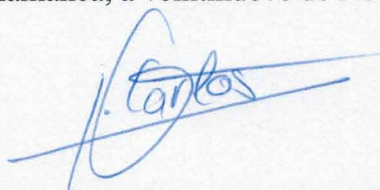
D. Juan Carlos Arévalo Martín, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular y Patología y miembro del Instituto de Neurociencias de Castilla y León,

CERTIFICA,

Que D.^a Laura Calvo Enrique, licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral “Regulación del receptor de neurotrofinas TrkA mediante la proteína Bex3”.

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 veintinueve de Noviembre de dos mil trece.



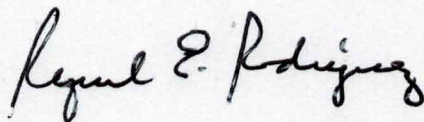
Fdo. D. Juan Carlos Arévalo Martín

Doña 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 “Regulación del receptor de neurotrofinas TrkA mediante la proteína Bex3”, ha sido realizada por D.^a Laura Calvo Enrique, licenciada en Farmacia, bajo la dirección del Dr. D. 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 veintinueve de Noviembre de dos mil trece.



Fdo. D.^a Raquel E. Rodríguez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Juan Carlos Arévalo la oportunidad que me dió hace ya cinco años de entrar en su laboratorio y descubrir el mundo de la investigación en primera persona. También quería agradecer al Dr. Dionisio Martín Zanca su gran ayuda; sin ellos esta tesis no hubiese sido posible. Al Dr. Javier Herrero quería agradecer toda la ayuda que me ha prestado con aquello que yo desconocía.

Por supuesto quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, toda la ayuda que me han prestado. En especial a Bego, a Saray, a Cris y a Tao que siempre han estado ahí. Sin olvidar a Antonio y a Saúl con los que también he compartido el día a día y porque todos ellos más que compañeros son amigos.

Finalmente, a Marcelo y a mis padres.

Muchas gracias!

ÍNDICE

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Las neurotrofinas y sus receptores.....	3
1.1. Antecedentes históricos: descubrimiento del NGF y teoría neurotrófica...	3
1.2. Las neurotrofinas.....	3
1.3. Funciones de las neurotrofinas.....	5
1.4. Los receptores de neurotrofinas Trk.....	6
1.4.1. Estructura y afinidad.....	6
1.4.2. Activación y cascadas de señalización.....	8
1.5. El receptor p75 ^{NTR}	12
2. El receptor específico del NGF: TrkA.....	15
2.1. Patrón espacio-temporal de expresión del gen <i>trkA</i>	15
2.2. Ratones Knock-out para <i>trkA</i> y <i>ngf</i>	16
2.3. Expresión de <i>trkA</i> mediada por NGF.....	18
2.4. Descubrimiento del promotor mínimo del gen <i>trkA</i>	18
2.5. Factores de transcripción implicados en la expresión de TrkA en DRG.....	19
3. La proteína Bex3.....	23
3.1. El descubrimiento de una nueva familia de genes: Bex (Brain Expressed X-linked).....	23
3.2. Caracterización de la proteína Bex3.....	24
3.3. Otros miembros de la familia Bex.....	27
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Disecciones.....	31
1.1. Disección de neuronas de ganglios raquídeos de embriones de rata.....	31
1.2. Disección de neuronas de hipocampo de embriones de rata.....	32
2. Cultivos celulares.....	32
2.1. Líneas celulares.....	32
2.1.1. HEK293-293FT.....	32
2.1.2. Neuro-2a (N2a).....	33
2.1.3. PC12.....	33
2.1.4. PC12-6/15.....	33
2.1.5. Mantenimiento y congelación/descongelación de las células.....	33
2.2. Cultivos primarios.....	34
2.2.1. Neuronas de los ganglios raquídeos.....	34
2.2.2. Neuronas de hipocampo.....	35

3. Métodos de transfección.....	35
3.1. Fosfato cálcico.....	35
3.2. Lipofectamina 2000 TM	35
4. Inmunoprecipitación.....	36
• Unión covalente de anticuerpos a proteína A/G agarosa.....	36
5. Fraccionamiento celular.....	37
6. Western blot.....	38
7. Inmunofluorescencia.....	40
8. Construcciones plasmídicas.....	41
8.1. Manipulación bacteriana.....	41
8.1.1. Crecimiento en medio sólido y en medio líquido.....	41
8.1.2. Transformación.....	41
8.2. Manipulación del DNA.....	42
8.2.1. Obtención de DNA plasmídico.....	42
8.2.2. Digestión y ligación de DNA.....	42
8.2.3. Purificación de fragmentos de DNA.....	43
8.3. Construcciones: shRNA.....	43
8.3.1. Diseño de los cebadores.....	43
8.3.2. Anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos.....	44
8.3.3. Defosforilación del vector.....	44
8.4. Construcciones: pEGFP-Bex3 resistente.....	44
8.5. Construcciones: pWPI-GFP-Bex3.....	46
8.6. Construcciones: pEGFP-Bex3 L94,97A.....	46
9. Obtención de partículas lentivirales.....	47
10. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.....	48
10.1. Extracción del ácido ribonucleico (RNA) de células en cultivo.....	48
10.2. Retrotranscripción - síntesis de la primera cadena.....	49
10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
10.4. qPCR (a tiempo real).....	50
11. Hibridación <i>in situ</i>	50
11.1. Generación de las sondas.....	50
11.2. Dot Blot.....	51
11.3. Preparación de los cortes.....	52
11.4. Hibridación <i>in situ</i>	52
11.5. Hibridación <i>in situ</i> e inmunofluorescencia.....	53
12. Ensayo enzimático de inmunoadsorción (ELISA).....	53
13. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	54
14. Análisis estadístico.....	55
Lista de tampones.....	56

IV. RESULTADOS

Previo: ensayo de doble híbrido.....	58
1. Interacción entre las proteínas TrkA y Bex3.....	60
1.1 Co-inmunoprecipitaciones.....	60
1.2. Mapeo de la interacción entre Bex3 y TrkA.....	61
1.2.1. Región del receptor implicada en la interacción.....	61
1.2.2. Región de la proteína Bex3 implicada en la interacción.....	62
2. Patrón de expresión de <i>trkA</i> y <i>bex3</i> durante el desarrollo embrionario del ratón.....	63
3. Bex3 regula específicamente los niveles de TrkA a través de su mRNA.....	65
3.1. Descenso de los niveles de Bex3 mediante un shRNA.....	66
3.2. Modulación de los niveles de TrkA al reducir Bex3.....	67
3.3. Bex3 no modula la estabilidad de la proteína TrkA.....	68
3.4. Bex3 regula los niveles de TrkA a través de la modulación de los niveles de su mRNA.....	69
3.5. Especificidad del efecto de Bex3 sobre TrkA.....	70
4. Bex3 modula la actividad transcripcional del promotor de <i>trkA</i>	71
4.1. La expresión de Bex3 modula la actividad transcripcional del promotor de <i>trkA</i>	72
4.2. La proteína Bex3 se une a la región promotora de <i>trkA</i>	73
5. Tráfico citoplasma - núcleo de la proteína Bex3.....	76
6. Efecto del NGF sobre la actividad transcripcional del promotor de <i>trkA</i> y la dimerización de Bex3 en el núcleo celular.....	79
7. Implicación de la proteína Bex3 en supervivencia y diferenciación.....	81

V. DISCUSIÓN	87
---------------------	-----------

VI. CONCLUSIONES	97
-------------------------	-----------

VII. BIBLIOGRAFÍA	99
--------------------------	-----------

ABREVIATURAS

5-FU (5-Fluorouridina)	ERK (Quinasas reguladas por señales extracelulares)
°C (grado centígrado)	FAP-1 (<i>Fas-associated phosphatase 1</i>)
A (Alanina)	FBS (Suero bovino fetal)
aa (Aminoácido)	FGF (<i>Fibroblast growth factor</i>)
AC (Anticuerpo casero)	FITC (Isotiocianato de fluoresceína)
APS (Persulfato de amonio)	FKHRL1 (<i>Forkhead homolog rhabdomyosarcoma like 1</i>)
ARMS (<i>Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein</i>)	FRS2 (Sustrato 2 del receptor FGF)
BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro)	Gab1 (<i>Grb2-associated binder-1</i>)
BEX (<i>Brain expressed X linked</i>)	GEF (Factor de intercambio de nucleótidos de guanina)
BS (Suero bovino)	GFP (Proteína verde fluorescente)
BSA (Albumina sérica bovina)	GPCR (Receptor acoplado a proteínas G)
C (Cisteína)	Grb2 (<i>Protein G-related α-binding 2</i>)
CAT (Cloranfenicol acetil transferasa)	GST (Glutation S-transferasa)
cdNA (Ácido desoxirribonucleico complementario)	h (hora)
CIP (<i>Calf intestinal phosphatase</i>)	HA (Epítipo de Hemaglutinina)
CREB (Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico)	HBS (Tampón HEPES salino)
DAG (Diacilglicerol)	HBSS (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
DD (Dominio de muerte)	HEK (<i>Human embryonic kidney</i>)
DIV (Días in vitro)	HRP (<i>Horseradish peroxidase</i>)
DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)	HS (Suero de caballo)
DMSO (Dimetilsulfóxido)	ICD (Dominio intracelular)
dNTPs (Desoxi nucleótidos trifosfato)	IF (Inmunofluorescencia)
DRG (Ganglio raquídeo)	Ig (Inmunoglobulina)
E (día embrionario)	IP3 (Inositol trifosfato)
ECD (Dominio extracelular)	IP (Inmunoprecipitación)
EDTA (Ácido etilendiamino tetra-acético)	JM (Dominio juxtamembrana)
ELISA (Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima)	JNK (<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>)
	K (Lisina)
	KO (<i>Knock out</i>)

L (Leucina)
LMB (Leptomycin B)
LRR (Región rica en leucinas)
M (Molar)
MAPK (Mitogen activated protein kinases)
MEM (*Minimum essential medium*)
min (Minutos)
mL (Mililitro)
mM (Milimolar)
mRNA (Ácido ribonucleico mensajero)
NEAA (*Non-essential amino acids*)
NES (Secuencia de exportación nuclear)
NGF (Factor de crecimiento nervioso)
NGS (*Normal goat serum*)
NRAGE (*Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog*)
NRIF (*Neurotrophin-receptor interacting factor*)
NT (Neurotrofina)
p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*)
PACAP (Polipéptido activador de adenilato ciclasa de pituitaria)
pb (Pares de bases)
PBS (Tampón fosfato salino)
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDL (Poli-D-Lisina)
PFA (Paraformaldehído)
PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinasa)
PIP₂ (Fosfatidilinositol bifosfato)
PKC (Protein quinasa C)
PLC-γ (Fosfolipasa C gamma)
PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*)
PTB (Dominio de unión a fosfotirosina)
PVDF (*Polyvinylidene difluoride*)
R (Arginina)
RhoA (*Ras homolog family member A*)
RIP2 (*Receptor-interacting protein 2*)
RPM (Revoluciones por minuto)
RT (Transcripción reversa)
S (Serina)
SC-1 (*Schwann cell factor-1*)
SDS (Docecil sulfato sódico)
S.E.M. (Error estándar de la media)
Seg (Segundos)
SH2 (Dominio 2 de homología a *src*)
Shc (*Src Homology 2 domain-containing transforming protein C*)
shRNA (*small hairpin RNA*)
SN (Sistema nervioso)
SNC (Sistema nervioso central)
SNP (Sistema nervioso periférico)
Src (*Rous sarcoma oncogene*)
TACE (*Tumor necrosis factor-α converting enzyme*)
TE (Tampón Tris-EDTA)
TEMED (Tetraetilenmetilendiamina)
TK (Dominio catalítico tirosina quinasa)
TM (Dominio transmembrana)
TNF (Factor de necrosis tumoral)
TRAF (*TNF receptor-associated factor*)
TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)
TRIS (Tris hidroximetil-aminometano)
TRITC (Isotiocianato de rodamina)
Trk (*Tropomyosin-related kinase*)
WB (*Western blot*)
WT (Tipo silvestre)

INTRODUCCIÓN

1 LAS NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES

1.1 Antecedentes históricos: descubrimiento del NGF y teoría neurotrófica

En 1892, Santiago Ramón y Cajal publicó un artículo en la revista *La Cellule* donde proponía una teoría según la cual, los conos de crecimiento se orientan hacia sus dianas atraídos por sustancias específicas. Obviamente, en aquel momento Cajal desconocía el concepto que hoy tenemos de factor neurotrófico, pero ya por aquel entonces anticipó lo que sería el inicio de la teoría neurotrófica. Fue en la década de 1950 cuando se descubrió el primer factor neurotrófico. Los trabajos de Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger y Stanley Cohen fueron los que condujeron al descubrimiento de una molécula que sintetizada por las células diana, era capaz de promover la supervivencia de las neuronas aferentes; se le denominó factor de crecimiento nervioso o *Nerve Growth Factor* (NGF). Esta molécula promovía la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico de las neuronas simpáticas del sistema nervioso periférico (Cohen, 1960; Cohen & Levi-Montalcini, 1956). A partir de ese momento, se estableció la teoría neurotrófica que postula que las neuronas son producidas en exceso durante el desarrollo y los factores neurotróficos funcionan como factores de supervivencia para las neuronas pero son producidos en cantidades limitantes. Aquellas neuronas que no establezcan conexiones con su célula diana o que lo hagan de manera incorrecta morirán puesto que no lograrán obtener la cantidad necesaria de factor neurotrófico. De este modo, se asegura una concordancia entre el número de neuronas que sobreviven y el requisito de inervación adecuado de cada tejido.

1.2 Las neurotrofinas

Tras el descubrimiento del NGF como factor neurotrófico en el sistema nervioso periférico, se observó que la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central no respondían a dicho factor y comenzó la búsqueda de nuevos factores. En la década de los años ochenta, se aisló el factor neurotrófico derivado del cerebro o *Brain Derived Neurotrophin Factor* (BDNF) (Barde et al, 1982). Se vio que la secuencia de la proteína BDNF presentaba gran homología en la secuencia del NGF y la conservación en las secuencias favoreció el aislamiento de nuevos miembros. Se estableció una correlación funcional a partir de una correlación estructural (Leibrock et al, 1989).

Introducción

En mamíferos la familia de las neurotrofinas (NTs) está compuesta por cuatro miembros: el NGF, el BDNF, la neurotrofina 3 (NT-3) (Ernfors et al, 1990; Hohn et al, 1990) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Hallbook et al, 1991). En peces, se han descrito además otras dos neurotrofinas: NT-6 y NT-7 (Gotz et al, 1994; Lai et al, 1998).

Las neurotrofinas son pequeños polipéptidos sintetizados y secretados principalmente por neuronas del sistema nervioso tanto central como periférico, pero también por células no neuronales de diferentes tejidos. Son inicialmente sintetizadas como precursores a partir de un único exón como pre-pro-neurotrofinas, constituidas desde el extremo amino terminal, por un péptido señal, un pro-dominio y un extremo carboxilo terminal que constituirá la molécula madura con actividad neurotrófica. Cada precursor tiene que sufrir dos proteólisis: una primera escisión en el retículo endoplasmático que eliminará el péptido señal y una segunda que escindiré el pro-dominio para dar lugar a la proteína madura. La secuencia de corte del pro-dominio está altamente conservada y está constituida por aminoácidos dibásicos. En el caso del pro-NGF la secuencia es reconocida por la endoproteasa Furina (Seidah et al, 1996; Shooter, 2001). Las proteínas maduras presentan seis cisteínas altamente conservadas entre las cuales se crean puentes disulfuro dando lugar a una estructura particular que se denomina "nudo de cisteínas" (Bibel & Barde, 2000; McDonald et al, 1991). Se ha descrito que las neurotrofinas son sintetizadas y liberadas en respuesta a la actividad neuronal (Hall et al, 2000; Thoenen, 1995).

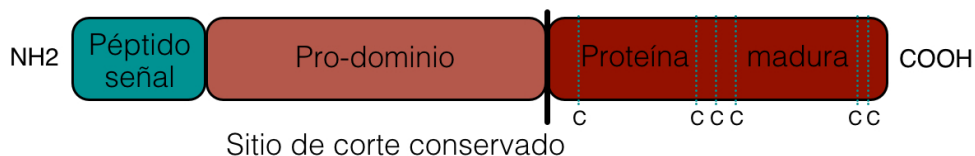


Figura 1. Esquema de la estructura de las pre-pro-neurotrofinas. Modificado de Thoenen, 1995. Las pre-pro-neurotrofinas están constituidas desde su extremo N-terminal por un péptido señal que se escinde en el retículo endoplasmático cuando la proteína ha entrado en la ruta de secreción. A continuación, presentan un pro-dominio que será escindido por una endoproteasa, a través de un sitio de corte altamente conservado. El extremo C-terminal tras el procesamiento proteolítico constituirá la proteína madura con actividad neurotrófica. Están representados los seis residuos de cisteína (C) conservados que formarán puentes disulfuro.

Cabe destacar que existe cierta discrepancia sobre si la escisión del pro-dominio es un requisito previo indispensable para su secreción o no. Diferentes grupos han publicado datos opuestos. Por un lado, se ha publicado que pro-NGF y pro-BDNF son

secretados y pueden ser procesados posteriormente en el medio extracelular por diversas proteasas (Lee et al, 2001; Yang et al, 2009). Por otro, se ha publicado que la escisión del pro-BDNF es necesaria para su secreción (Matsumoto et al, 2008).

1.3 Funciones de las neurotrofinas

El estudio de las neurotrofinas (NTs) desde su descubrimiento hasta hoy no ha dejado de aumentar lo que ha favorecido que cada vez se conozca más y mejor las funciones en las que participan. Inicialmente, se describió que las NTs eran esenciales para el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados y críticas para la diferenciación y la supervivencia de poblaciones neuronales específicas (Snider, 1994). Además, las NTs regulan el crecimiento axonal y dendrítico, las conexiones sinápticas, la expresión de proteínas cruciales para una correcta función neuronal (como por ejemplo, neurotransmisores o canales iónicos) y regular la plasticidad sináptica. Revisado en Arevalo & Wu, 2006; Bibel & Barde, 2000; Chao, 2003.

La implicación de las neurotrofinas en procesos cognitivos tales como el aprendizaje y la memoria (Hall et al, 2000; Soliman et al, 2010), junto con la controversia existente sobre su presencia en *D. Melanogaster*, hacía suponer que las neurotrofinas no eran necesarias para el desarrollo de los circuitos neuronales, pero que estaban implicadas en altos órdenes de actividad (Chao et al, 2003). Sin embargo, ciertas evidencias recientes de que las neurotrofinas como sus receptores están presentes en *D. Melanogaster* (Chao, 2003; Pulido et al, 1992; Sutcliffe et al, 2013; Zhu et al, 2008), hace suponer una mayor implicación de las neurotrofinas en la formación del sistema nervioso no solamente de los vertebrados.

La alteración en los niveles de neurotrofinas está implicada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington (Boissiere et al, 1997; Matrone et al, 2009; Zuccato et al, 2001). Así mismo, se ha demostrado la implicación de las neurotrofinas en la depresión y en el abuso de drogas. Por todo ello, se puede afirmar que las funciones de las neurotrofinas median desde el desarrollo neuronal hasta la neurodegeneración, incluyendo los trastornos psiquiátricos (Chao et al, 2006).

1.4 Los receptores de neurotrofinas Trk

Las neurotrofinas ejercen sus funciones a través de dos tipos de receptores transmembrana: los receptores de tipo Trk (*Tropomyosin-Related Kinase*) que pertenecen a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) y el receptor p75^{NTR} (p75 neurotrophin receptor) perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR).

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. Se le denominó p75^{NTR} puesto que unía todas las neurotrofinas. A pesar de que se había demostrado la unión entre el receptor p75^{NTR} y el NGF, ésta era de baja afinidad (Radeke et al, 1987). Por otro lado, se había visto que el NGF inducía fosforilación en tirosina en células PC12 pero no a través de p75^{NTR}, por lo que se pensó que debía existir otro receptor que uniese NGF con mayor afinidad y con ciertas características que p75^{NTR} no poseía.

Paralelamente, también en el año 1986 el Dr. Martín Zanca y colaboradores describieron una nueva forma oncogénica con actividad tirosina quinasa (Martin-Zanca et al, 1986a; Martin-Zanca et al, 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 se describió que TrkA y TrkB eran los receptores para las neurotrofinas NGF y BDNF, respectivamente (Kaplan et al, 1991; Klein et al, 1991). TrkC fue descrito en último lugar siendo el principal receptor para NT-3 (Lamballe et al, 1991).

1.4.1 Estructura y afinidad

Los receptores Trk pertenecen a la familia de los RTK, pero se distinguen de otros miembros de esta familia principalmente por la organización estructural de sus dominios extracelulares. En su dominio extracelular, contienen dos regiones ricas en cisteínas encontrándose entre ellas un dominio con tres motivos ricos en leucinas. A continuación, se encuentran dos dominios de tipo inmunoglobulina-C2. Presentan un único paso transmembrana y finalmente, en la región intracelular presentan un dominio con actividad tirosina quinasa (TK) y un corto extremo carboxilo terminal.

Cabe destacar la presencia de diversas tirosinas conservadas en la parte citoplasmática. Al igual que otros RTKs, la fosforilación de estas tirosinas regula su actividad y proporciona los sitios de reclutamiento de moléculas adaptadoras y enzimas que intervienen en la iniciación de las cascadas de señalización intracelular (Bibel & Barde, 2000; Huang & Reichardt, 2003; Patapoutian & Reichardt, 2001; Sofroniew et al, 2001).

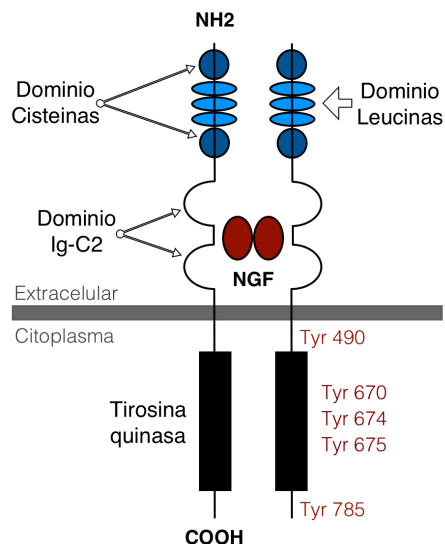
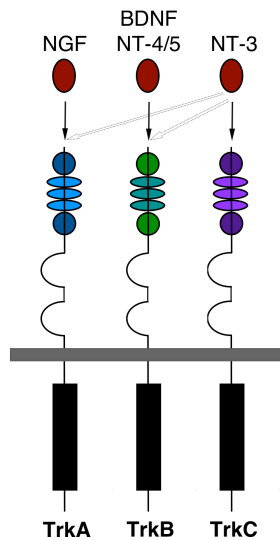


Figura 2. Esquema representativo de la estructura del receptor de neurotrofinas TrkA. Desde el extremo amino terminal, presenta un dominio rico en leucinas, flanqueado por dos dominios ricos en cisteínas. A continuación contiene dos dominios del tipo inmunoglobulina (Ig), atraviesa la membrana plasmática y en la parte citoplasmática presenta el dominio con actividad tirosina quinasa. Las tirosinas (Tyr) que regulan la activación del receptor y proporcionan los sitios de anclaje para iniciar las cascadas de señalización intracelular se indican según la nomenclatura del receptor TrkA humano.

Múltiples estudios han demostrado que las neurotrofinas se unen al segundo dominio del tipo inmunoglobulina (Ig-2), pero se ha visto que el primer dominio (Ig-1) también está implicado, así como que los dominios ricos en cisteína y en leucina tienen un efecto modulador en dicha interacción (Perez et al, 1995; Urfer et al, 1998; Wiesmann et al, 2000). Se puede decir, que cada uno de los dominios extracelulares de los receptores Trk ayuda a modular la unión del ligando, ya sea por la interacción directa con las neurotrofinas o por la modulación de los cambios conformacionales en los dominios de unión (Arevalo et al, 2001; Wehrman et al, 2007). Las neurotrofinas crean dímeros activos estables no covalentes y se unen a los receptores Trk en forma de dímeros (McDonald et al, 1991).



A pesar de que la secuencia y la estructura de las neurotrofinas es muy similar entre ellas, difieren enormemente, en su afinidad por los tres receptores Trk. El NGF se une específicamente a TrkA, el BDNF a TrkB y la NT-3 se une preferentemente a TrkC, aunque tiene cierta promiscuidad, ya que también puede unirse a TrkA y TrkB. La NT4/5 también se une a TrkB aunque con menor afinidad que el BDNF (Arevalo & Wu, 2006).

Figura 3. Afinidad de las neurotrofinas hacia los diferentes receptores Trks.

El procesamiento alternativo del exón 9 del gen *trkA* puede dar lugar a dos isoformas denominadas TrkA-I y TrkA-II, que se diferencian por una inserción de seis aminoácidos en la región yuxtamembrana extracelular en TrkA-II (Barker et al, 1993). La isoforma TrkA-I presenta una disminución en su afinidad hacia la NT-3 pero sorprendentemente, no disminuye la afinidad hacia el NGF (Clary & Reichardt, 1994).

Tras el descubrimiento del receptor TrkA se vio que unía NGF con una afinidad similar a la observada con $p75^{NTR}$. Entonces surgieron diversas hipótesis sobre los receptores de alta y baja afinidad. Se observó que la presencia/ausencia del receptor $p75^{NTR}$ modulaba la afinidad de las neurotrofinas por sus receptores. Así en presencia de $p75^{NTR}$, NT-3 se une de manera menos eficiente a TrkA y NT4/5 a TrkB. En otras palabras, la presencia de $p75^{NTR}$ aumenta la especificidad de TrkA y TrkB hacia sus ligandos principales (Clary & Reichardt, 1994). Se esclareció así que $p75^{NTR}$ y TrkA eran necesarios para crear los sitios de alta afinidad (Mahadeo et al, 1994).

1.4.2 Activación y cascadas de señalización

Al igual que sucede con el resto de miembros de la familia de los RTK, la unión del ligando provoca la dimerización del receptor. De esta manera, dos dominios TK se encuentran lo suficientemente próximos para que se produzca la autofosforilación en *trans* en los residuos de tirosina situados en los lazos de activación del dominio TK.

El estudio de los acontecimientos que siguen a la activación de los receptores Trk ha revelado una compleja red de vías de señalización que aún no se comprende

totalmente y que incluye numerosas proteínas. La fosforilación de los residuos de tirosina en el lazo de activación tiene dos funciones básicas: la primera es la *trans*-fosforilación eficiente de otros residuos de tirosina esenciales para la propagación de la señal y la segunda es proporcionar lugares de anclaje para proteínas específicas que sirvan de adaptadores.

En el receptor TrkA humano, tras la unión del NGF se fosforilan inicialmente cinco tirosinas, tres localizadas en la región catalítica (Y670, Y674 y Y675) y dos fuera de ella (Y490 y Y785). Las tirosinas Y490 y Y785 una vez fosforiladas son sitios de unión para proteínas que contengan dominios que reconozcan tirosinas fosforiladas como son los dominios del tipo SH2 (*Src Homology 2*) y PTB (*Phosphotyrosine binding domain*) (Koch et al, 1991; van der Geer & Pawson, 1995).

La activación de TrkA se produce inmediatamente tras la interacción con NGF y su actividad TK es máxima entre 5 y 10 minutos atenuándose posteriormente (Klein et al, 1991). La reducción de la actividad catalítica se debe a la defosforilación e internalización de los receptores (Hempstead et al, 1992). Tras la unión del ligando, se desencadenan principalmente tres grandes cascadas de señalización que a continuación paso a describir:

1) Ruta de las MAPK (*Mitogen activated protein kinases*).

Las neurotrofinas pueden estimular de dos maneras diferentes la ruta de las MAP quinasas: de manera transitoria (1-2h aprox) o de manera prolongada (7h aprox) (Marshall, 1995). La activación transitoria 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 que a su vez reclutará la proteína adaptadora Grb2 para formar un complejo con el intercambiador SOS. La activación de SOS promueve el intercambio de GDP por GTP para activar Ras que estimulará a tres proteínas quinasas que actúan de manera secuencial: Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK), culminando con la activación de ERK (MAPK) (Kaplan & Miller, 2000).

La activación prolongada de la ruta requiere la activación del intercambiador de nucleótidos de guanina C3G a través del adaptador CrkL. C3G activa entonces la GTPasa Rap1 para activar la serin-treonin quinasa B-Raf lo que resultará en la

Introducción

activación sostenida de la MAPK (Wu et al, 2001; York et al, 1998). Esta vía requiere la internalización del receptor de Trk en el compartimiento endosomal (Arevalo et al, 2006; Wu et al, 2001; York et al, 2000; York et al, 1998). A pesar de que la activación de Rap1 a través de CrkL-C3G está aceptada, 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/kidins220 como una proteína adaptadora para la señalización prolongada de la ruta de las MAP quinasas (Arevalo 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 (Arevalo et al, 2006). 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. *In vitro*, 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*) que controla la expresión de genes esenciales para la supervivencia/muerte neuronal y la diferenciación (Deak et al, 1998; Ginty et al, 1994; Xing et al, 1996).

2) Ruta PI3K/AKT.

Los receptores Trk una vez activos unen Shc, en el residuo Y490, que asociándose con Grb2 y Gab1 activarán PI3K y ésta a su vez activará Akt (Holgado-Madruga et al, 1997). Las neurotrofinas desempeñan un papel fundamental en la supervivencia neuronal durante el desarrollo y la señalización a través de la vía PI3K-Akt es una de las principales responsables, ya que entre los sustratos de Akt se incluyen proteínas implicadas en la 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 et al, 2002). Por otra parte, la supervivencia vía NF- κ B 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. Finalmente, Akt se encuentra activa en el cono de crecimiento favoreciendo 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).

3) Ruta de PLC- γ .

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

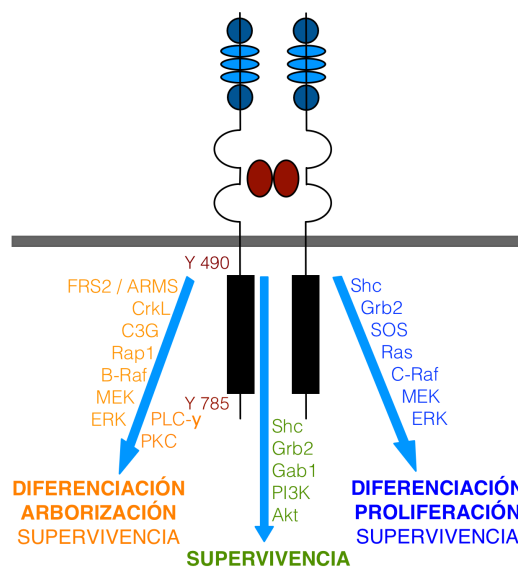


Figura 4. Vías de señalización activadas por el receptor TrkA. Esquema representativo de las cascadas de señalización intracelular mediadas por el receptor TrkA tras un estímulo de NGF. Se representan las diferentes proteínas que se asocian con los residuos de fosfotirosina específicos (Y490 e Y785) del dominio citoplasmático del receptor TrkA humano. Dichas cascadas de señalización provocarán supervivencia, proliferación, crecimiento de neuritas y transcripción génica.

Los receptores Trk también pueden activarse en ausencia de neurotrofinas a través de un fenómeno denominado transactivación, que se basa en la activación de los receptores Trks en respuesta a la activación por ligando de los receptores acoplados a proteína G (GPCR). Concretamente, la adenosina y el PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) son dos de los ligandos de los GPCR que pueden activar

los receptores Trk a través de la fosforilación de Shc y PLC- γ y aumentando la supervivencia neuronal a través de la activación de Akt en neuronas de hipocampo *in vitro* y en células PC12 (Lee & Chao, 2001; Rajagopal et al, 2004).

