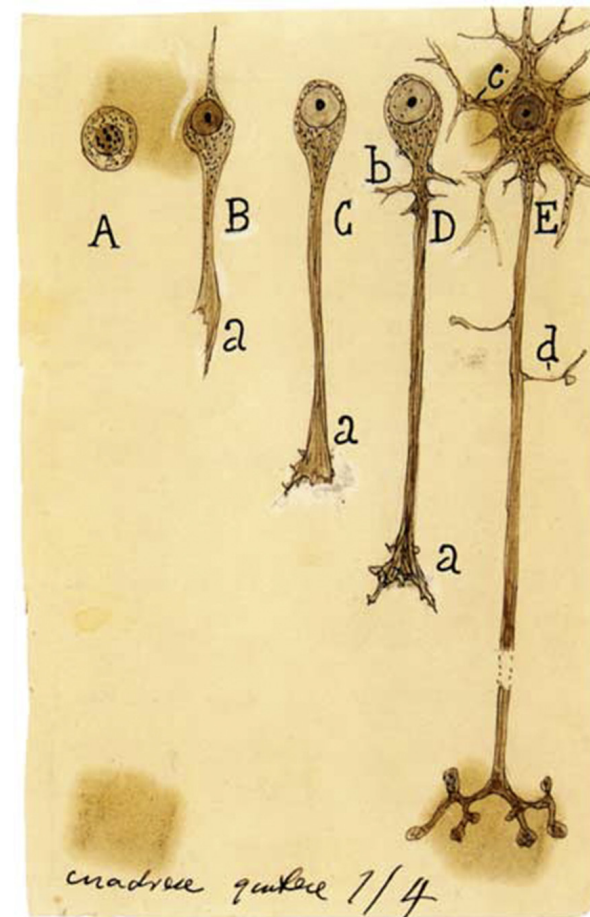


**ARMS coordina la
diferenciación neuronal
y la secreción mediada
por neurotrofinas**

Saray López Benito

INTRODUCCIÓN

Figura I1: Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal, procedente de su autobiografía literaria titulada "Recuerdos de mi vida", que se publicó en capítulos sueltos en la Revista de Aragón, entre 1901 y 1904, y que actualmente se recoge en el "Centro Virtual Cervantes" editada por Juan Fernández Santarén. Bajo esta imagen Cajal escribe: "Evolución positiva de la fibra nerviosa, según las observaciones de His y nuestras. A, célula germinal; B, fase bipolar con iniciación de la maza de crecimiento; C, fase de neuroblasto, propiamente dicho; D, aparición de las dendritas; E, modelamiento de éstas y formación de las ramas nerviosas colaterales y terminales. (Nótese la maza o cono de crecimiento (a), descubierto por primera vez.)"



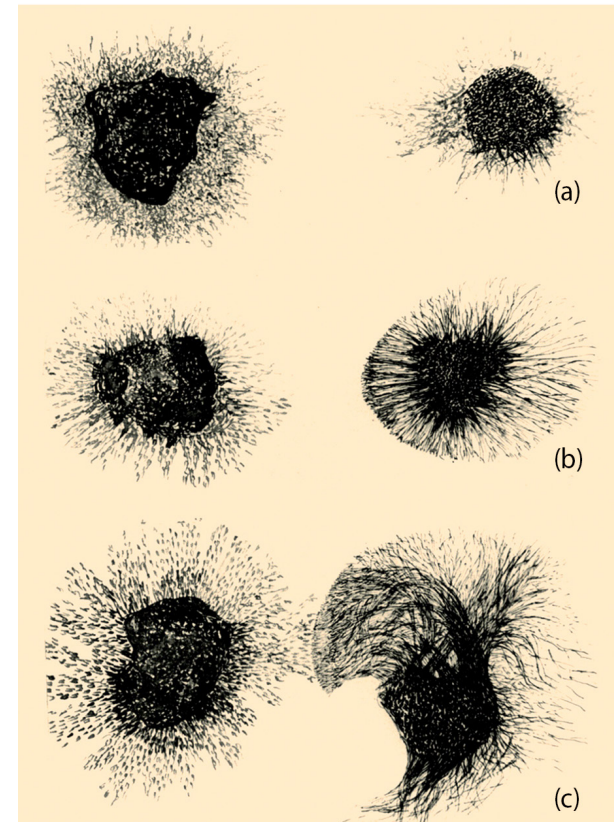
ANTECEDENTES HISTÓRICOS: DESCUBRIMIENTO DE NGF Y LA FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS.

Esta historia, como tantas otras, comienza a finales del siglo XIX, de la mano de Don Santiago Ramón y Cajal. Cajal inició sus estudios acerca del desarrollo del sistema nervioso en un contexto en el que la teoría celular ya había visto la luz y la mayoría de los científicos entendían el tejido nervioso como una excepción a dicha teoría. Fue Cajal quien descubrió que también el tejido nervioso está compuesto por células individuales, las neuronas, cuyos axones tienen terminaciones libres. Pocos años después Cajal no sólo había establecido el esquema estructural y funcional del sistema nervioso, sino también la maquinaria para la guía de los procesos neuronales en desarrollo: el cono de crecimiento. Tal como se describe en Sotelo, 2004, en el año 1892 Cajal, “impresionado por el comportamiento de los axones durante el desarrollo, trató de encontrar una explicación lógica a esa fuerza inteligente que guiaba a los conos de crecimiento”. Ese mismo año propuso lo que sería el inicio de la “teoría neurotrófica”, un mecanismo por el cual las células diana serían capaces de secretar sustancias atrayentes a las que los conos de crecimiento serían sensibles (Cajal, 1890; Cajal, 1892), (fig. 11). Por éstas y otras muchas aportaciones, Santiago Ramón y Cajal recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 1906. No obstante, la

teoría neurotrófica estuvo muy adelantada a su tiempo y no comenzó a tomar sentido hasta 60 años después, cuando Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger decidieron profundizar en las investigaciones de Elmer Bueker.

Bueker había sido un estudiante de doctorado dirigido por el catedrático de Zoología Viktor Hamburger en la Universidad Washington en San Luis (Misuri). En el año 1948, Bueker publicó un artículo en el que analizaba las consecuencias de injertar fragmentos de sarcoma de ratón sobre embriones de pollo (Bueker, 1948). En estos experimentos observó fibras nerviosas sensoriales que emergían de los ganglios raquídeos del embrión que estaban más próximos al sarcoma, accediendo incluso al interior del tejido neoplásico, y concluyó que las características histoquímicas del tumor ofrecían un ambiente favorable para el crecimiento de las fibras sensoriales. Sin embargo, no detectó este efecto en las fibras motoras. Tras la publicación, la neuróloga italiana Rita Levi-Montalcini y Hamburger decidieron re-investigar este fenómeno (Levi-Montalcini, 1987). Además de corroborar los resultados de Bueker, replicaron los mismos efectos colocando el sarcoma próximo al embrión pero sin que hubiera contacto entre ellos, así como en experimentos *in vitro* en los que utilizaban explantes de ganglios sensoriales simpáticos colocados cerca de los tumores en cultivo. Levi-Montalcini describió, en los ensayos *in vitro*, un halo de fibras nerviosas

Figura 12: Dibujo original procedente de la conferencia impartida por Rita Levi-Montalcini en la ceremonia en la que recibió el premio Nobel, el 8 de diciembre de 1986, en Estocolmo, y contenida en la publicación *"The Nerve Growth Factor: thirty-five years later"* (Levi-Montalcini, 1987). Bajo esta imagen aparece el texto siguiente: *"Drawings illustrating the in vitro "halo" effect on 8-day chick embryo sensory ganglia cultured in the presence of fragments of mouse sarcoma 180 for 24 hours (b) or 48 hours (c). In (a), the ganglion, which faces a fragment of chick embryonic tissue, shows fibroblasts but few nerve fibers. In (b) and (c), the ganglia, facing fragments of sarcoma 180, show the typical "halo" effect elicited by the growth factor released from the sarcoma. Note in (c) the first evidence of a neurotropic effect of the growth factor"*.



que emergían del ganglio a las 24 horas, y cuya densidad era máxima en la dirección en la que se encontraba el sarcoma (fig. 12). Con estos resultados Levi-Montalcini y Hamburger, junto a Stanley Cohen, un joven bioquímico que se había unido al grupo recientemente, centraron sus esfuerzos en el estudio de la naturaleza química de ese factor que era liberado por los sarcomas. Tras dos años de trabajo, identificaron una molécula de naturaleza proteica y peso molecular de 44000 Da a la que denominaron Factor de Crecimiento Nervioso o NGF (del inglés *Nerve Growth Factor*) (Cohen, Levimontalcini and Hamburger, 1954). Habían descubierto la primera neurotrofina, que estuvo en entredicho durante casi medio siglo hasta que se reconoció su validez, y en 1986 Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen recibieron por ello el premio Nobel de Fisiología o Medicina.

Casi 30 años después Hans Thoenen y colaboradores purificaron y caracterizaron otro factor neurotrófico, el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro o BDNF (del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) (Barde et al., 1982), iniciándose así la familia de las neurotrofinas. Los investigadores advirtieron que la secuencia de la proteína BDNF presentaba gran homología con la secuencia del NGF y esto favoreció el aislamiento de nuevos miembros, estableciéndose una correlación funcional a partir de una correlación estructural (Leibrock et al 1989). En la actualidad esta familia incluye

en los mamíferos otros dos miembros: la Neurotrofina-3 (NT-3) (Maisonpierre et al., 1990; Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt 1990; Rosenthal et al., 1990) y la Neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992).

