

**Interacción de las neurotoxinas clostridiales  
con los receptores de neurotrofinas:  
identificación de TrkB como receptor proteico  
de la toxina tetánica**

TESIS DOCTORAL

**Ana Candalija Iserte**

Septiembre 2015

Institut de Neurociències

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

# **Interacción de las neurotoxinas clostridiales con los receptores de neurotrofinas: identificación de TrkB como receptor proteico de la toxina tetánica**

Memoria elaborada por

**Ana Candalija Iserte**

Licenciada en Biotecnología, para optar al Grado de Doctora en  
Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma  
de Barcelona, bajo la dirección del doctor

**José Aguilera Ávila**

---

Ana Candalija Iserte

---

José Aguilera Ávila

Cerdanyola del Vallès, Septiembre del 2015

## ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS .....	i
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN .....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las toxinas clostridiales.....	3
1.1. Mecanismo infeccioso de las toxinas clostridiales .....	5
2. La toxina tetánica .....	8
2.1. Estructura molecular de la TeNT .....	8
2.2. Mecanismo de unión de la TeNT a las membranas neuronales .....	10
2.3. Unión de las CNTs a receptores proteicos .....	15
2.3.1. Receptores proteicos descritos para BoNTs.....	15
2.3.2. Receptores proteicos descritos para TeNT .....	16
2.4. Proceso de internalización de la TeNT en las neuronas.....	17
2.4.1. Internalización de TeNT mediante otros mecanismos de endocitosis.....	20
2.4.2. Diferencias entre los mecanismos infecciosos de BoNT y TeNT .....	20
2.5. Transporte retroaxonal de la TeNT .....	21
2.6. Aplicaciones del Hc-TeNT en la neurociencia y la medicina .....	24
3. Los receptores de neurotrofinas .....	28
3.1. Las neurotrofinas.....	28
3.2. Los receptores Trk.....	29
3.2.1. Estructura molecular .....	30
3.2.2. Mecanismo de activación y proteínas adaptadoras.....	32
3.2.3. Mecanismos de transactivación de los receptores Trk .....	33
3.2.4. Vías de señalización activadas por los receptores Trk .....	34
3.3. El receptor p75 <sup>NTR</sup> .....	38
3.3.1. Estructura molecular .....	38
3.3.2. Interacción con otras proteínas transmembrana .....	40
3.3.3. Vías de señalización activadas y proteínas adaptadoras .....	42
3.3.4. Actividad esfingomielinasa activada por p75 <sup>NTR</sup> .....	44
II. OBJETIVOS.....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. Síntesis y purificación del fragmento C-terminal de la toxina tetánica (Hc-TeNT) .....	53

1.1.	Expresión del fragmento Hc-TeNT.....	53
1.2.	Purificación de Hc-TeNT del lisado celular .....	54
1.3.	Marcaje del Hc-TeNT con AlexaFluor555 .....	54
2.	Estudio bioinformático de modelado molecular.....	56
3.	Mutagénesis del fragmento Hc-TeNT.....	57
3.1.	Reacciones de digestión y ligación .....	57
3.2.	Transformación en células competentes .....	58
3.3.	Secuenciación .....	59
3.4.	Expresión de Hc-A266-311-343 .....	59
4.	Cultivos y líneas celulares .....	60
4.1.	Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata .....	60
4.2.	Línea celular PC12.....	61
4.2.1.	Transfección PC12 .....	61
4.3.	Línea celular NSC-34 .....	62
4.3.1.	Transfección NSC-34.....	62
4.4.	Lisado de las células y cuantificación de proteína total .....	63
5.	Ensayos de viabilidad celular y enzimáticos .....	64
5.1.	Ensayo de MTT.....	64
5.2.	Tinción de núcleos con Hoescht 33258 .....	64
5.3.	Ensayo de actividad caspasa-3 .....	64
5.4.	Ensayo actividad esfingomielinasa .....	65
6.	Ensayos de unión e internalización de Hc-TeNT.....	66
6.1.	Desplazamiento de la unión .....	66
6.2.	Ensayos de internalización .....	66
7.	Citometría de flujo.....	68
8.	Inyección intramuscular de Hc-TeNT en ratón y trazado retroaxonal .....	69
8.1.	Inyección intramuscular y sacrificio de los animales.....	69
8.2.	Preparación de los tejidos de médula y músculo .....	69
8.3.	Inmunohistoquímica.....	70
9.	Técnicas de inmunodetección .....	72
9.1.	Western Blot.....	72
9.2.	Dot Blot.....	74
9.3.	Inmunoprecipitación .....	74