1.5 El receptor p75^{NTR}

Estructuralmente, el receptor p75^{NTR} está compuesto por un dominio extracelular (ECD) que atraviesa la membrana un sola vez y un dominio intracelular (ICD). Se incluye en la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) al presentar en su dominio extracelular cuatro regiones ricas en cisteínas (CR1-CR4 con 6 cisteínas cada una). En la parte intracelular posee un dominio de muerte celular.

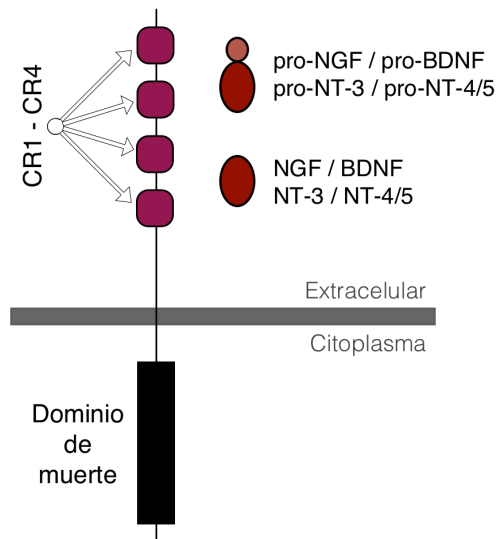


Figura 5. Esquema representativo de la estructura del receptor p75^{NTR} y su afinidad hacia las diferentes neurotrofinas. En su parte extracelular el receptor p75^{NTR} presenta cuatro regiones ricas en cisteínas, presenta un único paso transmembrana y en su parte intracelular contiene un dominio de muerte celular. El receptor p75^{NTR} une todas las neurotrofinas con similar afinidad e incluso une pro-neurotrofinas con una afinidad mayor. CR: dominio rico en cisteínas.

El receptor p75^{NTR} presenta una afinidad similar hacia todas las neurotrofinas maduras, sin embargo, une las pro-neurotrofinas (pro-NT) con mayor afinidad (Lee et al, 2001). La unión del NGF tiene lugar en la tercera y cuarta repetición de cisteínas (Dechant & Barde, 2002). El pro-dominio de las pro-NT interfiere con la unión y la activación de los receptores Trk y por lo tanto, hace que las pro-NT sean ligandos más selectivos para el receptor p75^{NTR}. Además, el pro-dominio de las pro-NT interactúa con el receptor de sortilina el cual se asocia y coopera con p75^{NTR} para unir pro-NT con alta afinidad (Nykjaer et al, 2004). De este modo, las pro-NT pueden ejercer acciones diferentes, complementarias e incluso contrarias a las NT (Hempstead, 2006).

El receptor p75^{NTR} 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, 1991). 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 p75^{NTR} en las células neuronales y gliales (Ernfors et al, 1989).

Desde su descubrimiento al receptor p75^{NTR} se le han atribuido muchas y variadas funciones: 1) Se caracterizó como un co-receptor capaz de favorecer las señales de supervivencia mediadas por los receptores Trk (Hempstead et al, 1991; Mahadeo et al, 1994). 2) Se demostró su implicación en mediar la señal de muerte celular, aunque esta función a menudo pero no siempre, está asociada con las pro-NT y el receptor sortilina (Arnett et al, 2007; Kalous et al, 2012; Nykjaer et al, 2004; Yang et al, 2009). 3) Se ha descrito que p75^{NTR} juega un papel importante en la migración celular así como en la elongación y la retracción de neuritas (Ben-Zvi et al, 2007). 4) Se ha demostrado que es un importante regulador del ciclo celular y de la diferenciación de las células progenitoras (Frade, 2000).

La transmisión de la señal del receptor p75^{NTR} al no poseer actividad enzimática intrínseca requiere la asociación con proteínas adaptadoras citoplasmáticas que terminan desencadenando la señalización mediada por el factor de transcripción NF-κB y la proteína JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Friedman, 2000; Yoon et al, 1998). Hasta la fecha se han descubierto numerosas proteínas que interactúan con el receptor (ver tabla 1). Sin embargo, aún queda mucho por dilucidar con respecto a la transducción de su señal. Se postula que las neurotrofinas pueden usar la proteólisis intramembrana regulada (RIP) de p75^{NTR} para transmitir señales intracelulares. El receptor p75^{NTR} se escinde por una α-secretasa denominada TACE/ADAM17 (*tumor necrosis factor-α converting enzyme/a disintegrin and metallopeptidase domain 17*) que provoca la liberación del ectodominio (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 p75^{NTR} es escindido por una γ-secretasa, permitiendo la liberación del dominio intracelular al citosol (Kanning et al, 2003). Datos recientes sugieren que la unión las neurotrofinas al dominio extracelular del receptor puede inducir la escisión vía γ-secretasa y mediar la translocación del

Introducción

dominio intracelular (ICD) al núcleo (Frade, 2005). Este hecho presenta gran interés ya que podría ser una nueva ruta de señalización mediada por las neurotrofinas a través del receptor p75^{NTR}. Cabe destacar que un alto número de proteínas adaptadoras del receptor que interactúan con el ICD, se localizan en el núcleo tras la activación de p75^{NTR} y/o TrkA por NGF (Chittka & Chao, 1999; Kenchappa et al, 2006; Kendall et al, 2003; Pincheira et al, 2009; Salehi et al, 2000).

Proteínas adaptadoras	Dominio de unión	Referencia
<i>Neurotrophin receptor-interacting factor (NRIF)</i>	JM y DD	(Casademunt et al, 1999)
<i>Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE)</i>	JM	(Salehi et al, 2000)
<i>p75-associated death executor (NADE) / Brain-expressed X-linked 3 (Bex3)</i>	DD	(Mukai et al, 2000)
<i>Schwann cell factor-1 (SC-1)</i>	JM	(Chittka & Chao, 1999)
<i>Ras homolog family member A (RhoA)</i>	DD	(Yamashita et al, 1999)
<i>Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1)</i>	C-t SPV	(Irie et al, 1999)
<i>Ankyrin-rich membrane spanning (ARMS)</i>	ND	(Kong et al, 2001)
<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4)</i>	JM	(Ye et al, 1999)
<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)</i>	JM	(Khursigara et al, 1999; Ye et al, 1999)
<i>Drosophila TRAF1 (DTRAF1)</i>	ICD	(Zapata et al, 2000)
<i>Receptor-interacting protein-2 (RIP2)</i>	DD	(Khursigara et al, 2001)
<i>Brain-expressed X-linked 1 (Bex1)</i>	DD	(Vilar et al, 2006)
<i>Interleukin 1 receptor-associated kinase (IRAK)</i>	ICD	(Mamidipudi et al, 2002)
Caveolin-1	ICD	(Bilderback et al, 1999)
<i>Sal like protein 2 (Sall2)</i>	DD	(Pincheira & Donner, 2008)

Tabla 1. Proteínas adaptadoras del receptor p75^{NTR}. Adaptado y actualizado de Roux & Barker, 2002. JM: dominio yuxtamembrana; DD: dominio de muerte; ICD: dominio intracelular; ND: no determinado.

2 EL RECEPTOR ESPECÍFICO DEL NGF: TrkA

2.1 Patrón espacio-temporal de expresión del gen *trkA*

El receptor TrkA se expresa principalmente en el sistema nervioso (SN) aunque no de manera exclusiva y su patrón de expresión no solapa con el de TrkB o TrkC, a excepción de ciertos momentos tempranos del desarrollo (Cochran et al, 1999; Huang et al, 1999a). Como se comentó anteriormente, existen dos formas alternativas del receptor TrkA, denominadas TrkA-I y TrkA-II. La isoforma TrkA-II contiene una inserción de 6 aminoácidos en el dominio extracelular cerca de la región yuxtamembrana. Los tejidos neurales expresan mayoritariamente la isoforma TrkA-II, mientras que los tejidos no neurales expresan ambas isoformas (Barker et al, 1993).

Dentro del SN, el gen *trkA* se expresa en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP). Sin embargo, su expresión es principalmente periférica, localizándose en las neuronas nociceptivas de pequeño tamaño de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y del ganglio del trigémino (TG) y en neuronas simpáticas (Martin-Zanca et al, 1990). La expresión de TrkA en el SNC es más restringida, localizándose concretamente en las 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). El patrón de expresión de *trkA* solapa en gran medida con el de p75^{NTR} en neuronas del SNC y del SNP (Ernfors et al, 1989; Friedman et al, 1991). La expresión de *trkA* 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).

Al margen del sistema nervioso, se han identificado las isoformas TrkA-I y TrkA-II en células del sistema inmune (monocitos, linfocitos) así como en el sistema endocrino, en el sistema reproductor (masculino y femenino), en el riñón y en los pulmones (Lomen-Hoerth & Shooter, 1995; Tam et al, 1997; Tessarollo, 1998). En el sistema inmune, las neurotrofinas ejercen funciones de supervivencia, proliferación y diferenciación (Coppola et al, 2004; Tessarollo, 1998). En el sistema reproductivo, parece que TrkA participa en la maduración de las gónadas durante el desarrollo (Cupp et al, 2002).

Introducción

El receptor TrkA se expresa en las neuronas de los ganglios raquídeos de una manera espacio-temporal tan precisa que sugiere estar altamente regulada. Durante el desarrollo más del 80% de las neuronas de los DRG expresan TrkA, mientras que en la vida postnatal este porcentaje se reduce hasta el 50% (Bennett et al, 1996; Farinas, 1999). Mediante la técnica de Northern Blot, se detectaron transcritos de *trkA* a partir del estadio embrionario 9.5 días (E9.5) del ratón, coincidiendo con los estadios tempranos de neurogénesis en los DRG y en el TG (Martin-Zanca et al, 1990; Wyatt & Davies, 1993). El pico máximo de expresión de *trkA* en las neuronas nociceptivas de los DRG se alcanza a E13.5 (Lawson & Biscoe, 1979). La expresión de *trkA* en los ganglios simpáticos se detecta en el estadio E17.5 (Martin-Zanca et al, 1990).

2.2 Ratones Knock-Out para *trkA* y *ngf*

Una de las principales herramientas para estudiar las funciones del NGF y de su receptor TrkA ha sido la generación de ratones *Knock-Out (KO)*. Existe una clara coincidencia en el fenotipo de los animales carentes de *trkA* y de *ngf*, lo que apoya la íntima relación existente. El fenotipo de estos ratones *KO* se caracteriza por: 1) ser viables en el momento del nacimiento, aunque la mayoría mueren durante el primer mes de vida, lo que no permite un estudio más avanzado. 2) Presentar cierto comportamiento de mutilación. 3) Presentar una reducción en la respuesta a los estímulos dolorosos (Crowley et al, 1994; Smeyne et al, 1994).

Los ratones *KO* para *trkA* y para *ngf* presentan una reducción del 80% en el número de neuronas de los ganglios raquídeos, del ganglio cervical superior y del ganglio trigémino (Crowley et al, 1994; Smeyne et al, 1994). La pérdida de neuronas de los ganglios raquídeos se ciñe, principalmente, a las neuronas peptidérgicas de pequeño tamaño implicadas en la nocicepción y termocepción que inervan las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal. Por el contrario, las neuronas de mayor tamaño que expresan los receptores TrkB y TrkC siguen presentes en los ganglios raquídeos de estos ratones *KO*. Hacia el día postnatal 10 (P10), dichos ratones carecen además de una gran parte de las neuronas de los ganglios simpáticos del SNP, lo que contrasta con la pérdida temprana (a P0) de las neuronas de los DRG poniendo de manifiesto una diferente dependencia temporal de la vía NGF/TrkA en estos dos grupos neuronales (Farinas, 1999; Snider, 1994).

A nivel del SNC, la situación es menos clara. La supervivencia de las neuronas colinérgicas de los ganglios basales (caracterizadas por responder al NGF y expresar TrkA) en los ratones *KO* para *trkA* y *ngf* no se ve afectada de manera notable ya que sobreviven y se diferencian en ambos linajes de ratones. Este hecho hace cuestionar la dependencia de dichas neuronas de NGF, aunque dichos ratones mueren durante el primer mes de vida lo que no permite un estudio a más largo plazo (Crowley et al, 1994; Smeyne et al, 1994). Dichas neuronas parecen estar atrofiadas al presentar una reducción en la síntesis de acetilcolina transferasa (ChAT) (Crowley et al, 1994). Esto indicaría que el principal papel del NGF en dichas neuronas es el mantenimiento de su fenotipo colinérgico y que, posiblemente, su supervivencia dependiese de mecanismos redundantes aún presentes en ausencia de NGF. Además, las proyecciones de estas neuronas colinérgicas al hipocampo y al córtex cerebral tampoco se ven afectadas (Crowley et al, 1994). En cambio, la pérdida de TrkA sí conlleva una marcada reducción de dichas proyecciones al verse afectada la supervivencia de las neuronas colinérgicas (Smeyne et al, 1994). Para facilitar el estudio de las neuronas colinérgicas de los ganglios basales y su dependencia del eje NGF/TrkA, se han creado diversos ratones mutantes condicionales. Sin embargo, los datos obtenidos son controvertidos. Por un lado, se emplearon ratones condicionales para *ngf* y para *trkA* en el SNC eliminando ambas proteínas en células progenitoras neuronales (nestina positivas) y se describió que ambas proteínas eran necesarias para la supervivencia de un conjunto de neuronas colinérgicas del SNC (Muller et al, 2012). Se describió que las neuronas colinérgicas no presentaron niveles inferiores en la expresión de ChAT sino que la pérdida en los niveles de ChAT era atribuible a la pérdida neuronal que presentaron los ratones mutantes y tampoco se encontró reducida la inervación colinérgica (Muller et al, 2012). Por otro lado, se emplearon ratones condicionales que no expresaron *trkA* en las neuronas del SNC al utilizar un ratón *Dlx5/5-Cre* y se describió que dichos ratones si presentaron un descenso en los niveles de ChAT, sin observar pérdida neuronal aunque sí un defecto en la inervación colinérgica del córtex y del hipocampo (Sanchez-Ortiz et al, 2012).

2.3 Expresión de *trkA* mediada por NGF

A pesar de que se desconocen los estímulos que promueven la expresión de TrkA, existen datos publicados que muestran que el NGF es uno de los factores que puede favorecer la expresión de *trkA*. En las neuronas sensoriales del ganglio trigémino, los niveles del mRNA de *trkA* incrementan rápidamente entre E12 y E15 a medida que las neuronas se vuelven dependientes de NGF (Wyatt & Davies, 1993), lo que haría pensar en una regulación interna entre las dos proteínas. Se ha descrito que el NGF estimula la actividad transcripcional de *trkA* en células PC12 y en neuronas colinérgicas de los ganglios basales (Holtzman et al, 1992; Li et al, 1995; Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995). En experimentos con células PC12 estimuladas con NGF se observó que el tratamiento agudo (1 hora) no incrementó los niveles de TrkA, sin embargo, el tratamiento prolongado (2 días) incrementó significativamente los niveles de TrkA a nivel de proteína (Zhou et al, 1995). Así mismo, los niveles del mRNA de *trkA* también se vieron incrementados tras un tratamiento prolongado de NGF (Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995). En las neuronas colinérgicas de los ganglios basales se obtuvieron resultados idénticos, el tratamiento con NGF incrementó los niveles del mRNA de *trkA* (Holtzman et al, 1992; Li et al, 1995). La administración de anticuerpos α -NGF que bloquean la acción del NGF endógeno condujo a una disminución del mRNA de *trkA* (Holtzman et al, 1992; Li et al, 1995). Recientemente, se ha descrito que el aumento en la expresión del mRNA de *trkA* producido por NGF es en parte dependiente de los factores de transcripción HAND (Doxakis et al, 2008).

2.4 Descubrimiento del promotor mínimo del gen *trkA*

A finales de la década de los años 90, el grupo del Dr. Kilpatrick en colaboración con el grupo del Dr. Martin-Zanca, describieron el promotor mínimo del gen *trkA* humano (Chang et al, 1998). Observaron que dicho promotor presentaba una actividad transcripcional variable que era específica de cada línea celular. Así mismo, localizaron las secuencias reguladoras que mediaban dicho proceso específico y comprendían una región de 138 pares de bases (pb) previas al punto de inicio de la transcripción. Observaron como las líneas celulares de neuroblastoma que presentaban altos niveles de expresión de TrkA, estaban enriquecidas en proteínas específicas que formaban varios complejos de unión al DNA en la región reguladora descrita (Chang et al, 1998).

Un año después, se publicó la caracterización del promotor del gen *trkA* de ratón. Al igual que sucedía en la región promotora humana, un segmento de 150 pb previo al inicio de la transcripción fue suficiente para dirigir la transcripción en líneas celulares que expresaban TrkA endógenamente (Sacristan et al, 1999). Describieron un elemento *cis*-regulador esencial para la actividad promotora y una región donde el factor de transcripción Sp1 se une formando un complejo con el DNA (Sacristan et al, 1999).

En el año 2000, el grupo del Dr. Parada identificó una secuencia de 457 pb antes del primer exón codificante del gen *trkA* de ratón que era suficiente para dirigir la expresión *in vivo* de TrkA (Ma et al, 2000). Realizaron un análisis de los elementos *cis*-reguladores en esa región e identificaron los sitios requeridos para la expresión global del gen y los sitios específicos que se requieren para la expresión de TrkA en las neuronas simpáticas, en las neuronas de DRG y del trigémino. Entre los múltiples sitios consenso descritos por este grupo cabe destacar: HAND, Sp1, MZF e IKAROS (Ma et al, 2000).

De acuerdo con los datos publicados, la maquinaria transcripcional que controla la expresión del gen *trkA* es diferente para cada población neuronal y parece estar regulada por múltiples factores.

2.5 Factores de transcripción implicados en la expresión de TrkA en DRG

Hasta la fecha, se han descrito numerosos factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión del receptor *trkA*. A continuación, paso a exponer algunos de los datos que se conocen sobre los factores de transcripción más importantes implicados en la expresión de TrkA:

Klf7: Para buscar factores de transcripción que pudiesen participar en la regulación de *trkA*, se realizó un *screening* a partir de cDNA de DRG de ratón (E13.5), para ver qué proteínas podían unirse a los sitios consenso descritos en el promotor del gen *trkA* descrito por el grupo del Dr. Parada. Se encontró la proteína Klf7 como un regulador potencial de TrkA ya que interaccionaba con el promotor a través del sitio Ikaros2 (Lei et al, 2001). Se describió que el *KO* para Klf7 presenta una disminución de TrkA tanto a nivel de proteína como de mRNA en el estadio E11.5 en las neuronas de DRG aunque

Introducción

su expresión no desaparece completamente (Lei et al, 2005). Además, se identificó la proteína MoKA (*Modulator of Klf7 Activity*) como una proteína que interaccionaba y modulaba al alza el efecto transcripcional de Klf7 (Smaldone et al, 2004).

Brn3a: Fue uno de los primeros factores de transcripción implicados en la regulación de los receptores Trk y ha sido uno de los más estudiados. El grupo del Dr. Reichardt, describió un *KO* para este factor de transcripción y observaron que Brn3a era necesario para el inicio de la expresión de TrkC y para el mantenimiento de la expresión de TrkA y de TrkB en las neuronas del TG. La expresión de TrkA en ese ratón *KO* a E11.5 era normal pero a partir del estadio E12.5 tenía lugar una pérdida progresiva de neuronas TrkA positivas (Huang et al, 1999b). Posteriormente, el grupo del Dr. Parada identificó dos lugares de unión para Brn3a en el promotor de *trkA* y corroboraron los datos del grupo del Dr. Reichardt (Ma et al, 2003). Sin embargo, la implicación de Brn3a en la expresión de TrkA no está clara ya que estudios recientes en neuronas de DRG han puesto de manifiesto la implicación de Brn3a en la segregación de las neuronas (TrkA/TrkB y TrkA/TrkC) y en la proyección correcta de las neuronas hacia la médula espinal (Zou et al, 2012). Además, varios grupos han demostrado que Brn3a *in vitro* no es capaz de promover la actividad del promotor de *trkA* descrito por el grupo del Dr. Parada en células PC12 (Lei et al, 2006; Valderrama & Misra, 2008). Sin embargo, la presencia adicional de Klf7 sí promueve que Brn3a incremente la actividad transcripcional del promotor de *trkA* en ese mismo tipo celular (Lei et al, 2006). Ello podría indicar que la acción Brn3a sobre el promotor de *trkA in vivo* requiere la asociación de otras proteínas. Por otro lado, se ha descrito que una región que contiene el promotor mínimo descrito por el grupo del Dr. Martín Zanca, pero que no es tan amplia como el promotor descrito por el grupo del Dr. Parada, es suficiente para promover la actividad transcripcional del factor Brn3a sobre *trkA* en las células PC12 por sí solo (Valderrama & Misra, 2008).

Se ha descrito que el factor de transcripción HIPK2 (*Homeodomain Interacting Protein Kinase 2*) suprime la actividad de Brn3a. HIPK2 interacciona con Brn3a y favorece que éste último se una al DNA, pero suprime su actividad transcripcional sobre *trkA* y sobre sus otros genes diana que son importantes para el desarrollo

embrionario como por ejemplo NeuroD1 o NeuroD4 e incluso él mismo (Lanier et al, 2007; Wiggins et al, 2004).

Runx1: Se ha encontrado un sitio de unión consenso en el promotor mínimo de *trkA* para el factor de transcripción Runx1 que está conservado en varias especies. Runx1 se co-expresa en las mismas neuronas de DRG que TrkA (Marmigere et al, 2006). Cabe destacar que el inicio de la expresión de *trkA*, que no está alterada en el ratón *KO* para Brn3a, si se ve afectada en ausencia de Runx1. Así mismo, Runx1 por sí sólo es suficiente para inducir la expresión de *trkA* tanto *in vitro* como *in vivo*. Es interesante remarcar que la región 5' de Runx1 contiene un sitio de unión para Brn3a y que en el ratón *KO* para Brn3a los niveles del mRNA de Runx1 se redujeron notablemente en el TG (Marmigere et al, 2006). Otros grupos también han demostrado que Brn3a es necesario para la correcta expresión de Runx1 (Dykes et al, 2010; Zou et al, 2012). Por lo que el efecto de Brn3a sobre *trkA* tal vez esté mediado por Runx1.

Por otro lado se ha visto que el factor Runx1 es necesario para la posterior transición durante el desarrollo tardío de las neuronas TrkA positivas a un fenotipo Ret positivo, reprimiendo la expresión de TrkA y promoviendo la expresión de Ret (Molliver et al, 1997). Runx1 es esencial para la expresión del receptor Ret así como de otros genes característicos de las neuronas nociceptivas Ret positivas no peptidérgicas (Chen et al, 2006; Kramer et al, 2006). Cabe remarcar que se ha implicado al NGF como factor esencial para la expresión de ciertos genes característicos de las neuronas nociceptivas a través del control del factor de transcripción Runx1 (Luo et al, 2007).

HAND: Es otro de los factores de transcripción que tiene una secuencia consenso de unión en el promotor de *trkA*. Datos obtenidos por el grupo del Dr. A. M. Davies sugieren que el aumento en la expresión del mRNA de *trkA* producido por NGF es en cierta medida dependiente de los factores de transcripción HAND1 y HAND2, pero que estos factores no son necesarios para el mantenimiento de la expresión basal del mRNA de *trkA* en ausencia de NGF (Doxakis et al, 2008). Observaron que el tratamiento con NGF incrementa la unión de HAND2 con el promotor de *trkA*, lo que conduce a la mayor expresión de TrkA y mejora la supervivencia de las neuronas simpáticas en presencia de NGF. Este grupo propone que HAND2 forma parte de un

Introducción

bucle de alimentación que aumenta la sensibilidad de las neuronas al NGF al igual que propuso el grupo del Dr. D. D. Ginty (Deppmann et al, 2008), aunque también proponen que el bucle podría compensar la disminución de receptor TrkA debida a su internalización y degradación tras un estímulo con NGF (Doxakis et al, 2008).

Con respecto a la inhibición de la expresión de TrkA se han postulado principalmente dos factores aunque no en neuronas de DRG: N-Myc y Sp3. Con respecto a MYCN, se ha correlacionado su alta expresión con una baja o prácticamente nula expresión del mRNA de *trkA* en células de neuroblastoma con un alto grado de malignidad (Eggert et al, 2000). Recientemente, se ha descrito el mecanismo molecular a través del cual el complejo N-Myc/Sp1/Miz1 reprime el promotor de *trkA* (Iraci et al, 2011). Por otro lado, se ha publicado que el factor de transcripción Sp3 inhibe la actividad transcripcional del promotor humano de *trkA in vitro* (Lambiase et al, 2005).

Pero no hay que olvidar que otros muchos factores de transcripción han sido implicados en la regulación de TrkA como son Islet1 (Sun et al, 2008), Cux2 (Bachy et al, 2011), Tlx3 (Lopes et al, 2012), Hmx1 (Furlan et al, 2013) o AP-1 (Fujimoto et al, 2005).

3 LA PROTEÍNA Bex3

3.1 El descubrimiento de una nueva familia de genes: *Bex* (*Brain expressed X-linked*)

En el año 1999, gracias a un estudio comparativo de la expresión génica en blastocistos frente a blastocistos partenogénéticos, se descubrió una nueva familia de genes que se expresaban abundantemente en el cerebro y que estaban ligados al cromosoma X del ratón a la que se denominó BEX (*Brain Expressed X-linked genes*) (Brown & Kay, 1999). A pesar de su nombre, su expresión no está restringida al cerebro ya que también se expresan en hígado, corazón, riñón y músculo esquelético entre otros tejidos (Alvarez et al, 2005). Inicialmente, se descubrieron tres genes: *bex1*, *bex2* y *bex3*. El gen *bex3* de ratón codifica una proteína que presenta gran homología (92,8%) con la proteína humana pHGR74 que había sido clonada en células ováricas granuladas (Brown & Kay, 1999; Mukai et al, 2000; Rapp et al, 1990). Posteriormente, se describieron los genes *bex4*, *hbex5* y *mbex6* (Alvarez et al, 2005), aunque sus homólogos respectivos en ratón y humano aún no se conocen. Los genes *bex* se encuentran localizados en el cromosoma X del ratón correspondiendo a la región humana Xq22, a excepción del gen *bex6* que se encuentra localizado en el cromosoma 16 del ratón pero que se incluyó en la familia por la similitud en su secuencia (Alvarez et al, 2005).

La familia génica presenta ciertas características comunes, así por ejemplo todos los genes *bex* en humano, en rata y en ratón contienen tres exones y su ORF (*Open Reading Frame*) se encuentra en el tercer exón. A nivel de proteína también tienen gran similitud en su secuencia de aminoácidos, presentando gran homología sobre todo en extremo carboxilo. Sin embargo, las proteínas Bex presentan ciertas diferencias, siendo la localización celular la más destacada. Ciertos miembros presentan una localización claramente nuclear (Bex1), otros miembros se encuentran principalmente en el citoplasma (Bex3, Bex5 y Bex6) mientras que otros se encuentran en ambos compartimentos celulares (Bex2 y Bex4) (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2000; Vilar et al, 2006).

3.2 Caracterización de la proteína Bex3

La proteína mBex3 es una proteína de 124 aminoácidos y contiene dos secuencias consenso: una secuencia de exportación nuclear (NES) y una caja CaaX (Kim et al, 2004; Mukai et al, 2000). La secuencia NES es una secuencia hidrofóbica rica en leucinas (L), del tipo Lx₂LxL, que comprende desde el aminoácido 90 hasta el 99. Este tipo de secuencia NES requiere la interacción directa con el factor de exportación Crm1 para la translocación de las proteínas desde núcleo hacia el citoplasma. La caja CaaX, situada en el extremo carboxilo terminal de la proteína, es una secuencia de reconocimiento para modificaciones lipídicas post-traduccionales mediante la adición de grupos geranilo-geranilo o de grupos farnesilos al residuo de cisteína. Este tipo de modificaciones post-traduccionales facilitan la unión de las proteínas a las membranas celulares (Zhang & Casey, 1996). Además, la proteína Bex3 presenta una “caja de destrucción” (*Ubiquitination D-Box*) entre los aminoácidos 91 hasta el 112 (Mukai et al, 2000). Esta secuencia de destrucción contiene una lisina (K) en posición 93, siendo un posible sitio de unión de ubiquitina para promover la señal de degradación de la proteína. Bex3 es el único miembro de la familia que presenta dicha secuencia de destrucción, lo que podría indicar que la ubiquitinación de la proteína podría estar regulando no únicamente su degradación sino alguna de sus funciones.

La proteína Bex3 se puede presentar como monómero o como dímero siendo la única proteína de la familia que presenta esta característica descrita hasta el momento (Alvarez et al, 2005). Es importante destacar que la forma dimérica se puede observar incluso en condiciones desnaturalizantes. La secuencia NES es necesaria para la dimerización (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2000). Se ha demostrado que Bex3 dimeriza mediante la creación de un puente disulfuro entre las cisteínas 102 (C 102) que se localizan muy próximas a la secuencia NES (Kimura et al, 2001). rBex3 y mBex3 se degradan vía proteosoma, al igual que otros miembros de la familia, y la tasa de degradación es mayor cuando se encuentra en forma monomérica, ya que los dímeros presentan cierta resistencia a dicha degradación (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2000).

La proteína Bex3 tiene principalmente una localización celular citoplasmática. La inhibición de la exportina Crm-1 con Leptomomicina B (LMB) bloquea el reconocimiento

de la señal de exportación nuclear y conduce a la acumulación de Bex3 en el núcleo, lo que indica que su señal de exportación es eficiente y la responsable de su exclusión del núcleo (Alvarez et al, 2005).

La proteína Bex3 humana presenta un 93% de similitud con la proteína murina. Sin embargo, la región rica en histidinas (H) y asparraginas (N) de la proteína murina no se encuentra en la proteína humana. La proteína Bex3 presenta dos isoformas, una larga y una corta. La isoforma corta no presenta los 10 primeros aminoácidos desde el extremo amino, esto se debe a la presencia de dos metioninas iniciadoras de la traducción en su secuencia. La proteína rBex3 únicamente presenta la isoforma corta.

1	MANIHQENEEMEQPMQNGEEDRPLGGGEGHQPAGN-----	35	
1	MANVHQENEEMEQPLQNGQEDRPVGGGEGHQPAANNNNNHNNHNNH ---	47	
1	-----MEQPLQNGQEDRPVGGGEGHQPAANNNNNHNNHNNHNNHNN	40	
36	----RRGQARRLAPNFRWAIPNRQINDGMGGDGDDEIFMEEMREIRRKL	81	
48	---HRRGQARRLAPNFRWAIPNRQMDGLGGDGDDEMFMEEMREIRRKL	94	
41	HNHHRRGQARRLAPNFRWAIPNRQMDGLGGDGDDEMFMEEMREIRRKL	90	
82	RELQLRNCLRILMGELSNHHDHDEFCLMP	111	H. SAPIENS
95	RELQLRNCLRILMGELSNHHDHDEFCLMP	124	M. MUSCULUS
91	RELQLRNCLRILMGELSNHHDHDEFCLMP	120	R. NORVERGICUS

Figura 6: Homología de la proteína Bex3 en diversas especies. En rojo se marcan las metioninas iniciales de cada isoforma.

