



Universitat de Lleida

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**Regulación de TrkA a través del dominio
intracelular: efecto de la unión a calmodulina y de
la tirosina 701**

Yolanda de Pablo Llavall

Directores:

Marta Llovera Tomás

Joan X Comella Carnicé

Lleida, Junio de 2006

Agraïments

En primer lloc vull donar les gràcies al Joan, per haver-me donat la oportunitat de fer la tesi en el seu grup. He après molt de tu: com a jefe, com a científic i fonamentalment com a persona.

Marta, Com ha estat l'experiència de dirigir una tesi? Espero que t'ho hagi passat tan bé com jo! Gràcies per la teva infinita paciència, per lo molt que m'has ensenyat, per estar sempre disposada a donar un cop de mà i per col·laborar en gran manera a mantenir el congelador ple de gradetes.

Als companys de promoció, per tantes bones estones com hem passat: Carme, gràcies a tu vaig venir a parar a Lleida, perquè un bon dia (per allà al 1998) et va cridar l'atenció que fos natural d'Anglesola i així va començar tot. Miquel, MariPuri, gràcies per compartir amb mi tantes estones d'oci i tertúlia. També al Damià que havent "escrit" una tesi es un altre més de la promoció.

Al *Dream Team*, en especial al Joaquim, que em va ensenyar la seva forma de fer els experiments amb elegància, a part de *Westerns*, IPs i aquestes coses. També al Víctor per les seves *helpful discussions* últimament.

A la Rosa per ensenyar-me el secret de la purificació de MTNs, que com ella diu, immunitza per a la resta de cultius.

Les tècnics Isu, Roser, Imma, per lo molt que ens han malacostumat en deixar-nos-ho tot preparat, i la feina que fan que ni podem imaginar.

A tota la gent que forma o ha estat formant part del lab, del grup NBM o del SCiA, i que al llarg d'aquests anys han contribuït a crear bon ambient o a animar les conversacions a la xocolatera.

A la Mari que sempre ens animava els vespres quan érem a la tercera planta i que es nota molt que no la tenim pel nou lab.

Al departament i als nous col·legues de l'Arnau, que de tant en tant els anem a demanar reactius i protocols... i pels memorables sopars de becaris...

A la gent del Mobley Lab i l'European List, ingredient indispensable d'una "awesome" breu estada.

Gràcies també a les preguntes encara sense resposta que fan que la ciència sigui tan apassionant.

Al ministeri d'Educació i Ciència, que ha permès que pugui viure de fer el que m'agrada. Suposo que a les meves dos amigues treballadores pagadores d'impostos, les podria incloure en el grup de finançament, però millor que faci un punt a part.

Gràcies Carme i Urgell per tants anys d'amistat, i que des de més lluny o a prop, i més o menys sovint, se on trobar-vos... tan aviat com m'instal·li us enviaré l'adreça.

I molt especialment he de donar les gràcies a la meva família, en especial als meus pares, dos persones a les que admiro i que sempre m'han animat a dedicar-me a la ciència.

Moltes gràcies a tots!

Pròleg

Per a no iniciats en el tema,

El tema central de la tesi, serà la proteïna Trk i la seva regulació. Trk es troba de forma natural a la membrana de determinades poblacions neuronals. La seva funció es rebre senyals de l'exterior de la cèl·lula i transmetre-les a l'interior. La senyal que rep, es una altra proteïna anomenada NGF, sigles en anglès per factor de creixement nerviós. Entre d'altres funcions evitarà la mort de la neurona.

Es una transmissió de la informació lenta, que no s'ha de confondre amb la neurotransmissió. Per exemple: la neurona que arriba fins a la punta del peu, i té com a funció avisar-nos que la sorra de la platja està molt calenta, requereix Trk i NGF per indicar que es funcional i no degenerar. La distancia que ha de recórrer la senyal de supervivència pot ser de l'ordre de 1 metre, ha d'arribar fins gairebé a la medul·la espinal, i ho farà en un temps relativament llarg hores/dies. La senyal que ens indica que ens estem cremant, en canvi, en menys d'un segon haurà arribat al cervell i apartarem el peu.

Donat que el departament de ciències mèdiques bàsiques està en una facultat de medicina, crec adient mencionar les malalties relacionades amb Trk, encara que només sigui en aquest pròleg, i no siguin l'objectiu d'estudi d'aquesta tesi.

Trk es va descobrir en un carcinoma de colon, en la forma oncogènica, es a dir: una forma anormal de la proteïna, en que un tros de Trk (domini tirosina kinasa) estava fusionat a una altra proteïna anomenada tropomiosina, d'aquí les inicials de Trk: *Tropomiosin Related Kinase*. Aquesta fusió, fa que Trk estigui sempre actiu, i això té efecte oncogènic, es a dir, contribueix a la transformació de una cèl·lula sana en tumoral. Aquesta tesi no parlarà de la forma oncogènica, l'objecte d'estudi es la proteïna en estat normal: el proto-oncogen.

Parlar de Trk com a proto-oncogen, sembla donar-li mala reputació, dóna la impressió que sigui "dolent o perillós". No es aquest el cas. La manca de Trk funcional, dóna lloc a una malaltia hereditària anomenada CIPA: *congenital insensitivity to pain with anhidrosis*, que traduït al català vol dir: malaltia congènita caracteritzada per insensibilitat al dolor i manca de sudoració. Aquestes peculiars característiques van acompanyades de retard mental, automutilació i 'mort

prematura'. Cal dir que es una malaltia poc freqüent. Amb això vull dir que la funció de Trk es necessària per al bon desenvolupament del sistema nerviós.

Donada la funció de Trk, s'ha estudiat la seva relació amb malalties neurodegeneratives com pugui ser l'alzheimer. S'ha vist disminució del receptor en malalts d'alzheimer, però encara no se sap la rellevància que això pot tenir.

Quina es doncs la finalitat del treball que aquí es presenta?

Com tota la recerca bàsica, té l'objectiu d'aprofundir en el coneixement, donar eines a la recerca aplicada, explicar el funcionament d'allò que s'ha descobert per casualitat... en aquest cas, aportar un granet de sorra en el coneixement de com es regula una proteïna tan important en el sistema nerviós com és Trk.

Us convido a que seguïu la lectura i jutgeu per vosaltres mateixos.

Aclariment:

En el fragment que es parla del calci, no es fa referència a cap funció en els ossos, no estem parlant del calci que contenen els iogurts, i no se'n pot deduir que veure llet suplementada tingui cap efecte sobre la supervivència neuronal. A efectes del que aquí es parla no té res a veure un calci amb l'altre.

Falsa Modèstia.

Afirmava que ell era molt senzill, sense reparar que tenia la complicació de tothom, amb una anatomia interna composta de moltes i molt meravelloses peces.

Pere Calders.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Las neurotrofinas y sus receptores	
1.1. Teoría neurotrófica	1
1.2. La familia de las neurotrofinas y sus receptores	3
1.3. Funciones específicas de las neurotrofinas	6
1.4. Vías activadas por Trk	9
1.5. Vías activadas por p75	12
2. Cinética de TrkA	
2.1. Síntesis, maduración y vida media	13
2.2. Internalización	14
2.3. Transporte retrógrado	16
2.4. Fragmentación de Trk	18
2.5. Extinción de la señal	19
2.6. Relación entre p75 y Trks	20
3. Calcio y Calmodulina	
3.1. Membranas biológicas y concentración de iones	21
3.2. Ca^{2+} como mensajero intracelular	21
3.3. Calmodulina	22
3.4. Relación entre la señalización por Ca^{2+} y por neurotrofinas	25
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Cultivos	
1.1. Recubrimiento de las placas:	33
1.2. Mantenimiento de PC12, PC12 ^{6/15} y PC12 ^{nr5}	33
1.3. Mantenimiento HEK 293T	34
1.4. Cultivo primario de neuronas corticales	34
1.5. Transfección transitoria	35
1.6. Transfección estable	36

Índice

2. Biología Molecular	36
2.1. Materiales:.....	36
2.2. Mutagénesis dirigida	37
2.3. Fusión a la proteína fluorescente	38
3. Bioquímica	
3.1. Western-blot (WB).....	39
3.2. Purificación de proteínas recombinantes	41
3.3. Dansyl-CaM.....	42
3.4. Ensayo de interacción con CaM.....	44
3.5. Co-InmunoPrecipitación Trk-CaM	44
3.6. Nivel de fosforilación de Trk	45
3.7. Ensayo actividad kinasa <i>in vitro</i>	46
3.8. Marcaje de proteínas de membrana con biotina	47
3.9. Preparación de muestras para MALDI-TOF.....	47
4. Biología Celular	
4.1. Inmunofluorescencia (IF).....	48
4.2. FRET	50
4.3. Ensayo de diferenciación de PC12 ^{nnr5}	52
4.4. Detección por IF de Trk internalizado	53
5. Herramientas bioinformáticas	54
RESULTADOS	59
1. Regulación de TrkA por CaM	
1.1. Interacción de CaM con TrkA.....	59
1.2. Efecto de la inhibición de CaM sobre Trk.....	67
2. Obtención de mutantes de TrkA	
2.1. Homología a lugares de unión a CaM.....	71
2.2. Características de la región candidata	71
2.3. Mutantes obtenidos	79
3. Caracterización de los mutantes	
3.1. Efecto sobre la unión a CaM	80
3.2. Efecto sobre la actividad del receptor	82
3.3. Efecto de las mutaciones sobre la cinética del receptor	85
3.4. Los mutantes Y701D y RK702DE no se autofosforilan en PC12 ^{nnr5} ni en HEK293.....	91

DISCUSIÓN	95
1. Unión de Trk a CaM	
1.1. Efecto de la activación de Trk sobre la unión a CaM	95
1.2. ¿Cuándo se produce la interacción?	98
1.3. Unión a Trk B y/o C	99
2. Inhibición de CaM	
2.1. Formación de fragmentos activos de TrkA	100
2.2. Otros efectos del W13	102
3. Selección de la región a mutar	
3.1. Cuestiones estructurales	103
3.2. Otras características	104
4. Fosforilación en otros residuos	105
5. Efecto de los mutantes	
5.1. ¿Es el dominio de unión a CaM?	106
5.2. Efecto de los mutantes de la Tyr 701	107
CONCLUSIONES	115
APÉNDICE	119
Características de los aa	119
RESUMEN	123
RESUM	124
ABSTRACT	125
BIBLIOGRAFÍA	129

ÍNDICE DE FIGURAS

- INTRODUCCIÓN

Fig 1. Receptores de las NTs y formas de <i>splicing</i> diferencial.	4
Fig 2. Receptores Trk de vertebrados e invertebrados.....	5
Fig 3. Requerimientos de NTs en el sistema nervioso periférico.	7
Fig 4. Vías activadas por TrkA.....	11
Fig 5. Vías activadas por p75	12
Fig 6. Mecanismos de internalización en las neurotrofinas y sus receptores.....	15
Fig 7. Tabla de posibles señales de internalización y transporte en Trk.....	16
Fig 8. Estructura 3D de CaM	23
Fig 9. Dominios de unión a CaM.....	24

- MATERIALES Y MÉTODOS

Fig MM1. Estructura y emisión del grupo dansilo	43
Fig MM2. Precipitación mediante bolas de sefarosa	44
Fig MM3. Esquema de la técnica FRET	51
Fig MM4. Diferenciación en PC12	53

- RESULTADOS

Fig R1. CaM interacciona con Trk en lisados de células PC12	60
Fig R2. La unión TrkA-CaM es directa.....	61
Fig R3. CaM se une directamente a la región 675-796 de TrkA.....	62
Fig 4. CaM se une a Trk en PC12 ^{6/15} y en corticales de embrión de rata E18.....	63

Índice de figuras

Fig R5. Resultado de FRET entre CaM y TrkA	65
Fig R6. Espectros de emisión de dansyl-CaM.....	66
Fig R7. Inducción del procesamiento de TrkA por Inhibidores de CaM.....	67
Fig R8. El fragmento p41 formado por la inhibición de CaM es activo.....	68
Fig R9. Efecto de la inhibición de CaM sobre la localización subcelular de TrkA	70
Fig R10. Resultado de la búsqueda de CBD en TrkA.....	72
Fig R11. Alineamiento <i>ClustalW</i> de dominios TK..	74
Fig R12. Predicción de la estructura 3D del dominio TK de TrkA.....	75
Fig R13. Representación en α -hélice del posible CBD de Trk.....	77
Fig R14. Sitios de fosforilación en TrkA.....	79
Fig R15. Unión de los Trk mutantes a CaM-Seph en PC12 ^{nnr5}	81
Fig R16. Unión de los TrkAi recombinantes a CaM-Seph..	82
Fig R17. Las mutaciones de la Y701 no afectan a la actividad TK de Trk <i>in vitro</i>	83
Fig R18. Diferenciación de PC12 ^{nnr5} transfectadas con los mutantes de Trk.	84
Fig R19. Las vías ERK y AKT no son activadas por el mutante Y701D	85
Fig R20. Marcaje de Trk en la membrana plasmática con biotina.....	86
Fig R21. Estudio de la internalización del receptor Trk.....	87
Fig R22. Detección de TrkA internalizado con RTA.....	89
Fig R23. Los mutantes Y701D y RK702DE no presentan autofosforilación.....	91

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AKT	sinónimo de PKB
ARMS	(=Kidins220) Ankyrin-rich membrane spanning protein
ART	Artemin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CaM	Calmodulina
CaMKs	Ca ²⁺ Calmodulin dependent protein kinase
CBD	Dominio de unión a Calmodulina
CIPA	congenital insensitivity to pain with anhidrosis
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CRNF	Factor Neurotrófico Rico en Cisteínas
CT-1	Cardiotrophin-1
DAG	Diacilglicerol
DD	Death Domain
DRGs	neuronas del ganglio de la raíz dorsal
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Regulated kinase
FAP-1	Fas associated phosphatase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
Gab1	Grb2 associated binder 1
GDNF	Glial-Derived neurotrophic factor
GSH	Glutathión reducido
GST	Gluthatione S-transferase
HGF	Hepatocyte growth factor
IF	Inmunofluorescencia
IGF	Insulin Growth Factor
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Jun N-terminal kinase
KD	Kinase Dead
KO	Knock out
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MAG	myelin-associated glycoprotein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBGIs	myelin based growth inhibitors
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NRAGE	Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog

Abreviaturas

NRIF	neurotrophin receptor interacting factor
NT	Neurotrofina
NTN	Neurturin
OMgP	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
PC12 ^{nnr5}	NGF nonresponsive pheochromocytoma cell line
PFA	paraformaldehido
PLC	Phospholipase C
PSP	Persephin
Rac-1	Ras-related C3 botolinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homologous member A
RIP	Receptor Interacting Protein
RTK	Receptor con actividad Tirosina Kinasa
SC-1	Schwann cell 1
SCGs	neuronas del ganglio cervical superior
SH2, 3	Dominio de homología a Src tipo 2 ó 3
Shc	SH2-containing transforming protein C
SOS	Son of sevenless
TGN	Trans golgi network
TK	Tyrosina Kinasa
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	TNF receptor associated factor
Trk	Tropomyosin related kinase
VGCC	Voltage gated calcium channel
WB	western blot

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Las neurotrofinas y sus receptores _____

1.1. Teoría neurotrófica

En el complejo proceso que da lugar a la formación del organismo a partir del cigoto, las neuronas son el exponente de la complejidad. Se enfrentan a problemas sin comparación a los de otros tejidos, su alto grado de especialización las lleva a requerir una morfología excepcional, que les permita formar sinapsis con las dianas correctas para dar lugar a la red neuronal funcional.

Los componentes del sistema nervioso (SN) se originan en regiones distintas del embrión, e inicialmente sin conexión. Las neuronas y las células de la glía se producen a partir del ectodermo. La glía va a ir formando una estructura de apoyo continuo a las neuronas. En la primera etapa evolucionan bajo las señales de inducción génica que prevalecen en la región donde se encuentran; de esta forma, el momento en que se produce la última mitosis va a determinar el porvenir de la neurona, ya que habrá estado expuesta a una serie de inductores específicos según el lugar del eje dorso-ventral y antero-posterior en que se haya producido.

En la siguiente fase, cada una de estas neuronas “predeterminadas” formará conexiones con distintas dianas, según los genes que le hayan sido inducidos. En esta etapa se inicia la morfogénesis del sistema nervioso, a través de una red de contactos provisional, pero de forma ordenada. Las neuronas se diferencian morfológicamente: se producen prolongaciones en todas direcciones, y en un momento dado, una de ellas aumenta su velocidad de crecimiento y se convertirá en el axón, cuya función será llegar al tejido diana, a diferencia de las dendritas, que principalmente se encargarán de recibir las aferencias. Estas prolongaciones van “probando” el sustrato y creciendo en la dirección que más les favorece, además el conjunto de receptores de factores quimiotácticos que exprese dictará la dirección de su crecimiento y las guiará hasta la diana que les había sido predeterminada.

Introducción

A menudo el cono de crecimiento sigue el camino marcado por un axón precedente, de manera que el conjunto de axones paralelos acaba formando una fibra nerviosa. En muchas ocasiones las neuronas que salen de la misma región juntan sus axones para recorrer el camino y luego vuelven a separarse al llegar a inervar la diana.

Una vez los conos de crecimiento llegan a la diana de inervación y forman la sinapsis se produce una última etapa en que las conexiones son reajustadas y refinadas. Por el proceso de muerte celular programada en torno al 50% de estas neuronas muere. Esto se explica por la teoría neurotrófica (Oppenheim, 1989) que postula que:

Los tejidos diana producen una cantidad limitante de factores neurotróficos que son necesarios para la supervivencia de las neuronas que los van a inervar.

Se establece una competencia entre las neuronas aferentes por la cantidad limitante de factor neurotrófico, de manera que aquellas que no reciben bastante mueren por el proceso de muerte celular programada. Esta muerte se caracteriza por ser de tipo apoptótico, y por producirse cuando la neurona ya tiene un elevado grado de diferenciación. De esta manera el tejido diana controla el número de neuronas que deben estar inervando, y así se ajusta al tamaño de la diana, que podrá presentar diferencias entre individuos. Permite también eliminar neuronas que están formando conexiones aberrantes.

Así podemos definir los factores neurotróficos como proteínas endógenas solubles que regulan la supervivencia, crecimiento, plasticidad y síntesis de proteínas para una función diferencial de las neuronas. Entre los factores neurotróficos podemos distinguir varias familias: las neurotrofinas (NTs: NGF, BDNF; NT-4/5, NT-3), la familia de ligandos del GDNF (GDNF, NTN, PSP y ART), las citoquinas (LIF, CNTF, CT-1) y pertenecientes a otras familias como HGF, EGF, IGFs,... cabe destacar que la acción de muchas de ellas no se limita sólo a componentes del sistema nervioso.

En contraposición a la acción protectora frente a la muerte celular programada, las NTs también pueden inducir muerte a través del receptor p75 (ver punto 1.5) de forma que la regulación no solo es positiva sobre las que presentan el receptor adecuado en el lugar adecuado, sino que también puede ser negativa, eliminando aquellas que presentan el receptor erróneo.

La competencia por las NTs no solo regula la supervivencia de la neurona como un todo, también puede regular el crecimiento de axones y dendritas, de

forma local, promoviendo o frenando el crecimiento de ramas individuales del árbol dendrítico, según puedan captar mayor o menor cantidad de factor neurotrófico.

Una vez el SN ya está completamente formado las NTs siguen siendo necesarias para el mantenimiento de determinadas poblaciones, como las neuronas simpáticas. También se ha descrito su implicación en procesos de plasticidad sináptica, (McAllister et al., 1999), regulando la neurotransmisión (Yang et al., 2002), o controlando la ramificación de neuronas sensoriales asegurando su recuperación después de una lesión.

1.2. La familia de las neurotrofinas y sus receptores

La familia de las NTs de mamífero está compuesta por NGF que fue el primer factor neurotrófico en descubrirse, BDNF, NT-3 y NT4-5. Todas ellas se producen en cantidades limitantes por el tejido diana y actúan sobre la neurona pre-sináptica, son captadas por las terminaciones y para dar lugar a la respuesta global de la célula son transportadas hasta el soma.

Las NTs son péptidos glicosilados que se sintetizan en una forma inmadura: pro-NT, que da lugar a la neurotrofina por proteólisis. Las proteasas responsables de su maduración son las convertasas (Furina y convertasa 1 y 2). Tanto la forma madura como la inmadura dimerizan formando un nudo de puentes disulfuro entre las Cys conservadas en todas ellas.

NGF promueve supervivencia en determinadas neuronas sensoriales (derivadas de la cresta neural) y en las neuronas simpáticas (subclase de neuronas periféricas que controlan las contracciones del músculo liso y la secreción de las glándulas exocrinas). Es un polipéptido 7S-NGF, formado por subunidades α , β y γ . La subunidad β es la responsable de la actividad, y la que utilizaremos *in vitro*. Es producido por los tejidos diana de las neuronas simpáticas y sensoriales, también en hipocampo, células de Schwann, fibroblastos y mastocitos (Levi-Montalcini et al., 1996); (Frossard et al., 2004).

Las NTs se unen a los receptores de la familia Trk (TrkA, TrkB y TrkC) y a p75. Cada una de las neurotrofinas tiene mayor afinidad por un determinado receptor Trk; sin embargo NT-3 es capaz de unirse a los tres Trk, y todas las NTs se pueden unir a p75. (Fig. 1)

Originariamente, se describieron lugares de alta afinidad (10pM) y de baja afinidad (1nM). Se adjudicó a p75 la unión con baja afinidad y a los Trk la unión de alta afinidad. Más tarde se vio que aunque la unión de alta afinidad se produce sobre Trk, requiere la presencia de p75 (Esposito et al., 2001).

Estructura de los receptores Trk:

Los tres miembros de la familia Trk de vertebrados presentan una estructura conservada. Son proteínas de membrana tipo I, con actividad tirosina kinasa (TK) en la parte intracelular. Empezando por el extremo N-terminal nos encontramos con dos regiones ricas en Cys (CRD), y un dominio con repeticiones de Leu (LR) intercalado entre los CRD (Fig.1). A continuación vienen dos dominios similares a inmunoglobulinas de tipo C2, el segundo de los cuales es el responsable de la unión a la NT y el primero impide la activación independiente de ligando. Al otro lado del único paso transmembrana, encontramos el dominio TK, entre una pequeña región yuxtamembrana de 60 aa y una región C-terminal de 11aa.

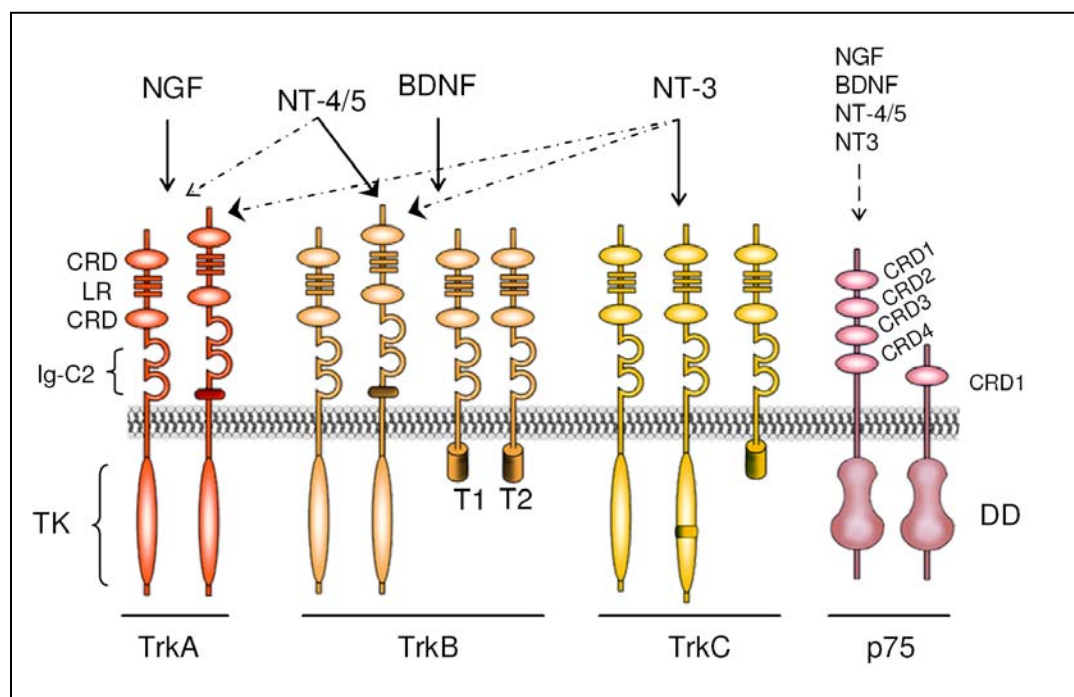


Fig 1. Receptores de las NTs y formas de *splicing* diferencial.

(Adaptado de Chao, 2003) CRD: dominio rico en cisteína. LR: repeticiones de leucina. Ig-C2: dominio similar al de inmunoglobulinas de tipo C2. TK: dominio Tirosina kinasa. DD: dominio de muerte. Las flechas discontinuas indican menor afinidad respecto a las continuas. La punta de flecha grande indica preferencia por la isoforma del receptor a la que apunta. (No se ha tenido en cuenta la presencia o no de p75).

Existen diversas variantes transcripcionales generadas por “*splicing diferencial*” de los receptores (Fig. 1):

TrkA- Su ligando específico es el NGF, pero también puede unir NT-3 y NT4-5. En la denominada forma neuronal se incluye el exón 9 que codificará 6 aa en la zona extracelular, su presencia favorece la unión de NT-3.

TrkB- Es el receptor específico de BDNF y NT-4/5. Puede presentar un exón opcional en la zona yuxtamembrana extracelular cuya presencia aumenta la afinidad por NT-3 y NT4/5 sin afectar a la unión con BDNF.

TrkC- Solo se ha descrito su unión a NT-3. Las formas con inserciones en el dominio intracelular son inactivas.

Se producen también formas truncadas de Trk B y TrkC que carecen de casi todo el dominio intracelular y que por lo tanto son también inactivas.

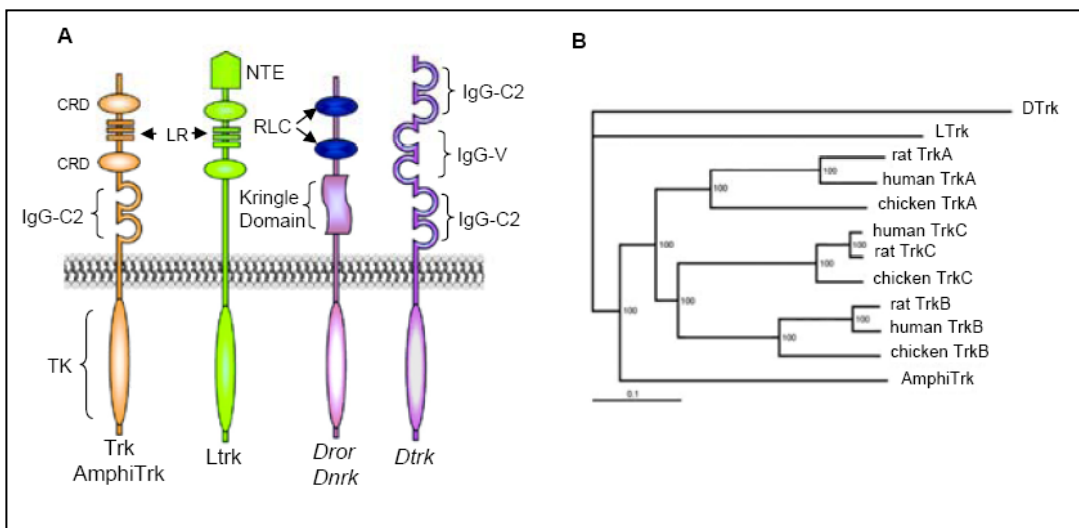


Fig 2. Receptores Trk de vertebrados e invertebrados. (A) Estructura de los Trk de vertebrado (Trk), Anfioxo (AmphiTrk), limnea (LTrk) y dos receptores similares a Trk en *Drosophilla*. NTE- N-terminal extension, RLC: Ror like cistein rich domain. (Adaptado de van Kesteren et al., 1998). (B) Árbol filogenético de los Trk de limnea, rata, pollo y humano (Benito-Gutierrez et al., 2005).

La homología entre los distintos Trk es elevada. En la escala evolutiva el Trk más alejado se encuentra en el molusco *Lymnaea stagnalis*. También se encuentra un Trk de estructura muy similar en el cefalocordado *Branchiostoma lanceolatum* (anfioxo). Se describió un Trk en *Drosophila*, pero más tarde se descartó que pudiera ser considerado como Trk debido a importantes diferencias estructurales (Fig. 2).

Estructura de p75:

El otro receptor de NTs (p75), pertenece a la superfamilia del TNFR (Receptor del factor de necrosis tumoral), sin embargo presenta características diferenciales al resto de miembros de dicha familia (Roux and Barker, 2002). El dominio extracelular está formado por 4 regiones ricas en Cys, las dos centrales son las responsables de la unión al ligando. En la región intracelular no presenta actividad enzimática intrínseca, con lo que básicamente contiene diversos motivos de interacción con otros receptores o proteínas efectoras como pueden ser: región de unión de TRAF, un dominio de muerte (DD), un dominio potencial de activación de Prot G y un PDZ en el extremo C-terminal.

Tiene una forma de *splicing diferencial* en la que se ha perdido el lugar de unión al ligando (Fig. 1). Esta forma a pesar de no unir NTs es capaz de promover apoptosis (Nykjaer et al., 2004). Evolutivamente lo encontramos también en invertebrados donde existe un ligando específico: CRNF (cystein-rich neurotrophic factor), para el que no se ha encontrado un homólogo en vertebrados.

1.3. Funciones específicas de las neurotrofinas

El descubrimiento del NGF se produjo debido a su capacidad de inducir el crecimiento dendrítico en explantes de ganglios sensoriales y simpáticos (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951), y los primeros experimentos *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de anticuerpos que bloqueaban NGF mostraban la pérdida de determinadas poblaciones neuronales mientras que el tratamiento con extra de NGF daba lugar a un mayor número de neuronas debido a la inhibición de la muerte celular programada (Burek and Oppenheim, 1996).

Una aproximación muy usada es la obtención de ratones *knock out* (KO) para ver la función de una determinada proteína a nivel global en el organismo. En el caso de los KO para NTs y Trk vemos que los de las NTs mueren en las primeras semanas después del nacimiento. Los heterocigotos que expresan la mitad de NT son viables pero con problemas en el aprendizaje, pérdida de neuronas del sistema nervioso periférico y en el caso del BDNF problemas de comportamiento: hiperactividad, hiperfagia, agresividad (Chao, 2003). En los KO disminuyen unos determinados tipos neuronales para cada conjunto Trk-NT, para TrkA o NGF, desaparecen casi por completo las SCGs, y las DRGs disminuyen un 70%, indicando su dependencia por esa NT (Fig 3). Pero existen efectos

compensatorios o redundantes de forma que en algunas poblaciones la supervivencia está mediada por varias NTs y el KO presenta una pérdida parcial, debido a la activación de un Trk por distintas NTs. También en el SNC se produce compensación ya que a pesar de que se expresan los receptores Trk, no se observan efectos graves en los KO (Huang and Reichardt, 2001).

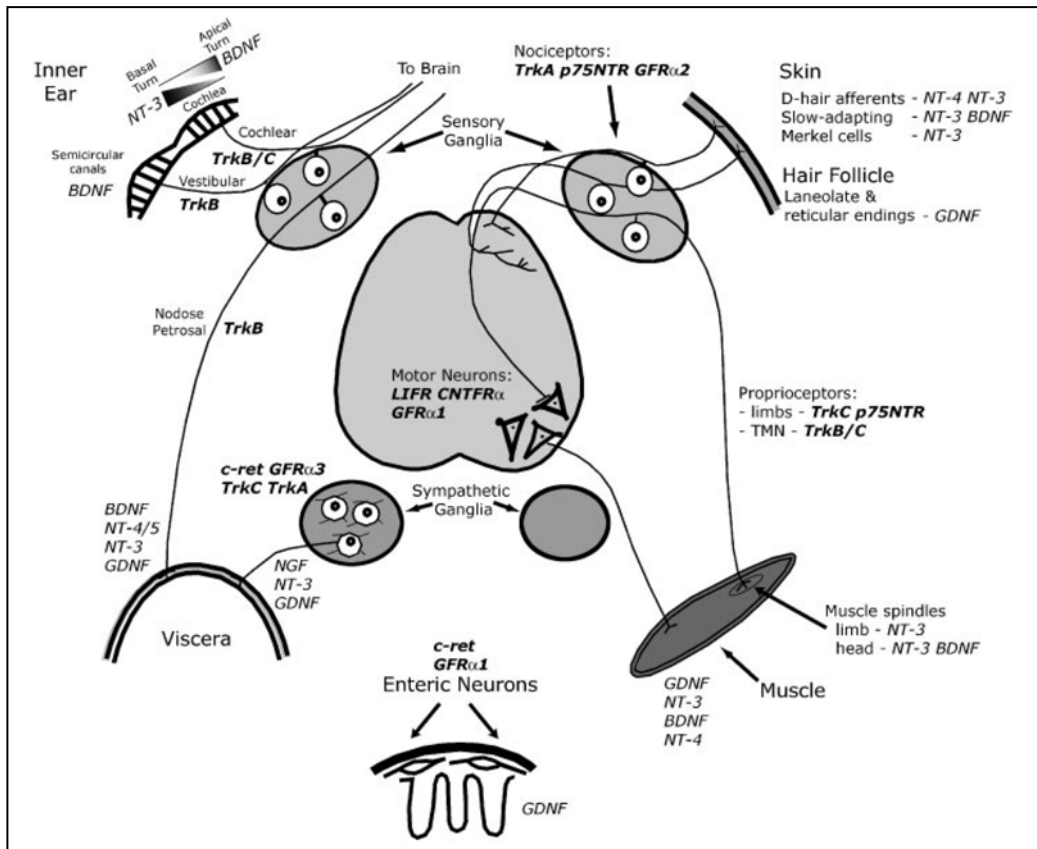


Fig 3. Requerimientos de NTs en el sistema nervioso periférico.

El diagrama ilustra varios componentes del sistema nervioso periférico. Solo los ligandos o receptores imprescindibles para la supervivencia de cada población se muestran en la figura (Huang and Reichardt, 2001).

En el caso de p75 se han obtenido dos tipos de KO distintos: el del exón III, que mantiene la expresión de la isoforma de splicing corta, y el del exón IV, que no produce ningún fragmento funcional de p75. Estos KO presentan efectos curiosos, ya que p75 actúa tanto complementando la acción protectora de las NT como facilitando la muerte, de manera que los KO presentan mayor número de neuronas al nacer debido a la pérdida del efecto de muerte de p75, pero después el número disminuye respecto el *wt* debido a la pérdida de la capacidad de los Trk de unir NTs con alta afinidad.

Más allá de la función en la formación del sistema nervioso, las NTs y en concreto NGF, tienen otras funciones como pueden ser:

- Permitir la supervivencia de determinadas poblaciones neuronales, no solo durante la formación del sistema nervioso, también en el adulto.
- Definir la morfología de las terminaciones sinápticas, así como el conjunto de neurotransmisores que producirá la neurona; y permitir su adaptación al entorno contribuyendo a la plasticidad sináptica. Pueden también regular la expresión de uno u otro de los neurotransmisores en un momento dado, (Yang et al., 2002).
- Tiene también efecto sobre mediadores de la inflamación, provoca la degranulación de mastocitos y tiene efecto quimiotáctico sobre los leucocitos (Levi-Montalcini et al., 1996).