9.4.	Inmunocitoquímica .....	75
IV.	RESULTADOS .....	77
1.	PAPEL DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkB COMO RECEPTOR PROTEICO DE ALTA AFINIDAD PARA LA TOXINA TETÁNICA.....	81
1.1.	La toxina tetánica es capaz de acoplarse <i>in silico</i> a Los receptores Trk.....	81
1.2.	Hc-TeNT interacciona con el receptor TrkB en cultivos neuronales .....	84
1.2.1.	El fragmento Hc-TeNT se une a un péptido homólogo al dominio D5 de TrkB .....	84
1.2.2.	El Hc-TeNT es capaz de inducir la fosforilación del receptor TrkB.....	86
1.2.3.	El Hc-TeNT colocaliza con TrkB en neuronas en cultivo.....	87
1.2.4.	Hc-TeNT compite con BDNF por la unión a membrana en neuronas granulares .....	89
1.2.5.	BDNF desplaza la interacción entre Hc-TeNT y TrkB en vesículas endocíticas .....	92
1.3.	Internalización de Hc-TeNT en uniones neuromusculares y transporte retroaxonal hasta el soma de las motoneuronas.....	95
1.4.	Implicación de los residuos Y266, K311 y E343 de Hc-TeNT en su interacción con TrkB	102
1.4.1.	La mutación en tres residuos de Hc-TeNT provoca una pérdida de afinidad por el receptor TrkB.....	102
1.4.2.	Capacidad de unión a membranas neuronales de Hc-A266-311-343.....	104
1.4.3.	Capacidad de internalización de Hc-A266-311-343 .....	106
1.4.4.	Capacidad de transporte retroaxonal de Hc-A266-311-343 .....	109
2.	IMPLICACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR LOS RECEPTORES TRK .....	115
2.1.	La actividad esfingomielinasa es esencial en el efecto neuroprotector inducido por las neurotrofinas.....	115
2.2.	Papel de la nSMasa en las vías de señalización activadas por las neurotrofinas.....	120
2.2.1.	La activación de Akt inducida por TrkB es dependiente de nSMasa.....	120
2.2.2.	El NGF induce la producción de ceramida en ausencia del receptor TrkA .....	122
2.2.3.	La nSMasa2 está implicada en el mantenimiento de la fosforilación basal de Akt .	124
2.3.	El efecto de supervivencia celular inducido por Hc-TeNT es dependiente de actividad esfingomielinasa.....	125
V.	DISCUSIÓN.....	129
1.	Papel del receptor de neurotrofinas TrkB como receptor proteico de alta afinidad para la toxina tetánica.....	131
1.1.	Hc-TeNT es capaz de unirse al dominio extracelular D5 de TrkB in silico.....	131
1.2.	Hc-TeNT es capaz de interactuar con TrkB así como con un péptido derivado de su dominio D5.....	132

1.3.	Hc-TeNT compite con BDNF por la unión a TrkB en membrana y por la internalización en vesículas endocíticas TrkB-positivas.....	133
1.4.	El fragmento Hc-TeNT inyectado intramuscularmente coincide con TrkB en las uniones neuromusculares y en el soma de las motoneuronas.....	135
1.5.	La mutación de los residuos Y266, K311 y E343 del fragmento Hc-TeNT disminuye su afinidad por TrkB .....	138
1.6.	La mutación de los residuos Y266, K311 y E343 no afecta al transporte retroaxonal de Hc-TeNT <i>in vivo</i> .....	138
1.7.	Consideraciones sobre el modelo de unión a TrkB propuesto.....	139
2.	IMPLICACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR LOS RECEPTORES TRK .....	142
2.1.	La actividad esfingomielinasa es esencial en el efecto neuroprotector inducido por las neurotrofinas.....	142
2.2.	Papel de la nSMasa en las vías de señalización activadas por las neurotrofinas .....	142
2.3.	El efecto de supervivencia celular inducido por Hc-TeNT es dependiente de actividad esfingomielinasa .....	146
VI.	CONCLUSIONES.....	149
VII.	BIBLIOGRAFÍA .....	153

## LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

**Figuras**

Figura 1. Mecanismo de acción del complejo SNARE en el ciclo de fusión de las vesículas presinápticas con la membrana plasmática .....	4
Figura 2. Mecanismo de acción de las CNTs. ....	5
Figura 3. Proceso de infección de las toxinas tetánica y botulínica.....	6
Figura 4. Estructura tridimensional y composición en dominios de las CNTs.....	8
Figura 5. Estructura tridimensional del dominio H <sub>C</sub> -TeNT. ....	9
Figura 6. Estructura molecular y tipos de gangliósidos.....	11
Figura 7. Sitios de unión a gangliósidos en H <sub>C</sub> -TeNT: R-pocket y W-pocket .....	13
Figura 8. Modelo de receptor dual propuesto para las CNTs. ....	14
Tabla 1. Receptores proteicos descritos para los diferentes serotipos de BoNTs. ....	16
Figura 9. Compartimentalización intracelular del fragmento Hc-TeNT y de la toxina colérica. ....	18
Figura 10. Endocitosis mediada por clatrina .....	19
Figura 11. Transporte retrogrado axonal de los endosomas de señalización.....	22
Figura 12. Esquema del mecanismo de endocitosis y transporte retroaxonal para Hc-TeNT.....	24
Figura 13. Vías de señalización activadas por TeNT.....	27
Figura 14. Tipos de neurotrofinas y receptores. ....	30
Figura 15. Estructura de los receptores Trk. ....	31
Figura 16. Cascada de señalización de PI3K/Akt. ....	35
Figura 17. Cascada de señalización de Ras/MAPK. ....	36
Figura 18. Cascada de señalización de PLC- $\gamma$ /PKC.....	37
Figura 19. Estructura del receptor p75 <sup>NTR</sup> . ....	39
Figura 20. Vías de señalización iniciadas por p75 <sup>NTR</sup> . ....	43
Figura 21. Estructura y dominios de la nSMasa2. ....	45
Figura 22. Metabolismo de la ceramida y otras moléculas lipídicas derivadas. ....	46
Figura 23. Secuencia nucleotídica de Hc-TeNT clonada en pYN1 y traducción en aminoácidos. ....	53
Figura 24. Secuencia del constructo sintético clonado en pMK-Hc. ....	58
Figura 25. Diagrama de puntos con un <i>gate</i> que engloba a la población de CGN.....	68
Figura 25. Analogía entre la unión de la NT-4/5 a TrkB y la unión de TeNT a TrkB. ....	82
Figura 27. Modelo molecular propuesto para la interfaz de unión entre TeNT y el receptor TrkB.....	84