PROCESAMIENTO Y SECRECIÓN DE LAS NEUROTROFINAS

Como la mayoría de los polipéptidos biológicamente activos que se secretan, la síntesis de las neurotrofinas se produce en el retículo endoplasmático rugoso, donde las pro-neurotrofinas se empaquetan en vesículas secretoras. Las pro-neurotrofinas, que van desde aproximadamente 210 a 270 residuos de aminoácidos de longitud, son inicialmente sintetizadas como pre-pro-neurotrofinas a partir de un único exón. Están 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. Las pre-pro-neurotrofinas se procesan tanto en el retículo endoplasmático, donde se eliminará el péptido señal, como dentro de estas vesículas, donde se elimina el pro-dominio por proteasas de la familia convertasa de proproteína (Seidah et al., 1996), dando lugar a la producción de las neurotrofinas maduras que contienen alrededor de 120 residuos. Cabe destacar que también 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).

Las neuronas y las células neuroendocrinas utilizan dos vías distintas de secreción: regulada y constitutiva, mientras que las células no neuronales tienen típicamente sólo la vía secretora constitutiva (Kelly, 1985). Por lo tanto, mientras que en células no neuronales la forma de secreción de las cuatro neurotrofinas es similar, éste no es el caso en las neuronas. El tráfico del NGF, NT-3 y NT-4 es principalmente a través de la vía secretora constitutiva en las neuronas y células neuroendocrinas, mientras que BDNF se secreta selectivamente a través de la ruta regulada (Mowla et al., 1999; Griesbeck et al., 1999; Farhadi et al., 2000; Hibbert et al., 2003). Esta distinción es particularmente importante en el contexto de las funciones de BDNF en el aprendizaje y la memoria, donde el control de la secreción de BDNF por la actividad neuronal es esencial. En las neuronas, la mayoría de la secreción de BDNF sigue la misma vía secretora que el resto de neuropéptidos, se empaqueta en vesículas grandes de núcleo denso (Large Dense Core Vesicles, LDCVs), que se transportan anterógradamente a lo largo de los axones, y es secretado en el extremo del axón (von Bartheld et al., 1996; Zhou and Rush, 1996; Conner et al., 1997; Dieni et al., 2012). No obstante, el BDNF se encuentra también en vesículas

dendríticas que no poseen las características propias de las LDCVs (Miyazaki et al., 2011).

Curiosamente, la secreción de neurotrofinas también puede ser desencadenada por las propias neurotrofinas: el uso de NT-4/5 o NT-3 para inducir la estimulación de los receptores TrkB y TrkC neuronales en rodajas de hipocampo desencadena la secreción de BDNF tanto sobreexpresado como endógeno (Canossa et al., 1997). Del mismo modo, se ha descrito en células PC12, la secreción inducida por NGF de cualquier neurotrofina sobreexpresada, mediada por la señalización combinada de receptores TrkA y p75^{NTR} (Kruttscham et al., 1998).

RECEPTORES DE NEUROTROFINAS

Las neurotrofinas realizan sus funciones mediante su unión a receptores específicos, de los que se conocen dos tipos: los receptores de alta afinidad Trk (*Tropomyosin receptor kinase*), pertenecientes a la familia de receptores tirosina quinasa, y el receptor de baja afinidad p75^{NTR}, miembro de la superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR). El receptor p75^{NTR} humano fue descrito en el año 1986 (Chao et al., 1986) como receptor de baja afinidad para el NGF humano, capaz de unir también el resto de neurotrofinas. 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., 1986-a; Martin-Zanca et al., 1986-b) a la que denominaron Trk (del inglés *Tropomyosin receptor kinase*). Poco tiempo después, se clonó el receptor TrkB (Klein et al., 1990; Leibrock et al., 1989), el receptor Trk pasó a denominarse TrkA y se estableció 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 como el principal receptor para NT-3 (Lamballe et al., 1991).

Las cuatro neurotrofinas, tanto en su forma inmadura de pro-neurotrofinas como en su forma madura totalmente procesada, pueden unirse y activar la señalización de p75^{NTR}, mientras que los receptores Trk se unen a las formas maduras y son selectivos para neurotrofinas concretas: NGF se une preferentemente y activa TrkA, NT3 se une preferentemente y activa TrkC y BDNF y NT4 preferentemente unen y activan TrkB (Patapoutian and Reichardt, 2001; Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003) (fig. 13). La función de estos receptores es compleja ya que p75^{NTR} y los receptores Trk pueden funcionar de manera independiente o conjunta. En las neuronas que expresan tanto receptores Trk como p75^{NTR}, los receptores interactúan física y funcionalmente de manera que pueden alterar las propiedades de señalización de cada uno. Así, cuando p75^{NTR} es co-expresado con TrkA, el NGF maduro se une al complejo con mayor afinidad que la que se observa cuando TrkA es expresado en ausencia de p75^{NTR} (Hempstead et al 1991).

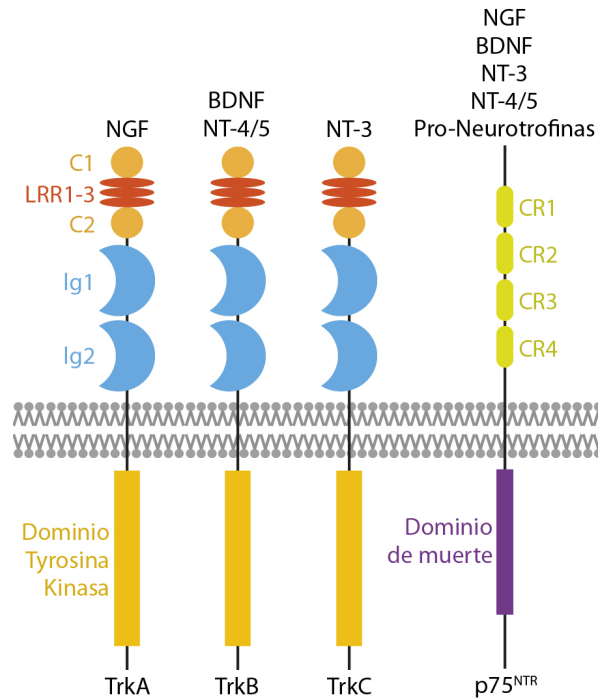


Figura 13: Esquema de los distintos receptores de neurotrofinas y sus dominios estructurales. En la parte superior aparecen las neurotrofinas capaces de unirse a cada uno de los receptores. CR1-4: regiones ricas en cisteína del receptor p75^{NTR}; C1-2: regiones ricas en cisteína de los receptores Trk; Ig: dominio tipo inmunoglobulina; LRR1-3: motivos ricos en leucinas.

Uno o más de los cuatro receptores de neurotrofinas se expresan en una amplia variedad de tipos de neuronas y glía, tanto en el sistema nervioso central como periférico, y también en numerosos tipos de células no neuronales. Así, se establecen poblaciones celulares que están determinadas por el receptor o receptores de neurotrofinas que expresan, y que pueden afectar a una extraordinaria gama de funciones biológicas.

Para añadir un nivel adicional de complejidad, diferentes receptores pueden interactuar unos con otros. Por ejemplo, p75^{NTR} puede formar complejo con los receptores Trk, sortilin-1 (SORL1) o Nogo (RTN4R), (Bronfman y Fainzilber, 2004), mientras que TrkB interactúa con ephrin-A7 y EphA5 (Fitzgerald et al., 2008; Marler et al., 2008). Del mismo modo, el receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNFR), el receptor tirosina quinasa Ret y las protocaderinas cooperan para regular la supervivencia neuronal (Schalm et al., 2010). Además, la interacción entre el receptor de efrinas EphB y los receptores de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) es crucial para la modulación de la plasticidad sináptica (Dalva et al., 2000; Henderson et al., 2001). Así, una compleja interacción entre el repertorio de receptores y la disponibilidad de los efectores determina en última instancia la respuesta de una neurona a un estímulo dado.

Activación de los receptores y rutas de señalización

1. Receptor p75^{NTR}

Estructuralmente, el receptor p75^{NTR} está compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Se incluye en la familia del receptor del factor de necrosis tumoral al presentar en su dominio extracelular cuatro regiones ricas en cisteínas (CR1-CR4 con 6 cisteínas cada una) y en su parte intracelular, un dominio de muerte celular (fig. 13). El receptor p75^{NTR} presenta una afinidad similar hacia todas las neurotrofinas maduras, sin embargo, une las pro-neurotrofinas con mayor afinidad (Lee et al., 2001). Además, el pro-dominio de las pro-neurotrofinas interactúa con el receptor de sortilina el cual se asocia y coopera con p75^{NTR} para unir pro-neurotrofinas con alta afinidad (Nykjaer et al., 2004). De este modo, las pro-neurotrofinas pueden ejercer acciones diferentes, complementarias e incluso contrarias a las neurotrofinas (Hempstead, 2006).

El receptor p75^{NTR} se expresa ampliamente tanto en tejidos neurales como no neurales. Sus niveles de expresión son máximos durante el y aunque disminuyen 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).

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).

2. Receptores Trk

Los receptores Trk pertenecen a la familia de receptores tirosina quinasa, 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 separadas por un dominio con tres motivos ricos en leucinas. A continuación, presentan dos dominios de tipo inmunoglobulina-C2, un único paso transmembrana y finalmente, en la región intracelular, un dominio con actividad tirosina quinasa y un corto extremo carboxilo terminal (fig. 13). Cabe destacar la presencia de diversas tirosinas conservadas en la parte citoplasmática, cuya fosforilación, al igual que ocurre en otros receptores tirosina quinasa, regula la actividad del receptor y proporciona los sitios de reclutamiento de moléculas adaptadoras y

enzimas que intervienen en la iniciación de las cascadas de señalización intracelular (Bibel and Barde, 2000; Huang and Reichardt, 2003; Patapoutian and Reichardt, 2001; Sofroniew et al., 2001). Cada uno de los dominios extracelulares de los receptores Trk ayuda a regular 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 (Arévalo et al., 2001; Wehrman et al., 2007).

