

# Desubiquitinasas moduladoras de receptores Trk

Carlos Martín Rodríguez

Salamanca

2019



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Juan Carlos la oportunidad que me ha dado de trabajar en su laboratorio. Porque desde el principio ha sabido guiarme y se ha preocupado de que esta tesis llegue a buen puerto. Por la perseverancia y la paciencia demostrada y transmitida.

A todo el laboratorio 13, porque de todos he aprendido algo y habéis hecho que cada día haya sido un placer ir al laboratorio. A Bego, mi mentora, que siendo un novatín me adoptó como su padawan y me enseñó todo lo que tenía que saber. A Laurita y Saray, porque las horas que pasamos compartiendo campana me ayudaron a ver el mundo con otros ojos. A Cris, que siempre ha estado ahí para echar una mano en todo lo posible. A Julia, por su optimismo y su energía que en alguna ocasión ha conseguido contagiarme. A Laura, porque siendo los dos muy reservados, con el tiempo bajamos la guardia y compartimos grandes conversaciones. A Silvia, que siempre se ha preocupado de compartir su sabiduría conmigo y demostrar que no solo es una excelente profesional, sino una gran persona. A todos los novatines y no tan novatines que han pasado por el laboratorio, que siempre dieron una bocanada de aire fresco.

Al laboratorio 3. A Jorge y a Vicente, por todo lo que me han ayudado a lo largo de estos años, no solo con los experimentos, si no haciendo más llevadero cada día. Porque sois buena gente. A Antonio, que siempre se preocupó de que trabajara con una sonrisa. A Alicia, por el buen rollo que transmite. A Andrés, porque ha sido un placer conocerte y trabajar contigo.

Al gran equipo de comida, que a lo largo de los años ha ido variando mucho, pero siempre ha hecho más llevadero el comer “recalentao”. Porque ha sido genial compartir con vosotros el día a día de laboratorio y arreglar el mundo en media hora. A todos los miembros del INCyL, que en mayor o menor medida habéis contribuido a que esta tesis vea la luz.

A mi familia, mis padres, mi hermana y cuñadete, porque siempre habéis estado y estáis ahí. Porque siempre me habéis animado a hacer lo que me gusta. Porque siempre intentáis que vea el lado positivo de las cosas. Por todo.

A mi segunda familia, Antonio, Loli, Ruth y Yovanny. Porque sois simplemente geniales.

A Miguel (*Rastas*), porque gracias a que somos polos opuestos me ha enseñado a ver las cosas con otros ojos. Por la paciencia que has tenido conmigo, y yo contigo. Porque somos hermanos de otra madre. A Rubén (*el jevi*), por compartir mi visión del mundo. A Julia (*Hulito*), Ana (*Tejaverde*), el otro Miguel (*Emsi/MC*) y Carmen (*Carmon/Carmensín*). Por las barbacoas, por las cervezas, por las rutas. Por haberme aguantado estos años. Porque os quiero.

Al bueno de Kamina y al bueno de Hoca, porque desde que os conocí, las tardes han sido más llevaderas. Por el “marujeo”, por el Diablo, por el Heroes, por el Over. Porque me prometisteis cosas que no vais a cumplir si aparecáis en estos agradecimientos. Pero por las risas.

A Sara. Porque desde que apareciste en mi vida, todos los días son soleados. Por tus “guini pigs”: Foxdrop, Dropfox, Ponchito, Milky, Chip-chip y Gingerbread. Porque siempre consigues sacarme una sonrisa. Porque estás loca. Porque tú y yo.

# Introducción



## Las neurotrofinas y sus receptores

Ya en 1892, el premio Nobel de Fisiología o Medicina Santiago Ramón y Cajal postuló lo que llamó “Teoría Neurotrófica” (Sotelo, 2004). Estudiando la estructura de la retina, observó que los conos de crecimiento (estructura que él mismo había descrito previamente) se guiaban siguiendo una “fuerza inteligente”, fuerza que Cajal hipotetizaba como factores quimiotácticos.

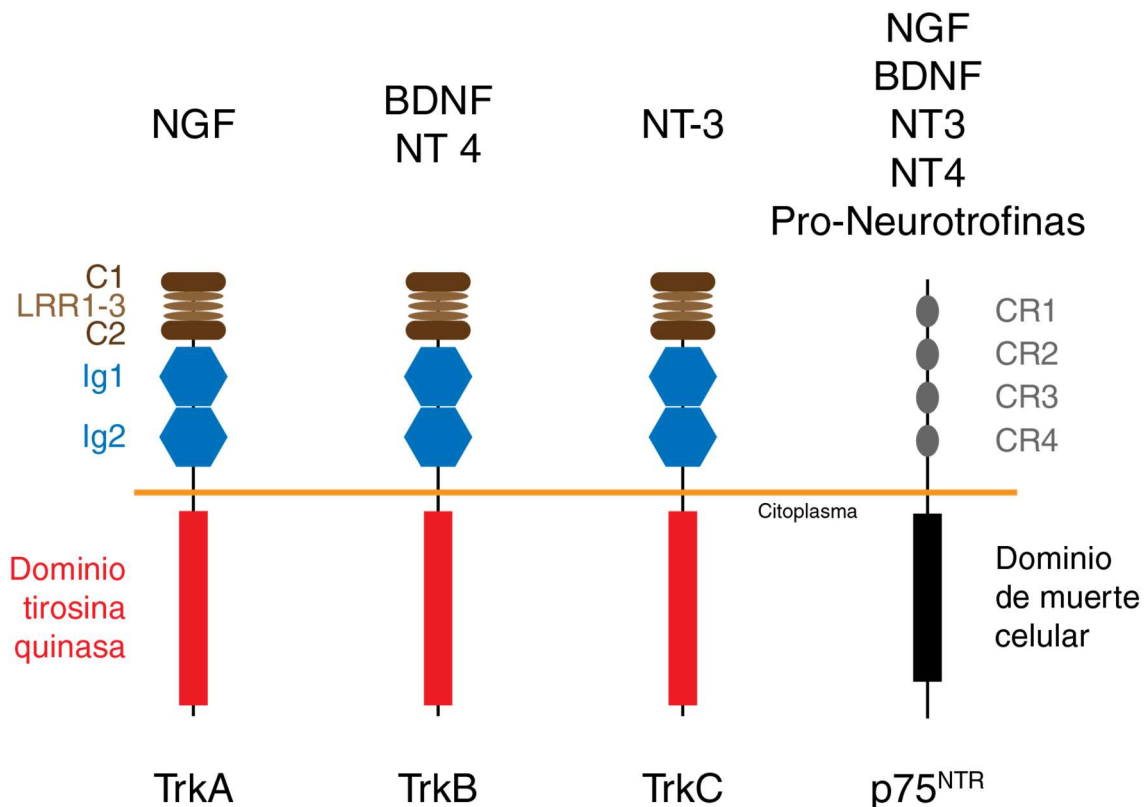
En la década de 1930, Viktor Hamburger (Hamburger, 1934; Hamburger, 1939) estudió en embriones de pollo qué ocurría con el sistema nervioso al retirar o añadir quirúrgicamente las yemas de un ala. Así, observó una hipo- o hiperplasia de los ganglios espinales respectivamente, además de un efecto en los núcleos motores de la médula espinal. De esta manera, puso de manifiesto el efecto de órganos de la periferia sobre el sistema nervioso. Más adelante, la neuróloga Rita Levi-Montalcini observó primero *in vivo* y luego *in vitro* (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951; Levi-Montalcini y Hamburger, 1953) el efecto que tenía sobre el desarrollo neuronal del embrión de pollo la adición de pequeñas porciones de un sarcoma de ratón. De esta manera, describió cómo de los ganglios emergía un halo de fibras nerviosas hacia el sarcoma, siendo este el que producía una sustancia que provocaba tal efecto. Con todos estos resultados, Levi-Montalcini, Hamburger y Stanley Cohen, fueron capaces de aislar esa sustancia del sarcoma que promovía el crecimiento de las fibras nerviosas y la denominaron Factor de Crecimiento Nervioso o NGF (*Nerve Growth Factor*) (Cohen, Levi-Montalcini y Hamburger, 1954). Este gran hallazgo les supuso a Levi-Montalcini y Cohen el Nobel de Fisiología o Medicina en 1986. Hubo que esperar casi 30 años hasta que se aisló una molécula similar al NGF, el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), purificada a partir del cerebro de cerdo (Barde et al., 1982). Actualmente, a esta familia de las neurotrofinas también pertenecen la Neurotrofina-3 (NT-3) (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990) y la Neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Hallböök et al., 1991; Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992).