Figura 28. El fragmento Hc-TeNT se une <i>in vitro</i> a un péptido sintético basado en el dominio D5 de TrkB.....	85
Figura 29. Niveles de TrkB fosforilado en CGN después de un tratamiento con Hc-TeNT. ....	86
Figura 30. Colocalización entre Hc-TeNT y TrkB en un cultivo de CGN.....	88
Figura 31. El BDNF y el péptido D5, pero no NGF, compiten con Hc-TeNT por la unión a neuronas granulares de cerebelo.....	91
Figura 32. Competición en la internalización entre Hc-TeNT y BDNF, NGF y el péptido D5.....	95
Figura 33. Localización del fragmento Hc-TeNT y el receptor TrkB en las uniones neuromusculares del músculo tibial de ratón.....	96
Figura 34. Internalización del fragmento Hc-TeNT en las uniones neuromusculares del músculo tibial de ratón.....	97
Figura 35. El receptor TrkB se encuentra en vesículas endocíticas positivas para Hc-TeNT en motoneuronas.....	99
Figura 36. Localización del fragmento Hc-TeNT internalizado en las motoneuronas de la medula espinal.....	101
Figura 37. Unión <i>in vitro</i> de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 al péptido D5.....	103
Figura 38. Niveles de TrkB fosforilado en CGN después de un tratamiento con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343.....	104
Figura 39. Unión de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 a neuronas granulares de cerebelo.....	105
Figura 40. Colocalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 con TrkB en ensayos de unión.....	106
Figura 41. Internalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 en neuronas granulares de cerebelo.....	107
Figura 42. Colocalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 con TrkB en ensayos de internalización... ..	108
Figura 43. Transporte retroaxonal hasta las motoneuronas de la médula espinal de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 inyectados intramuscularmente.....	110
Figura 44. Efecto neuroprotector de BDNF y NGF en células CGNs y PC12 sometidas a un estrés apoptótico.....	117
Figura 45. Efecto del silenciamiento de la expresión de nSMasa2 en la viabilidad celular inducida por NGF.....	118
Figura 46. Efecto del silenciamiento de la expresión de nSMasa2 en los eventos antiapoptóticos promovidos por NGF en PC12 sometidas a un estrés de suero.....	119
Figura 47. Niveles de pAkt, pERK-1/2 y pP38 en CGNs tratadas con BDNF y NGF en presencia de un inhibidor de la esfingomielinasa.....	121
Figura 48. Correlación entre la actividad esfingomielinasa y la actividad Trk en cultivos de CGN y PC12.....	123
Figura 49. Determinación de los niveles de pAkt y pERK-1/2 en PC12 silenciadas para nSMasa2.....	124

Figura 50. Efecto en la supervivencia celular inducida por Hc-TeNT ante un estrés oxidativo en células PC12.....	126
Figura 51. Efecto en la viabilidad celular inducida por Hc-TeNT en células NSC34 silenciadas para nSMasa2. ....	127
Figura 52. Determinación de los niveles de pAkt en CGN tratadas con BDNF, Hc-TeNT y un inhibidor de nSMasa. ....	128
Figura 53. Esquema de la división en dominios de la toxina tetánica. ....	131
Figura 54. Esquema del modelo de unión e internalización propuesto para la toxina tetánica.....	141

### **Tablas**

Tabla 1. Receptores proteicos descritos para los diferentes serotipos de BoNTs. ....	16
Tabla 2. Proteínas adaptadoras de p75 <sup>NTR</sup> . ....	44
Tabla 3. Anticuerpos y tinciones utilizados para la inmunohistoquímica, dilución usada y referencias de la casa comercial. ....	71
Tabla 4. Composición de los geles de SDS-PAGE para un gel de 1,5 mm de grosor. ....	72
Tabla 5. Anticuerpos y tinciones utilizados para el western blot, dilución de cada uno y casa comercial. ....	73
Tabla 6. Interacciones no covalentes observadas y calculadas en las interfaces de unión entre los receptores Trk y sus aceptores, y entre los receptores Trk y el fragmento Hc-TeNT.....	83



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>4E-BP1</b>	<i>eIF4E-binding protein 1</i>
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADAM17/TACE</b>	<i>ADAM metallopeptidase domain 17/Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
<b>AP2</b>	<i>Adaptor Protein 2</i>
<b>ARMS</b>	<i>Ankyrin-rich membrane spanning protein</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BME</b>	<i>Basal Medium Eagle</i>
<b>BoNT</b>	<i>Botulinum Neurotoxin</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumine</i>
<b>CaMK</b>	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i>
<b>CGN</b>	Neuronas granulares de cerebelo
<b>CNT</b>	<i>Clostridium Neurotoxins</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
<b>CTx</b>	Toxina colérica
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
<b>DD</b>	<i>Death Domain de p75<sup>NTR</sup></i>
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EEA1</b>	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
<b>EED</b>	<i>Embryonic ectodermal development</i>
<b>ERK-1/2</b>	<i>Extracellular Signal-Regulated kinase 1/2</i>
<b>FAN</b>	<i>Factor associated with nSMase activation</i>
<b>FAP-1</b>	Fas-associated phosphatase-1
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FGFR3</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
<b>FKHR</b>	<i>Forkhead transcription factor</i>
<b>FPLC</b>	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
<b>FRS2</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
<b>Gab1</b>	<i>Grb2-associated binder-1).</i>
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
<b>GM130</b>	<i>Golgi Matrix 130 kDa Protein</i>
<b>GPCR</b>	<i>G-protein-coupled receptors</i>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen Synthase Kinase 3<math>\beta</math></i>
<b>Hc-A266-311-343</b>	Fragmento carboxilo terminal de la toxina tetánica mutado en Y266, K311 y E343
<b>Hc-TeNT</b>	Dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica
<b>Hc-TeNT-A555</b>	Fragmento carboxilo terminal de la toxina tetánica acoplado a AlexaFluor555
<b>H<sub>N</sub>-TeNT</b>	Dominio amino terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica
<b>ICD</b>	<i>Intracellular domain of p75<sup>NTR</sup></i>
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