Las neurotrofinas maduras existen asociadas no covalentemente como dímeros formados por monómeros de unos 13.500 Da, y se unen a los receptores en forma de dímeros (Bothwell and Shooter, 1977; Radziejewski et al., 1992). Al igual que sucede con el resto de miembros de la familia de los receptores tirosina quinasa, la unión del ligando provoca la dimerización del receptor. De esta manera, dos dominios tirosina quinasa se sitúan lo suficientemente próximos para que se produzca la autofosforilación en los residuos de tirosina situados en los lazos de activación del dominio tirosina quinasa. 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 y que contengan dominios que reconozcan tirosinas fosforiladas, como son los dominios del

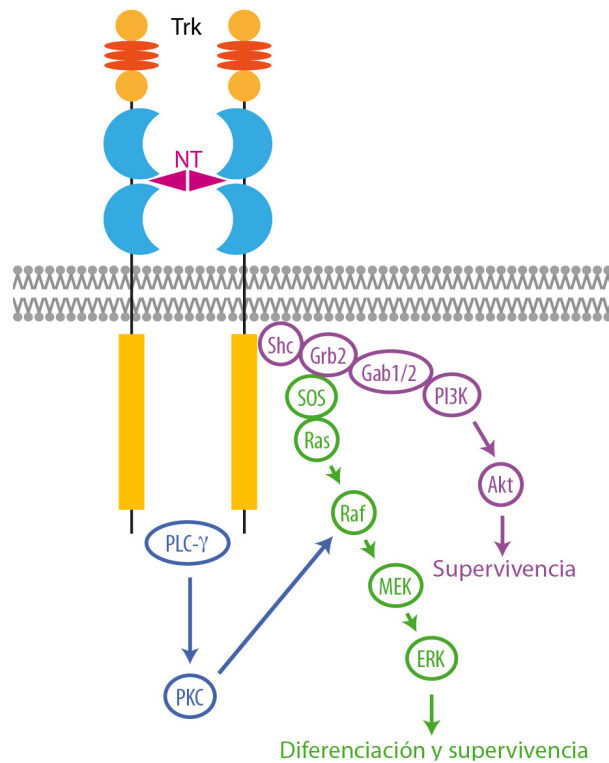


Figura 14: Esquema de las principales rutas de señalización que se activan tras la unión del ligando al receptor Trk. PLC- γ : fosfolipasa C- γ ; PKC: proteína quinasa C; SOS: *Son of sevenless*; Grb2: *growth factor receptor bound protein-2*; Gab1/2: *GRB2-associated binding protein 1*; PI3K: fosfoinositol 3 quinasa; AKT: proteína quinasa B; Ras: *Rat sarcoma*; Raf: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*.

tipo SH2 (*Src Homology 2*) y PTB (*Phosphotyrosine binding domain*) (Koch et al., 1991; van der Geer and Pawson, 1995).

La activación de TrkA se produce inmediatamente tras la interacción con NGF y su actividad tirosina quinasa es máxima entre 5 y 10 minutos después del estímulo, 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). 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 Trk 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 , aumentando la supervivencia neuronal, a través de la activación de Akt, en neuronas de hipocampo *in vitro* y en células PC12 (Lee and Chao, 2001; Rajagopal et al., 2004).

Tras la unión del ligando al receptor Trk, se desencadenan principalmente tres grandes cascadas de señalización (fig. 14) que se describen a continuación:

2.1. 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, durante aproximadamente 1 o 2 horas, o de manera prolongada, durante unas 7 horas (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 de nucleótidos de guanina SOS. La activación de SOS promueve el intercambio de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) para activar Ras, que estimulará a tres proteínas quinasas que actúan de manera secuencial: Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y ERK (MAPK) (Kaplan and 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, que a su vez activa la serina-treonina quinasa B-Raf, lo que resulta en la activación sostenida de la MAPK. Esta vía requiere la internalización del receptor de Trk en el compartimiento endosomal (Wu et al., 2001; York et al., 1998; Arévalo et al., 2006; Wu et al., 2001; York et al., 2000). 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. Nuestro grupo ha descrito que la proteína adaptadora ARMS/Kidins220 pone en contacto CrkL con Trk para la señalización prolongada de la ruta de las MAP quinasas (Arévalo et al., 2004). Tras el tratamiento con NGF, ARMS se fosforila rápidamente en tirosina y proporciona un sitio de unión para el complejo CrkL-C3G, lo que conlleva a la activación sostenida de la ruta (Arévalo et al., 2006) (fig. 16). 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 a su vez controla la expresión de genes esenciales para la supervivencia y muerte neuronal y para la diferenciación (Deak et al., 1998; Ginty et al., 1994; Xing et al., 1996).

2.2. Ruta PI3K/AKT

Shc se une a los receptores Trk activos en el residuo Y490. Shc se asocia con Grb2 y Gab1, los cuales 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 a través de la vía PI3K-Akt. Entre los sustratos de Akt se incluyen proteínas implicadas en la muerte celular. Así, la proteína Akt fosforila e inactiva a 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).

2.3. Ruta de PLC- γ

PLC- γ es una enzima cuya actividad es inducida por las neurotrofinas cuando se une al residuo Y785 fosforilado de

Trk. Tras su activación, hidroliza fosfatidil-inositoles 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).

FUNCIONES DE LAS NEUROTROFINAS

Regulación de la supervivencia y la muerte celular

Las neurotrofinas se identificaron por primera vez como promotores de la supervivencia neuronal, especialmente en el sistema nervioso periférico, y durante décadas los investigadores se han centrado en gran medida en los efectos favorables a la supervivencia de las neurotrofinas y sus receptores en diferentes poblaciones neuronales (revisado en Barde, 1989). Sin embargo, a principios de la década de 1990, varios estudios mostraron que las neurotrofinas también podrían inducir la apoptosis, actuando a través de p75^{NTR}, en varias poblaciones celulares (Barrett et al., 1994; Frade et al., 1996; Beattie et al., 2002). De este modo, las neurotrofinas desempeñan papeles cruciales en la regulación de la supervivencia y la apoptosis en el sistema nervioso

en desarrollo, y en el adulto en respuesta a daño neuronal. Las cuatro neurotrofinas ejercen funciones cruciales en el desarrollo de las neuronas periféricas y su acción está íntimamente ligada a la correcta inervación de los objetivos periféricos. En el sistema nervioso central son prescindibles para la supervivencia neuronal durante el desarrollo, pero mantienen la supervivencia neuronal después de una lesión (Beattie et al., 2002). No obstante, las neurotrofinas también regulan la apoptosis de las neuronas periféricas y centrales después de un daño o durante el desarrollo. En el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados se produce un exceso de neuronas y sólo aquellas que contactan con éxito con las células diana y forman las conexiones apropiadas, reciben soporte trófico y logran sobrevivir, mientras que el resto se eliminan por apoptosis (revisado en Oppenheim, 1991). El uso de las mismas moléculas y receptores en la regulación de la supervivencia y la muerte proporciona el estricto control requerido para esculpir adecuadamente un sistema nervioso funcional.

Formación de los circuitos nerviosos y plasticidad sináptica: papel de BDNF

El BDNF está implicado en prácticamente todas las etapas de la formación de las conexiones neuronales en el sistema nervioso. Regula la supervivencia de las células madre y los

progenitores neurales, la neurogénesis y la diferenciación neuronal, la polarización de las neuronas y la guía de los procesos neuronales, la ramificación y la supervivencia de las neuronas diferenciadas así como la formación y maduración de las espinas dendríticas y las conexiones sinápticas (revisado en Park and Poo, 2013).

En el sistema nervioso adulto, el BDNF modula la plasticidad sináptica en el hipocampo y, por tanto, afecta a las funciones cognitivas del cerebro, incluyendo el aprendizaje y la memoria (Alonso et al., 2002). La plasticidad sináptica se define como un cambio, dependiente de la experiencia, en la potencia de la sinapsis. El ejemplo mejor estudiado de plasticidad es la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *Long-Term Potentiation*), que ha sido generalmente asociada con las neuronas de hipocampo (Bliss et al., 1993). La LTP se puede definir como el fortalecimiento, dependiente de la actividad, de una sinapsis, que típicamente es inducido por la alta frecuencia de estimulación de entradas excitadoras. Numerosos estudios han identificado la importancia de BDNF en el desarrollo tanto de LTP como de recuerdos a largo plazo (Figurov et al., 1996; Kang et al., 1997; Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996; Xu et al., 2000; Alonso et al., 2002; Zakharenko et al., 2003).

Otras funciones de las neurotrofinas

Además, las neurotrofinas regulan el crecimiento axonal y dendrítico, las conexiones sinápticas y la expresión de proteínas cruciales para una correcta función neuronal (como por ejemplo, neurotransmisores o canales iónicos), (revisado en Arévalo and Wu, 2006; Bibel and Barde, 2000; Chao, 2003). Las neurotrofinas son también importantes en los procesos de inflamación y dolor, contexto en el que han sido ampliamente estudiadas durante los últimos 20 años encontrándose una relación directa entre el NGF y la hiperalgesia (Heppenstall and Lewin, 2000; Pezet and McMahon, 2006; Mantyh et al., 2011). Varias neurotrofinas han sido implicadas en los mecanismos centrales que regulan la ingesta de alimentos y el peso corporal así como en los procesos de enfermedad que conducen a la obesidad. En este contexto, el BDNF ha sido descrito como factor de saciedad que participa en los mecanismos homeostáticos del hipotálamo que mantienen el equilibrio nutricional (Lapchak and Hefti 1992; Martin-Iverson et al., 1994; Pellemounter et al., 1995). También se han identificado papeles específicos para BDNF, NT-3, y sus receptores Trk correspondientes, en la formación del corazón y la vasculatura del miocardio (Donovan et al., 1996; Hiltunen et al., 1996; Huber et al., 1996; Tessarollo et al., 1997; Tessarollo, 1998).