Los KO han permitido ver los efectos en el desarrollo embrionario sobre determinadas poblaciones, pero la muerte perinatal impide estudiar su función en el adulto. Hay dos puntos que van a permitir un mejor conocimiento de la función de Trk-NGF:

- 1- Para evitar la letalidad perinatal en el KO de Trk el grupo del Dr. Ginty ha obtenido un *Knockin* para cada uno de los Trk, de manera que puede bloquearse la actividad kinasa de Trk de forma farmacológica añadiendo una pequeña molécula derivada de PP1 (inhibidor general de kinasas) que es permeable, reversible y estable. (Chen et al., 2005a), pero hasta el momento no se han publicado los resultados obtenidos mediante esta estrategia.
- 2- Descubrimiento de la pérdida de función de TrkA como causa de la enfermedad congénita llamada CIPA (congenital insensitivity to pain with anhidrosis). Podríamos definirlo como el KO de TrkA en humano. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva, llamada así por sus síntomas: insensibilidad al dolor y falta de sudoración; va acompañado por retraso mental moderado y episodios de fiebre. Ello se explica por la pérdida de determinadas poblaciones neuronales que son dependientes de NGF, como las neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y las encargadas de inervar las glándulas sudoríparas. El estudio de estos pacientes va a permitir conocer las poblaciones más sensibles a la pérdida de señalización TrkA-NGF. Aunque un inconveniente es el hecho de que al ser autosómica recesiva, solo se va a encontrar en poblaciones con alto

grado de endogamia, con el consiguiente sesgo en la población representada (Indo, 2002). También para TrkB se ha descrito un paciente con una Tyr del loop de activación mutada, que en heterocigosis inactiva el receptor y provoca obesidad, hiperfagia y retraso en el desarrollo.

1.4. Vías activadas por Trk

El NGF activo se encuentra en forma de dímero, de manera que al unirse al receptor induce su dimerización. El receptor tiene actividad tirosina kinasa intrínseca, y se activa al dimerizar, auto-fosforilándose en diversas tirosinas.

Tres de ellas están situadas en el loop de activación, que en estado basal bloquea el centro catalítico (Hubbard et al., 1994) y al ser fosforilado cambia su conformación y permite el acceso de los sustratos al centro catalítico.

Otras están situadas fuera del dominio de activación de la kinasa y van a servir de puntos de anclaje para proteínas adaptadoras, que serán también sustrato de Trk. Éstas presentan dominios de unión a Tyr fosforiladas, como son los dominios SH2 y PTB. De esta forma se va a desencadenar una serie de fosforilaciones, activaciones, translocaciones...que llevarán a la activación de varias vías de señalización (Fig.4). Las proteínas principales que se unen a Trk para mediar su señalización son:

- **Shc:** se une a P-Y496 (Obermeier et al., 1993a) por el dominio SH2 y es fosforilado. A su vez, esta fosforilación es reconocida por el dominio SH2 de Grb-2.
- **PLC γ :** se une a P-Y791 (Obermeier et al., 1993b), es fosforilada y activada. Formará DAG (diacilglicerol) e IP₃ (inositol (1, 4, 5)P₃) a partir de los PtdIns(4,5).
- **FRS2:** se une a un dominio yuxtamembrana KFG(447-449) y a P-Y496 mediante su dominio PTB. Actúa como proteína adaptadora anclada a la membrana (Kouhara et al., 1997), es reconocido por Grb-2, y media la activación sostenida de MAPKs.
- **PI3K:** Se había postulado que se unía directamente a la Y757 de TrkA, (Obermeier et al., 1993a) pero más tarde se atribuyó su activación a la unión de adaptadores a la Tyr 496 (Holgado-Madruga et al., 1997), sin necesidad de unión directa.

- **ARMS:** proteína de cuatro pasos transmembrana que se encuentra en los *lipid raft*. Es fosforilado en Tyr tras el tratamiento con NTs. Interviene en la activación sostenida de las MAPKs a través de Rap-1. Cabe destacar que puede unirse a Trk y a p75 simultáneamente (Chang et al., 2004). Se une a Trk por la región transmembrana y a p75 en la región yuxtamembrana intracelular.
- **Grb2:** además de su unión mediada por Shc y FRS2, se une de forma directa a las Tyr del loop de activación y a la de PLC γ (MacDonald et al., 2000) mediante el dominio SH2.
- **rAPS/SH2-B:** Se unen a las Tyr del loop de activación a través de su dominio SH2, pueden reclutar a Grb2 y por tanto mediar la activación de ras (Qian et al., 1998).

La unión de unos u otros intermediarios dará lugar a la activación diferencial de las vías, y por tanto podrá contribuir a la especificidad de la señal de un receptor respecto a otro. Las principales vías que se ha descrito que pueden activarse son:

- **Vía PI3K-Akt:** Grb2 se une a Gab1, y dará lugar a la activación de PI3K por cambio conformacional. Requiere también de Ras-GTP para ser activa (Rodríguez-Viciano et al., 1994). PI3K fosforila los Fosfatidil-Inositoles (PtdIns) en posición 3. La presencia de PIP₃ da lugar a la translocación de proteínas con motivos PH a la membrana, entre ellas Akt y su kinasa PDK1. Se ha descrito que la fosforilación y activación de Akt tiene un papel central en la supervivencia neuronal.
- **Vía MAPK(ERK):** Una GTPasa pequeña permitirá la translocación a membrana y activación de la MAPKKK, dando lugar a la activación de la cascada de MAPKs. En último término ERK se transloca a núcleo donde activa factores de transcripción. La vía es distinta a tiempo corto (5min) o largo (a partir de 20min). La activación transitoria tiene efectos mitogénicos, la activación sostenida se ha relacionado con la diferenciación.
 - A tiempo corto, Grb2, a través de su dominio SH3, forma complejo con SOS. Este facilita el paso de Ras-GDP a Ras-GTP. La activación de la GTPasa Ras dará lugar a la activación de la cascada c-Raf, MEK, ERK.

- A tiempo largo se requiere la GTPasa Rap-1 que se encuentra en la membrana endosomal, por tanto se producirá su activación tras la internalización del receptor. Las proteínas adaptadoras implicadas son ARMS, C3G, FRS2. En este caso la MAPKKK es B-Raf.
- **IP₃**: Dará lugar a la liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares, y en consecuencia la activación de Calmodulina (CaM).
- **PKC**: Es una Ser/Thr kinasa que se activará por acción de IP₃ y DAG. PKCδ contribuye a la activación de MAPKs por debajo de Raf.
- **NF-κB**: Es activada a través del complejo formado por p62 y aPKC (Wooten et al., 2001), que lleva a la activación de IKK y la fosforilación de IKβ, que será degradada y quedará NF-κB libre para activar la transcripción. Contribuye a la diferenciación en PC12 (Foehr et al., 2000).

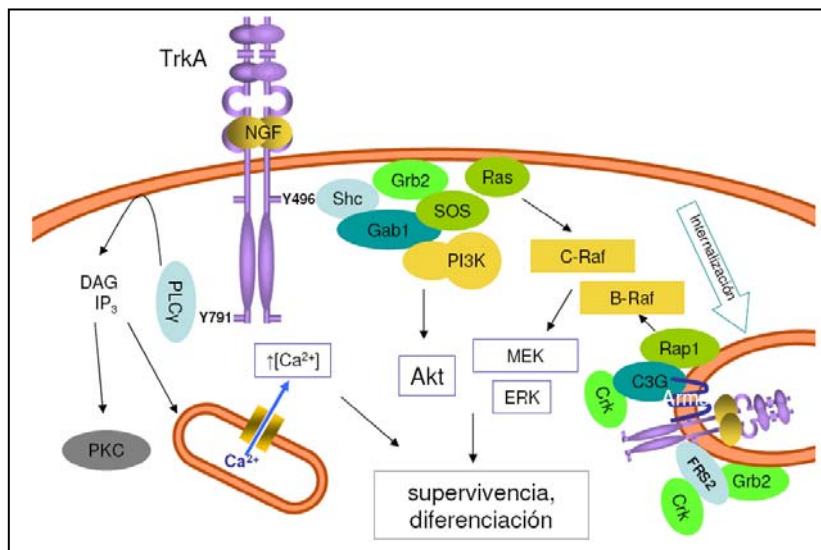


Fig 4. Vías activadas por TrkA. En el esquema se representan los intermediarios que se unen directamente a Trk (azul), las proteínas adaptadoras que se unen a éstas (verde), las iniciadoras de las vías de señalización (amarillo y recuadro azul).

Se puede producir también la activación de Trk a través de receptores acoplados a proteína G, como los receptores Adenosina A_{2a} y PAC-1. La activación a través de estos receptores es más lenta y da lugar a una mayor estimulación de Akt que de la vía Erk. También se ha descrito la regulación de Trk sobre canales iónicos o receptores acoplados a proteínas G. (revisado por (Huang and Reichardt, 2003) y (Chao, 2003)).

1.5. Vías activadas por p75

Los ligandos de la familia del TNF son proteínas transmembrana o solubles homotriméricas, en cambio las NTs son monómeros o dímeros solubles. Se ha visto que p75 no trimeriza, sino que dimeriza en ausencia de ligando, y forma un monómero o heterodímero en presencia de NGF (He and Garcia, 2004). Se une a todas las NTs pero su afinidad es baja. En cambio tiene mayor afinidad por las pro-NTs, que por el contrario, no se unen a los receptores Trk.

Sirve tanto de co-receptor de Trk como de unidad de señalización por sí mismo, y puede tanto favorecer como impedir la activación de Trk por NTs dependiendo del contexto celular. Él mismo puede señalizar en presencia o ausencia de NTs. Ello conlleva que el espectro de funciones que se le han atribuido sea muy amplio: desde promover supervivencia o apoptosis, a facilitar la migración o inhibir el crecimiento neurítico (Barker, 2004), ello dependerá del conjunto de intermediarios u otros receptores a los que se una, de forma que los mecanismos de acción mostrados en la figura 5 son generales, y dependerán del tipo celular. Funciones de p75:

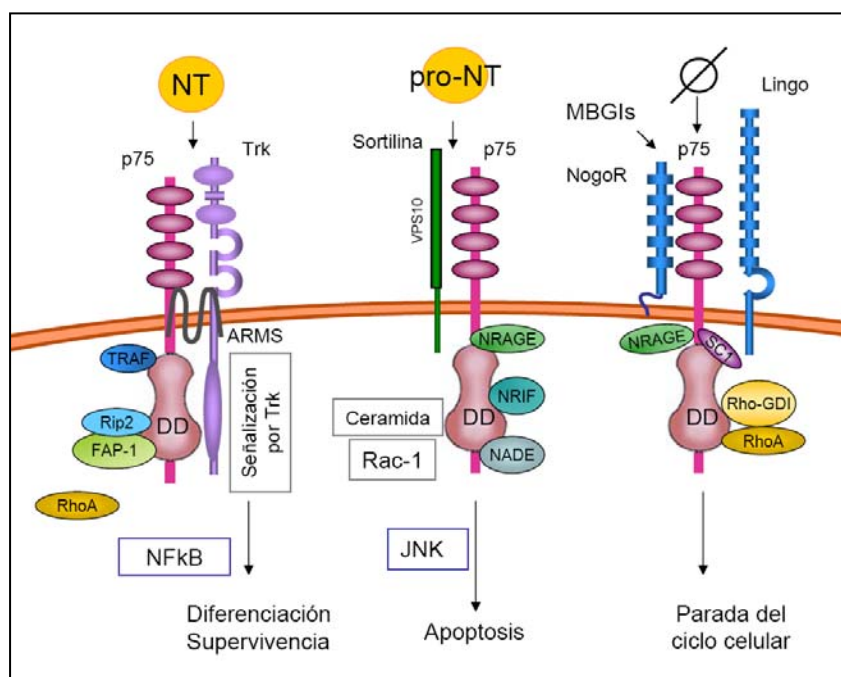


Fig 5. Vías activadas por p75.

La figura representa los mecanismos generales y las funciones que se atribuyen a p75 por: (Izquierda) la mediación de TrkA y NTs, (Centro) la unión de proNTs y sortilina, y (Derecha) la participación de las MBGIs y su receptor. Se representan algunos de los intermediarios que se ha visto que pueden unirse a p75, y el nombre de la vía activada. (Modificado de (Barker, 2004)).

- **Inducción de apoptosis:** El dominio de muerte de p75 es estructural y funcionalmente distinto al resto de miembros de la familia del TNFR, no une los mismos efectores que TNFR y otros receptores de muerte. La unión de las pro-NTs conduce a la apoptosis a través de Sortilina (Nykjaer et al., 2004), que también tiene afinidad por las proNTs, y participa en el tráfico intracelular. Se ha descrito la formación de ceramida y la activación de JNK como mecanismos implicados en la inducción de apoptosis.
- **Supervivencia y diferenciación:** Media la señalización por Trk, facilitando la unión de las NTs a Trk cuando la concentración es baja y le ayuda a discriminar entre ligandos. Además, puede activar vías como NF- κ B de forma independiente de Trk.
- **Inhibición de la proliferación y crecimiento axonal:** Forma un heterotrímero con NogoR (receptor de las proteínas inhibidoras del crecimiento basadas en mielina (MGBIs)) y con Lingo-1.

2. Cinética de TrkA

2.1. Síntesis, maduración y vida media

Trk como proteína transmembrana tipo I, presenta una señal de exportación membranal que comprende los aminoácidos 1-32. Es insertada en la membrana en el retículo endoplasmático, con un peso molecular aparente de 80kDa. La maduración tendrá lugar, principalmente, en el aparato de Golgi, a través de glicosilación. Las formas más abundantes serán la inmadura, de 110kDa y la madura de 140kDa, que es la que se encontrará en la membrana extracelular.

La vida media del receptor TrkA maduro (gp140) en PC12 es de 2h 20min y disminuye a 1h 30min en presencia de NGF (Jullien et al., 2002). Para la forma inmadura (gp110) la vida media es de 24min y pasa a 20min en presencia de NGF. Teniendo en cuenta que la estabilidad de la fracción de la forma madura que se encuentra en la membrana plasmática, pasa de 1h 45min a 35min, parece que la regulación no se produce sobre la maduración sino que se reduce el tiempo de tránsito entre la membrana y los lugares de degradación.

2.2. Internalización

Desde la membrana extracelular, el receptor podrá volver a entrar a través de la invaginación de la membrana conteniendo el receptor. El dominio extracelular quedará en el interior de la vesícula y el intracelular seguirá en la cara citoplasmática.

El proceso podrá ser inducido por la unión del ligando, o de forma basal, para renovar las proteínas de membrana. En el caso de ser inducido por el ligando, su función será: continuar con la señalización o como mecanismo de inhibitorio por reducción del nivel en membrana.

El mecanismo por el cual se produce la internalización tampoco es único, para Trk se ha descrito la existencia de (Fig. 6) (Zweifel et al., 2005):

- Internalización por vesículas recubiertas de clatrina: es uno de los mecanismos más estudiados para la internalización de receptores de membrana. La clatrina recubre una zona de la membrana, uniéndose unas moléculas con otras de manera que fuerzan la estructura esférica y por consiguiente la invaginación de la membrana. Por mediación de dinamina se escinde la vesícula, y a continuación se elimina el recubrimiento de clatrina que volverá a ser reciclada.
- Mediada por Caveolina: TrkA-NGF se encuentra en “*lipid rafts*” que son zonas de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos. A partir de estas regiones se pueden formar invaginaciones llamadas caveolas, ya que contienen caveolina, por lo que están implicadas en transporte vesicular; y también en señalización ya que son estructuras de membrana donde se encuentran intermediarios de la señalización como Shc y ras.
- Pinocitosis y “*membrane ruffling*”: El último mecanismo descrito de internalización implica a Pincher (chaperona de pinocitosis) y se ha visto que se origina en las ondulaciones de membrana y es necesario para la internalización de Trk en PC12 (Shao et al., 2002).

El hecho que la unión de NGF incremente la internalización parece apuntar a que la actividad de Trk sea necesaria este proceso, pero sin embargo se ha visto que la inhibición de la actividad kinasa de Trk no impide la internalización en células PC12, aunque sí que es capaz de variar el destino del receptor, favoreciendo el reciclaje frente a su degradación (Saxena et al., 2005). La internalización es, por tanto, estimulada por el ligando, pero independiente de la actividad kinasa del receptor.

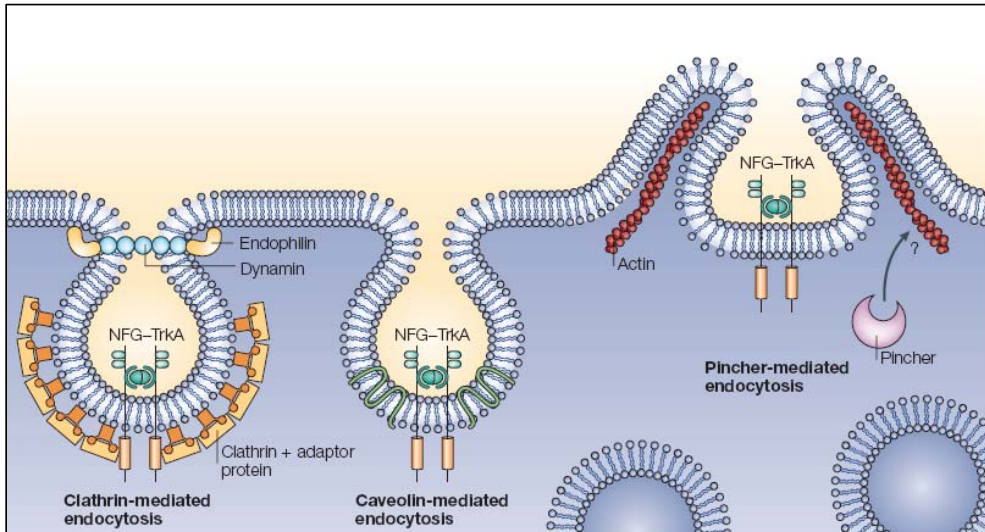


Fig 6. Mecanismos de internalización en las neurotrofinas y sus receptores. Internalización por vesículas recubiertas de Clatrina, mediada por caveolina, o endocitosis (Zweifel et al., 2005)

Una vez internalizado, se eliminará la clatrina u otras proteínas que estuvieran recubriendo la vesícula, que mayoritariamente serán recicladas. Las vesículas se fusionarán unas con otras formando el endosoma temprano, que irá migrando hacia el interior de la célula. Su estructura puede formar tubulaciones que permitirán el reciclaje de nuevo a la membrana plasmática. O si las proteínas han sido marcadas con ubiquitina (Ub), serán invaginadas, es decir, formarán vesículas en el interior del endosoma, dando lugar a cuerpos multivesiculares, o endosomas tardíos. Estos finalmente se fusionarán con los lisosomas o vesículas que contengan los enzimas lisosomales, para la degradación de las proteínas.

El receptor podrá ser reciclado (Chen et al., 2005b), seguir el ciclo que llevará a la degradación, o en determinados casos, podrá continuar la señalización desde el interior de la célula, y ser transportado a través del axón hacia el cuerpo neuronal.

Existen diversos motivos que median la internalización y transporte del receptor. Sobre ellos se van a unir determinadas proteínas adaptadoras, que una vez formada la vesícula regirán su destino. En la figura 7 se muestran las secuencias presentes en Trk, su localización y función .

Motivo	Posición	Tipo
¿?	470-490	reciclaje
NPQY	493-496	NPxY
ECHNLL	528-533	[DE]xxxL[LI]
EQDKML	535-540	“di-Leu”
EAELLTML	560-567	“di-Leu”
EGRPLL	581-586	[DE]xxxL[LI]
DAKLL	607-611	“TGN-endosoma”
YYRV	680-683	YxxΦ
YRKF	701-704	YxxΦ
YAIM	757-760	YxxΦ
PPVY	788-791	media la ubiquitinización
YLDV	791-794	“degradación lisosomal”

Fig 7. Tabla de posibles señales de internalización y transporte en Trk.

Para realizar la tabla se han tenido en cuenta las características descritas por (Bonifacino and Traub, 2003), (Chen et al., 2005b), (Arevalo et al., 2006). Los motivos que figuran como “di-leu” son putativos, X representa cualquier aa, Φ representa un aa hidrofóbico y voluminoso. La función aparece entre comillas si no ha sido comprobada.

También la ubiquitinización actúa como señal de transporte. La Ub es un péptido de 76aa, que puede ser unido por su C-terminal a la cadena lateral de una Lys de la proteína diana. Ella misma posee 3 Lys sobre las que puede unirse formando cadenas de poly-Ub. La unión de poly-Ub conduce a la degradación en el proteasoma, la mono-Ub es suficiente para la internalización de receptores TK, y puede regular su direccionamiento al lisosoma (Haglund et al., 2003).

2.3. Transporte retrógrado

Desde el inicio se trató el problema de como el NGF, que se va a unir a los receptores Trk presentes en la membrana de las terminaciones nerviosas, va a llegar hasta el soma donde desencadenará la cascada de señalización que dará lugar a la respuesta global de la célula. En el hombre, la distancia a salvar, entre la terminación nerviosa y el soma puede ser del orden de 1m. El efecto sobre el

crecimiento axonal puede tener lugar directamente en las terminaciones, pero para la supervivencia (y también una parte sobre la morfología) requieren de la activación de la transcripción por CREB.

Se plantearon varias hipótesis para explicar como tiene lugar la transmisión de la señal desde la terminación nerviosa hasta el soma; se pueden clasificar en tres grupos (Howe and Mobley, 2005):

- Endocitosis y transporte de NGF y Trk (juntos o por separado), de forma que recorrerán la distancia en forma de vesícula. En este grupo se encuentra la hipótesis del “*Signalling endosome*” denominada así porque la vesícula formada lleva asociadas las moléculas intermediarias activadas por Trk.
- Ola de propagación de fosforilaciones entre Trk o efectores contiguos. No implica transporte físico de Trk, solo se transmite la activación.
- Propagación de una señal secundaria como podrían ser iones de Ca^{2+} o cAMP.

Ha sido un tema controvertido, habiendo partidarios de todas las hipótesis. Actualmente el mecanismo más aceptado es el del “*signalling endosome*” que postula que el receptor es internalizado y transportado junto con NGF y de esta manera permanece activo durante el trayecto. Aunque también se han descrito casos en que aparece Trk activo en el soma sin que se haya transportado junto con NGF (MacInnis and Campenot, 2002). Así pues, el “*signalling endosome*” no sería el único mecanismo posible, aunque sí es el más aceptado.

El complejo NGF-TrkA se encuentra tanto en vesículas (recubiertas o no) como en cuerpos multivesiculares. Pero se ha visto que los que son transportados a través del axón presentan marcadores de “*early endosomes*” como rab-5 y EEA1 (Delcroix et al., 2003). Por eso es necesario que estos endosomas eviten la degradación en la terminal sináptica. Además sirven de plataforma de señalización, ya que se han aislado y se ha visto que el tratamiento con NGF incrementa su contenido en intermediarios de vías de señalización: Rap-1, MAPKs, PI3K y PLC γ (Howe et al., 2001).

Sigue sin conocerse como se regula este transporte retrógrado y las proteínas implicadas. Pero hay evidencias de que se trata de un sistema basado en un motor de dineína sobre los microtúbulos, dirigido al extremo (-), (Yano et al., 2001) y se ha visto tanto *in vivo* (Hafezparast et al., 2003), como *in vitro*

(Heerssen et al., 2004) que el transporte mediado por dineína es necesario para la supervivencia neuronal.

2.4. Fragmentación de Trk

Varios estímulos conducen al procesamiento de Trk que da lugar a la liberación del dominio extracelular: inhibición de CaM, tratamiento con PMA (mediado por la activación de PKC), incremento moderado y mantenido de Ca^{2+} intracelular, activación de otros receptores de membrana como BK2 o EGFR (Cabrera et al., 1996).

Se producen varios cortes: el primero elimina el dominio extracelular, y da lugar a la parte intracelular todavía unida a membrana. Se ha detectado el dominio extracelular en el medio, ello lleva a pensar que el corte tiene lugar en la membrana plasmática.

Posteriormente puede producirse un segundo corte (Diaz-Rodriguez et al., 2000) de forma que obtenemos dos fragmentos intracelulares distintos, de peso molecular aparente de 38 y 40/41.

No se conocen las proteasas responsables de estos cortes, pero se postula que γ -secretasa podría estar implicada. También se ha visto la implicación de metaloproteasas (Diaz-Rodriguez et al., 2000), ya que la formación de los fragmentos se bloquea por inhibidores de metaloproteasas de la familia del ácido hidroxámico, tanto en el caso de ser producidos por inhibidores de CaM como por PMA.

Cabe destacar que es el dominio extracelular el que impide la dimerización del receptor y por consiguiente, su activación (Arevalo et al., 2000). Por eso al ser eliminado el dominio extracelular, la parte intracelular queda de forma constitutivamente activa y podría dar lugar a una señalización sostenida e independiente de ligando.

En otros receptores como ErbB4, FGFR o EGFR, se ha descrito que la proteólisis permite la translocación del fragmento intracelular al núcleo (Carpenter, 2003), y una vez allí podría dar lugar a la regulación de la transcripción.

En p75 también se producen dos cortes, el primero por una metaloproteasa que libera el dominio extracelular. El segundo corte, por γ -secretasa, libera el dominio intracelular de la membrana, y puede transportarse al

núcleo, pero no se ha descrito actividad transcripcional, aunque se ha visto que el procesamiento afecta a la unión con Trk (Jung et al., 2003).

2.5. Extinción de la señal

La activación sostenida frente a la activación transitoria dará lugar a un tipo determinado de respuesta. Ello, en parte, será regulado por la presencia de NGF, pero una vez desaparece el NGF del medio, ¿Durante cuanto tiempo sigue Trk activo? ¿Quién lo inactiva? En la muerte celular programada la señal debe ser transitoria para evitar la supervivencia de aquellas neuronas que no han conseguido un aporte suficiente, porque están mal conectadas o porque han llegado tarde. Además Trk constituye un proto-oncogén por lo que su activación aberrante contribuye a la transformación de la célula.

Los mecanismos que se han postulado que pueden conducir a la inactivación de Trk son:

- A nivel transcripcional: El aumento en la expresión de variantes transcripcionales de Trk no funcionales: que pueden actuar como dominante negativas por heteromerización; o por estar secuestrando la NT del medio y por tanto disminuyendo su disponibilidad para unirse a Trk.
- Activación de proteínas inhibitoras de la actividad TK, como SAP (SLAM associated protein) que se une a la P-Y680 (Lo et al., 2005). O de las vías de señalización como Sprouty (Mason et al., 2006).
- Activación de fosfatasa como SHP-1 (Marsh et al., 2003) o SHP-2 (Araki et al., 2000). SHP-1 se une por mediación de P-Y496 y defosforila Y680, Y681 y parcialmente Y496. Con el tratamiento de 5min con NGF aumenta la unión a Trk. Es necesaria para evitar la activación del receptor independiente de ligando y su sobreexpresión impide la supervivencia mediada por NGF; indicando que es capaz de atenuar la respuesta a NGF.
- Degradación del receptor: Después de la internalización del receptor, las vesículas de endocitosis acaban fusionándose con los lisosomas. Las proteínas ubiquitiniladas para la degradación habrán sido dirigidas hacia las membranas internas de los cuerpos multivesiculares. Se conocen varias ligasas de ubiquitina capaces de interaccionar con TrkA como son Cbl o Nedd4-2 (Arevalo et al., 2006).

2.6. Relación entre p75 y Trks

Se ha visto que se produce una interacción entre p75 y Trk, por lo general se ha descrito que la interacción se produce a través de la región extracelular de ambas proteínas (Chang et al., 2004). Sin embargo también se han descrito casos en que la región transmembrana y la citoplasmática son necesarias (Esposito et al., 2001). En ningún caso, esta unión es dependiente de la activación por NTs.

- La presencia de p75 aumenta la especificidad y afinidad de cada NT por su Trk. En ausencia de p75 la cinética de asociación/disociación NGF-TrkA es lenta. En coexpresión, la asociación aumenta 25 veces, dando lugar a los sitios de unión de alta afinidad. Por tanto, la presencia de p75 aumenta la respuesta de Trk en los casos en que la disponibilidad de NT es baja. Para describir como tiene lugar la formación de los lugares de alta afinidad se han planteado varias hipótesis: Se ha debatido la necesidad de una unión de NGF a p75 para este efecto, de forma que p75 presentaría NGF a Trk, o aumentaría la cantidad local de la NT. La hipótesis alternativa es que p75 regula el lugar de unión de la NT a su Trk, de forma que pasa a ser necesaria la *CRD* en TrkA y también el LR en TrkB (Zaccaro et al., 2001).
- p75 impide la activación constitutiva de Trk independiente de ligando.
- Efecto sobre la degradación de Trk: La presencia de p75 ralentiza la internalización y degradación de Trk inducido por ligando a través de la disminución de la ubiquitinización. Así se pueden ver diferencias entre corticales que expresan poco p75, PC12, que expresan mucho p75, y HEK293 transfectadas con distintas proporciones de ambos (Makkerh et al., 2005).
- Un aspecto interesante que todavía no se ha explorado en profundidad, es el aumento de la fosforilación en Ser en TrkA inducido por la estimulación de p75, lo cual tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del receptor Trk (MacPhee and Barker, 1997).

3. Calcio y Calmodulina

3.1. Membranas biológicas y concentración de iones

Una característica fundamental de las membranas biológicas es su apolaridad. Son casi impermeables a los iones. El agua puede pasar con dificultad a través de la bicapa o a través de canales (aquaporin) para mantener el equilibrio osmótico. Ello permite la existencia de diferencias de concentración de determinados iones a uno y otro lado de la membrana que dan lugar a una diferencia de potencial neta. Esta situación se mantiene mediante canales y bombas que pasarán determinados iones a uno u otro lado de la membrana. En una neurona en reposo existe una diferencia de potencial de en torno a -70mV en el interior respecto el exterior, y podemos hablar de K^+ como ión intracelular y Ca^{2+} como ión extracelular.

3.2. Ca^{2+} como mensajero intracelular

El incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol actuará como segundo mensajero (Berridge et al., 1999), ya que será reconocido por motivos especiales en determinadas proteínas, y les provocará cambios en su actividad o conformación. Este Ca^{2+} provendrá del exterior por la apertura de canales, o del interior, por la salida desde reservorios intracelulares (retículo endoplasmático, mitocondria), su concentración se mantendrá elevada un cierto tiempo hasta que vuelva a los parámetros normales por acción de bombas o proteínas quelantes.

Volviendo al paradigma de las neuronas en el proceso de formación del sistema nervioso, se ha descrito que en las neuronas la llegada de información puede manifestarse como pérdida de la polarización de la membrana y transmitirse en forma de potencial de acción a lo largo de la membrana de la neurona y a las células postsinápticas. Esto provoca la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y el consiguiente incremento de Ca^{2+} intracelular media la supervivencia inducida por actividad eléctrica. De esta forma, además de transmitirse el impulso nervioso, se seleccionan positivamente las neuronas que están formando conexiones funcionales.

In vitro se puede simular el efecto de la actividad eléctrica con el tratamiento con K^+ , que también provoca la despolarización de la membrana, aunque de un modo más sostenido. Así se ha comprobado que la despolarización provoca la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a voltaje (VGCC) tipo L; y el incremento mantenido de la concentración de este ión en el citoplasma es el responsable de promover supervivencia.

Sin embargo una concentración muy elevada de Ca^{2+} resultará tóxica para la célula, como sucede por la activación de receptores excitotóxicos como el NMDA. Este efecto diferencial del Ca^{2+} según su concentración se conoce como “*Calcium set point hypothesis*” (Johnson et al., 1992), y postula que una concentración moderada de Ca^{2+} puede sustituir el efecto protector de los factores neurotróficos. A las concentraciones basales de Ca^{2+} , los factores neurotróficos son necesarios para la supervivencia neuronal, y si la concentración es muy alta o por debajo de un mínimo, se producirá la muerte, aun en presencia de factores neurotróficos.

No existe una única vía para explicar la supervivencia por despolarización, pero se ha descrito la Calmodulina (CaM) como intermediario en muchos casos. Además estas vías dependen del tipo neuronal. Veamos varios ejemplos:

- Activación de AKT por un mecanismo dependiente de CaMK e independiente de PI3K en el neuroblastoma NG108 (Yano et al., 1998).
- En motoneuronas la supervivencia por despolarización pasa por la activación de vías dependientes de CaM. Se produce activación de ERK/MAPK, pero no es necesaria para la supervivencia. Tampoco la vía PI3K está implicada en este efecto (Soler et al., 1998).
- Y en el caso de las neuronas del ganglio espiral (Hansen et al., 2001) se produce la acción conjunta de: la liberación y efecto autocrino de BDNF, el aumento de cAMP y la activación de CaMKs.

3.3. Calmodulina

Calmodulina (CaM) constituye un sensor de los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Es una proteína citosólica, soluble, ácida (pI 3'9), de 149 aa sin actividad enzimática. Es una proteína ubicua, imprescindible y muy conservada,

prueba de ello es que en mamíferos está codificada por tres genes con igual secuencia.

Su estructura está formada por dos regiones globulares conectadas por una alfa hélice flexible. Tiene cuatro lugares de unión a Ca^{2+} (*EF hands*), y una Kd entre $0.5\mu\text{M}$ y $5\mu\text{M}$. La unión de los 4 iones provoca un cambio de conformación (Fig.8) pasando de una conformación cerrada (ApoCaM) a otra más abierta (Ca^{2+} -CaM).

Ejerce su acción mediante la interacción con otras proteínas, regulando su actividad. La mayoría de las proteínas efectoras tienen mayor afinidad por la conformación abierta, en la cual CaM se repliega sobre una α -hélice de la

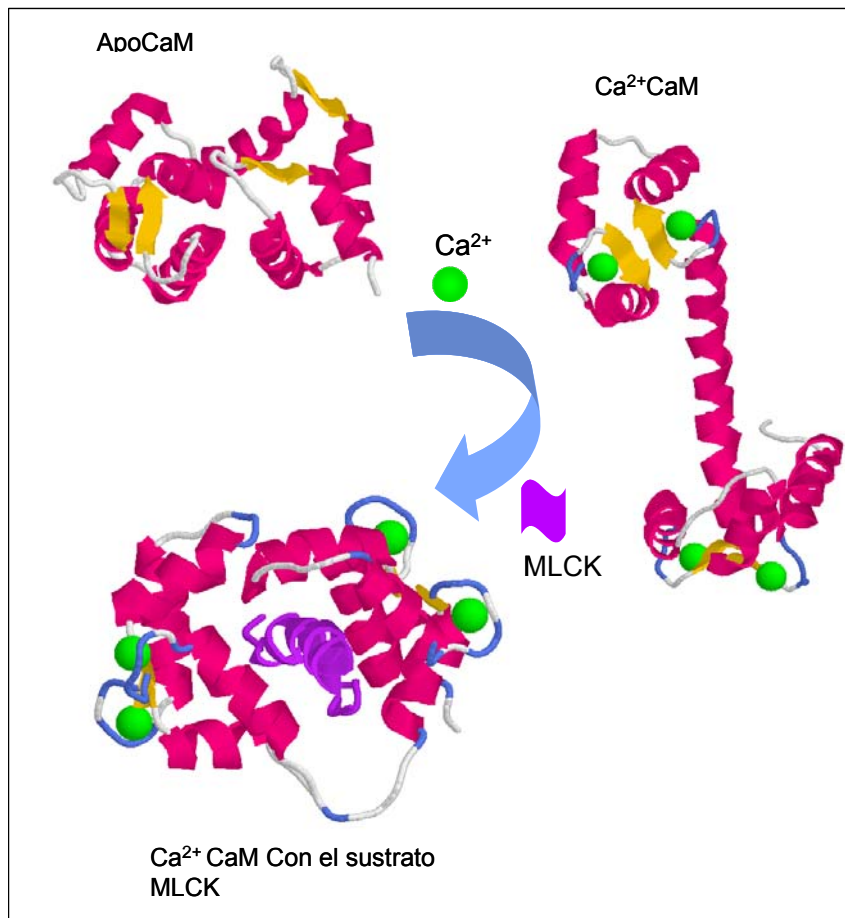


Fig 8. Estructura 3D de CaM.

Representación de la estructura 3D de CaM en ausencia de Ca^{2+} (ApoCaM, cadena R de la estructura 1qx5), en presencia de Ca^{2+} (estructura 1osa) y con Ca^{2+} y unida al dominio de unión a CaM de la cadena ligera de miosina (MLCK) (estructura 2bbm). En rosa las α -hélice, en amarillo las hojas beta, en azul los giros. Los átomos de Ca^{2+} están representados en verde y en lila el fragmento de MLCK.

proteína diana doblando su hélice central. Pero también hay proteínas capaces de unirse a ApoCaM, como es el caso de los dominios IQ.