<b>JNK</b>	<i>c-Jun kinase</i>
<b>Kd</b>	Constante de disociación
<b>KSR</b>	<i>Kinase Suppressor of Ras</i>
<b>L-TeNT</b>	<i>light chain</i>
<b>LTP</b>	<i>Long-term potentiation</i>
<b>MAG</b>	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MEF2</b>	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
<b>MNP</b>	<i>Mice Phrenic Nerve hemidiaphragm</i>
<b>MPP<sup>+</sup></b>	<i>1-methyl-4-phenylpyridinium</i>
<b>MPTP</b>	<i>1-methyl-1,2,3,4,-tetrahydropyridine</i>
<b>MT</b>	Microtúbulos
<b>mTORC1</b>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
<b>mTORC2</b>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>nAChR</b>	Receptores nicotínicos de acetilcolina
<b>NADE</b>	<i>p75<sup>NTR</sup>-associated Death Executor</i>
<b>NeuAc</b>	Ácido N-acetilneuramínico
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
<b>NMJ</b>	<i>Neuromuscular junction</i>
<b>NogoR</b>	<i>Nogo receptor</i>
<b>NRAGE</b>	<i>Neurotrophin receptor interacting MAGE homolog</i>
<b>NRG-1</b>	<i>Neuregulin 1</i>
<b>NRIF</b>	<i>Neurotrophin-receptor interacting factor</i>
<b>nSMasa</b>	Esfingomielinasa
<b>NT-3</b>	<i>Neurotrophin 3</i>
<b>NT-4/5</b>	<i>Neurotrophin 4/5</i>
<b>OMgp</b>	<i>Oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
<b>PACAP</b>	<i>Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PK1</b>	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate or PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></i>
<b>PIP<sub>3</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate or PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub></i>
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PLCγ-1</b>	<i>Phospholipase C γ-1</i>
<b>PP1</b>	<i>Protein phosphatase 1</i>
<b>PP2A</b>	<i>Protein phosphatase 2A</i>
<b>PTB</b>	<i>PhosphoTyrosine Binding Motif</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>RIP2</b>	<i>Receptor-interacting protein 2</i>
<b>Rsk/S6K</b>	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
<b>S1P</b>	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
<b>SAPK</b>	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>

<b>SC-1</b>	Schwann cell factor-1
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SH2</b>	<i>Src Homology 2</i>
<b>SMN</b>	<i>Survival motor neuron</i>
<b>SNAP-25</b>	<i>Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa</i>
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>SOD1</b>	<i>Superoxide dismutase 1</i>
<b>SOS</b>	<i>Son of sevenless</i>
<b>SV2</b>	<i>Synaptic vesicle protein 2</i>
<b>Syt</b>	Sinaptotagmina
<b>TeNT</b>	<i>Tetanus Neurotoxin</i>
<b>TNRF</b>	<i>Tumor necrosis factor receptors</i>
<b>TRAF</b>	<i>Tumour necrosis factor receptor-associated factor</i>
<b>Trk</b>	<i>Tropomyosin-related kinase receptor</i>
<b>vAChT</b>	Transportador vesicular de acetilcolina
<b>VAMP</b>	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
<b>vATPasa</b>	H <sup>+</sup> ATPasa vacuolar
<b>α-BTx</b>	α-bungarotoxina
<b>PFA</b>	Paraformaldehido



## RESUMEN

La toxina tetánica (TeNT) es una potente neurotoxina clostridial causante de la enfermedad del tétanos. Actúa en el sistema nervioso periférico y central bloqueando la neurotransmisión inhibitoria y causando una parálisis espástica del músculo. Su extrema neuroespecificidad viene determinada por la interacción de su dominio carboxilo terminal (Hc-TeNT) con las membranas neuronales mediante un mecanismo de receptor dual. Primeramente interacciona con los polisialogangliósidos, presentes en gran cantidad en la membrana plasmática, y en segundo lugar con un receptor proteico de alta afinidad que permite su endocitosis en la neurona. Aunque aún se desconoce cuál es este receptor proteico, se ha descrito que la TeNT comparte la misma ruta endocítica que las neurotrofinas y sus receptores. Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que regulan el desarrollo, el mantenimiento y la función del sistema nervioso. La interacción con sus receptores Trk (TrkA, TrkB y TrkC) y p75<sup>NTR</sup> desencadena la activación de diversas vías de señalización como la vía PI3K/Akt, la Ras/MAPK y la PLC $\gamma$ /PKC, que derivan en la inducción de la supervivencia neuronal y la diferenciación. El Hc-TeNT es capaz de activar a estos receptores de neurotrofinas, así como a las vías de señalización dependientes de ellos, provocando un efecto neuroprotector en distintos modelos celulares sometidos a estrés.

Basándonos en estas premisas proponemos que la TeNT podría actuar sobre las neuronas mimetizando a las neurotrofinas, uniéndose a sus receptores y aprovechando su maquinaria de transporte retroaxonal para su proceso infectivo. En este trabajo se presentan evidencias que identifican al receptor TrkB como receptor proteico para la TeNT. El Hc-TeNT es capaz de unirse a un péptido derivado de un dominio extracelular de TrkB y de inducir la fosforilación de éste receptor, propiedades que parecen debilitarse al mutar tres residuos de Hc-TeNT en la zona de unión teórica. También compete con su agonista nativo por la unión a membranas neuronales y por la internalización junto a TrkB. Ambas moléculas además localizan conjuntamente *in vivo* en las uniones neuromusculares y en las motoneuronas.

Centrándonos en el efecto neuroprotector observado en Hc-TeNT, nos proponemos también estudiar la respuesta de la célula frente al tratamiento con neurotrofinas y con Hc-TeNT después de un estímulo apoptótico, para determinar qué receptores participan, qué vías de señalización se activan y la implicación de la esfingomielinasa neutra (nSMasa) en el proceso. La nSMasa es activada por el receptor p75<sup>NTR</sup> e hidroliza la esfingomielina presente en las membranas generando ceramida, que actúa como segundo mensajero interviniendo en procesos tan dispares como la apoptosis o la supervivencia. Se ha observado que las neurotrofinas promueven la viabilidad celular actuando a través de los receptores Trk, de forma dependiente de los niveles basales de nSMasa pero no mediante el incremento de la actividad de ésta.