EL BDNF EN CONDICIONES PATOLÓGICAS

Cambios en los niveles y la actividad BDNF se han descrito en un gran número de trastornos neurodegenerativos desde principios de la década de 1990. Algunos de estos trastornos se describen a continuación:

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo y fatal que causa una serie de trastornos cognitivos, psiquiátricos y motores (revisado en Walker, 2007). Se trata de una enfermedad de herencia dominante, causada por una expansión inestable de repeticiones CAG dentro de la región codificante de la proteína huntingtina (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Aunque la proteína huntingtina se expresa en el organismo de manera ubicua y es capaz de interactuar con otras muchas proteínas, la HD se limita a las neuronas y más en particular a las neuronas del estriado. El BDNF está involucrado en el desarrollo de la enfermedad humana al reducirse tanto la producción de esta neurotrofina en la corteza, como su liberación al estriado (Gauthier et al., 2004; Zuccato et al., 2001). Aunque el BDNF se distribuye extensamente por el sistema nervioso central de los mamíferos adultos, es particularmente abundante en el hipocampo y en la corteza

cerebral, desde donde se transporta anterógradamente, a través de las conexiones aferentes corticoestriatales, hasta sus dianas estriatales. Es interesante destacar que las neuronas del estriado necesitan BDNF para su supervivencia y para el desarrollo correcto de su actividad (Hofer et al., 1990; Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004; Baydyuk et al., 2014).

La proteína huntingtina está implicada en el control fisiológico de la síntesis de BDNF y su transporte en el cerebro, ya que sustenta la transcripción cortical del gen que codifica el BDNF y dirige en las neuronas la clasificación del BDNF en vesículas. Ambos procesos resultan simultáneamente interrumpidos en HD dando lugar a la muerte neuronal (Zuccato, 2001, Colin, 2008) y este hecho es a menudo citado como una posible razón de la alta vulnerabilidad de las neuronas del estriado en HD. Por estas razones, muchos estudios han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento de HD basadas en la administración de BDNF (Alberch, 2004). Sin embargo, trabajos recientes apuntan que la producción y liberación del BDNF al estriado podrían no estar tan afectadas como se había pensado en un primer momento, y que el déficit de plasticidad podría deberse a una sobreactivación del receptor $p75^{NTR}$, un conocido inhibidor de la señalización de TrkB. Concretamente se ha detectado una disminución en la cantidad de receptores TrkB así como en la activación de la ruta de las MAPK, que

además aparece acompañada de un aumento de receptores $p75^{NTR}$, produciéndose así una descompensación en los sistemas de señalización del BDNF (Ginés et al., 2010, Brito et al., 2013, Plotkin et al., 2014).

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y Atrofia Muscular Espinal (SMA)

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y la atrofia muscular espinal (SMA) representan las dos formas principales de enfermedad de las neuronas motoras. En ambas formas de la enfermedad, la médula espinal y las neuronas motoras se vuelven disfuncionales y degeneran. Los factores neurotróficos modulan la enfermedad de las motoneuronas a varios niveles. Por un lado, desempeñan un papel en la compensación de la pérdida de neuronas motoras en las primeras etapas del brote, mediante la estabilización de las sinapsis neuromusculares, estabilizando axones, y también actuando sobre la supervivencia de las motoneuronas. Por otro lado, la señalización mediada por $p75^{NTR}$ podría contribuir a los mecanismos degenerativos responsables de la denervación de las placas neuromusculares y la destrucción del axón, y posiblemente incluso de la muerte en las etapas posteriores de la enfermedad de las motoneuronas (Caroni, 1997; Frade et al., 1996; Singh et al., 2008; Thoenen and Sendtner, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

Todas las células utilizadas en el desarrollo de esta tesis se han mantenido en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad.

1. Líneas celulares

1.1. Células HEK293 y HEK293FT

HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) es una línea celular obtenida a partir de células embrionarias de riñón humano, de las más utilizadas debido a sus múltiples ventajas, como un rápido crecimiento y gran facilidad de transfección. Estas células se han mantenido en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco™) suplementado con un 10% de suero bovino térmicamente inactivado (BS, Gibco™), 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 a su vez derivan de las HEK293. Están transfectadas de manera estable con el antígeno T del virus SV40 para mejorar la producción de partículas lentivirales. Además de este antígeno, expresan un gen de resistencia a geneticina, por lo se han mantenido con 500 µg/mL de G-418 (Gibco™).

1.2. Células PC12

PC12 es una línea celular derivada de un feocromocitoma de la médula adrenal de rata. Su origen embrionario es la cresta neural y expresan los receptores de neurotrofinas TrkA y P75^{NTR}, además de la proteína adaptadora de dichos receptores, ARMS. Son un modelo de diferenciación muy bien caracterizado ya que en presencia de NGF paran su ciclo celular y se diferencian a fenotipo neuronal, estableciendo conexiones sinápticas funcionales (Greene et al., 1976) y siendo capaces incluso de establecer sinapsis con neuronas corticales en cultivo (Zhou et al, 2006). Estas células contienen vesículas grandes de núcleo denso (LDCVs, del inglés *Large Dense Core Vesicles*) (Tsuboi et al., 2007) además de vesículas sinápticas (Liu et al., 2005), por lo que también han sido ampliamente utilizadas como modelo de célula neurosecretora.

Estas células se han mantenido en placas previamente tratadas con colágeno (1 mg/mL) (BD Bioscience™) y medio RPMI1640 (Lonza™) suplementado con un 10% de suero de caballo inactivado (HS, Gibco™), un 5% de suero bovino fetal inactivado (FBS), 2 mM de L-glutamina y con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

2. Cultivos primarios

El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo cumpliendo las directrices establecidas por la Unión

Europea (2010/63/UE) englobadas en la legislación española (RD 53/2013). Los protocolos utilizados fueron previamente revisados y aprobados por la comisión de Bioética de la Universidad de Salamanca.

2.1. Neuronas de los ganglios raquídeos

Los ganglios raquídeos o DRG (del inglés *Dorsal Root Ganglion*) se encuentran a ambos lados de la médula espinal y están formados por los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales primarias. Durante el desarrollo embrionario y en el momento del nacimiento, el 70-80% de las neuronas sensoriales de los DRG expresan el receptor TrkA y requieren la presencia de NGF para su supervivencia (Smeyne et al., 1994; White et al., 1996).

Las preparaciones de neuronas sensoriales de los DRG se han obtenido a partir de embriones de rata en estadio embrionario E15,5 o de ratón en estadio E13,5. Las hembras gestantes fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. Los embriones se obtuvieron mediante cesárea en condiciones de asepsia y se colocaron en una placa estéril de cultivo con medio L-15 (Gibco™) frío, donde se diseccionaron los DRGs.

Para disgregar el tejido y obtener células individuales, se utilizó tripsina al 0,25 % (Gibco™) a 37°C durante 45 minutos. Las células se sembraron sobre placas tratadas con 0,1 mg/mL de poli-D-lisina (Sigma™) y Matrigel™ (BD Biosciences™), con medio MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco™)

suplementado con 4 g/L de glucosa (Sigma-Aldrich™), 10% de suero bovino fetal térmicamente inactivado (FBS, Gibco™), 2 mM de L-glutamina (Gibco™) y 50 ng/mL mNGF 2.5S (Alomone labs). Al día siguiente de la disección se cambió el medio de plaqueo por medio Neurobasal (Gibco™) suplementado con B27 (Gibco™), 4 g/L de glucosa, 2 mM L-glutamina, 25 U/mL de penicilina, 25 µg/mL de estreptomina (Gibco™), 2,44 µg/mL de 5-fluorodeoxiuridina, 2,44 µg/mL de uridina y 50 ng/mL de NGF.

2.2. Neuronas corticales

El cultivo primario de neuronas corticales es una poderosa herramienta para el aislamiento de los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo neuronal, el envejecimiento y la muerte. Estas células en cultivo expresan los receptores de neurotrofinas TrkB y TrkC.

Las neuronas primarias de corteza se prepararon a partir de embriones de rata en estadio embrionario entre E17,5 y E18,5 o de ratón en estadio E16,5. Los embriones se obtuvieron en condiciones de asepsia de la misma manera que para el cultivo de neuronas de DRG y se colocaron en una placa estéril con una solución salina tamponada fría, que en este caso fue *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* sin calcio ni magnesio (DPBS, Gibco™). Las cortezas diseccionadas se disgregaron en una solución de 0,5 mM EDTA y 0,44 mg/ml de papaína (Worthington™) activada con cisteína (Sigma™) durante 20

minutos a 37°C. La reacción de la papaína se detuvo utilizando una solución con albúmina sérica bovina (Sigma™) e inhibidor de tripsina (Sigma™) en EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*-Sigma™). Las células se plaquearon en placas previamente tratadas con 0,01 mg/mL poli-D-lisina (Sigma™) en medio DMEM/F12 + GlutaMAX (Gibco™) suplementado con un 5% de HS y un 5% de FBS. Al día siguiente de la disección este medio se cambió por Neurobasal (Gibco™) suplementado con NeuroBrew-21 (MACS™).

MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se basa en la obtención de precipitados insolubles que contengan el ADN de interés, para su incorporación a las células. Para ello se mezcla a partes iguales una solución conteniendo el ADN de interés y 0,25 M CaCl₂, con una solución salina de fosfatos 2xHBS (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 15 mM D-Glucosa y 42 mM HEPES). En este trabajo esta técnica se ha empleado para obtener una transfección transitoria en células HEK293 y en la producción de vectores víricos en HEK293-FT.