Clasificación de los dominios de unión a CaM	
1-14	ejemplo: smMLCK, skMLCK-Ca ²⁺
1-5-8-14: (FILVW)xxx(FAILVW)xx(FAILVW)xxxxx(FILVW) Básico 1-8-14: (RK)(RK)(RK)(FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxxx(FILVW) 1-8-14: (FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxxx(FILVW) 1-14: (FILVW)xxxxxxxxxxxx(FILVW)	
1-10	ejemplo: CaMKII Ca ²⁺
1-5-10: xxx(FILVW)xxxx(FAILVW)xxx(FILVW) Básico 1-5-10: (RK)(RK)(RK)(FAILVW)xxx(FILV)xxx(FILVW) 1-10: (FILVW)xxxxxxxx(FILVW)	
1-16	ejemplo: CaMKK (només) Ca ²⁺
1-16: (FILVW)xxxxxxxxxxxx(FILVW)	
IQ	ejemplo: L-type calcium channel apoCaM/Ca ²⁺
IQ: (FILV)Qxxx(RK) "G" xxx(RK)xx "(FILVWY)" IQ-like: (FILV)Qxxx(RK)xxxxxxxx	
Otros	
1-12: (FILVW)xxxxxxxx(FILVW) Motivo Básico: >50% de K o R Otros: los no incluidos en los grupos anteriores	

Fig 9. Dominios de unión a CaM.

El cuadro representa las características de los tipos en que se han agrupado los motivos de unión a CaM conocidos. Los caracteres entre paréntesis se pueden intercambiar. Las x representan cualquier aa. Los caracteres entre comillas pueden no estar conservados. Adaptado de *Calmodulin Target Database*.

Los lugares de unión a CaM (CBD) no presentan una estructura definida, aunque sí tienen algunas características comunes.

- Contienen aa hidrofóbicos voluminosos cruciales, en determinadas posiciones (Fig. 8). La presencia de esta combinación no es suficiente para que sea CBD, solo nos permite su clasificación una vez se ha confirmado la unión a CaM.
- Tienen la capacidad de plegarse en forma de α-hélice con los aa hidrofóbicos a un lado de la hélice.
- La longitud de la secuencia es de unos 10-20 aa. En los que apenas hay aa ácidos, abundan los básicos y entorno el 50% son hidrofóbicos. Ello se explica por la naturaleza ácida de CaM, y por los residuos hidrofóbicos que quedan expuestos al unir Ca²⁺.

La función de las proteínas reguladas por CaM es tan variada como las características de los motivos de interacción. Entre ellas podemos encontrar fosfatasas, kinasas, canales, proteínas motoras... que podrán ser activadas o inhibidas por la unión de Ca^{2+} /CaM.

3.4. Relación entre la señalización por Ca^{2+} y por neurotrofinas

CaM está mediando la supervivencia promovida por despolarización de la membrana a través de su papel central como sensor de Ca^{2+} , y además es necesaria para la activación de las vías de señalización por NTs.

Dado que la activación de Trk provoca la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, este aumento de concentración será suficiente para cambiar la conformación de CaM. Mediante la utilización de inhibidores farmacológicos de CaM se ha podido establecer que:

- La inhibición de CaM no impide la fosforilación del receptor, pero bloquea las vías de señalización en varios puntos: en PC12 es necesaria para la activación de AKT, y de c-Raf (Egea et al., 2000; Egea et al., 2001).
- En fibroblastos NIH3T3, en cambio, se ha descrito que CaM impide la activación de ras/ERK dependiente de PKC (Bosch et al., 1998), (Villalonga et al., 2002).
- CaM es necesaria para prevenir la fragmentación de Trk (ver apartado 2.4)
- Se ha visto que está implicada en procesos de transporte: es necesaria para la fusión de endosomas (Lawe et al., 2003), tubulación y su inhibición impide el correcto direccionamiento endosomal de EGFR (Tebar et al., 2002).
- Regula la función de otros receptores, como el EGFR o InsR.
 - CaM y PKC compiten en muchos aspectos de la regulación de EGFR. Inhibe la activación de EGFR por el corte y liberación de HB-EGF; y a través de CaMKII; pero contrariamente, impide la fosforilación inhibitoria en T654 por PKC por unión directa (Martin-Nieto and Villalobo, 1998).

Introducción

- En el caso del InsR, también se produce una unión directa (Graves et al., 1985). CaM aumenta la estimulación de InsR por insulina, y a su vez, CaM es fosforilada por efecto de la insulina (Graves et al., 1986).

Por tanto, a parte de intervenir en varios pasos de las vías de señalización, CaM tiene un efecto específico por unión directa a receptores TK, y también efectos indirectos sobre los receptores, por activación de proteínas reguladoras de su actividad o efecto en el transporte del receptor. Por eso nos planteamos que CaM podía estar desarrollando un papel importante en la señalización por NGF a través de la modulación de su receptor, y por tanto, decidimos estudiar que efecto tiene CaM sobre el receptor Trk.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El conocimiento de la regulación de TrkA ha avanzado mucho, pero quedan aún cuestiones por resolver. Como objetivo general nos planteamos describir el efecto de la unión de CaM sobre TrkA. Podemos desglosar esta primera parte en:

- Analizar si CaM se une al receptor de NGF TrkA de forma directa.
- Comprobar si se trata de una unión específica de TrkA o es común a los demás miembros de la familia de los receptores Trk de vertebrados.
- Caracterizar la interacción: como, cuando, donde se produce y cual es su función.
- Estudiar que efecto tiene la inhibición de CaM sobre TrkA.

Para estudiar la función de la unión, buscamos el CBD de TrkA con el fin de mutarlo. Así que en la segunda parte del trabajo los objetivos fueron:

- Determinar una zona candidata de interacción que permitiera la regulación de Trk.
- Obtener mutantes de TrkA en la zona putativa de unión a CaM en los que se pierda o desregule la unión.
- Analizar el efecto de los mutantes en la función de TrkA: su actividad kinasa, translocación a membrana, funcionalidad.

De forma colateral, también nos planteamos estudiar el estado de fosforilación de TrkA en Tyr/Ser/Thr en distintas situaciones por análisis de espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos

Mantenemos las células en un incubador a 37°C, humidificado y al 5% de CO₂. Los medios de cultivo son de la casa Invitrogen: DMEM con L-glutamina, 4500mg/L D-glucosa, sin piruvato sódico (#41965-039); MEM con sales de Earle, sin glutamina (# 21090-022). Sueros: FBS suero fetal bovino (#10270-106) y HS suero de caballo (# 16050-122), ambos inactivados por calor 30min a 56°C. Glutamina (# 25030-024). El NGF fue obtenido por C. Espinet y C. Solé según se ha descrito (Mobley et al., 1976).

1.1. Recubrimiento de las placas:

Poli-DL-ornitina: (#P8638 Sigma) solución de 30µg/ml en tampón bórico-borato sódico (150mM tetraborato sódico, 150mM ácido bórico pH 8'3 aprox.), recubrimos la placa durante 1h a RT. Finalmente lavamos 3 veces con agua.

Poli-D-lisina: (#P7280 Sigma) solución 0'01 mg/ml en agua. Incubar 1h a 37°C. Aspirar y guardar a 4°C.

Colágeno: colágeno tipo I de cola de rata (#354236 BD) 100µg/ml en ácido acético 0'02M. Cubrir la placa con un volumen mínimo y dejar evaporar en la cabina de flujo laminar. Lavar en caso que queden restos de ácido.

1.2. Mantenimiento de PC12, PC12^{6/15} y PC12^{nnr5}

La línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de rata, tiene la particularidad de expresar TrkA y diferenciarse a un fenotipo de neurona simpática en presencia de NGF. El clon de PC12^{6/15} expresa de manera estable la forma no-neuronal de TrkA humano, (donado por D. Kaplan, Montreal, Canada). Por el contrario las PC12^{nnr5} (donadas por Y.A. Barde, Basel, Suiza) expresan

niveles insignificantes de Trk, se obtuvieron por mutagénesis química y selección clonal (Green et al., 1986).

El medio utilizado para el crecimiento es DMEM high glucose suplementado con: 6% FCS y 6% HS; 20u/ml de penicilina y 10µg/ml de estreptomina y 10 mM HEPES. Añadimos geneticina 250µg/ml a las PC12^{6/15} para mantener la expresión selectiva sobre Trk humano.

Cambiamos el medio en el momento de dividir las y realizamos una dilución 1/4 cada 3-4 días. No requieren tripsinización, para desengancharlas damos unos golpes a la placa y pasamos por la pipeta varias veces.

Si vamos a realizar algún tratamiento largo, o agresivo, es necesario recubrir la placa con un sustrato que favorezca su adhesión como poli-DL-ornitina; o poli-D-lisina/colágeno en el caso de querer diferenciarlas. Para mantenerlas no es necesario recubrir la placa.

1.3. Mantenimiento HEK 293T

Línea celular de morfología epitelial procedente de riñón de embrión humano. La usamos por su capacidad de sobreexpresar las proteínas exógenas y por su facilidad para ser transfectadas. El medio de crecimiento es DMEM suplementado con 20u/ml penicilina, 20µg/ml estreptomina, 10mM piruvato sódico y 10% FBS.

Para realizar el pase hacemos un lavado con PBS y a continuación añadimos tripsina a 37°C, la dejamos actuar 1 min o hasta que veamos que las células se desprenden de la placa. Añadimos medio con suero para inactivar la tripsina y centrifugamos 5 min a 800g. Resuspendemos en medio nuevo y plantamos a una dilución 1/7.

1.4. Cultivo primario de neuronas corticales

Obtenemos las neuronas a partir de cerebros de embrión de rata de 17 días. Sacrificamos la madre y extraemos los embriones. Los decapitamos e inmovilizamos la cabeza con unas pinzas. Seccionamos el cráneo y con la ayuda

de una lupa binocular extraemos el córtex, lo sumergimos en HBBS y eliminamos las meninges.

Juntamos todos los córtex y tras un lavado con HBBS, tripsinizamos a 37°C durante 10 min (0'025% Tripsina). Eliminamos la tripsina lavando dos veces con MEM 5%HS, 5%FCS. Para la disgregación usamos el medio completo suplementado con DNAasal (1:100). Disgregamos el tejido pasándolo por una pipeta Pasteur con la abertura reducida a la llama. Dejamos sedimentar los trozos grandes y transferimos el sobrenadante a otro tubo. Repetimos el proceso hasta conseguir el grado de disgregación deseado. Juntamos los disociados y los pasamos por una malla para eliminar los grumos de células.

Contamos las células y sembramos en placas recubiertas con poli-D-Lisina. El medio de crecimiento es: MEM suplementado con 20mM glucosa, 13'1mM Bicarbonato Sódico, 2mM glutamina, 5%FCS, 5%HS.

1.5. Transfección transitoria

Electroporación de células PC12: Partimos de células que no lleguen a la confluencia. Las lavamos con PBS, centrifugamos y resuspendemos en PBS frío para conseguir una concentración aproximada de 10^7 cels/ml. Incubamos las células en hielo con 12µg DNA por cada 750µl de suspensión celular, durante 10 min. Las transferimos a una cubeta de 4mm de distancia entre electrodos. Utilizamos la opción "exponential decay" con los parámetros: 325V, 975µFa/750µl y 10^6 células. El tiempo del pulso resultará de entre 15-20 msec. Un elevado porcentaje de células van a morir y aparecerá el DNA en el sobrenadante. Plantamos las células sobre placas recubiertas con poli-DL-ornitina.

Transfección con Lipofectamine™ 2000 (LF): para una placa de 35mm de diámetro (p35) al 50% de confluencia (aprox 500.000 células) usaremos 3µl de LF2000 y 3µg DNA. Hacemos una predilución de la LF y del DNA en 100 µl de medio sin antibiótico. Juntamos las dos prediluciones y dejamos 20min de preincubación. Finalmente lo echamos sobre las células en una cantidad mínima de medio.

Transfección con PEI: Para una p35 al 50% de confluencia utilizamos: 5µg de DNA en 200µl de 150mM NaCl, 30µl PEI en 200µl de 150mM NaCl. Añadimos la solución de PEI sobre la de DNA y agitamos bien (*vortex*) inmediatamente. Tras 10 min de incubación lo añadimos sobre las células. Si

llevan más de un día en cultivo, cambiamos el medio previamente a la transfección.

En los tres casos podemos cambiar el medio el día siguiente a la transfección, para eliminar las células muertas; o añadir medio de crecimiento, al cabo de un mínimo de tres horas, en el caso de realizar la transfección en medio reducido, o incompleto.

1.6. Transfección estable

Para obtener clones estables utilizamos las construcciones en el vector pcDNA3, que confiere resistencia a geneticina.

Transfectamos con LF2000 una p60 por condición (aprox. 2×10^6 células), a los dos días hacemos varias diluciones (de 1/5 a 1/20), y añadimos la geneticina a 500µg/ml. Vamos renovando el medio junto con la geneticina cada 3 días, hasta que se hayan muerto las PC12^{nr5} que no hayan incorporado el plásmido en su genoma, y veamos la aparición de clones resistentes en las placas transfectadas (aprox 10-15 días). Esperamos a que los clones lleguen al tamaño adecuado para aislarlos individualmente en una placa de 96 pocillos, y los vamos amplificando hasta llegar a dos p35 confluentes. Añadiendo el 50% de medio condicionado en los casos en que el factor de dilución es muy elevado.

Una vez obtenidos todos los mutantes analizamos la expresión del transgén por *western blot* y seleccionamos aquellos clones que presentan un nivel de expresión adecuado. Guardamos alícuotas congeladas de los clones de interés en N₂ líquido. Mantenemos aquellos clones con nivel de expresión similar en presencia de geneticina, para usarlos en los experimentos.

2. Biología Molecular _____

2.1. Materiales:

Enzimas: Endonucleasas: de Roche: DpnI (#742988), NheI (#885843), XbaI (#674257), EcoRI (#703737), Sall (#567663); de New England: NcoI

(#R0193s), BglIII (#R0144s). T4 DNA ligase (#M0202 New England). Fosfatasa alcalina (#M0290s New England). Polimerasa: Pfu ultra (#600380 Stratagene)

Plásmidos: Vectores pcDNA3 (#V790-20 Invitrogen), pEYFP-N1 (#6006-1 Clontech). Usamos el cDNA de TrkA humano neuronal (Martin-Zanca et al., 1989), donado por el Dr. Dionisio Martín Zanca (Instituto de Microbiología Bioquímica, Salamanca). Los mutantes deleccionales de TrkAi en pGEX fueron donados por el Dr. Moses V Chao (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York). El plásmido de CaM-CFP (proteína de fusión de CaM con la CFP en el extremo C-terminal) fue una donación del Dr. Francesc Tebar (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona).

Bacterias: *E. coli* cepa DH5 α . Transformamos las bacterias competentes por el protocolo de shock térmico. Guardamos stocks congelados a -80°C con un 20% de glicerol.

2.2. Mutagénesis dirigida

Obtención de los mutantes YRKF: Realizamos la mutagénesis sobre pGEX-TrkAi, mediante PCR con oligonucleótidos que contienen la mutación e introducen una nueva diana de restricción para facilitar la selección. Cada pareja de oligonucleótidos se solapa completamente y tienen un mínimo de 10 bases completamente específicas, desde la última mutación hasta el extremo, para unirse a la diana. Amplificamos con Pfu ultra con las concentraciones recomendadas por el fabricante. A continuación digerimos el DNA molde con DpnI y transformamos en *E. coli* DH5 α . Identificamos las colonias correctas por el patrón de digestión y comprobamos mediante secuenciación que no se hayan introducido otras mutaciones.

Obtención de los mutantes YRK en pcDNA3: Subclonamos el fragmento que contiene la mutación desde pGEX a pBluescript-TrkA por NcoI-BglIII; y seguidamente pasamos la mutación a pcDNA3-TrkA, mediante las dianas NheI-XbaI.

Mutantes L700R y F704Y: Fueron obtenidos por mutagénesis dirigida sobre pcDNA3-TrkA por el Dr. Niclas Lindqvist, durante su estancia en nuestro laboratorio.

2.3. Fusión a la proteína fluorescente

Obtención de la construcción Trk-YFP: mediante PCR amplificamos TrkA a la vez que introducimos las dianas EcoRI a 5' (fuera de la región codificante) y Sall a 3' (eliminando el STOP) y de forma que nos permita subclonarlo en pauta con la secuencia de YFP.

3. Bioquímica

Los reactivos generales para bioquímica: sales, detergentes y las bolas de sefrosa son de la casa SIGMA. El cóctel de inhibidores de proteasas es de Roche (#11-873-580-001), K252a (Calbiochem #420298).

Tabla de los anticuerpos usados:

nombre	dilución	casa comercial	nº Catálogo
anti-CaM	1:2.000	Upstate Biotechnology	# 05-173
anti-fosfo-Tyrosine(4G10)	1:10.000	Upstate Biotechnology	#05-321
anti-GST	1:5.000	Amersham	#27-4577-01
anti-P-Akt P-Ser473	1:2.000	Cell Signaling	#9271
anti-PLC γ	1:5.000	Cell Signaling	#2821
anti-P-p44/42 MAP kinasa P-Thr202/P-Tyr204	1:10.000	New England	#9106
anti-Shc	1:1.000	BD Transduction Laboratories	#610081
anti-Trk (α -203)	1:1.000	*	*
anti-Trk (RTA)	1:5.000	Upstate Biotechnology	#06-574
anti-tubulin	1:40.0000	SIGMA	#T5168
anti-phospho Y490 Trk	1:1.000	Cell Signaling	#9141
anti-mouse IgG-HRP	1:5.000	SIGMA	#9917
anti-rabbit IgG-HRP	1:10.000	Amersham	#NA9340
anti-goat IgG-HRP	1:20.000	SIGMA	#A5420

* Donación de D Martín-Zanca, o obtenido en nuestro laboratorio por R Pané.

3.1. Western-blot (WB)

Preparación de las muestras: Cuantificamos la concentración de proteína en el lisado celular según el *kit* de Biorad (Dc protein assay). Preparamos las muestras de manera que tengan el mismo volumen y cantidad de proteína (aproximadamente 30µg). Añadimos tampón de carga 5x (10%SDS, 250mM Tris pH 6'8, 50% glicerol, 720 mM β-mercaptoetanol y azul de bromofenol). En las muestras que contienen bolas de sefarosa, aspiramos el último lavado dejando un pequeño volumen y añadimos el tampón de carga. Hervimos 5 min, y centrifugamos unos segundos a máximas revoluciones.

Electroforesis: Para detectar proteínas de bajo peso molecular como pueda ser la CaM (16-20kDa) utilizaremos un porcentaje de acrilamida de 12%. Para proteínas grandes como Trk (110-140kDa) utilizaremos un porcentaje de acrilamida del 8%, y 10% para los casos intermedios. Como tampón usaremos Tris-HCl, 375µM y pH 8'8 en el separador y 125µM y pH 6'8 en el apilador. Mantenemos el SDS al 0'1%, y finalmente añadimos el persulfato amónico (PSA) 0'08% y el TEMED 1µl/ml en el separador y 0'067% PSA, 1'7µl/ml TEMED en el apilador. Montamos la electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante. El tampón de electroforesis que utilizamos contiene: 1'44% glicina, 0'1% SDS y 25mM Tris. Cargamos las muestras vigilando que todos los pocillos tengan el mismo volumen, completando con tampón de carga 1x si es necesario. Aplicamos un amperaje constante de unos 20mA (por cada gel de 1mm de grosor y 8cm de ancho), hasta que el frente llegue al final del gel.

Transferencia: Utilizamos el sistema semiseco. Recortamos el papel de transferencia y la membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel. Hidratamos la membrana sumergiéndola en metanol 1 min y seguidamente en agua. Sumergimos la membrana, el gel y el papel para la transferencia en tampón: 48mM TRIS, 0'0375% SDS, 39mM glicina, 20% metanol. Colocamos dos capas de papel sobre el ánodo (+), después la membrana, el gel y otras dos capas de papel. Debemos tener cuidado que no queden burbujas atrapadas en ninguna capa, así como no deformar el gel al moverlo sobre la membrana. Colocamos el cátodo (-) y corremos a un amperaje constante de 0'8mA por cm² de membrana.

Bloqueo: Una vez terminada la transferencia lavamos la membrana en TBS-T (20mM Tris pH 7'6, 150mM NaCl, 0'1% Tween20) y seguidamente bloqueamos en 5% de leche desnatada en polvo en TBS-T, durante 1h a temperatura ambiente. Para algunos anticuerpos como el anti-P-Tirosina (4G10),

bloqueamos con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) en TBS-T, ya que la leche contiene una cantidad significativa de proteínas fosforiladas en Tyr, y nos incrementarían el marcaje basal.

Incubación del anticuerpo primario: Lo diluimos en TBS-T según se indica en la tabla. Habitualmente los incubamos a temperatura ambiente durante una hora, pero en casos especiales es necesario dejarlo toda la noche a 4°C, siempre en agitación. Añadimos 0'2% de azida sódica para preservar el anticuerpo del crecimiento bacteriano y poder reutilizarlo.

Incubación del anticuerpo secundario: lavamos tres veces con TBS-T, e incubamos con el anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente en solución de bloqueo.

Revelado: El anticuerpo secundario está conjugado a peroxidasa, para detectarlo usamos un reactivo comercial que asocia la catálisis del agua oxigenada a la oxidación del luminol, dando lugar a un incremento en la quimioluminiscencia. Para los casos en que tenemos poca señal revelamos con Super Signal West Dura (Pierce), cuya señal es más potente y prolongada. Tiene el inconveniente de que puede formar un precipitado en la membrana que aparecerá como una banda blanca en el film. Por eso si la señal es buena usamos EZ-ECL (Biological Industries), cuya reacción es menor y no precipita sobre la membrana. Exponemos sobre películas fotosensibles Fuji super RX (#H7500329143) y usamos el revelador Kodak HC110 (#5010541) y fijador Kodak Tmax (#5089198).

Eliminación del anticuerpo de la membrana (stripping): Si queremos volver a incubar la membrana y el peso molecular de la nueva proteína cae a una altura similar a las bandas de la detección anterior, debemos eliminar el anticuerpo de la primera inmunodetección por un proceso en inglés llamado *stripping*. Para ello incubamos la membrana 30 min a 60 °C con 62'5mM Tris pH 6'8, 2% SDS y 100mM β-mercaptoetanol. A continuación lavamos hasta eliminar completamente el β-mercaptoetanol y reiniciamos el proceso de inmunodetección con otro anticuerpo desde el bloqueo.

3.2. Purificación de proteínas recombinantes

Obtenemos las proteínas recombinantes fusionadas al dominio de unión a glutatión (GSH) de la glutatión S-Transferasa (GST), que nos permitirá su purificación mediante bolas de GSH-Seph.

Cultivo: Partimos de la construcción de interés en el vector pGEX, transformada en bacterias *E coli* DH5 α . Inoculamos 200ml de medio con 10ml de precultivo en presencia de 100 μ g/ml de ampicilina y lo incubamos a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600nm sea de 0'8.

Expresión: Inducimos la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG 1mM. Incubamos toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Centrifugamos a 2600g durante 20 min a 4°C. Lavamos el *pellet* con PBS y volvemos a centrifugar. En este punto se puede guardar el *pellet* a -80°C antes de proceder a la lisis.

Lisis: Resuspendemos en 15 ml de tampón STE (40mM Tris pH 8'0, 25mM EDTA, 150mM NaCl) con 0'1 mg/ml lisozima y todos los inhibidores de proteasas de que dispongamos (PMSF, aprotinina, leupeptina, benzamidina; ir renovando el PMSF durante todo el proceso). Incubamos en hielo durante 20 min, mezclando con la pipeta periódicamente. Tras añadir DTT hasta 6mM y Sarcosyl hasta 1'2%, sonicamos durante 5 min a intervalos de 5" a máxima potencia y 5" de descanso (mantener la muestra en hielo con agua). El aspecto al terminar deberá ser transparente-translúcido, si la lisis es incompleta el aspecto será turbio, y perderemos una gran cantidad de proteína. A continuación añadimos Tritón-X100 hasta el 2% en un volumen final de 30 ml en STE e incubamos 30 min RT mezclando con la pipeta periódicamente. Finalmente centrifugamos a 16000rpm durante 30 min a 4°C y nos quedamos con el sobrenadante.

Purificación: Para recuperar la proteína incubaremos el SN durante 3h a 4°C en agitación orbital, con 1ml de bolas de sefarosa con glutatión, previamente lavadas con STE. A continuación lavamos 3 veces con: 2% tritón X-100, 1mM DTT, 40mM Tris pH 8 y 150mM NaCl. Para la elución utilizamos 2 volúmenes de: 10mM glutatión reducido, 150mM NaCl, 50mM Tris pH 8'0, 0'1% Tritón X-100, durante 10min a temperatura ambiente (RT) en agitación orbital, y lo repetimos 3 veces. Cuantificamos los eluidos mediante electroforesis en gel de acrilamida y tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250, comparando con un patrón de BSA.

Concentración: Juntamos las fracciones que contienen proteína en un filtro de concentración por centrifugación con un margen de exclusión de 10kDa (Amicon), previamente lavado con agua. Centrifugamos a 3000g 4°C hasta obtener un volumen de 500µl, a continuación lavamos con 20mM Tris pH 8, 50mM NaCl, 1mM DTT. Volvemos a concentrar hasta el volumen deseado y añadimos 5% de glicerol para su conservación. Cuantificamos de nuevo la proteína y la guardamos alícuotada a -80°C.

Nota: El hecho de inducir a temperatura ambiente hace que la expresión sea más lenta, y la proporción de proteína bien plegada aumente. Para proteínas solubles podemos inducir a 30-37°C y no es necesario usar Sarcosyl en la lisis. La sonicación es otro paso crítico en el rendimiento, si la lisis no es completa perderemos una gran cantidad de proteína en el *pellet*. Podemos recoger alícuotas en cada punto del proceso: antes y después de la inducción, del *pellet* de la lisis y antes de la unión a GST-Seph. Si el rendimiento es bajo, resolvemos en un gel de acrilamida las alícuotas que hemos recogido y teñimos el gel con Coomassie. Siempre se pierde una parte de proteína en el *pellet* después de la lisis, habitualmente por estar mal plegada, si la proporción en el sobrenadante respecto el *pellet* es baja, tenemos problemas en la solubilización de la proteína. Si tampoco la vemos en el *pellet* el problema está en la inducción. También debemos evitar en todo momento que la muestra se caliente, y sacarla del hielo solo cuando el protocolo lo requiera, para evitar la degradación.

3.3. Dansyl-CaM

La emisión del grupo dansilo varía en función de la conformación de la molécula a la que se encuentra conjugado. Por ello nos va a permitir detectar la unión de CaM a su sustrato (Kincaid et al., 1982).

Materiales: CaM 1'34mg/ml equivale a 80nmol/ml en 1'7mM HEPES pH 7 y 30 µM CaCl₂. Cloruro de dansilo: (#39220 Fluka) resuspender 1mg de cloruro de dansilo en 100 µl de acetona (37mM) dejarlo en agitación orbital toda la noche (o/n). Solución de trabajo: 24 µl en 1ml.

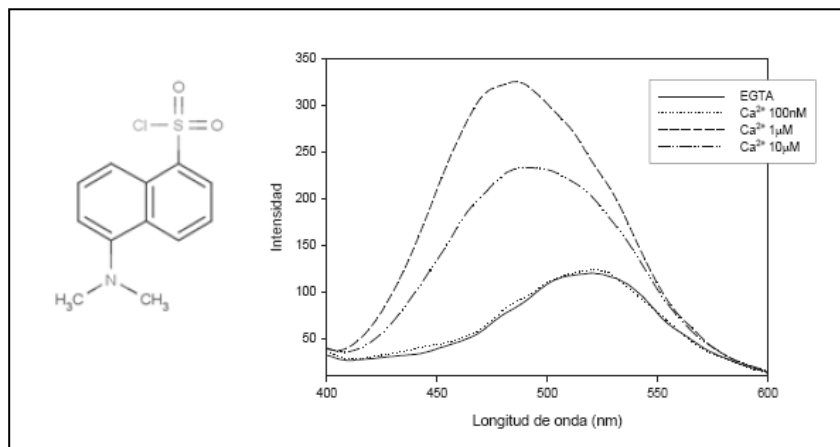


Fig MM1. Estructura y emisión del grupo dansilo.

La emisión de la dansyl-CaM varía en función de la presencia de Ca²⁺, su pico máximo de emisión pasa de 520 a 490nm al añadirle Ca²⁺.

Protocolo de dansilación: Diluimos la CaM a 1mg/ml en tampón 100mM Tris-acetato pH 8'5. Añadimos el cloruro de dansilo (en agitación continua) a razón de 1'5 mol / mol de CaM. Incubamos 90min a 30°C o 12h a 4°C. Usamos un filtro Amicon de 10kDa para cambiar el tampón a CB (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7'5, 50 μM EGTA).

Ensayo de interacción: Utilizaremos un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5000. Excitamos a 340nm y captamos el espectro de emisión entre 400-600nm. Fijamos la temperatura de la muestra a 26°C.

Disponemos de la CaM a 1μM, las proteínas sustrato a 200μM, y una solución de CaCl₂ 5mM.

Leemos el espectro de CaM sola y sobre la misma cubeta vamos añadiendo CaCl₂ para obtener concentraciones crecientes de Ca²⁺. Recogemos el espectro para cada una de las condiciones. Repetimos el mismo proceso en presencia de la proteína o péptido para el que queremos testar la unión.

Utilizamos la opción *smooth* del mismo programa, que suaviza la curva de manera que facilita su comparación.

3.4. Ensayo de interacción con CaM

Tratamos las PC12 con NGF según sea requerido. Las lavamos en PBS frío y lisamos con: 20mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1mM Na₃VO₄, 25mM NaF, 50mM β-glicerofosfato, e inhibidores de proteasas de Roche.

Partimos de 1 mg de proteína total de lisado celular o 0.25-1μg de proteína recombinante. Añadimos 20μl de CaM-Seph (previamente bloqueada con 1% de BSA) y CaCl₂ o EGTA hasta la concentración final requerida. Incubamos 1h a 4°C en agitación orbital. Lavamos tres veces con el mismo tampón centrifugando a 1000g 1 min. Finalmente añadimos tampón de carga y detectamos la presencia de la proteína de interés en la fracción unida a bolas mediante WB.

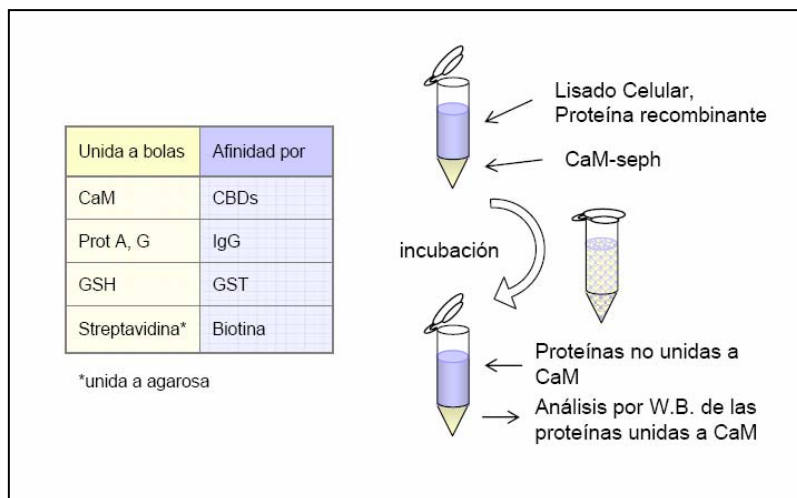


Fig MM2. Precipitación mediante bolas de sefarosa

La figura muestra el protocolo general para la precipitación con bolas de sefarosa. En la tabla se indica el recubrimiento de las bolas y la proteína por la que tienen afinidad. Es importante tener en cuenta que el tampón de lisis no sea desnaturante, y que no contenga agentes que puedan interferir en la unión, como agentes reductores o una elevada concentración de detergente.

3.5. Co-InmunoPrecipitación Trk–CaM

Tratamos las PC12^{6/15} o los cultivos primarios de neuronas corticales con NGF(100ng/ml) o BDNF(50ng/ml) respectivamente. Lisamos con: 20mM Tris pH 7.4, 140mM NaCl, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 1mM PMSF, 10μg/ml aprotinina

20 µg/ml leupeptina, 2mM benzamidina, 1mM ortovanadato, 25mM fluoruro sódico, 40mM β-glicerofosfato. Completamos la lisis en agitación orbital durante 20min y clarificamos el lisado por centrifugación (15min a 13.000rpm).

Inmunoprecipitamos (IP) a partir de 1mg de proteína total, añadiendo 1µl de α-Trk 203 y bolas de proteína A-sefarosa. Incubamos un mínimo de 4h a 4° en agitación orbital, en presencia o no de 0'5mM CaCl₂. Lavamos tres veces con el mismo tampón. Analizamos por WB la presencia de CaM.

Nota: Se trata de una interacción lábil y al mismo tiempo queremos evitar un falso positivo debido a la abundancia de CaM. Por eso partimos de 1mg de proteína, el tampón que usamos no es muy astringente y realizamos tres lavados. Durante el WB también usamos las condiciones más sensibles, incubando el α-CaM toda la noche a 4°C y revelando con Super Signal West Dura.

3.6. Nivel de fosforilación de Trk

Existen anticuerpos específicos contra las Tyr de Trk fosforiladas, sin embargo resulta más sensible inmunoprecipitar Trk con el anticuerpo α-203 y detectar la fosforilación total en Tyr con el anticuerpo 4G10.

El tampón de lisis para la inmunoprecipitación de Trk que usamos es: 20mM Tris pH 7'4, 140mM NaCl, 10mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 1mM Na₃VO₄, 25mM NaF, 40mM beta-glicerofosfato e inhibidores de proteasas de Roche.

Una vez tratadas las células lavamos 2 veces con PBS frío y continuamos el proceso en hielo. Si no vamos a lisar inmediatamente, aspiramos bien y congelamos a -80°C. Para la lisis (todo el proceso a 4°C) añadimos el tampón directamente sobre la placa, lo esparcimos con una espátula de plástico y recogemos las células en un tubo de 1'5ml. Incubamos en agitación orbital durante 20min para completar la lisis, y centrifugamos 15min a 13.000rpm para eliminar los restos celulares no solubilizados y los núcleos.

Inmunoprecipitamos a partir de 300µg-1mg de proteína total, con 1µl de α-203 y 20µl de proteína A-sefarosa. Incubamos los lisados toda la noche a 4°C en agitación orbital. Lavamos tres veces con el mismo tampón pero sin inhibidores de proteasas, centrifugando a 1000g 1min. Finalmente se añade tampón de carga y se procede a su análisis por SDS-PAGE y western blot.

3.7. Ensayo actividad kinasa *in vitro*

Para el ensayo de actividad kinasa de TrkA, utilizamos como sustrato un fragmento de FRS2 (GST-FRS2¹⁻²⁴⁰) que contiene el dominio PTB (de unión a Tyr fosforiladas) y la Tyr fosforilada por Trk. Lo expresamos y purificamos de *E. coli* como proteína de fusión a GST, según se ha descrito para las construcciones GST-Trk (punto 3.2).

Para testar la actividad kinasa *in vitro* transfectamos los mutantes de Trk en PC12^{nr5}: 1p60 por condición en placas recubiertas con poli-DL-ornitina. Transfectamos con LF2000, y a las 48h de la transfección deprivamos de suero o/n. Tratamos con NGF 100ng/ml 0, 5 o 30 min. Lavamos con PBS y congelamos la placa a -80°C.

Procedemos a la lisis en 200µl de tampón NP-40: 25mM HEPES pH 7'4, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 10% Glicerol, 1%NP-40, 1mM Na₃VO₄, 25mM NaF, 40mM β-glycero-fosfato e inhibidores de proteasas.

Preparamos la IP con 1mg de proteína, 1µl de α-203, 15µl de bolas de Proteína A-sefarosa y añadimos SDS hasta una concentración final de 0'1%. Incubamos en agitación orbital o/n a 4°C.

Lavamos las bolas con tampón de lisis dos veces, una vez en tampón de litio (50mM HEPES pH 7'4, 500mM LiCl) y finalmente una vez en el tampón KBW (50mM HEPES pH 7'4, 10mM MgCl₂, 5mM MnCl₂).