La capacidad del Hc-TeNT de pasar del SNP hasta el SNC mediante saltos transinápticos, así como sus propiedades neuroprotectoras, son características de gran interés que podrían ser aplicadas en el desarrollo y la administración de fármacos al SNC.



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. LAS TOXINAS CLOSTRIDIALES

Las toxinas clostridiales (*Clostridium Neurotoxins*, CNTs) son un grupo de holoproteínas sintetizadas por bacterias del género *Clostridium sp.* Estas bacterias son bacilos gram-positivos, anaeróbicos y formadores de esporas. Dentro de este grupo de toxinas se engloban por un lado la toxina tetánica (*Tetanus Neurotoxin*, TeNT), sintetizada por *C. tetani*, y por otro lado la toxina botulínica (*Botulinum Neurotoxin*, BoNT), sintetizada por algunas cepas de *C. botulinum*, *C. barati* y *C. butiryicum*, y que se presenta en siete serotipos diferentes designados de la A a la G (BoNT/A-G) (Grumelli et al., 2005). Ambas son unas de las neurotoxinas más potentes conocidas que afectan tanto al sistema nervioso central (SNC) como al sistema nervioso periférico (SNP), pudiendo llegar a actuar a dosis inferiores a 1 ng/kg de peso corporal en ratón (Gill, 1982).

La toxina tetánica y las botulínicas son los agentes causantes de las enfermedades del tétanos y el botulismo respectivamente. La sintomatología típica del tétanos consiste en que el paciente se ve afectado por una parálisis espástica, es decir, por una contracción sostenida de la musculatura, acompañada de dolor en las extremidades, dolor de cabeza, rigidez y espasmos que pueden conducir a una obstrucción laríngea (Farrar et al., 2000). La enfermedad del botulismo en cambio, se caracteriza por que los pacientes afectados presentan una parálisis flácida de la musculatura, y la sintomatología incluye cansancio, debilidad muscular, problemas de visión y dificultad para hablar. Ambas enfermedades pueden llegar a provocar la muerte del paciente usualmente por parada respiratoria. Aunque existe una vacuna para su prevención, el tétanos sigue siendo responsable de cientos de miles de muertes al año en países subdesarrollados dónde la vacunación no es habitual (Hassel, 2013).

Las CNTs comparten unas propiedades funcionales y una estructura molecular muy similares, presentando una elevada homología tanto en su composición en subunidades como en su secuencia aminoacídica (65 % homología de secuencia y 35 % de identidad) (Lacy and Stevens, 1999). A nivel funcional son metaloproteasas específicas que proteolizan diferentes proteínas integrantes del complejo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor*) (Binz and Rummel, 2009). El complejo SNARE se encarga de la fusión de las vesículas sinápticas contenidas en la neurona con la membrana presináptica, permitiendo así la liberación del contenido vesicular en la sinapsis. El complejo está compuesto por diversas proteínas presentes tanto en la membrana de las vesículas de transporte (v-SNARE) como en la membrana presináptica (t-SNARE). La interacción entre estas proteínas proporciona la fuerza motriz necesaria para acercar las dos membranas y permitir su fusión. (Jahn and Scheller, 2006; Südhof, 2013). En la Figura 1 se comenta de forma esquemática el proceso de fusión vesicular durante la liberación de los neurotransmisores. Por lo tanto, la escisión de las proteínas SNAREs por efecto de las CNTs, resulta en la inhibición de la liberación en la sinapsis de los neurotransmisores contenidos en las vesículas. Cada tipo de toxina y cada serotipo actúan sobre distintas proteínas clave en este proceso. Así, en el caso de la TeNT y los serotipos B, D, F y G de BoNT, actúan hidrolizando la proteína VAMP-1 y VAMP-2 (*Vesicle-Associated Membrane Protein*, también denominada sinaptobrevina), proteolizándola cada una por un enlace peptídico específico; excepto la TeNT y la BoNT/B que lo hacen entre los mismos residuos (Gln76 - Phe77). Las BoNT/A y E proteolizan la SNAP-25 (*Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa*) por un enlace diferente cada

una, y la BoNT/C es capaz de hidrolizar tanto la sintaxina-1 como también la SNAP-25 (Schiavo et al., 1992, 1993a, 1993b, 1993c, 1995; Blasi et al., 1993; Binz et al., 1994; Yamasaki et al., 1994).