El patrón de expresión de la proteína Bex3 es bastante amplio y solapa en gran medida con el patrón de expresión de TrkA (Kim et al, 2004; Tong et al, 2003). En humanos, se han detectado altos niveles de Bex3 en órganos con influencia hormonal, como son la próstata, los testículos, los ovarios, la glándula tiroides o adrenal, pero también en el corazón. En muchos otros tejidos, Bex3 está presente pero en niveles muy inferiores. Los niveles de Bex3 presentes en el SN son elevados (Tong et al, 2003). En ratón, Bex3 se expresa también en diversos tejidos como cerebro, pulmón, corazón, hígado, intestino delgado, riñón y bazo durante la etapa embrionaria, pero a P0 la expresión de Bex3 comienza a descender de manera gradual en los tejidos mencionados y en la etapa adulta la expresión de Bex3 es indetectable, excepto en cerebro y pulmón donde se mantiene constante (Tong et al, 2003). Durante el desarrollo embrionario, los niveles de Bex3 también varían; se ha descrito que la expresión de su mRNA comienza en el estadio embrionario E7.5 (Kendall et al, 2003) aunque su pico de expresión se alcanza en el estadio embrionario E11 y desde ese

Introducción

momento sus niveles se mantienen constantes hasta el nacimiento (Kim et al, 2004). En el sistema nervioso del ratón, se ha descrito la expresión del transcrito de *bex3* en el neuroepitelio a partir del estadio E10 (Kendall et al, 2003; Kim et al, 2004).

Tras el descubrimiento de la familia de genes *bex*, la proteína Bex3 se identificó mediante un ensayo de doble híbrido como una proteína que interactuaba con el receptor $p75^{NTR}$ y la denominaron NADE (*p75^{NTR} – Associated Death Executor*) (Mukai et al, 2000). El grupo del Dr. Sato describió que el extremo carboxilo terminal de Bex3 incluyendo la secuencia NES (aminoácidos 81-106) era necesario para la interacción con el dominio de muerte celular de $p75^{NTR}$ en células PC12 y en células de neuroblastoma humano. Comprobaron que la interacción era dependiente de NGF y provocaba apoptosis en células 293T transfectadas y en oligodendrocitos vía activación de las caspasas. Finalmente, observaron que el NGF inducía la expresión del mRNA de *bex3* en oligodendrocitos (Mukai et al, 2000). El mismo grupo, publicó después que las proteínas $p75^{NTR}$ y Bex3 eran co-inducidas en neuronas de cultivos corticales que estaban degenerando tras una exposición al zinc (Park et al, 2000), así como en neuronas de hipocampo en degeneración inducida por kainato (Yi et al, 2003) y describieron la interacción entre Bex3 y 14-3-3 ϵ (Kimura et al, 2001). Sin embargo, existe cierta controversia ya que otros grupos no han sido capaces de reproducir los resultados descritos por el grupo del Dr. Sato. Varios grupos han descrito que ni rBex3 ni hBex3 se unen a $p75^{NTR}$ (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2002; Tong et al, 2003; Yu et al, 2006) y tampoco han podido reproducir la apoptosis celular cuando se sobre-expresó la proteína hBex3 o mBex3 en diversos tipos celulares tras un estímulo con NGF o sin él (Kim et al, 2004; Tong et al, 2003). Por lo tanto, la implicación de Bex3 en la apoptosis inducida por NGF a través del receptor $p75^{NTR}$ necesita ser demostrada por otros grupos.

Por otro lado, existen datos que relacionan la proteína Bex3 con la proliferación celular. Así, se ha descrito que la proteína hBex3 tiene una gran actividad antiproliferativa *in vivo* pero que no disminuye el crecimiento de diversos tipos celulares *in vitro* (Tong et al, 2003). También está descrito que la proteína hBex3 interactúa con la proteína DRG-1 (*dopamine responsive gene-1*), siendo un regulador negativo del crecimiento mediado por DRG-1 (Yu et al, 2006). Otros estudios han

descrito que mBex3 puede asociarse a las mitocondrias gracias a su secuencia CaaX durante la síntesis de DNA en el ciclo celular y mBex3 parece ser necesaria para el crecimiento de las células F9 (Kim et al, 2004). Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuáles Bex3 podría ejercer una función en la proliferación celular están aún por dilucidar.

Finalmente, mediante un ensayo de doble híbrido, se describió la interacción de mBex3 con Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*)/DIABLO (Yoon et al, 2004). En este estudio, se observó como la co-expresión de Bex3 con Smac promueve la apoptosis inducida por TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) en células MCF-7 (células cancerígenas de mama). Curiosamente, la presencia de Bex3 inhibe la ubiquitinación de Smac mediada por XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). En conclusión, estos resultados proporcionan evidencias de que la interacción entre Smac y Bex3 podría regular la apoptosis a través de la inhibición de la ubiquitinación de Smac.

3.3 Otros miembros de la familia Bex

A partir del año 2006, la idea de considerar a los genes *bex1*, *bex2* y *bex4* como supresores tumorales emergió gracias a dos artículos que describían como dichos genes eran silenciados por la metilación de sus promotores en glioma y cáncer de ovario (Chien et al, 2005; Foltz et al, 2006). Desde ese momento, han surgido múltiples evidencias de su cada vez mayor implicación tanto en gliomas como en varios tipos de cáncer (Lee et al, 2013; Naderi et al, 2012; Naderi et al, 2007; Rattan et al, 2010; Zhou et al, 2012b).

Bex1: En el año 2006, a partir de un ensayo de doble híbrido con el receptor p75^{NTR}, se describió que la proteína mBex1 interaccionaba con el receptor p75^{NTR} (Vilar et al, 2006). Dicha interacción no se veía afectada por NGF. Sin embargo, el NGF si afectaba a la localización celular de Bex1 promoviendo su salida del núcleo, lo que es contrario a lo que sucede con otros adaptadores de p75^{NTR}, que tras un estímulo con NGF se traslocan al núcleo. Ese estudio describió como mBex1 era el nexo de unión entre la señalización mediada por p75^{NTR} y el ciclo celular. La modulación de los niveles de mBex1, siendo éstos bajos en G1 y altos en la fase S, promueve la salida del ciclo y la consiguiente diferenciación celular (Vilar et al, 2006).

Introducción

También se ha descrito como la proteína mBex1 está implicada en la regeneración muscular tras una lesión y en la regeneración de axones dañados. El músculo en regeneración de ratones *KO* para Bex1 presenta una elevada proliferación celular, así como un retraso en la diferenciación comparado con los ratones WT (Khazaei et al, 2010; Koo et al, 2007).

Bex2: La proteína Bex2 se expresa abundantemente en el SNC (Alvarez et al, 2005). Se ha implicado a hBex2 como un regulador específico durante el desarrollo embrionario mediante la modulación de la actividad transcripcional de un nuevo complejo que contiene, además de hBex2, las proteínas LMO2 (*LIM domain only 2*), TAF1/NSCL2 (*Transcription initiation factor TFIID subunit 1*) y LDB1 (*LIM domain binding protein 1*) (Han et al, 2005). Sin embargo, con la proteína mBex2 no se ha detectado la interacción con LMO2 (Han et al, 2005).

Bex4 – TCEAL7 (*Transcription elongation factor A (S-II) like 7*). Cabe destacar que Bex4/TCEAL7 es el miembro de la familia que presenta mayor homología con Bex3, siendo de un 77% con la región carboxilo terminal de Bex3 (aminoácidos 72-112) (Chien et al, 2005). Bex4/TCEAL7 se identificó como regulador transcripcional que estaba silenciado en el cáncer de ovario debido a la metilación de su promotor (Chien et al, 2005). Investigaciones posteriores revelaron que Bex4/TCEAL7 se asocia con el promotor de la ciclina D1, que contiene una secuencia consenso tipo E-box y reprime su expresión transcripcionalmente. La disminución de Bex4/TCEAL7 ha sido asociada con un incremento en la actividad de NF-KB y un incremento en el nivel de los genes implicados en proliferación como ciclina D1 y c-Myc (Chien et al, 2008; Rattan et al, 2010).

Al igual que Bex1, Bex4/TCEAL7 se ha visto implicada en la regeneración muscular, favoreciendo la diferenciación celular (Shi & Garry, 2010).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

A pesar de que el estudio sobre las neurotrofinas y sus receptores ha avanzado enormemente en los últimos 25 años, todavía quedan muchas cuestiones por resolver. Para profundizar en su estudio e identificar proteínas que interaccionasen con los receptores de neurotrofinas Trk, se realizó un ensayo de doble híbrido.

Este trabajo de investigación se inició a partir de los resultados obtenidos en dicho ensayo. En él, se identificó que la proteína Bex3 interaccionaba con la región yuxtamembrana de los receptores Trk. Bex3 había sido previamente descrita como una proteína adaptadora del receptor de neurotrofinas p75^{NTR} y se había sugerido que participaba en la apoptosis mediada por p75^{NTR} en respuesta a NGF. Consideramos que el estudio de la proteína Bex3 podría ser muy interesante al interaccionar con los dos tipos de receptores de NGF.

En este trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Comprobar y analizar la interacción detectada en el ensayo de doble híbrido entre el receptor TrkA y la proteína Bex3.
2. Estudiar la/s posible/s función/es de Bex3 en cultivos neuronales primarios y en diversas líneas celulares y su posible especificidad en las acciones de los distintos receptores Trk.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISECCIONES

El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo en cumplimiento de las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética de la Universidad de Salamanca.

1.1. Disección de neuronas de ganglios raquídeos de embriones de rata

Las neuronas primarias de los ganglios raquídeos o DRG (*Dorsal Root Ganglion*) se obtuvieron a partir de embriones E15.5 de rata. Las ratas gestantes fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. Los embriones se obtuvieron mediante cesárea y se colocaron en una placa estéril de cultivo, para ser extraídos de los úteros mediante una pequeña incisión en la cavidad que contiene el líquido amniótico y se transfirieron a otra placa estéril con medio L-15 (Gibco®). Bajo una lupa de disección, se cortó la cabeza y la cola de los embriones, se retiró toda la parte ventral y se dejó la parte dorsal correspondiente a la columna vertebral expuesta y limpia. Se abrió la columna vertebral cortándola cuidadosamente por el canal espinal con unas tijeras de disección y, tras exponer la médula ósea con los ganglios unidos se separó de la columna. La médula ósea con los ganglios raquídeos adheridos se colocó en otra placa estéril con medio L-15 y los ganglios se separaron de la médula uno por uno con unas pinzas. Finalmente, los ganglios se recogieron en medio L-15, se les añadió tripsina al 0,25% (Gibco®) y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron a 750 rpm durante 4 minutos a 9°C y se resuspendieron en "*plating media*" (compuesto por MEM (*Minimum Essential Medium* - Gibco®) suplementado con glucosa (Sigma-Aldrich®) a una concentración final de 4 g/L, 10% de suero fetal bovino (FBS - Gibco®) previamente inactivado a 55°C durante 30 minutos, 2 mM L-glutamina (Gibco®), con 50 ng/mL mNGF 2.5S (Alomone labs). Los ganglios se disgregaron mecánicamente pipeteando 30 veces con una P1000 y luego otras 30 veces con una P200 hasta obtener células individuales. Las neuronas se sembraron en placas previamente tratadas con 0,1 mg/mL poli-D-lisina (MARCA) y seguidamente con Matrigel™ (BD Biosciences®) diluido 1:10 en MEM. En el caso de sembrar las neuronas en cubres, la concentración de poli-D-lisina usada fue de 1 mg/mL.

Materiales y Métodos

1.2. Disección de neuronas de hipocampo de embriones de rata

Las neuronas primarias de hipocampo se obtuvieron a partir de embriones E17.5-E18.5 de rata. Los embriones se obtuvieron de la misma manera que para las neuronas de los DRG y se colocaron en una placa estéril con una solución salina equilibrada *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS - Gibco®). El embrión se sujetó por el cuello, se quitó la piel de la cabeza y seguidamente, se retiró el cráneo, sin lesionar el encéfalo. Los cerebros se colocaron en otra placa que contenía también HBSS, se dispuso la parte ventral hacia arriba y con el tronco del encéfalo hacia abajo se separaron los dos hemisferios para seguir trabajando con cada uno de ellos por separado quitando las meninges desde el bulbo olfatorio. En este momento, se expusieron los hipocampos como una media luna y se extrajeron cortando el tejido adyacente para recogerlos en un tubo de 15 mL con HBSS al que se añadió tripsina al 0,025%. El tejido se incubó durante 10 minutos a 37°C, se añadió "*plating media*" para inactivar la tripsina y se centrifugó 5 minutos a 750 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 2 mL de "*plating media*" y se pipeteó 5 ó 6 veces con una punta P1000 y después con una P200 para disgregar las células. Se hizo un recuento de células y se sembraron en placas previamente tratadas con poli-D-lisina.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Líneas celulares

2.1.1. HEK293-293FT

Las células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) son una línea celular obtenida a partir de células embrionarias de riñón humano. Es una de las líneas celulares más usada, ya que presenta como ventajas un rápido crecimiento y además, es una línea celular que se transfecta fácilmente. Las células HEK293FT a su vez derivan de las HEK293; han sido transformadas de manera estable con el antígeno T del virus SV40, para mejorar la producción de partículas lentivirales. Ambas se mantuvieron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Gibco®) suplementado con un 10% de suero bovino (BS - Gibco®) inactivado previamente a 55°C durante 30 minutos, un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA - Gibco®), 2 mM de L-glutamina y con penicilina (100 U/mL - Gibco®) y estreptomycin (100 µg/mL - Gibco®). Las células HEK293FT

además, tienen un gen de resistencia a neomicina, por lo que fueron mantenidas con 100 µg/mL de geneticina (Gibco®).

2.1.2. Neuro-2a (N2a)

Las células N2a son una línea celular derivada de la cresta neural proveniente de un neuroblastoma de ratón. Es una línea celular que puede diferenciarse dando una morfología neuronal expresando múltiples marcadores neuronales. Este tipo celular expresa endógenamente la proteína Bex3 y el receptor TrkA, aunque mayoritariamente expresa una forma truncada de este receptor (Tesis Doctoral de Laura Andrés Martín). Se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS inactivado, 1% NEAA, 2 mM de L-glutamina y con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Esta línea celular fue cedida por el Dr. Martín Zanca (CSIC-USAL).

2.1.3. PC12

Las células PC12 derivan de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata y en presencia de NGF pueden diferenciarse dando un fenotipo neuronal. Este tipo celular expresa de manera endógena el receptor TrkA funcional y la proteína Bex3. El medio en el que se mantienen estas células es RPMI1640 (Lonza®) suplementado con 10% de suero de caballo (HS - Gibco®) inactivado, 5% de FBS, 2 mM de L-glutamina y con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las placas donde se cultivaron fueron tratadas previamente con colágeno (1 mg/mL) (BD Bioscience®).

2.1.4. PC12-6/15

Las células PC12-6/15 es un clon que sobre-expresa de manera estable el gen *trkA* humano (Hempstead et al, 1992). Se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% HS, 5% FBS, 2 mM de L-glutamina y penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Para mantener la sobre-expresión del gen *trkA* se añadió geneticina a una concentración final de 100 µg/mL.

2.1.5. Mantenimiento y congelación/descongelación de las células

Todas las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad. Para realizar los pases, las células se lavaron con PBS a temperatura

Materiales y Métodos

ambiente y posteriormente se trataron durante tres minutos con 0,05% tripsina-EDTA (Gibco®) a 37°C, excepto las PC12-6/15 las cuales no necesitan tripsina para despegarse de la placa. Se añadió medio con suero para inactivar la tripsina, y se pipeteó un par de veces para separar mecánicamente las células. Las células se centrifugaron a 600 rpm durante 4 minutos, el sobrenadante se eliminó, las células fueron resuspendidas en medio fresco y se sembraron en función de la dilución deseada. En el caso de tener que sembrar un número exacto de células, se diluyeron con Trypan Blue (Gibco®) y se contaron en una cámara Neubauer. Para favorecer el crecimiento de las células PC12 y PC12-6/15, al realizar el pase siempre se añadió un 20% de medio condicionado, es decir, medio en el que han estado creciendo previamente las células.

Para congelar las células, éstas se trataron como si se fuese a realizar un pase, pero justo después de la centrifugación se resuspendieron en un medio con 90% de suero y 10% de DMSO, que tiene que estar a 4°C. Las células se congelaron lentamente, utilizando el recipiente “Mr Frosty™ Cryo 1°C freezing container” (Nalgene®), el cual va disminuyendo la temperatura un grado centígrado por minuto y se almacenaron a -80°C. El proceso de descongelación, contrariamente al de congelación, se hizo rápidamente. Se descongeló un vial en un baño a 37°C, se añadió el medio en el cual suelen crecer las células y se centrifugaron. El sobrenadante se eliminó para retirar todo el DMSO, ya que a más de 4°C es tóxico para las células y se resuspendieron en medio fresco para ser sembradas.

2.2. Cultivos primarios

2.2.1. Neuronas de los ganglios raquídeos

Al día siguiente de la disección, las neuronas dependientes de NGF se cambiaron de medio y se mantuvieron en medio Neurobasal (Gibco®) suplementado con B27 (Gibco®) o NS-21 (Chen et al, 2008), glucosa a una concentración final de 4 g/L, 2 mM L-glutamina, con penicilina (25 U/mL) y estreptomycin (25 µg/mL), 5-fluorodeoxiuridina (2,44 µg/mL) y uridina (2,44 µg/mL) y NGF a una concentración final de 50 ng/mL.

2.2.2. Neuronas de hipocampo

El día posterior a la disección, las neuronas se cambiaron de medio y se mantuvieron en medio Neurobasal suplementado de la misma manera que el medio para las neuronas de los ganglios raquídeos, salvo que no necesitan neurotrofinas.

3. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

3.1. Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se empleó principalmente para obtener una transfección transitoria en células HEK293. Las células HEK293 se sembraron el día anterior a la transfección. La transfección consistió en crear un precipitado de fosfato cálcico que contenga el DNA y, de ese modo, las células lo incorporarán. Para una placa de 6 cm con un millón de células, se empleó una solución A que contenía: 5 µg de DNA plasmídico, 175 µL de H₂O, 75 µL de CaCl₂ 1M y otra solución B, que consistió en 250 µL de una solución salina tamponada (2X HBS). Se añadió gota a gota la solución A sobre la solución B, mientras ésta última estaba en constante agitación. La mezcla se dejó 20 minutos a temperatura ambiente para que se generasen los precipitados y finalmente se añadió a las células. Los precipitados se pudieron observar de color marrón en el microscopio. Normalmente, se incluyó una pequeña cantidad de un plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (pEGFP) para poder verificar al día siguiente los niveles de transfección mediante fluorescencia.

3.2. Lipofectamina 2000TM

Otro método empleado para realizar transfecciones, fue usar el reactivo Lipofectamina 2000TM (InvitrogenTM). Con este reactivo, la transfección de los plásmidos se realizó mediante liposomas que incorporan el DNA y que se fusionan con la membrana celular fácilmente. Se empleó la Lipofectamina 2000TM para aquellas líneas celulares o cultivos primarios que eran más difíciles de transfectar (las líneas celulares N2a y PC12, así como para las neuronas de los ganglios raquídeos), ya que su eficacia es mayor que la obtenida con el método del fosfato cálcico. Las células fueron transfectadas siguiendo las indicaciones del fabricante, en cuanto a la relación de DNA/cantidad de lipofectamina/número de células. La mezcla se dejó 20 minutos,

luego ya se añadió a las células y el medio se cambió a las 4-6 horas después de añadir el complejo Lipofectamina-DNA.

4. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para realizar la inmunoprecipitación, ya sea de una proteína endógena o de una proteína previamente transfectada en un cultivo celular, se añadieron 500 μ L de un tampón de lisis a 4°C por placa de 6 cm junto con una mezcla de diversos inhibidores de proteasas (ver Tabla 2). Las células se mantuvieron en el tampón de lisis durante 40 minutos en hielo y con agitación. Los lisados se recogieron y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar todos los desechos celulares. De ahí, se cogió una alícuota que fue considerada como los lisados totales y el resto de los lisados se dejaron toda la noche incubando a 4°C con el anticuerpo primario. Al día siguiente, se añadió la proteína A o G conjugada con bolas de agarosa en el caso de que sea necesario, ya que algunos de los anticuerpos primarios pueden estar ya fusionados a bolas de agarosa. La mezcla de lisados, anticuerpos y proteína A/G se dejó al menos una hora y media con agitación a 4°C. Finalmente, los inmunoprecipitados se lavaron 6 veces con tampón de lisis tras centrifugar 1 minuto a 3000 rpm a fin de eliminar restos no deseados. Para terminar, el sobrenadante se eliminó y se añadió tampón de carga de proteínas. Las muestras se hirvieron 7 minutos a 100°C y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

INHIBIDOR	ACTIVIDAD	CONCENTRACIÓN
Aprotinina	Inhibidor de proteasas	1 mg/mL
Leupeptina	Inhibidor de proteasas lisosomales	2 mg/mL
Ortovanadato	Inhibidor de tirosin-fosfatasas	1 mM
PMSF	Inhibidor de proteasas	1 mM
β -glicerofosfato	Inhibidor de fosfatasas aspárticas	10 mM
NaF	Inhibidor de serin/treonin-fosfatasas	10 mM

Tabla 2. Lista de inhibidores empleados para evitar la degradación de las proteínas.

- Unión covalente de anticuerpos a proteína A/G agarosa

Para obtener una mayor eficiencia en las inmunoprecipitaciones y para también evitar las señales inespecíficas en los Western blots, decidimos unir covalentemente

los anticuerpos (caseros o comerciales) a la proteína A o G agarosa (Calbiochem®), en función del anticuerpo primario. Para ello se mezclaron 20 µg de anticuerpo primario con 200 µl de proteína A o G agarosa (previamente bloqueadas con BSA al 2% en tampón de lisis durante una noche a 4°C) y se incubó con agitación durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se retiró. En este momento, se comenzó la unión covalente: el inmunoprecipitado se resuspendió en borato sódico 0,2 M pH 9,0, se añadió dimetilpimelimidato (DMP – Sigma-Aldrich®) a una concentración final de 20 mM y se incubó durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, para parar la reacción, se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se retiró, se añadió etanolamina 0,2 M pH 8,0 y se incubó con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó nuevamente y el anticuerpo unido de manera covalente a las bolas de agarosa se resuspendió en tampón de lisis.

5. FRACCIONAMIENTO CELULAR

La fracción citoplasmática se separó de la fracción nuclear, a partir de células en cultivo. Para ello, se partió de 1×10^6 células PC12-6/15 que se lavaron con PBS frío y se añadieron 300 µL de tampón de citosol con los inhibidores de proteasas. Las células se dejaron incubando en hielo durante 10 minutos y se miró en el microscopio recurrentemente hasta observar únicamente núcleos. En ese momento, se centrifugó a 500 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se guardó ya que será nuestra fracción citosólica. La fracción nuclear, es decir el pellet que ha quedado, se resuspendió en 100 µL de tampón de núcleos y se dejó incubando durante 1 hora en hielo pipeteando frecuentemente. Finalmente, las muestras se congelaron a -80°C y se terminaron hirviendo 1 minuto. La concentración de proteínas de cada fracción se analizó con el reactivo de Bradford (BioRad®), diluyéndolo 1/5 en agua y añadiendo concentraciones conocidas de BSA (Sigma-Aldrich®) (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL y 5 µg/mL) para realizar una recta patrón. La cantidad de proteína de las muestras se cuantificó midiendo la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro.

6. WESTERN BLOT

El proceso de Western blot se puede dividir en tres etapas: electroforesis en gel, transferencia e inmunodetección. En la electroforesis en gel, la corriente eléctrica que atraviesa el gel provoca que las proteínas previamente desnaturalizadas migren en función de su peso molecular en un gel de acrilamida (Ultra Pure Protogel® de National Diagnostics (30% acrilamida y 0.8% bisacrilamida)). Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis con un tampón de electroforesis (National Diagnostics). En función del tamaño de las proteínas que se quieran detectar, se variará la cantidad de acrilamida del gel. A mayor porcentaje de acrilamida en el gel más separadas estarán las proteínas de bajo peso molecular y viceversa (ver Tabla 3).

WB	4.0 %	8.0 %	10.0 %	12.0 %	15.0 %	Empaquetamiento
Acrilamida (mL)	0.666	1.35	1.65	2	2.5	0.52
1.5M Tris pH8.8 + 0.4%SDS (mL)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	X
0.5M Tris pH6.8 + 0.4% SDS (mL)	X	X	X	X	X	1
H2O (mL)	3.1	2.4	2.1	1.75	1.25	2.5
10% APS (mL)	50	50	50	50	50	30
TEMED (mL)	5	5	5	5	5	3

Tabla 3. Reactivos para hacer para hacer los geles de acrilamida.

Mientras las proteínas atravesaron el gel de empaquetamiento y “entraron” en el gel separador se aplicó una corriente de 90 voltios que luego ya se pudo aumentar. Cuando las proteínas ya estuvieron separadas en el gel, se transfirieron también mediante una corriente eléctrica a una membrana de PVDF donde se llevó a cabo la inmunodetección (Immobilon® - Millipore™) y que se activó previamente con metanol, se lavó bien con agua destilada y se equilibró con tampón de transferencia. La membrana y el gel se colocaron juntos procurando que no quedasen burbujas entre ellos y se dejó transfiriendo en frío. Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó durante un mínimo de 2 horas en tampón TBST con 2% de BSA (Sigma-Aldrich®) para evitar que el anticuerpo primario se uniese de manera inespecífica a la

membrana. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (ver Tabla 4) diluido en solución de bloqueo y con agitación.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Peso (KDa)
β-actina	Sigma®	1:5000	42
Bex3 (P-13)	Santa Cruz Biotechnology®	1:200	22-44
Bex3 (705)	J.C.Arévalo Lab	1 mg/mL (WB) 3 mg/mL (IF)	22-44
GAPDH	Sigma-Aldrich®	1:10000	37
GFP	Clontech®	1:2000	25
pH3	Abcam®	1:1000	18
β-Tubulina III	Sigma®	1:5000	55
TrkA (RTA)	L.F.Reichardt lab	1:400	140
TrkA (203)	D.Martin Zanca Lab	1:3000	140
Trk (C-14)	Santa Cruz Biotechnology®	1:400	140
pTrk	Cell signaling Technology®	1:500	140
Ubiquitina P ₄ D ₁	Santa Cruz Biotechnology®	1:1000	-
Normal Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology®	-	-
Normal Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology®	-	-
Proteína A-G HRP	Molecular Probes™	1:10000	-
Anti rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	1:10000	-
Anti mouse HRP	Jackson ImmunoResearch	1:8000	-

Tabla 4: Lista de anticuerpos empleados en los Western blots.

Tras la incubación, se realizaron varios lavados con TBST (los tiempos estándar fueron 3 lavados de 10 minutos cada uno). La membrana se bloqueó con 5% de leche en polvo diluida en TBST durante unos minutos para posteriormente incubar el anticuerpo secundario que está conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) durante 30 minutos en oscuridad y con agitación. Finalmente, la membrana se volvió a lavar varias veces con TBST y se procedió al revelado. Para ello, se empleó una solución de revelado casera (ECL, que contenía luminol) a la que se añadió peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en el momento y la membrana se incubó en dicha solución durante un minuto. La peroxidasa cataliza la oxidación del luminol en presencia del H₂O₂ generando una reacción quimioluminiscente que se detectará mediante la exposición de una película

fotográfica (Fujifilm®). El revelado se hizo manualmente empleando un líquido revelador y un líquido fijador (Kodak®).

Tras una primera inmunodetección, la membrana se puede volver a incubar con otros anticuerpos diferentes para detectar otras proteínas después de eliminar los anticuerpos previos. En este caso, tras el primer revelado la membrana se lavó con TBST para eliminar los restos de la reacción de revelado que hubiesen quedado. Luego, la membrana se lavó 10 minutos con glicina 0,1 M pH 2,5 (que eliminará la unión del anticuerpo con la proteína debido al bajo pH de la solución), otros 10 minutos con SDS al 1% y por último se lavó varias veces con TBST. En este momento, se puede retomar el proceso de inmunodetección desde el bloqueo de la membrana con la solución de BSA al 2% en TBST.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células crecidas en cubres fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% + 20% de sacarosa en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras de un lavado rápido con PBS se tratan con PBS + NH₄Cl 1M durante 10 minutos y se volvieron a lavar con PBS. Después, las células fueron bloqueadas con una solución que contenía 10% FBS, 2% BSA y 0,1% Tween-20 en PBS y 0,1% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) para permeabilizar (en caso de querer detectar proteínas intracelulares y no de superficie) y permitir que los anticuerpos puedan penetrar en las células. Las células se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo. Tras la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, se lavaron con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario que está conjugado con un fluoróforo (ver Tabla 5) y finalmente, se incubaron con Hoechst 33342 (Molecular Probes™) a concentración final de 1 µg/mL en PBS durante 5 minutos para marcar los núcleos. Finalmente, las células se lavaron durante 40 minutos con PBS y se montaron con ProLong® Gold (Invitrogen™). Las células se examinaron y las imágenes se obtuvieron en un microscopio invertido de fluorescencia. Nota: para los anticuerpos conjugados FITC y TRITC que son producidos en burro se usó como solución de bloqueo suero de burro al 5% v/v en PBS + 0,1% Tween-20, para evitar problemas de inespecificidad del anticuerpo secundario según recomendación de la casa comercial.

Anticuerpo	Casa comercial	Fluoróforo conjugado	Dilución
Donkey α Goat	Jackson ImmunoResearch	TRITC	1:50
Donkey α Goat	Jackson ImmunoResearch	FITC	1:50
Goat α Mouse	Molecular Probes™	Alexa Fluor® 568	1:500
Goat α Rabbit	Molecular Probes™	Alexa Fluor® 568	1:500
Goat α rabbit	Molecular Probes™	Alexa Fluor® 488	1:500

Tabla 5. Lista de los anticuerpos secundarios usados para las inmunofluorescencias.

8. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

8.1. Manipulación bacteriana

8.1.1. Crecimiento en medio sólido y en medio líquido

Las bacterias que se emplearon fueron DH5 α de *E. coli*. Las bacterias crecieron en medio líquido LB junto con el antibiótico correspondiente y con agitación a una temperatura en un intervalo desde los 30°C hasta los 37°C. Los antibióticos empleados fueron ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich®) o kanamicina (30 μ g/mL) (Sigma-Aldrich®) según la selección que contenía cada plásmido. El crecimiento en medio sólido se realizó en medio LB-agar con el antibiótico correspondiente y se crecieron en el mismo intervalo de temperaturas. Las bacterias competentes se conservaron congeladas a -80°C.

8.1.2. Transformación

Para su transformación, las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se mezcló una alícuota de 100 μ l con el DNA transformante que nunca fue más del 10% del volumen final. Después de incubar en hielo durante 4 minutos, se realizó un choque térmico a 42°C durante un minuto y medio. Tras mantener las bacterias de nuevo en hielo durante 5 minutos, se añadió 1 mL de LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación. Por último, se recogieron por centrifugación y se esparcieron en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente.

8.2. Manipulación del DNA

8.2.1. Obtención de DNA plasmídico

Las preparaciones de DNA plasmídico a partir de los cultivos bacterianos, se obtuvieron de dos maneras diferentes: 1) gracias al uso de kits comerciales con los que se obtiene una buena calidad y cantidad de DNA o 2) de manera casera con el “*Boiling method*” (Holmes & Quigley, 1981). El DNA plasmídico se obtuvo a partir de cultivos bacterianos de 1 mL para *minipreps* o de 200 mL para *midipreps* en presencia del antibiótico adecuado. Los kits comerciales empleados fueron: *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System de Promega* y *Genopure Plasmid Midi Kit (Roche)*. Ambos kits se basan en una lisis alcalina de las bacterias y posterior purificación del DNA en columna. Con el método casero, las bacterias se lisaron gracias a la lisozima y al calor, el DNA que se obtuvo no tuvo una limpieza y calidad tan buena como la obtenida con la lisis alcalina del kit comercial, pero fue suficiente para poder analizar el DNA mediante cortes enzimáticos.

8.2.2. Digestión y ligación de DNA

Para las digestiones de DNA se emplearon las enzimas de restricción correspondientes a la temperatura de corte recomendada por el fabricante y se empleó un tampón universal donde corta cualquier combinación de enzimas. Una vez cortado el DNA, se cargó en un gel de agarosa para observar si los fragmentos obtenidos eran del tamaño correcto. Los sitios de restricción de los plásmidos, así como los tamaños que deberían obtenerse tras los cortes enzimáticos, siempre se revisaron con el programa Serial Cloner 1-3®.