Lipofectamina 2000™

El reactivo comercial Lipofectamina 2000™ (Invitrogen™) está compuesto por lípidos catiónicos capaces de formar liposomas que engloban el ácido nucleico de interés para su incorporación a la célula mediante fusión con la membrana plasmática. Esta técnica se ha empleado para transfectar las células PC12 siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

GENERACIÓN DE CLONES DE CÉLULAS PC12 TRANSFECTADAS DE MANERA ESTABLE

Para generar líneas celulares que expresaran de manera estable un plásmido de interés, se utilizó una selección positiva por resistencia al antibiótico geneticina. Para ello se incorporó a los plásmidos de interés un gen *neo^R*, que confiere resistencia a neomicina y geneticina, así como un gen codificante para una proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) o RFP (*Red Fluorescent Protein*). Se transfectaron las células PC12 con el plásmido de interés y posteriormente las células transfectadas se plaquearon a una densidad muy baja en presencia del antibiótico geneticina (Gibco™) a una concentración de 500 mg/ml. En estas condiciones las células no transfectadas mueren por el efecto del antibiótico, mientras que las células transfectadas, que expresan la resistencia al antibiótico, sobreviven y proliferan, formando colonias de clones. Cuando

estas colonias alcanzaron un tamaño suficiente, se aislaron y se mantuvieron proliferando hasta establecer la línea celular. Durante este período se redujo la concentración del antibiótico a la mitad, para permitir una mayor proliferación. Asimismo, el medio de cultivo de estas células, incluyó siempre 250 mg/ml de geneticina, para evitar la pérdida o reorganización del plásmido. La expresión del plásmido de interés se verificó en todo momento mediante comprobación de la expresión de la proteína fluorescente correspondiente en el microscopio de fluorescencia así como mediante Western Blot.

WESTERN BLOT

El Western Blot (WB) es una técnica analítica para el estudio de proteínas, descrita por primera vez por Towbin et al., en 1979, que permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. Esta especificidad se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés.

El WB permite estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, y comparar cuantitativamente los niveles de una proteína entre distintas muestras.

Durante este procedimiento las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida compuestos de acrilamida (moléculas que polimerizan para formar cadenas) y bisacrilamida (forma uniones con las cadenas de acrilamida para formar un entramado). Posteriormente las proteínas separadas se transfieren a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Una vez completada esta operación, la proteínas de interés son detectadas en la membrana por la unión de un anticuerpo específico.

En este trabajo se ha empleado la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, utilizando el detergente dodecilsulfato sódico (SDS), que mantiene la linealidad y la uniformidad de carga de las proteínas. Bajo estas condiciones, las proteínas cargadas negativamente, al ser sometidas a un campo eléctrico, migran al electrodo positivo. Debido a que el SDS iguala la carga en todas las proteínas, la tasa de migración viene determinada únicamente por su peso molecular. De este modo, se pueden utilizar diferentes concentraciones de acrilamida para resolver distintos rangos de tamaño, según se describe en la tabla 1.

Las proteínas se extrajeron mediante la incubación de las células o el tejido con un tampón a base de detergentes (NP-40 y TritonX-100) a 4°C. La estructura química de los detergentes permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas. Para evitar que las enzimas proteasas liberadas con la rotura de las células pudieran degradar las proteínas, a este

tampón se añadieron los inhibidores de proteasas descritos en la tabla 2.

Las muestras de proteínas se mezclaron con un tampón de carga específico para condiciones desnaturizantes, cuya composición se detalla en la tabla 3.

TABLA 1:

Porcentaje	Rango Peso Molecular (kDa)
7,5	25-500
10	15-300
12	10-200
15	10-45
20	5-40

La mezcla de los lisados celulares y el tampón de carga se incubó a 95°C durante 5 minutos para asegurar la total desnaturalización de las proteínas. Los geles se prepararon siguiendo la técnica Laemmli, manteniendo dos zonas diferenciadas en el gel: la capa superior o gel de concentración a pH 6,8 y el resto del gel, llamado gel de resolución, a pH 8,8. Dado que la glicina presente en el tampón de electroforesis tiene carga negativa, cuando se aplica un campo eléctrico entra en el gel de concentración alejándose del electrodo negativo. La glicina empieza a perder su carga a pH 6,8 y ralentiza su movimiento de manera que los iones de cloruro avanzan por delante de la glicina. El aumento de la resistencia, obliga a las proteínas a alejarse, de forma apilada, del electrodo negativo, y se separan según su peso molecular. El tampón utilizado durante la electroforesis, contiene Tris (mantiene el pH),

TABLA 2:

Compuesto	Actividad	Concentración
Aprotinina	Inhibidor de proteasas de Serina	1 µg/mL
Leupeptina	Inhibidor de proteasas de Serina y Cisteína	2 µg/mL
Ortovanadato sódico	Inhibidor de fosfatasa de Tirosina	1 mM
PMSF	Inhibidor de proteasas de Serina	1 mM
β-glicerofosfato	Inhibidor de fosfatasa de Serina y Treonina	10 mM
NaF	Inhibidor de fosfatasa de Serina y Treonina	10 mM

TABLA 3:

Reactivo	Propósito
Glicerol	Aporta viscosidad y densidad para arrastrar la muestra al fondo del pocillo y evitar que se extienda a los pocillos adyacentes.
Azul de Bromofenol	Molécula colorante pequeña: <ul style="list-style-type: none"> - Da color a la muestra para ayudar a la carga. - Migra por delante de las proteínas, de modo que se puede hacer el seguimiento del movimiento de las muestras en el gel.
SDS	Detergente desnaturizante <ul style="list-style-type: none"> - Cola hidrofóbica que rodea la esqueleto peptídico. - Unión a la proteína de forma regular, aportando carga negativa de forma proporcional al tamaño de la proteína. - Evita las interacciones hidrofóbicas y rompe los enlaces de hidrógeno. - Destruye la estructura secundaria/ terciaria y lineariza la proteína.
Beta Mercaptoetanol	Agente reductor <ul style="list-style-type: none"> - Evita la oxidación de cisteínas. - Completan la linearización de la proteína al romper los puentes disulfuro.
Tampón Tris	Mantiene el pH adecuado

Glicina (conductor eléctrico) y SDS (mantiene las proteínas cargadas negativamente).

Una vez terminada la electroforesis las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de

polifluoruro de vinilideno (PVDF), un polímero termoplástico altamente inerte que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así su inmunodetección. Previamente a la transferencia, tanto el gel como la membrana se equilibraron

en una solución tamponada de transferencia fría. El tampón de transferencia contiene Tris, Glicina y metanol (necesario para la activación de la membrana de PVDF).

Tras finalizar la transferencia las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo diseñada para reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo. Para ello, utilizamos un 3% de albúmina de suero bovino (BSA) diluida en tampón tris salino (TBS) con un 0,1% del detergente Tween-20 (Sigma™) (TBST). Después del proceso de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en solución de bloqueo, durante toda una noche, en agitación suave y a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a la eliminación del excedente mediante el tampón de lavado TBST y a la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. El anticuerpo secundario se utilizó diluido a la concentración adecuada en tampón TBST con un 5% de leche en polvo desnatada. La función de la leche en polvo sería en este caso la misma que la de la BSA, es decir, proporcionar una alta concentración de proteínas para ocupar los lugares de unión no específicos al anticuerpo. El anticuerpo secundario se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente y se procedió, al igual que en la etapa anterior, a la eliminación del exceso de anticuerpo mediante lavados con tampón TBST.

La detección de los complejos anticuerpo-proteína se realizó mediante quimioluminiscencia, añadiendo a la membrana un sustrato a base de luminol que, en contacto con la enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, produce luminiscencia detectable mediante la exposición de películas radiográficas (Fuji Film corporation) o mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia (MicroChem 4.2, Berthold Technologies).

En este trabajo se han empleado los anticuerpos primarios descritos en la tabla 4.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford implica la formación de un complejo coloreado mediante la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie a las proteínas. Este colorante presenta dos formas coloreadas, azul y roja. Cuando el colorante se une a la proteína el color rojo pasa a azul, lo que provoca un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm que se detecta midiendo el incremento en la absorción a 595 nm. Para poder calcular la concentración de una muestra en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, extrapolamos los valores de absorbancia sobre una recta patrón realizada con distintas cantidades conocidas de proteína, en este caso, BSA.

TABLA 4:

Anticuerpo	Información
ARMS	Monoclonal generado en ratón descrito previamente (Bracale et al., 2007) y policlonal generado en conejo y purificado en este trabajo, empleando un epítipo de la región C-terminal de ARMS descrito en Kong, 2001.
Sinembrina	Policlonal generado en conejo contra la región C-terminal de Sinembrina-B y purificado en este trabajo.
GAPDH	Monoclonal generado en ratón (Sigma-Aldrich).
Actina beta	Monoclonal generado en ratón (Sigma-Aldrich).
Tubulina beta III	Policlonal generado en conejo (Sigma-Aldrich).
p44/42 MAPK	Policlonal generado en conejo (Cell Signaling).
p44/42 MAPK-fosfato	Monoclonal generado en ratón (Cell Signaling).
Akt	Monoclonal generado en ratón (Santa Cruz Biotechnology).
Akt1/PKB α -fosfato (Ser473)	Monoclonal generado en ratón (Upstate).
Rac1	Monoclonal generado en ratón (Cell Signaling y BD Transduction Laboratories).
RhoA	Monoclonal generado en conejo (Cell Signaling).
Flag	Policlonal generado en conejo (Sigma-Aldrich).
GFP	Monoclonal generado en ratón (Clontech).
BDNF	Monoclonal obtenido y purificado en este trabajo, a partir del hibridoma BDNF #1 (Developmental Studies Hybridoma Bank) descrito en Kolbeck et al., 1999.

REFERENCIAS

A

Alberch J, Pérez-Navarro E, Canals JM. (2004) Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res.* 146:195-229.

Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. (2002) Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 22: 663–674.

Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856–860.

Amino S, Itakura M, Ohnishi H, Tsujimura J, Koizumi S, Takei N, Takahashi M (2002) Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca²⁺-responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biochem. Jun*;131(6):887-94.

Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M. (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 713-719.

Aravind, L., L. M. Iyer, D.D. Leipe, and E. V. Koonin. (2004) A Novel Family of P-loop NTPases with an Unusual Phyletic Distribution and Transmembrane Segments Inserted within the NTPase Domain. *Genome Biology* 5.5: R30.

Arévalo JC, Conde B, Hempstead BI, Chao MV, Martín-Zanca D, Perez P (2001) A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20: 1229-1234

Arévalo 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

Arévalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV. (2006) Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 13;281(2):1001-7

Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63: 1523-1537

Arevalo JC, Wu SH, Takahashi T, Zhang H, Yu T, Yano H, Milner TA, Tessarollo L, Ninan I, Arancio O, Chao MV. (2010) The ARMS/Kidins220 scaffold protein modulates synaptic transmission. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 92-100.