Añadimos a cada tubo: 25µl de KBW suplementado con 1mM DTT, conteniendo 1 µg de sustrato (GST-FRS2). Añadimos 5µl de ATP-mix (tampón KBW con 1mM DTT, 0'3mM ATP) conteniendo 5µCi γ³²P-ATP por muestra.

Incubamos 30min a 30°C en agitación y paramos la reacción añadiendo 6µl de tampón de carga 5x.

Al seguir el protocolo de WB debemos tener cuidado de no contaminar el material. Una vez transferido dejamos secar la membrana y obtenemos la imagen de autoradiografía que requerirá una exposición larga, generalmente o/n. A continuación hidratamos la membrana y procedemos a las inmunodetecciones.

3.8. Marcaje de proteínas de membrana con biotina

Detección del nivel de proteína en membrana:

Utilizamos PC12^{nmr5} transfectadas con las construcciones de Trk por el protocolo de la LF2000, 1 p35 por condición. Sometemos las células al tratamiento con NGF. Las sacamos del incubador y las ponemos inmediatamente en hielo para evitar que pueda continuar la internalización. Biotinilamos con el reactivo EZ-Link® Sulfo-NHS-Biotin (#21217 Pierce) que va a reaccionar con las aminas primarias. Incubamos en hielo durante 30min. A continuación lavamos con TBS y pasamos a la lisis con tampón RIPA (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% Deoxicolato, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 40mM NaF, 1mM Na₃VO₄ e inhibidores de proteasas). Cuantificamos y a partir de la misma cantidad de proteína, precipitamos mediante bolas de estreptavidina-agarosa la fracción de proteína biotinilada. Lavamos tres veces con tampón RIPA y analizamos por WB la cantidad de Trk en la membrana en cada condición.

Detección de proteínas internalizadas:

Marcamos las proteínas de membrana con biotina a temperatura ambiente: Lavamos dos veces con PBS. Incubamos con el reactivo EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin (#21331 Pierce), a RT durante 5min. Lavamos rápidamente con TBS para inactivar la NHS-SS-biotina. Añadimos el medio con o sin NGF e incubamos a 37°C durante varios tiempos.

Eliminación de la biotina no internalizada: A partir de aquí mantenemos las células en hielo y usamos todos los tampones fríos. Incubamos dos veces con la solución: 50mM GSH, 75mM NaCl, 10mM EDTA, 1%BSA, 0.075N NaOH, que va a reducir el enlace S-S por el que está unida la biotina, de esta forma solo la biotina que está internalizada queda protegida. Hacemos dos lavados con iodoacetamida (5mg/ml en PBS), un último lavado con TBS y pasamos a la precipitación como en el caso anterior.

3.9. Preparación de muestras para MALDI-TOF

El análisis de la fosforilación por MALDI-TOF, requiere la mayor cantidad de proteína que sea posible obtener, por lo que utilizamos células PC12^{6/15}. Para incrementar la proporción de receptor fosforilado en residuos Tyr o Ser/Thr,

además de las condiciones no tratado (NE) y NGF 5min, utilizamos dos condiciones de tratamiento con NGF en presencia ya sea de un inhibidor de Ser/Thr fosfatasas, la caliculina A o bien un inhibidor de Tyr fosfatasas, el ortovanadato. Para ello sembramos 2 placas de p150mm pretratadas con poly-ornitina por condición con células PC12^{6/15}. Una vez alcanzado un 70-80% de confluencia, tratamos con 100 ng/ml de NGF durante 5 min, 20nM caliculina A con NGF durante 30 min o bien 1mM ortovanadato sódico con NGF durante 30 min. Al finalizar el tratamiento, lisamos y procedimos a inmunoprecipitar TrkA a partir de la máxima cantidad de proteína disponible, con 10 μ l de anticuerpo α -203 según se ha descrito en el apartado 3.6. a excepción del tampón usado que en este caso es RIPA.

Las muestras fueron cargadas en un gel del SDS-PAGE 8%. Después de la separación de las proteínas el gel se tiñó con Coomassie coloidal G-250 y se visualizaron las bandas de TrkA correspondientes a gp140 y gp110. El gel se envió al grupo de Ole Noerregaard Jensen en Odense, Dinamarca. Las muestras fueron procesadas por Elisabetta Boeri Erba quien se encargó de cortar las bandas del gel, hacer la digestión con tripsina, extraer los péptidos y hacer la purificación de fosfopéptidos por IMAC (Boeri Erba et al. 2005) y un posterior enriquecimiento con TiO₂ (Larsen et al. 2005). Las muestras fueron analizadas por MALDI-TOF para la detección de los fosfopéptidos y por MS/MS para la secuenciación e identificación de los sitios de fosforilación.

4. Biología Celular ---

4.1. Inmunofluorescencia (IF)

Si vamos a utilizar microscopia confocal, o fijación con acetona, plantaremos las células sobre cubreobjetos (*cubres*) previamente autoclavados. Pondremos un *cubre* en cada pocillo de la placa y procederemos al pretratamiento con poli-D-lisina, poli-DL-ornitina o colágeno.

Cultivo: Plantaremos las células a la densidad adecuada: 200.000/p35 para transfectar, 300.000/p35 si vamos a tratarlas o 25.000/M4 para diferenciar.

Fijación: Una vez finalizado el tratamiento lavamos con PBS y fijamos con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS. Si las células tienen tendencia a desprenderse por estar diferenciadas o por el tratamiento con determinadas drogas, añadiremos el PFA 8% directamente sobre el medio de cultivo de manera que la concentración final sea del 4%.

En el caso de IF contra CaM, fijamos 5min con PFA 4% y a continuación 1min con Acetona (-20°C). Al usar acetona hay que tener cuidado porque reacciona con el plástico, puede llegar a romper la placa, y por tanto es necesario cambiarla a continuación.

Lavamos 3 veces con PBS, siempre con cuidado y sin dejar secar la preparación.

Permeabilización: no debemos excedernos en el tiempo de permeabilización para evitar que aumente el marcaje inespecífico del interior de la célula. Para el marcaje de Trk con α -203 utilizamos 1min con 0'5% de Tritón X-100.

Bloqueo: Bloqueamos 30min con 0'5% BSA y 1% FCS (suero de vaca fetal).

Anticuerpos: diluimos los anticuerpos en PBS y 1/5 de solución de bloqueo: 1:1500 α -203, 1:50 α -CaM (Upstate #05-173). Incubaremos el primario 1h RT o toda la noche a 4°C (recomendado para α -CaM). En caso de incubaciones largas dejaremos las placas en una cámara húmeda para evitar que se sequen. Si la cantidad de anticuerpo de que disponemos es limitante podemos incubar con 50 μ l de la dilución poniendo una capa de *parafilm* directamente encima. Lavar 3 veces con PBS, e incubar con el secundario: 1:500 Rabbit IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes #A-11008), 1:150 Mouse IgG-RRX (Jackson #715-295-150).

Montaje: Si vamos a montar el *cube* sobre un *porta*, es recomendable hacer un último lavado con agua miliQ, así evitamos que queden cristales de sal. Podemos montar con Mowiol o con Vectashield, teniendo cuidado en ambos casos de que no queden burbujas de aire. El Vectashield tiene un mayor efecto protector de la fluorescencia pero tiene el inconveniente de ser líquido, así que deberemos fijar el *cube* con pegamento y sellarlo con laca de uñas si vamos a ponerlo invertido sobre el objetivo.

Notas:

*Si deseamos usar un marcador nuclear como el Hoechst podemos añadirlo junto con el anticuerpo secundario, así evitamos su foto-degradación durante todo el proceso.

*Es recomendable centrifugar la dilución de los anticuerpos o Hoechst durante 5min a 13000rpm para eliminar los agregados que se hayan podido formar y que ensuciarían la preparación.

* Si hemos transfectado alguna proteína fluorescente debemos proteger las placas de la luz en todo momento. Sino sólo después de añadir el anticuerpo secundario.

4.2. FRET

Plantamos PC12^{nr5} sobre cubres pretratados con poly-D-lisina. Transfectamos con LF2000 las construcciones CaM-CFP y TrkA-YFP, así como los controles YFP y CFP. Tratamos con NGF durante 5 o 15 min. Fijamos con PFA 4%, lavamos y montamos con Mowiol.

Definimos los canales del microscopio: (Fig. MM-3)

- Donador: λ^{436} excitación del donador, λ^{470} emisión del donador.
- Aceptor: λ^{500} excitación del aceptor, λ^{535} emisión del aceptor.
- FRET: λ^{436} excitación del donador, λ^{535} emisión del aceptor.

Empezamos tomando las imágenes de los controles de sangrado entre canales:

- FRETa: Fluorescencia emitida por el aceptor excitado a la longitud de onda de excitación del donador. Es decir: canal FRET en células transfectadas solo con el aceptor (YFP).
- FRETd: Fluorescencia emitida por el donador captada a la longitud de onda de emisión del aceptor. Es decir canal FRET en células transfectadas solo con el donador (CFP).

A las imágenes obtenidas se les sustrae el *background* y calculamos los factores de corrección (C) para evaluar el sangrado entre canales, de la siguiente manera:

$$C_a = \text{FRET}_a / \text{aceptor}$$

$$C_d = \text{FRET}_d / \text{donador.}$$

Que serán constantes a lo largo del experimento. Tomamos para cada muestra las imágenes de los tres canales (siempre con la misma intensidad que hemos usado para los controles), sustraemos a la imagen FRET las imágenes del aceptor y el donador corregidas por sus respectivos factores de corrección, según el método de Youvan (Youvan et al., 1997).

$$\text{FRET}_c = \text{FRET} - C_d \times \text{Donador} - C_a \times \text{Aceptor}$$

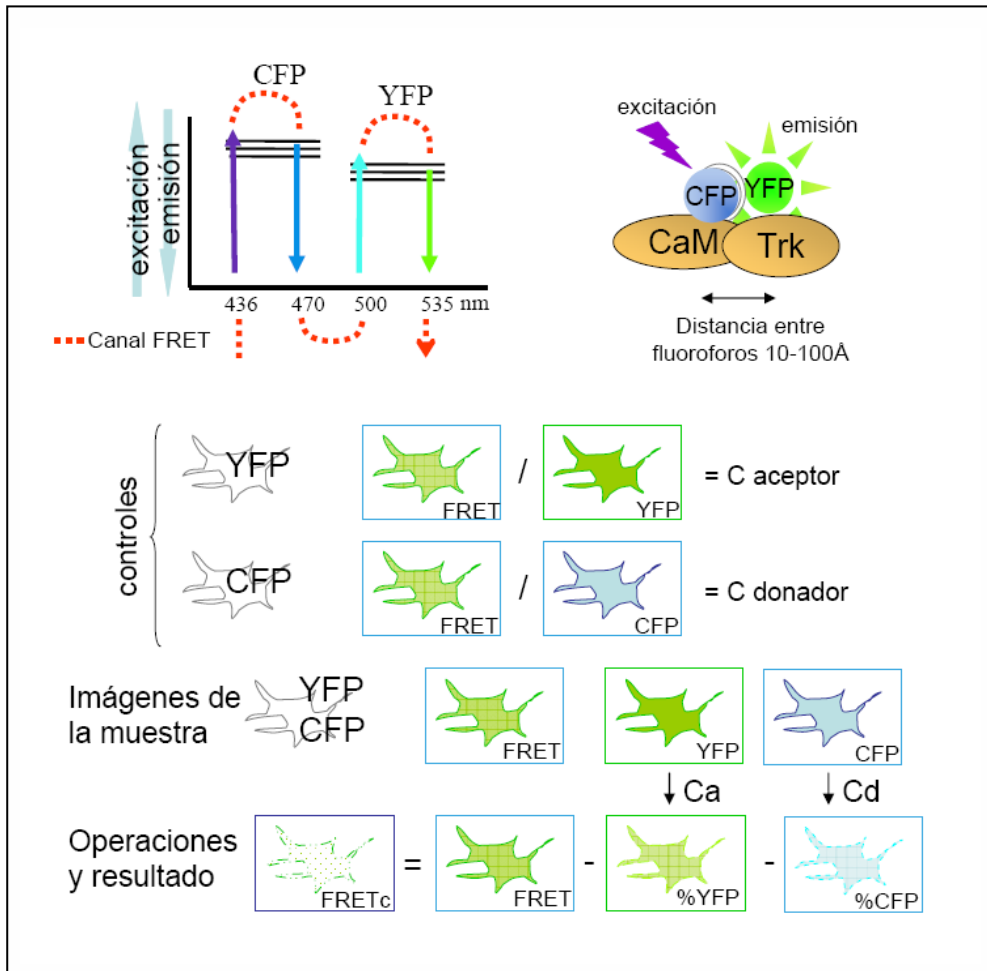


Fig MM3. Esquema de la técnica FRET:

En la figura se representa los niveles de energía entre los que se produce emisión y excitación. La emisión de CFP es próxima a la excitación de YFP de forma que puede producirse resonancia entre ambas y captaremos la emisión de YFP por la excitación de CFP. Especialmente deben encontrarse muy próximas, entre 10-100Å. La segunda parte del esquema representa las operaciones entre imágenes que realizamos para obtener la imagen final de FRET corregido (FRET_c).

Para observar mejor la imagen de FRET la representamos con una escala de colores y aplicamos un filtro que reduce el fondo a través de la media entre valores próximos, de forma que permite observar mejor las estructuras positivas.

A continuación realizamos medidas de la intensidad de señal en las regiones de membrana o del interior celular con mayor FRET, teniendo en cuenta que se estén expresando ambos fluorocromos. Podemos normalizar el resultado por el aceptor o por la raíz cuadrada del producto donador-aceptor.

Las imágenes mostradas fueron obtenidas por la Dra. Maria Calvo del SCT- Servei Microscopia Confocal, Hospital Clínic-UB. En un microscopio confocal espectral Leica TCS-SL (DMIRE2-SDK) con un objetivo de inmersión de 100X.

4.3. Ensayo de diferenciación de PC12^{nnr5}

Pretratamos las placas con poli-D-lisina y colágeno. Plantamos 25.000 células por pocillo de M24. A las 4 h aprox. transfectamos con LF2000. A las 24h de la transfección iniciamos el tratamiento con 100ng/ml NGF en DMEM suplementado con 0'5% de suero de caballo. Renovamos el NGF, cada 3 días, cambiando la mitad del medio.

A partir de los 5 días de tratamiento fijamos las células con PFA al 4% e iniciamos el protocolo de inmunofluorescencia con los parámetros: permeabilización 1 min con 0'5% Tritón X-100 en PBS, α -TrkA (203) como primario 1 hora a temperatura ambiente, diluido 1/1000 y secundario unido a un fluorocromo verde (Alexa Fluor 488), 30 min RT.

Para el recuento utilizamos un microscopio óptico de fluorescencia Olympus IX70/U-RFL-T. Descartamos las células con una fluorescencia casi imperceptible y aquellas excesivamente verdes, ya que el nivel de expresión del Trk transfectado está fuera del límite fisiológico. Contamos el porcentaje de células diferenciadas respecto al total, considerando diferenciadas aquellas que tienen prolongaciones mayores que dos veces la longitud del cuerpo.

Nota: En la bibliografía encontramos muchos ejemplos en los que se realiza este tipo de ensayo para evaluar la funcionalidad de Trk. Sin embargo el grado de diferenciación obtenido con las PC12^{nnr5} transfectadas, aun con un Trk wt, no llega a ser comparable al de las PC12, en que toda la población puede diferenciarse.

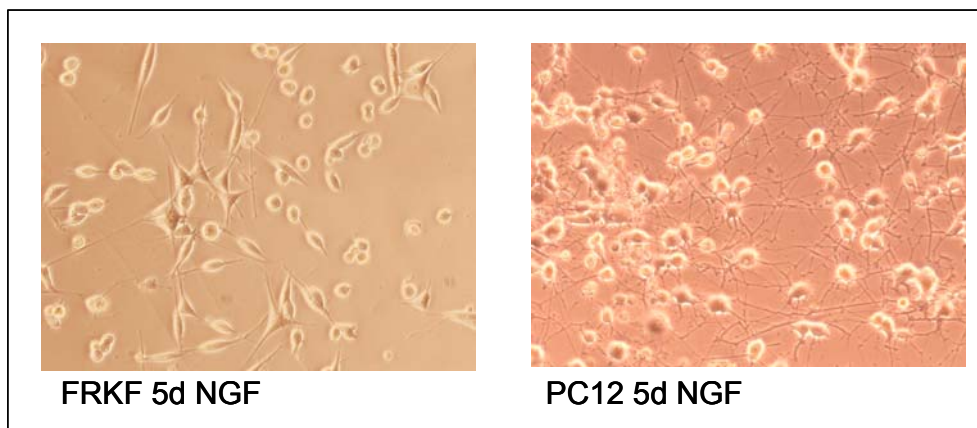


Fig MM4. Diferenciación en PC12

Diferencias en el nivel de diferenciación entre PC12wt y PC12 transfectadas con un Trk activo. Tratadas durante 5 días con NGF.

4.4. Detección por IF de Trk internalizado

Transfectamos las construcciones de los Trk mutantes en PC12^{nnr5} por el método de la LF2000. Esperamos 48h para la expresión y tratamos con el anticuerpo RTA (Upstate #06-574) que se ha descrito que puede activar Trk en ausencia de NGF (Clary et al., 1994). Utilizamos una dilución 1:10 en medio completo, durante 15', 30', 2h, 4h a 37°C o 1h a 4°C.

A continuación fijamos y seguimos el protocolo de IF general usando como solución de bloqueo: 5% HS, 5% FBS, 3mg/ml Glicina, 0'1% triton X-100 en PBS.

Añadimos el segundo anticuerpo primario: α -TfnR (#13-6800 Zymed) para las muestras de 0, 15 y 30 min NGF y el marcador lisosomal LAMP (#ab13523 Abcam) para las muestras de 2 y 4h. Incubamos 1:500 en PBS 1h RT.

Lavamos e incubamos con el secundario: α -mouse Alexa Fluor 594 (#A11005 Molecular Probes) y anti-Rabbit IgG- Alexa Fluor 488 (#A11008 Molecular Probes), ambos 1:500, 1h RT.

Montamos sobre cobre y obtenemos las imágenes en un microscopio confocal Olympus XT FV500, con un objetivo de inmersión de 60x. Utilizamos el programa Image J para obtener la superposición de los dos canales. Para obtener la imagen de colocalización realizamos la operación lógica AND, entre los dos canales, de forma que solo nos enseña los píxeles con ambos marcajes.

5. Herramientas bioinformáticas ---

5.1. CLUSTALW:

Realizamos los alineamientos múltiples con wClustal (Thompson et al., 1994) *ClustalW WWW Service at the European Bioinformatics Institute*. Rodrigo Lopez, Services Programme and Andrew Lloyd. The ClustalWWW server at the EBIembnet.news volume 4.2 1997.

www2.ebi.ac.uk/embnet.news/vol4_3/clustalw1.html

5.2. Estructura 3D:

Las representaciones 3D de proteínas se han obtenido con Protein Explorer ver.2.45 beta. Eric Martz © 2005.

El modelado por homología se ha obtenido a través de la aplicación: Swiss-Model version 36.0003 (Guex and Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003).

<http://swissmodel.expasy.org/>

Hemos utilizado como molde las estructuras de las 4 secuencias más similares de entre las resueltas, según el alineamiento con ClustalW del dominio TK o la región intracelular cristalizada:

- Forma activa: *IGF1RK (40'95%, 1K3A), IRK (41'5%, 1IR3), VEGFR2 (36'2%, 1VR2), c-kit (36'22%, 1PKG).
- Forma inactiva: Musk (53'25%, 1LUF), IGF1RK (39'13%, 1M7N), IRK (40'6%, 1IRK), FAK (42'7%, 1MP8).

*nomenclatura: nombre de la proteína (% identidad respecto a TrkA de la región alineada, código de 4 dígitos del PDB). Los archivos PDB provienen del *Protein data bank*. <http://www.pdb.org>

5.3. Representación en α -hélice

El α -hélice es un tipo de estructura secundaria en que la cadena proteica forma una hélice dextrógira característica de 3'6aa por vuelta estabilizada por puentes de hidrógeno. La representación de la estructura de una región si los aa estuvieran formando una α -hélice permite determinar si siguen alguna distribución en función de su hidrofobicidad o carga y ello puede ayudar a entender la función de la región. Hemos utilizado la aplicación:

<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>

5.4. Predicción de fosforilaciones:

Netphos consiste en una base de datos de Ser, Thr y Tyr que son fosforiladas, y las secuencias de fosforilación de las kinasas conocidas. Permite introducir una secuencia y busca en ella la probabilidad de cada Ser, Thr o Tyr de ser fosforilada.

Netphos 2.0: www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ (Blom et al., 1999)

La aplicación GPS (Group-based Phosphorylation Scoring method), contiene una base de datos más amplia y determina la probabilidad para cada kinasa conocida individualmente (Xue et al., 2005), (Zhou et al., 2004).

GPS: http://973-proteinweb.ustc.edu.cn/gps/gps_web/predict.php

5.5. pDRAW:

Es un programa descargable gratuito que permite representar y manipular las construcciones de DNA, de manera que nos ayuda a diseñar las estrategias de clonaje. pDRAW32 by Kjeld Olesen. Acaclone software: www.acaclone.com

5.6. MAX Chelator:

En un medio complejo como puede ser un lisado celular, no podemos conocer la concentración exacta de cada ión, por ello, si queremos obtener una concentración determinada de un ión debemos añadir una concentración superior de la sal y también del agente quelante, para que en el equilibrio la concentración del ión sea la deseada, minimizando el efecto de los iones y quelantes endógenos.

La aplicación MaxChelator permite calcular la concentración de Ca^{2+} libre en una solución en la que conocemos la concentración de sales de calcio y agentes quelantes: www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html (Patton et al., 2004).

5.7. ChemIDplus:

Permite representar las estructuras químicas, servido por TOXNET<TEHIP< NLM. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

5.8. Calmodulin target database:

Base de datos sobre proteínas de unión a CaM (incluyendo el motivo reconocido) y herramientas para buscar lugares putativos de interacción y sus características. <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/flash.htm>

5.9. ImageJ

Aplicación que permite visualizar y tratar las imágenes obtenidas con cualquier microscopio, sin necesidad de tenerlo conectado. Permite delimitar una región y cuantificar la intensidad, variar los colores con que queremos presentar la imagen y realizar operaciones con imágenes y/o escalares. ImageJ ver.1.36b por Wayne Rasband. NIH, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

5.10. Scion Image

Programa gratuito que entre otras aplicaciones, permite cuantificar la intensidad de las bandas del WB. a partir de la imagen escaneada del film en formato Tiff. Scion Image for Windows ver.4.0.2 beta. Scion corporation © 2000. www.scioncorp.com

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Regulación de TrkA por CaM_____

1.1. Interacción de CaM con TrkA

Interacción en lisados celulares

Colaboradores de nuestro grupo obtuvieron evidencias de que CaM podría estar interaccionando con los receptores Trk. Por este motivo nos propusimos analizar si CaM se unía a Trk y en que situaciones.

Para detectar dicha interacción utilizamos CaM recombinante unida a bolas de sefarosa para precipitar el TrkA presente en lisados celulares de PC12 y PC12^{6/15}. Testamos la dependencia de Ca²⁺ añadiendo CaCl₂ o EGTA al lisado en el momento de realizar la precipitación, y también el efecto de la fosforilación de TrkA sobre la unión, tratando las células previamente con NGF 5 min.

En la Fig R1 vemos que TrkA interacciona con CaM en presencia de Ca²⁺, y que no se produce unión inespecífica con la sefarosa sin recubrir (carriles Seph) o en ausencia de Ca²⁺ (EGTA). La unión se produce tanto en PC12 como en PC12^{6/15}, por ello utilizaremos estas últimas en los experimentos sucesivos de interacción, ya que el anticuerpo anti-Trk(α -203) reconoce mejor la forma humana que la de rata.

Sabemos que el tratamiento de las PC12 con NGF durante 5 min es suficiente para la activación y autofosforilación de TrkA en las Tyr del loop de activación, Y496 y Y791 (no mostrado) pero en cambio no vemos que ello tenga efecto sobre la unión a CaM. Dado que la proporción de Trk fosforilado respecto el Trk total es baja, tratamos las células 6/15 con NGF 5 min o con el inhibidor de Trk k252a durante 30min para eliminar la activación basal que pueda haber y maximizar las diferencias. Lisamos y procedemos a la precipitación con CaM-Seph. En este caso revelamos con un anticuerpo específico de la Y496 fosforilada. Como podemos observar en la figura R1-B tanto la forma activada por autofosforilación como la no fosforilada en Y496 pueden unirse a CaM, por lo que se puede afirmar que esta unión es independiente de la activación del receptor.

Resultados

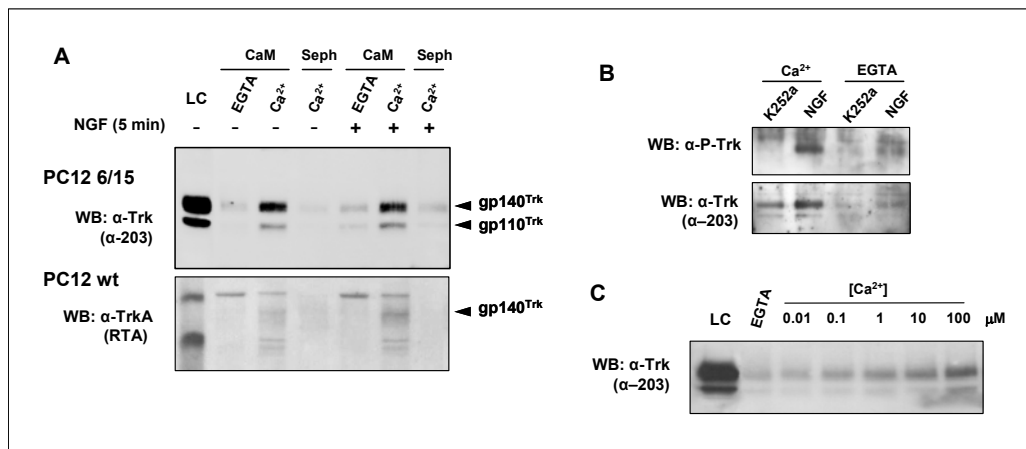


Fig R1. CaM interacciona con Trk en lisados de células PC12. (A) Los lisados de PC12^{6/15} (panel superior) o PC12 (inferior), tratadas, o no, con NGF 100ng/ml durante 5min, fueron sometidos a precipitación con CaM-sefarosa (CaM) o con sefarosa sin recubrir (Seph), en presencia de 2mM EGTA o 100μM CaCl₂. (B) PC12^{6/15} tratadas con NGF 5 min o K252a 30min, sometidas a precipitación con CaM-Seph en presencia de Ca²⁺ o EGTA. Trk fue inmunodetectado con el anticuerpo específico de Y496 fosforilada (panel superior) o Trk total (panel inferior). (C) Dependencia de Ca²⁺ en la interacción Trk-CaM. Las PC12^{6/15} fueron lisadas y sometidas al experimento de interacción con CaM-sefarosa. En el tampón de interacción se añadió EGTA 2mM o las concentraciones de CaCl₂ indicadas. El primer carril (LC) corresponde a una muestra de lisado celular.

Para profundizar en el requerimiento de Ca²⁺ en la unión, realizamos la precipitación con CaM-Seph sobre lisados de células PC12^{6/15} no tratadas añadiendo concentraciones crecientes de Ca²⁺ en el tampón de precipitación (Fig. R1-C). El resultado muestra que la unión es dependiente de la concentración de Ca²⁺ y que la precipitación de Trk aumenta en el rango de concentración de 100mM a 100μM de Ca²⁺.

Interacción con proteína recombinante

Una vez demostrada la existencia de unión entre TrkA y CaM, nos propusimos analizar si se trata de una unión directa. Como los experimentos anteriores han sido realizados sobre lisados celulares, cabría la posibilidad que la unión estuviera mediada por otra proteína presente en la célula. Por ello el siguiente paso fue expresar el dominio intracelular de TrkA (aminoácidos 433-796) de forma recombinante en *E coli*, y observar si se une a CaM-Seph sin otras proteínas que puedan mediar la interacción.

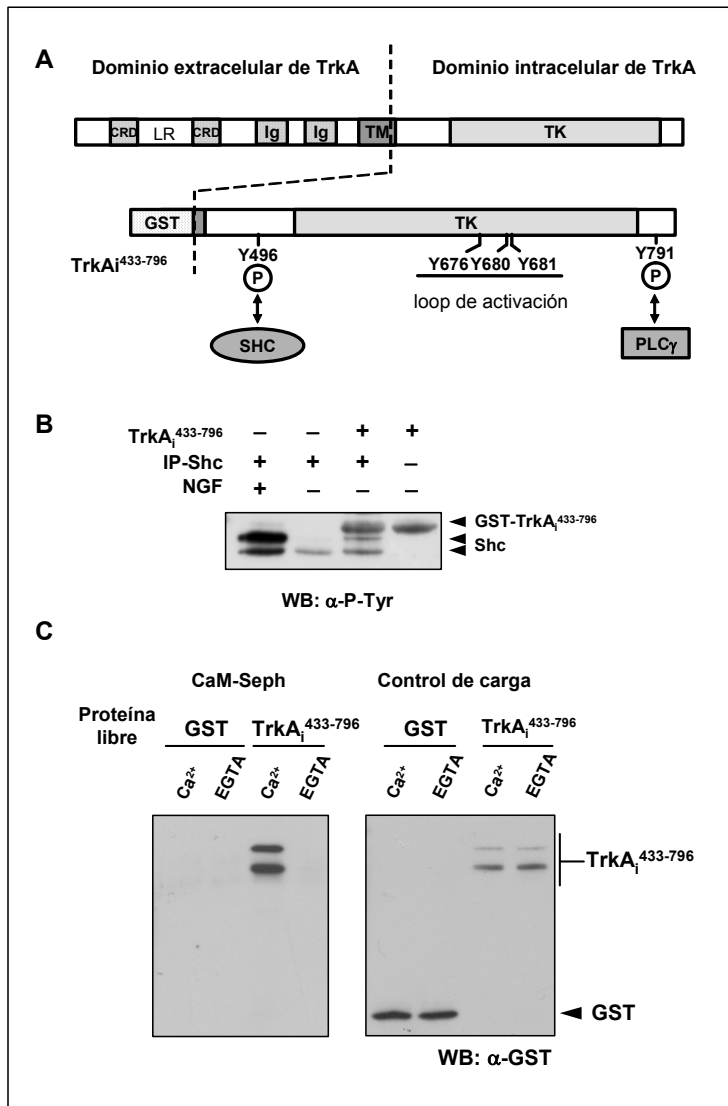


Fig R2. La unión TrkA-CaM es directa.

(A) Esquema de la construcción del dominio intracelular de TrkA fusionado a GST. (TM) dominio transmembrana. (TK) dominio tirosina quinasa. (CRD) dominios ricos en Cys. (LR) Repeticiones de Leu. (GST) fragmento de GST que confiere unión a GSH. (Ig) dominio inmunoglobulina.

(B) Ensayo de actividad kinasa de TrkA sobre Shc. Se incubó Shc inmunoprecipitado de PC12 con TrkAi y ATP. Detectamos la fosforilación en Tyr mediante WB.

(C) Ensayo de interacción entre CaM-sefarosa y TrkAi o GST solo. En presencia de Ca²⁺ (100μM) o EGTA (2mM). Detectamos TrkAi mediante el epítipo GST por WB, en el panel de la izquierda sobre la fracción unida a bolas de CaM-sefarosa y en la parte derecha sobre una alícuota de la proteína libre usada en el ensayo como control de carga.

CaM es una proteína intracelular, por lo que si esta interacción tiene una función fisiológica tendrá que implicar el dominio intracelular de Trk. Además podemos favorecer la expresión en *E. coli* con un plegamiento correcto del receptor si eliminamos la región extracelular. La construcción presenta GST fusionada en pauta en el extremo N-terminal que nos va a permitir su purificación por unión a bolas de GSH-sefarosa (Fig R2a).

Para comprobar que el TrkAi que obtenemos es funcional, y por tanto su plegamiento correcto, lo utilizamos en un ensayo kinasa *in vitro* con Shc inmunoprecipitado a partir de PC12 como sustrato (Fig R2b). Detectamos la fosforilación por western blot mediante el anticuerpo específico de Tyr fosforiladas

Resultados

(4G10). Como control positivo tenemos Shc inmunoprecipitado de células estimuladas con NGF 5min (primer carril). Vemos que el grado de fosforilación basal de Shc procedente de células no tratadas es mucho menor (segundo carril). En el tercer carril vemos como el TrkAi recombinante obtenido en *E. coli* es capaz de autofosforilarse y de fosforilar a Shc.

Tras eluir TrkAi recombinante de las bolas, mediante glutatión, lo utilizamos en experimentos de precipitación con CaM-sefarosa. Obtenemos el mismo resultado que con el lisado de PC12 (Fig R2C): se produce unión dependiente de Ca^{2+} y es específica porque no hay unión de GST solo. De esta forma podemos concluir que la unión del dominio intracelular de TrkA y CaM es directa.

Para delimitar la zona en que se produce la unión utilizamos la región intracelular de TrkA dividida en dos construcciones (Fig R3A): fragmento proximal aa 433 a 674, que mantiene una parte del fragmento transmembrana, y el fragmento C-terminal aa 675 a 796, que incluye el loop de activación.

Procedimos a analizar la interacción de la misma forma que en el apartado anterior. En la figura R3B vemos que la interacción se mantiene en el fragmento

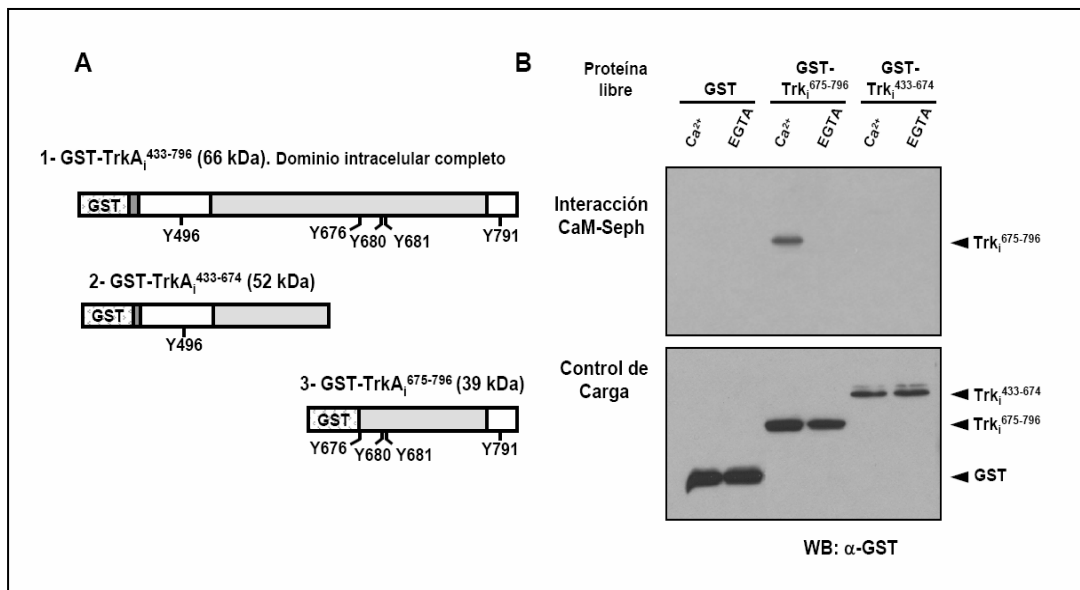


Fig R3. CaM se une directamente a la región 675-796 de TrkA.

(A) Esquema de las construcciones utilizadas: fragmento proximal (2) y C-terminal (3). (B) Ensayo de interacción con las proteínas recombinantes: GST sola, la parte C-terminal (TrkA_i⁶⁷⁵⁻⁷⁹⁶) y la parte proximal (TrkA_i⁴³³⁻⁶⁷⁴). En el panel superior se detecta por WB la presencia de GST o GST-Trk en la fracción unida a CaM-Sefarosa. En la parte inferior se ha analizado una alícuota de la proteína libre usada en el ensayo como control de carga.