La reacción de ligación entre dos fragmentos de DNA se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs®), que cataliza la creación de un enlace fosfodiéster entre un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3', siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de vector que se puso en la reacción de ligación fueron 100 ng. La proporción molar utilizada para el inserto fue 1:3 o 1:5 (vector:inserto) dependiendo de si la ligación tenía extremos romos o cohesivos, respectivamente. La reacción se dejó durante dos horas a 15°C – 20°C. Paralelamente, siempre se hizo a la vez un control negativo de la reacción de ligación donde todas las condiciones son iguales salvo que no se añadió inserto.

8.2.3. Purificación de fragmentos de DNA

Para purificar un fragmento de DNA, previamente se separó el fragmento deseado mediante electroforesis en un gel de agarosa (de concentración variable desde 0,8% hasta 2%) en tampón TAE con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Una vez separada la banda de DNA deseada, se extrajo del gel de agarosa con una cuchilla y se transfirió a un tubo nuevo. A partir de ahí, se purificó mediante el kit comercial *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.3. Construcciones: shRNA

8.3.1. Diseño de los cebadores

El diseño de los oligonucleótidos para los diversos shRNA sigue un mismo patrón. Lo primero fue identificar una secuencia específica de 19 nucleótidos que sea complementaria al RNA mensajero de la proteína que deseamos eliminar. Para ello se emplearon diversos programas informáticos, como por ejemplo las páginas web <http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/> ó <http://www.ensembl.org/index.html> para diseñar los oligonucleótidos y comprobar su especificidad. Una vez identificada dicha secuencia, el oligonucleótido se diseñó para poder ser introducido de manera directa entre los sitios de restricción *MluI* y *Clal* del vector pLVTHM. Para ello, un extremo del oligonucleótido contenía la secuencia cohesiva correspondiente a la generada por un corte de la enzima *MluI* y el otro extremo la secuencia cohesiva producida por el corte de la enzima *Clal*. Desde el extremo 5' se puso la secuencia de corte generada por la enzima *MluI* (CGCGT), los 19 nucleótidos con sentido del shRNA, una secuencia que generará la horquilla, y nuevamente la secuencia específica antisentido de 19 nucleótidos. Al final, se puso una cola de poli-A en el extremo 3' junto con el corte generado por la enzima *Clal* (AT). Por ejemplo: 5' CGCGT 19 nt sentido TTCAAGAGA 19 nt antisentido TTTTGGAAAT 3'

SECUENCIA de shRNAs	
shRNA Bex3 RATA	5' CAACAACCACAACCATAAC 3'
shRNA Bex RATÓN	5' CAACAACAACAACCACAAC 3'
shRNA control	5' GCGCGCTTTGTAGGATTCG 3'

Tabla 6: Secuencia de 19 nucleótidos de los diversos shRNA.

Nota: la secuencia del shRNA de Bex3 de ratón reconoce al 100% las dos isoformas de la proteína. La secuencia del shRNA Bex3 de ratón ha sido ya empleada y probada su eficacia (Kim et al, 2004).

8.3.2. Anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos

Tras resuspender los oligonucleótidos que se utilizaron para los shRNAs a una concentración de 100 μ M, se anillaron. Para ello, se mezclaron ambos oligonucleótidos junto con el tampón de anillamiento y la mezcla se puso en agua a 95°C durante 4 minutos. A continuación, se dejó que el agua caliente se fuese enfriando poco a poco a temperatura ambiente para que los oligonucleótidos se anillasen correctamente. La reacción de fosforilación se llevó a cabo utilizando la enzima T4 poli-nucleótido quinasa (PNK-Fermentas®). En la reacción, se mezclaron los oligonucleótidos ya anillados junto con ATP para que cediese los grupos fosfatos, la enzima T4 poli-nucleótido quinasa y el tampón de la enzima facilitado por la casa comercial. La reacción tuvo lugar a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, se inactivó la actividad quinasa manteniendo la reacción durante 15 minutos a 70°C.

8.3.3. Defosforilación del vector

La defosforilación del vector se realizó sobre un vector previamente cortado con una enzima de restricción. En nuestro caso, el vector empleado fue el pLVTHM y las enzimas que se emplearon para realizar los cortes fueron *MluI* y *ClaI*. La reacción de defosforilación se llevó a cabo con la enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline phosphatase New England Biolabs*®) que es una fosfatasa y eliminó los grupos fosfato en el extremo 5' del vector para así evitar su recircularización. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. La actividad fosfatasa de la enzima CIP no se inactiva mediante calor por lo que se purificó el DNA a partir de un gel de agarosa.

8.4. Construcciones: pEGFP-Bex3 resistente

Para realizar esta construcción, se tuvo que realizar una mutagénesis dirigida para mutar la secuencia de nucleótidos de Bex3 sin modificar la secuencia de aminoácidos que constituyen la proteína. Así, el shRNA contra Bex3 reconocerá únicamente el RNA mensajero endógeno de Bex3 mientras que no se podrá unir al RNA mensajero mutado y así éste último se podrá expresar y dará lugar a una proteína idéntica a la

proteína endógena en cuanto a estructura y función. Para llevar a cabo la mutagénesis “*in vitro*” se empleó la enzima *Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase* y la enzima de restricción *DpnI*. El primer paso de esta mutación dirigida fue diseñar dos oligonucleótidos complementarios que tuviesen mutado el último nucleótido de cinco tripletes para que el cDNA no fuese reconocido por el shRNA, pero que codificase para los mismos aminoácidos.

Bex3 mutado F: 5´ GCT GCA AAC AAC AAT AAT CAT AAT CAC AAT CAC AAC CAC AAC CAC 3´

Bex3 mutado R: 5´ GTG GTT GTG GTT GTG ATT GTG ATT ATG ATT ATT GTT GTT TGC AGC 3´

Nota: Las mutaciones se presentan en negrita.

Se emplearon dichos oligonucleótidos como cebadores para realizar una PCR, de este modo las mutaciones se fueron incorporando a medida que se fue amplificando el plásmido con los ciclos. El DNA molde que se empleó fueron 100 ng del plásmido pEGFP-Bex3. Los oligonucleótidos se usaron a una concentración de 10 µM y se añadieron dNTPs a concentración 25 µM. El volumen final de la reacción fue de 50 µL. El programa de PCR que se empleó fue: 94°C durante 5 minutos para desnaturalizar el DNA, seguido de 14 ciclos de 94°C durante 30 segundos, un anillamiento de 30 segundos a 50°C y una extensión a 68°C durante 14 minutos y, finalmente, después de los 14 ciclos una extensión adicional de 10 minutos a 68°C.

El producto de la PCR se trató con *DpnI*, una enzima de restricción que corta únicamente el sitio de reconocimiento (GATC) cuando la adenina está metilada, con lo cual cortó todo el DNA molde utilizado mientras que no afectó al DNA amplificado en la PCR ya que este último no está metilado. El tratamiento con *DpnI* se hizo a 37°C durante 3 horas y media. Tras transformar y amplificar el DNA se secuenció en la unidad de secuenciación de la Universidad de Salamanca para comprobar si las mutaciones se habían introducido correctamente. Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se comprobó que únicamente estuviesen presentes las mutaciones deseadas. Como no se secuenció todo el plásmido, si no únicamente la zona que se quería quiso mutar, se realizó una subclonación para evitar cualquier mutación no deseada en otro punto del DNA. Para ello, se emplearon enzimas de restricción que tenían su sitio de corte lo más cerca posible de la secuencia mutada. Se subclonó en el propio vector pEGFP-Bex3.

8.5. Construcciones: pWPI-GFP-Bex3

La generación de esta construcción se hizo a partir de los vectores pWPI y pEGFP-Bex3. El vector pWPI fue cortado con la enzima *PmeI* que lo linearizó generando unos extremos romos y posteriormente fueron defosforilados. Por otro lado, se hizo una digestión de pEGFP-Bex3 primero con la enzima *SmaI* generando un extremo romo y luego se añadió *Agel* generando un extremo cohesivo. Tras la digestión se convirtió el extremo cohesivo en romo mediante tratamiento con la enzima *Mung Bean Nuclease* (New England Biolabs®) durante una hora a 25°C que eliminó los nucleótidos sueltos del extremo cohesivo. Finalmente, tras purificar el inserto se realizaron los procesos de ligación, transformación, etc. Para comprobar si las colonias tenían inserto y en la orientación apropiada, en vez de comprobarlo mediante cortes enzimáticos se comprobó realizando una PCR ya que el inserto pudo introducirse en ambas orientaciones.

8.6. Construcciones: pEGFP-Bex3 L94-97A

La generación de este mutante conllevó mutar dos leucinas en dos alaninas. Las leucinas se encuentran en la secuencia de exportación nuclear de la proteína Bex3 y son esenciales para su actividad, de este modo se provocó que la secuencia NES no tuviese funcionalidad. Se mutaron las leucinas 94 y 97 de la proteína Bex3 de rata.

CTT leucina 94 → alanina 94 GCT

CTG leucina 97 → alanina 97 GCG

Para realizar esta mutación dirigida, al igual que en el caso de la construcción pEGFP-Bex3 resistente, se empleó la enzima *Pfu Ultra II polymerase* y la enzima de restricción *DpnI*. El primer paso fue diseñar unos oligonucleótidos que tuviesen las mutaciones deseadas. Dichos oligonucleótidos se alinearon con pEGFP-Bex3 (nucleótidos 1667-1702). El DNA molde fueron 100 ng de pEGFP-Bex3. El programa de PCR para amplificar el DNA fue: 94°C durante 5 minutos y luego 14 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 43°C durante 30 segundos, y 68°C durante 14 minutos. Finalmente, se dejó 10 minutos a 68°C para una extensión adicional.

9. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES

Para eliminar la expresión de la proteína Bex3 se empleó la técnica del *small hairpin RNA* (shRNA), la cual se basa en el mecanismo de los RNA de interferencia para destruir el RNA mensajero codificante para la proteína de interés. Se introdujo en las células un shRNA que anilla específicamente con el mRNA de la proteína diana, el mRNA es cortado en pequeños fragmentos y ello conlleva a la disminución de los niveles de expresión de la proteína. Las secuencias de los shRNAs empleadas están recogidas en la Tabla 6. La secuencia para el shRNA control es del DNA de *Euglena gracilis*. Dichas secuencias fueron clonadas entre los sitios de restricción *MluI* y *Clal* del vector lentiviral pLVTHM (ver el apartado 8 “Construcciones plasmídicas” para los detalles). Antes de producir las partículas lentivirales, los plásmidos que se obtuvieron tras los cortes enzimáticos y la ligación fueron secuenciados para asegurar que la secuencia que contenían era correcta. Las partículas lentivirales fueron producidas transfectando células HEK293FT ($2,5 \times 10^6$ células en placas de 10 cm) con el método del fosfato cálcico empleando 9 μg de vector pLVTHM que contiene la secuencia de interferencia, 6 μg de psPAX2 y 5 μg de pMD.2G (plásmidos que contienen los genes virales). A las 8 horas post-transfección, el medio de las células HEK293FT se retiró y se añadió medio nuevo sin antibióticos. Dos días después, se recogió la totalidad del medio donde estaban creciendo las células HEK293FT, se centrifugó durante 15 minutos a 4800 rpm para eliminar posibles restos celulares. El sobrenadante conteniendo las partículas lentivirales se filtró a través de filtros de tamaño de poro de 45 μm y se guardó en alícuotas a -80°C . Para concentrar las partículas lentivirales, tras la filtración se pueden ultracentrifugar a 26000 rpm durante 2 horas. Las partículas se resuspendieron en PBS y se guardaron igualmente en alícuotas a -80°C .

Para la sobre-expresión de proteínas con partículas lentivirales se empleó el vector pWPI, donde se puede introducir la proteína deseada y posteriormente generar partículas lentivirales del mismo modo que se producen con el vector pLVTHM.

10. RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

10.1. Extracción del ácido ribonucleico (RNA) de células en cultivo

La extracción de RNA se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen® Life Technologies). Las células se lavaron con PBS y se añadió una cantidad variable de Trizol a un cultivo monocapa en función del tamaño de la placa según las recomendaciones del fabricante. Las células se recogieron en un tubo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se añadió cloroformo, se mezcló bien mediante agitación y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación se observaron dos capas; la capa superior, que corresponde a la fase acuosa, se transfirió a un tubo nuevo y se añadió isopropanol para precipitar el RNA. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de RNA con etanol al 75%. Se volvió a centrifugar a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar brevemente el pellet. El RNA se resuspendió en 25 µL de agua sin RNAsas y se cuantificó en un NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific®).

10.2. Retrotranscripción – síntesis de la primera cadena

La síntesis de la primera cadena de DNA complementario (cDNA) se obtuvo por retrotranscripción a partir del RNA gracias al kit comercial *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega®) usando *random primers* (Promega®). El ciclo de temperaturas fue: 5 minutos a 70°C (para desnaturalizar el RNA) y luego otros 5 minutos a 25°C (para que se anillen los cebadores) y finalmente a 42°C durante una hora (para que tenga lugar la elongación). La cantidad y la calidad del cDNA se cuantificó en el NanoDrop.

10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el cDNA se empleó como DNA molde para las PCR. Se partió de 1 µg de cDNA y se empleó una mezcla 2X de PCR (que contenía la polimerasa y los dNTPs y el tampón). Realizando experimentos preliminares, con la PCR semicuantitativa se determinó la cantidad relativa de cDNA y el intervalo de ciclos de PCR que permiten la amplificación lineal de *bex3* y de *β-actina*. Las condiciones de la PCR para amplificar Bex3 fueron: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, seguido de 68°C durante 40 segundos. El número de ciclos fue de 32, tras los cuales se mantuvo una temperatura de 68°C durante 4 minutos adicionales. Los oligonucleótidos se emplearon a una concentración de 25 µM y el volumen total de la reacción fue de 20 µL. Se empleó el programa informático Image J del NIH (*National Institutes for Health*) para cuantificar la intensidad de cada banda. La expresión relativa del RNA mensajero de *bex3* se evaluó calculando la intensidad del ratio *bex3/β-actina* de cada muestra.

Cebadores

Bex3 resistente F (Rata)	5'-GCTGCAAACAACAATAATCATAATCACAATCACAACCACAACCAC-3'
Bex3 resistente R (Rata)	5'-GTGGTTGTGGTTGTGATTGTGATTATGATTATTGTTGTTTGCAGC-3'
Bex3 L94-97A F (Rata)	5'-ATCCGGAGAAAGGCTAGGGAGGCGCAGTTGAGAAAT-3'
Bex3 L94-97A R (Rata)	5'-ATTTCTCAACTGCGCCTCCCTAGCCTTTCTCCGGAT-3'
β-actina F	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'
β-actina R	5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'
Bex3 F (Rata)	5'-CATTCCCAACAGGCAGATG-3'
Bex3 R (Rata)	5'-GGCATAAGGCAGAATTCATC-3'
TrkA F (Rata) - qPCR	5'-TCTCCTTCTCGCCAGTGGAC-3'
TrkA R (Rata) – qPCR	5'-ACAGCCACAGAGACCCCAA-3'
TrkB F (Rata) – qPCR	5'-CCGGACACATTTGTTTCAGCA-3'
TrkB R (Rata) - qPCR	5'-TTCCCAAAGGCTCCTTCTCC-3'
TrkA F (ChIP)	5'-CGTGAGGGACATGAGGAAG-3'
TrkA R (ChIP)	5'-GGGCGGTGTTAAAGACTAGC-3'

Tabla 7. Secuencias de los diversos oligonucleótidos que se emplearon como cebadores para realizar las PCR y las qPCR.

10.4. qPCR (a tiempo real)

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron por triplicado usando *SYBR-Green Power Master Mix* (Applied Biosystems). El nivel del mRNA de cada gen fue normalizado usando β -actina como referencia. Los cebadores que se emplearon para amplificar *trkA* (Ntrk1 ref NM_021589.1) presentaron una eficiencia del 106%, mientras que la eficiencia para amplificar *trkB* (Ntrk2 variante 1, ref NM_012731.2 *full length*) fue del 104,5% y para β -actina la eficacia de los cebadores fue del 107%. El sistema de detección empleado fue *ABI Prism 7300 detection system* (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C, luego 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 61,5°C. Tras la amplificación, se obtuvieron las curvas de desnaturalización para corroborar la amplificación de un único producto homogéneo de PCR. Se empleó el método comparativo del ciclo umbral de amplificación (*2^{-ΔΔCt} method*) para relativizar el nivel de transcripción del gen de interés frente al nivel del gen β -actina.

11. HIBRIDACIÓN IN SITU

11.1. Generación de las sondas

Las sondas se generaron a partir de DNA de cultivos neuronales de ganglios raquídeos de embriones de ratón. La PCR para amplificar el DNA fue: 94°C durante 4 minutos para desnaturalizar el DNA, seguidos de 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, un anillamiento en gradiente de temperatura durante 15 segundos y luego una extensión a 68°C durante 20 segundos y finalmente, después de los 35 ciclos, una extensión adicional de 2 minutos a 68°C. El gradiente para amplificar *trkA* fue desde 50,8°C hasta 63,3°C mientras que el gradiente para amplificar *bex3* fue desde 49,4°C hasta 62°C.

Oligonucleótidos para las sondas

TrkA-1F	5'-ATATAGAATTCGGATCCATGCTGCGAGGCC-3'
TrkA-1B	5'-ATATAGAATTCTCCCGCGCCCCGAGG-3'
Bex3-1F	5'-ATATAGAATTCGGATCCATGGAGCAGCCCC-3'
Bex3-1B	5'-ATATAGAATTCCATCTCCACCCAACCCGTC-3'

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar el DNA y poder crear las sondas para la hibridación *in situ*.

Tras la PCR, se separaron los productos en un gel de agarosa y la banda correspondiente a cada DNA fue purificada (una banda de 196 pb). Una vez obtenido el DNA amplificado se digirió con *EcoRI* a 37°C durante toda la noche. Tras la digestión enzimática, se realizó la ligación con el vector pcDNA3.1 linearizado con *EcoRI* y defosforilado. Para comprobar la orientación del inserto se emplearon cortes con *EcoRI* y *BamHI* (secuencias de reconocimiento de corte que habían sido introducidas en los oligonucleótidos). Si tuviésemos el inserto en las dos orientaciones, tendríamos las dos sondas, *sense* y *antisense*. El DNA se linearizó con *EcoRV* y se purificó mediante el método del fenol-cloroformo. Una vez obtenido el DNA linearizado y purificado, se sintetizó la sonda (cRNA) según el siguiente protocolo: 1 µg DNA molde, 2 µL DTT (100 mM), 4 µL de tampón 5X, 1,5 µL de UTPs-DIG (Roche), 0,5 µL T7 RNA polimerasa (Fermentas - 20 U/mL), 0,5 µL Ribolock (Fermentas - 40 U/mL) y H₂O DEPC hasta 20 µL. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas y, a continuación, el DNA molde se eliminó, se añadió a la mezcla 2 µL de DNAsas (libre de RNAsas de Fermentas) (1 U/mL), 4 µL de tampón 10X DNAsa y 14 µL de H₂O DEPC, y se incubó nuevamente a 37°C durante otros 40 minutos. Por último, se precipitó el cRNA añadiendo 60 µL de 0,5% SDS, 2 mM EDTA en agua, 11 µL 3M NaOAc y 250 µL de etanol absoluto, se incubó a -20°C durante toda la noche y, al día siguiente, se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µL de agua DEPC. La cantidad y la calidad de la sonda se comprobó en el NanoDrop.

11.2. Dot blot

La sonda sintetizada se comprobó mediante la técnica de Dot blot. En una membrana de Southern blot (Immobilon - NY+ de Millipore®) se depositó 1 µl de la sonda generada. La membrana se expuso a 80°C durante 10 minutos y luego un minuto bajo una luz ultravioleta para posteriormente, ser incubada con BSA al 2% en TBST y se añadió el anticuerpo α -Digoxigenina-AP (Roche) a una concentración 1:9000. El anticuerpo se incubó toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó dos veces durante 10 minutos con TBST y otras dos veces de 10 minutos con *AP Stain Buffer* (Roche). Finalmente, para revelar se añadió gota a gota

BM-Purple AP substrate (Roche) mientras se mantuvo la membrana cubierta para evitar la luz. El revelado nos dio una idea de la intensidad de la sonda.

11.3. Preparación de los cortes

Se obtuvieron embriones de E10.5, E11.5, E12.5 y E13.5 días de gestación (considerando el día que se vio el tapón mucoso como E0.5). Los embriones fueron fijados en PFA al 4% en PBS, a 4°C y con agitación durante 24 horas, tras las cuales se cambió el PFA y se puso nuevo durante otras 24 horas. Tras ese tiempo, los embriones fueron puestos en una solución de sacarosa al 30% manteniendo la agitación y la temperatura. Cuando los embriones se equilibraron con la solución de sacarosa, fueron incluidos en O.C.T. (Tissue Tek™) empleando nitrógeno líquido para una rápida congelación. Finalmente, se cortaron en secciones de 12 µm en un criostato Thermo Scientific Microm HM 550.

11.4. Hibridación *in situ*

El protocolo de la hibridación *in situ* fue el siguiente: 1) se fijaron los cortes con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente; 2) se aclararon y lavaron con PBS; 3) se trataron con proteinasa K (20 mg/mL) en PBS durante 6 minutos; 4) se lavaron con PBS durante 5 minutos; 5) se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos; 6) se lavaron y aclararon con PBS; 7) se acetilaron durante 10 minutos; 8) se aclararon y lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos; 9) se diluyó la sonda de hibridación en solución de hibridar y se calentó a 80°C durante 5 minutos. En el caso de la sonda de *bex3* se usó a una concentración final de 1 µg/mL, la sonda de *trkA* se usó a la concentración de 0,5 µg/mL; 10) las secciones se hibridaron con 200 µL por porta a 55°C con humedad durante toda la noche; 11) se lavaron con 5X SSC (precalentado a 65°C); 12) se lavaron con 50% de formamida (Sigma®) en 2X SSC durante 30 minutos a 65°C; 13) se lavaron con tampón RNAsa durante 15 minutos a 37°C; 14) se trataron con 20 mg/mL de RNAsa A durante 30 minutos a 37°C; 15) se lavaron con tampón de RNAsa durante 15 minutos a 65°C; 16) se lavaron con 2X SSC a 37°C durante 15 minutos; 17) se lavaron con 0,1X SSC a 37°C durante 15 minutos; 18) se lavaron con PBT (PBS + 0,1% Tween 20) durante 15 minutos a temperatura ambiente; 19) se bloquearon como mínimo una hora y media con PBT + 10% NGS

(*Normal Goat Serum*), 20) se añadió el anticuerpo α -digoxigenina-AP en PBT + 1% NGS a concentración 1:3000 y se dejó toda la noche a 4°C; 21) se aclararon y lavaron 2 veces con PBT a temperatura ambiente y con agitación durante una hora y media; 22) se lavaron 2 veces con el tampón *AP Stain Buffer* durante 10 minutos; 23) se tiñó con *BM-Purple AP substrate* + 1mM tetramizol a temperatura ambiente, en oscuridad y en condiciones de humedad; 24) se paró la reacción lavando varias veces con agua del grifo. Finalmente, las secciones se incubaron en 2 mM EDTA/dH₂O y 25) se montaron con Mowiol (Calbiochem®) e incubaron a 37°C hasta que se secaron.

11.5. Hibridación *in situ* e inmunofluorescencia

Cuando se realizó una inmunohistoquímica y una hibridación *in situ* en la misma sección, se realizó primero la inmunohistoquímica. Las secciones fueron post-fijadas con PFA al 4% durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 5% de NGS + 0,1% Tritón X-100 en PBS durante 30 minutos. Se incubaron con el anticuerpo RTA (que reconoce específicamente TrkA) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor®488 (Invitrogen™) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavaron otras 3 veces con PBS y se procedió a realizar la hibridación *in situ* como se ha descrito anteriormente, usando el anticuerpo α -DIG-Rhodamine (Roche) para detectar el mRNA de *bex3*. Las imágenes se captaron con un microscopio confocal Leica.

12. ENSAYO ENZIMÁTICO DE INMUNOADSORCIÓN (ELISA)

Para llevar a cabo los ensayos de ELISA que detectaban la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bacteriana, se empleó un kit comercial de Roche. El protocolo llevado a cabo fue el indicado en las instrucciones del fabricante.

El primer día, se sembraron 75000 células N2a en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron con diversos plásmidos (GFP o GFP-Bex3 o shRNA control o shRNA Bex3 o shRNA Bex3 + GFP-Bex3 resistente) junto con el plásmido pMS8 que contiene el promotor de *trkA* fusionado a la secuencia que codifica para la proteína CAT (Sacristan et al, 1999) (Figura R15A). La transfección se realizó con Lipofectamina 2000™ y a las 6 horas se cambió el medio a las células. A las 48h y tras comprobar por

fluorescencia que las células expresaban la proteína verde fluorescente, se comenzó el ELISA con la lisis de las células. En todos los experimentos se realizaron duplicados. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas LT-4000 *microplate reader* (Labtech) a una longitud de onda de 405nm. Se guardó una alícuota de cada muestra para posteriormente realizar un Western blot y comprobar los niveles de transfección. Para asegurar de que todas las células que hubiesen incorporado el pMS8, además hubiesen incorporado el segundo plásmido, éste se puso en una cantidad tres veces superior a la cantidad de pMS8 que se empleó para realizar la transfección. Los experimentos realizados con otros vectores (pMS10.3, pMS16 o pMS22) se realizaron de manera análoga a lo descrito para el pMS8.

Los experimentos de ELISA con estímulos de NGF se realizaron en células PC12 ya que éstas responden mejor al NGF que las células N2a, puesto que éstas últimas expresan mayoritariamente un receptor truncado. Dichos experimentos se realizaron de manera análoga a los realizados en las células N2a.

13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Para realizar la inmunoprecipitación de cromatina, se emplearon cuatro placas confluentes de 10 cm con células N2a (aproximadamente unos 40 millones de células). Las células se lavaron con PBS, se añadieron 3 mL de PBS con formaldehído a una concentración final del 1% (Merck®) por placa y se incubaron durante 10 minutos a 37°C para que se creasen las uniones entre el DNA y las proteínas. Al cabo de los diez minutos se retiró el medio y se lavó con PBS frío. Las células se recogieron con 1 mL de PBS por placa junto con el coctel de inhibidores de proteasas en frío (ver Tabla 2). Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de tampón de lisis de ChIP que contenía los inhibidores de proteasas. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos y fueron sometidas a sonicación durante un minuto en un baño de ultrasonidos (USC100 de VWR™). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y se guardó una alícuota de 50 µl del sobrenadante como *input* a -80°C. El resto del sobrenadante se diluyó 10 veces con tampón de ChIP. Para disminuir las uniones inespecíficas, se añadieron 60 µl por cada 2 mL de sobrenadante de proteína G-agarosa y se incubó durante una hora a 4°C con agitación. Las muestras se centrifugaron 2 min a 2000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante, al

cual se le añadió o bien el anticuerpo α -Bex3-proteína G-agarosa (80 μ L) o como control negativo añadimos IgG de cabra unidas a proteína G-agarosa (80 μ L). Las muestras se incubaron con agitación toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 2000 rpm durante 2,5 minutos y se eliminó el sobrenadante para “lavar” los inmunoprecipitados dos veces con el tampón de lavado del complejo inmune bajo en sal durante 4 minutos con agitación a 4°C. Después, se repitieron los pasos de centrifugación y lavado con el tampón de lavado del complejo inmune alto en sal y por último con el tampón TE. Para eluir se añadieron 250 μ L del tampón de elución y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se repitió la elución y se juntaron los dos eluidos. A continuación, a las muestras eluidas y a los *inputs* se les añadió 20 μ L de NaCl 5 M y se dejó incubando durante 5 horas a 65°C para revertir el *cross-link*. Luego se añadieron 10 μ L de EDTA 0,5 M, 20 μ L de Tris-HCl 1 M pH 6,5 y 1 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y las muestras se incubaron durante una hora a 45°C. Finalmente, se extrajo el DNA con el método del fenol-cloroformo, dejando que el DNA precipitara durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se extrajo el DNA y se realizó una PCR convencional para analizar la presencia del promotor de *trkA*. El programa de la PCR fue: 94°C durante 5 minutos, luego 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante otros 30 segundos y 72°C durante también 30 segundos para finalmente realizar una elongación de 4 minutos a 72°C.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La cuantificación de las RT-PCR semi-cuantitativas se realizó empleando el programa informático Image J (NIH). La intensidad de las bandas de diversos experimentos fue cuantificada y normalizada frente a la intensidad de la banda de β -actina en el control.

Los Western blot se escanearon y se cuantificaron mediante el programa informático Image J (NIH). Los datos se normalizaron frente a la cantidad de β -tubulina y se representan como media \pm s.e.m

Todos los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado. Los valores estadísticos fueron obtenidos con el programa informático GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) y están expresados como la media \pm el error estándar de la media (s.e.m.). Para determinar las diferencias significativas se usó el

Materiales y Métodos

test de la t de Student con dos colas. Para los datos de los experimentos de ELISA, se emplearon siempre duplicados y se consideraron datos pareados. Los valores con $p < 0,05$ se consideraron significativos.

LISTA DE TAMPONES

TAMPONES:

Tampón 2X PCR de PROMEGA

2X HBS: 140 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 50 mM HEPES pH 7,05.

Tampón de lisis: 20 mM Tris pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40).

Tampón de carga (2X SDS): 100 mM Tris pH 7,5, 25% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol.

Tampón de citosol: 10 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% NP-40.

Tampón de núcleo: 50 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% NP-40.

Tampón de electroforesis: 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS.

Tampón de transferencia: 400 mM glicina, 50 mM Tris y 10% metanol.

Tampón TBST: 10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween-20.

ECL: 0,1 M Tris pH 9,35 con 195 mg luminol (sigma) y 237 mg de para-iodofenol (Aldrich) para 500 mL de solución.

Tampón de anillamiento de oligonucleótidos: 100 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, 30 mM HEPES pH 7,4 y 2 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

TAMPONES para la hibridación *in situ*:

Tampón de acetilación: 1,3 mL Trietanolamina (Sigma), 260 mL de 12N HCl, 250 mL de anhídrido acético (Fluka) y completar con H_2O DEPC hasta un volumen final de 1000 mL.

Tampón de hibridación: 50 mL formamida (Sigma), 20 mL de 50% sulfato de dextrano (Sigma), 2 mL de 50 X Denhardt's (sigma), 2,5 mL de 10 mg/mL de yeast tRNA (sigma), 6 mL 5M NaCl, 2 mL 1M Tris-HCl pH 8,0, 1 mL 0,5M EDTA, 1 mL 1M Na_3PO_4 , 5 mL 20% sarcosyl (sigma) y H_2O hasta completar un volumen de 100 mL.

Tampón de RNasa: 100 mL 5M NaCl, 10 mL Tris-HCl pH 7,5, 10 mL 0,5M EDTA, H_2O hasta completar un litro.

Tampón de tinción AP: 2 mL de 5M NaCl, 10 mL 1M Tris-HCl pH 9,5, 5 mL 1M MgCl₂, 0,1 mL Tween-20, H₂O hasta completar un volumen de 100 mL.

5X SSC: 3M NaCl pH 7, 0,3M Na₃C₃H₅O(COO)₃.

TAMPONES para el CHIP:

Tampón de lisis: 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1 y el cóctel de inhibidores de proteasas.

Tampón de CHIP: 0,01% SDS, 1,1% Tritón X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1, 167 mM NaCl.

Tampón de lavado del complejo inmune bajo en sal: 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl.