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento implicados en la diferenciación, mantenimiento y supervivencia de neuronas del sistema nervioso central y periférico. En mamíferos, esta familia está compuesta por el NGF, BDNF, NT-3 y NT-4. Estas neurotrofinas son sintetizadas en forma de precursores 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 formará la neurotrofina madura. Estas pre-pro-neurotrofinas son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso (donde será retirado el péptido señal) y van a ser empaquetadas en vesículas secretoras. A partir de aquí, se han descrito dos posibilidades: o eliminan el pro-dominio para constituir la neurotrofina madura (Seidah et al., 1996) o serán secretadas y procesadas extracelularmente (Lee et al., 2001; Yang et al., 2009), pudiendo ejercer distintas funciones en su forma inmadura (Teng et al., 2005; Yang et al., 2009; Tiveron et al., 2013; Ioannou et al., 2017). Las neurotrofinas en su forma madura existen

## Introducción

como homodímeros en condiciones fisiológicas (Bothwell y Shooter, 1977; Radziejewski et al., 1992), aunque también se ha descrito la existencia de heterodímeros *in vitro*, pero no *in vivo* (Radziejewski y Robinson, 1993; Jungbluth et al., 1994; Heymach y Shooter, 1995).

Las neurotrofinas pueden ser secretadas por las vías de secreción descritas: la constitutiva, donde las proteínas se liberan a medida que se producen, y la regulada, donde las proteínas se sintetizan y almacenan a la espera de un estímulo específico para ser secretadas. Las células no neuronales que secretan neurotrofinas lo hacen solo por la vía constitutiva, pero las neuronas pueden utilizar ambas vías de secreción (Kelly, 1985). Así, aparece una distinción entre el NGF, NT-3 y NT-4 que son secretados principalmente a través de la vía constitutiva y el BDNF, que se secreta a través de la vía regulada (Mowla et al., 1999; Griesbeck et al., 1999; Farhdi et al., 2000; Hibbert et al., 2003). Una vez secretadas, las neurotrofinas van a ejercer sus funciones mediante dos tipos de receptores de membrana: los receptores Trk y el receptor  $p75^{NTR}$ . Cada neurotrofina va a unirse de manera específica a los receptores Trk: NGF a TrkA, BDNF y NT-4 a TrkB y NT-3 a TrkC, mientras que todas las neurotrofinas y sus formas inmaduras son capaces de unirse al receptor  $p75^{NTR}$  (Huang y Reichardt, 2003; Arévalo y Wu, 2006) (Figura I1).



**Figura I1:** Neurotrofinas y sus receptores. Esquema que representa los dominios estructurales que forman los receptores Trk y  $p75^{NTR}$ . En la parte superior aparecen las neurotrofinas capaces de unirse a cada uno de los receptores. C1-2: regiones ricas en cisteína del receptor Trk; LRR1-3: motivos ricos en leucinas; Ig1-2: dominios tipo inmunoglobulina; CR1-4: regiones ricas en cisteína del receptor  $p75^{NTR}$ .



### Receptores de neurotrofinas

En 1986 fue descrito el receptor de baja afinidad p75<sup>NTR</sup>, capaz de unir todas las neurotrofinas (Chao et al., 1986). El receptor p75<sup>NTR</sup> forma parte de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral debido a su estructura. Está formado por una región extracelular con cuatro regiones ricas en cisteínas, un dominio transmembrana y una región intracelular que contiene el dominio de muerte celular (Figura I1). Este receptor presenta una afinidad baja hacia todas las neurotrofinas maduras, uniendo las pro-neurotrofinas con mayor afinidad (Lee et al., 2001). Además, este receptor carece de actividad catalítica intrínseca, necesitando asociarse con otras proteínas que puedan desencadenar una cascada de señalización (Yoon et al., 1998; Friedman, 2000). La función de este receptor es compleja, ya que puede actuar de manera independiente o conjunta con los receptores Trk, alterando la afinidad con la que unen cada neurotrofina (Hempstead et al., 1991; Clary y Reichardt, 1994).