C-terminal pero no en el proximal. De ello se deduce que el dominio de interacción está situado en la mitad distal (aa 675-796) de la parte intracelular del receptor TrkA.

Co-inmunoprecipitación Trk-CaM

Para testar si esta interacción se podría detectar en condiciones más fisiológicas, realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación en PC12^{6/15} y en neuronas corticales de embrión de rata de 18 días de gestación.

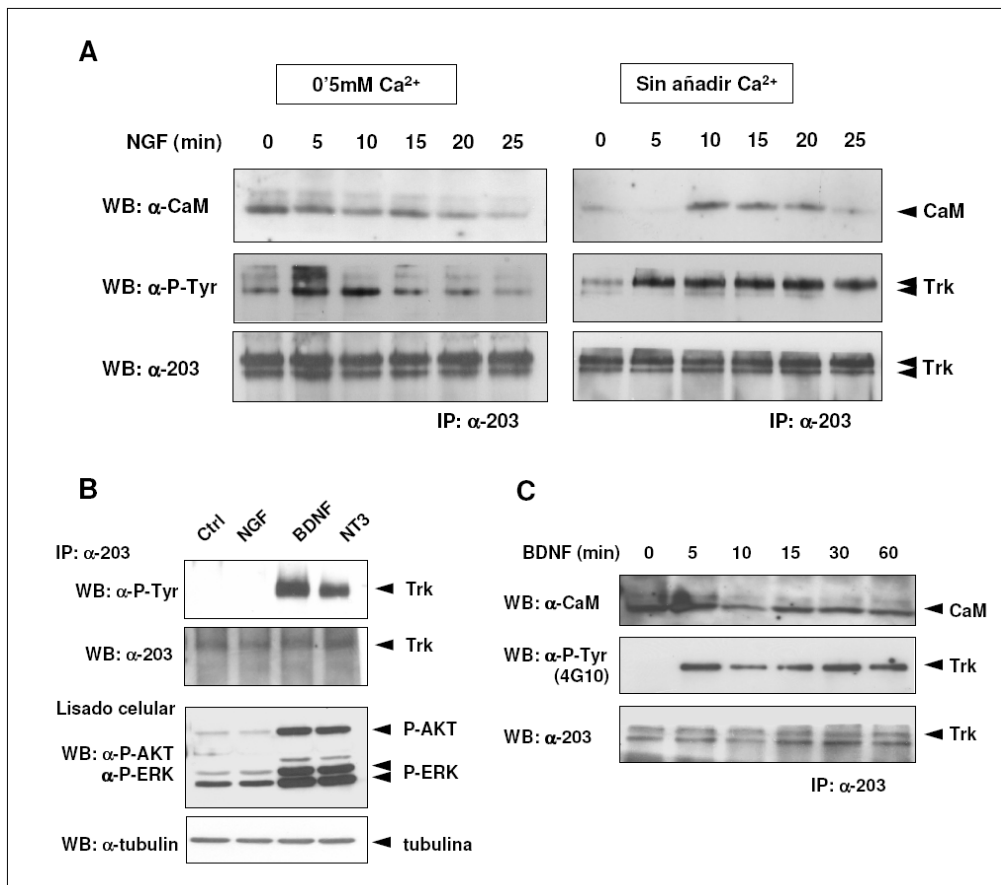


Fig 4. CaM se une a Trk en PC12^{6/15} y en corticales de embrión de rata E18.

(A) Las PC12^{6/15} fueron tratadas con NGF durante 5-25min y lisadas. Se añadió 0.5mM CaCl₂ en el lisado (izquierda) o no se modificó (derecha), y Trk fue inmunoprecipitado con el anticuerpo α-203. Por WB detectamos el grado de fosforilación en Tyr de Trk, la co-precipitación de CaM y la cantidad de Trk inmunoprecipitado. (B) Detección de la fosforilación de Trk inmunoprecipitado de corticales tratadas con NGF, BDNF o NT-3, (paneles superiores) y de la fosforilación de AKT y ERK; en el panel inferior vemos tubulina como control de carga. (C) Detección de la coprecipitación de CaM, de la fosforilación de Trk y de la cantidad total de Trk, sobre la fracción Trk inmunoprecipitada de neuronas corticales.

Resultados

En células PC12^{6/15}:

Al inmunoprecipitar Trk de células PC12^{6/15} sin añadir Ca²⁺ en el tampón (Fig 4A derecha), CaM coprecipita transitoriamente entre 10 y 20 min de estimulación con NGF. La adición de Ca²⁺ 0'5mM a los lisados (Fig 4A izquierda) permite la coprecipitación a tiempo cero y a tiempo corto de tratamiento con NGF. En cambio, a partir de los 25min, observamos que disminuye la interacción en ambas condiciones.

En neuronas corticales:

Para ver la interacción en un sistema en que no estemos sobreexpresando Trk usamos el cultivo de neuronas corticales de embrión de rata a 18 días de gestación. Estas células expresan Trk B y C, aunque no TrkA (Fukumitsu et al., 1998), como se demuestra con la fosforilación de AKT y ERK (Fig 4B abajo) mediada por la fosforilación del receptor Trk en respuesta a BDNF y NT-3, pero no a NGF (Fig 4B arriba).

En este caso, observamos que sin la necesidad de añadir Ca²⁺ en el lisado, se produce co-inmunoprecipitación de CaM con Trk en situación basal. Además esta interacción es constitutiva, se produce también en ausencia de neurotrofina y continúa observándose a los 60min de estimulación.

Estos resultados muestran que existe unión de Trk con CaM en dos modelos celulares distintos: PC12^{6/15} y neuronas corticales. Además se ha demostrado que no solo se produce la unión a TrkA, sino también a TrkB y/o TrkC. Igual que observamos en la precipitación con CaM-Seph, no guarda una relación directa con el estado de fosforilación del receptor, ya que podemos modificar la cantidad de CaM que coprecipita mediante la adición de Ca²⁺ al lisado. Por ello, la interacción podría estar regulada por el incremento de Ca²⁺ intracelular tras la estimulación o la endocitosis y transporte del receptor.

Detección de la interacción Trk-CaM por FRET

Una vez comprobado que CaM interacciona con los receptores Trk nos planteamos analizar en que lugar de la célula se produce la interacción. Para ello utilizamos la técnica de FRET, que consiste en el análisis de la transmisión de energía por resonancia entre dos fluorocromos suficientemente próximos. Para ello transfectamos las PC12^{nrf5} con CaM y Trk fusionados a dos fluorocromos adecuados para este tipo de estudio: CFP y YFP respectivamente.

En la figura R5 vemos la distribución de CaM en azul, Trk en amarillo y en el caso de la imagen final de FRET (Fc) utilizamos una escala cromática que permite resaltar mejor las diferencias de intensidad. Cuantificamos las regiones a nivel de membrana plasmática e intracelulares con mayor señal FRET y normalizamos por la cantidad de aceptor (Trk-YFP) o por la raíz cuadrada del producto aceptor-donador.

Vemos que el tratamiento con NGF produce un incremento significativo de FRET a 5min. La unión se produce tanto en la membrana plasmática como en determinadas estructuras del interior celular, también vemos que es transitoria puesto que deja de observarse a los 15min.

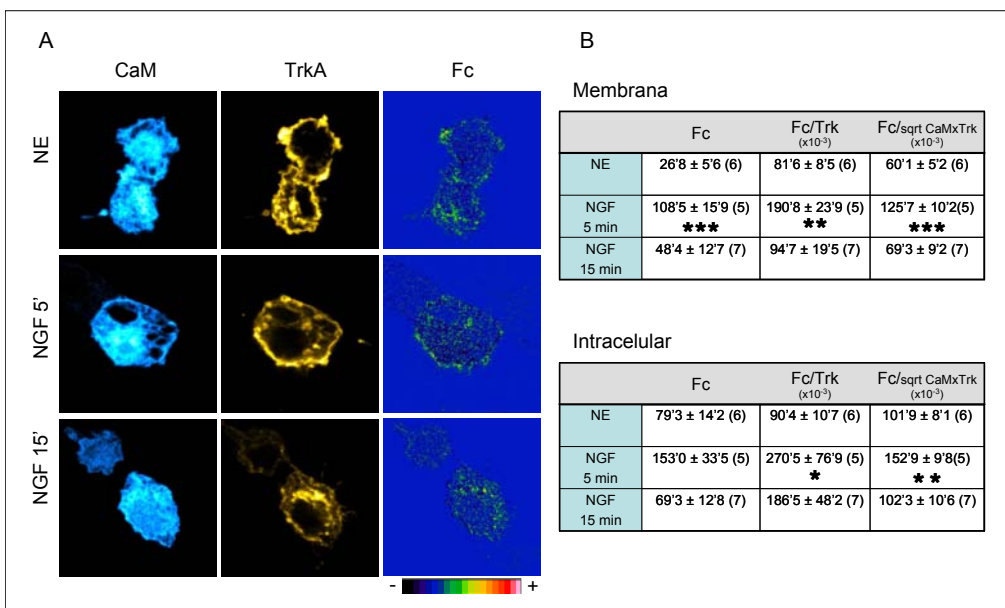


Fig R5. Resultado de FRET entre CaM y TrkA

(A) Imágenes de microscopía confocal, de PC12^{hnr5} transfectadas con Trk-YFP y CaM-CFP. En azul CaM, en amarillo Trk y a la derecha el resultado de FRETc según la escala indicada abajo. NE (no estimulado con NGF). (B) Cuantificación de FRET en regiones de la membrana plasmática y del interior celular. Se expresan los valores de FRET corregido (Fc) y normalizado por la fluorescencia del aceptor (/Trk) o la raíz cuadrada del producto donador-aceptor (/sqrt CaMxTrk). Significatividad respecto al NE: * p<0'05; ** p<0'01; *** p<0'001.

Estudio de la interacción con Dansyl-CaM

Otro método que se utiliza habitualmente para caracterizar la unión de péptidos o proteínas a CaM es la dansilación. La emisión del grupo dansilo unido covalentemente a CaM varía en función de la estructura tridimensional del complejo, y por tanto de si CaM se une al sustrato.

Resultados

En la figura 6 se muestra como se produce un desplazamiento del pico de Dansyl-CaM por el cambio de conformación al añadir Ca^{2+} o EGTA, el espectro de emisión pasa de tener su máximo de 520 a 490nm, a la vez que incrementa la intensidad de la emisión.

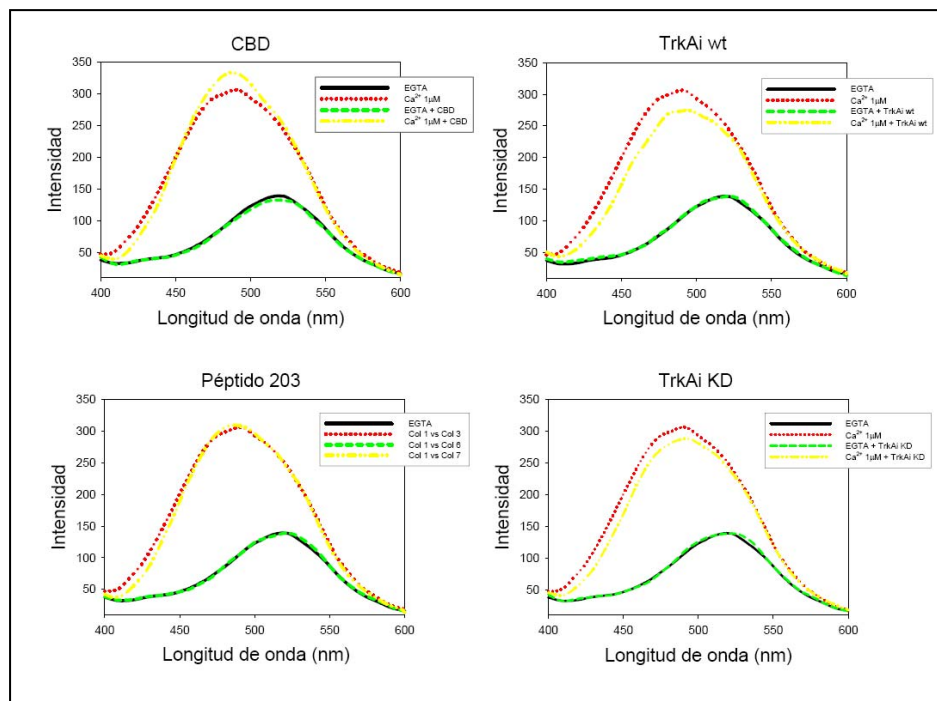


Fig R6. Espectros de emisión de dansyl-CaM. Recogidos en presencia de péptido CBD, TrkAiw, péptido 203 o TrkAiKD, según descrito en materiales y métodos.

Cuando añadimos el CBD, que es nuestro control positivo, vemos un ligero desplazamiento del pico, y un aumento de la intensidad (Fig R6, gráfico superior izquierda). Dado que disponíamos del péptido 203 (14 últimos aa del extremo C-terminal de TrkA humano), lo utilizamos para comprobar si el extremo C-terminal podía constituir el CBD de Trk. Como se puede observar en la figura, la adición de este péptido no modifica la curva de emisión de Dansyl-CaM. En el caso de utilizar la proteína recombinante (TrkAiw y TrkAiKD) vemos una disminución de la intensidad y un desplazamiento hacia la derecha, tal vez por un efecto de apantallamiento.

El incremento o disminución que observamos es muy leve. Este método parece ser más adecuado para el estudio con péptidos en lugar de la proteína entera, por lo que desestimamos su utilización para nuestros estudios.

1.2. Efecto de la inhibición de CaM sobre Trk

Fragmentación de TrkA

Nuestro grupo ha descrito anteriormente que la inhibición de CaM no altera la autofosforilación del receptor por NGF, ni el reclutamiento de proteínas adaptadoras Shc, Grb2, PLC γ (Egea et al., 2000). Sin embargo se ha visto que el uso de inhibidores de CaM aumenta la formación del fragmento p41 de TrkA, esto se observó en células CHO transfectadas de manera estable con la forma no-neuronal de TrkA (Diaz-Rodriguez et al., 2000).

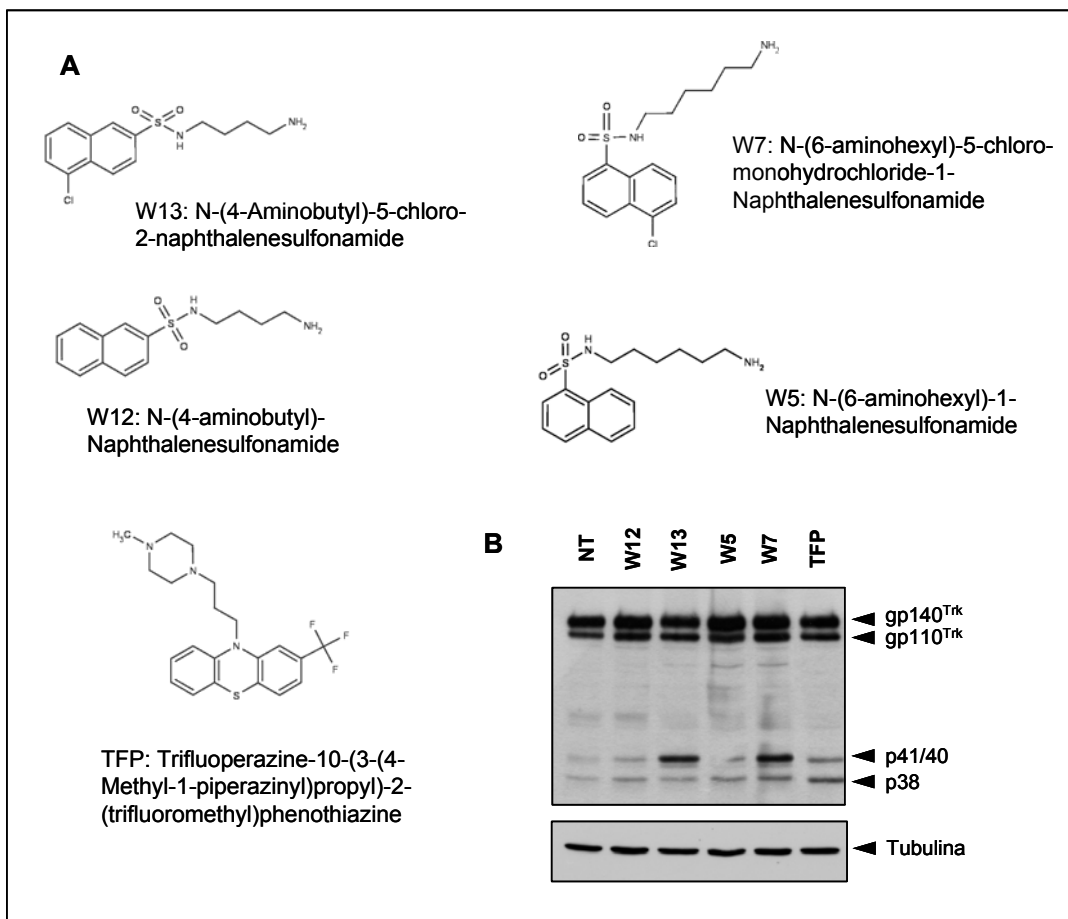


Fig R7. Inducción del procesamiento de TrkA por Inhibidores de CaM: (A) Estructura química de los inhibidores usados (B) Las PC12^{6/15} en medio de crecimiento, fueron tratadas con los inhibidores W12 (150 μ M), W13 (150 μ M), W5 (200 μ M), W7 (200 μ M) y TFP (100 μ M) durante 1h. A continuación las células fueron lisadas y la presencia de fragmentos de Trk analizada por WB mediante α -203. Detectamos tubulina como control de carga.

Resultados

Decidimos comprobar si sucede lo mismo en condiciones semi-endógenas, en el contexto de las células PC12^{6/15}. En la Fig R7 se muestra el efecto de la inhibición de CaM con: W13, W7 y TFP. Como control de su especificidad tenemos W12 y W5 que son análogos estructurales de W13 y W7 respectivamente, pero les falta un átomo de cloro, que los hace menos potentes.

Vemos como la inhibición de CaM en PC12^{6/15} lleva a un notable incremento en la formación del fragmento p41, y en menor proporción el p38; solo detectamos el fragmento p40 en condiciones en que la cantidad de p41 es muy elevada, de forma que hablaremos de p41 ya que es el mayoritario (Fig. R7B).

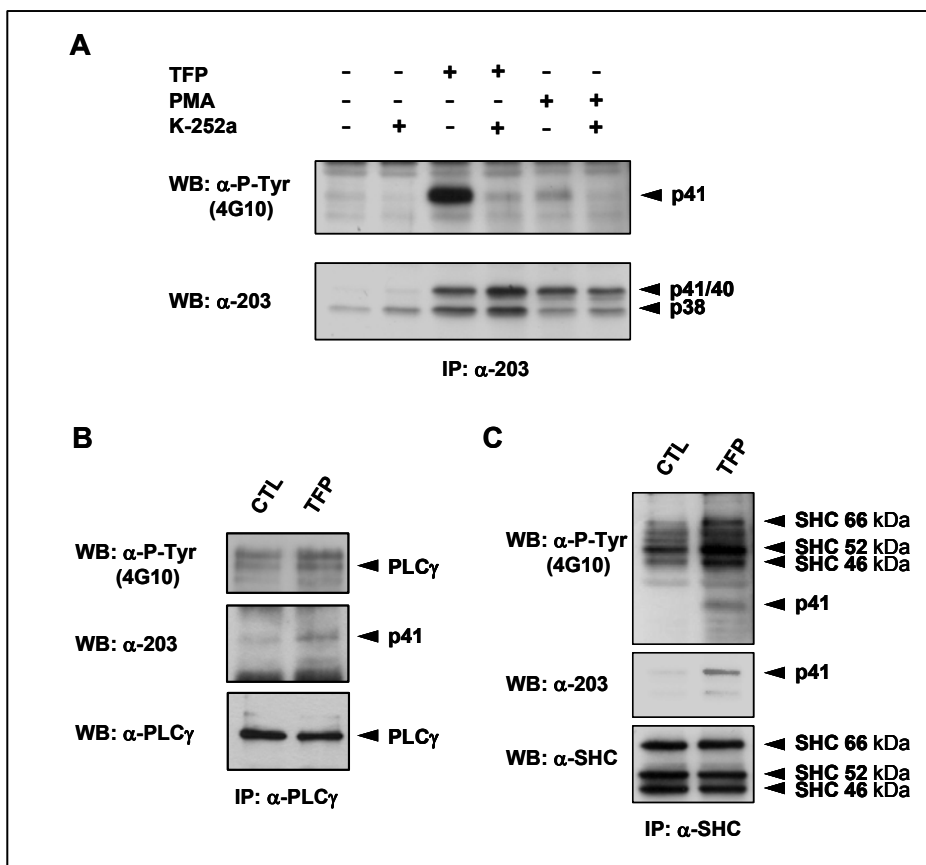


Fig R8. El fragmento p41 formado por la inhibición de CaM es activo. (A) Las PC12^{6/15} fueron pre-tratadas con el inhibidor K-252a (500 nM 30 min), y a continuación con TFP (100 μ M) o PMA (1 μ M) durante otros 30 min. Las células fueron lisadas y Trk inmunoprecipitado con α -203 conjugado a bolas de sefarosa. El grado de fosforilación de Trk se detectó mediante el anticuerpo 4G10. Comprobamos el grado de fragmentación de Trk con α -203. (B y C) Co-precipitación de p41 con PLC γ y Shc. Las PC12^{6/15} tratadas con TFP o mantenidas en medio de crecimiento (Ctl), fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación con α -PLC γ (B) o α -Shc (C). Mediante WB analizamos el grado de fosforilación en Tyr, la co-precipitación de fragmentos de Trk y la cantidad de PLC γ y Shc total inmunoprecipitado.

Este resultado apunta a que CaM está implicada en mantener la integridad de TrkA en células que lo expresan de forma endógena.

El dominio extracelular se encarga de mantener inactivo el receptor en ausencia de ligando, la eliminación del dominio extracelular TrkA conlleva su activación. Se ha descrito en células CHO que el fragmento p41 está autofosforilado y es capaz de unir PLC γ (Diaz-Rodriguez et al., 2000). Nos planteamos ver si en células PC12^{6/15} se produce el mismo efecto, para descartar que esta observación pueda deberse a un artefacto de la sobreexpresión en células CHO.

Observamos que en PC12^{6/15}, el tratamiento con TFP y PMA lleva a la formación del fragmento p41, el cual está fosforilado en Tyr (Fig R8A). Esta fosforilación es mucho mayor en la condición de TFP. Se trata además de autofosforilación ya que es inhibible por K252a, sin que se altere la cantidad total de fragmento.

Miramos también si este fragmento tiene la capacidad de reclutar los adaptadores Shc y PLC γ . Para ello inmunoprecipitamos PLC γ y Shc (Fig 8 B-C) y vemos co-precipitación de p41. Además la fosforilación de Shc incrementa con el tratamiento con TFP y aunque en menor medida también la de PLC γ indicando su activación.

Por tanto el fragmento p41 formado por inhibición de CaM es capaz de autofosforilarse y de reclutar a los efectores Shc y PLC γ .

Distribución celular de TrkA en presencia de inhibidores de CaM

Se ha descrito para otros receptores con actividad kinasa que la inhibición de CaM altera la distribución celular del receptor, causando su acúmulo en endosomas de mayor tamaño. Esto se ha visto que es debido a la inhibición del reciclaje y de la degradación (Llado et al., 2004).

Para comprobar que sucede en el caso de TrkA lo detectamos por inmunofluorescencia con α -203 en células PC12^{6/15} tratadas con NGF, W12 o W13 (Fig R9).

En las células control TrkA se encuentra principalmente en una región yuxtannuclear. También es detectable en la membrana plasmática y en algunas vesículas entre ambos compartimientos. El tratamiento con NGF 15min induce la

Resultados

internalización de TrkA, de forma que aumenta el número de vesículas y disminuye el marcaje de Trk en la membrana.

El tratamiento con W13 también conduce a la redistribución de Trk: disminuye la cantidad de Trk en la membrana, y aumenta el marcaje en vesículas internas, éstas, a diferencia de lo observado con el tratamiento con NGF, son de un tamaño mayor. En cambio el tratamiento con W12, el análogo estructural menos potente, no produce ningún efecto.

Ello nos lleva a pensar que CaM participa en la regulación del transporte intracelular de TrkA, como se ha demostrado que sucede en el caso del EGFR.

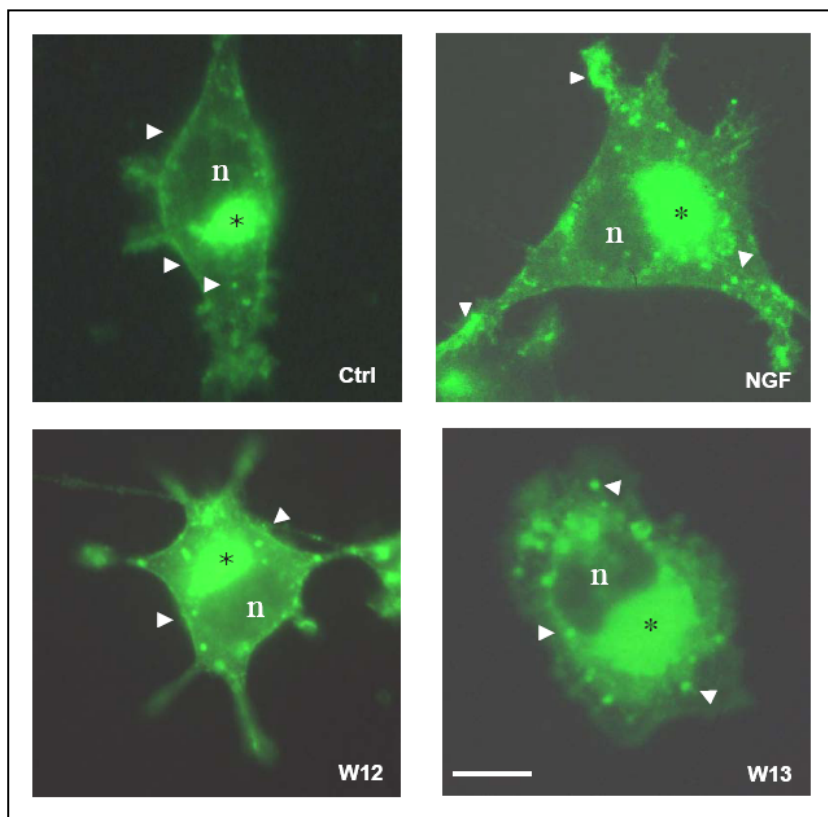


Fig R9. Efecto de la inhibición de CaM sobre la localización subcelular de TrkA. Las PC12^{6/15} fueron tratadas con NGF(100ng/ml), W12 o W13 (10µg/ml) durante 15min. A continuación fueron fijadas y se inmunodetectó Trk con α -203. Las puntas de flecha indican las regiones de la mebrana o vesículas en que se encuentra Trk. n: nucleo y * Trk en fase de síntesis. La barra indica una distancia de 5µm.

2. Obtención de mutantes de TrkA

Dada la ubicuidad de CaM y el amplio espectro de proteínas que regula, nos propusimos mutar el lugar de unión a CaM de TrkA para no alterar otros procesos regulados por CaM. De forma que en la segunda parte del trabajo se presenta la obtención de mutantes de TrkA en el lugar putativo de unión a CaM. De esta manera los podremos transfectar en PC12^{nnr5} y determinar la función de esta interacción sin provocar alteraciones generales en otros procesos en los que la participación de CaM es crucial.

2.1. Homología a lugares de unión a CaM

En primer lugar buscamos la presencia de dominios de unión a CaM (CBD) a través de herramientas bioinformáticas. Introducimos la región intracelular de TrkA en el programa *Calmodulin Target Database* que analiza la secuencia en busca de posibles CBD según: la tendencia a formar α -helice, el peso, carga y hidrofobicidad de cada aa. Evalúa una ventana de 20aa a partir de cada posición, y lo normaliza por el resultado de la secuencia entera (Fig R10).

Así vemos que la región a la que concede una mayor puntuación se encuentra en el dominio yuxtamembrana. Esta región presentaría el patrón coincidente con los grupos 1-14, 1-10 o 1-16 (ver Fig.9. en la introducción). Pero sin embargo no predice ningún CBD putativo en la mitad c-terminal (aa 675-796) que es la que por los experimentos explicados en el apartado 1.1 (Fig R3) contendría el lugar de unión.

2.2. Características de la región candidata

Elegimos una región comprendida entre los aa 675-796 y realizamos mutagénesis dirigida sobre ella. Nos basamos en la posibilidad de que sea compatible con la unión a CaM y que pueda ser importante para la función de Trk. En los siguientes apartados se explican las características de la región mutagenizada, que consiste en:

a) *TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. (Inagaki et al., 1995)*

Analizan las Tyr del dominio intracelular de Trk a través de mutagénesis dirigida, para ver de todas las Tyr presentes, exceptuando las del loop de activación, cuales son importantes para la actividad. Un Trk mutante con tan solo las tres Tyr del loop de activación (Trk-F8) es inactivo, pero se recupera la capacidad de inducir diferenciación al regenerar una de las Tyr 496, 640, 701, 757, 791 individualmente sobre Trk-F8. Las dos primeras están fuera de la región de unión de CaM y 785 es el lugar de unión de PLCγ. Solo quedarían la 701 y la 757 por conocer su mecanismo de acción. Se postuló que Y757 era el lugar de unión a PI3K (Obermeier et al., 1993a), que a su vez puede unirse a CaM (Joyal et al., 1997), por lo que este residuo nos podría llevar a la obtención de falsos positivos en determinadas condiciones.

b) *A function-structure model for NGF-activated TRK. (Cunningham and Greene, 1998)*

Estudian la estructura de Trk buscando los aa con carga básica que se van a encargar de estabilizar las cargas negativas que suponen las fosforilaciones en Tyr del loop de activación. Estas interacciones serán necesarias para estabilizar la conformación activa. Entre otros, mutan los residuos R702 y K703 y observan que son necesarios para la función del receptor: su mutación a Ala impide la fosforilación de la Y791 pero no afecta la fosforilación en Y496. Nos interesa este hecho porque la abundancia de aa básicos es una característica de los CBD.

c) *Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. (Jullien et al., 2003)*

Estudian las secuencias de internalización de Trk mediante mutantes deleccionales fusionados a YFP. Observan que el mutante al que se ha eliminado la región C-terminal a partir de la Met671 aumenta la internalización. En él se han perdido las secuencias de regulación de transporte (teóricas): YYRV (680-683), YRKF(701-704) y YAIM(757-760) (también YLDV (791-794) pero su pérdida exclusiva en un mutante deleccional no afecta la internalización de TrkA). De forma que el motivo YRKF podría estar regulando negativamente la internalización.

Criterios estructurales

Basándonos en el grado de conservación entre los distintos dominios Tyr kinasa, vemos que la Y701 está en el loop α EF/ α F (Nolen et al., 2004). Constituye una región variable entre las distintas familias de receptores TK y está comprendida entre las α -hélices EF y F. Alineando varios dominios Tyr kinasa vemos que la Y701 no está conservada en la mayoría de casos, aunque sí lo está en todos los miembros de la familia Trk, junto con MuSK. Es remarcable que en muchas ocasiones está sustituida por un aa ácido, por tanto su mutación a Asp no debería ser deletérea para la actividad kinasa. (Fig R11)

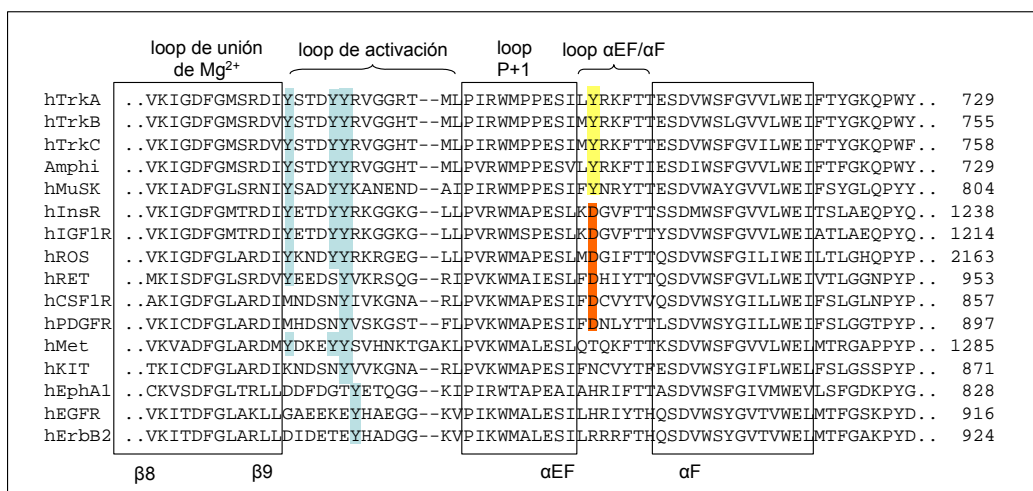


Fig R11. Alineamiento *ClustalW* de dominios TK.

Alineamiento correspondiente a una parte del dominio TK de varios receptores. Los recuadros marcan las regiones conservadas según Nolen y colaboradores (Nolen et al., 2004). En azul, las Tyr del loop de activación, en amarillo la Y701, y en rojo aquellos casos en que encontramos un Asp en lugar de la Y701.

La estructura 3D de Trk solo se ha resuelto del dominio extracelular unido a NGF y una pequeña región de 11aa del dominio yuxtamembrana donde se une a Shc. Sin embargo, el modelado tridimensional por homología a proteínas que han podido ser cristalizadas nos permite obtener un modelo teórico. La mayoría de estructuras corresponden a la conformación del dominio TK inactivo, aunque también hay algunas que corresponden a la forma activa, de manera que podemos obtener un modelo por homología para cada situación.

Para ello, realizamos primero un alineamiento (*ClustalW*) con las secuencias proteicas de las kinasas cuya estructura se conoce. La aplicación *Swiss-model* nos permite obtener el modelo teórico por homología a 4 estructuras

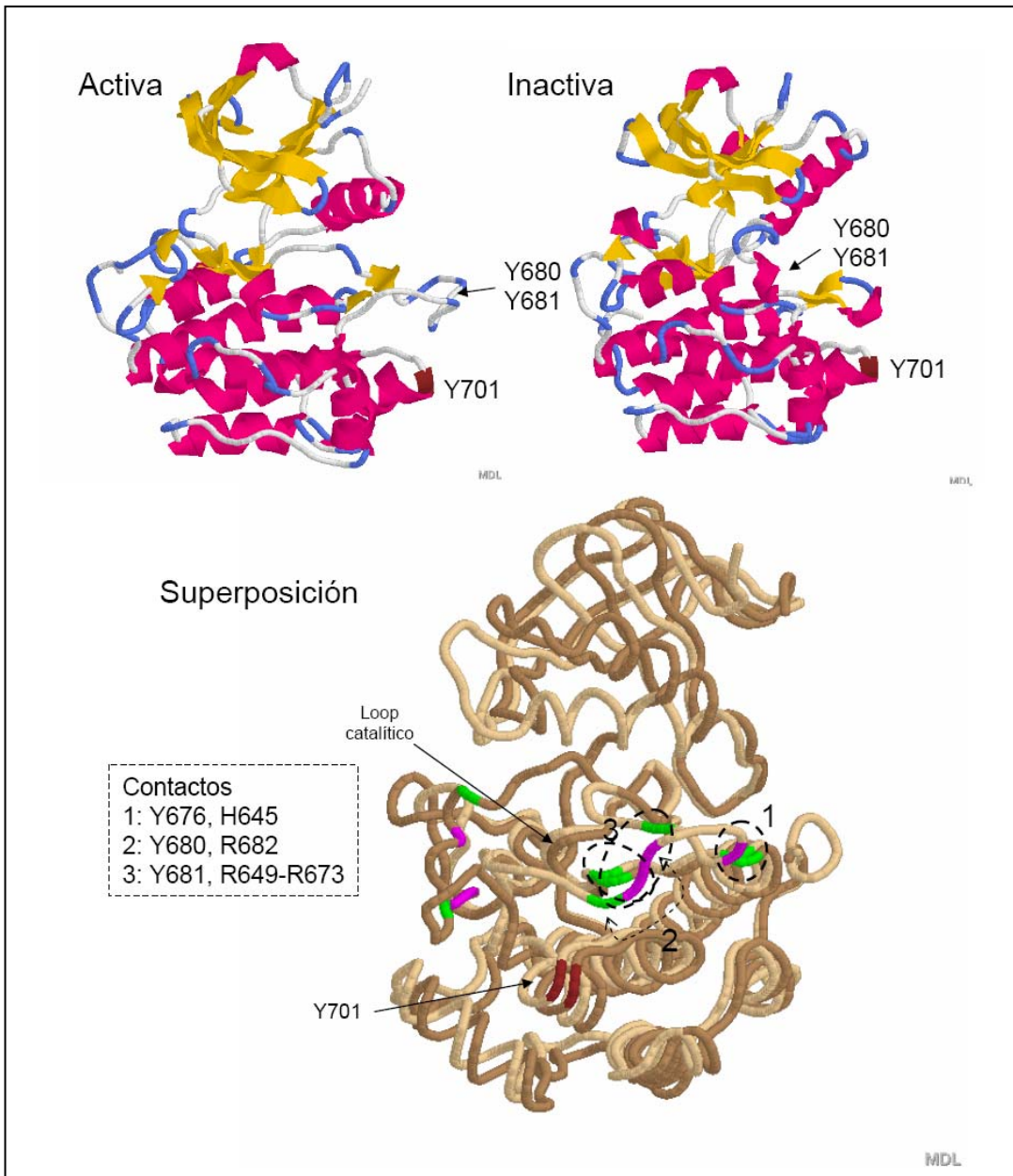


Fig R12. Predicción de la estructura 3D del dominio TK de TrkA

En la parte superior modelos por homología de la forma activa e inactiva coloreadas en función de la estructura secundaria: láminas β (amarillo), α -hélices (fucsia), giros (azul). En la parte inferior se representa la superposición de ambas estructuras, en color claro la forma activa y en oscuro la forma inactiva. En fucsia las Y del loop de activación, en verde los aa básicos que estabilizan las cargas del fosfato y en marrón la Y701.