Tampón de lavado del complejo inmune alto en sal: 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 500 mM NaCl.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,1, 1 mM EDTA.

Tampón de elución: 1% SDS, 0,1M NaHCO₃.

RESULTADOS

PREVIO: ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO

Para identificar proteínas que interaccionasen con los receptores de neurotrofinas Trk, se realizó un ensayo de doble híbrido. El ensayo se efectuó con la región yuxtamembrana del receptor de neurotrofinas TrkB como cebo, concretamente con la región comprendida desde la histidina 458 (His 458) hasta la glicina 544 (Gly 544) y se empleó una genoteca de cDNA de ganglios raquídeos de rata de día postnatal 1 (P1) descrita anteriormente (Kong et al, 2001). El ensayo se realizó como se describe previamente (Yano et al, 2001) y una de las proteínas que se identificó en dicho ensayo fue la proteína Bex3.

Las neuronas de los ganglios raquídeos o DRG (*Dorsal Root Ganglion*) de rata a P1 a partir de los cuales se generó la genoteca de cDNA para realizar el ensayo de doble híbrido, expresan los receptores de neurotrofinas TrkA, TrkB y TrkC aunque con unos porcentajes muy diferentes. Así, a P0-P2 entorno al 75% de las neuronas expresan el receptor TrkA (Benn et al, 2001; Bennett et al, 1996; Guo et al, 2001). Teniendo esto en consideración y también que la similitud entre los dominios yuxtamembrana de TrkA y de TrkB es de un 56% (Figura R1), es por lo que decidimos comprobar si la proteína Bex3 interaccionaba con el receptor TrkA.

```

trkB      -----MSPWPRWHGPAMARLWGLCLLVLGFWRASLACPMSCCKSTTRIWCTEPEPSPGIVAF
trkA      MLRGQRHGLGWHRPAAG-LGGLVTSL-----MLACACAASCR-----ETCCPVGPSGLRCT
          .** ** . * ** : : ** **: . * *: .
trkB      PR----LEPNSIDPENITEILIANQKRLEIINEDDVEAYVGLKNLTIIVDSGLKFVAYKAF
trkA      RAGTLNLTLRGLRGAGNLTELYVENQRDLQRLEFEDLQGLGELRSLTIIVKSGLRVFAPDAF
          ..**:: : **: *: :: **: . *:.****.***:*** .**
trkB      LKNGNLRHINFTRNKLTSLSRRHFRHLDLSDLILTGPNPFTCSCDIMWLKTLQETKSSP-D
trkA      HFTPRLSHLNLSSNALESLSWKTVOGLSLQDLTSLGNPLHCSCALLWLQRWEQEDLCGVY
          . * *::: * * ** : : *.** *::*: ** ::*: : .
trkB      TQDLYCLNESSKNTPLANLQIPNCGLPSARLAAPNLTVEEGKSVTISCSVGGDPLPTLYW
trkA      TQKLQGS--GSGDQFLPLGHNNSCGVPSVKIQMPNDSVEVGDDVFLQCQVEGQALQQADW
          **. * . * : * : .**::: ** :** *..* :.* * * : *
trkB      DVGNLVSKHMNETSHT--QGSLRITNISSDDSGKQISCAENLVGEDQDSVNLTVHFAPT
trkA      ILTELEGTATMKKSGDLPSLGLTLVNVTSDLNKKNVTCWAENDVGRAEVSQVSVSFPAS
          : * . . :.* . * :*:** . *::* ** ** : *::* * :
trkB      ITFLESPTSDDHHCIPFTVRGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKI---HVTNHTEYHGC
trkA      V-HLGKAVEQHHCIPFSVDGQPAPSLRWFNFGSVLNETSFI FTQFLESALTNETMRHGC
          : . * . .:*****:* *:* *:*:**::**::*: * * : : **.* ***
trkB      LQLDNPTHMNGDYTLMAKNEYGKDERQISAHFMGRPGVDYETNPNYPEVLYEDWTTPTD
trkA      LRLNQPTHVNNGNYTLLAANPYGQAAASIMAAFMDNPF---EFNPEDPIPVS---FSPVD
          *:::***:***:***:* * **: . * * * . * * **: * : :*. *
trkB      IGDTTNKSNEIPSTDVADQTNREHLSVYAVVV-IASVVGFCLLVMLLLLKLARHSKFGMK
trkA      TNSTS-----RDPVEKKDET PFGVSVAVGLAVSAALFLSALLLVLNKCGQRSKFGIN
          .* : * :. . . :.* .. * .*. * :*: * * .:****:
    
```

Resultados

```

trkB      GPASVISNDDDSASPLHHISNGSNTSPSSSEGGPDAVIIGMTKIPVIENPQYFGITNSQLK
trkA      RPAVLAPE-DGLAMSLHFMTLGGSSLSPTEGKGSGL-----QGHIMENPQYF-----
          ** : : * * **.: : *.: * :** ..: : :*****
trkB      PDTFVQHIKRHNIVLKRELGEGAFGKVFLAECYNLCPEQDKILVAVKTLKDASDNARKDF
trkA      SDTCVHHIKRQDIILKWELGEGAFGKVFLAECYNLLNDQDKMLVAVKALKETSENARQDF
          ** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
trkB      HREAELLTNLQHEHIVKFYGVCVEGDPLIMVFEYMKHGDLNKFLRAHGPDAVLMAEGN--
trkA      HREAELLTMLQHIVRFFGVCTEGGPLLMVFEYMRHGDLNRFLRSHGPDAKLLAGGEDV
          ***** **:*:*:*:*:*:*:* **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
trkB      PPELTQSQMLHIAQQIAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKIGDFGMSRDVYS
trkA      APGPLGLQLLAVASQVAAGMVYLASLHFVHRDLATRNCLVGQGLVVKIGDFGMSRDIYS
          .* * .:*:*:*:*:*:*:****** *****: *:*:*:*:*:*:*:*
trkB      TDYYRVGGHTMLPIRWMPPESIMYRKFTTESDVWSLGVVLWEIFTYGKQPWYQLSNNEVI
trkA      TDYYRVGGRTMLPIRWMPPESILYRKFSTESDVWSFGVVLWEIFTYGKQPWYQLSNTEAI
          *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:**.*.*
trkB      ECITQGRVLQRPRTCPQEVYELMLGCWQREPHTRKNIKNIHTLLQNLAKASPVYLDILG
trkA      ECITQGRELERPRACPPDVYAIMRGCWQREPQRLSMKDVHARLQALAQAPPSYLDVLG
          ***** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * .:*:*:*:* * * *:*:*

```

Figura R1: Alineamiento de las proteínas TrkB y TrkA de *Rattus norvegicus*. Se empleó el programa informático CLUSTAL-W2. En negrita se marcan los aminoácidos del receptor TrkB utilizados como cebo para el ensayo de doble híbrido y en subrayado los aminoácidos que componen la región yuxtamembrana del receptor TrkA.

RESULTADOS

1 Interacción entre las proteínas TrkA y Bex3

1.1 Co-inmunoprecipitaciones

Para validar el resultado obtenido en el ensayo de doble híbrido, se realizaron co-inmunoprecipitaciones a partir de lisados de células HEK293. Estas células fueron previamente transfectadas con plásmidos que codifican para el receptor de neurotrofinas TrkA y para la proteína Bex3 de rata fusionada al epítipo de hemaglutinina del germen de trigo (HA), para facilitar su posterior reconocimiento. A partir de los lisados celulares, el receptor TrkA se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -Trk 203. Posteriormente, se analizó la presencia de la proteína HA-Bex3 en el inmunoprecipitado mediante Western blot y se observó que la proteína HA-Bex3 interaccionaba con TrkA (Figura R2A).

Para confirmar aún más la interacción entre las dos proteínas, se empleó la línea celular PC12-6/15 que expresa endógenamente la proteína Bex3 y sobre-expresa el receptor TrkA (Hempstead et al, 1992). De igual modo, a partir de lisados celulares se inmunoprecipitó el receptor con el anticuerpo α -Trk C-14 y se detectó la presencia de la proteína Bex3 tras inmunoprecipitar el receptor (Figura R2B). Por el contrario, cuando se emplearon IgGs de conejo como control negativo para realizar la inmunoprecipitación no se detectó la presencia de Bex3, lo que indicó la especificidad de la interacción (Figura R2B). Este resultado indica que las dos proteínas interaccionan en esta línea celular.

Finalmente, se emplearon directamente lisados de ganglios raquídeos, diseccionados de embriones de rata de estadio embrionario 15.5 días (E15.5) que expresan TrkA y Bex3 endógenamente. En este estadio aproximadamente el 80% de las neuronas de los DRG expresan TrkA (Lawson & Biscoe, 1979). De manera análoga a lo descrito anteriormente, tras dos horas de lisis a 4°C se inmunoprecipitó el receptor con el anticuerpo α -Trk 203 y se detectó la presencia de Bex3 pero no en el control realizado con IgGs de conejo (Figura R2C). Por lo tanto, TrkA y Bex3 interaccionan endógenamente.

Resultados

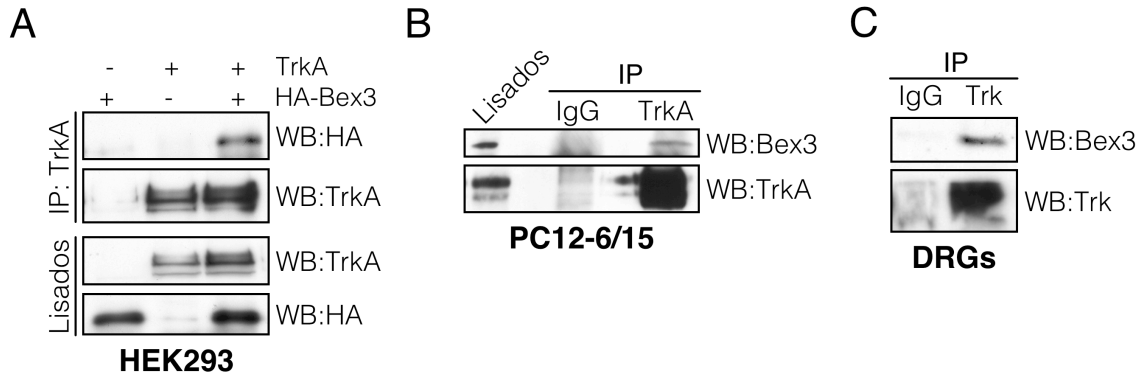


FIGURA R2: Bex3 interacta con el receptor de neurotrofinas TrkA. (A) Interacción entre TrkA y Bex3 en células HEK293 transfectadas. A partir de los lisados celulares, se inmunoprecipitó el receptor TrkA y se analizó la presencia de la proteína HA-Bex3. **(B)** TrkA y Bex3 interactan en células PC12-6/15. TrkA se inmunoprecipitó a partir de lisados de células PC12-6/15 y se detectó la presencia de la proteína Bex3 en la inmunoprecipitación. Se emplearon IgGs de conejo como control negativo de la inmunoprecipitación. **(C)** TrkA y Bex3 interactan en los ganglios raquídeos de rata. Los DRG se obtuvieron de embriones de rata a E15.5. A partir de los lisados, el receptor TrkA se inmunoprecipitó y se detectó la presencia de la proteína Bex3. Se emplearon IgGs de conejo como control negativo de la inmunoprecipitación.

1.2 Mapeo de la interacción entre Bex3 y TrkA

Tras haber validado y confirmado el resultado obtenido en el ensayo de doble híbrido, quisimos discernir con mayor rigor la región de cada proteína implicada en la interacción. Para ello, primeramente se mapeó la zona de interacción en el receptor TrkA y posteriormente se realizó el mapeo en la proteína Bex3.

1.2.1 Región del receptor implicada en la interacción

Para intentar delimitar aún más la región del dominio yuxtamembrana del receptor implicada en la interacción con Bex3, se emplearon diversas construcciones que contenían distintos fragmentos de la región yuxtamembrana del receptor TrkA fusionados a GST y que fueron expresadas en bacterias (Yano et al, 2001) (Figura R3A). Por otro lado, se sintetizó *in vitro* la proteína HA-Bex3 marcada radioactivamente (^{35}S Met), como se describe en Materiales y Métodos. Se incubaron conjuntamente las proteínas recombinantes con la proteína Bex3 radioactiva y mediante auto-radiografía se observó que la proteína HA-Bex3 (^{35}S) se unía a todos los fragmentos recombinantes, mientras que no se unió a GST que se utilizó como control negativo (Figura R3B). Las dos bandas que se observaron en la auto-radiografía se deben a que la proteína HA-Bex3 presenta dos ATG de inicio, uno para el epítipo HA y otro para la proteína Bex3. Se realizó una tinción del gel con Coomassie para comprobar la cantidad de proteína

recombinante utilizada. Estos datos nos permiten concluir que toda la región yuxtamembrana del receptor de neurotrofinas contribuye a la interacción con la proteína Bex3.

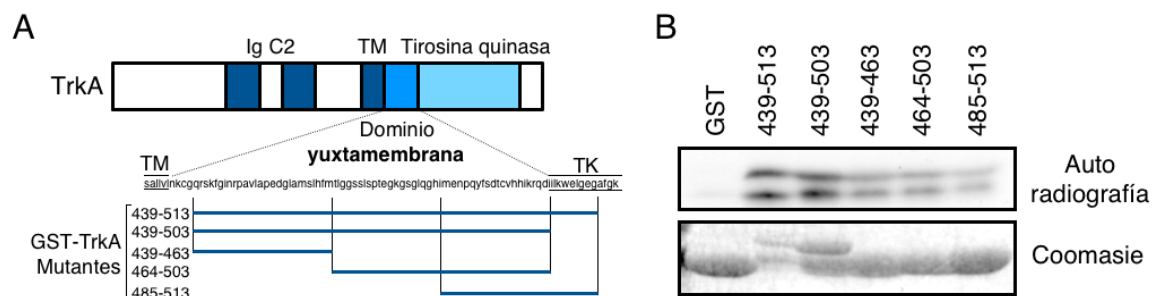


FIGURA R3: Toda la región yuxtamembrana del receptor TrkA participa en la interacción con Bex3. (A) Esquema representativo de las proteínas recombinantes empleadas. Diversos fragmentos de la región yuxtamembrana del receptor TrkA se fusionaron a GST. Modificado de (Yano et al, 2001) TM: dominio transmembrana. Ig C2: Dominios del tipo inmunoglobulina. (B) Auto-radiografía mostrando la interacción de TrkA y Bex3. Las proteínas recombinantes fueron incubadas en presencia de la proteína HA-Bex3 sintetizada *in vitro* y marcada radiactivamente con azufre (S^{35}). Se realizó una auto-radiografía para detectar la interacción. La tinción del gel con Coomassie se hizo para evaluar la carga de proteína recombinante en el gel.

1.2.2 Región de la proteína Bex3 implicada en la interacción

Para identificar cuál era la región de la proteína Bex3 que estaba involucrada en la interacción con el receptor, se generaron diversos mutantes de la proteína fusionados a GFP para facilitar su reconocimiento. Se obtuvieron dos mutantes con deleciones de la región carboxilo terminal (Bex3 D1 y Bex3 D2) y un mutante puntual (Bex3 K93R). El mutante Bex3 D1 presenta una deleción de 33 aminoácidos del extremo carboxilo terminal, mientras que el mutante Bex3 D2 tiene delecionados los últimos 73 aminoácidos. El mutante Bex3 K93R presenta una mutación puntual donde se cambió la lisina 93 (K), que potencialmente puede unir residuos de ubiquitina, por una arginina (R) (Figura R4A).

Para analizar la interacción entre el receptor de neurotrofinas TrkA y las diversas proteínas mutantes de Bex3, se utilizaron células HEK293 transfectadas con TrkA y mutantes de Bex3. De manera análoga a los experimentos de co-inmunoprecipitación, a partir de los lisados celulares se inmunoprecipitó el receptor y se comprobó si existía interacción o no con los diversos mutantes de Bex3 mediante Western blot. Se observó que la interacción desapareció con los dos mutantes que presentan las deleciones en el

Resultados

extremo carboxilo terminal (Bex3 D1 y Bex3 D2) mientras que se mantuvo con el mutante puntual Bex3 K93R (Figura R4B). Por lo tanto, la región carboxilo terminal de la proteína Bex3 y más concretamente los últimos 33 aminoácidos están implicados en la interacción con el receptor de neurotrofinas TrkA.

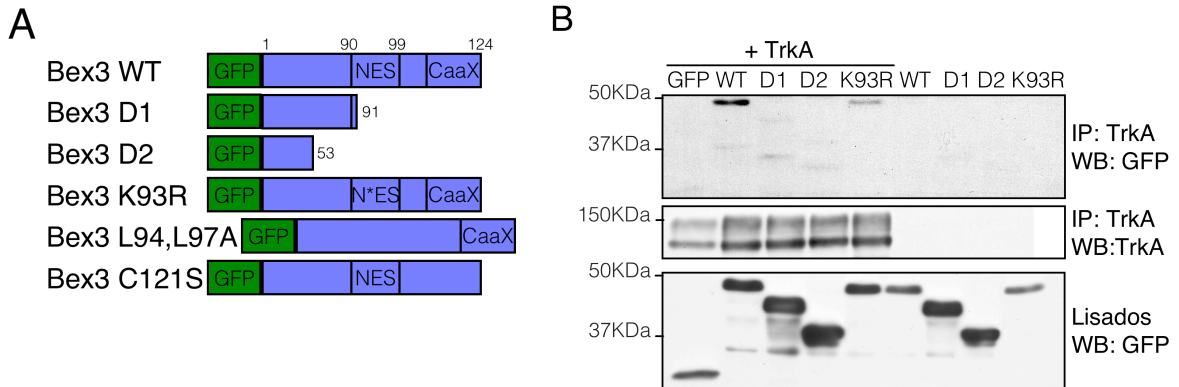


FIGURA R4: El dominio carboxilo terminal de Bex3 media su interacción con el receptor de neurotrofinas TrkA. (A) Esquema de los diferentes mutantes de la proteína Bex3 fusionados a GFP. NES: secuencia de exportación nuclear. CaaX: secuencia de modificación lipídica post-traduccional. **(B)** Interacción de TrkA con Bex3 mediante su extremo carboxilo terminal. A partir de lisados de células HEK293 transfectadas, se inmunoprecipitó TrkA y se analizó la presencia de las diferentes proteínas Bex3.

2 Patrón de expresión de *trkA* y de *bex3* durante el desarrollo embrionario del ratón

Tras demostrar que las dos proteínas interaccionaban y sabiendo que ambas se expresan en las neuronas de DRG, quisimos analizar el patrón temporal de expresión de Bex3 durante el desarrollo para ver si existía una relación espacio-temporal entre ambas. Se ha descrito que la expresión del RNA mensajero de *bex3* comienza a partir del estadio embrionario E7.5, donde se sitúa en las capas del saco amniótico (Kendall et al, 2003). En el desarrollo del sistema nervioso del ratón, se ha descrito la expresión del transcrito de *bex3* en el neuroepitelio a partir del estadio E10 (Kendall et al, 2003; Kim et al, 2004). Sin embargo, la expresión de *bex3* en los DRG únicamente está descrita a estadio E14 (Kendall et al, 2003). Respecto a la expresión de TrkA, mediante análisis tipo Northern blot se observa su expresión a partir del estadio embrionario E9.5, alcanzando un pico a E13.5 (Martin-Zanca et al, 1990). Mediante hibridación *in situ* con radioactividad, una técnica altamente sensible, se detecta débilmente la expresión de *trkA* asociada al sitio de condensación de los DRG a E9.5 (Martin-Zanca et al, 1990).

Con objeto de comparar en las neuronas de DRG en qué momento del desarrollo se expresan los RNA mensajeros de *trkA* y de *bex3*, se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando digoxigenina en secciones consecutivas de embriones de ratón a diferentes estadios del desarrollo. Se comenzó con secciones de embriones de estadio E10.5 aunque no se observó la presencia de ninguno de los dos mRNA (datos no mostrados), probablemente por ser una técnica menos sensible que la hibridación radioactiva. Un día más tarde, a E11.5 se detectó la expresión de ambos aunque con ligeras diferencias. Mientras que el mRNA de *bex3* presentó expresión en la mayor parte de las neuronas de los ganglios raquídeos, la expresión del mRNA de *trkA* estuvo más restringida a ciertas neuronas (Figura R5A, paneles superiores). Sin embargo, a E12.5 la expresión de ambos transcritos presentó un marcaje más intenso, sobre todo para el transcrito de *trkA*, y ambos se localizaron en la mayoría de las neuronas de los ganglios raquídeos (Figura R5A, paneles inferiores).

A pesar de que las hibridaciones *in situ* habían sido realizadas en secciones contiguas, no permitían distinguir si ambos genes se expresaban en las mismas neuronas. Para lograr dilucidar este hecho, decidimos realizar en las mismas secciones hibridación *in situ* para *bex3* e inmunofluorescencia contra TrkA empleando el anticuerpo RTA que reconoce específicamente el receptor, como se detalla en Materiales y Métodos. Con imágenes de microscopia confocal, se corroboró que en las mismas células que se expresaba *bex3* también se localizó la proteína TrkA (Figura R5B). Esta colocalización se detectó en secciones de estadios E11.5 y E13.5. Por lo tanto, existe una co-expresión de *bex3* y de TrkA durante el desarrollo temprano en las neuronas nociceptivas.

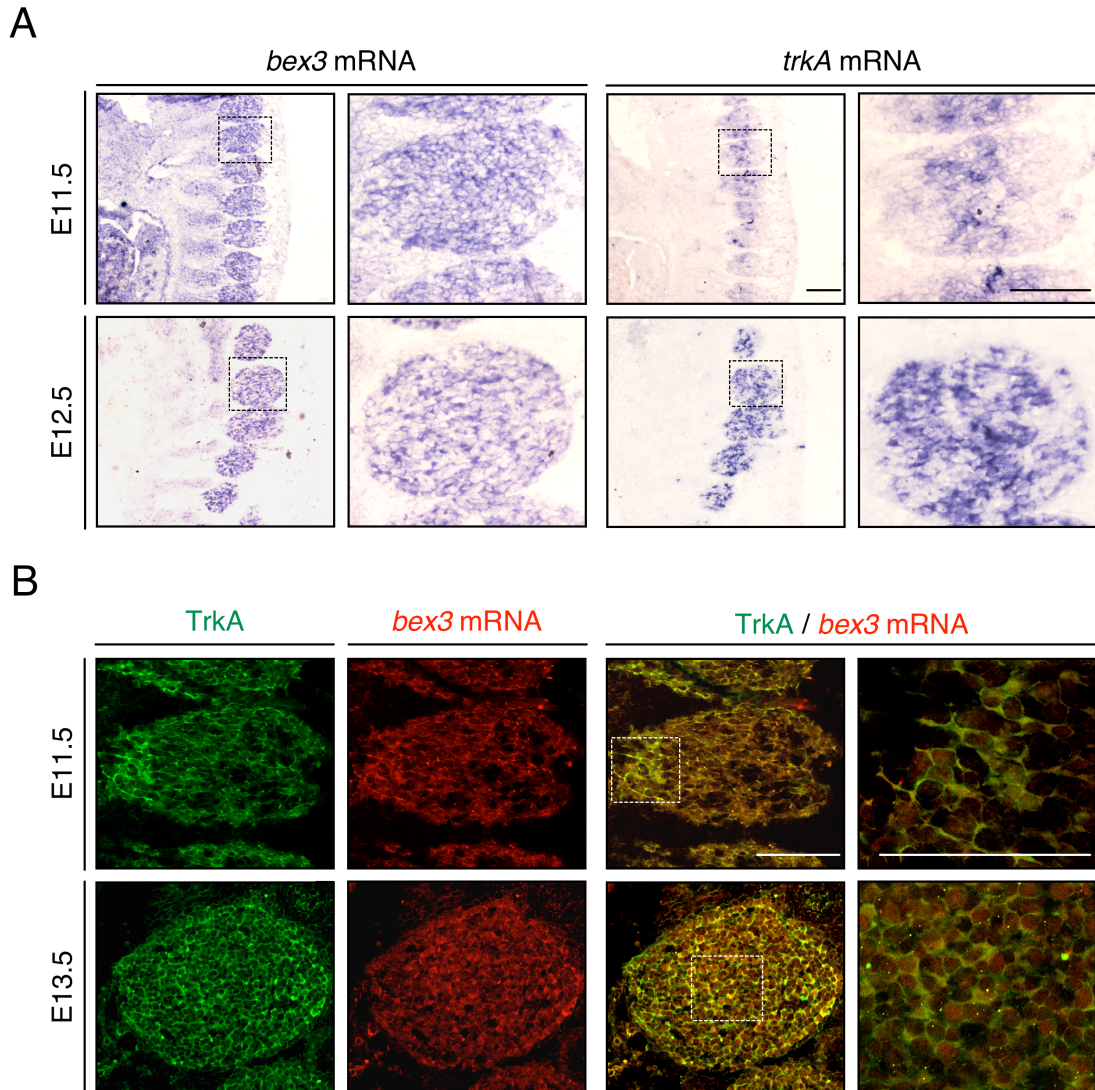


FIGURA R5: Patrón de expresión de *bex3* y de *trkA* durante el desarrollo embrionario del ratón. (A) Patrón de expresión de los RNA mensajeros de *bex3* y de *trkA* durante el desarrollo del ratón. Hibridaciones *in situ* contra *bex3* y *trkA* realizadas en secciones consecutivas de embriones de ratón a E11.5 y E12.5. (B) Co-expresión del mRNA de *bex3* y de la proteína TrkA en las neuronas de DRG de ratón durante el desarrollo. Inmunofluorescencia contra TrkA e hibridación *in situ* contra *bex3* a E11.5 y a E13.5 en la misma sección. Imágenes tomadas con microscopía confocal. Barra de escala, 100 μ m.

3 Bex3 regula específicamente los niveles de TrkA a través de su mRNA

Puesto que Bex3 interacciona a través de su dominio carboxilo terminal con la región yuxtamembrana del receptor de neurotrofinas TrkA, nos propusimos investigar cuáles podrían ser la/s función/es de la proteína Bex3 en las neuronas de los ganglios raquídeos durante el desarrollo. Para ello, se realizaron experimentos de pérdida de función de Bex3 en neuronas de DRG en cultivo.

3.1 Descenso de los niveles de Bex3 mediante un shRNA

Para reducir los niveles de la proteína Bex3, se empleó la técnica del *small hairpin* RNA (shRNA), la cual se basa en el mecanismo de los RNA de interferencia para destruir el RNA mensajero codificante para la proteína de interés. Se diseñó un shRNA que anillase específicamente con el mRNA de rata de la proteína Bex3. Tras la expresión del shRNA en las neuronas, el mRNA de *bex3* será destruido y ello conllevará a la disminución de los niveles de la proteína. Las secuencias de los shRNA empleados están recogidas en la Tabla 6 de Materiales y Métodos. Para introducir el shRNA en las células se emplearon partículas lentivirales que se generaron tal y como viene recogido en Materiales y Métodos. Las neuronas de los ganglios raquídeos en cultivo se infectaron con partículas lentivirales que expresaban bien un shRNA control o bien el shRNA contra Bex3. En la Figura R6 se pueden observar las neuronas en cultivo infectadas mediante la expresión de la proteína GFP. Los experimentos se continuaron únicamente cuando los niveles de infección superaron el 80%.

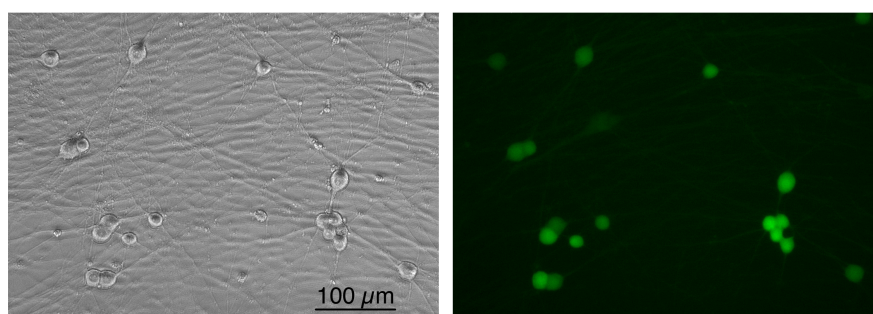


Figura R6: Neuronas de DRG en cultivo tras 5 días de infección con el shRNA control. Imágenes de campo claro (izquierda) y de fluorescencia (derecha).

Para comprobar los niveles del mRNA de *bex3* en las neuronas infectadas se utilizó el método de la RT-PCR semi-cuantitativa. En la Figura R7A se pueden observar dos ejemplos representativos. El mRNA de *bex3* disminuyó eficientemente, reduciendo su expresión un 67% de media en aquellas neuronas que fueron infectadas con partículas lentivirales que expresaron el shRNA contra Bex3 como muestra la cuantificación de diferentes experimentos (100% vs 33%, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R7B). A su vez, también los niveles de la proteína Bex3 en extractos celulares de neuronas infectadas mostraron un descenso tanto de la forma monomérica como dimérica (Figura R7C).

Resultados

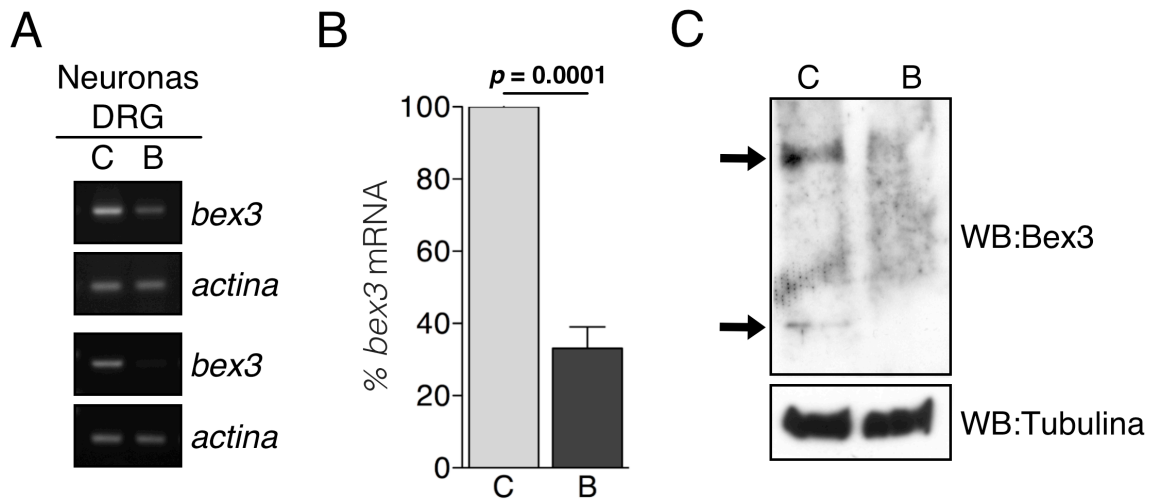


FIGURA R7: Reducción de los niveles de Bex3 mediante un shRNA específico en neuronas de ganglios raquídeos. (A) Disminución de los niveles del mRNA de *bex3* en neuronas de ganglios raquídeos. Se obtuvo el RNA de neuronas en cultivos de DRG infectadas y se realizaron RT-PCR semi-cuantitativas. Se empleó β -*actina* como control. Se muestran dos RT-PCR representativas. **(B)** Cuantificación del descenso del mRNA de *bex3* en neuronas de DRG tras la infección. Los datos se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student con dos colas ($n=7$). **(C)** Reducción de la proteína Bex3 en cultivos neuronales de DRG. Se muestra un Western blot representativo con la disminución de la proteína Bex3 en forma dimérica como monomérica (señalizadas con flechas negras) en neuronas de DRG infectadas. Se empleó β -tubulina como control de carga. C: control shRNA. B: Bex3 shRNA.