También en 1986 comenzó el descubrimiento de los receptores Trk con el trabajo de Martín-Zanca y colaboradores. Describieron una forma oncogénica fruto de la fusión entre un gen truncado de tropomiosina y uno de un receptor tirosina quinasa desconocido a la que llamaron Trk (*Tropomiosin receptor kinase*) debido a su estructura molecular (Martín-Zanca et al., 1986). Posteriormente, el gen codificante para este receptor fue clonado (Martín-Zanca et al., 1989) y más tarde fue identificado como el receptor de NGF (Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991). Gracias al posterior descubrimiento de los receptores TrkB (Klein et al., 1989) y TrkC (Lamballe et al., 1991), este primer receptor Trk descrito pasó a llamarse TrkA.

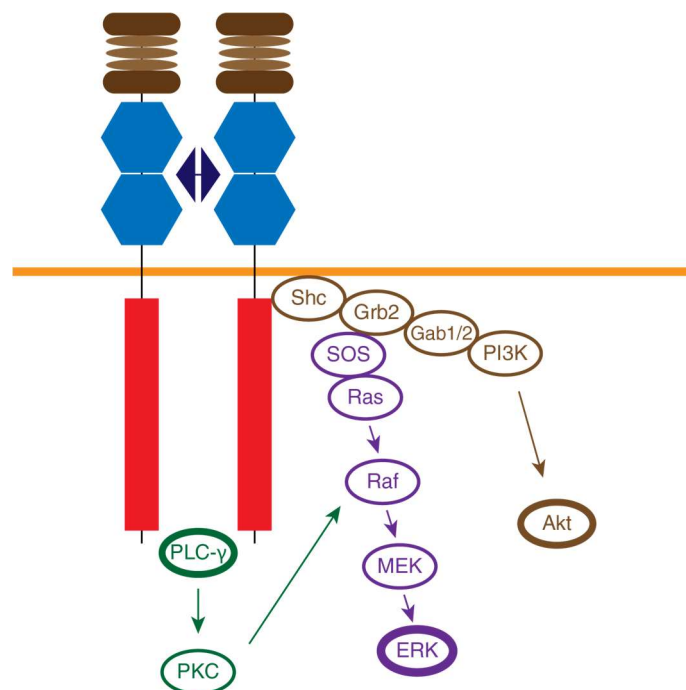
Los receptores Trk pertenecen a la familia de los receptores tirosina quinasa, distinguiéndose del resto principalmente por la organización estructural de su dominio extracelular. Este dominio, localizado en el extremo aminoterminal de la proteína, está constituido por dos regiones ricas en cisteína flanqueando tres regiones ricas en leucina, siendo todo ello responsable de modular la interacción con la neurotrofina. Además, también tiene dos dominios de tipo inmunoglobulina, responsables del reconocimiento e interacción directa con las neurotrofinas (Pérez et al., 1995; Arévalo et al., 2001; Wehrman et al., 2007). Este dominio extracelular aparece glicosilado, lo que evita su activación independiente de ligando y le permite localizarse en la membrana plasmática (Watson et al., 1999). A continuación, los receptores Trk presentan un dominio transmembrana y, por último, la región intracelular, que contiene el dominio catalítico con actividad tirosina quinasa junto con un pequeño extremo carboxiloterminal (Figura I1). En esta región intracelular, se encuentran diversas tirosinas muy conservadas que, gracias a su fosforilación, van a permitir regular la actividad del receptor y su interacción con otras proteínas (Bibel y Barde, 2000; Patapoutian y Reichardt, 2001; Huang y Reichardt, 2003).

# Activación y rutas de señalización de los receptores Trk

La activación de los receptores tirosina quinasa ha sido objeto de controversia. Por un lado, el modelo clásico propone que los receptores aparecen únicamente en forma monomérica en la membrana plasmática, siendo la unión del ligando la que los dimeriza (Schlessinger, 1988; Lemmon and Schlessinger, 1994; Jiang and Hunter, 1999). No obstante, en los últimos años está tomando fuerza otro modelo que propone que los receptores pueden aparecer también en forma dimérica u oligomérica pero inactivos, siendo la interacción con el ligando la que estabiliza esa unión (Hubbard y Miller, 2007; He y Hristova, 2012; Bocharov, 2017). A pesar de no ser modelos excluyentes, este último modelo es el que parece aplicarse a los receptores de la familia Trk (Shen y Maruyama, 2011; Shen y Maruyama, 2012; Ahmed y Hristova, 2018).

Una vez que unen la neurotrofina, esta va a provocar cambios conformacionales en los dímeros de receptores permitiendo el acercamiento de los dominios tirosina quinasa y la autofosforilación en residuos de tirosina. En el caso de TrkA humano, estos residuos de tirosina aparecen tanto en el dominio catalítico (Y670, Y674, Y675) como fuera de él (Y490, Y785), teniendo sus equivalentes en el resto de receptores Trk.

Estas fosforilaciones van a provocar la aparición de lugares de anclaje para proteínas específicas como las que contienen dominios tipo SH2 (*Src homology 2*) o PTB (*Phosphotyrosine binding domain*) (Koch et al., 1991; van der Geer y Pawson, 1995). De esta manera, van a desencadenar la activación de tres cascadas de señalización (Figura I2): ruta de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), ruta del PI3K/AKT (fosfoinositol-3-fosfato quinasa/proteína quinasa B) y ruta de la PLC- $\gamma$  (Fosfolipasa C $\gamma$ ).



**Figura I2:** Distintas vías de señalización desencadenadas tras la unión de ligando a los receptores Trk.

## Ruta de las MAPK

La activación mediada por neurotrofinas puede estimular de dos maneras diferentes la ruta de las MAPK: de manera transitoria, durante 1-2 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 de tirosina Y490 del receptor permite el acoplamiento de la proteína Shc, que a su vez reclutará a la proteína adaptadora Grb2 para formar un complejo con el intercambiador de nucleótidos de guanina SOS. La activación de SOS es la que va a provocar el intercambio de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) en Ras, activándola y provocando la activación de tres proteínas quinasa de manera secuencial: Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y ERK (MAPK) (Kaplan y Miller, 2000). La activación prolongada de la ruta requiere la activación del intercambiador de nucleótidos de guanina C3G a través del adaptador CrkL. C3G va a ser el encargado de activar la GTPasa Rap1, que a su vez activa la serina-treonina quinasa B-Raf, resultando en la activación sostenida de las MAPK (York et al., 1998; Wu et al., 2001). Esta vía requiere la internalización del receptor Trk en el compartimento endosomal (York et al., 2000; Arévalo y Wu, 2006). No obstante, existe cierta controversia sobre cómo la señal se transmite desde el receptor hasta la proteína CrkL. Se ha descrito que la proteína adaptadora ARMS/Kidins220 es capaz de poner en contacto CrkL con el receptor Trk, permitiendo la señalización prolongada de la ruta (Arévalo et al., 2004; Arévalo et al., 2006). Otros estudios han propuesto que Trk es capaz de activar la proteína adaptadora FRS2 (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2*), que formará un complejo con las proteínas CrkL, C3G, Rap1, y B-Raf provocando la activación prolongada de las MAPK (Kao et al., 2001).