Resultados

molde que podemos determinar en función del resultado obtenido en el alineamiento ClustalW. Nos genera un archivo "pdb" que nos permite visualizar la estructura con el programa *protein explorer* (Fig R12).

La superposición de ambos modelos nos permite observar como el loop de activación cambia su conformación dejando libre el centro catalítico (R649-N655) para que sea accesible al sustrato. Comprobamos también, que en el modelo de la forma activa las Tyr del loop de activación están próximas a los residuos básicos que se ha descrito que estabilizan la carga incorporada por el fosfato.

El sistema que hemos usado para validar el modelo es la comprobación de la distancia entre las Tyr fosforilables del loop de activación y los aa con carga positiva encargados de estabilizar la conformación activa (*Cunningham and Greene, 1998*) (Fig R12 superposición). Observamos que a diferencia de la forma inactiva, en la forma activa las Tyr del loop de activación están próximas a los residuos básicos que se ha descrito que estabilizarán la carga del fosfato.

Vemos que la región escogida está expuesta y su conformación poco replegada, características compatibles con un lugar de unión a CaM. Otro hecho remarcable es que en la conformación activa se encuentra justo debajo del loop de activación, por lo que la interacción de alguna proteína sobre esta región podría afectar a la activación de Trk.

Estructura en α -hélice:

La proyección de nuestra región de interés en forma de α -hélice (Fig R13), muestra que los residuos hidrofóbicos quedarían en un mismo lado, y su distribución sería compatible con un motivo 1-14. La presencia de aa ácidos en la zona hidrofóbica del CBD no es usual, aunque en el caso de otras proteínas con motivo 1-14 como son: Simian/chimpansee immunodeficiency virus (SIV/CIV) glicoprotein o unc-13; también hay un aa ácido en el motivo 1-14 (Fig R13 parte inferior). Por tanto la región elegida cumple con las características de los CBD.

Capacidad de regulación por fosforilación

El receptor activo se autofosforila en diversas Tyr en su dominio intracelular. Hasta el momento se ha demostrado que tiene lugar la fosforilación de las Tyr del loop de activación, y las de unión de Shc y PLC γ . Pero pueden existir más fosforilaciones, ya sean autofosforilaciones o no. El hecho de que la unión se produjera en una zona con residuos fosforilables, permitiría explicar el papel de la interacción de CaM con Trk, evitando o promoviendo la fosforilación

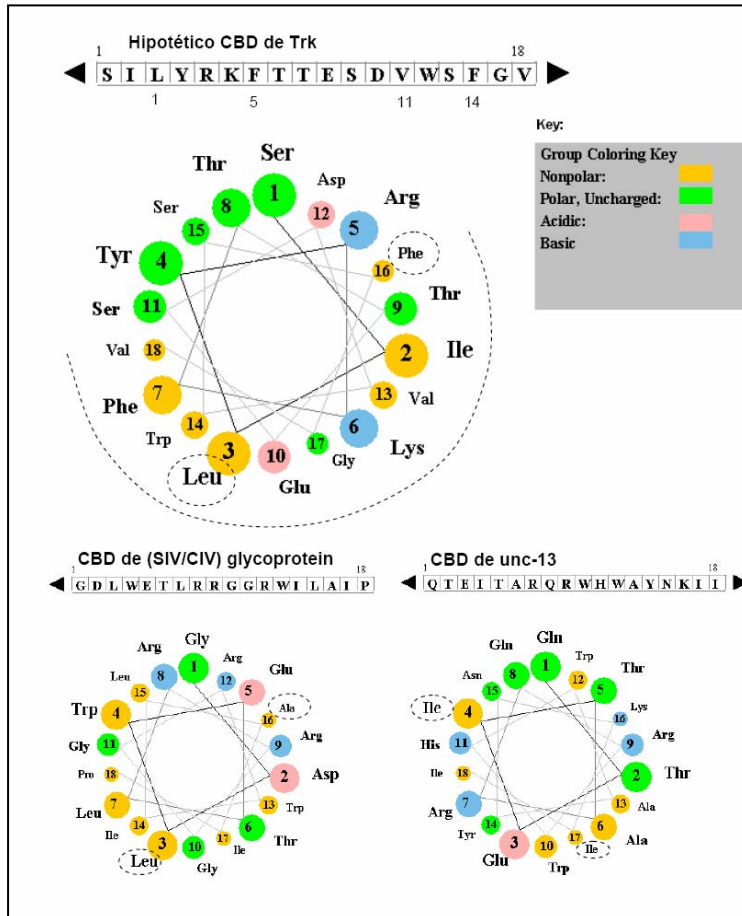


Fig R13. Representación en α -hélice del posible CBD de Trk.

En la parte superior se representa la posición de los aa de nuestro CBD teórico en una α -hélice. En la parte inferior dos ejemplos de otros CBD con estructura 1-14. La línea discontinua marca los aa hidrofóbicos.

de este residuo; o al contrario, que la fosforilación evite o sea necesaria para la unión de CaM.

La primera aproximación fue bioinformática. El programa Netphos contiene una base de datos con las secuencias de fosforilación conocidas. De manera que podemos introducir una secuencia y nos da una puntuación sobre la probabilidad de que una determinada Tyr, Ser o Thr sea fosforilada. En la figura 14A se muestra el resultado obtenido en la predicción de fosforilación sobre el dominio intracelular de TrkA.

Por lo que respecta a las Tyr, vemos que predice la fosforilación en 6 de ellas, Y496 (lugar de unión de Shc), 676, 680, 681 (Tyr del loop de activación), Y791 (lugar de unión de PLC γ) y una sexta Y757, que se había relacionado con la

Resultados

unión de PI3-K. La que hemos mutado (Y701) aunque tiene una puntuación relativamente baja en el análisis general de netphos; es detectada como lugar de fosforilación por TIE2 mediante la aplicación bioinformática *GPS*.

Es remarcable que las dos Thr adyacentes tienen una puntuación elevada, indicando que podrían ser fosforiladas por: AMPK, CaM-II, DAPK, GRK, PHK, PKA, PKB, PKC, ROCK y SGK la T705; y CK2 y GRK en el caso de la T706.

Hemos establecido una colaboración con el Dr. Ole N. Jensen del Dept. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del Sur de Dinamarca, para detectar mediante espectrometría de masas si estas fosforilaciones tienen lugar fisiológicamente. En la figura 14b se muestran los resultados obtenidos hasta el momento en muestras provenientes de PC12^{6/15} tratadas con NGF e inhibidores de fosfatasa.

En el péptido que contiene el loop de activación se detecta la fosforilación

NetPhos 2.0 Server - prediction results Technical University of Denmark				<u>Tyrosine predictions</u>			
Pos	Context	Score	Pred	Pos	Context	Score	Pred
Phosphorylation sites predicted: Ser: 5 Thr: 2 Tyr: 6				496	ENPQYFSDA	0.955	*
				591	MVFEYMRHG	0.362	-
				641	AGMVYLAGL	0.010	-
				676	SRDIYSTDY	0.852	*
				680	YSTDYRVVG	0.961	*
				681	STDYRVVGG	0.820	*
				701	ESILYRKFT	0.123	-
				713	EIFTYGKQP	0.064	-
				729	KQPWYQLSN	0.296	-
				757	PPEVYAIMR	0.863	-
791	APPVYLDVL	0.804	*				
<u>Serine predictions</u>				<u>Threonine predictions</u>			
Pos	Context	Score	Pred	Pos	Context	Score	Pred
465	GLAMSLHFM	0.056	-	434	LFLSTLLLV	0.020	-
474	TLGGSSLSLSP	0.043	-	470	LHFMTLGGG	0.101	-
475	LGGSSLSPT	0.968	-	479	SLSPTEGKG	0.023	-
477	GSSLSPTTEG	0.997	-	565	AELLTMLQH	0.007	-
484	EGKGSGLQG	0.552	-	580	FGVCTEGRP	0.182	-
498	PQYFSDACV	0.004	-	653	RDLATRNCN	0.016	-
560	LKEASESAR	0.137	-	678	DIYSTDYR	0.032	-
550	EASESARQD	0.976	-	687	VGGRTMLPI	0.018	-
603	RFLRSHGPD	0.110	-	705	YRKFTTESD	0.771	-
632	LAVASQVAA	0.011	-	706	RKFTTESDV	0.867	-
672	DFGMSRDIY	0.044	-	722	WEIFTYGKQ	0.087	-
677	RDIYSTDY	0.082	-	734	QLSNTEAID	0.015	-
698	MPPESILYR	0.005	-	741	IDCITQGRE	0.048	-
708	FTTESDVWS	0.252	-				
712	SDVWSFGVV	0.007	-				
732	WYQLSNTEA	0.033	-				
773	QQRHSIKDV	0.998	-				

de hasta 3 de los 4 residuos fosforilables. La comprobación por secuenciación por MS/MS (no mostrado) indica que las fosforilaciones recaen sobre S677, Y680 y Y681. También se detecta el fosfopéptido que corresponde a la Y791, que constituye el lugar de unión de PLC γ . Estos dos péptidos se han detectado fosforilados en todas las condiciones de tratamiento con NGF.

Se detectan también dos fosfopéptidos que contienen residuos cuya fosforilación no había sido descrita: el que contiene la T687, y el de la Y701. El fosfopéptido que contiene la Y701 engloba además otro aa fosforilable, la S698, pero la probabilidad de que sea fosforilada, según Netphos es muy baja (Fig 14a), por tanto probablemente recae sobre la Y701.

2.3. Mutantes obtenidos

En virtud de la información disponible sobre esta región, los mutantes que hemos diseñado son:

- L700R; F704Y y el doble mutante L700R, F704Y -> mutación de los aa clave hidrofóbicos del dominio putativo de unión a CaM.
- Y701-> mutación a Asp (Y701D) -> mutante con el que se pretende imitar una fosforilación mediante la incorporación de una carga negativa. mutación a Phe (Y701F)-> Mutante con el que se pretende evitar la posible fosforilación de la Tyr, substituyéndola por el aa estructuralmente

Péptido	aa fosforilables	Condiciones de tratamiento			
		NE	NGF 5 min	Calyculin 30 min NGF 30 min	Ortovan. 30 min NGF 30 min
674-682 DIYSTDYYR	Y676/S677/Y680/Y681	1PO ₄	2PO ₄	1PO ₄ /2PO ₄	1PO ₄ /2PO ₄ /3PO ₄
683-692 VGGRTMLPIR	T687	-	1PO ₄	-	-
693-702 WMPPE SILYR	S698/Y701	-	-	-	1PO ₄
781-796 LQALAQAPPVYLDV LG	Y791	-	1PO ₄	1PO ₄	1PO ₄

Fig R14. Sitios de fosforilación en TrkA

(Izquierda) Análisis teórico por homología a lugares fosforilados y motivos de fosforilación conocidos mediante la aplicación Netphos 2.0. Se muestran los resultados obtenidos para la región intracelular de TrkA. Considera que el residuo estará fosforilado (negrita) a partir de una puntuación de 0.5. El * indica los residuos cuya fosforilación real ha sido comprobada.

(Arriba) Resultado de la detección por MALDI de la fosforilación en TrkA

más parecido no fosforilable. En ambos mutantes desaparece el lugar putativo de transporte.

- RK702DE-> mutante descrito como inactivo. Se mantiene el motivo YxxØ, pero puede haber cambiado su especificidad.
- Mutante K544N -> mutante defectivo en actividad kinasa por pérdida del lugar de unión del ATP.

3. Caracterización de los mutantes _____

3.1. Efecto sobre la unión a CaM

Una vez obtenidos los mutantes, en primer lugar, comprobamos si hemos eliminado el lugar de unión a CaM. Para ello realizamos el ensayo de interacción con CaM-Seph, ya que es el método más robusto de los que hemos usado. Obtenemos Trk de dos formas distintas: por transfección en PC12^{nnr5}, células deficientes en la expresión de TrkA endógeno, y por expresión y purificación de proteína recombinante en E.coli.

Las mutaciones disminuyen la unión Trk-CaM en PC12^{nnr5}

Para observar el efecto de las mutaciones sobre el CBD putativo, transfectamos las construcciones en PC12^{nnr5}, y a los dos días de expresión las lisamos y evaluamos la interacción con CaM-Seph en presencia de 100µM Ca²⁺ o 2mM EGTA (Fig R15). Observamos que la mayor interacción se produce en la forma *wt*, el resto de mutantes también se unen a CaM-Seph pero la fracción que precipita con CaM es menor.

La interacción sigue siendo dependiente de Ca²⁺, ya que en presencia del quelante de Ca²⁺ (EGTA) la interacción desaparece casi por completo. Otro hecho a destacar es que la mutación L700R, que corresponde al aa 1 del motivo 1-14, es la que tiene mayor efecto y la mutación simultánea de los dos aa hidrofóbicos no tiene efectos aditivos.

Ninguna de las mutaciones elimina completamente la unión a CaM, pero todas ellas la disminuyen, indicando que los aa mutados pueden formar el lugar de unión o estar implicados en su regulación.

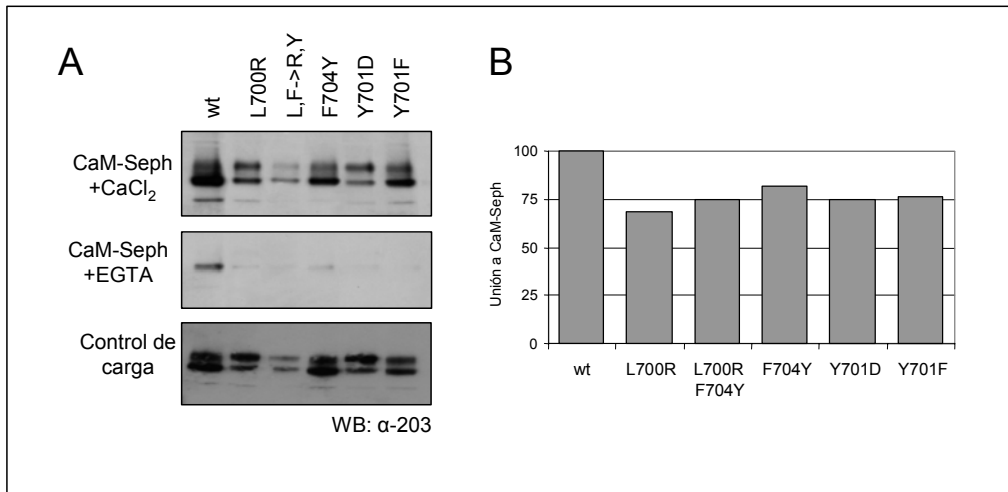


Fig R15. Unión de los Trk mutantes a CaM-Seph en PC12^{nnr5}.
 (A) Interacción con CaM-Seph sobre lisados de PC12^{nnr5} transfectadas con los mutantes de Trk indicados. (B) Cuantificación de la unión en presencia de Ca²⁺: media de 2 experimentos independientes, corregidos por el control de carga y expresados como porcentaje respecto al wt.

Las mutaciones disminuyen la unión de la proteína recombinante

Puesto que habíamos observado que la proteína purificada de *E. coli* está autofosforilada, miramos el efecto de la fosforilación total y en especial de la Y701 en la unión a CaM. Para ello utilizamos las siguientes construcciones de TrkA intracelular en pGEX que forman un gradiente de fosforilación:

- KD: ninguna fosforilación en Tyr.
- KD-Y701D: ninguna fosforilación en Tyr, pero con una carga negativa simulando un hipotético fosfato sobre la Y701.
- Y701F: todas las fosforilaciones del wt excepto la Y701
- WT: todas las fosforilaciones que se puedan producir durante su expresión en *E. coli* por su propia actividad kinasa.

Con ellas, analizamos la unión a CaM-Seph en 4 condiciones de Ca²⁺: 0, 10nM, 1μM y 100μM, (Fig R16).

Vemos que existe correlación con el nivel de Ca²⁺ en todos los casos excepto en el KD, donde el nivel de unión es muy elevado independientemente de la concentración de Ca²⁺. No existe una correlación directa entre el nivel de fosforilación total de Trk y la unión a CaM, ya que tras el KD, el siguiente con mayor unión no es el KD-Y701D sino el wt, que es el mutante con mayor grado de

Resultados

fosforilación. En el centro vemos que los mutantes de la Tyr701, ya sea a Phe como a Asp, son los que presentan menor unión, independientemente de que el resto de Tyr estén fosforiladas o no.

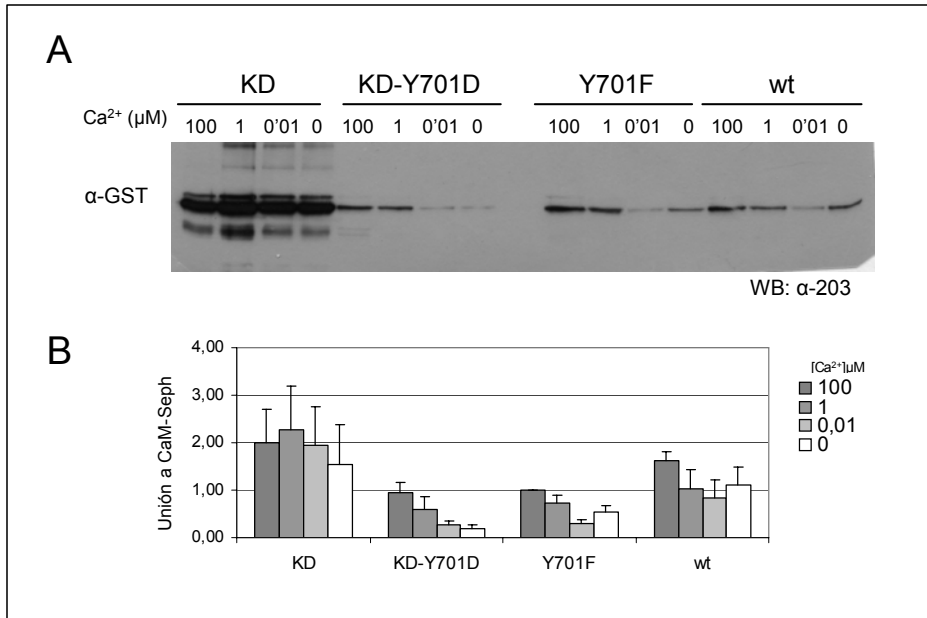


Fig R16. Unión de los TrkAi recombinantes a CaM-Septh.

(A) Ensayo de interacción de los mutantes de TrkA_i con CaM-Septh. (B) Cuantificación de 5 experimentos independientes, corregidos por el control de carga y expresados en relación a Y701F 100μM.

3.2. Efecto sobre la actividad del receptor

Las mutaciones no inhiben la actividad kinasa del receptor

Con el análisis de estos mutantes nos proponemos ver un efecto sobre la regulación del receptor, por lo tanto no nos interesa que pierda la actividad de forma irreversible por una conformación aberrante. Por ello es importante comprobar que la mutación no esté alterando la actividad kinasa intrínseca del receptor.

Aprovechamos la proteína recombinante correspondiente a la región intracelular, que hemos usado para testar la interacción con CaM y analizamos su grado de fosforilación (Fig. R17A). Vemos que las mutaciones en Y701 no

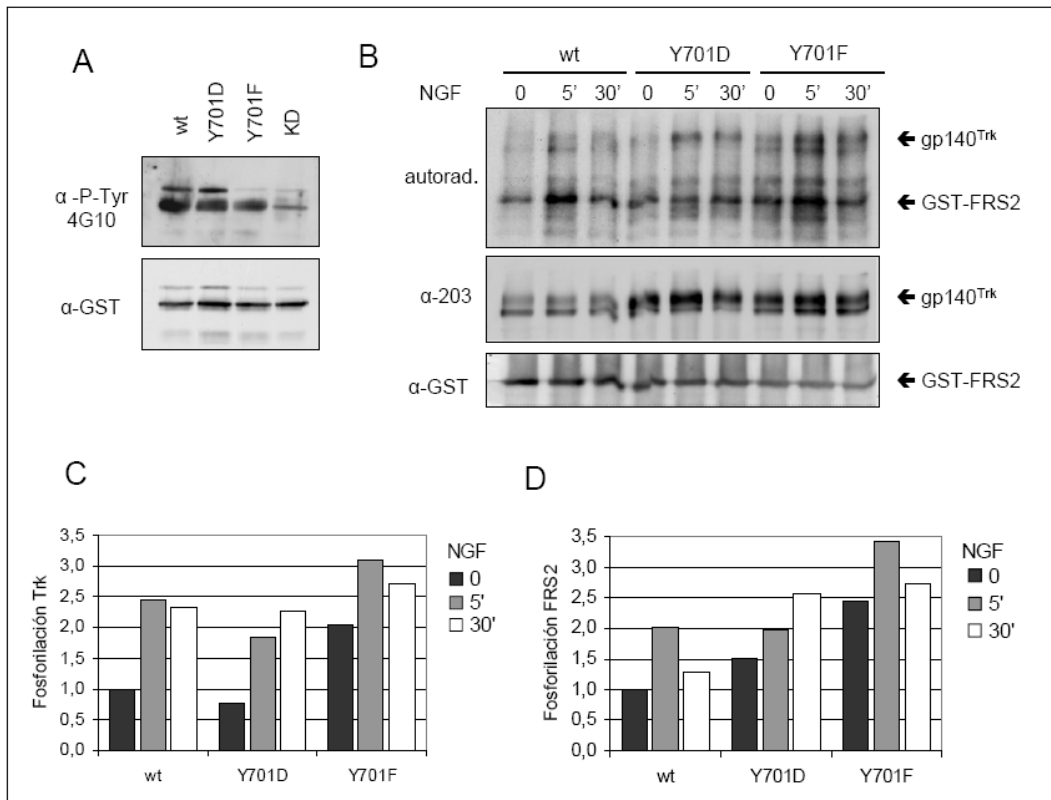


Fig R17. Las mutaciones de la Y701 no afectan a la actividad TK de Trk *in vitro*.

(A) Detección por WB del grado de fosforilación de la proteína recombinante purificada de *E. coli*. (B) Ensayo *in vitro* de la actividad kinasa de TrkA. Los Trk mutantes fueron inmunoprecipitados de PC12^{nnr5} transfectadas con las construcciones y tratadas durante 5-30min con NGF. Su actividad se determinó en ensayo kinasa *in vitro* con γ -P³²-ATP* y GST-FRS2¹⁻²⁴⁰ como sustrato. Autoradiografía (panel superior), nivel total de Trk o FRS2 detectados por WB (paneles inferiores). Los gráficos muestran la cuantificación de la fosforilación de Trk (C) y FRS2 (D), corregidos por el nivel de carga y expresados en relación a wt t₀.

eliminan la autofosforilación que observamos en el wt, mientras que el mutante KD no se autofosforila.

Para comprobar la función de la proteína entera, expresamos los mutantes en PC12^{nnr5}, los inmunoprecipitamos y realizamos un ensayo de actividad kinasa *in vitro* con ATP* y GST-FRS2 como sustrato (Fig. R17b). La autoradiografía muestra que: Trkwt, Y701F y Y701D son capaces de autofosforilarse y de fosforilar al sustrato, la fosforilación es mayor en el caso del mutante Y701F. El pretratamiento de las células con NGF conduce a una mayor actividad kinasa *in vitro*. Por tanto la mutación de la Y701 no está impidiendo la actividad kinasa del receptor.

Los mutantes Y701D y RK702DE han perdido la capacidad de diferenciar PC12^{nnr5}.

Una vez comprobada la actividad kinasa, pasamos a evaluar la funcionalidad de los receptores mutantes, para ello analizamos su capacidad de inducir diferenciación en PC12^{nnr5}. Transfectamos transitoriamente y tratamos con NGF durante 5 días. Transcurrido el tratamiento fijamos e inmunodetectamos Trk con el anticuerpo α -203.

El recuento del porcentaje de diferenciación entre las células que expresan el transgén muestra que wt y Y701F promueven el crecimiento neurítico en presencia de NGF, fenómeno ya observable a los 5 días de tratamiento. En los mutantes Y701D y RK702DE no se observa crecimiento neurítico significativo inducido por NGF (Fig. R18). A tiempos más largos de tratamiento, tampoco se observa diferenciación en estos dos mutantes (no mostrado).

Este resultado indica que la mutación Y701D impide la función diferenciadora de Trk en PC12^{nnr5}.

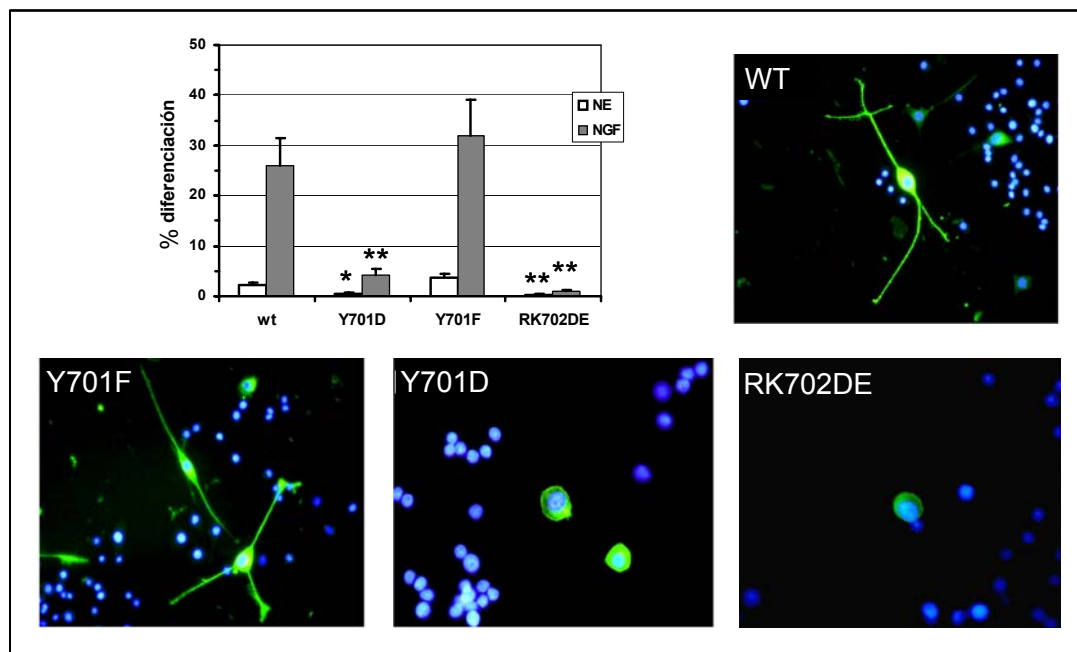


Fig R18. Diferenciación de PC12^{nnr5} transfectadas con los mutantes de Trk. Transfectamos los mutantes en PC12^{nnr5} y las tratamos con NGF durante 5 días para inducir la diferenciación. El gráfico muestra el porcentaje de células diferenciadas respecto al total para cada condición, promedio de 5 experimentos. Probabilidad respecto a WT * p<0'05, **p<0'01. En las imágenes vemos los núcleos con Hoescht y en verde Trk total

La vía MAPK no está activa en el mutante Y701D

Dado que la activación sostenida de las MAPKs se ha relacionado con la diferenciación de PC12, comprobamos la activación de MAPKs y también AKT a tiempos largos de tratamiento con NGF en células PC12^{nnr5} transfectadas de forma estable con los mutantes: PC12^{Y701D}, PC12^{Y701F} (Fig. R19).

Se puede observar que el tratamiento con NGF induce la fosforilación de ERK y AKT en PC12^{6/15} y PC12^{Y701F}, mientras que no es capaz de activar estas vías en el clon PC12^{Y701D}. Este hecho correlaciona con los resultados previos de diferenciación, en que el mutante Y701D es incapaz de diferenciar las PC12^{nnr5} en presencia de NGF. Otro aspecto a remarcar es que las PC12^{Y701F} presentan una activación de ERK más mantenida que las PC12^{6/15}.

También observamos que la cantidad total de TrkA en las formas activas se mantiene estable (PC12^{6/15}), o incluso aumenta (PC12^{Y701F}), en cambio en el mutante que ha perdido la funcionalidad (PC12^{Y701D}) se observa una disminución progresiva de la cantidad total de Trk.

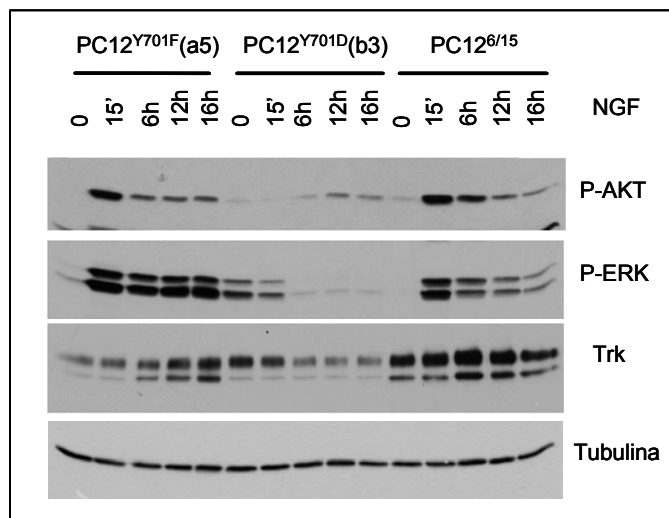


Fig R19. Las vías ERK y AKT no son activadas por el mutante Y701D.

Los clones expresores estables de los mutantes Y701F (a5) y Y701D (b3), así como las PC12^{6/15} fueron tratadas con NGF durante varios tiempos 15min-16h. Se analizó la fosforilación de AKT y de ERK, así como la cantidad de Trk total y nivel de tubulina, como control de carga sobre lisados celulares.

3.3. Efecto de las mutaciones sobre la cinética del receptor

Dado que la internalización es necesaria para la activación sostenida de las ERK, y que estamos mutando un posible motivo de transporte, nos propusimos ver si la internalización y transporte en el mutante Y701D están

alterados y por tanto son la causa del efecto que observamos sobre la activación de las vías.

La mutación no afecta al direccionamiento a membrana plasmática

Mediante la biotinización de las proteínas de membrana y la precipitación de las proteínas biotiniladas con estreptavidina-agarosa, podemos detectar la fracción de Trk presente en la membrana plasmática en un momento concreto. Para analizar si las mutaciones que hemos introducido afectan a la exportación de TrkA a la membrana plasmática transfectamos las construcciones de los Trk mutantes en PC12^{nrr5}, tratamos con NGF 0, 30min o 2h y a continuación biotinilamos.

El resultado muestra que todos los Trk mutantes están presentes en la membrana. El tratamiento con NGF, previo a la biotinización, induce la disminución de Trk en la membrana a las 2h (cuantificación: Fig. R20B). Esta disminución es mayor en Trkwt y el mutante Y701F, mientras que la disminución

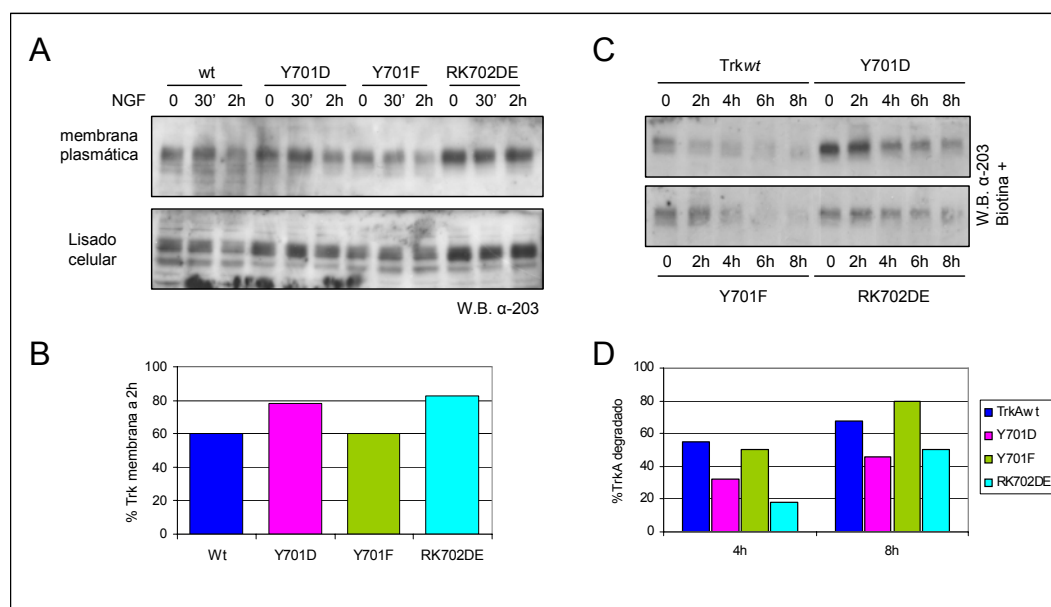


Fig R20. Marcaje de Trk en la membrana plasmática con biotina.

(A) Disminución de Trk de membrana por efecto del NGF. Transfectamos PC12^{nrr5} con los mutantes de Trk. Tratamos con NGF 0, 30' o 2h, marcamos las proteínas de membrana con biotina, precipitamos la fracción unida a biotina con streptavidina-agarosa (biotina +) y detectamos la presencia de Trk por W.B. con α-203. (B) Cuantificación del WB-A. Se representa el % de Trk presente en la membrana plasmática a las 2h de tratamiento con NGF respecto a tiempo 0. (C) Desaparición del marcaje con biotina de TrkA como medida de la degradación del receptor. Detectamos Trk en precipitados con streptavidina-agarosa de PC12^{nrr5} biotiniladas a tiempo 0. (D) Porcentaje del receptor de membrana degradado a 4 y 8h de incubación a 37°C.

de Y701D es menor y casi inapreciable en el caso de RK702DE.

Para comprobar la estabilidad de los distintos mutantes, marcamos con biotina las proteínas de membrana a tiempo 0 y vamos congelando las muestras tras los tiempos indicados de incubación a 37°C. Lisamos y precipitamos las proteínas que conservan el marcaje con biotina, es decir, aquellas que a tiempo 0 se encontraban en la membrana y que en el momento en que paramos el experimento todavía no se han degradado.

En la figura R20C y en la cuantificación de ésta (Fig R20D), vemos que tanto Trkwt como el mutante Y701F son degradados más rápidamente que Y701D y RK702DE.