3.2 Modulación de los niveles del receptor TrkA al reducir Bex3

Tras infectar las neuronas de DRG y confirmar el descenso de Bex3, sorprendentemente se observó como los niveles de la proteína TrkA se vieron muy reducidos en las neuronas infectadas con el shRNA contra Bex3 (Figura R8A).

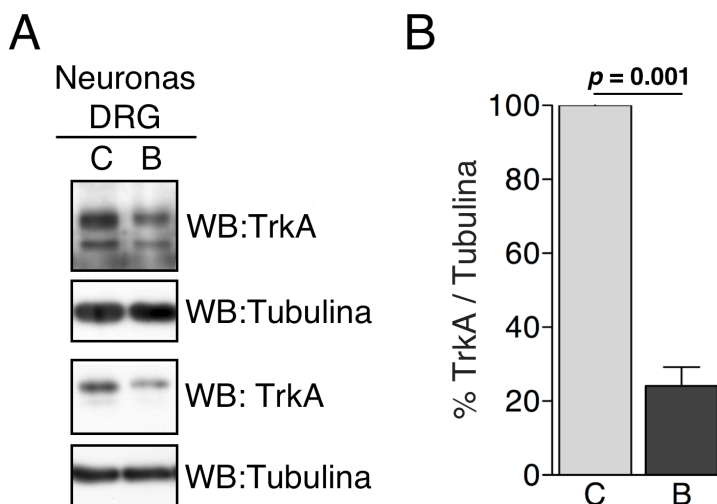


FIGURA R8: La reducción de Bex3 en neuronas de DRG conlleva una disminución de los niveles de TrkA. (A) Los niveles de TrkA se vieron reducidos tras la disminución de Bex3. Se obtuvieron extractos celulares de neuronas de DRG infectadas para analizar la expresión de TrkA. Se empleó

β -tubulina como control de carga. Se muestran dos experimentos representativos. **(B)** Cuantificación de los niveles de TrkA en respuesta a la disminución de Bex3. Los datos se normalizaron frente a la cantidad de β -tubulina y se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student con dos colas ($n=7$). C: control shRNA. B: Bex3 shRNA.

La cuantificación de distintos experimentos indicó que el descenso fue de más de un 75% de media frente al control (100% vs 24%, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R8B). Por lo tanto, la reducción de los niveles de Bex3 conlleva una disminución de los niveles de TrkA en los cultivos neuronales de DRG.

3.3 Bex3 no modula la estabilidad de la proteína TrkA

Al observar la drástica disminución de los niveles de TrkA en neuronas con bajos niveles de Bex3, nos preguntamos si la ausencia de Bex3 estaba afectando a la degradación del receptor. Anteriormente, se había publicado que la proteína Bex3 inhibía la ubiquitinación de la proteína Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*, también denominada DIABLO) mediada por XIAP al formar un complejo con Smac (Yoon et al, 2004). Pensamos que Bex3 podría estar ejerciendo el mismo efecto sobre TrkA y así, al eliminar Bex3 el receptor se ubiquitaría más lo que favorecería su posterior degradación. Para estudiar la ubiquitinación del receptor en presencia y ausencia de Bex3, se emplearon células HEK293 tranfectadas con TrkA y diferentes cantidades de Bex3. A partir de los lisados celulares el receptor se inmunoprecipitó y se analizaron sus niveles de ubiquitinación. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de ubiquitinación de TrkA en función de la presencia de Bex3 (Figura R9A). Para explorar si TrkA sufría una mayor degradación en ausencia de Bex3, se analizaron los niveles del receptor en neuronas sensoriales infectadas usando MG132 y cloroquina, dos inhibidores que bloquean la degradación de proteínas a distinto nivel. El MG132 es un inhibidor del proteasoma mientras que la cloroquina es un inhibidor de proteasas lisosomales. El MG132 es uno de los compuestos más utilizados en este tipo de estudios, a pesar de que su efecto no es totalmente específico e induce apoptosis a tiempos largos de tratamiento. Por ello, se empleó como tiempo máximo de tratamiento 6 horas a una concentración 50 μ M. La cloroquina se empleó durante el mismo tiempo a concentración 10 μ M. Se analizaron los niveles de TrkA tras el tratamiento con los inhibidores por separado o conjuntamente en neuronas previamente infectadas. Se

Resultados

pudo observar que incluso en la condición más restrictiva, es decir, en presencia de ambos inhibidores, no se logró recuperar el nivel de expresión de TrkA en aquellas neuronas que habían sido infectadas con partículas lentivirales que expresaban el shRNA contra Bex3 (Figura R9B). Este resultado junto con los niveles de ubiquitinación de TrkA en células HEK293 parecen sugerir que los niveles de Bex3 no afectan a la estabilidad del receptor y no son la causa de su disminución.

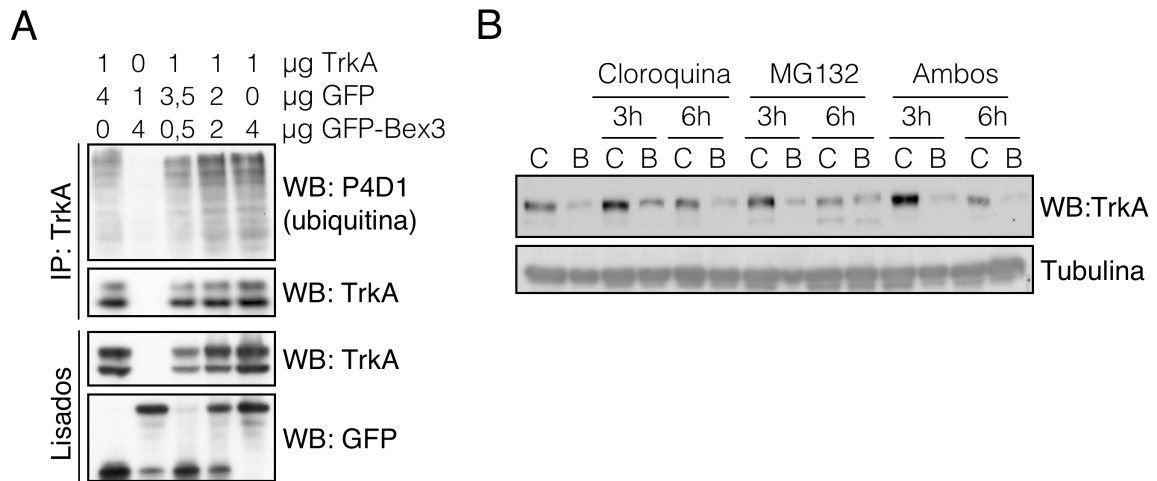


FIGURA R9: Bex3 no regula ni la ubiquitinación ni la degradación de la proteína TrkA. (A) La expresión de GFP-Bex3 no afecta a los niveles de ubiquitinación de TrkA. Se transfectaron células HEK293 con TrkA y diferentes cantidades de GFP-Bex3. A las 24 h se inmunoprecipitó el receptor a partir de los lisados celulares y se analizaron sus niveles de ubiquitinación. Se muestra un experimento representativo (n=3). **(B)** Bex3 no altera la degradación de TrkA. Análisis de los niveles de TrkA tras bloquear la degradación. Las neuronas de DRG en cultivo fueron infectadas y, posteriormente, fueron tratadas con cloroquina (10 μ M), con MG132 (50 μ M) o con ambos inhibidores conjuntamente durante un tiempo de 3 h o 6 h o no fueron tratadas y se analizaron los niveles de expresión de TrkA. Se muestra un experimento representativo (n=3). C: control shRNA. B: Bex3 shRNA.

3.4 Bex3 regula los niveles de TrkA a través de la modulación de los niveles de su mRNA

Tras comprobar que la hipótesis planteada sobre el papel de Bex3 en la estabilidad de la proteína TrkA no era válida, volvimos a plantear una nueva hipótesis de trabajo. Esta vez, consideramos que el descenso en los niveles de TrkA podría deberse a una menor síntesis de la proteína. Para comprobar esta hipótesis, se analizaron los niveles del RNA mensajero de *trkA* en neuronas infectadas con partículas lentivirales que expresaban el shRNA control o el shRNA contra Bex3 mediante PCR cuantitativa. Tras cuantificar el mRNA de *trkA* frente al mRNA de β -actina, se observó que las neuronas

con una menor cantidad de proteína Bex3 presentaron unos niveles inferiores en la cantidad de mRNA de *trkA*, mostrando un descenso del 50% frente a las neuronas control ($1,102 \pm 0,097$ vs $0,566 \pm 0,107$, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R10). Por lo tanto, Bex3 modula la cantidad de mRNA de *trkA* en neuronas sensoriales.

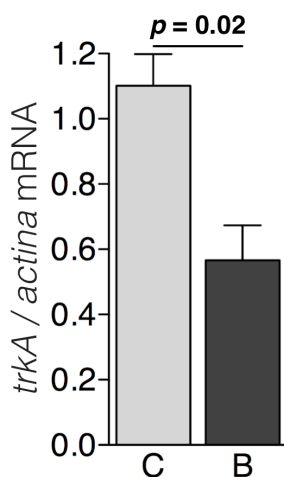


FIGURA R10: Bex3 regula los niveles del mRNA de *trkA*. Se obtuvo el RNA a partir de cultivos neuronales de DRG tras una semana de infección y se sintetizó el cDNA con el que se llevó a cabo una PCR cuantitativa. El nivel de transcripción relativo de *trkA* se normalizó frente al de β -actina utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student con dos colas. Se realizaron tres experimentos independientes empleando triplicados en cada uno de ellos.

3.5 Especificidad del efecto de Bex3 sobre TrkA

Con objeto de detectar si la proteína Bex3 pudiese modular también los niveles del receptor de neurotrofinas TrkB, comenzamos a trabajar con cultivos neuronales de hipocampo que expresan de manera endógena Bex3 y TrkB. Tras infectar de igual modo las neuronas de hipocampo en cultivo con partículas lentivirales que expresan un control shRNA o el shRNA contra Bex3, se comprobó mediante PCR semi-cuantitativa que los niveles del mRNA de *bex3* se encontraban reducidos entorno al 50% de media en aquellas neuronas infectadas con el shRNA contra Bex3 (100% vs 45,0%, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R11A,B). Tras ello, se procedió a analizar los niveles del receptor TrkB. Se observó que éstos no se encontraban afectados por la reducción de Bex3 (100% vs 135,0%, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R11C,D). A su vez, también quisimos analizar los niveles del RNA mensajero de *trkB* mediante PCR cuantitativa. Al igual que ocurrió con los niveles de proteína, los niveles del mRNA no se vieron afectados cuando se redujeron los niveles de Bex3 ($1,007 \pm 0,06$ vs $0,982 \pm 0,203$, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R11E). Por lo tanto, podemos concluir que Bex3 no afecta al receptor TrkB y que el efecto de Bex3 es específico sobre el receptor TrkA.

Resultados

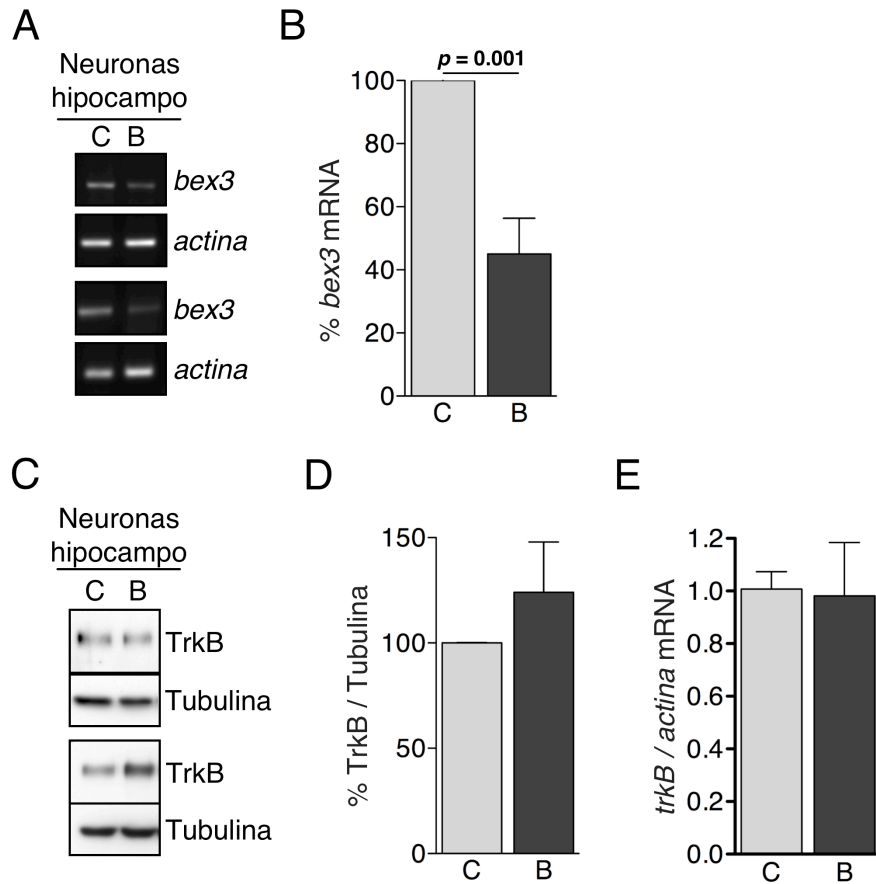


FIGURA R11: Bex3 no afecta a los niveles de TrkB. **(A)** Disminución de los niveles del mRNA de *bex3* en neuronas de hipocampo. Se obtuvo el RNA de neuronas en cultivo de hipocampo infectadas y se realizaron RT-PCR semi-cuantitativas. Se empleó β -*actina* como control. Se muestran dos ejemplos representativos. **(B)** Cuantificación del descenso del mRNA de *bex3* en neuronas de hipocampo tras la infección. Los datos se representan como media \pm s.e.m. (n=4). **(C)** Los niveles de TrkB no se ven afectados tras la disminución de la proteína Bex3. Tras una semana de infección, se obtuvieron los extractos celulares para analizar la expresión de TrkB. Se empleó β -tubulina como control de carga. Se muestran dos experimentos representativos. **(D)** Cuantificación de los niveles de TrkB en respuesta a la reducción de Bex3. Los datos se representan como media \pm s.e.m. (n=4). **(E)** La disminución de Bex3 no afecta a los niveles del mRNA de *trkB*. Se obtuvo el RNA a partir de los cultivos, se sintetizó cDNA y se llevó a cabo una PCR cuantitativa. El análisis estadístico se realizó como se describe en la Figura R9. Se realizaron tres experimentos independientes empleando triplicados en cada uno de ellos. Los valores de p fueron calculados usando el test de la t de Student con dos colas. C: control shRNA. B: Bex3 shRNA.

4 Bex3 modula la actividad transcripcional del promotor de *trkA*

Tras observar como la reducción de la proteína Bex3 provocaba un descenso en los niveles del mRNA de *trkA*, decidimos estudiar si Bex3 podría estar influyendo en la actividad transcripcional del promotor del gen *trkA*. Para ello, se realizaron experimentos de reporte de actividad transcripcional tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

4.1 La expresión de Bex3 modula la actividad transcripcional del promotor de *trkA*

La Dra. Sacristán y el Dr. Martín Zanca describieron un fragmento de 1,8 Kb previo al punto del inicio de la transcripción que exhibía actividad transcripcional en células N2a y PC12 pero no en células HEK293, es decir, únicamente en líneas celulares que de manera endógena expresan TrkA (Sacristan et al, 1999). El Dr. Martín Zanca nos cedió amablemente las construcciones que habían sido utilizadas para identificar la secuencia genómica que contiene la actividad promotora mínima del gen *trkA* del ratón (Sacristan et al, 1999). Con estos plásmidos se comenzó analizando la función de Bex3 en experimentos en los que se redujeron los niveles de Bex3. Para eliminar la expresión de Bex3 en la línea celular N2a se empleó un shRNA, que reconocía el RNA mensajero de la proteína Bex3 de ratón previamente descrito y de demostrada eficacia (Kim et al, 2004). Se verificó el descenso en los niveles del mRNA de *bex3* en las células N2a infectadas con partículas lentivirales que expresaban el shRNA contra Bex3 mediante RT-PCR semicuantitativa frente a las células N2a infectadas con partículas lentivirales que expresaban el shRNA control (Figura R12).

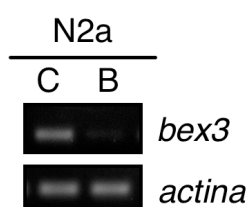


Figura R12: Descenso del mRNA de *bex3* en células N2a. Las células N2a se infectaron con partículas lentivirales que expresaban el control shRNA o el shRNA contra Bex3 de ratón. Se empleó β -actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo.

Una vez comprobada la eficacia del shRNA contra Bex3 en las células N2a, estas fueron transfectadas con el plásmido pMS8, que contiene un fragmento de 1.8 Kb del promotor de *trkA* fusionado al gen bacteriano que codifica la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (Figura R15A) y un plásmido que expresa el shRNA control o el shRNA contra Bex3. Mediante la técnica de ELISA se cuantificó la cantidad de CAT presente en los lisados celulares en presencia o ausencia de Bex3. La actividad promotora se vio reducida cerca de un 35% cuando eliminábamos la proteína Bex3 (100% vs 64,24%, en el grupo control vs Bex3 shRNA, respectivamente) (Figura R13). Para asegurarnos que la disminución observada en la actividad transcripcional se debía a la reducción de la proteína Bex3 y no a un efecto inespecífico del shRNA contra Bex3 sobre otros mRNAs, se realizaron experimentos de rescate. En ellos, se empleó junto con

Resultados

el shRNA contra Bex3 un cDNA de Bex3 resistente al shRNA, es decir, un cDNA de Bex3 con mutaciones en el último nucleótido de varios tripletes (ver Materiales y Métodos para más detalle). De esta manera, el shRNA contra Bex3 destruirá el mRNA endógeno, mientras que no tendrá una complementariedad del 100% con el cDNA de Bex3 mutado y, por lo tanto, éste no será destruido. Además, este cDNA mutado codificará para los mismos aminoácidos que la proteína silvestre, generando así una proteína idéntica a la endógena eliminada con el shRNA procedente del mRNA resistente a la degradación por el shRNA contra Bex3. Al emplear esta estrategia, no solamente se recuperaron los niveles de actividad transcripcional basal observados en el grupo control, si no que además fueron muy superiores (100% vs 203%, en el grupo control vs Bex3 resistente, respectivamente) (Figura R13). Estos datos nos permiten concluir que la actividad transcripcional del promotor de *trkA* está regulada específicamente por los niveles de proteína Bex3.

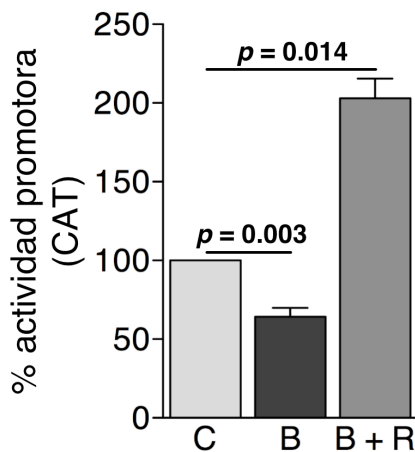


FIGURA R13: La reducción de Bex3 reduce la actividad del promotor de *trkA*. Las células N2a se transfectaron con el plásmido pMS8 junto con un control shRNA o Bex3 shRNA o Bex3 shRNA + GFP-Bex3 resistente. Los datos se representan como la media de varios experimentos (n=3-5 empleando duplicados). El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student pareado con dos colas (n=3-5 usando duplicados).

Para profundizar en el papel de la proteína Bex3 sobre la actividad transcripcional del promotor de *trkA*, las células N2a se transfectaron con el vector pMS8 junto con la proteína Bex3 silvestre (WT) o diversos mutantes que nos permitieran identificar la región implicada de Bex3 en la modulación de la actividad transcripcional. Dichos experimentos pusieron de manifiesto que la presencia de la proteína Bex3 silvestre incrementaba la actividad transcripcional del promotor (189%), de manera similar a lo que ocurría con la proteína Bex3 resistente (203%) (Figura R14A). Por el contrario, los mutantes con la pérdida de la secuencia NES (Bex3 L94,97A) o la pérdida del extremo carboxilo terminal (Bex3 D1 y Bex3 D2) no presentaron la actividad transcripcional inducida por la proteína Bex3 WT (Figura R14A). La mutación puntual de la lisina 93

(Bex3 K93R) mostró la misma actividad que la proteína WT. Curiosamente, la mutación en la cisteína 121 (Bex3 C121S), que afecta a la caja CaaX, provocó un incremento mayor en la actividad transcripcional en comparación con la proteína WT (367% vs 189%, Bex3 C121S vs Bex3 WT, respectivamente) (Figura R14A). Para evaluar los niveles de expresión de cada proteína mutante en los experimentos anteriores, se realizaron análisis tipo Western blot. Los niveles de proteína Bex3 que se detectaron fueron similares, a excepción de los dos mutantes con deleciones (Bex3 D1 y Bex3 D2) que presentaron mayor expresión con respecto a los demás mutantes (Figura R14B). Para nuestra sorpresa, lo más relevante fue el descubrimiento de una correlación entre el aumento en la actividad transcripcional que presentaron las diferentes proteínas Bex3 expresadas y la presencia de dímeros e incluso tetrameros. La proteína Bex3 WT así como los mutantes Bex3 K93R y Bex3 C121S que presentaron un incremento en la actividad transcripcional del promotor, se encontraron en forma dimérica y tetramérica a pesar de las condiciones desnaturalizantes del Western blot. Sin embargo, los mutantes (Bex3 L94,97A, Bex3 D1 y Bex3 D2) que no incrementaron la actividad transcripcional del promotor de *trkA*, se encontraron únicamente en forma monomérica (Figura R14B). Siendo necesaria la presencia en el núcleo celular para promover la transcripción cabe destacar que los mutantes que no presentaron incremento en la actividad transcripcional del promotor de *trkA* se localizaron en mayor proporción en el núcleo que los mutantes que sí incrementaron la actividad transcripcional así como la proteína WT (Figura R16D). Todos estos datos sugieren que la dimerización de Bex3, y no solo su presencia en el núcleo, podría ser requerida para modular la actividad transcripcional del promotor de *trkA*.

Resultados

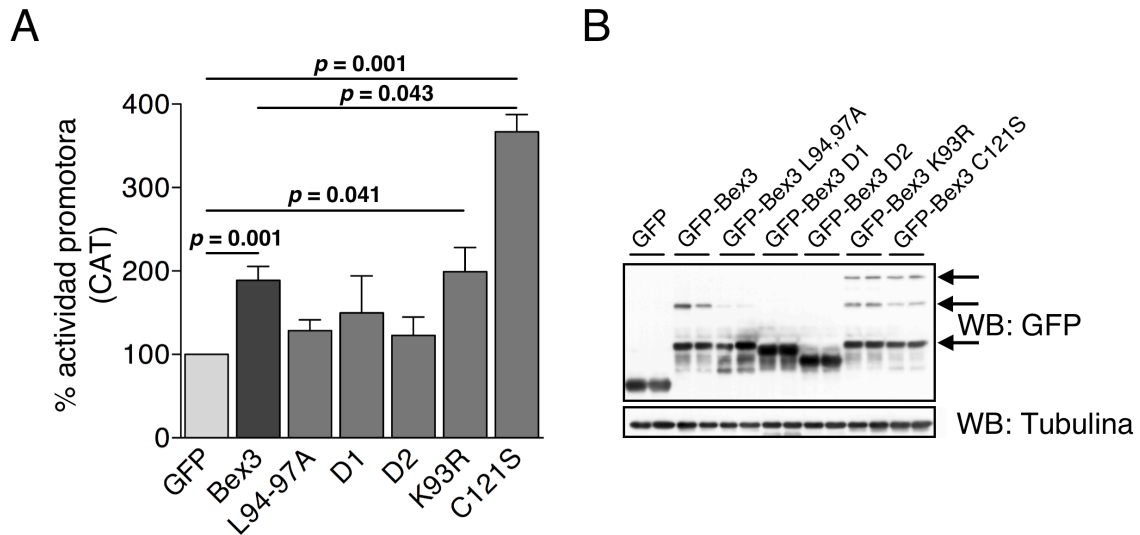


FIGURA R14: Bex3 modula la actividad transcripcional del promotor de *trkA*. (A) La expresión de GFP-Bex3 incrementa la actividad transcripcional del plásmido pMS8 en células N2a. Actividad transcripcional del plásmido pMS8 con diferentes mutantes de GFP-Bex3. Los datos se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student pareado con dos colas ($n=4-9$ usando duplicados). (B) Western blot representativo mostrando los niveles de transfección de los diversos mutantes de Bex3 en células N2a. Se muestra cada proteína por duplicado.

Para identificar la región del promotor de *trkA* donde Bex3 podría ejercer su función, se utilizaron diferentes construcciones del promotor con deleciones consecutivas desde el extremo 5' (Figura R15A) junto con GFP o GFP-Bex3. Se emplearon las construcciones pMS10.3 (que contiene 934 pb previos al punto de inicio transcripcional), pMS16 (que contiene 150 pb) y pMS22 (que contiene 43 pb). Esta última no presenta actividad transcripcional (Sacristán et al, 1999). Todas las construcciones ensayadas presentaron mayor actividad transcripcional en presencia de GFP-Bex3 frente a GFP, a excepción de la construcción pMS22, que no presenta actividad transcripcional por sí sola (Figura R15B). Con los datos obtenidos podemos decir que la proteína Bex3 estaría ejerciendo su efecto en los 150 pb previos al inicio de la transcripción, ya que con la construcción pMS16 la proteína Bex3 aún es capaz de incrementar la actividad transcripcional basal del promotor.

4.2 La proteína Bex3 se une a la región promotora de *trkA*

Tras localizar la región en el promotor de *trkA* sobre la cual la proteína Bex3 podría estar ejerciendo su acción y con objeto de determinar si Bex3 se unía al promotor del gen *trkA* de ratón, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina

(ChIP). Se emplearon células N2a ya que con ellas se habían realizado los experimentos de actividad transcripcional y se inmunoprecipitó la proteína Bex3 a partir de lisados celulares. Tras la inmunoprecipitación, fuimos capaces de amplificar mediante PCR la región que comprende desde -143 pb hasta -19 pb previos al punto de inicio de la transcripción del promotor de *trkA*, ya que nuestros datos previos indicaron que Bex3 estaba ejerciendo su acción en esa región. Como control de la inmunoprecipitación se emplearon IgGs de conejo (Figura R15C). Por lo tanto, Bex3 se une al promotor de *trkA* en la región próxima al punto inicial de transcripción.

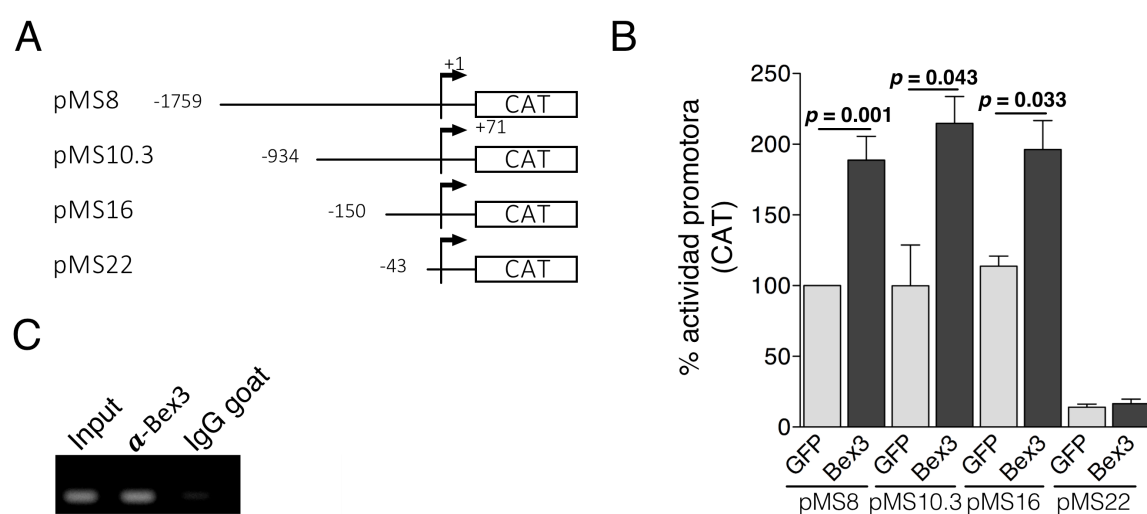


FIGURA R15: Bex3 modula la actividad transcripcional uniéndose al promotor de *trkA* en una región próxima al sitio de inicio de la transcripción. (A) Esquema representativo de las diversas construcciones empleadas, con sucesivas deleciones en el extremo 5' del promotor de *trkA* de ratón. Modificado de Sacristán et al. 1999. **(B)** Mapeo de la región del promotor de *trkA* modulada por GFP-Bex3. Se muestra la actividad transcripcional de diversos fragmentos del promotor de *trkA* transfectados en células N2a junto con GFP o GFP-Bex3. Los datos se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student pareado con dos colas ($n=9-4$ usando duplicados). **(C)** La proteína Bex3 endógena se une al promotor de *trkA* en células N2a. Se realizaron análisis de tipo ChIP, usando células N2a con el anticuerpo α -Bex3-Prot-G-agarosa e IgG-Prot-G-agarosa como control negativo. Se amplificó mediante PCR la región del promotor de *trkA* correspondiente a -143 hasta -19 pb. Se muestra un experimento representativo ($n=5$).

5 Tráfico citoplasma - núcleo de la proteína Bex3

Con respecto al patrón de localización celular de la proteína Bex3 los datos publicados hasta la fecha muestran que su localización celular es principalmente citoplasmática tanto en rata (Alvarez et al, 2005) como en ratón (Mukai et al, 2000), e incluso se ha publicado que colocaliza con marcadores mitocondriales (Kim et al, 2004). Está descrito que la proteína Bex3 tiene una secuencia de exportación nuclear (NES)

Resultados

(Mukai et al, 2000), aunque no se ha identificado ninguna secuencia de localización nuclear (NLS). El único dato que demuestra que la proteína Bex3 puede encontrarse en el núcleo celular es un mutante generado por el grupo del Dr. Sato, donde mutaron la secuencia de exportación nuclear y observaron como el mutante se encontraba localizado mayoritariamente en el núcleo (Mukai et al, 2000).

De acuerdo con estos resultados previos, decidimos comprobar la localización celular de Bex3. Para ello, se emplearon células HEK293 transfectadas con GFP-Bex3 y se observó gracias a la expresión de GFP, que la proteína se encuentra principalmente localizada en el citoplasma celular confirmando los datos previos (Figura R16A). Además, para analizar la localización endógena de la proteína Bex3 se emplearon neuronas en cultivo de los ganglios raquídeos. Se realizaron inmunofluorescencias contra Bex3 y se observó que en las neuronas de DRG la proteína Bex3 endógena se localizó mayoritariamente en el citoplasma celular, corroborando una vez más los datos previos (Figura R16B). Para analizar la localización celular de los diversos mutantes de la proteína Bex se emplearon de nuevo células HEK293. Las células fueron transfectadas con GFP, GFP-Bex3 WT y los diferentes mutantes Bex3 D1, Bex3 D2, Bex3 K93R y Bex3 C121S fusionados a GFP. Mediante la expresión de GFP pudimos observar como la proteína WT así como los mutantes Bex3 K93R y Bex3 C121S se localizó distribuida principalmente por el citoplasma celular, mientras que los mutantes delecionados presentaron una distribución por toda la célula al igual que la proteína GFP que se empleó como control (Figura 16C).