La activación de la ruta de las MAPK está relacionada 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 activarán el factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding*). Este factor de transcripción es el que va a controlar la expresión de genes implicados en la supervivencia, muerte y diferenciación neuronal (Ginty et al., 1994; Xing et al., 1996; Deak et al., 1998).

### Ruta del PI3K/Akt

Esta cascada se inicia con la proteína Shc, que se une al residuo Y490 fosforilado del receptor Trk. Esta proteína va a formar un complejo proteico con Grb2 y Gab1, promoviendo la activación de la PI3K y esta, a su vez, activará a Akt (Holgado-Madruga et al., 1997). Entre los sustratos de Akt se incluyen proteínas implicadas en la muerte celular a las que va a fosforilar e inactivar, como la proteína pro-apoptótica Bad (Datta et al., 1997) o el factor de transcripción FKHL1 (Brunet et al., 1999; Zheng et al., 2002). Akt también fosforila a la subunidad inhibidora de NF- $\kappa$ B, liberando al factor de transcripción y permitiendo su entrada al núcleo, lo que permitirá la transcripción de genes implicados en la arborización dendrítica y la sinaptogénesis (Gutierrez et al., 2005; Kaltschmidt et al., 2006; Boersma et al., 2011). Además, Akt se encuentra activa en el cono de crecimiento de neuronas sensoriales, favoreciendo el

## Introducción

crecimiento y la ramificación del axón mediante la fosforilación e inactivación de la GSK-3 $\beta$  a nivel local (Markus et al., 2002; Zhou et al., 2004).

### Ruta de la PLC- $\gamma$

La PLC- $\gamma$  se va a unir al residuo fosforilado de tirosina Y785 del receptor Trk (Obermeier et al., 1993). Tras activarse, PLC- $\gamma$  va a hidrolizar fosfatidilinositoles bifosfato (PIP<sub>2</sub>) generando inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), dos importantes segundos mensajeros. El IP<sub>3</sub> va a estimular la liberación de calcio intracelular, activando proteínas como la calmodulina o quinasas dependientes de calcio/calmodulina. El DAG, por otra parte, activa diferentes isoformas de la enzima PKC y, finalmente, la vía de las MAPK (Corbit et al., 1999). La activación de PLC- $\gamma$  provocada por neurotrofinas se ha implicado en el quimiotropismo del cono de crecimiento (Ming et al., 1999) y en la hipersensibilidad provocada por NGF (Chuang et al., 2001). Además, también parece jugar un papel importante en la potenciación a largo plazo de las neuronas de hipocampo mediada por la señalización de TrkB (Minichiello et al., 2002).

## Modificaciones postraduccionales

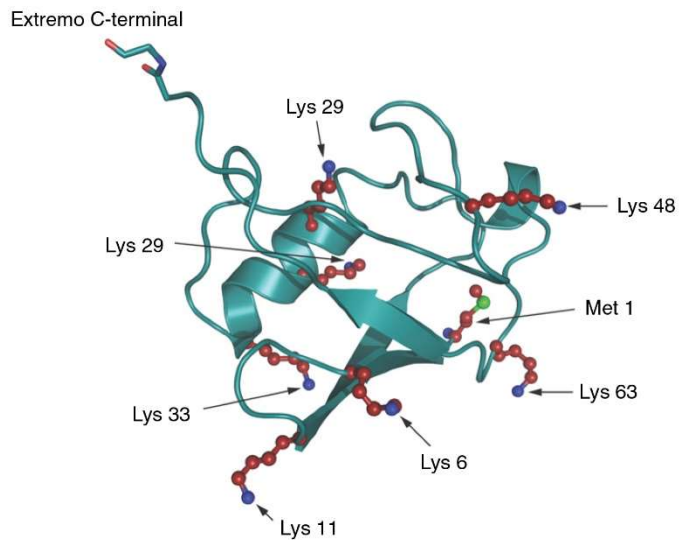
Las modificaciones postraduccionales de proteínas permiten un gran aumento en la complejidad del proteoma, ya que posibilitan que una misma proteína presente distintos estados funcionales atendiendo al contexto celular. Estas modificaciones pueden ser de muchos tipos, desde la adición de pequeños grupos funcionales como el grupo fosfato, acetilo, metilo, etc., hasta pequeñas proteínas como la ubiquitina. En este trabajo nos vamos a centrar en el estudio de la ubiquitinación/desubiquitinación, pero es importante destacar que no es el único tipo de modificación postraduccionales que implica a otra proteína como modificador. De esta manera, aparecen las denominadas proteínas similares a ubiquitina, que en humanos las más estudiadas son: SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*) (Flotho y Melchior, 2013), Nedd8 (*Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*) (Enchev y Schulman, 2015), ISG15 (*Interferon-Stimulated Gene 15*) (Villarroya-Beltri et al., 2017) y FAT10 (*HLA-F-adjacent transcript 10*) (Basler et al., 2015). Todas estas modificaciones postraduccionales han sido implicadas en importantes procesos como cáncer (Aichele, y Groettrup, 2016; Zou et al., 2018; Hu y Jiang, 2019), reparación del ADN (Chen et al., 2018), interacción con patógenos (Ribet y Cossart, 2018) o plasticidad celular (Di Stefano y Hochedlinger, 2018).

### Ubiquitinación

La ubiquitina fue descubierta en 1975 por Goldstein y colaboradores (Goldstein et al., 1975) y se nombró originalmente como UBIP (*ubiquitous immunopoietic polypeptide*). Es una pequeña proteína globular formada por 76 aminoácidos y con una masa molecular de 8,5 kDa. En mamíferos está codificada

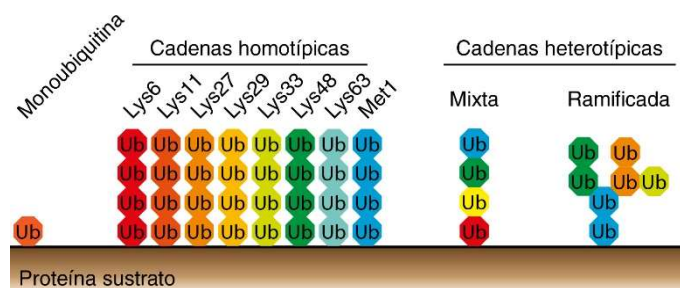
por cuatro genes: dos que codifican para una única molécula de ubiquitina fusionada con un polipéptido ribosomal (*Uba52* y *Uba80*) y otros dos que codifican cadenas de poliubiquitina (*Ubb* y *Ubc*) que, posteriormente, serán procesadas proteolíticamente (Ozkaynak et al., 1987).