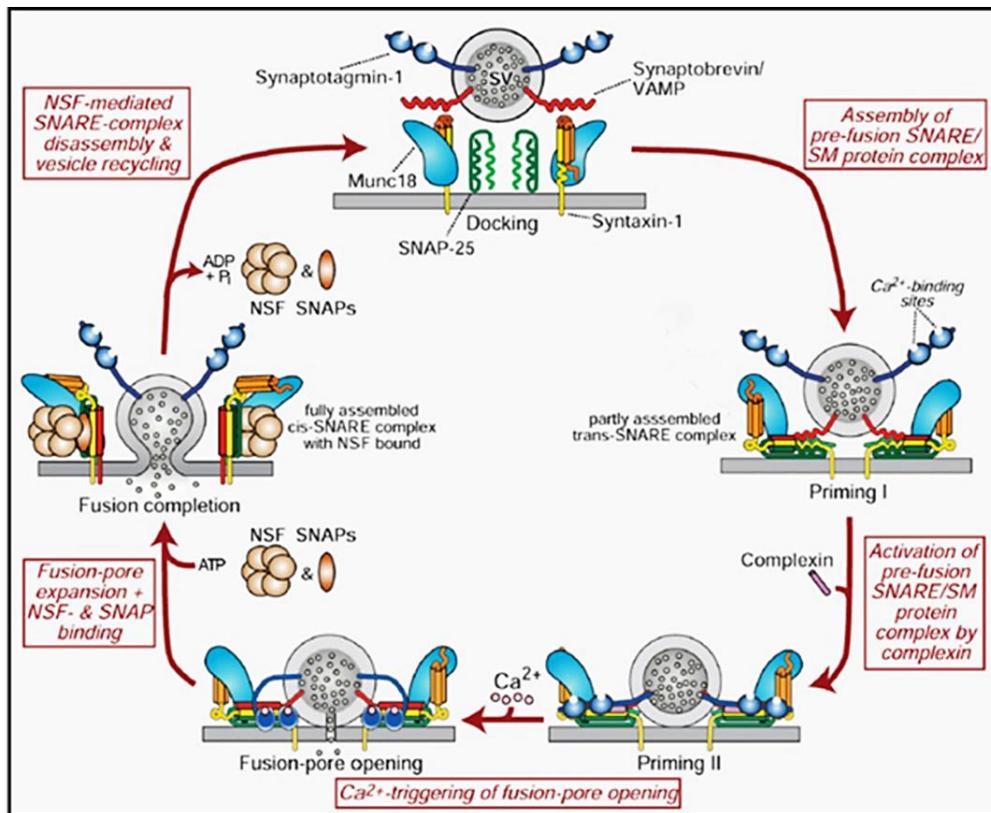


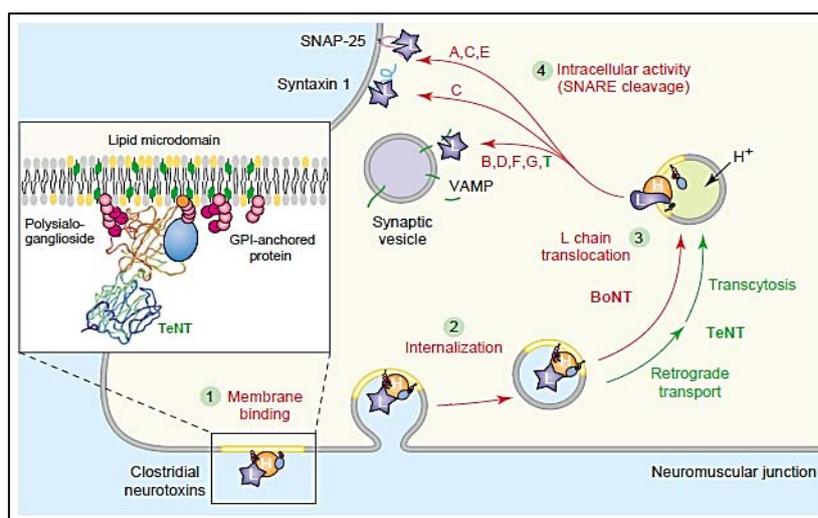
Figura 1. Mecanismo de acción del complejo SNARE en el ciclo de fusión de las vesículas presinápticas con la membrana plasmática.

El ciclo se inicia con el proceso de *priming*, cuando la VAMP presente en la membrana de la vesícula interactúa con las proteínas t-SNARE sintaxina-1 y SNAP-25. La proteína Munc-18 presente en la membrana plasmática interactúa entonces con la sintaxina-1 y provoca un cambio en la estructura de ésta, que pasa a adoptar una conformación "abierta". La complexina se une también al complejo incrementando su *priming*. A continuación la unión de  $Ca^{2+}$  a la sinaptotagmina presente en la vesícula, provoca su interacción con el complejo SNARE y los fosfolípidos de la membrana, desencadenando así la apertura del poro. Tras la apertura del poro, los complejos SNARE son desensamblados por las ATPasas NSF y SNAP. Modificación de Sudhof, 2013.

Existen varias isoformas de VAMP, pero las principales son VAMP-1 y VAMP-2 que son esenciales para la neurotransmisión. Debido a mutaciones en el sitio de corte y/o los sitios de reconocimiento de estas proteínas, algunas isoformas no son proteolizadas por la TeNT. Este hecho contribuye a explicar la resistencia de algunas especies animales al tétanos (Galli et al., 1998). En la Figura 2 se puede observar la proteólisis de las distintas proteínas vesiculares por parte de TeNT y de las diferentes BoNT.

### 1.1. Mecanismo infectivo de las toxinas clostridiales

El mecanismo infectivo que siguen todas las CNTs se puede dividir en cuatro etapas principales tal como se ilustra en la Figura 2 (Calvo et al., 2012). En la primera etapa, la bacteria entra en el organismo huésped, libera la toxina y ésta difunde por el flujo sanguíneo hasta alcanzar las uniones neuromusculares, donde se une con una alta especificidad a las membranas presinápticas de las motoneuronas que inervan el músculo. En un segundo paso, la toxina unida a la membrana se internaliza en vesículas endocíticas dentro de la motoneurona. Una vez alcanzado su destino dentro de la neurona, la toxina sale de la vesícula donde ha sido endocitada para liberarse en el citoplasma neuronal. Esta tercera etapa está propiciada por la acción de la  $H^+$  ATPasa vacuolar (vATPasa) que acidifica el lumen vesicular (Bohnert and Schiavo, 2005). Esta acidificación induce un cambio conformacional en la toxina, permitiendo la formación de un poro en la membrana vesicular a través del cual la región de la toxina con capacidad catalítica será translocada al citosol. Finalmente, la última etapa del proceso de infección consiste en el reconocimiento y posterior hidrólisis por parte de la toxina de su sustrato específico. Esto lleva a la disrupción del mecanismo de fusión de vesículas a la membrana presináptica, impidiéndose así la liberación de los neurotransmisores contenidos en estas vesículas al espacio intersináptico.