Para verificar los datos obtenidos por el grupo del Dr. Sato, decidimos mutar específicamente la secuencia de exportación nuclear de la proteína Bex3. Como se ha mencionado anteriormente, Bex3 presenta una secuencia de exportación nuclear rica en leucinas, por lo que decidimos cambiar la leucina 94 y la leucina 97 por dos alaninas, para de este modo destruir la secuencia NES (Bex3 L94,97A). Las células HEK293 se transfectaron con el mutante GFP-Bex3 L94,97A y se observó como la proteína se encontraba localizada principalmente en el núcleo celular (Figura R17A). Esta localización es, notoriamente, opuesta a la observada en las células transfectadas con la proteína WT, lo que pone de manifiesto que la localización citoplasmática de la proteína Bex3 se

debe a una eficiente traslocación desde el núcleo hacia el citoplasma mediada por su secuencia NES.

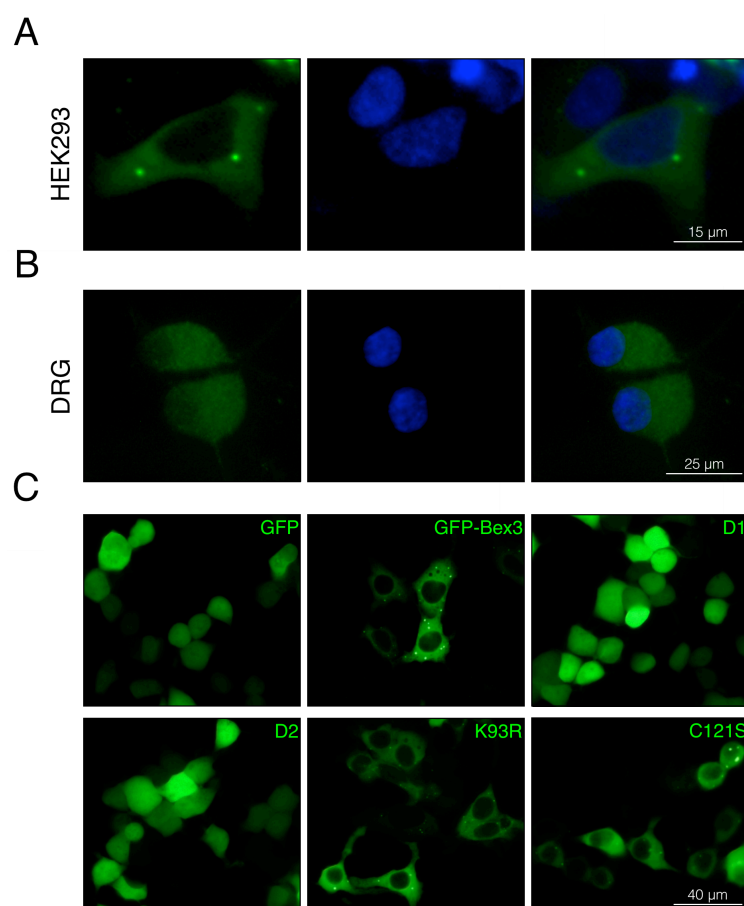


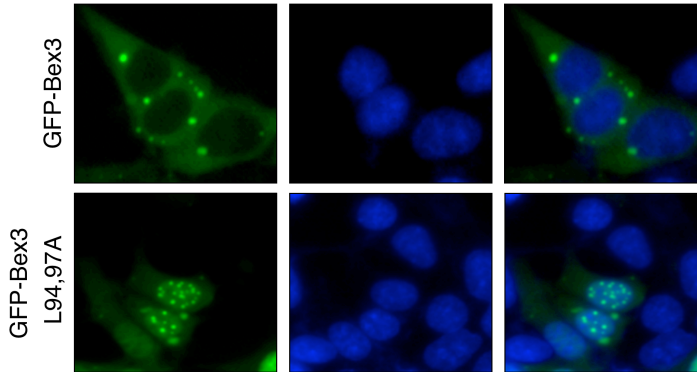
FIGURA R16: Localización celular de la proteína Bex3 WT y de los mutantes de Bex3. (A) Localización subcelular de la proteína GFP-Bex3 en células HEK293. Las células HEK293 fueron transfectadas con GFP-Bex3. **(B)** La proteína Bex3 se localiza principalmente en el citoplasma de las células PC12. Se realizaron inmunofluorescencias contra la proteína Bex3. **(C)** Localización celular de los diversos mutantes de la proteína Bex3. Las células HEK293 fueron transfectadas con GFP, con la proteína GFP-Bex3 WT o con los mutantes GFP-Bex3 D1, GFP-Bex3 D2, GFP-Bex3 K93R y GFP-Bex3 C121S para visualizar su localización celular mediante la expresión de GFP.

Además, quisimos analizar si la proteína Bex3 WT, a pesar de tener una localización citoplasmática, se traslocaba de manera endógena al núcleo. Para ello, se transfectaron células HEK293 con GFP-Bex3 y se añadió leptomicina B (LMB), un inhibidor específico del factor de exportación nuclear Crm1 que no afecta a la importación (Fornerod et al, 1997). Crm1 es el receptor de exportación para las proteínas que tienen una secuencia NES rica en leucinas, como es el caso de Bex3. La LMB se añadió durante 6 horas, tiempo tras el cual se añadió Hoechst 33342 para marcar los núcleos. La proteína GFP-Bex3 en condiciones basales se encontró localizada en el citoplasma (Figura R16A y R17A) mientras que cuando se añadió LMB, se localizó mayoritariamente acumulada en el núcleo (Figura R17B). La proteína GFP-ARMS (proteína con cuatro pasos transmembrana) se empleó como control de las posibles acciones inespecíficas causadas por la LMB y se observó que no modificó su distribución celular por la presencia de la

Resultados

LMB (Figura R17B). Estos datos demuestran que la proteína GFP-Bex3 se trasloca al núcleo aunque es eficientemente exportada gracias a su secuencia NES.

A



B

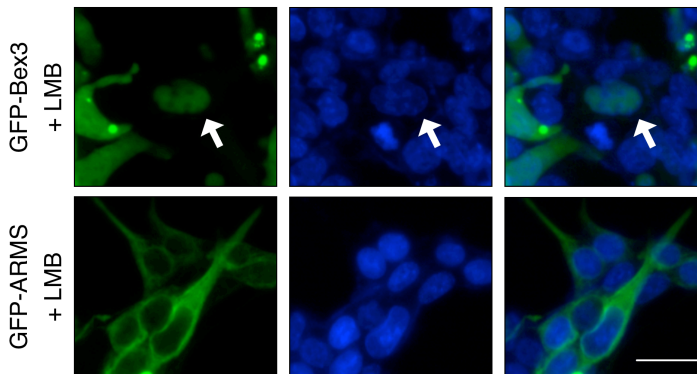


FIGURA R17: Bex3 transita entre el citoplasma y el núcleo. (A) Localización subcelular de las proteínas GFP-Bex3 y GFP-Bex3 L94,97A en células HEK293. Las células HEK293 fueron transfectadas y a las 24 h los núcleos se visualizaron con Hoechst 33342. **(B)** La proteína Bex3 se acumula en el núcleo tras el tratamiento con leptomicina B (LMB). Se transfectaron células HEK293 y tras 24 h las células fueron tratadas con LMB (10 ng/ml) durante 6 h. Los núcleos se visualizaron con Hoechst 33342. Barra de escala, 20 μ m.

6 Efecto del NGF sobre la actividad transcripcional del promotor de *trkA* y la dimerización de Bex3 en el núcleo celular

Se ha descrito previamente que el NGF modula la traslocación al núcleo de varias de las proteínas adaptadoras del receptor $p75^{\text{NTR}}$, como por ejemplo SC-1 o Sall1 (Chittka & Chao, 1999; Pincheira et al, 2009). Además, la proteína Bex1 modifica su localización celular tras un estímulo de NGF (Vilar et al, 2006). Por ello, nos planteamos si el NGF afectaría a la localización celular de Bex3. Para averiguar si era así, se realizaron inmunofluorescencias contra Bex3 en células PC12 en respuesta a NGF. Se emplearon dos anticuerpos diferentes contra Bex3 que reconocen dos epítopos distintos en la proteína Bex3 (un anticuerpo comercial y un anticuerpo desarrollado en el laboratorio que reconoce la región rica en histidinas y asparraginas única de la proteína Bex3) lo que nos permitió dar mayor validez a los datos. Se observó que en ausencia de NGF la

proteína Bex3 endógena se encuentra principalmente localizada en el citoplasma celular lo que coincide con los datos previos (Figura R18A). Sin embargo, tras un tratamiento con NGF de 15 minutos al menos una fracción de la proteína Bex3 pareció localizarse también en el núcleo celular (Figura R18A). Para apoyar estos datos, se realizaron fraccionamientos subcelulares en células PC12-6/15 en presencia/ausencia de NGF. Se analizó la presencia de Bex3 en la fracción nuclear y se observó que en ausencia de NGF Bex3 se encontró en forma monomérica, mientras que en presencia de NGF Bex3 se encontró en forma monomérica y dimérica en el núcleo (Figura R18B). Por todo ello, podemos decir que la proteína Bex3 podría encontrarse en forma de dímero en el núcleo tras un estímulo con NGF.

Se ha descrito que el NGF estimula la actividad transcripcional de *trkA* en células PC12 y en neuronas colinérgicas de los núcleos basales (Holtzman et al, 1992; Li et al, 1995; Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995). Así mismo, también está documentado que el NGF incrementa los niveles del mRNA de *bex3* (Mukai et al, 2000). Por todo ello, quisimos investigar si la actividad transcripcional de *trkA* en respuesta a NGF podría estar mediada por Bex3. Para ello, se realizaron experimentos de reporte de actividad transcripcional con el promotor de *trkA* en presencia/ausencia de Bex3 en respuesta a NGF. Se emplearon células PC12 ya que las células N2a presentan mayoritariamente un receptor TrkA truncado y no responden bien al NGF (Tesis doctoral de Laura Andrés Martín, Salamanca 2007). Además, el plásmido pMS8 presenta también actividad transcripcional en este tipo celular (Sacristan et al, 1999). Las células PC12 se transfectaron con el vector pMS8 y GFP o GFP-Bex3 y se midió la actividad transcripcional sin estímulo o con estímulos de NGF (100 ng/ml) durante 30 minutos o 18 horas. Dichos experimentos mostraron, en concordancia con los datos publicados anteriormente (Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995), que las células transfectadas con GFP y estimuladas con NGF durante 18 horas aumentaron los niveles de actividad transcripcional del promotor de *trkA* en un 21% (Figura R18C). Sin embargo, cuando las células PC12 expresaron GFP-Bex3 el incremento en la actividad transcripcional en respuesta a NGF aumentó hasta llegar a un 39% (Figura R18C). El tratamiento con NGF durante 30 minutos no incrementó los niveles de actividad transcripcional respecto al no tratamiento en ninguno de los dos grupos, lo que concuerda con resultados previos

Resultados

(Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995). Además, cabe recalcar que incluso en ausencia de NGF la proteína Bex3 incrementó la actividad transcripcional basal en las células PC12 de manera similar a lo descrito anteriormente para las células N2a (100% vs 160%, en el grupo GFP vs GFP-Bex3, respectivamente) (Figura R18C). Por lo tanto, podemos concluir que Bex3 no solo modula la actividad transcripcional del promotor de *trkA* en condiciones basales si no también en respuesta a NGF.

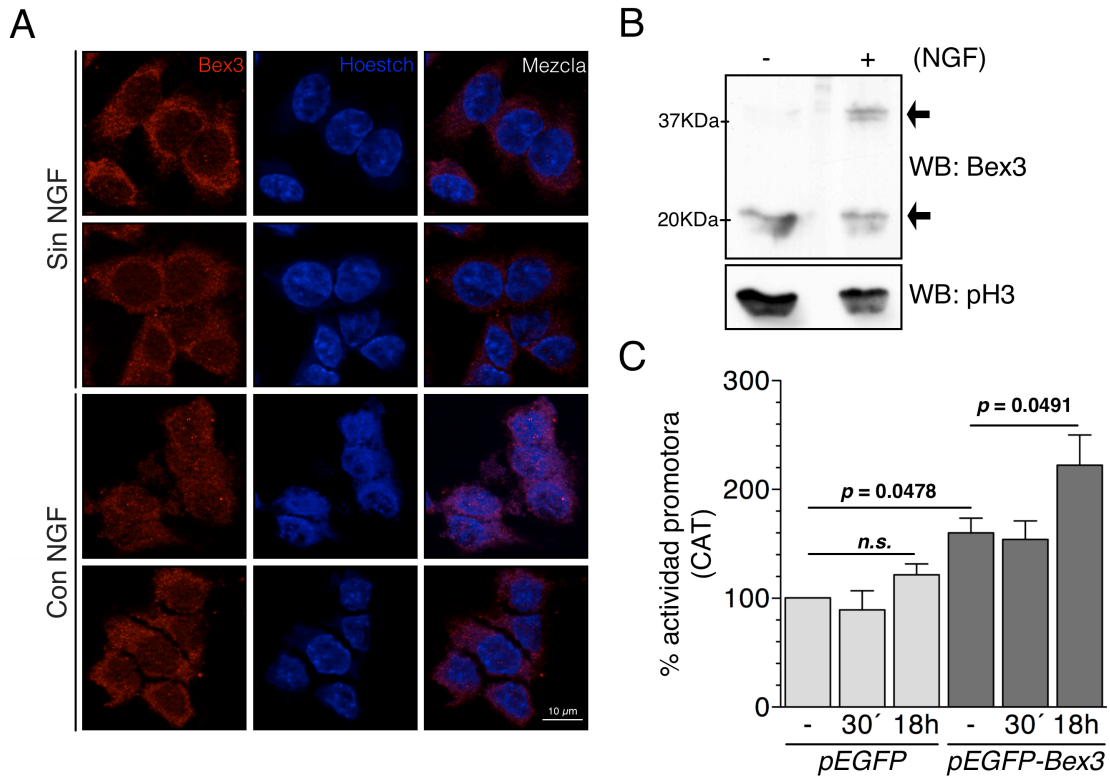


Figura R18: El tratamiento con NGF regula la actividad transcripcional del promotor de *trkA* y la dimerización de Bex3 en el núcleo. (A) Los niveles de Bex3 se incrementan en el núcleo celular tras un tratamiento con NGF. Inmunofluorescencias contra Bex3 en células PC12 en presencia/ausencia de NGF. Se emplearon dos anticuerpos diferentes para reconocer la proteína Bex3: α -Bex3 (paneles superiores) y α -Bex3 705 (paneles inferiores). Se empleó Hoechst 33342 para marcar los núcleos celulares. **(B)** Presencia de Bex3 dimerizado en el núcleo en respuesta a NGF. Se realizó un fraccionamiento subcelular en células PC12-6/15 tratadas o no con NGF (100 ng/ml). Se realizó un análisis de tipo Western blot con la fracción nuclear para detectar la proteína Bex3. Se empleó pH3 como control de fracciones nucleares. **(C)** El NGF incrementa la actividad transcripcional del promotor de *trkA*. Las células PC12 fueron transfectadas con el plásmido pMS8 y GFP o GFP-Bex3 y se trataron con NGF (100 ng/ml) durante 30 min, 18h o no fueron tratadas. Los datos se representan como media \pm s.e.m. El valor de p fue calculado usando el test de la t de Student pareado con dos colas ($n=3$ con duplicados).

7 Implicación de la proteína Bex3 en supervivencia y diferenciación

Una de las principales funciones mediadas por el NGF a través de los receptores TrkA es la supervivencia de las neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo del

sistema nervioso periférico. Se ha descrito que la activación de TrkA tiene un papel central en dicha supervivencia (Huang & Reichardt, 2003). Si la reducción de Bex3 en las neuronas de los ganglios raquídeos provocó una disminución en los niveles de TrkA, es muy probable que las rutas de señalización intracelulares desencadenadas por el receptor en respuesta a NGF se vean también afectadas tras la reducción de Bex3. Para estudiar dicha hipótesis, decidimos analizar la señalización mediada por TrkA tras reducir los niveles de la proteína Bex3. Para ello, las neuronas de los ganglios raquídeos en cultivo se infectaron con partículas lentivirales que expresaban bien un shRNA control o bien el shRNA contra Bex3. Tras una semana de infección, dichas neuronas fueron privadas de NGF durante una noche y, al día siguiente fueron estimuladas con NGF para analizar los niveles de activación del receptor así como de las principales proteínas que median sus cascadas de señalización mediante Western blot. Se pudo observar como la reducción de TrkA inducida por la disminución de Bex3 conllevó a una activación menor del receptor (niveles de receptor fosforilado) y de las proteínas Akt y MAPK fosforiladas (Figura R19A). Una de las consecuencias directas de una menor activación de las cascadas mediadas por las proteínas Akt y MAPK podría ser un descenso en la supervivencia de estas neuronas. Para estudiar este hecho, se transfectaron neuronas de DRG con un plásmido que expresa el shRNA control o el shRNA contra Bex3. Las neuronas fueron transfectadas a pesar de la baja eficiencia de esta técnica en vez de ser infectadas, porque datos previos del laboratorio habían mostrado que la infección con partículas lentivirales favorecía la supervivencia neuronal. El NGF se retiró del medio de cultivo de las células transfectadas y se analizó la supervivencia neuronal desde las 48 hasta las 72 horas después de retirar el NGF. Los plásmidos empleados en la transfección expresaban la proteína GFP, lo que nos permitió identificar mediante fluorescencia las neuronas transfectadas. Se consideraron células apoptóticas aquellas que tras añadir Hoechst 33342 presentaron un núcleo condensado o fragmentado (Figura R19B). El porcentaje de apoptosis observado tras la retirada del NGF fue de un 16,80% en las neuronas transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA control, mientras que en las transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA contra Bex3 fue de un 28,95% (Figura R19C). Por lo tanto, los datos indican que Bex3 es capaz de influir en la supervivencia de las neuronas de los ganglios raquídeos dependientes de NGF a través de la modulación del receptor de neurotrofinas TrkA y de sus vías de señalización.

Resultados

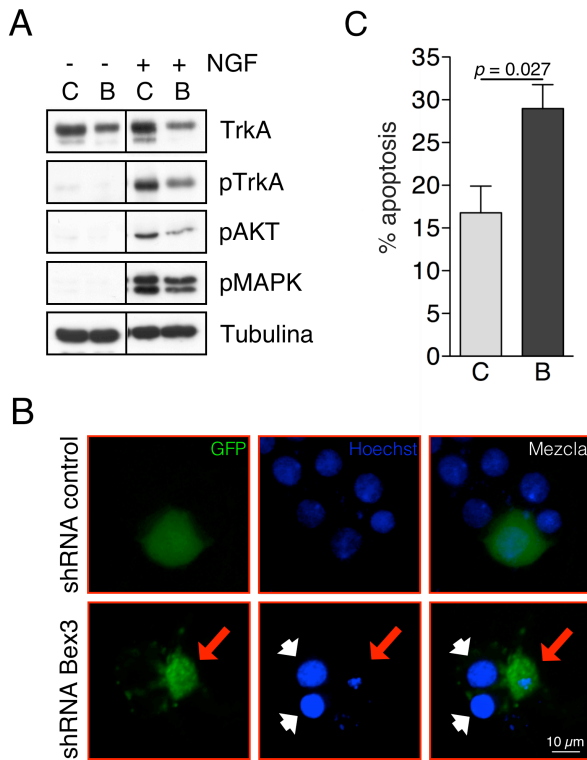


FIGURA R19: Bex3 modula la supervivencia de la neuronas dependientes de NGF. (A) El descenso de TrkA inducido por la reducción de Bex3 conlleva un descenso en la señalización mediada por el receptor. Se emplearon los lisados de células de DRG infectadas tras estimular o no con NGF (100 ng/ml) durante 1 h para analizar las principales cascadas de señalización del receptor TrkA así como sus niveles de activación mediante Western blot. Se empleó β -tubulina como control de carga. (B) Bex3 modula la supervivencia *in vitro* de las neuronas dependientes de NGF. Imágenes de neuronas en cultivo dependientes de NGF. Las células transfectadas se visualizan gracias a la expresión de GFP y las células no apoptóticas (flechas blancas) u apoptóticas (flechas rojas) se visualizan gracias a la tinción con Hoechst 33342.

(C) Cuantificación del porcentaje de apoptosis en las neuronas transfectadas a las 48-72h tras la retirada del NGF. Los datos se presentan como media \pm S.E.M. El número total de neuronas transfectadas fue de 249 en el grupo control y de 464 en el grupo shRNA Bex3 en cuatro experimentos independientes. El valor de p ha sido calculado usando el test de la t de Student con dos colas.

Otra de las principales funciones mediada por el NGF a través de los receptores TrkA es la diferenciación neuronal. En este caso, para investigar si la reducción de TrkA debida a un descenso en los niveles de Bex3 afectaba también a la diferenciación se emplearon células PC12, un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la diferenciación inducida por NGF (Greene & Tischler, 1976). Las células PC12 fueron infectadas con partículas lentivirales que expresaban bien el shRNA control o bien el shRNA contra Bex3. Tras 4 días de infección, las células PC12 fueron estimuladas con NGF para promover su diferenciación. A las 48-72 horas se analizó el porcentaje de células diferenciadas en cada grupo experimental. Gracias a la expresión de la proteína GFP se pudieron analizar únicamente las células infectadas (Figura R20A). Las células PC12 fueron consideradas diferenciadas cuando la extensión de una de sus neuritas era el doble del tamaño del cuerpo celular. El porcentaje de diferenciación en las células infectadas con partículas lentivirales que expresaban el shRNA control tras 48-72h en

presencia de NGF fue del 36,5% mientras que las células infectadas partículas lentivirales que expresaban el shRNA contra Bex3 presentaron un porcentaje de diferenciación del 20,5% (Figura R20B). Por lo tanto, los datos indican que Bex3 es capaz de influir en la diferenciación de las células PC12 inducida por NGF.

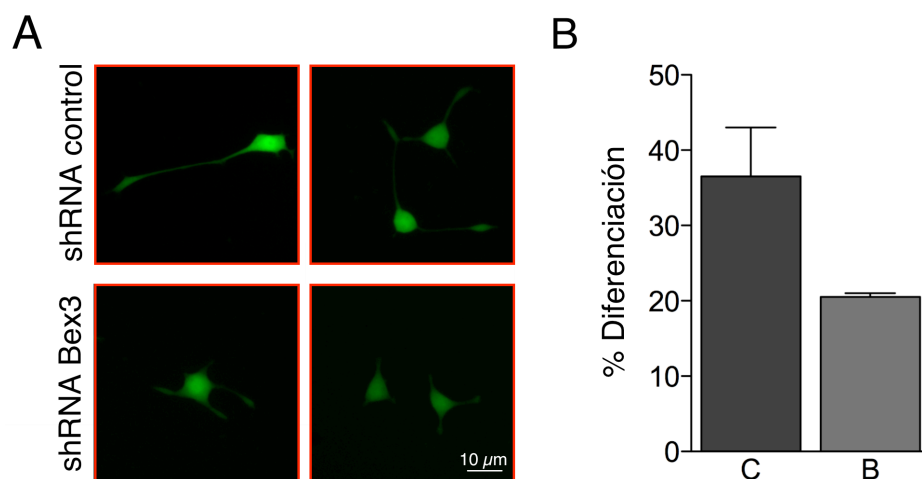


FIGURA R20: Bex3 modula la diferenciación de las células PC12. (A) El descenso de TrkA inducido por la reducción de Bex3 conlleva un descenso en la diferenciación de las células PC12. Imágenes de fluorescencia de las células PC12 tras ser infectadas y en presencia de NGF durante 48-72 horas. Las células infectadas se visualizan gracias a la expresión de GFP. **(B)** Cuantificación de los niveles de diferenciación. La cuantificación se realizó a las 48-72h en presencia de NGF. Se muestran los datos de dos experimentos con un total de 98 células contadas en el grupo control y 112 células en el grupo donde se disminuyó la expresión de Bex3.

DISCUSIÓN

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso sumamente complicado que requiere una coordinación a nivel temporal y espacial basada en la adecuada regulación de los genes implicados en dicho proceso. Entre ellos, las neurotrofinas y sus receptores son responsables directos de la supervivencia y la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se proporciona un estudio detallado de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkA a través de la modulación de la actividad transcripcional de su promotor regulada directamente por la proteína Bex3.

Primeramente, se observó como el receptor de neurotrofinas TrkA y la proteína Bex3 interaccionaban a través de los dominios yuxtamembrana y carboxilo terminal, respectivamente. Curiosamente, la reducción de la proteína Bex3 en las neuronas sensoriales de DRG causó un aumento en la apoptosis de las neuronas dependientes de NGF y una disminución en la diferenciación de las células PC12 tras un tratamiento con NGF. Estos efectos fueron provocados por una disminución de los niveles TrkA y de su señalización en respuesta a NGF. La disminución de los niveles del receptor se produjo como consecuencia de una reducción de los niveles del RNA mensajero de *trkA*. Los efectos de la eliminación de Bex3 fueron específicos para TrkA ya que no afectaron a los niveles del receptor TrkB en neuronas de hipocampo.

La reducción o la sobre-expresión de Bex3 en células N2a conllevó una disminución o un aumento en la actividad transcripcional del promotor de *trkA*, respectivamente. Además, hemos observado que la actividad del promotor de *trkA* se correlacionó con el estado de dimerización de la proteína Bex3, ya que aquellos mutantes de Bex3 que no formaban dímeros no incrementaron la actividad transcripcional basal del promotor de *trkA*. Por otro lado, se observó que el tratamiento con NGF provocó una acumulación de Bex3 en forma de dímeros en el núcleo celular. Además, la actividad transcripcional del promotor de *trkA* en respuesta al NGF fue aún mayor en presencia de la proteína Bex3. Por otra parte, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina indicaron que Bex3 se asocia con el promotor de *trkA* en la región previa al inicio de la transcripción.

Discusión

Los resultados presentados en esta memoria apuntan al papel de la proteína Bex3 en la regulación de los niveles de la proteína TrkA a través de la modulación de la actividad transcripcional de su promotor tanto en condiciones basales como en respuesta a NGF.

La primera parte de esta Tesis Doctoral se basó en esclarecer la interacción entre la proteína Bex3 y el receptor de neurotrofinas TrkA detectada en un ensayo de doble híbrido. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación en diversos tipos celulares se puso de manifiesto que las dos proteínas estudiadas interactuaban a nivel endógeno (Figura R2). Con el uso de diversos mutantes de la proteína Bex3 y de proteínas recombinantes que expresaban distintos fragmentos de la región yuxtamembrana del receptor, se pudo detectar que la interacción entre las dos proteínas tenía lugar mediante el dominio carboxilo terminal de Bex3 y más concretamente a través de los últimos 33 aminoácidos (91-124 aa) y toda la región yuxtamembrana del receptor (Figuras R3 y R4). Esa misma región de la proteína Bex3 ha sido descrita también como la región con la que interactúa con el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (81-106 aa) y con las proteínas Smac (70-124 aa), 14-3-3ε (81-124 aa) y DRG-1 (79-111 aa) (Kimura et al, 2001; Mukai et al, 2000; Yoon et al, 2004; Yu et al, 2006). Sin embargo, el posible papel de la interacción entre TrkA y Bex3 aún está por dilucidar. Una posible hipótesis es que la interacción sea un mecanismo regulador de la/s función/es de Bex3. A pesar de que el ensayo de doble híbrido se realizó con la región yuxtamembrana del receptor TrkB, la interacción de Bex3 con TrkB aún está por confirmar. Los experimentos realizados en neuronas de hipocampo en cultivo que expresan el receptor TrkB y donde se ha descrito que la expresión de Bex3 es especialmente abundante (Kim et al, 2004), pusieron de manifiesto que los niveles de Bex3 no afectaban a los niveles del receptor TrkB ni a nivel de mRNA ni a nivel de proteína (Figura R11C, D, E). Todo ello indica que Bex3 podría ejercer otras funciones en el hipocampo.

La proteína Bex3 tiene en su extremo carboxilo una secuencia CaaX que está diseñada para que la proteína sufra modificaciones post-traduccionales que faciliten el anclaje de la proteína a las membranas celulares (Kim et al, 2004; Mukai et al, 2000). Dicha secuencia CaaX podría favorecer la localización de Bex3 en la

membrana plasmática y su interacción con los receptores de neurotrofinas, puesto que se ha descrito que la secuencia CaaX de Bex3 es funcional (Kim et al, 2004). Mediante imágenes de microscopía de células HEK293 transfectadas no se han observado diferencias en la localización celular del mutante Bex3 C121S que tiene mutada la secuencia CaaX con respecto a la proteína silvestre (Figura R16C), localizándose ambas proteínas distribuidas principalmente por el citoplasma. Sin embargo, en los experimentos de reporte de actividad transcripcional del promotor de *trkA* el mutante Bex3 C121S presentó un incremento tres veces superior al presentado por la proteína silvestre (Figura R14A), lo que haría pensar que al no presentar la secuencia CaaX, su anclaje a membranas celulares no será el mismo que el de la proteína silvestre y podría estar más libre en el citoplasma teniendo de este modo un mejor acceso al núcleo con respecto a la proteína silvestre. Ello podría explicar el incremento en la actividad transcripcional del mutante Bex3 C121S frente a la proteína silvestre. Otra posible hipótesis para la función de la interacción entre las proteínas TrkA y Bex3 es que Bex3 fuese un nexo de unión entre el receptor TrkA y el receptor p75^{NTR}. Se ha demostrado que la comunicación entre TrkA y p75^{NTR} para crear el sitio de alta afinidad no requiere el dominio extracelular de p75^{NTR} (Esposito et al, 2001). Por ello, se ha postulado que probablemente ambos receptores se comuniquen a través de la convergencia de sus vías de señalización y/o a través de moléculas adaptadoras compartidas, en vez de a través de interacciones extracelulares directas (Bibel et al, 1999; Esposito et al, 2001). Bex3 al interactuar con los dos receptores del NGF podría ser una de dichas proteínas adaptadoras que promueven la comunicación y/o la señalización de los dos receptores conjuntamente.

Los datos obtenidos en los experimentos de reporte de actividad transcripcional del promotor de *trkA* en las células N2a empleando el plásmido pMS8 con la eliminación o la sobre-expresión de Bex3 pusieron de manifiesto la participación de Bex3 en la inducción de la actividad promotora del gen *trkA* de ratón (Figuras R13 y R14A). Es más, la reducción de la proteína Bex3 endógena de los cultivos de neuronas de los ganglios raquídeos provocó una reducción de los niveles del mRNA

Discusión

de *trkA* del 50%, lo que da una importancia aún mayor a la implicación de la proteína Bex3 en la transcripción del gen *trkA* (Figura R10).

Para poder discernir si Bex3 podría estar mediando el mantenimiento de la expresión de *trkA* o si podría promover el inicio de la expresión durante el desarrollo temprano del ratón, se analizó la expresión espacio-temporal de las dos proteínas durante el desarrollo embrionario. Las hibridaciones *in situ* y las inmunofluorescencias realizadas en las mismas secciones a distintos estadios del desarrollo embrionario del ratón nos permitieron dilucidar que ambas proteínas se estaban expresando en las mismas neuronas de los DRG (Figura R5B). Sin embargo, con respecto a la expresión temporal, con las hibridaciones *in situ* no pudimos detectar cuál de las dos proteínas tiene una expresión anterior o si se expresan a la vez (Figura R5A). Aunque la bibliografía apoya una expresión previa de la proteína Bex3 durante el desarrollo embrionario del ratón (Kendall et al, 2003; Kim et al, 2004), los datos disponibles en el desarrollo de los ganglios raquídeos no son suficientes y se requerirían experimentos adicionales para poder discernir cuál es el patrón temporal de expresión de ambas proteínas.