La ubiquitina se va a unir a otras proteínas mediante la formación de un enlace peptídico entre la glicina de su extremo carboxilo-terminal y un residuo de lisina presente en la proteína sustrato. Sin



**Figura I3:** Molécula de ubiquitina (Modificado de Komander, 2009). Destacar la presencia de los siete residuos de lisina que permiten la formación de distintas cadenas y el residuo de metionina que permitirá la formación de las cadenas lineales.

embargo, la capacidad de la ubiquitina para regular multitud de procesos reside en su propia estructura (Figura I3). Esta molécula es capaz de formar distintos tipos de cadenas mediante enlaces peptídicos entre la glicina de su extremo carboxilo-terminal y cualquiera de sus residuos internos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) (Peng et al., 2003; Meierhofer et al., 2008). Además, la metionina del extremo amino-terminal también puede utilizarse para alargar las cadenas de ubiquitina, formando las llamadas cadenas lineales (Kirisako et al., 2006). Gracias a esta estructura, la unión de ubiquitina al sustrato puede darse de diversas maneras (Swatek y Komander, 2016). Por un lado, la unión de una única molécula de ubiquitina al sustrato se conoce como monoubiquitinación, mientras que si este proceso ocurre en varios residuos de lisina del sustrato hablamos de multi-monoubiquitinación. Además, gracias a los residuos de lisina



**Figura I4:** Complejidad de los distintos tipos de ubiquitinación. Las cadenas homotípicas, más simples, están formadas por ubiquitinas unidas mediante un único tipo de enlace. En las cadenas heterotípicas, más complejas, aparecen varios tipos de enlaces pudiendo formar cadenas mixtas o ramificadas.

que posee la propia ubiquitina, es capaz de formar cadenas de distintos tipos atendiendo al residuo de lisina con el que se unan, hablando en este caso de poliubiquitinación homotípica, mixta o ramificada (Figura I4). Gracias a esta complejidad a la hora de unirse a los sustratos, la ubiquitinación va a regular una gran variedad de procesos biológicos tales como señalización, endocitosis, degradación proteasomal y

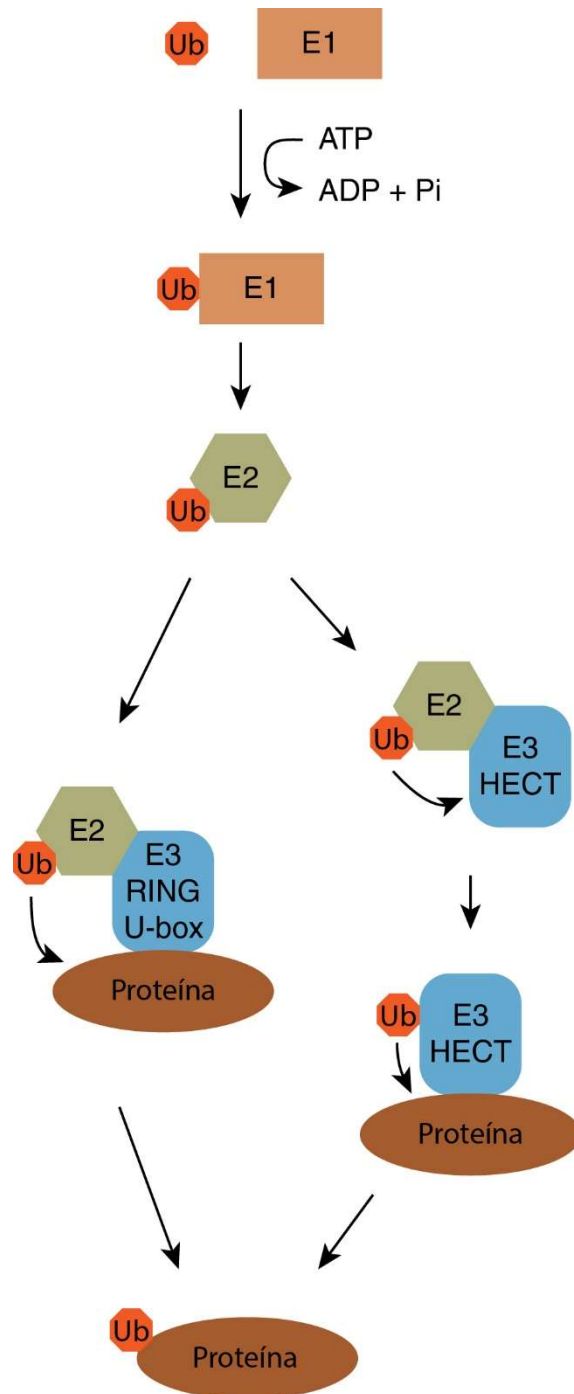


## Introducción

lisosomal, regulación de la localización subcelular y reparación del ADN (Komander y Rape, 2012; Swatek y Komander, 2016).

La ubiquitinación es un proceso reversible que consiste en la unión de moléculas de ubiquitina de forma covalente a una proteína sustrato. Este proceso requiere de un complejo enzimático constituido por varias enzimas que van a actuar de manera secuencial. Primero, una enzima activadora de ubiquitina (E1) activa la ubiquitina gracias al gasto de ATP, formando un enlace entre la ubiquitina y esta enzima (Schulman y Harper, 2009). Después, la ubiquitina activa va a ser transferida hacia la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) (Ye y Rape, 2009) para, finalmente, ser transferida al sustrato gracias a una última enzima llamada ubiquitina ligasa (E3) (Buetow y Huang, 2016) (Figura I5). Para la formación de cadenas de poliubiquitina solo es necesario repetir este proceso, salvo en algunos casos que son necesarias otras proteínas adicionales conocidas como elongadoras (E4) (Hoppe, 2005).