Efecto sobre la internalización y transporte

Para detectar específicamente la fracción de Trk que ha sido internalizado, utilizamos un reactivo de biotina que es eliminable mediante reducción de un enlace disulfuro. De esta forma marcamos el receptor de la membrana plasmática (tiempo 0) y después incubamos a 37°C con o sin NGF para inducir la internalización durante 30min o 2h. Una vez transcurrido este tiempo eliminamos la biotina de las proteínas que todavía están en la membrana, de forma que la biotina de aquel Trk que ya ha sido internalizado queda protegida de la reducción.

En primer lugar observamos que la internalización independiente de ligando es elevada, por lo que realizamos un control no tratado para cada tiempo de incubación con NGF (Fig R21).

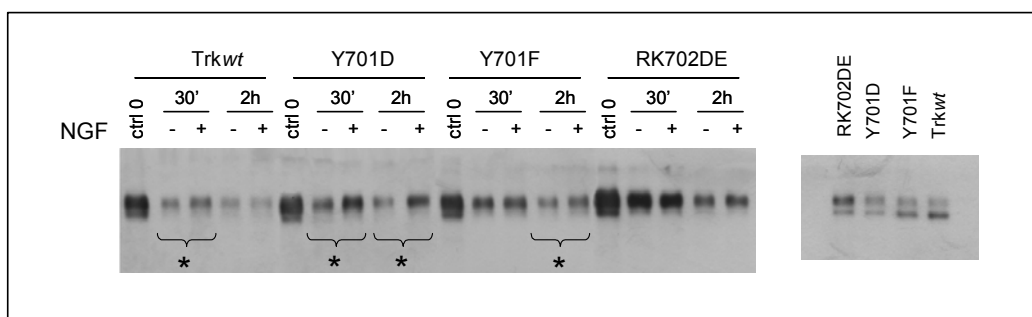


Fig R21. Estudio de la internalización del receptor Trk

Las células PC12^{nnr5} fueron transfectadas con Trk wt o los mutantes indicados. Tras 15h, de privación fueron biotinizadas 5' RT (tiempo 0), e incubadas 30min o 2h con medio con (+) o sin (-) NGF. A la izquierda vemos el WB de la fracción precipitada con streptavidina y por tanto representa el Trk internalizado. Los * indican las condiciones entre las que se aprecia el efecto del NGF. A la derecha una alícuota del lisado celular, como control del nivel de expresión equivalente entre los mutantes. Ambas membranas han sido inmunodetectadas con Trk total α -203.

Resultados

La cinética de internalización es distinta en los cuatro casos. En el mutante RK702DE el tratamiento con NGF no induce una mayor internalización que en condiciones basales, como ya habíamos visto mediante la detección de Trk de membrana después del tratamiento con NGF (Fig R20A). En el resto de construcciones sí vemos mayor internalización en respuesta a NGF. Este efecto es muy evidente en el mutante Y701D tanto a 30min como a 2h. En el caso de Trk wt es detectable a 30min pero no a 2h, hecho que concuerda con la mayor degradación que se observa ya a partir de 2h (Fig R20C), que por tanto evitaría que detectemos el incremento porque a este tiempo se ha degradado una elevada proporción. En el caso de Y701F observamos la internalización inducida por NGF a las 2h, probablemente porque a 30min la internalización basal es muy elevada para detectar diferencias.

Para corroborar el resultado obtenido por biotilización, detectamos la internalización mediante inmunofluorescencia (IF) utilizando el anticuerpo RTA, que es capaz de activar a Trk a través de la unión a su región extracelular. Así podemos además colocalizarlo con otros marcadores para ver a que estructuras se dirige una vez internalizado.

Transfectamos PC12^{nnr5} con los mutantes de Trk. Incubamos con RTA a 37°C durante distintos tiempos: 0, 15', 30', 2h y 4h y detectamos la localización de RTA por IF. Como se puede observar en la figura R22, a tiempo corto el marcaje es membranaral en todos los mutantes. El porcentaje de células marcadas es de entorno el 20%, valor que coincide con la eficiencia de transfección, indicando, por tanto, que el marcaje es específico de Trk.

A partir de los 15min de incubación ya se ha producido internalización del receptor, aparecen vesículas intracelulares dirigiéndose al interior desde la membrana, algunas de ellas colocalizan con TfnR (Fig R22D). A 15min la cantidad de vesículas de Y701D es significativamente mayor, así como la colocalización con TfnR .

A 30 min la internalización de Y701D se ha estabilizado y la de Y701F es significativamente mayor. A 2h vemos que algunas de las vesículas co-localizan con el marcador lisosomal LAMP-1, la forma wt presenta mayor colocalización con Lamp-1.

En el mutante RK702DE vemos menor número de vesículas en todos los tiempos de tratamiento y las que observamos son, además, de menor tamaño.

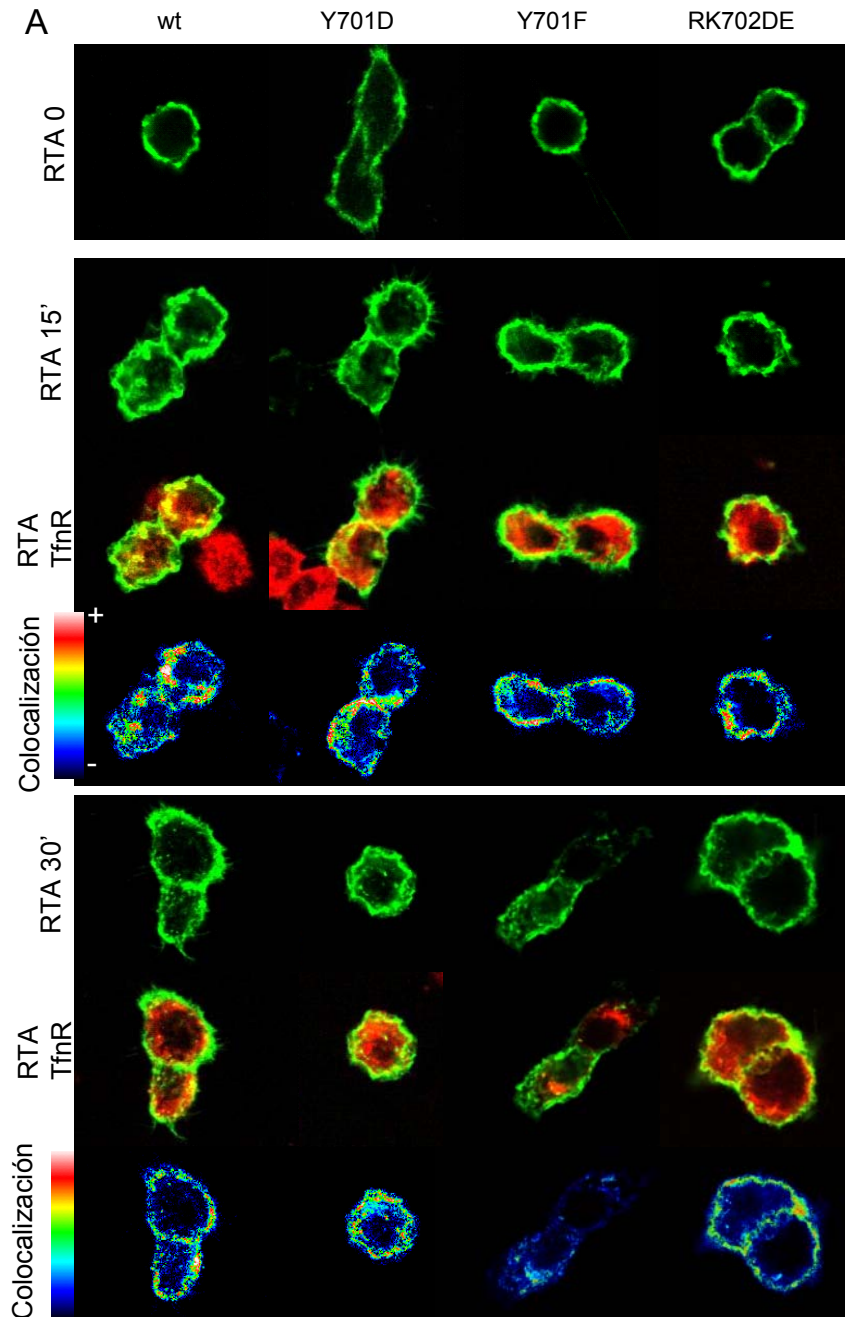
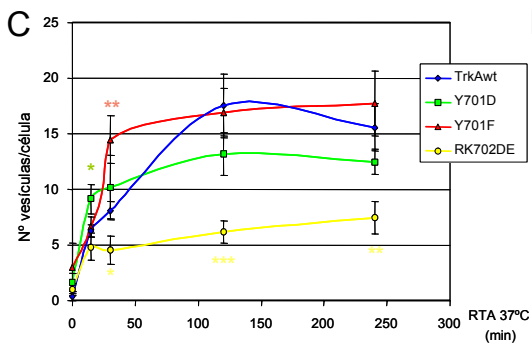
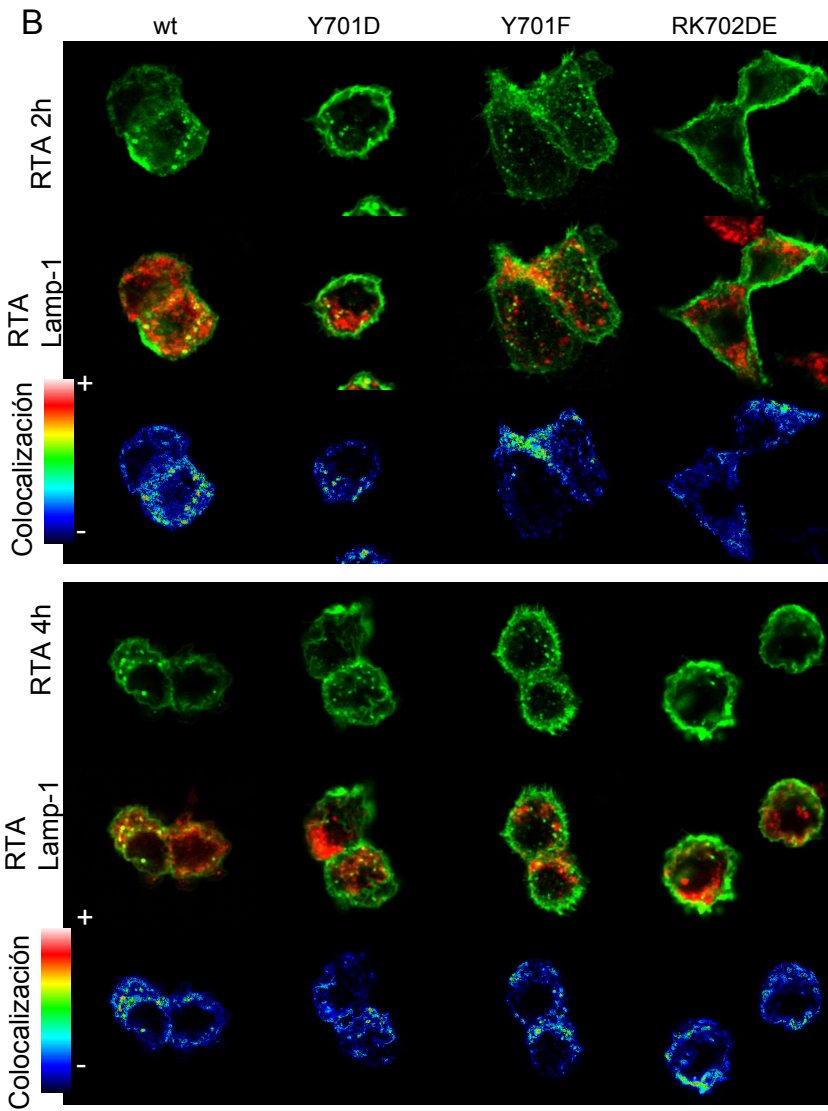


Fig R22. Detección de TrkA internalizado con RTA.

En verde vemos Trk marcado con RTA incubado a 37°C sobre las células vivas según el tiempo que se indica a la izquierda. A continuación vemos la superposición de la imagen de RTA y TfnR (tiempos 15' y 30')(A) o Lamp (2h y 4h)(B) en rojo. La fila inferior corresponde a la imagen de los píxeles en que se produce colocalización. (C) Cuantificación del número de vesículas media de 6 células. Significatividad: * $<0'05$, ** $<0'01$, *** $<0'001$. (D) Porcentaje de píxeles que colocalizan con los marcadores TfnR o Lamp-1 dividido por píxeles de Trk total.

Resultados



D

	t(37°C)	Wt	Y701D	Y701F	RK702DE
Tnfr	NE	48 ± 7	53 ± 9	57 ± 6	49 ± 7
	15'	49 ± 2	61 ± 2 **	50 ± 4	53 ± 6
	30'	65 ± 5	51 ± 7	67 ± 8	60 ± 6
Lamp-1	2h	60 ± 7	36 ± 5 *	35 ± 3 **	39 ± 4 *
	4h	37 ± 5	37 ± 2	42 ± 10	41 ± 7

3.4. Los mutantes Y701D y RK702DE no se autofosforilan en PC12^{nnr5} ni en HEK293

Puesto que hemos comprobado que la actividad kinasa del mutante Y701D se mantiene *in vitro*; que éste se encuentra en la membrana extracelular y que NGF induce su internalización, pero no la activación sostenida de las ERK; comprobamos si se produce la activación de Trk en el contexto celular.

Para ello analizamos el grado de fosforilación del receptor en respuesta a un estímulo corto de NGF en los clones de PC12^{nnr5} transfectadas de forma estable con los mutantes de Trk: PC12^{wt}, PC12^{Y701F}, PC12^{Y701D}, PC12^{RK702DE}. Tras el tratamiento con NGF, inmunoprecipitamos Trk y por WB detectamos su fosforilación en Tyr.

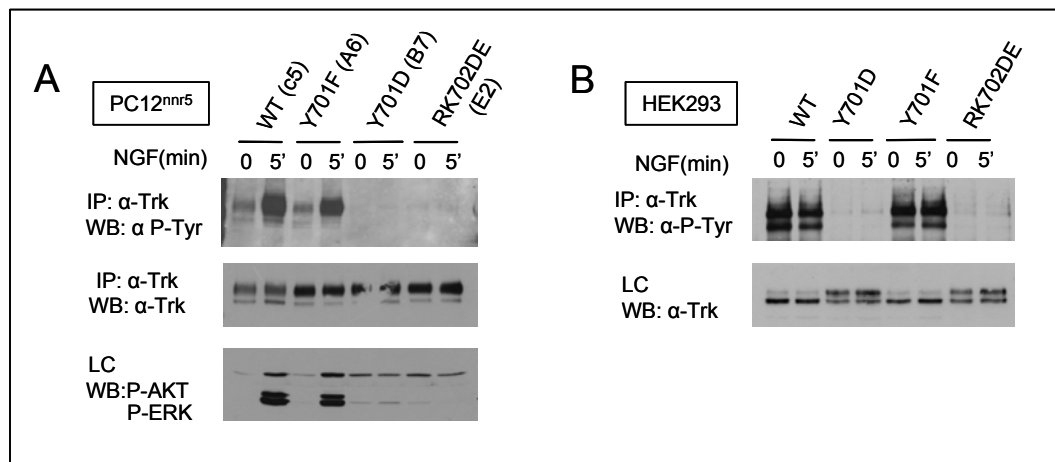


Fig R23. Los mutantes Y701D y RK702DE no presentan autofosforilación.

(A) Nivel de fosforilación en Tyr de Trk inmunoprecipitado de PC12^{nnr5} transfectadas de manera estable con los mutantes de Trk, tratadas o no con NGF 100ng/ml durante 5min. Los dos paneles superiores corresponden a la fracción inmunoprecipitada con 203, el panel inferior al lisado celular. (B) Sobreexpresión de los Trk mutantes en células HEK293. Panel superior fracción inmunoprecipitada con 203 (8% acrilamida), panel inferior lisado celular (10% acrilamida).

En el caso de Trk *wt* y del mutante Y701F se mantiene la capacidad de autofosforilación: en presencia de NGF detectamos la banda correspondiente a Trk inmunoprecipitado con el anticuerpo específico de tirosina fosforilada (4G10). Por el otro lado los mutantes Y701D y RK702DE no se autofosforilan (Fig R23a panel superior).

Así mismo vemos que la fosforilación de Trk correlaciona con la activación de ERK o AKT a tiempo corto (Fig R23a panel inferior) en el caso de PC12^{wt} y

Resultados

PC12^{Y701F}, mientras que como era de esperar, no se produce activación de las vías de señalización por debajo del receptor en el caso de PC12^{Y701D} y PC12^{RK702DE}.

Repetimos el experimento pero transfectando los mutantes en HEK293 (Fig R23b), en esta línea celular, el grado de sobreexpresión es mayor, hecho que provoca la activación constitutiva del receptor. De forma que vemos fosforilación en Tyr independientemente del estímulo con NGF en el *wt* y el mutante Y701F, pero seguimos sin observar fosforilación de los mutantes Y701D y RK702DE.

Otro hecho que observamos claramente en las HEK293 y que también se produce de forma significativa en las transfecciones transitorias en PC12^{nnr5}, es la mayor cantidad de la forma madura (140kDa) en los Trk que son inactivos.

De esta forma vemos que la mutación Y701D conduce a la inactivación de Trk en el contexto celular, sin afectar a la actividad kinasa intrínseca del receptor, mientras que el cambio por un aa no fosforilable no interfiere con sus efectos biológicos. Por tanto la posible fosforilación de la Y701 tendría un efecto deletereo sobre la funcionalidad de TrkA.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Unión de Trk a CaM

Los resultados obtenidos con proteína recombinante muestran que existe una unión directa entre CaM y Trk. Esta interacción es dependiente de la concentración de Ca^{2+} e independiente del tratamiento corto con NGF, como muestra la precipitación con CaM-seph de Trk a partir de células PC12^{6/15}. Por el resultado del experimento de interacción con la proteína recombinante sabemos que el lugar de unión se sitúa en la mitad distal de la región intracelular.

Trk no es el primer RTK que se ha visto que se une a CaM, en 1985 se descubrió que el receptor de la Insulina interacciona con CaM (Graves et al., 1985), y después siguieron el receptor del EGF (Martin-Nieto and Villalobo, 1998), y ErbB2 (Li et al., 2004).

En el caso del EGFR la interacción con CaM tiene lugar en la región yuxtamembrana del receptor y compite con la fosforilación en T654 por PKC (Martin-Nieto and Villalobo, 1998): la fosforilación de dicha Thr impide la unión de CaM y paralelamente, la unión de CaM impide la fosforilación por PKC en T654. La interacción de CaM con EGFR juega un papel inhibitorio de la actividad TK.

En el receptor ErbB2, en cambio, CaM es necesaria para su autofosforilación, ya que su inhibición con W7 impide la fosforilación del receptor (Li et al., 2004).

En el caso del InsR, el tratamiento con insulina induce la fosforilación de CaM, y a su vez CaM aumenta la activación de InsR por insulina (Graves et al., 1986).

Por tanto la interacción de CaM con proteínas de membrana y en concreto receptores TK puede desarrollar funciones muy diversas, por ello resulta interesante conocer cual es el papel concreto de la interacción con Trk.

1.1. Efecto de la activación de Trk sobre la unión a CaM

A diferencia de lo observado con otros receptores, en el caso de Trk la interacción es independiente del estado de activación del receptor. En los

Discusión

experimentos de precipitación con CaM-Seph, no vemos efecto del tratamiento previo con NGF sobre la unión Trk-CaM; y además vemos unión a CaM-Seph tanto de Trk fosforilado, como no fosforilado. Solo hemos comprobado la fosforilación de Y496, pero en principio debemos pensar que si esta está fosforilada es porque Trk está activo.

Por el otro lado, el resultado obtenido con la proteína recombinante, en que se produce una unión más alta en el mutante TrkA_iKD, podría indicar que la unión es mucho mayor en la forma inactiva, por tanto no fosforilada (Fig R16). En los otros mutantes de TrkA_i, se produce una autoactivación del dominio TK al facilitarse la dimerización por su elevada expresión en bacterias y por carecer del dominio extracelular. En el caso de TrkA_iKD, en cambio, se producirá la dimerización pero no la activación, y tal vez quede en una conformación inestable favoreciendo la agregación y precipitación. Además la unión pasa a ser no regulada por Ca²⁺, cuando en el resto de situaciones, tanto con proteína recombinante como con el Trk endógeno de PC12, observamos dependencia de Ca²⁺. En el caso de TrkA_iKD-Y701D la unión a CaM se comporta de forma similar al *wt*, por lo tanto este resultado indica que la unión Trk-CaM es independiente del estado de activación de TrkA.

En el experimento de CoIP (Fig R4) en que observamos la unión de Trk con CaM sobre lisados de PC12^{6/15}, vemos, en cambio, que la unión entre proteína endógena sí está regulada por NGF. Se une de forma transitoria, con el máximo entre 10-20 min de tratamiento con NGF. Al realizar la precipitación con CaM-Seph (Fig R1), estamos añadiendo CaM en elevada cantidad en comparación a la CaM endógena, sin embargo, es una proteína muy abundante en la célula, por lo que la diferencia observada no parece que pueda atribuirse a la concentración de CaM, ya que está en exceso en ambos casos. Otra diferencia es que junto con la CaM-Seph, añadimos Ca²⁺ al tampón del ensayo de precipitación, y en cambio en la co-IP no añadimos Ca²⁺ exógeno, porque queremos detectar la interacción que está previamente formada en la célula. Para comprobar si ese es el motivo de la diferencia observada entre las dos aproximaciones, suplementamos también el tampón de la CoIP con Ca²⁺ y vemos que se produce el mismo resultado que en el caso de la precipitación con CaM-Seph: la adición de Ca²⁺ permite la unión en condiciones basales o de tratamiento corto con NGF, unión que no se produce de forma fisiológica en la célula.

De esta forma vemos que el NGF sí que ejerce algún tipo de regulación sobre la unión a CaM, siendo necesario el tratamiento de 10-20 min con NGF para observar la unión. Aunque, en principio, parezca independiente del estado de activación del receptor, entendiendo como tal la fosforilación en Y496. Podemos pensar en varias teorías que expliquen este hecho, siguiendo los acontecimientos que conlleva la unión del receptor a NGF:

- que el efecto del NGF esté mediado por el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por la activación del receptor;
- o por el cambio de localización intracelular del receptor: la unión se produciría en un compartimiento específico tras la internalización;
- o por la unión a unas u otras proteínas adaptadoras que facilitarían o competirían por la unión. La unión es lábil y por tanto CaM podría ser desplazada fácilmente de su lugar de unión, la accesibilidad a éstas también podría depender de la localización de Trk.

Para resolver esta cuestión, nos planteamos ver la interacción en condiciones más fisiológicas: en la célula intacta; y poder identificar los lugares en que se produce la interacción, ver si tiene lugar en vesículas, o en la membrana. Para ello usamos técnicas de microscopía detectando la interacción mediante FRET.

En esta técnica, para que se produzca la transferencia de energía las dos proteínas deben tener los fluorocromos bien orientados y que queden lo bastante próximos como para que se produzca la resonancia. Por ello, la puesta a punto de este método es totalmente empírica. En nuestro caso la señal obtenida con Trk-YFP y CaM-CFP es significativamente mayor que la obtenida en el control negativo constituido por células transfectadas con Trk-YFP y CFP (no mostrado).

En el análisis de la imagen de FRET después de la aplicación de las correcciones, cuantificamos las zonas de mayor señal a nivel de la membrana plasmática y del interior celular separadamente y vemos un incremento significativo de FRET en membrana plasmática así como en determinadas estructuras del interior celular a los 5min de tratamiento con NGF, que desaparece a los 15min. El resultado de FRET indica que se produce la unión tanto con el Trk de membrana plasmática como con el que se encuentra en determinadas estructuras del interior celular a los 5min de tratamiento con NGF.

Transcurridos 15min la señal vuelve a niveles basales tanto en la membrana como en estructuras intracelulares.

1.2. ¿Cuándo se produce la interacción?

Juntando el resultado de FRET, el de la Co-IP en PC12^{6/15} y la precipitación con CaM-Seph, vemos que el tiempo de tratamiento en que se produce la unión varía en los tres casos: FRET: t=5 min (membrana y vesículas), Co-IP(PC12^{nnr5}) t=10-20min, CaM-Seph independiente de NGF.

Podemos pensar en varias teorías que expliquen la diferencia en el tiempo en que observamos la unión:

1: *“una proteína compite por la unión al mismo lugar que CaM”*. El tratamiento con NGF podría provocar modificaciones postraduccionales o un cambio de localización membranal de TrkA o la proteína competidora que permitirían la unión Trk-CaM. En los experimentos en que lisamos la célula, se perderían las concentraciones locales relativas de la proteína X y Trk, de forma que dejaríamos de ver parte de la regulación.

2: *“la unión se produce en el Trk que se encuentra en vesículas de endocitosis”*, fenómeno que coincide con el tiempo en que observamos unión en la Co-IP. El FRET observado en la membrana a 5min podría corresponder a vesículas que empiezan a internalizarse, pero la cantidad es aun muy pequeña y por eso en la Co-IP no lo detectamos.

3: *“La unión se produce a tiempo corto de tratamiento con NGF debido al incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular”*. El incremento de Ca²⁺ en la célula tras la estimulación del receptor, es rápido, pero moderado, no aumenta el nivel de toda la célula, sino que se producen regiones de mayor concentración que otras según se va liberando Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. A 5min el Ca²⁺ estará volviendo a los niveles normales, pero podría ser suficiente para permitir la activación y unión de CaM a Trk en determinadas regiones de la membrana, como se observa con los resultados de FRET.

4: *“Alguna de las interacciones que observamos es indirecta”*. CaM es muy abundante y puede unirse a muchas proteínas, alguna de ellas podrá unirse también a Trk y podría ocasionar un falso positivo. Esto podría suceder en las Co-

IP y precipitación con CaM-seph, en base a que la interacción directa quedase enmascarada por la indirecta.

Basándonos en las evidencias experimentales, la teoría más plausible sería que en estado basal CaM no se encuentra unida a Trk. La activación del receptor por NGF induce el incremento transitorio de Ca^{2+} intracelular que permite que todavía observemos la interacción a 5min pero no a 15min. Probablemente estamos lejos de detectar el máximo en la unión, ya que el incremento de Ca^{2+} se produce en cuestión de segundos, y tal vez a 5min la unión ya está desapareciendo. La utilización de tiempos más cortos de tratamiento con NGF, o drogas que modifiquen la concentración de Ca^{2+} intracelular, o el análisis de FRET en células vivas, pueden ayudar a resolver esta cuestión.

1.3. Unión a Trk B y/o C

El grado de homología entre los dominios intracelulares de los distintos Trk es elevado, por ello es lógico pensar que la interacción se produzca también en Trk B y C si el dominio de interacción está conservado. Testamos la unión en corticales de embrión de rata, que no expresan TrkA pero sí Trk B y C, y nos permite obtener una cantidad de proteína suficiente para los experimentos de precipitación con CaM-Seph, a partir de un cultivo primario. Efectivamente observamos interacción, pero esta se produce ya en condiciones basales, sin requerir de la adición de Ca^{2+} o estimulación con BDNF. Esta diferencia en condiciones basales con las células PC12^{6/15} podría deberse a:

- Pequeñas diferencias en la región de interacción entre TrkA y B-C.
- Proteínas que compitan por el lugar de unión del receptor, presentes en PC12 y no en corticales, o que solo se unan a TrkA.
- Diferencias en la concentración basal de Ca^{2+} en el entorno de Trk, o en el lisado celular.

Existen diferencias significativas entre los dos modelos celulares utilizados: las PC12 y las neuronas corticales. De entrada, aunque utilizemos las PC12 como modelo pseudoneuronal, debemos recordar que no son neuronas, que son una línea celular y en la mayoría de los experimentos sin diferenciar. Por eso, aunque

estén expresando TrkA y p75 y respondan a NGF, hay otras muchas proteínas que solo se expresan en neuronas diferenciadas o en células ciclantes.

Una vez conozcamos el lugar de unión podremos determinar si existen diferencias estructurales suficientes, o paralelamente, podremos buscar el posible competidor entre las proteínas con expresión diferencial en PC12 y neuronas corticales.

2. Inhibición de CaM

Una forma de caracterizar la función de la unión de CaM a Trk, es la utilización de inhibidores específicos de CaM, que nos permitirán estudiar que sucede con el receptor cuando CaM está bloqueada.

Resultados previos del grupo indican que la inhibición de CaM no impide la fosforilación del receptor (Egea et al., 2000), pero sí que están bloqueadas las vías de señalización de Raf/MAPKs y PI3-K/AKT a nivel de Raf-1 y de PI3-k. También se ha visto que se produce el procesamiento de proteínas de membrana entre las cuales está TrkA (Cabrera et al., 1996).

2.1. Formación de fragmentos activos de TrkA

Se ha descrito la formación de fragmentos activos de TrkA en células CHO transfectadas de forma estable con TrkA, después del tratamiento con PMA e inhibidores de CaM (Diaz-Rodriguez et al., 2000). Estos autores, no detectan la co-inmunoprecipitación de Trk con CaM y por ello no creen que la fragmentación sea debida a la unión directa de CaM.

En nuestro modelo, PC12^{6/15}, también observamos el procesamiento de TrkA dando lugar a fragmentos activos por inhibición de CaM y en menor grado por el tratamiento con PMA (Apartado 1.2 de los resultados). A pesar de que sí observemos interacción Trk-CaM, debemos plantearnos si la fragmentación se debe a un efecto directo de la unión Trk-CaM o indirecto debido a la inhibición de CaM:

- Díaz Rodríguez y colaboradores (2000) eliminan gran parte de la región intracelular o mutan el lugar que predicen como posible CBD, por tanto, evitando cualquier interacción, y ven que se sigue induciendo el corte con los inhibidores de CaM de la misma manera.
- La inhibición provoca el procesamiento no solo de Trk sino de otras proteínas como: proTGF α , proNRG α 2c, β APP (Díaz-Rodríguez et al., 2000) y L-Selectin. De todas ellas solo L-Selectin se ha descrito que se une a CaM, indicando que podría deberse a un efecto general sobre proteínas de membrana, independientemente de la unión a CaM, quizás mediante la activación de las enzimas responsables del corte o induciendo cambios a nivel de membrana plasmática.
- El corte es yuxtamembrana y la unión es más distal, por tanto no parece compatible con una protección directa del sitio de corte por unión de CaM.
- Temporalidad: en estado basal en PC12 no vemos unión y sin embargo la formación de fragmentos es baja. Si el efecto del W13 fuese debido simplemente a la pérdida de la protección por parte de CaM, deberíamos ver la misma fragmentación en las dos situaciones: W13 y no estimulación.

Por tanto, las evidencias apuntan a que la inhibición de CaM es necesaria para la activación de la proteasa responsable del corte o a para la redistribución de Trk, u otras proteínas de membrana, que facilite su disponibilidad a la proteasa.

Se ha visto para otros receptores como es el ErbB4, que tras el segundo corte, por actividad γ -secretasa, se produce un fragmento soluble que puede translocarse a núcleo (Carpenter, 2003). Una vez en el núcleo puede regular la expresión génica actuando como una chaperona de STAT5A (Williams et al., 2004).

También p75 sufre el corte del dominio extracelular promovido por PMA (Kanning et al., 2003). Se debe a la actividad α - y γ -secretasa de forma dependiente de PKC. El fragmento formado puede activar Rho e inhibir el crecimiento axonal (Domeniconi et al., 2005).

En el caso de Trk, no se ha descrito el destino de estos fragmentos, ni las proteasas que los forman, pero resulta interesante que sean constitutivamente

activos, ya que podrían dar lugar a la activación sostenida de la señalización en ausencia de ligando.

2.2. Otros efectos del W13

Se ha descrito que CaM es necesaria para la fusión de los endosomas tempranos (Lawe et al., 2003), para la tubulación durante el reciclaje (de Figueiredo and Brown, 1995) y además puede unirse a clatrina (Pley et al., 1995). Por tanto estos procesos pueden verse alterados por la inhibición de CaM.

En el caso del receptor EGFR la inhibición de CaM impide el reciclaje y degradación, provocando la acumulación de éste en endosomas de mayor tamaño (Tebar et al., 2002), dicha inhibición del reciclaje requiere la función de PKC δ (Llado et al., 2004).

En el resultado de la inmunofluorescencia de TrkA en PC12^{6/15} tratadas con NGF o el inhibidor de CaM (Fig R9), vemos que paralelamente a lo descrito en el caso de EGFR, la adición de W13 hace variar la distribución celular de TrkA, provocando la disminución de la cantidad de Trk en la membrana, e incrementando el número y tamaño de las vesículas.

Dado que CaM está actuando en varios procesos celulares decidimos buscar y mutar el lugar de unión a CaM de TrkA, para determinar cual puede ser la función de la unión.

3. Selección de la región a mutar _____

En el momento en que nos planteamos mutar el posible lugar de unión a CaM de Trk, analizamos las características de la región intracelular en busca de un buen lugar candidato. Al no existir un CBD homólogo a los descritos, nos encontramos ante dos vías a seguir: mutagénesis masiva aleatoria e identificación de los mutantes defectivos en unión a CaM; o mutagénesis dirigida de una región importante funcionalmente para Trk, pero para la que no se hubiera descrito su mecanismo de acción; de manera que pudiésemos descifrar si su efecto se debe o no a la unión de CaM en ese punto. Esta segunda aproximación nos pareció

técnicamente más atractiva, y nos garantizaba que la mutación tendría algún efecto.

3.1 Cuestiones estructurales

El modelado tridimensional por homología a proteínas cuya estructura se ha resuelto, nos permite obtener un modelo teórico de Trk. La exactitud de estas predicciones depende fundamentalmente de la similitud a las proteínas que usamos como molde. Los dominios Tyr Kinasa presentan un elevado grado de conservación, que nos da cierta confianza en el modelo teórico.

Otra garantía de la validez del modelo obtenido es la situación de los aa básicos importantes para la estabilización del loop de activación (Cunningham and Greene, 1998) relativa a las Tyr fosforiladas, de forma que en el modelo de la forma activa quedan más próximos que en el modelo de la forma inactiva. Este método de validación está basado en criterios experimentales y ello supone una ventaja frente a los métodos teóricos de refinar la estructura.

No es nuestro objetivo conseguir una estructura 3D de un elevado grado de exactitud, nos vale una idea general de la estructura, que nos permita ver la posición relativa del dominio kinasa respecto a los aa que estamos mutando.

Basándonos en la estructura predicha, vemos que el dominio mutado está en una zona expuesta formando un loop entre dos hélices alfa (Fig R12). De forma que es compatible con una región de unión a CaM, es accesible y puede replegarse formando una α -hélice en la que los aa hidrofóbicos quedan orientados hacia el mismo lado (Fig R13).

Otro hecho remarcable es que en la conformación activa se encuentra justo debajo del loop de activación, por lo que podría estar regulando la estabilidad de la conformación activa, directamente o a través de reclutar a otra proteína.

3.2. Otras características

Como se ha descrito en el apartado de resultados, las características funcionales de esta región, al margen de la posible implicación en la estabilización del loop de activación; son que constituye un motivo de transporte basado en Tyr (YxxØ) y que además podría ser susceptible de regulación por fosforilación. Por ello la Y701 es una diana interesante para estudiar su implicación en la actividad, transporte y destino intracelular de Trk activado por NGF, y como ello podría estar regulado por CaM.

Los motivos basados en Tyr se han descrito como lugares de unión de proteínas adaptadoras para la internalización y transporte (Bonifacino and Traub, 2003), y concretamente se ha descrito que el YRKF de TrkA podría ser un regulador negativo de la internalización (Jullien et al., 2003).

La mutación de la Y701 a Phe supone una diferencia en la hidrofobicidad, siendo Tyr un aa polar en contraposición a la hidrofobicidad de Phe, aunque estructuralmente sean equivalentes, por ello tanto la mutación Y701D como la Y701F están eliminando el motivo YxxØ.

La sustitución de un residuo fosforilable por un residuo con carga negativa se ha utilizado de forma habitual para mimetizar el cambio conformacional que provoca la fosforilación (MacDonald et al., 2000), por tanto, esperamos que en nuestro caso la mutación Y701D reproducirá el efecto fisiológico de un fosfato. Asimismo la mutación a Phe es más conservativa, pero elimina la capacidad de fosforilación del aa.