Sorprendentemente, al observar la drástica disminución de los niveles de TrkA (más de un 75%) en aquellas neuronas que presentaron niveles bajos de Bex3 (Figura R8) quisimos evaluar los niveles de ubiquitinación del receptor TrkA puesto que se había publicado que la proteína Bex3 inhibía la ubiquitinación mediada por XIAP, de la proteína Smac al interactuar Bex3 con esta última (Yoon et al, 2004). Sin embargo, los datos obtenidos no mostraron efectos de Bex3 sobre la ubiquitinación de TrkA (Figura R9A) lo que pone de manifiesto que la proteína Bex3 podría ejercer efectos diversos sobre las proteínas con las que interactúa. Por otro lado hay que destacar que la ubiquitinación de TrkA se midió en células HEK293 transfectadas con plásmidos que expresaban TrkA y GFP-Bex3 mientras que para analizar los niveles de ubiquitinación de Smac, Yoon y colaboradores realizaron los experimentos de ubiquitinación sobre-expresando la proteína ubiquitina lo que podría también producir resultados diferentes.

En los cultivos de neuronas de los ganglios raquídeos, la disminución de la proteína Bex3 endógena conllevó un descenso en los niveles del mRNA de *trkA* del

50% frente a las neuronas control mientras que el descenso observado en los niveles de proteína fue de más de un 75% de media (Figuras R8B y R10). Esta diferencia entre los niveles de mRNA y de proteína hace suponer que Bex3 pudiese estar modulando también la traducción del mRNA de *trkA*, y por tanto produciendo unos niveles menores de proteína. En un ensayo de doble híbrido que se realizó con la proteína Bex3 para identificar proteínas con las que interaccionase y poder dilucidar sus funciones, se identificaron 5 clones independientes que codificaron la subunidad P40 del factor de iniciación eucariótico eIF3, por lo que Bex3 podría desempeñar algún papel en la iniciación de la traducción (Tong et al, 2003). El factor eIF3 se asocia al factor eIF4E que forma parte de las estructuras denominadas "*P Bodies*" que controlan la traducción y/o la degradación de ciertos mRNAs. La composición de los "*P Bodies*" así como los mecanismos a través de los cuales producen la represión traduccional aún se desconocen en gran medida (Eulalio et al, 2007; Parker & Sheth, 2007). El punteado característico que presentan los "*P Bodies*" en las células se asemeja mucho al punteado que presentó la proteína Bex3 cuando se sobre-expresó en las células HEK293 (Figura R16A, D y R17A), por lo que no se puede descartar la presencia de Bex3 en los "*P Bodies*", lo que podría explicar la diferencia encontrada entre el descenso del mRNA de *trkA* y los niveles de proteína tras reducir los niveles de la proteína Bex3.

Para promover la actividad transcripcional del promotor de *trkA* la proteína Bex3 debería localizarse en el núcleo celular. Los mutantes Bex3 D1, Bex3 D2 y Bex3 L94,97A se localizaron en mayor proporción en el núcleo celular que la proteína Bex3 silvestre y los mutantes Bex3 K93R y Bex3 C121S (Figura R16C). Sin embargo, no fueron capaces de incrementar los niveles de actividad basal del promotor de *trkA* en las células N2a (Figura R14A). Esto nos hace pensar que la presencia en el núcleo no es suficiente para promover el incremento en la actividad transcripcional de *trkA*. Por otro lado, la dimerización es un requisito indispensable para muchos factores de transcripción así como un mecanismo de regulación (Lee, 1992). Se observó que los mutantes de Bex3 que no eran capaces de formar dímeros, a pesar de encontrarse en el núcleo, no incrementaron los niveles de transcripción basal en las células N2a (Figura R14A, B). Sin embargo, la proteína Bex3 silvestre y los mutantes Bex3 K93R y

Discusión

Bex3 C121S que sí formaron dímeros o tetrámeros incrementaron de manera significativa la actividad transcripcional basal del promotor de *trkA* (Figura R14A, B). El mutante Bex3 C121S incluso presentó una actividad transcripcional tres veces superior a la observada con la proteína silvestre. Este hecho podría deberse, como se ha comentado anteriormente, a que el mutante Bex3 C121S al no tener una secuencia CaaX funcional podría encontrarse más libre en el citoplasma celular en vez de estar anclado a membranas y así tener mayor acceso al núcleo. Todo ello indica que la regulación de la actividad de Bex3 en la transcripción del promotor de *trkA* podría deberse a una regulación de su estado de dimerización y/o de su localización, junto con un estricto control de sus niveles ya que la proteína en forma de monómero sufre una degradación mayor por el proteosoma que cuando se encuentra en forma de dímero (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2000).

Mediante el empleo de diferentes construcciones que contenían distintos fragmentos del promotor de *trkA* de ratón se observó que el efecto de la proteína Bex3 induciendo la actividad transcripcional tendría lugar en los 150 pb previos al punto inicial de transcripción (Figura R15B). Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, se encontró que la proteína Bex3 se une a dicha región promotora de *trkA* (Figura R15C), aunque queda por averiguar si se une de manera directa o a través de otros factores, ya que anteriormente se había descrito que el factor de transcripción Sp1 forma parte de un complejo que se une a dicha región del promotor (Sacristan et al, 1999). Por ello es posible que Bex3 estuviese formando parte de ese complejo junto con Sp1 aunque habría que confirmarlo.

Se había descrito que la proteína Bex3 tenía una localización citoplasmática (Alvarez et al, 2005; Mukai et al, 2000). Sin embargo, nuestros datos previos indicaban que Bex3 debía en algún momento localizarse en el núcleo para poder promover la transcripción del promotor de *trkA*. Para analizar la localización celular de la proteína Bex3, se realizaron inmunofluorescencias en neuronas de DRG y en células PC12 y se comprobó que la proteína Bex3 endógena en esos tipos celulares se localiza mayoritariamente en el citoplasma (Figura R16B y R18A). También se realizaron transfecciones en células HEK293 con la proteína GFP-Bex3 en presencia/ausencia de leptomicina B para bloquear específicamente la exportación

nuclear. Las imágenes de microscopía mostraron que la proteína Bex3 presenta una localización principalmente citoplasmática pero pusieron de manifiesto la translocación de la proteína Bex3 entre el citoplasma y el núcleo, siendo exportada eficientemente gracias a su secuencia NES (Figura R17A, B), corroborando de este modo los datos previos (Mukai et al, 2000).

El mecanismo que modula la translocación de la proteína Bex3 se desconoce por completo puesto que no presenta ninguna secuencia de localización nuclear conocida hasta el momento en su secuencia lineal. Se pueden plantear varias posibilidades no excluyentes para elucidar el tránsito de la proteína Bex3: 1) se ha demostrado que las proteínas de la familia 14-3-3 son proteínas reguladoras capaces de unirse a numerosas proteínas citoplasmáticas como fosfatasa, quinasas o incluso receptores de membrana (Fu et al, 2000). Las proteínas de la familia 14-3-3 se unen a proteínas en el citoplasma e impiden su translocación al núcleo, reteniendo de este modo diversos factores de transcripción en el citoplasma (Dalal et al, 1999; Kanai et al, 2000; Kumagai & Dunphy, 1999). Se ha descrito que Bex3 interacciona con la proteína 14-3-3- ϵ , uno de los siete miembros que componen la familia en mamíferos (Kimura et al, 2001). Dicha interacción podría estar regulando el tráfico de la proteína Bex3; 2) datos recientes han demostrado que tras la escisión del receptor p75^{NTR} vía γ -secretasa, su dominio intracelular (ICD) se transloca al núcleo (Frade, 2005; Kanning et al, 2003). Cabe destacar que un alto número de proteínas adaptadoras que interactúan con el ICD, se localizan en el núcleo tras la activación de p75^{NTR} y/o TrkA por NGF (Chittka et al, 2004; Kenchappa et al, 2006; Kendall et al, 2003; Pincheira et al, 2009; Salehi et al, 2000), lo que nos hace suponer que tal vez Bex3 se transloque al núcleo conjuntamente con la región ICD del receptor p75^{NTR}; 3) la translocación de la proteína Bex3 podría estar regulada por la asociación de sus monómeros. Se ha demostrado que la secuencia NES a parte de ser necesaria para la exportación eficaz del núcleo, también es necesaria para la asociación de los monómeros. Tal vez, cuando la proteína Bex3 se encuentra en forma de dímero la secuencia NES no pueda unirse a la exportina Crm1 y así la exportación de la proteína no sería posible a menos que Bex3 se encontrase en forma de monómero; 4) la proteína Bex3 podría estar sufriendo un tráfico dinámico constante; podría

Discusión

estar siendo importada al núcleo celular junto con otras proteínas y gracias a su secuencia NES está constante y eficazmente siendo exportada.

Puesto que el estímulo con NGF en las células PC12 produjo un acúmulo de la proteína Bex3 en el núcleo, como muestran las inmunofluorescencias contra Bex3 en presencia/ausencia de NGF (Figura R18A) y puesto que el tratamiento con NGF produjo también la dimerización la proteína Bex3 en el núcleo (Figura R18B), cabe la posibilidad de que sea la señalización del NGF a través de TrkA o de p75^{NTR} quien regule la dimerización de la proteína Bex3 en el núcleo a través de diversas cascadas de señalización. Teniendo en cuenta además que se observó que el NGF estimula la actividad transcripcional del promotor de *trkA* en células PC12 corroborando datos previos (Meakin et al, 1992; Zhou et al, 1995) y que se observó que en presencia de Bex3 la actividad transcripcional promovida por el NGF estaba potenciada (Figura R18C), cobra más fuerza la idea de que el NGF es responsable de mediar la dimerización de Bex3 y facilitar así la actividad transcripcional del promotor del gen *trkA*.

Entre las principales funciones mediadas por el NGF a través de los receptores TrkA cabe destacar la diferenciación así como la supervivencia de las neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo del sistema nervioso periférico. La activación de las cascadas de señalización mediadas por TrkA tiene un papel central en ambas funciones (Huang & Reichardt, 2003). Se observó como la reducción de Bex3 en las neuronas de los ganglios raquídeos provocó una disminución de la señalización intracelular mediada por TrkA a causa del descenso en sus niveles (Figura R19A). Una de las consecuencias de una menor activación de las cascadas mediadas por TrkA en respuesta a NGF es un descenso en la supervivencia de las neuronas dependientes de NGF. El porcentaje de apoptosis tras la retirada del NGF se incrementó en aquellas neuronas que presentaron niveles inferiores de proteína Bex3 (Figura R19C). De manera similar, la reducción de la proteína Bex3 en las células PC12 condujo a un descenso en la diferenciación de estas células tras un estímulo de NGF (Figura R20B). Por lo tanto, la proteína Bex3 está directamente relacionada con la diferenciación de las células PC12 así como la supervivencia de las

neuronas de los ganglios raquídeos dependientes de NGF, mediante la modulación de los niveles de TrkA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- I. La proteína Bex3 interacciona con el receptor de neurotrofinas TrkA, mediante sus dominios carboxilo terminal y yuxtamembrana, respectivamente.
- II. Bex3 modula la expresión de la proteína TrkA, pero no de TrkB, a través de la regulación de los niveles del RNA mensajero de *trkA*.
- III. Bex3 induce la actividad transcripcional basal del promotor del gen *trkA* de ratón y potencia la actividad transcripcional inducida por NGF.
- IV. La proteína Bex3 se une a la región promotora del gen *trkA* de ratón que comprende 150 pares de bases previos al inicio de la transcripción.
- V. El tratamiento con NGF provoca la dimerización de Bex3 en el núcleo de las células PC12-6/15.
- VI. Los niveles de Bex3 modulan la señalización mediada por NGF/TrkA, la supervivencia de las neuronas sensoriales dependientes de NGF así como la diferenciación de las células PC12 en respuesta a NGF.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez E, Zhou W, Witta SE, Freed CR (2005) Characterization of the Bex gene family in humans, mice, and rats. *Gene* **357**: 18-28
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2001) A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* **20**: 1229-1234
- Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV (2006) Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **281**: 1001-1007
- Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* **63**: 1523-1537
- Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (2004) A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* **23**: 2358-2368
- Arnett MG, Ryals JM, Wright DE (2007) Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain Res* **1183**: 32-42
- Bachy I, Franck MC, Li L, Abdo H, Pattyn A, Ernfors P (2011) The transcription factor Cux2 marks development of an A-delta sublineage of TrkA sensory neurons. *Dev Biol* **360**: 77-86
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* **1**: 549-553
- Barker PA, Lomen-Hoerth C, Gensch EM, Meakin SO, Glass DJ, Shooter EM (1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* **268**: 15150-15157
- Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Klein H, Behar O (2007) Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning. *J Neurosci* **27**: 13000-13011
- Bennett DL, Averill S, Clary DO, Priestley JV, McMahon SB (1996) Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptor in primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* **8**: 2204-2208
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* **18**: 616-622
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* **14**: 2919-2937
- Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT (1999) Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**: 257-263
- Boissiere F, Faucheux B, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC (1997) Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **145**: 245-252
- Brown AL, Kay GF (1999) Bex1, a gene with increased expression in parthenogenetic embryos, is a member of a novel gene family on the mouse X chromosome. *Hum Mol Genet* **8**: 611-619
- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868
- Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA (1999) The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo J* **18**: 6050-6061
- Chang BB, Persengiev SP, de Diego JG, Sacristan MP, Martin-Zanca D, Kilpatrick DL (1998) Proximal promoter sequences mediate cell-specific and elevated expression of the favorable prognosis marker TrkA in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **273**: 39-44
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**: 299-309
- Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, Sehgal A (1986) Gene-Transfer and Molecular-Cloning of the Human Ngf Receptor. *Science* **232**: 518-521

Bibliografia

- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* **110**: 167-173
- Chen CL, Broom DC, Liu Y, de Nooij JC, Li Z, Cen C, Samad OA, Jessell TM, Woolf CJ, Ma Q (2006) Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* **49**: 365-377
- Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, Hell JW (2008) NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. *J Neurosci Methods* **171**: 239-247
- Chien J, Narita K, Rattan R, Giri S, Shridhar R, Staub J, Belefond D, Lai J, Roberts LR, Molina J, Kaufmann SH, Prendergast GC, Shridhar V (2008) A role for candidate tumor-suppressor gene TCEAL7 in the regulation of c-Myc activity, cyclin D1 levels and cellular transformation. *Oncogene* **27**: 7223-7234
- Chien J, Staub J, Avula R, Zhang H, Liu W, Hartmann LC, Kaufmann SH, Smith DI, Shridhar V (2005) Epigenetic silencing of TCEAL7 (Bex4) in ovarian cancer. *Oncogene* **24**: 5089-5100
- Chittka A, Chao MV (1999) Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10705-10710
- Clary DO, Reichardt LF (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 SL, Stone JS, Bermingham-McDonogh O, Akers SR, Lefcort F, Rubel EW (1999) Ontogenetic expression of trk neurotrophin receptors in the chick auditory system. *J Comp Neurol* **413**: 271-288
- Cohen S (1960) Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**: 302-311
- Cohen S, Levi-Montalcini R (1956) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**: 571-574
- Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, Chen B, Haddad el B, Yin J, Nussenzweig A, Subramaniam A, Tessarollo L (2004) Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* **131**: 5185-5195
- Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* **19**: 4209-4218
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, et al. (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**: 1001-1011
- Cupp AS, Tessarollo L, Skinner MK (2002) Testis developmental phenotypes in neurotrophin receptor trkA and trkC null mutations: role in formation of seminiferous cords and germ cell survival. *Biol Reprod* **66**: 1838-1845
- Dalal SN, Schweitzer CM, Gan J, DeCaprio JA (1999) Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* **19**: 4465-4479
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (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
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**: 1131-1136
- Deppmann CD, Mihalas S, Sharma N, Lonze BE, Niebur E, Ginty DD (2008) A model for neuronal competition during development. *Science* **320**: 369-373
- Doxakis E, Howard L, Rohrer H, Davies AM (2008) HAND transcription factors are required for neonatal sympathetic neuron survival. *EMBO Rep* **9**: 1041-1047
- Dykes IM, Lanier J, Eng SR, Turner EE (2010) Brn3a regulates neuronal subtype specification in the trigeminal ganglion by promoting Runx expression during sensory differentiation. *Neural Dev* **5**: 3

- Eggert A, Ho R, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM (2000) Different effects of TrkA expression in neuroblastoma cell lines with or without MYCN amplification. *Med Pediatr Oncol* **35**: 623-627
- Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H (1988) Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* **1**: 983-996
- Ernfors P, Henschen A, Olson L, 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
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, 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
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**: 32687-32695
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 9-22
- Farinas I (1999) Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* **45**: 233-242
- Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, Lee H, Field L, Zander K, Sibenaller Z, Ryken TC, Vibhakar R, Hood L, Madan A (2006) Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. *Cancer Res* **66**: 6665-6674
- Fornierod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**: 1051-1060
- Frade JM (2000) Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**: 1139-1148
- Frade JM (2005) Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *J Neurosci* **25**: 1407-1411
- Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* **20**: 6340-6346
- Friedman WJ, Olson L, Persson H (1991) Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* **63**: 43-51
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 617-647
- Fujimoto M, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S (2005) Methylation adjacent to negatively regulating AP-1 site reactivates TrkA gene expression during cancer progression. *Oncogene* **24**: 5108-5118
- Furlan A, Lubke M, Adameyko I, Lallemand F, Ernfors P (2013) The transcription factor Hmx1 and growth factor receptor activities control sympathetic neurons diversification. *Embo J* **32**: 1613-1625
- Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77**: 713-725
- Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Schartl M, Thoenen H (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**: 266-269
- Greene LA, Tischler AS (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 A, Simone DA, Stone LS, Fairbanks CA, Wang J, Elde R (2001) Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* **14**: 293-304

Bibliografia

- Hagag N, Halegoua S, Viola M (1986) Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* **319**: 680-682
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* **3**: 533-535
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron* **6**: 845-858
- Han C, Liu H, Liu J, Yin K, Xie Y, Shen X, Wang Y, Yuan J, Qiang B, Liu YJ, Peng X (2005) Human Bex2 interacts with LMO2 and regulates the transcriptional activity of a novel DNA-binding complex. *Nucleic Acids Res* **33**: 6555-6565
- Hempstead BL (2006) Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* **3**: 19-24
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**: 678-683
- Hempstead BL, Rabin SJ, Kaplan L, Reid S, Parada LF, Kaplan DR (1992) Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* **9**: 883-896
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (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 DK, Emler DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12419-12424
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197
- Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC (1992) p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* **9**: 465-478
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**: 609-642
- Huang EJ, Wilkinson GA, Farinas I, Backus C, Zang K, Wong SL, Reichardt LF (1999a) 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
- Huang EJ, Zang K, Schmidt A, Saulys A, Xiang M, Reichardt LF (1999b) POU domain factor Brn-3a controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating Trk receptor expression. *Development* **126**: 2869-2882
- Iraci N, Diolaiti D, Papa A, Porro A, Valli E, Gherardi S, Herold S, Eilers M, Bernardoni R, Della Valle G, Perini G (2011) A SP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF. *Cancer Res* **71**: 404-412
- Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **460**: 191-198
- Kalous A, Nangle MR, Anastasia A, Hempstead BL, Keast JR (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
- Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley LC, Yaffe MB (2000) TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *Embo J* **19**: 6778-6791
- Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC (2003) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* **23**: 5425-5436

- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (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 DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**: 554-558
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 381-391
- Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD (2006) Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* **50**: 219-232
- Kendall SE, Ryczko MC, Mehan M, Verdi JM (2003) Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **144**: 151-158
- Khazaei MR, Halfter H, Karimzadeh F, Koo JH, Margolis FL, Young P (2010) Bex1 is involved in the regeneration of axons after injury. *J Neurochem* **115**: 910-920
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* **21**: 5854-5863
- Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* **274**: 2597-2600
- Kim AJ, Lee CS, Schlessinger D (2004) Bex3 associates with replicating mitochondria and is involved in possible growth control of F9 teratocarcinoma cells. *Gene* **343**: 79-89
- Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, Sato TA (2001) 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **276**: 17291-17300
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**: 189-197
- Klein R, Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990) Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* **109**: 845-850
- Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**: 668-674
- Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker PA (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J* **25**: 2061-2070
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV (2001) An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* **21**: 176-185
- Koo JH, Smiley MA, Lovering RM, Margolis FL (2007) Bex1 knock out mice show altered skeletal muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **363**: 405-410
- Kramer I, Sigrist M, de Nooij JC, Taniuchi I, Jessell TM, Arber S (2006) A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron* **49**: 379-393
- Kumagai A, Dunphy WG (1999) Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev* **13**: 1067-1072
- Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* **11**: 64-76
- Lamballe F, Klein R, 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
- Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi AM, M DA, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E (2005) Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16795-16800
- Lanier J, Quina LA, Eng SR, Cox E, Turner EE (2007) Brn3a target gene recognition in embryonic sensory neurons. *Dev Biol* **302**: 703-716
- Lawson SN, Biscoe TJ (1979) Development of mouse dorsal root ganglia: an autoradiographic and quantitative study. *J Neurocytol* **8**: 265-274

Bibliografia

- Lee CH, Wong TS, Chan JY, Lu SC, Lin P, Cheng AJ, Chen YJ, Chang JS, Hsiao SH, Leu YW, Li CI, Hsiao JR, Chang JY (2013) Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* **230**: 298-309
- Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3555-3560
- Lee KA (1992) Dimeric transcription factor families: it takes two to tango but who decides on partners and the venue? *J Cell Sci* **103 (Pt 1)**: 9-14
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948
- Lei L, Laub F, Lush M, Romero M, Zhou J, Luikart B, Klesse L, Ramirez F, Parada LF (2005) The zinc finger transcription factor Klf7 is required for TrkA gene expression and development of nociceptive sensory neurons. *Genes Dev* **19**: 1354-1364
- Lei L, Ma L, Nef S, Thai T, Parada LF (2001) mKlf7, a potential transcriptional regulator of TrkA nerve growth factor receptor expression in sensory and sympathetic neurons. *Development* **128**: 1147-1158
- Lei L, Zhou J, Lin L, Parada LF (2006) Brn3a and Klf7 cooperate to control TrkA expression in sensory neurons. *Dev Biol* **300**: 758-769
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**: 149-152
- Li Y, Holtzman DM, Kromer LF, Kaplan DR, Chua-Couzens J, Clary DO, Knusel B, Mobley WC (1995) Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *J Neurosci* **15**: 2888-2905
- Lomen-Hoerth C, Shooter EM (1995) Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J Neurochem* **64**: 1780-1789
- Lopes C, Liu Z, Xu Y, Ma Q (2012) Tlx3 and Runx1 act in combination to coordinate the development of a cohort of nociceptors, thermoceptors, and pruriceptors. *J Neurosci* **32**: 9706-9715
- Luo W, Wickramasinghe SR, Savitt JM, Griffin JW, Dawson TM, Ginty DD (2007) A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron* **54**: 739-754
- Ma L, Lei L, Eng SR, Turner E, Parada LF (2003) Brn3a regulation of TrkA/NGF receptor expression in developing sensory neurons. *Development* **130**: 3525-3534
- Ma L, Merenmies J, Parada LF (2000) Molecular characterization of the TrkA/NGF receptor minimal enhancer reveals regulation by multiple cis elements to drive embryonic neuron expression. *Development* **127**: 3777-3788
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* **269**: 6884-6891
- Mamidipudi V, Li X, Wooten MW (2002) Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **277**: 28010-28018
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* **35**: 65-76
- Marmigere F, Montelius A, Wegner M, Groner Y, Reichardt LF, Ernfors P (2006) The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci* **9**: 180-187
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185
- Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (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

- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986a) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**: 743-748
- Martin-Zanca D, Mitra G, Long LK, Barbacid M (1986b) Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 2**: 983-992
- Matrone C, Marolda R, Ciafre S, Ciotti MT, Mercanti D, Calissano P (2009) Tyrosine kinase nerve growth factor receptor switches from prosurvival to proapoptotic activity via Abeta-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11358-11363
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* **11**: 131-133
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991) New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**: 411-414
- Meakin SO, MacDonald JL, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (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
- Meakin SO, Suter U, Drinkwater CC, Welcher AA, Shooter EM (1992) The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2374-2378
- Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* **19**: 849-861
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **276**: 12660-12666
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* **275**: 17566-17570
- Mukai J, Shoji S, Kimura MT, Okubo S, Sano H, Suvanto P, Li Y, Irie S, Sato TA (2002) Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 13973-13982
- Muller M, Triaca V, Besusso D, Costanzi M, Horn JM, Koudelka J, Geibel M, Cestari V, Minichiello L (2012) Loss of NGF-TrkA signaling from the CNS is not sufficient to induce cognitive impairments in young adult or intermediate-aged mice. *J Neurosci* **32**: 14885-14898
- Naderi A, Liu J, Francis GD (2012) A feedback loop between BEX2 and ErbB2 mediated by c-Jun signaling in breast cancer. *Int J Cancer* **130**: 71-82
- Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, Caldas C (2007) BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* **67**: 6725-6736
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843-848
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993) Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *Embo J* **12**: 933-941
- Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY (2000) Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci* **20**: 9096-9103
- Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**: 635-646
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 272-280

Bibliografia

- Perez P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV (1995) NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* **6**: 97-105
- Pincheira R, Baerwald M, Dunbar JD, Donner DB (2009) Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *Embo J* **28**: 261-273
- Pincheira R, Donner DB (2008) The Sall2 transcription factor is a novel p75NTR binding protein that promotes the development and function of neurons. *Ann N Y Acad Sci* **1144**: 53-55
- Pulido D, Campuzano S, Koda T, Modolell J, Barbacid M (1992) Dtrk, a Drosophila gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. *Embo J* **11**: 391-404
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM (1987) Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**: 593-597
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2004) Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* **24**: 6650-6658
- Rapp G, Freudenstein J, Kludiny J, Mucha J, Wempe F, Zimmer M, Scheit KH (1990) Characterization of three abundant mRNAs from human ovarian granulosa cells. *DNA Cell Biol* **9**: 479-485
- Rattan R, Narita K, Chien J, Maguire JL, Shridhar R, Giri S, Shridhar V (2010) TCEAL7, a putative tumor suppressor gene, negatively regulates NF-kappaB pathway. *Oncogene* **29**: 1362-1373
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**: 203-233
- Sacristan MP, de Diego JG, Bonilla M, Martin-Zanca D (1999) Molecular cloning and characterization of the 5' region of the mouse trkA proto-oncogene. *Oncogene* **18**: 5836-5842
- Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA (2000) NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**: 279-288
- Sanchez-Ortiz E, Yui D, Song D, Li Y, Rubenstein JL, Reichardt LF, Parada LF (2012) TrkA gene ablation in basal forebrain results in dysfunction of the cholinergic circuitry. *J Neurosci* **32**: 4065-4079
- Savaskan E, Muller-Spahn F, Olivieri G, Bruttel S, Otten U, Rosenberg C, Hulette C, 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
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314 (Pt 3)**: 951-960
- Shi X, Garry DJ (2010) Myogenic regulatory factors transactivate the Tceal7 gene and modulate muscle differentiation. *Biochem J* **428**: 213-221
- Shooter EM (2001) Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci* **24**: 601-629
- Smaldone S, Laub F, Else C, Dragomir C, Ramirez F (2004) Identification of MoKA, a novel F-box protein that modulates Kruppel-like transcription factor 7 activity. *Mol Cell Biol* **24**: 1058-1069
- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**: 246-249
- Snider WD (1994) Functions of the Neurotrophins during Nervous-System Development - What the Knockouts Are Teaching Us. *Cell* **77**: 627-638
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **24**: 1217-1281
- Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ (2010) A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* **327**: 863-866

- Sun Y, Dykes IM, Liang X, Eng SR, Evans SM, Turner EE (2008) A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci* **11**: 1283-1293
- Sutcliffe B, Forero MG, Zhu B, Robinson IM, Hidalgo A (2013) Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the Drosophila Neuromuscular Junction. *PLoS One* **8**: e75902
- Szeberenyi J, Cai H, Cooper GM (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **10**: 5324-5332
- Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, Galli SJ (1997) Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* **90**: 1807-1820
- Tessarollo L (1998) Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**: 125-137
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270**: 593-598
- Tong X, Xie D, Roth W, Reed J, Koeffler HP (2003) NADE (p75NTR-associated cell death executor) suppresses cellular growth in vivo. *Int J Oncol* **22**: 1357-1362
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG (1998) High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* **273**: 5829-5840
- Valderrama X, Misra V (2008) Novel Brn3a cis-acting sequences mediate transcription of human trkA in neurons. *J Neurochem* **105**: 425-435
- van der Geer P, Pawson T (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* **20**: 277-280
- Verge VM, Merlio JP, Grondin J, Ernfors P, Persson H, Riopelle RJ, Hokfelt T, Richardson PM (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
- Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, Magnusson K, Besset V, Ibanez CF (2006) Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *Embo J* **25**: 1219-1230
- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC (2007) Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**: 25-38
- Weskamp G, Schlondorff J, Lum L, Becherer JD, Kim TW, Saftig P, Hartmann D, Murphy G, Blobel CP (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**: 41-49
- Wiesmann C, Muller YA, de Vos AM (2000) Ligand-binding sites in Ig-like domains of receptor tyrosine kinases. *J Mol Med (Berl)* **78**: 247-260
- Wiggins AK, Wei G, Doxakis E, Wong C, Tang AA, Zang K, Luo EJ, Neve RL, Reichardt LF, Huang EJ (2004) Interaction of Brn3a and HIPK2 mediates transcriptional repression of sensory neuron survival. *J Cell Biol* **167**: 257-267
- Wu C, Lai CF, Mobley WC (2001) Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* **21**: 5406-5416
- Wyatt S, Davies AM (1993) Regulation of expression of mRNAs encoding the nerve growth factor receptors p75 and trkA in developing sensory neurons. *Development* **119**: 635-648
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-963
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**: 585-593
- Yan KS, Kuti M, Yan S, Mujtaba S, Farooq A, Goldfarb MP, Zhou MM (2002) FRS2 PTB domain conformation regulates interactions with divergent neurotrophic receptors. *J Biol Chem* **277**: 17088-17094
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* **12**: 113-115

Bibliografía

- Yano H, Lee FS, Kong H, Chuang J, Arevalo J, Perez P, Sung C, Chao MV (2001) Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci* **21**: RC125
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC, Bredesen DE (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**: 30202-30208
- Yi JS, Lee SK, Sato TA, Koh JY (2003) Co-induction of p75(NTR) and the associated death executor NADE in degenerating hippocampal neurons after kainate-induced seizures in the rat. *Neurosci Lett* **347**: 126-130
- Yoon K, Jang HD, Lee SY (2004) Direct interaction of Smac with NADE promotes TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 649-654
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* **18**: 3273-3281
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (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
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**: 622-626
- Yu Y, Wang J, Yuan H, Qin F, Zhang N, Li YY, Liu J, Lu H (2006) Characterization of human dopamine responsive protein DRG-1 that binds to p75NTR-associated cell death executor NADE. *Brain Res* **1100**: 13-20
- Zapata JM, Matsuzawa S, Godzik A, Leo E, Wasserman SA, Reed JC (2000) The Drosophila tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates NFkappaB activity. *J Biol Chem* **275**: 12102-12107
- Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269
- Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002) FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* **80**: 1049-1061
- Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* **42**: 897-912
- Zhou J, Valletta JS, Grimes ML, Mobley WC (1995) Multiple levels for regulation of TrkA in PC12 cells by nerve growth factor. *J Neurochem* **65**: 1146-1156
- Zhou X, Xu X, Meng Q, Hu J, Zhi T, Shi Q, Yu R (2012b) Bex2 is Critical for Migration and Invasion in Malignant Glioma Cells. *J Mol Neurosci*
- Zhu B, Pennack JA, McQuilton P, Forero MG, Mizuguchi K, Sutcliffe B, Gu CJ, Fenton JC, Hidalgo A (2008) Drosophila neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation. *PLoS Biol* **6**: e284
- Zou M, Li S, Klein WH, Xiang M (2012) Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord. *Dev Biol* **364**: 114-127
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**: 493-498

TESIS DOCTORAL: Laura Andrés Martín, 2007. Estudio de transcritos alternativos del gen *trkA* y análisis de metilación de su promotor en neuroblastomas. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