La especificidad de este proceso reside en el elevado número de proteínas E3 ubiquitina ligasas, ya que en el genoma humano hay codificadas más de seiscientas (Li et al., 2008), frente a una o dos enzimas activadoras E1 y una treintena de conjugadoras E2. Estas enzimas E3 ubiquitina ligasas se dividen en tres familias, atendiendo a su dominio de ubiquitinación: RING (*Really interesting new gene*)-finger, HECT (*Homologous to E6AP carboxy terminus*) y U-box (*UFD2 homology*) (Hatakeyama y Nakayama, 2003; Deshaies y Joazeiro, 2009; Rotin y Kumar, 2009). Las proteínas de las familias RING-finger y U-box actúan solo como soporte, uniéndose a la enzima conjugadora E2 para que esta transfiera la ubiquitina directamente al sustrato. Sin embargo, las proteínas de la familia



**Figura I5:** Esquema del proceso de ubiquitinación. Se muestran los distintos mecanismos empleados por las E3 ubiquitina ligasas en función de su dominio catalítico.

HECT primero unen la ubiquitina de la enzima conjugadora E2 y posteriormente la transfieren al sustrato.

### Desubiquitinación

La ubiquitinación de proteínas es un proceso reversible, por lo que la retirada de moléculas de ubiquitina se conoce como desubiquitinación, siendo un proceso que requiere de las enzimas conocidas como desubiquitinasas. En el genoma humano existen unas 95 desubiquitinasas conocidas (Nijman et al., 2005) divididas en seis familias atendiendo a su dominio catalítico. Cinco de estas familias pertenecen a la superfamilia de cisteína proteasas y son las familias UCH (*ubiquitin C-terminal hydrolase*), USP/UBP (*ubiquitin-specific protease*), OTU (*ovarian tumor domain*), MJD (*Machado-Josephin domain*) y MINDY (*motif interacting with ubiquitin-containing novel DUB family*). La sexta familia, pertenece a la superfamilia de metaloproteasas dependientes de zinc y es la familia JAMM (*JAB1/MPN/Mov34*) (Reyes-Turcu et al., 2009).

Las desubiquitinasas regulan la ubiquitinación de proteínas de varias maneras. Por un lado, pueden unirse al sustrato ubiquitinado permitiendo la modificación de la ubiquitinación de manera independiente al tipo de cadena de poliubiquitina que posean (Faesen et al., 2011). Sin embargo, otras desubiquitinasas se van a unir directamente a cadenas de poliubiquitina concretas, pudiendo modificar la ubiquitinación de un gran número de proteínas sustrato (Keusekotten et al., 2013). Además, muchas desubiquitinasas actúan formando parte de grandes complejos macromoleculares (e.g. el proteasoma), siendo el complejo el que recluta las proteínas sustrato (Borodovsky et al., 2001). También existe especificidad por posiciones concretas en la cadena de poliubiquitina en la que van a actuar, apareciendo las endo-desubiquitinasas (actúan en el interior de la cadena, editándola) y exo-desubiquitinasas (actúan en los extremos de la cadena, generando como resultado moléculas de monoubiquitina).

Una de las primeras funciones descritas de las desubiquitinasas, debido a su actividad proteolítica, fue el procesamiento de los precursores de ubiquitina, ya que como hemos mencionado, esta se sintetiza bien fusionada a un polipéptido ribosomal o formando cadenas de poliubiquitina (Kimura y Tanaka, 2010). Otra de las funciones clásicas atribuidas a las desubiquitinasas es la retirada de ubiquitina de proteínas que van a ser degradadas en el proteasoma, permitiendo el reciclaje de la ubiquitina (Verma et al., 2002; Lee et al., 2016). No obstante, debido a su capacidad de edición de cadenas de ubiquitina, van a intervenir en multitud de procesos.

### USP36

USP36 es una enzima cisteína proteasa. Está compuesta por el dominio catalítico USP (cercano al extremo amino-terminal), varias secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina) implicadas en su estabilidad (Kim et

## Introducción

al., 2005) y por último, una secuencia de localización nucleolar en su extremo carboxilo-terminal. Se ha descrito que USP36 puede localizarse en el nucleolo, donde regula su estructura y funciones (Endo et al., 2009). Además, es capaz de regular la transcripción de genes mediante la desubiquitinación de histonas (DeVine et al., 2018). También se ha descrito su localización en mitocondrias, donde regula la estabilidad de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) interviniendo en el estrés oxidativo (Kim et al., 2011). No obstante, los últimos estudios también la han situado en el citoplasma (Anta et al., 2016).

## USP15

Desde el extremo amino-terminal, USP15 está compuesta por: el llamado dominio presente en USPs (DUSP), un dominio similar a ubiquitina (UBL) y por último, el dominio catalítico (Ward et al., 2018). Además, USP15 tiene dos genes parálogos, USP4 y USP11, con quienes forma la familia DUSP-UBL y cuya homología les va a permitir solaparse en algunas de sus funciones (Vlasschaert et al., 2015; Park et al., 2016; Zhang et al., 2016). Se ha descrito su implicación en la regulación de múltiples rutas. Por ejemplo, favorece la señalización del factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) (Inui et al., 2011; Eichhorn et al., 2012; Galant et al., 2019), contrarresta el efecto de la ubiquitina E3 ligasa Parkina en mitofagia (Cornelissen et al., 2014, 2018) e interviene en la estabilidad de p53 (Liu et al., 2017; Padmanabhan et al., 2018). Además, se ha descrito su interacción con el complejo proteico COP9 signalosoma (*Constitutive photomorphogenesis 9 signalosome*) (Hetfeld et al., 2005), lo que le permite intervenir en la señalización de NF- $\kappa$ B (Schweitzer et al., 2007; Zou et al., 2018) y de Wnt (Huang et al., 2009) entre otras.

## USP8

También conocida como UBP $y$  (*Ubiquitin-specific protease y*), USP8 está constituida desde su extremo amino-terminal por: un dominio MIT (*Microtubule interacting and transport*), un dominio similar a rodanasa o Rhod (*Rhodanase-like*), un par de dominios SH3 en la mitad de su secuencia y, por último, el dominio catalítico USP en el extremo carboxilo-terminal. El dominio MIT es necesario para la localización endosomal de USP8 (Row et al., 2007), y el dominio Rhod se ha implicado en su interacción con la enzima E3 ubiquitina ligasa Nrdp1, sugiriendo una posible regulación entre ambas (Wu et al., 2004; Avvakumov et al., 2006).