Aspenström P, Fransson A, Saras J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J. Jan* 15;377(Pt 2):327-37.

B

Bader MF, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S. (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta*;1742:37–49.

Baquet, Z.C., Gorski, J.A., Jones, K.R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24, 4250–4258.

Barde, Y. A., Edgar, D. & Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553

Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2(6):1525–1534

Barrett GL, Bartlett PF (1994) The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (14):6501–6505

Bassani, S., Valnegri, P., Beretta, F. and Passafaro, M. (2009) The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience* 158, 55-61.

Bastiani CA, Gharib S, Simon MI, Sternberg PW. (2003) *Caenorhabditis elegans* Galphaq regulates egg-laying behavior via a PLCbeta-independent and serotonin-dependent signaling pathway and likely functions both in the nervous system and in muscle. *Genetics.* 165(4):1805-22.

Bateman, J. and Van Vactor, D. (2001) The Trio family of guanine-nucleotide exchange factors: regulators of axon guidance. *J. Cell Sci.* 114, 1973-1980

Bath KG, Akins MR, Lee FS (2012) BDNF control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Psychobiol. Sep*;54(6):578-89.

- Baydyuk M, Xu B. *BDNF signaling and survival of striatal neurons* (2014) *Front Cell Neurosci*; 28;8:254.
- Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36(3):375–386
- Bellanger JM, Lazaro JB, Diriong S, Fernandez A, Lamb N, Debant A. (1998) The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways in vivo. *Oncogene*; 16:147-52
- Bellanger JM, Estrach S, Schmidt S, Briçon-Marjollet A, Zugasti O, Fromont S, Debant A (2003) Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell. Dec*;95(9):625-34.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* Nov;7(5):857-66.
- Berry A, Bellisario V, Capoccia S, Tirassa P, Calza A, Alleva E, Cirulli F (2012) Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* 37: 762–772.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-2937
- Blangy A, Vignal E, Schmidt S, Debant A, Gauthier-Rouvière C, Fort P. (2000) TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci*; 113:729-39;
- Bliss TV, Collingridge GL. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–39.
- Blumer JB, Cismowski MJ, Sato M, Lanier SM (2005) AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends Pharmacol Sci. Sep*;26(9):470-6.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell. Jun* 1;129(5):865-77.
- Bothwell MA, Shooter EM (1977) Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem* 252:8532–8536
- Bouquier N, Vignal E, Charrasse S, Weill M, Schmidt S, Léonetti JP, Blangy A, Fort P (2009) A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol. Jun* 26;16(6):657-66.
- Bracale, A., F. Cesca, V. E. Neubrand, T. P. Newsome, M. Way, and G. Schiavo (2007) Kidins220/ARMS Is Transported by a Kinesin-1-based Mechanism Likely to Be Involved in Neuronal Differentiation. *Molecular Biology of the Cell* 18.1: 142-52.
- Brito V, Puigdel·l·ivol M, Giral·t A, del Toro D, Alberch J, Gin·es S. (2013) Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis. Apr* 18;4:e595.
- Brito V, Giral·t A, Enriquez-Barreto L, Puigdel·l·ivol M, Suelves N, Zamora-Moratalla A, Ballesteros JJ, Mart·in ED, Dom·inguez-Iturza N, Morales M, Alberch J, Gin·es S. (2014) Neurotrophin receptor p75(NTR) mediates Huntington's disease-associated synaptic and memory dysfunction. *J Clin Invest. Oct*;124(10):4411-28.
- Bronfman, F. C. and Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* 5, 867-871.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond 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
- Buck, L., Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Bueker, E.D. (1948) Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. *Anat. Rec.*, 102, 369-390.

C

- Cabrera-Poch N, S·anchez-Ruiloba L, Rodr·iguez-Mart·inez M, Iglesias T (2004) Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem. Jul* 2;279(27):28592-602.

- Cajal, S. Ramón y. (1890) A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière du poulet? *Anat. Anz.* 5 (Nr. 21 and 22): 609-613, 631-639.
- Cajal, S. Ramón y. (1892) La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9: 121-133.
- Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., Thoenen, H., (1997) Neurotrophin release by neurotrophins: implications or activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13279–13286.
- Caroni P (1997) Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* 19:767–775
- Castrén E. (2014) Neurotrophins and psychiatric disorders *Handb Exp Pharmacol.* 220:461-79. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_17.
- Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, and Barker PA. (2014). Neurotrophins in the Regulation of Cellular Survival and Death. *Neurotrophic Factors, Handbook of Experimental Pharmacology Volume 220:* 193-194, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cesca F, Yabe A, Spencer-Dene B, Scholz-Starke J, Medrihan L, Maden CH, Gerhardt H, Orriss IR, Baldelli P, Al-Qatari M, Koltzenburg M, Adams RH, Benfenati F, Schiavo G (2012). Kidins220/ARMS mediates the integration of the neurotrophin and VEGF pathways in the vascular and nervous systems. *Cell Death Differ.* Feb;19(2):194-208.
- Chan PY, Gabay M, Wright FA, Tall GG. (2011) Ric-8B is a GTP-dependent G protein as guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 286:19932–19942.
- Chang, M. S., Arevalo, J. C. and Chao, M. V. (2004) Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J. Neurosci Res.* 78, 186–192.
- 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
- Chao MV. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* Apr;4(4):299-309.
- Chen Y, Fu WY, Ip JP, Ye T, Fu AK, Chao MV, Ip NY (2012). Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein (kidins220) is required for neurotrophin and ephrin receptor-dependent dendrite development. *J Neurosci.* 2012 Jun 13;32(24):8263-9.
- Cesca, F., Yabe, A., Spencer-Dene, B., Scholz-Starke, J., Medrihan, L., Maden, C. H., Gerhardt, H., Orriss, I. R., Baldelli, P., Al-Qatari, M. et al. (2012). Kidins220/ARMS Mediates the Integration of the Neurotrophin and VEGF Pathways in the Vascular and Nervous Systems. *Cell Death Differ.*, 2, 194-208.
- Cohen, S., Levimontalcini, R. & Hamburger, V. A. (1954). Nerve growth stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 40, 1014–1018.
- Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pagès M, Li XJ, Saudou F, Humbert S. (2008) Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/ retrograde transport in neurons. *EMBO J.* Aug 6;27(15):2124-34.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* Apr 1;17(7):2295-313.
- Constantine-Paton, M. and Cline, H. T. (1998)LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 139-148.
- 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
- Cortes, R. Y., Arevalo, J. C., Magby, J. P., Chao, M. V. and Plummer, M. R. (2007) Developmental and activity-dependent regulation of ARMS/Kidins220 in cultured rat hippocampal neurons. *Dev. Neurobiol.* 67, 1687-1698
- Cotman CW, Berchtold NC. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25: 295–301.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci.* 9;3:1.

D

- da Silva, J. S. and Dotti, C. G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritegenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 694-704.

- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W. and Greenberg, M. E. (2000)** EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945-956.
- 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
- Debant A, Serra-Pagès C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH, Streuli M. (1996)** The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93:5466-71.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA. (2012)** BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol. Mar* 19;196(6):775-88.
- Dickson, B. J. (2001)** Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 103-110.
- Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL (1996)** Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 14:210-213
- Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL (2000)** Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127:4531-4540
- Duffy, A. M., Schaner, M. J., Wu, S. H., Staniszewski, A., Kumar, A., Arevalo, J. C., Arancio, O., Chao, M. V. and Scharfman, H. E. (2011)** A selective role for ARMS/ Kidins220 scaffold protein in spatial memory and trophic support of entorhinal and frontal cortical neurons. *Exp. Neurol.* 229, 409-420.
- E**
- 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
- Estrach, S., Schmidt, S., Diriong, S., Penna, A., Blangy, A., Fort, P. and Debant, A. (2002)** The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr. Biol.* 12, 307-312.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002)**Rho GTPases in cell biology. *Nature.* Dec 12;420(6916):629-35.
- F**
- Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. (2000)** Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* Jun 1;20(11):4059-68.
- Fields, S. and Song, O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246
- Figuroa M, Hinrichs MV, Bunster M, Babbitt P, Martinez-Oyanedel J, Olate J. (2009)** Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. *Protein Sci.* 18(6):1139-45.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. (1996)** Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381: 706-709.
- Fitzgerald, M., Buckley, A., Lukehurst, S. S., Dunlop, S. A., Beazley, L. D. and Rodger, J. (2008)** Neurite responses to ephrin-A5 modulated by BDNF: evidence for TrkB-EphA interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 625-630.
- Frade JM, RodriguezTebar A, Barde YA (1996)** Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168

Frantz C, Coppola T, Regazzi R (2002) Involvement of Rho GTPases and their effectors in the secretory process of PC12 cells. *Exp Cell Res*. Feb 15;273(2):119-26.

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

Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 20: 6340-6346

G

Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*. Jul 9;118(1):127-38.

Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader MF (2004) Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42 / NWASP- induced actin filaments. *Mol Biol Cell*;15:520-31.

Ge, Y., Dong, Z., Bagot, R. C., Howland, J. G., Phillips, A. G., Wong, T. P. and Wang, Y. T. (2010) Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21;107(38):16697-702.

Ginés S, Paoletti P, Alberch J. (2010) Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in huntington disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression. *J Biol Chem*. 285(28):21537-48.

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

Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. (2005) Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 255: 381-386.

Govek, E. E., Newey, S. E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*. 19, 1-49.

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*. Jul;73(7):2424-8.

Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gärtner A, Hoener MC, Nawa H, Kolbeck R, Thoenen H. (1999) Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech*. May 15-Jun 1;45(4-5):262-75.

Gutkind, J.S., Novotny, E.A., Brann, M.R., and Robbins, K.C. (1991) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4703-4707.

Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) *Cdi1*, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.