Tenemos evidencias experimentales de que esta Tyr puede encontrarse fosforilada a los 30min de tratamiento con NGF (Fig. R14). Mediante el análisis por MALDI se ha detectado un fosfopéptido correspondiente a la región que contiene la Y701. Aunque dicho péptido contiene además la S698, la probabilidad de fosforilación según Netphos sobre la Ser es bajísima, por tanto podemos considerar que el aa fosforilado será probablemente la Tyr.

El resultado de la predicción con *GPS* indica que esta Tyr puede ser sustrato de Tie2, receptor Tyr kinasa que se expresa principalmente en el endotelio vascular y participa en la angiogénesis. El hecho que sea reconocido como diana de fosforilación de otro receptor de membrana, puede además

significar que se trate de un lugar de autofosforilación, o bien un sitio de regulación por otras TK.

Paralelamente, MuSK, un receptor TK muy próximo a Trk, localizado en la membrana postsináptica de las uniones neuromusculares, contiene una Tyr (Y775) en la posición equivalente a la Y701 de Trk. Watty y colaboradores han detectado la autofosforilación en esta Tyr por MALDI en MuSK de ratón sobrepresado en células de insecto (Watty et al., 2000). El nivel de fosforilación que detectan es bajo, y el residuo no está conservado en MuSK de *Torpedo sp.*, por tanto deducen que no es necesario para la activación. Sin embargo el efecto inhibitorio de la fosforilación, que observamos en nuestro caso, explicaría el bajo nivel de fosforilación que detectan, ya que han realizado el experimento con MuSK activado “*in vitro*”, situación en la que no sería de esperar la presencia de una fosforilación inhibitoria.

Parece por tanto que es probable encontrar este residuo fosforilado, y que en condiciones más favorables podremos observar un mayor grado de fosforilación.

4. Fosforilación en otros residuos _____

Puesto que estábamos analizando la fosforilación de la Y701, decidimos ampliar el estudio a las Ser y Thr. Estos experimentos se están llevando a cabo en colaboración con el Dr. Ole N. Jensen (Dinamarca). Con el análisis realizado hasta el momento hemos detectado dos nuevas fosforilaciones, que recaen sobre la S677 y la T687.

Se ha descrito que TrkB es fosforilado en Ser por la activación con BDNF (Guiton et al., 1994), y que la estimulación de p75 con BDNF induce la fosforilación inhibitoria en Ser de TrkA (MacPhee and Barker, 1997). Por tanto parece que puede producirse una regulación de Trk por Ser/Thr kinasas. Hasta el momento no se había descrito sobre que aa recaen estas fosforilaciones, así que es un resultado interesante, que va a abrir la puerta al estudio en profundidad de la regulación de Trk por fosforilación en Ser/Thr.

Detectamos la fosforilación en T687 a los 5min de tratamiento con NGF, y la fosforilación en S677 tanto a 5 como 30 min de tratamiento. Por tanto parece que estas fosforilaciones tengan un papel positivo en la activación de Trk.

No hemos visto la fosforilación de la primera Tyr del loop de activación, pero sin embargo sí que se detecta la fosforilación de la Ser adyacente (S677). En Trk la mutación de la primera Tyr no tiene efecto deletéreo sobre la actividad del receptor (Guiton et al., 1994), en el InsR, en cambio, la sustitución de la Tyr homóloga sí que impide la activación del receptor, y cabe destacar que este receptor no tiene una Ser equivalente a la S677 de Trk. Por tanto tiene sentido pensar que la fosforilación de una u otra sea importante para estabilizar la conformación activa del receptor. En el caso de Trk, podría ser la Ser y no la Tyr la que se encuentra fosforilada.

5. Efecto de los mutantes ---

5.1. ¿Es el dominio de unión a CaM?

Los resultados obtenidos con los mutantes de la Y701 sobre la unión a CaM no son concluyentes. Guiándonos por el resultado con la proteína recombinante vemos como la mutación Y701D disminuye de forma espectacular la interacción que se produce en el KD, sin embargo, el efecto de las mutaciones de la Y701 sobre TrkA*wt* es mucho menor (Fig. R16).

El efecto de la mutación KD sobre la unión a CaM, es un tanto sospechoso debido a su independencia de Ca^{2+} . En las células PC12^{nnr5}, los mutantes Y701D y RK702DE tampoco presentan autofosforilación y sin embargo unen CaM de forma dependiente de Ca^{2+} .

Pese a ello, cabe destacar, que la simple sustitución de Y701 a Asp, es capaz de recuperar la unión regulada a CaM en el mutante TrkA*KD*, indicando su importancia en la conformación de Trk adecuada para la unión a CaM.

Por el otro lado tenemos el resultado con los mutantes expresados en PC12^{nnr5}, en el que vemos que cualquiera de las mutaciones conlleva una menor interacción con CaM que Trk *wt*, tanto las mutaciones sobre la Tyr como sobre los aa hidrofóbicos, sin embargo la unión no se inhibe completamente en ninguna de

las construcciones, y paralelamente no observamos efecto aditivo de las mutaciones sobre los residuos hidrofóbicos.

Por ello podemos decir que esta región es importante para mantener una conformación de Trk susceptible de unir CaM de forma regulada, y que cualquier mutación aunque no es deletérea disminuye el grado de interacción.

5.2. Efecto de los mutantes de la Tyr 701

Puesto que la señalización por Trk se produce a través del reclutamiento de adaptadores en las Tyr fosforiladas, esperábamos ver un efecto positivo al simular una fosforilación en Y701, y un efecto inhibitorio al sustituirla por un aa no fosforilable. Así que en primer lugar nos sorprendió el hecho que la mutación Y701D inactivara el receptor. A la vez constituye un resultado más interesante puesto que todavía no se había descrito ninguna fosforilación en Tyr inhibitoria de Trk.

Funcionalidad del mutante Y701F

Los resultados muestran que la mutación Y701F produce una mayor duración de la activación de ERK (Fig R19), pero este efecto no correlaciona con una diferenciación mayor o más rápida de las células PC12^{nnr5} transfectadas con este mutante (Fig R18).

La transfección en PC12^{nnr5} se ha utilizado ampliamente para comprobar el efecto de mutantes de Trk, pero el hecho de trabajar con un margen de células transfectadas de en torno al 20%, la heterogeneidad en el nivel de expresión y que el proceso de transfección sea de por sí estresante para las células, hace que el grado de diferenciación de las PC12^{nnr5} nunca llegue a ser comparable al de las PC12 nativas (Fig MM4). Además se ha descrito que las PC12^{nnr5} no adquieren el fenotipo colinérgico propio de las PC12 al diferenciarse (Baskey et al., 2002).

Por eso no podemos descartar que en otras condiciones, viésemos un efecto del mutante Y701F, que confirmase la pérdida de un lugar de fosforilación inhibitoria y que resultase en una mayor diferenciación celular.

Pérdida de función de Trk-Y701D

Vamos a seguir la cadena de acontecimientos que llevan a la respuesta a NGF para tratar de encontrar la causa de la falta de actividad en células PC12 del mutante Y701D:

- En primer lugar nos interesa que Trk llegue a la membrana plasmática y pueda unirse a NGF:

Por los experimentos de biotilización e inmunofluorescencia con RTA vemos que las mutaciones no afectan a la exportación a membrana plasmática. De esta forma el NGF debería ser accesible para todos los mutantes.

La mutación en la región intracelular no debería ser suficiente para alterar la estructura de la parte extracelular donde se produce la unión a NGF. Por ello la unión al ligando solo podría estar alterada a través de la pérdida de la unión de alta afinidad mediada por la intervención de p75.

No está claro el mecanismo por el cual p75 genera los sitios de unión a NGF de alta afinidad con TrkA, pero se postula que la interacción p75-Trk es necesaria. En tal caso podríamos plantearnos que el efecto sea debido a la pérdida de dicha unión en nuestro mutante. Sin embargo, la sobreexpresión de Trk da lugar a su activación independientemente de ligando, y en células HEK293 no observamos autofosforilación del mutante Y701D, indicando que la actividad independiente de ligando también está afectada, y por tanto el efecto no es debido a la pérdida de unión a NGF.

En conclusión, aún sin haber estudiado la interacción con NGF, parece que no es éste el factor limitante en el mutante Y701D.

- El siguiente paso es que se produzca la activación del receptor: dimerización, fosforilación de las tirosinas del loop de activación y cambio conformacional:

Por los resultados obtenidos, éste parece ser el punto limitante, ya que la proteína expresada en bacterias o inmunoprecipitada de PC12^{nnr5} es activa: capaz de autofosforilarse y de fosforilar al sustrato *in vitro* (Fig R17) pero dejamos de ver fosforilación en el contexto celular (Fig R23), podemos plantear varias causas:

- *La forma activa no es estable en el contexto celular: Y701D lo convierte en sustrato preferencial de las vías de inactivación.*

- *debido a que la defosforilación esté incrementada*
- *o internalización y/o degradación de la proteína acelerada.*
- *La activación no llega a producirse en células PC12.*
 - *Se une alguna proteína reguladora bloqueando a Trk e impidiendo su autofosforilación.*
 - *El NGF induce la internalización del receptor Y701D antes de que este llegue a dimerizar y activarse.*

Para responder a esta cuestión en función de los resultados obtenidos, debemos tener en cuenta que con la mutación de la Y701 estamos provocando dos alteraciones distintas simultáneamente: la pérdida del lugar de transporte YxxØ (tanto en el mutante Y701D como Y701F), y la introducción de una carga negativa (hecho diferencial entre la mutación a Asp y Phe).

Paralelamente observamos dos tipos de resultado: la mayor internalización en Y701D y Y701F; y la pérdida de actividad en el mutante Y701D pero no en el mutante Y701F.

El motivo de transporte se pierde en ambos casos, por eso el efecto de ambos mutantes Y701D y Y701F sobre el transporte es similar.

La simulación de una fosforilación en el mutante Y701D conduce a la inactivación del receptor, en cambio la mutación Y701F, que impide la fosforilación, lleva a una activación más sostenida. Por tanto podemos atribuir el efecto sobre la internalización a la pérdida del motivo YxxØ y el efecto sobre la funcionalidad a la introducción de una carga negativa.

Fisiológicamente el efecto de la carga negativa podría explicarse como una fosforilación que tiene lugar a tiempo largo para parar la señalización por Trk; o por efecto de la activación de otra vía, como mecanismo para aumentar la selectividad de la respuesta.

Puesto que la carga no elimina la actividad kinasa de Trk, podría ser que la inactivación fuese debida al reclutamiento de alguna proteína reguladora negativa como pueda ser una fosfatasa.

Internalización y transporte

El tratamiento con NGF induce la disminución de la cantidad de Trk en la membrana plasmática de forma más notable en Trk *wt* y Y701F que Y701D o RK702DE. También la velocidad de degradación es mayor en los mutantes activos que en los inactivos (Fig R20).

En el caso de detectar el receptor internalizado (marcaje con biotina reducible o inmunofluorescencia con RTA) vemos que la mutación de la Y701, tanto a Asp, como a Phe, induce una internalización más rápida del receptor. (Fig R21 y Fig R22).

A primera vista estos resultados pueden parecer contradictorios, sin embargo, la explicación es lógica teniendo en cuenta que estamos detectando el resultado de varios procesos simultáneos: internalización, degradación y reciclaje, que se ven alterados de forma distinta en cada uno de los mutantes.

Vemos que el motivo basado en Tyr YxxØ estabiliza Trk en la membrana plasmática, su mutación provoca una internalización más rápida en respuesta a RTA, como observamos en la Fig R22 para los mutantes Y701D y Y701F. Este resultado está en consonancia con el efecto descrito por Jullien y colaboradores (Jullien et al., 2003), que observan que la pérdida de la región C-terminal comprendiendo este motivo, presenta una velocidad de internalización mayor.

En el mutante RK702DE, se conserva el YxxØ; en este tipo de motivos, los dos residuos centrales no están determinados, pero son los que permitirán discriminar la proteína adaptadora que vaya a unirse, de forma que en este caso probablemente habrá cambiado su especificidad, y por ello vemos alterada su internalización. Se observó que la mutación de estos residuos a Ala desestabiliza el loop de activación (Cunningham and Greene, 1998), por lo que muy probablemente el cambio de aa básicos a ácidos perturbe aún más la conformación de Trk dando lugar a su inactivación.

Una vez internalizado, el receptor principalmente será degradado o reciclado a la membrana. El transporte retrógrado sería otra opción en células diferenciadas, pero podemos obviarlo teniendo en cuenta las pequeñas dimensiones de una PC12 sin diferenciar. Tampoco la fragmentación es significativa a tiempos cortos (15min-2h) de tratamiento con NGF. Por tanto el direccionamiento distintivo hacia degradación o reciclaje es la causa de las diferencias en la estabilidad de los mutantes de Trk tras la internalización.

El resultado del experimento realizado con clones estables expresores de los mutantes (Fig R19) en que vemos variaciones en el nivel total de Trk por efecto del NGF, nos indujo a pensar que la degradación podría estar aumentada en los mutantes inactivos. El estudio en concreto de la degradación del Trk de membrana mediante biotilización en transfección transitoria (Fig R20), nos indicó lo contrario: la degradación de Y701F y *wt* es más rápida que la de Y701D y RK702DE. Este hecho puede relacionarse con la observación, principalmente en HEK293, que los mutantes inactivos tienen mayor proporción de forma madura que los activos.

Este resultado está respaldado bibliográficamente puesto que ha sido descrito que Trk activo es direccionado principalmente a degradación y en cambio es reciclado si es inactivo (Saxena et al., 2005). Por tanto, ambos mutantes Y701F y Y701D son internalizados más rápido que *wt*, pero en el caso de Y701D, al ser inactivo, es reciclado a la membrana plasmática, por eso su colocalización con TfnR es mayor, y su degradación menor.

Por tanto concluimos que el motivo YRKF está implicado en mantener la estabilidad del receptor en la membrana, efecto que se pierde al mutar la Y701.

Hemos visto también que puede producirse la fosforilación de esta Tyr y dado que la introducción de una carga negativa en esta posición inactiva el receptor, podemos pensar que fisiológicamente, la fosforilación de Y701 da lugar a la inactivación del receptor.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- **Primera:** CaM interacciona con TrkA de forma dependiente de Ca^{2+} pero independiente del estado de activación del receptor. Tanto con la proteína recombinante como procedente de lisados de PC12^{6/15}.
- **Segunda:** La unión de CaM a TrkA es directa y se produce en la mitad distal del dominio intracelular de TrkA.
- **Tercera:** Esta interacción no es exclusiva de TrkA sino que también ocurre con TrkB y/o TrkC en un contexto más fisiológico como las neuronas corticales de embrión de rata.
- **Cuarta:** La inhibición de CaM provoca la proteólisis del receptor dando lugar al fragmento p41 el cual es constitutivamente activo: se autofosforila y puede reclutar proteínas de señalización (Shc y PLC- γ).
- **Quinta:** Por espectrometría de masas hemos detectado que el receptor Trk es fosforilado también en S677 y T687.
- **Sexta:** El motivo LYRKF presente en el dominio TK de TrkA está implicado en la unión a CaM, aunque su mutación no elimina la interacción por completo.
- **Séptima:** La mutación de la Y701 a Asp, imitando una fosforilación, da lugar a un receptor inactivo, incapaz de inducir la diferenciación de células PC12^{nnr5} en presencia de NGF, mientras que la mutación a Phe, no afecta a su funcionalidad.
- **Octava:** El motivo YRKF esta implicado en la estabilización de Trk en la membrana plasmática. La mutación de la Y701 induce una internalización más rápida del receptor.

APÉNDICE

APÉNDICE

Características de los aa

Nombre	Código		Cadena lateral
Alanina	A	Ala	Pequeño, Apolar
Arginina	R	Arg	Básico
Asparagina	N	Asn	Amida, Polar
Aspártico	D	Asp	Ácido
Cisteína	C	Cys	Polar
Fenilalanina	F	Phe	Aromático, Apolar
Glicina	G	Gly	Pequeño, Polar
Glutámico	E	Glu	Ácido
Glutamina	Q	Gln	Amida, Polar
Histidina	H	His	Básico
Isoleucina	I	Ile	Apolar
Leucina	L	Leu	Apolar
Lisina	K	Lys	Básico
Metionina	M	Met	Apolar
Prolina	P	Pro	Apolar
Serina	S	Ser	Polar
Tirosina	Y	Tyr	Aromático, Polar
Treonina	T	Thr	Polar
Triptófano	W	Trp	Aromático, Apolar
Valina	V	Val	Apolar

Parte de los resultados han sido publicados en Journal of Neurochemistry:

Journal of Neurochemistry, 2004, **88**, 422–433

doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02178.x

Trk is a calmodulin-binding protein: implications for receptor processing

Marta Llovera,^{*,1} Yolanda de Pablo,^{*,1} Joaquim Egea,^{*,1,2} Mario Encinas,^{*,1,3} Sandra Peiró,[†] Dionisio Martín-Zanca,^{‡,4} Nativitat Rocamora^{§,4} and Joan X. Comella^{*,4}^{*}Grup de Neurobiologia Molecular, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida, Spain[†]Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain[‡]Instituto de Microbiología Bioquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain[§]Laboratori de Biologia Molecular, Institut Català d'Oncologia (ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Spain**Abstract**

The tyrosine kinase receptors for the neurotrophins (Trk) are a family of transmembrane receptors that regulate the differentiation and survival of different neuronal populations. Neurotrophin binding to Trk leads to the activation of several signalling pathways including a rapid, but moderate, increase in intracellular calcium levels. We have previously described the role of calcium and its sensor protein, calmodulin, in Trk-activated intracellular pathways. Here we demonstrate that calmodulin is able to precipitate TrkA from PC12 cell lysates. Using recombinant GST-fusion proteins containing the complete intracellular domain of TrkA, or fragments of this region, we show that calmodulin binds directly to the C-terminal domain of TrkA in a

Ca²⁺-dependent manner. We have also co-immunoprecipitated endogenous Trk and calmodulin in primary cultures of cortical neurones. Moreover, we provide evidence that calmodulin is involved in the regulation of TrkA processing in PC12 cells. Calmodulin inhibition results in the generation of a TrkA-derived p41 fragment from the cytosolic portion of the protein. This fragment is autophosphorylated in tyrosines and can recruit PLC γ and Shc adaptor proteins. These results suggest that calmodulin binding to Trk may be important for the regulation of Trk intracellular localization and cleavage.

Keywords: calmodulin-binding protein, p41 fragment, PC12 cells, rat cortical neurones, receptor cleavage, Trk receptor. *J. Neurochem.* (2004) **88**, 422–433.

TrkA is a member of the subfamily of receptor tyrosine kinases that also includes TrkB and TrkC. They act as specific receptors for the nerve growth factor (NGF) family of neurotrophic factors, called neurotrophins. NGF is the preferred ligand for TrkA, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and NT4/NT5 are both ligands for TrkB, and NT3 is the only known ligand for TrkC (Barbacid 1995). Neurotrophins are involved in the development, maintenance and repair of the nervous system (Lewin and Barde 1996), but each exhibit trophic effects for only a specific, although partially overlapping, subset of neuronal populations in either the central or the peripheral nervous system (Davies 1994). Specifically, NGF has been demonstrated to be essential for

Address correspondence and reprint requests to Joan X. Comella, Grup de Neurobiologia Molecular, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Avda. Rovira Roure, 44, 25198 Lleida, Spain. E-mail: joan.comella@cmb.udl.es

¹These authors contributed equally to this work.

²Present address: Department of Molecular Neurobiology, Max-Planck Institute of Neurobiology, An Klopferspitz 18 A, D-82152 Martinsried, München, Germany.

³Present address: Department of Molecular Biology and Pharmacology, Campus Box 8103, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, Saint Louis, MO 63110, USA.

⁴Senior coauthors.

Abbreviations used: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CaM, calmodulin; CaMKK, CaM-dependent protein kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK, extracellular-regulated kinase; GST, glutathione S-transferase; NGF, nerve growth factor; NT, neurotrophin; PI, 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC γ , phospholipase C γ ; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TFP, trifluoperazine.

Received April 29, 2003; revised manuscript received September 25, 2003; accepted September 26, 2003.

RESUMEN

TrkA se descubrió como un oncogén producto de la fusión de su dominio tirosina kinasa (TK) con la tropomiosina. Posteriormente, aumentó su interés tras descubrirse que la proteína nativa constituía el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF).

Se conocen bien los acontecimientos que ocurren tras la unión del ligando al receptor y que dan lugar a la activación de las vías de señalización de las MAPK y PI 3-K/Akt. Se sabe que, *in vivo*, la internalización del receptor y su transporte retrógrado también juegan un papel importante para el efecto a largo plazo del NGF y que es una característica distintiva de otros receptores de factores de crecimiento.

La activación del receptor también conlleva un aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular. Por ello nos planteamos estudiar la relación entre la activación de TrkA y calmodulina (CaM), como sensor de los niveles de Ca^{2+} intracelulares.

En primer lugar observamos una interacción directa y Ca^{2+} dependiente entre CaM y la mitad c-terminal del dominio intracelular de TrkA. La primera parte del trabajo se centra en caracterizar esta interacción.

Para ver el efecto de la unión sobre Trk, utilizamos inhibidores de CaM. Éstos no impiden la fosforilación de TrkA inducida por NGF, pero sí conllevan la proteólisis del receptor dando lugar a un fragmento con actividad tirosina kinasa constitutiva. Dada la ubicuidad de CaM y su importancia en procesos vitales para la célula, el segundo objetivo consistió en buscar el sitio de unión a CaM de TrkA, para así poder obtener una construcción de Trk en que se perdiera la unión a CaM.

Basándonos en diversas evidencias, nos centramos en la caracterización de una región que contenía una Tyr fosforilable (Y701) y que además forma parte de un motivo de internalización. La última parte del trabajo se centra en describir las características de dicha Tyr y su función, que más allá de la relación con CaM, puede constituir una fosforilación inhibitoria para la actividad de Trk y un lugar de regulación negativa de su internalización.

RESUM

TrkA es va descobrir com a un oncogén producte de la fusió del seu domini tirosina kinasa (TK) amb la tropomiosina. Posteriorment, va augmentar el seu interès en descobrir-se que la proteïna nativa constituïa el receptor del factor de creixement nerviós (NGF).

Es coneixen bé els esdeveniments que tenen lloc a partir de la unió del lligand al receptor i que donen lloc a l'activació de les vies de senyalització de les MAPK y PI 3-K/Akt. Se sap que, *in vivo*, la internalització del receptor i el seu transport retrògrad també juguen un paper important per a l'efecte a llarg termini del NGF i que és un tret distintiu en relació a d'altres receptors de factors de creixement.

L'activació del receptor també comporta un augment transitori de Ca^{2+} intracel·lular. Per això ens vam plantejar l'estudi de la relació entre l'activació de TrkA i calmodulina (CaM), com a sensor dels nivells de Ca^{2+} intracel·lulars.

En primer lloc vam observar una interacció directa i dependent de Ca^{2+} entre CaM i la meitat c-terminal del domini intracel·lular de TrkA. La primera part del treball se centra en caracteritzar aquesta interacció.

Per veure l'efecte de la unió sobre Trk, vam utilitzar inhibidors de CaM. Aquests no impedeixen la fosforilació de TrkA induïda per NGF, però sí comporten la proteòlisi del receptor donant lloc a un fragment amb activitat tirosina kinasa constitutiva. Donada la ubiquïtat de CaM, i la seva importància en processos vitals per a la cèl·lula, el segon objectiu ha consistit en buscar el lloc d'unió a CaM de TrkA per així poder obtenir una construcció de Trk on es perdés la unió a CaM.

Basant-nos en diverses evidències, ens vam centrar en la caracterització d'una regió que conté una Tyr fosforilable (Y701) i que forma part d'un motiu d'internalització. L'última part del treball se centra en descriure les característiques d'aquesta Tyr i la seva funció, que més enllà de la relació amb CaM, pot constituir una fosforilació inhibidora per l'activitat de Trk i un lloc de regulació negativa de la internalització.

ABSTRACT

TrkA was discovered as an oncogen, product of the fusion of its Tyrosine kinase domain with Tropomiosin. Later on, it was identified as the receptor for the Nerve growth factor (NGF).

The first steps in Trk signaling after ligand binding are well understood. And also the pathways leading to MAPKs and PI3K-Akt activation. But receptor internalization and retrograde transport are also important for the long term signaling of TrkA, giving raise to a differential regulation of Trk receptors among other growth factor receptors.

Receptor activation also induces an increase in intracellular calcium concentration. That's why we thought on studying the relationship between TrkA activation and calmodulin (CaM), as a prototypical calcium sensor.

First we described a direct and calcium-dependent interaction between CaM and the c-terminal part of TrkA. The first part of this work consists on the characterization of this interaction.

In order to check the effect of CaM binding on TrkA we used CaM inhibitors. NGF-induced TrkA fosforilation was not inhibited upon CaM inhibition, but Trk was cleaved, leading to constitutively active fragments. CaM is ubiquitous and necessary for many cell processes, so the second objective has been to search for the CaM binding domain on TrkA in order to generate a TrkA mutant defective in CaM binding.

We mutated a region containing a phosphorylatable Tyrosine Y701 that constitutes a trafficking motif, as the putative binding site of CaM. The last part of this project deals with the characterization of the mutants, and their effect even regardless of CaM binding. Its phosphorylation might inhibit Trk function, and the region constitutes a negative regulator of internalization.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Araki T, Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Uetsuki T, Hatanaka H (2000) Shp-2 specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in brain-derived neurotrophic factor signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 74:659-668.
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20:5908-5916.
- Arevalo JC, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2006) Cell Survival through Trk Neurotrophin Receptors Is Differentially Regulated by Ubiquitination. *Neuron* 50:549-559.
- Barde YA, Lindsay RM, Monard D, Thoenen H (1978) New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature* 274:818.
- Barker PA (2004) p75^{NTR} is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42:529-533.
- Baskey JC, Kalisch BE, Davis WL, Meakin SO, Rylett RJ (2002) PC12^{nnr5} cells expressing TrkA receptors undergo morphological but not cholinergic phenotypic differentiation in response to nerve growth factor. *J Neurochem* 80:501-511.
- Benito-Gutierrez E, Nake C, Llovera M, Comella JX, Garcia-Fernandez J (2005) The single AmphiTrk receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells. *Development* 132:2191-2202.
- 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* 7:857-866.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M (1999) Calcium signalling. *Curr Biol* 9:R157-159.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395-447.
- Bosch M, Gil J, Bachs O, Agell N (1998) Calmodulin inhibitor W13 induces sustained activation of ERK2 and expression of p21(cip1). *J Biol Chem* 273:22145-22150.
- Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6:427-446.
- Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martin-Zanca D, Pandiella A (1996) TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* 132:427-436.
- Campenot RB (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4516-4519.

Bibliografía

- Carpenter G (2003) Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol* 15:143-148.
- Clary DO, Weskamp G, Austin LR, Reichardt LF (1994) TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol Biol Cell* 5:549-563.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:1014-1018.
- Cunningham ME, Greene LA (1998) A function-structure model for NGF-activated TRK. *Embo J* 17:7282-7293.
- Chang MS, Arevalo JC, Chao MV (2004) Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* 78:186-192.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
- Chen X, Ye H, Kuruvilla R, Ramanan N, Scangos KW, Zhang C, Johnson NM, England PM, Shokat KM, Ginty DD (2005a) A chemical-genetic approach to studying neurotrophin signaling. *Neuron* 46:13-21.
- Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS (2005b) A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* 16:5761-5772.
- de Figueiredo P, Brown WJ (1995) A role for calmodulin in organelle membrane tubulation. *Mol Biol Cell* 6:871-887.
- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC (2003) NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39:69-84.
- Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Montero JC, Yuste L, Pandiella A (2000) Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem J* 346 Pt 2:359-367.
- Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao MV, Filbin MT (2005) MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 46:849-855.
- Egea J, Espinet C, Soler RM, Peiro S, Rocamora N, Comella JX (2000) Nerve growth factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca(2+) and calmodulin. *Mol Cell Biol* 20:1931-1946.
- Egea J, Espinet C, Soler RM, Dolcet X, Yuste VJ, Encinas M, Iglesias M, Rocamora N, Comella JX (2001) Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol* 154:585-597.
- Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5454-5458.
- Espósito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 276:32687-32695.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Gelezianus R, Bradshaw RA, Greene WC (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in

- nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 20:7556-7563.
- Frossard N, Freund V, Advenier C (2004) Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 500:453-465.
- Fukumitsu H, Furukawa Y, Tsusaka M, Kinukawa H, Nitta A, Nomoto H, Mima T, Furukawa S (1998) Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 84:115-127.
- Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharlt M, Thoenen H (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372:266-269.
- Graves CB, Goewert RR, McDonald JM (1985) The insulin receptor contains a calmodulin-binding domain. *Science* 230:827-829.
- Graves CB, Gale RD, Laurino JP, McDonald JM (1986) The insulin receptor and calmodulin. Calmodulin enhances insulin-mediated receptor kinase activity and insulin stimulates phosphorylation of calmodulin. *J Biol Chem* 261:10429-10438.
- Green SH, Rydel RE, Connolly JL, Greene LA (1986) PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. *J Cell Biol* 102:830-843.
- Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M (1985) Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 260:8044-8049.
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Guiton M, Gunn-Moore FJ, Stitt TN, Yancopoulos GD, Tavare JM (1994) Identification of in vivo brain-derived neurotrophic factor-stimulated autophosphorylation sites on the TrkB receptor tyrosine kinase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269:30370-30377.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300:808-812.
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5:461-466.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6:845-858.
- Hansen MR, Zha XM, Bok J, Green SH (2001) Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro. *J Neurosci* 21:2256-2267.

Bibliografía

- He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.
- Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA (2004) Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* 7:596-604.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
- Hendry IA, Stockel K, Thoenen H, Iversen LL (1974) The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res* 68:103-121.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339-341.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12419-12424.
- Howe CL, Mobley WC (2005) Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol* 15:40-48.
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372:746-754.
- Inagaki N, Thoenen H, Lindholm D (1995) TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *Eur J Neurosci* 7:1125-1133.
- Indo Y (2002) Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin Auton Res* 12 Suppl 1:120-32.
- Ip NY, Ibanez 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* 89:3060-3064.
- Johnson EM, Jr., Koike T, Franklin J (1992) A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol* 115:163-166.
- 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* 87:8060-8064.
- Joyal JL, Burks DJ, Pons S, Matter WF, Vlahos CJ, White MF, Sacks DB (1997) Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 272:28183-28186.
- Jullien J, Guili V, Reichardt LF, Rudkin BB (2002) Molecular kinetics of nerve growth

- factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* 277:38700-38708.
- Jullien J, Guili V, Derrington EA, Darlix JL, Reichardt LF, Rudkin BB (2003) Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. *J Biol Chem* 278:8706-8716.
- Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, Kim PK, Kim DS, Ryu SH, Chao MV, Kim TW (2003) Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278:42161-42169.
- Kaisho Y, Yoshimura K, Nakahama K (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. *FEBS Lett* 266:187-191.
- Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC (2003) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23:5425-5436.
- Kincaid RL, Vaughan M, Osborne JC, Jr., Tkachuk VA (1982) Ca²⁺-dependent interaction of 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl-calmodulin with cyclic nucleotide phosphodiesterase, calcineurin, and troponin I. *J Biol Chem* 257:10638-10643.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989) trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *Embo J* 8:3701-3709.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89:693-702.
- 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.
- Lawe DC, Sitouah N, Hayes S, Chawla A, Virbasius JV, Tuft R, Fogarty K, Lifshitz L, Lambright D, Corvera S (2003) Essential role of Ca²⁺/calmodulin in Early Endosome Antigen-1 localization. *Mol Biol Cell* 14:2935-2945.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116:321-361.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 19:514-520.
- Li H, Sanchez-Torres J, Del Carpio A, Salas V, Villalobo A (2004) The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein. *Biochem J* 381:257-266.
- Lo KY, Chin WH, Ng YP, Cheng AW, Cheung ZH, Ip NY (2005) SLAM-associated protein as a potential negative regulator in Trk signaling. *J Biol Chem* 280:41744-41752.
- Llado A, Tebar F, Calvo M, Moreto J, Sorkin A, Enrich C (2004) Protein kinaseCdelta-calmodulin crosstalk regulates epidermal growth factor receptor exit from early endosomes. *Mol Biol Cell* 15:4877-4891.
- MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM, Meakin SO (2000) Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J Biol Chem* 275:18225-18233.

Bibliografía

- MacInnis BL, Campenot RB (2002) Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* 295:1536-1539.
- MacPhee IJ, Barker PA (1997) Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signaling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain. *J Biol Chem* 272:23547-23551.
- 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* 247:1446-1451.
- Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA (2005) p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 6:936-941.
- Marsh HN, Dubreuil CI, Quevedo C, Lee A, Majdan M, Walsh GS, Hausdorff S, Said FA, Zoueva O, Kozlowski M, Siminovitch K, Neel BG, Miller FD, Kaplan DR (2003) SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. *J Cell Biol* 163:999-1010.
- Martin-Nieto J, Villalobo A (1998) The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 37:227-236.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9:24-33.
- Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD (2006) Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 16:45-54.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:295-318.
- Mobley WC, Schenker A, Shooter EM (1976) Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry* 15:5543-5552.
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15:661-675.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427:843-848.
- Obermeier A, Lammers R, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993a) Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem* 268:22963-22966.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993b) Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *Embo J* 12:933-941.
- Oppenheim RW (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12:252-255.
- Patton C, Thompson S, Epel D (2004) Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* 35:427-431.
- Pley UM, Hill BL, Alibert C, Brodsky FM, Parham P (1995) The interaction of calmodulin with clathrin-coated vesicles, triskelions, and light chains. Localization of a binding site. *J Biol Chem* 270:2395-2402.

- Qian X, Riccio A, Zhang Y, Ginty DD (1998) Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21:1017-1029.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-532.
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203-233.
- Saxena S, Howe CL, Cosgaya JM, Steiner P, Hirling H, Chan JR, Weis J, Kruttgen A (2005) Differential endocytic sorting of p75^{NTR} and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci* 28:571-587.
- Scott J, Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell GI, Rutter WJ (1983) Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* 302:538-540.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381-3385.
- Shao Y, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G, Cabot JB, Hilbush BS, Haleboua S (2002) Pincher, a pinocytotic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* 157:679-691.
- Soler RM, Egea J, Mintenig GM, Sanz-Rodriguez C, Iglesias M, Comella JX (1998) Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3 kinase- and MAPK-independent pathways. *J Neurosci* 18:1230-1239.
- Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM (1979) Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* 254:5972-5982.
- Tebar F, Villalonga P, Sorkina T, Agell N, Sorkin A, Enrich C (2002) Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway. *Mol Biol Cell* 13:2057-2068.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibanez CF, Geraerts WP, Bulloch AG (1998) Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *Embo J* 17:2534-2542.
- Villalonga P, Lopez-Alcala C, Chiloeches A, Gil J, Marais R, Bachs O, Agell N (2002) Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 277:37929-37935.
- Watty A, Neubauer G, Dreger M, Zimmer M, Wilm M, Burden SJ (2000) The in vitro and in vivo phosphotyrosine map of activated MuSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4585-4590.
- Williams CC, Allison JG, Vidal GA, Burow ME, Beckman BS, Marrero L, Jones FE (2004) The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* 167:469-478.
- Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J

Bibliografia

- (2001) The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 276:7709-7712.
- Xue Y, Zhou F, Zhu M, Ahmed K, Chen G, Yao X (2005) GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res* 33:W184-187.
- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ (2002) A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci* 5:539-545.
- Yano H, Lee FS, Kong H, Chuang J, Arevalo J, Perez P, Sung C, Chao MV (2001) Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci* 21:RC125.
- Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396:584-587.
- Youvan DC, Silva, C.M., Bylina, E.J., Coleman, W.J., Dilworth, M.R., Yang, M.M. (1997) Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivates on Nickel Chelating Beads. *Biotechnology* 3:1-18.
- Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU (2001) p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem* 276:31023-31029.
- Zhou FF, Xue Y, Chen GL, Yao X (2004) GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method. *Biochem Biophys Res Commun* 325:1443-1448.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD (2005) Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6:615-625.