Se ha descrito la importancia de USP8 en el tráfico endosomal, ya que regula la estabilidad de Hrs (*Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate*) (Zhang et al., 2014) e interacciona con STAM (*Signal transducing adaptor molecule*) (Berlin et al., 2010; Lange et al., 2012), ambos componentes del complejo ESCRT-0 (*Endosomal sorting complex required for transport*). Además, USP8 desubiquitina a CHMP1B (*Charged multivesicular protein*), uno de los componentes del complejo ESCRT-III, permitiendo su ensamblaje con el resto de proteínas que forman ese complejo (Crespo-Yañez et al., 2018). USP8



juega un papel importante en la desubiquitinación de multitud de proteínas a su paso por los endosomas, donde va a regular su reciclaje y degradación lisosomal. Algunos ejemplos son: EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) (Mizuno et al., 2005), ENaC (*Epithelium sodium channel*) (Zhou et al., 2013) CXCR4 (*Chemokine receptor 4*) (Berlin et al., 2010), el receptor opioide  $\delta$  (Hislop et al., 2009), KCa3.1 (*Calcium-activated potassium channel*) (Balut et al., 2011) y Conexina 43 (Sun et al., 2018). Los ratones *knockout* para USP8 son letales durante el desarrollo embrionario, y su eliminación en tejido hepático en ratones condicionales también provoca la muerte a los pocos días, observándose una disminución de receptores tirosina quinasa y unos endosomas anormalmente grandes (Mizuno et al., 2006; Niendorf et al., 2007).

Pese a su importancia en el tráfico endosomal, también han sido descritos otros sustratos de USP8 fuera de esta ruta. Así, USP8, desubiquitina a SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) previniendo su degradación proteasomal y aumentando la densidad sináptica (Kerrisk Campbell y Sheng, 2018); desubiquitina al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Cdc25Mm, promoviendo su estabilización e interviniendo en el ciclo celular (Gnesutta et al., 2001); participa en la formación del acrosoma en células germinales de ratón (Berruti et al., 2005; Berruti et al., 2010) e interviene en el proceso de mitofagia desubiquitinando a la enzima E3 ubiquitina ligasa Parkina (Durcan et al., 2014). Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de USP8 en la regulación de varios procesos celulares, siendo una proteína cuyas funciones son irremplazables. Por ello, no es de extrañar que USP8 se haya relacionado con multitud de patologías como la enfermedad de Cushing (Ballmann et al., 2018; Hernández-Ramírez y Stratakis, 2018), cáncer (Yan et al., 2018; Tiedemann et al., 2012), neurodegeneración (Zhu et al., 2014), psoriasis (Schrodi, 2008), etc.

## Ubiquitinación de receptores Trk

La ubiquitinación de los receptores Trk ocurre en respuesta a su activación por la correspondiente neurotrofina (Arévalo et al. 2006). En el caso de TrkA, el receptor más estudiado, esta ubiquitinación va a promover su internalización e incorporación al tráfico endosomal (Geetha et al., 2005; Makkerh et al., 2005).

Diferentes E3 ubiquitina ligasas han sido descritas para el receptor de neurotrofinas TrkA. La primera de ellas, TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor*), es capaz de interactuar tanto con el receptor p75<sup>NTR</sup> como con la proteína adaptadora p62, regulando la ubiquitinación del receptor TrkA y su presencia en la membrana plasmática, así como la señalización mediada por NGF (Geetha et al., 2005). Otras dos E3 ubiquitina ligasas de la familia Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*), c-Cbl y Cbl-b, también participan en la ubiquitinación de TrkA tras su estimulación por NGF, provocando su degradación lisosomal y, por tanto, limitando la señalización de NGF (Takahashi et al., 2011; Emdal et al., 2015). Por último, el efecto de la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2 sobre el tráfico y la señalización de TrkA ha sido demostrado en estudios

## Introducción

tanto *in vitro* como *in vivo*, poniendo de manifiesto la importancia de este proceso en las funciones mediadas por NGF (Arévalo et al., 2006; Georgieva et al., 2011; Yu et al., 2011; Yu et al., 2014). Nedd4-2 se une al motivo PPXY de TrkA (ausente en los receptores TrkB y TrkC) para multi-monoubiquitarlo, por lo que mutaciones de este dominio de TrkA impiden su correcta ubiquitinación. Como consecuencia, la señalización de TrkA aumenta, incrementando el número de neuronas sensoriales y, por tanto, la sensibilidad al calor y a la inflamación en modelos *in vivo* (Yu et al., 2014). En el caso de los receptores TrkB y TrkC, muy poco es conocido sobre las enzimas implicadas en su ubiquitinación. Se ha relacionado por similitud de secuencias al complejo TRAF6/p62 como una posible ubiquitina E3 ligasa, pero no hay una evidencia experimental de este proceso (Jadhav et al., 2008). No obstante, se ha descrito una interacción entre c-Cbl y TrkB dependiente de glucocorticoides (Pandya et al., 2014). Por último, también se ha detallado la interacción entre TrkB y Ndfip1, una proteína adaptadora capaz de promover la ubiquitinación de TrkB a través de Nedd4-2 (Murray et al., 2018) y probablemente de otras E3 ubiquitina ligasas de la familia Nedd4.

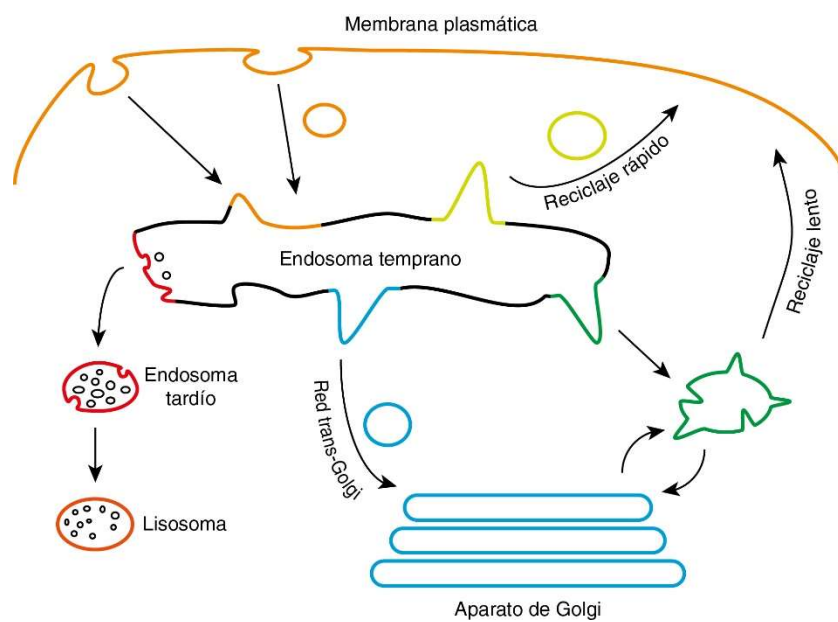
El proceso de desubiquitinación de estos receptores es necesario tanto para el reciclaje como la degradación de los mismos. Sorprendentemente, se ha descrito que enzimas del proteasoma juegan un papel importante en la degradación lisosomal de TrkA y TrkB, aunque poco se conoce de este proceso (Sommerfeld et al., 2000; Geetha et al., 2008; Moises et al., 2009). Se ha descrito que la desubiquitinación de TrkA por parte de USP8 aumenta su degradación en células PC12 (Ceriani et al., 2015) y que USP36 afecta a la ubiquitinación de TrkA de manera indirecta, ya que compite la interacción de Nedd4-2 con el receptor (Anta et al., 2016). La desubiquitinasa CYLD también parece actuar sobre la ubiquitinación de TrkA, aunque no se ha demostrado un efecto directo (Geetha et al., 2005). Por último, la desubiquitinasa UCHL1 actúa sobre el receptor TrkB tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo su degradación y, por tanto, aumentando la señalización de BDNF (Guo et al., 2017). A pesar de estos estudios, aún queda mucho por saber sobre las desubiquitininas implicadas en la desubiquitinación de los receptores Trk.