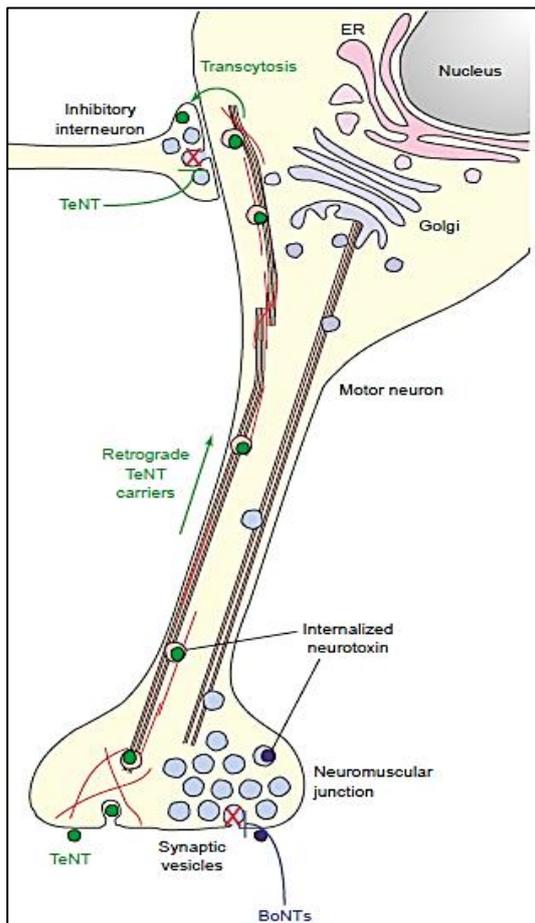


**Figura 2. Mecanismo de acción de las CNTs.**

Las etapas principales en la infección son: (1) unión de las CNTs a la membrana en los terminales nerviosos, (2) internalización en vesículas endocíticas, (3) acidificación del lumen vesicular y translocación de la toxina al citosol, y (4) proteólisis de determinadas proteínas del complejo SNARE e inhibición de la liberación de neurotransmisores. Extraído de Lalli et al., 2003.

Tal como se ha comentado, estas etapas generales del proceso infectivo son compartidas por todas las CNTs, ejerciendo todas ellas su acción proteolítica sobre el mismo tipo de sustratos intracelulares e infectando al mismo tipo de neuronas. La diferencia entre la toxina tetánica y las botulínicas viene determinada por el tipo neuronal donde llevan a cabo su actividad catalítica, debido a que una vez endocitadas en los terminales presinápticos de las motoneuronas, la TeNT y las BoNTs son destinadas

a diferentes vías de transporte intracelular. Mientras que la toxina botulínica permanece en el SNP, en los terminales presinápticos de las motoneuronas, la toxina tetánica posee la capacidad de llegar hasta el SNC por transporte retrógrado hasta el soma de la motoneurona, y desde allí realizar un salto transináptico hasta las interneuronas inhibitorias de la medula espinal, donde será internalizada de nuevo y finalmente realizará su acción catalítica (Figura 3) (Simpson, 1986; Lalli et al., 1999).



**Figura 3. Proceso de infección de las toxinas tetánica y botulínica.**

La TeNT (en verde) y la BoNT (en lila) se unen a los terminales nerviosos de las motoneuronas en las uniones neuromusculares. Ambas se internalizan en la motoneurona en vesículas endocíticas sin embargo, mientras que la BoNT permanece en los terminales nerviosos efectuando su acción a nivel de unión neuromuscular, la TeNT es transportada retroaxonalmente hasta el soma de la motoneurona, desde donde es liberada a las sinápsis inhibitorias y recaptada por interneuronas. De esta manera mientras que la BoNT inhibe la liberación de ACh al músculo impidiendo así la contracción muscular, la TeNT impide la liberación de neurotransmisores inhibitorios desde las interneuronas, manteniendo así una activación constante de la motoneurona y una liberación de ACh continuada al músculo, que permanece continuamente contraído. Extraído de Lalli et al., 2003.

En condiciones fisiológicas normales, la transmisión sináptica en la unión neuromuscular (NMJ, *neuromuscular junction*) comienza con la transmisión por parte de las  $\alpha$ -motoneuronas de un potencial de acción a lo largo de su axón que llega a los terminales presinápticos. Esto origina la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. Los iones  $Ca^{2+}$  se unen a la sinaptotagmina presente en las membranas de las vesículas sinápticas y permiten la fusión de éstas con la membrana plasmática. La acetilcolina (ACh) contenida en las vesículas es liberada en la sinapsis neuromuscular y captada por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) presentes en la membrana del músculo. Estos receptores son ionotrópicos, de manera que al unirse su ligando se abre el canal iónico permitiendo la entrada de iones  $Na^+$  a la célula muscular, causando su despolarización. Esta despolarización desencadena una cascada en la que están involucradas la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplasmático y la unión de la miosina a la actina, que acaba resultando en la contracción del músculo. En condiciones patológicas, la toxina

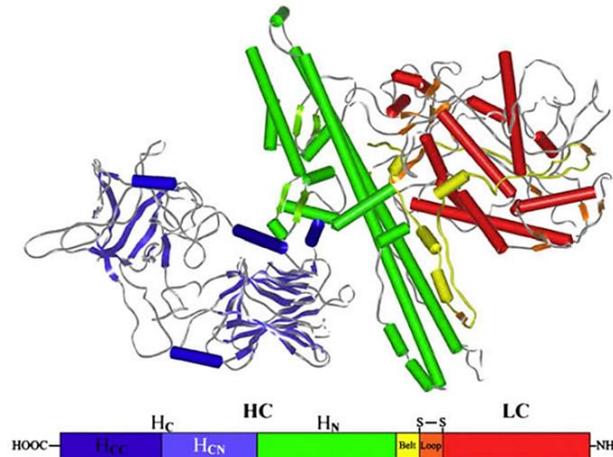
botulínica permanece en los terminales presinápticos de las motoneuronas, interrumpiendo el tráfico vesicular y afectando la liberación de ACh en la unión neuromuscular (Schiavo et al., 1992; Blasi et al., 1993). Como consecuencia, impide que el músculo reciba el impulso excitatorio, quedando en el estado de flacidez característico de la infección con BoNT. Por el contrario, la toxina tetánica, una vez internalizada, posee la capacidad de transportarse retroaxonalmente hasta el soma de la motoneurona. Desde allí puede realizar un salto transináptico hasta las interneuronas inhibitorias (GABAérgicas y glicinérgicas) que inervan las  $\alpha$ -motoneuronas regulando su actividad. En estas interneuronas la TeNT es endocitada de nuevo, y es aquí donde lleva a cabo su acción tóxica. Proteoliza la VAMP presente en las vesículas sinápticas de las interneuronas bloqueando así la fusión de éstas con la membrana, e impidiendo la liberación a la sinapsis de los neurotransmisores inhibitorios contenidos en ellas (principalmente glicina y GABA [ácido  $\gamma$ -aminobutírico]). Al no recibir los estímulos inhibitorios, las  $\alpha$ -motoneuronas se mantienen permanentemente activadas, liberando continuamente ACh al músculo y produciendo así una contracción sostenida de éste (Montecucco and Schiavo, 1994).