H

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, B. J. and Ghosh, A. (2008) Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci*. 31, 82-89.

Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* May;6(5):845-58.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 82:26-34.

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*. Apr 25;350(6320):678-83.

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

- Hempstead BL (2006)** Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* 3: 19-24
- Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C. and Pawson, T. (2001)** The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA dependent synaptic function. *Neuron* 32, 1041-1056.
- Hepler JR, Gilman AG (1992)** G proteins. *Trends Biochem Sci*. Oct;17(10):383-7.
- Heppenstall PA, Lewin GR (2000)** Neurotrophins, nociceptors and pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 13:573-576
- Hibbert AP, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. (2003)** Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. Nov 28;278(48):48129-36.
- Higgins, C. F., M. P. Gallagher, M. L. Mimmack, and S. R. Pearce. (1988)** A Family of Closely Related ATP-binding Subunits from Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *BioEssays* 8.4: 111-16.
- Higuero, A. M., L. Sanchez-Ruiloba, L. E. Doglio, F. Portillo, J. Abad-Rodriguez, C. G. Dotti, and T. Iglesias. (2010)** Kidins220/ARMS Modulates the Activity of Microtubule-regulating Proteins and Controls Neuronal Polarity and Development. *Journal of Biological Chemistry* 285.2: 1343-357.
- Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M, Saarma M (1996)** Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res* 79:930-939
- Hinrichs MV, Torrejón M, Montecino M, Olate J (2012)** Ric-8: different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *J Cell Biochem. Sep*;113(9):2797-805.
- Hisata, S., T. Sakisaka, T. Baba, T. Yamada, K. Aoki, M. Matsuda, and Y. Takai. (2007)** Rap1-PDZ-GEF1 Interacts with a Neurotrophin Receptor at Late Endosomes, Leading to Sustained Activation of Rap1 and ERK and Neurite Outgrowth. *The Journal of Cell Biology* 178.5: 843-60.
- Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., Barde, Y.A. (1990)** Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 9, 2459-2464.
- 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 Mar* 22;344(6264):339-41.
- Holmes DS, Quigley M (1981)** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet 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
- Huang EJ, Reichardt LF. (2003)** Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-42. *Epub* 2003 Mar 27.
- Huber LJ, Hempstead B, Donovan MJ (1996)** Neurotrophin and neurotrophin receptors in human fetal kidney. *Dev Biol* 179:369-381
- Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D. and Cloutier, J. F. (2003)** Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci* 26, 509-563.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993)** *Cell* 72, 971-983.

I

Iglesias, T., N. Cabrera-Poch, MP Mitchell, and TJ Naven. (2000) Identification and Cloning of Kidins220, a Novel Neuronal Substrate of Protein Kinase D. *Journal of Biological Chemistry* 275.51: 40048-0056.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-8.

Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Squinto SP, et al. (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr 1;89(7):3060-4.

J

Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*;7:631-43.

Jones KR, Reichardt LF. (1990) Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct;87(20):8060-4.

K

Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blanas MA (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*. Jul 24;70(2):351-64.

Kalincic G, Nazari A, Hermouet S, Xu N, and Gutkind J.S. (1992) Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4687-4693.

Kang H, Welcher AA, Shelton D, Schuman EM. (1997) Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19: 653-664.

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

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

Katoh H, Yasui H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M (2000) Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol*. Oct;20(19):7378-87.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*. 14(2):231-41.

Kelly RB. Pathways of protein secretion in eukaryotes (1985) *Science* Oct 4;230(4721):25-32.

Kemp, A. and Manahan-Vaughan, D. (2007) Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* 30, 111-118.

Kisseberth WC, Brettingen NT, Lohse JK, Sandgren EP. (1999) Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev Biol*. Oct 1;214(1):128-38.

Klattenhoff C, Montecino M, Soto X, Guzmán L, Romo X, García MD, Mellstrom B, Naranjo JR, Hinrichs MV, Olate J. (2003) Human synembryon interacts with *Gscα* and *Gqα* and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J Cell Physiol* 195:151-157.

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

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. (2009) Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat. Neurosci.* 12, 15-20.

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

Kolb, B., Gibb, R. (2011) Brain Plasticity and Behaviour in the Developing Brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*.20 (4). 265-276

Kolbeck, R., Bartke, I., Eberle, W., and Barde, Y.-A. (1999) Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J. Neurochem.* 72, 1930-1938.

Kong, H., J. Boulter, J.L Webber, C. Lai, and MV Chao. (2001) An Evolutionarily Conserved Transmembrane Protein That Is a Novel Downstream Target of Neurotrophin and Ephrin Receptors. *Journal of Neuroscience* 21.1176-85.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8856-8860.

Kruttgen A., Moller, J.C., Heymach Jr., J.V., Shooter, E.M., (1998) Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9614-9619.

L

- Lackner MR, Nurrish SJ, Kaplan JM (1999)** Facilitation of synaptic transmission by EGL-30 Gα_q and EGL-8 PLCβ: DAG binding to UNC-13 is required to stimulate acetylcholine release. *Neuron*. Oct;24(2):335-46.
- 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
- Lapchak PA, Hefti F (1992)** BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport* 3:405-408
- Lai, K. O. and Ip, N. Y. (2009)** Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 275-283.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001)** Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. Nov 30; 294 (5548): 1945-8.
- 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
- Levi-Montalcini, R. (1987)** The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *The EMBO Journal* vol.6 no.5 pp. 1 145-1 154.
- 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*. Sep 14;341(6238):149-52.
- Li J, Chen LA, Townsend CM Jr, Evers BM (2008)** PKD1, PKD2, and their substrate Kidins220 regulate neurotensin secretion in the BON human endocrine cell line. *J Biol Chem*. Feb 1;283(5):2614-21.
- Liao, Y.H., S.M. Hsu, and P.H. Huang. (2007)** ARMS Depletion Facilitates UV Irradiation Induced Apoptotic Cell Death in Melanoma. *Cancer Research* 67.24: 11547-1556.
- Liao, Y. H., Hsu, S. M., Yang, H. L., Tsai, M. S. and Huang, P. H. (2011)** Upregulated ankyrin repeat-rich membrane spanning protein contributes to tumour progression in cutaneous melanoma. *Br. J. Cancer* 104, 982-988.
- Liu TT, Kishimoto T, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N, Kasai H. (2005)** Exocytosis and endocytosis of small vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol*. Nov 1;568(Pt 3):917-29.
- López-Menendez, C., S. Gascon, M. Sobrado, O. G. Vidaurre, A. M. Higuero, A. Rodriguez-Pena, T. Iglesias, and M. Diaz-Guerra. (2009)** Kidins220/ARMS Downregulation by Excitotoxic Activation of NMDARs Reveals Its Involvement in Neuronal Survival and Death Pathways. *Journal of Cell Science* 122.19: 3554-565.
- Luo, S., Chen, Y., Lai, K. O., Arevalo, J. C., Froehner, S. C., Adams, M. E., Chao, M. V. and Ip, N. Y. (2005)** {alpha}-Syntrophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. *J. Cell Biol.* 169, 813-824.
- Luo S1, Mizuta H, Rubinsztein DC. (2008)** p21-activated kinase 1 promotes soluble mutant huntingtin self-interaction and enhances toxicity. *Hum.Mol.Genet.* 17, 895-905.

M

- Ma J, Ptashne M. (1987)** Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*. Jul 3;50(1):137-42.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. (1990)** Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* Mar 23;247(4949 Pt 1):1446-51.
- Malacombe M, Ceridono M, Calco V, Chasserot-Golaz S, McPherson PS, Bader MF, Gasman S (2006)** Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *EMBO J*;25:3494-503.
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH (2008)** Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci*;65:2814-32.
- Man, H. Y. (2011)** GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors--inducers of plasticity? *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 291-298.
- Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL (2011)** Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. *Anesthesiology* 115:189-204
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002)** Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35: 65-76

- Marler, K. J., Becker-Barroso, E., Martinez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J. and Drescher, U. (2008)** A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 28, 12700-12712.
- Marshall CJ (1995)** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185
- Martin-Iverson MT, Todd KG, Altar CA (1994)** Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *J Neurosci* 14:1262-1270
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986-a)** 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 (1986-b)** Molecular characterization of the human *trk* oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 2: 983-992
- Martinez, A., Alcantara, S., Borrell, V., Del Rio, J. A., Blasi, J., Otal, R., Campos, N., Boronat, A., Barbacid, M., Silos-Santiago, I. and Soriano, E. (1998)** TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J. Neurosci.* 18, 7336-7350
- Martinowich K, Manji H, Lu B. (2007)** New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* (9):1089-93.
- McKinney, R. A. (2010)** Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J. Physiol.* 588, 107-116.
- Meakin SO, MacDonald JI, 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
- Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johson CD, Rand JB. (1996)** A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12593-12598.
- Miller KG, Emerson MD, Rand JB (1999)** Gqalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in *C. elegans*. *Neuron.* Oct;24(2):323-33.
- Miller KG, Rand JB. (2000)** A role for RIC-8 (synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156:1649-1660.
- Milligan G, Kostenis E (2006)** Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* Jan;147 Suppl 1:546-55.
- Miyazaki, T., Yamasaki, M., Uchigashima, M., Matsushima, A., and Watanabe, M. (2011)** Cellular expression and subcellular localization of secretogranin II in the mouse hippocampus and cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 33, 82-94.
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader MF, Gasman S (2009)** betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J Cell Sci*;122:798-806.
- Monfils MH, Cowansage KK, LeDoux JE. (2007)** Brain-derived neurotrophic factor: linking fear learning to memory consolidation. *Mol Pharmacol.* 72: 235-237.
- Mori Y, Higuchi M, Hirabayashi Y, Fukuda M, Gotoh Y. (2008)** JNK phosphorylates synaptotagmin-4 and enhances Ca²⁺-evoked release. *EMBO J.* Jan 9;27(1):76-87.
- Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA. (1999)** Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci.* Mar 15;19(6):2069-80.