## Tráfico endosomal de receptores tirosina quinasa

Como ya hemos mencionado en apartados anteriores, los receptores tirosina quinasa se encuentran principalmente en la membrana plasmática, a la espera de unir su ligando para activarse y desencadenar su señalización. Este proceso, requiere de una estricta regulación para asegurar el correcto funcionamiento de los receptores. Uno de los mecanismos que interviene en esta regulación, consiste en modular la disponibilidad de estos receptores en la membrana plasmática mediante su retirada por endocitosis. Esta endocitosis, implica la internalización de una región de la membrana plasmática incorporando el receptor al sistema endosomal, formado por diferentes compartimentos intracelulares. A pesar de la existencia de multitud de mecanismos que llevan a cabo la endocitosis (Doherty y McMahon, 2009), en el

caso de TrkA se han descrito solo tres: dependiente de clatrina (Bilderback et al., 1999), dependiente de caveolas (Peiró et al., 2000) y por pinocitosis (Shao et al., 2002).

Independientemente del mecanismo de endocitosis utilizado, los receptores convergen en los llamados endosomas tempranos (*Early endosome* o también llamado *Sorting endosome*). En estos endosomas es donde se va a decidir el destino de los receptores (Jovic et al., 2010): pueden volver a la membrana plasmática (reciclaje local o rápido), dirigirse a otras áreas de la célula (reciclaje de larga distancia o lento), volver a la red trans-Golgi o dirigirse a los endosomas tardíos para ser degradados. Estos endosomas tardíos se caracterizan por contener muchas vesículas intralumenales, formadas por procesos de invaginación de su membrana (llevados a cabo por los complejos ESCRT), por lo que también se les conoce como cuerpos multivesiculares (Klumperman and Raposo, 2014). Por último, estos cuerpos multivesiculares, se fusionarán con los lisosomas para ser degradados (Figura I6). A lo largo de esta ruta, los receptores van a interactuar con multitud de proteínas asociadas a membranas, siendo estas las responsables de dirigirlos entre los distintos compartimentos. De todas ellas, las más conocidas son las Rab GTPasas, lo que nos permite utilizarlas como marcadores de distintos endosomas (Grosshans et al., 2006). De esta manera, Rab5 es un marcador de endosomas tempranos, Rab4 de endosomas de reciclaje rápido, Rab11 de endosomas de reciclaje lento y Rab7 de endosomas tardíos (Stenmark, 2009). La ubiquitinación juega un papel fundamental en todo este proceso. Mientras que la monoubiquitinación se considera suficiente para provocar la endocitosis y la degradación lisosomal, muchos receptores requieren además de cadenas K63 de poliubiquitina (Lauwers et al., 2009; Huang et al., 2013). Una vez internalizado, el receptor llega al endosoma temprano y, o bien se desubiquitina para volver a la membrana (reciclaje), o no se desubiquitina y continúa hacia su degradación (Row et al., 2006). Si no es desubiquitinado, será reconocido por los complejos ESCRT (gracias a proteínas que poseen dominios de unión a ubiquitina), provocando su invaginación para entrar a formar parte de los cuerpos multivesiculares y ser degradado vía lisosomal (McCann et al., 2016).



**Figura I6:** Tráfico endosomal de receptores tirosina quinasa. Se muestran los posibles destinos tras la internalización y llegada al endosoma temprano.



# **Justificación y objetivos**



La ubiquitinación de los receptores de neurotrofinas Trk ha sido estudiada durante los últimos años, poniendo de manifiesto la importancia de este proceso en las funciones mediadas por las neurotrofinas y sus receptores tanto *in vitro* como *in vivo* (revisado por Sánchez-Sánchez y Arévalo, 2017). De esta manera, se han descrito E3 ubiquitina ligasas para el receptor TrkA, como Nedd4-2 (Arévalo et al., 2006; Yu et al., 2011; Yu et al., 2014), TRAF6 (Geetha et al., 2005), c-Cbl (Takahashi et al., 2011) y Cbl-b (Emdal et al., 2015). Para el receptor TrkB también han sido descritas TRAF6 (Jadhav et al., 2008) y c-Cbl (Pandya et al., 2014) como E3 ubiquitina ligasas. Sin embargo, apenas hay datos sobre las desubiquitininas implicadas en la desubiquitinación de estos receptores.

En este trabajo, nos hemos propuesto identificar y estudiar desubiquitininas que participen en la regulación de la ubiquitinación de los receptores Trk. Partiendo de un ensayo que identificó la posible implicación de 54 desubiquitininas en la activación del receptor TrkA (Anta et al., 2016), decidimos abordar los siguientes objetivos:

1. Seleccionar desubiquitininas entre las potencialmente identificadas para estudiar en profundidad, si procede, su papel en la desubiquitinación de receptores Trk.
2. Identificar el mecanismo por el cual USP36 afecta a la ubiquitinación del receptor TrkA.
3. Estudiar la implicación de USP15 en la desubiquitinación del receptor TrkA.
4. Analizar el papel de USP8 en la desubiquitinación de TrkB y evaluar su importancia en las funciones mediadas por el receptor.