N

- Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H (2010)** Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *J Biol Chem.* Apr 9;285(15):11114-20
- Neubrand, V. E., C. Thomas, S. Schmidt, A. Debant, and G. Schiavo. (2010)** Kidins220/ARMS Regulates Rac1-dependent Neurite Outgrowth by Direct Interaction with the RhoGEF Trio." *Journal of Cell Science* 123.12:2111-23.

Newton, A.C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353–2364

Nikolic M (2002) The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* Jul;34(7):731-45.

Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G (2002) Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem.* Sep 27;277(39):35840-6.

Nusser N, Gosmanova E, Makarova N, Fujiwara Y, Yang L, Guo F, Luo Y, Zheng Y, Tigyi G (2006) Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell Signal.* May;18(5):704-14

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

O

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

Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI (2009) The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 3;106(5):1484-9.

Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501

Ory S, Gasman S (2011) Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links? *Semin Cell Dev Biol.* Feb;22(1):27-32.

P

Park, H. J., Park, H. W., Lee, S. J., Arevalo, J. C., Park, Y. S., Lee, S. P., Paik, K. S., Chao, M. V. and Chang, M. S. (2010) Ankyrin repeat-rich membrane spanning/Kidins220 protein interacts with mammalian Septin 5. *Mol. Cells* 30, 143–148.

Park H, Poo MM. (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 14(1):7-23.

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol Jun*;11(3):272-80.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16: 1137–1145.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Wellman CL (1995) Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol* 131:229–238

Pezet S, McMahon SB (2006) Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 29:507–538

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep;3(9):639-50.

Plotkin JL, Day M, Peterson JD, Xie Z, Kress GJ, Rafalovich I, Kondapalli J, Gertler TS, Flajolet M, Greengard P, Stavarache M, Kaplitt MG, Rosinski J, Chan CS, Surmeier DJ. (2014) Impaired TrkB receptor signaling underlies corticostriatal dysfunction in Huntington's Disease. *Neuron.* 2014. 83, 178–188

Poo, M. M. (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24-32.

Poulain, F. E. and Sobel, A. (2009) The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol. Cell Neurosci.* 43, 15-32.

R

Radziejewski C, Robinson RC, DiStefano PS, Taylor JW (1992) Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry* 31:4431–4436

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

- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. Jul 19;477(7366):549-55.
- Ren J, Guo W. (2012) ERK1/2 regulate exocytosis through direct phosphorylation of the exocyst component Exo70. *Dev Cell*. May 15;22(5):967-78.
- Reynolds NK, Schade MA, Miller KG (2005) Convergent, RIC-8-dependent Galpha signaling pathways in the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics*. Feb;169(2):651-70.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:281-312.
- Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. Oct;16(10):522-9.
- Rogers DA, Schor NF (2013) Kidins220/ARMS depletion is associated with the neural-to Schwann-like transition in a human neuroblastoma cell line model. *Exp Cell Res*. Mar 10;319(5):660-9.
- Rogers DA, Schor NF (2013) Kidins220/ARMS is expressed in neuroblastoma tumors and stabilizes neurotrophic signaling in a human neuroblastoma cell line. *Pediatr Res*. Nov;74(5):517-24.
- Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J (2007) Galpha directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. Oct 5;282(40):29201-10
- Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, Ramirez A, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J. (2008) xRic-8 is a GEF for Gscx and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Physiol* 214:673–680.
- Ronnett, G.V., Moon, C., (2002) G proteins and olfactory signal transduction. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 189–222.
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW. (1990) Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* May;4(5):767-73.
- Ross CA (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35:819-822.
- Rozengurt, E. (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J. Cell. Physiol.* 213, 589–602.
- Rydell RE, Greene LA. (1987) Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J Neurosci.* 7(11):3639-53.
- Sánchez-Fernández G, Cabezedo S, García-Hoz C, Benincá C, Aragay AM, Mayor F Jr, Ribas C (2014) Gαq signalling: the new and the old. *Cell Signal*. May;26(5):833-48.
- Schmidt S, Debant A. (2011) TRIO (triple functional domain (PTPRF interacting)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*; 15:490-8
- Schmidt S, Debant A. (2014) Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio, Small GTPases, 5:4, 1-10, DOI: 10.4161/sgtp.29769
- Sebök A, Nusser N, Debrecei B, Guo Z, Santos MF, Szeberenyi J, Tigyi G (1999) Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *J Neurochem*. Sep;73(3):949-60.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J*. Mar 15;314 (Pt 3):951-60.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. May 10;252(5007):802-8.
- Singh KK et al (2008) Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR dependent axon degeneration. *Nat Neurosci* 11:649–658

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-1281

Sotelo, C (2004) History of Neuroscience: The Neurotropic Theory of Santiago Ramón y Cajal, *IBRO History of Neuroscience*.

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*. Mar 17;368(6468):246-9.

Sniderhan, L.F., A. Stout, Y. Lu, M.V. Chao, and S.B. Maggirwar. (2008) Ankyrin-rich Membrane Spanning Protein Plays a Critical Role in Nuclear Factor- κ B Signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 38.3: 404-16.

Soriano P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*. Jan;21(1):70-1.

Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, Oprian DD, Schertler GF (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*. Mar 31;471(7340):656-60.

Sugita S (2004) Human growth hormone co-transfection assay to study molecular mechanisms of neurosecretion in PC12 cells. *Methods*. Aug;33(4):267-72

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

T

Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K, Kobori M (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem*. Nov 12; 279(46): 47438-45.

Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. and Takiguchi, K. (2009) Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol*. 19, 140-145.

Tall GG, Krumins AM, Gilman AG. (2003) Mammalian Ric-8A (*Synembryn*) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278:8356-8362

Tau, G.Z., Peterson, B.S. (2010) Normal Development of Brain Circuits *Neuropsychopharmacology* 35. 147-168

Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, Palko ME, Blair-Flynn J, Hempstead BL, Parada LF (1997) Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14776-14781

Tessarollo L (1998) Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:125-137

Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5(Suppl):1046-1050

Tourette C, Li B, Bell R, O'Hare S, Kaltenbach LS, Mooney SD, Hughes RE (2014) A large scale Huntingtin protein interaction network implicates Rho GTPase signaling pathways in Huntington disease. *J. Biol.Chem*. 289, 6709-6726

Towbin, H. et. al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.

Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1317-26.

Tsuboi T, Fukuda M. (2007) Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes Cells*. Apr;12(4):511-9.

V

van der Geer P, Pawson T (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20: 277-280

Vaqué JP, Dorsam RT, Feng X, Iglesias-Bartolome R, Forsthoefel DJ, Chen Q, Debant A, Seeger MA, Ksander BR, Teramoto H, Gutkind JS (2013) A genome-wide RNAi screen reveals a Trio-regulated Rho GTPase circuitry transducing mitogenic signals initiated by G protein-coupled receptors. *Mol Cell*. Jan 10;49(1):94-108.

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

Verhage M, Sorensen JB (2008) Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic*;9:1414-24.

von Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M. (1996) Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature*. Feb 29;379(6568):830-3.

von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Gaolf. *The J Neurosci* 25:3793-3800.

W

Walker, F. O. (2007) Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228

Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci*. Jun;27(6):317-23

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

White FA, Silos-Santiago I, Molliver DC, Nishimura M, Phillips H, Barbacid M, Snider WD. (1996) Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci*. Aug 1;16(15):4662-72.

Williams SL, Lutz S, Charlie NK, Vettel C, Ailion M, Coco C, Tesmer JJ, Jorgensen EM, Wieland T, Miller KG. (2007) Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Galpha q effector in *C. elegans*. *Genes Dev* 21:2731-46.

Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*. Aug . 77(16):8957-61.

Wick PF, Senter RA, Parsels LA, Uhler MD, Holz RW. (1993) Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J Biol Chem*. May 25;268(15):10983-9.

Wu C, Lai CF, Mobley WC (2001) Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 21: 5406-5416

Wu, S.H., J.C. Arévalo, F. Sarti, L. Tessarollo, W.B. Gan, and M.V. Chao. (2009) Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 Protein Regulates Dendritic Branching and Spine Stability in Vivo. *Developmental Neurobiology* 69.9: 547-57.

Wu, S. H., Arevalo, J. C., Neubrand, V. E., Zhang, H., Arancio, O. and Chao, M. V. (2010) The ankyrin repeat-rich membrane spanning (ARMS)/Kidins220 scaffold protein is regulated by activity-dependent calpain proteolysis and modulates synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* 285, 40472-40478.

X

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

Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. (2000) The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci* 20: 6888-6897.

Y

Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Aoki J, Nakamura K, Negishi M (2000) Galpha(12) and galpha(13) inhibit Ca(2+)-dependent exocytosis through Rho/Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Neurochem*. Aug;75(2):708-17.

Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M (2001) RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. Jun 1;276(22):18977-83.

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 F, Je HS, Ji Y, Nagappan G, Hempstead B, Lu B. (2009) Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *J Cell Biol.* May 18;185(4):727-41. doi: 10.1083/jcb.200811147.

Yoon SO, Casaccia-Bonnett 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, 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

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

Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., and Wigler, M. (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45, 711-719.

Yu, T., Calvo L., Anta B., López-Benito S., Southon E., Chao MV., Tessarollo L., and Arévalo JC. (2011) Regulation of Trafficking of Activated TrkA Is Critical for NGF-Mediated Functions. *Traffic* 12.4: 521-34.

Z

Zafra-Ruano A, Luque I. (2012) Interfacial water molecules in SH3 interactions: Getting the full picture on polyproline recognition by protein-protein interaction domains. *FEBS* 14;586(17):2619-30.

Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. (2003) Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39: 975-990.

Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 15;94(8):3789-94.

Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002) FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* 80: 1049-1061

Zhou XF, Rush RA. (1996) Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience.* Oct;74(4):945-53.

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 T, Xu B, Que H, Lin Q, Lv S, Liu S (2006) Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with primary neurons from rat cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2006;66(2):105-12.

Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:217-247.

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.* Jul 20;293(5529):493-8.

Zuccato C and Cattaneo E. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology* 81 294-330