El mecanismo de transcitosis de la TeNT, por el cual ésta pasa de las motoneuronas a las interneuronas, está aún poco caracterizado. Aunque existen varios trabajos en los que tras una inyección de TeNT la localizan en interneuronas inhibitorias como las células de Renshaw o las interneuronas la, este proceso debe ser estudiado en mayor profundidad (Dumas et al., 1979; Schwab et al., 1979; Evinger and Erichsen, 1986; Fishman and Carrigan, 1987; Meckler et al., 1990; Cabot et al., 1991; Ligorio et al., 2000). Aún no se conoce por qué vía la TeNT es transportada retrógradamente ni los mecanismos celulares involucrados en la liberación postsináptica de la toxina, así como tampoco los receptores que permiten su recaptación por parte de las interneuronas.

## 2. LA TOXINA TETÁNICA

### 2.1. Estructura molecular de la TeNT

En este apartado se comentará concretamente la estructura molecular de la TeNT, pero en general puede aplicarse a los diferentes serotipos de BoNT ya que todas ellas comparten una estructura en subdominios muy similar.



**Figura 4. Estructura tridimensional y composición en dominios de las CNTs.**

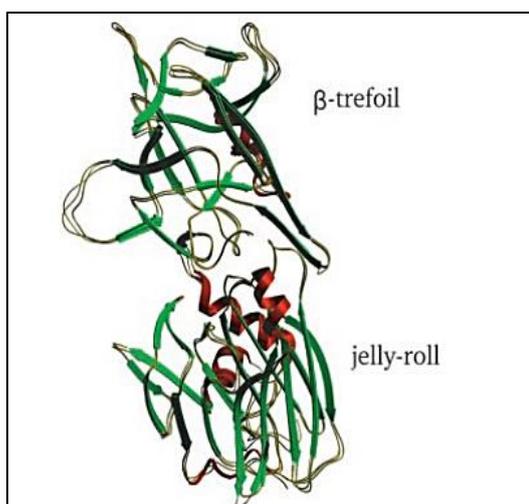
En el extremo N-terminal se encuentra la cadena L (rojo) (50 kDa) con actividad metaloproteasa y unida a la cadena pesada H (100 kDa) mediante puentes disulfuro. La cadena pesada se encuentra dividida en los dominios  $H_N$  (verde) y  $H_c$  (azul), encargados de la internalización y de la unión, respectivamente. La estructura cristalizada mostrada corresponde a la BoNT/B. Extraído de Brunger and Rummel, 2009.

La toxina tetánica es sintetizada por la bacteria en forma de una sola cadena polipeptídica de 150 kDa que, al ser procesada post-transduccionalmente por proteasas propias de la bacteria o de la célula huésped, da lugar a dos cadenas polipeptídicas. Por un lado una cadena de 50 kDa en el extremo amino-terminal (N-terminal) designada como cadena L (*light chain*, L-TeNT), y por otro una cadena H (*heavy chain*, H-TeNT) de 100 kDa en el extremo carboxilo-terminal (C-terminal). Ambas cadenas se encuentran unidas por un puente disulfuro que conecta la C438 de la cadena L con la C466 de la cadena H, así como por enlaces no covalentes (Kriegelstein et al., 1990). Las dos cadenas se pueden subdividir en tres dominios estructural y funcionalmente diferenciados, ilustrados en la Figura 4. Por una parte la cadena L comprende del residuo 1 hasta el 457 (Eisell et al., 1986) y contiene el dominio catalítico de la toxina, que ejerce una actividad metaloproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$  muy específica (Schiavo et al., 2000). Por otra parte la cadena H se subdivide en los dominios  $H_N$  ( $H_N$ -TeNT), situado en el extremo N-terminal, y el dominio  $H_c$  en el extremo C-terminal ( $H_c$ -TeNT), con 50 kDa cada uno. El dominio  $H_N$  engloba de los residuos 458 al 864 de la proteína y es el dominio que permite la translocación de la cadena L a través de la membrana endosomal hacia el lumen celular. El dominio  $H_c$  es el dominio encargado de la unión específica a las membranas neuronales y la posterior internalización de la toxina, y comprende los residuos del 865 al 1315 (Emsley et al., 2000). A

continuación se comentan más detalladamente las funcionalidades y propiedades de estos tres dominios.

### Dominio H<sub>C</sub>-TeNT

La estructura cristalizada del dominio H<sub>C</sub>-TeNT (Figura 5) revela que está compuesto por dos subdominios, de 25 kDa cada uno de ellos, designados como H<sub>CN</sub>-TeNT y H<sub>CC</sub>-TeNT (Brunger and Rummel, 2009). El subdominio H<sub>CN</sub> (residuos 865–1110), denominado así por encontrarse en el extremo N-terminal, se compone estructuralmente de 16 láminas-β y 4 hélices-α dispuestas en un motivo *jelly roll*, muy similar al de las proteínas de unión a carbohidratos de la familia de las lectinas de las leguminosas (Umland et al., 1997; Lacy and Stevens, 1999). Sin embargo, a pesar de su estructura, no se ha observado que este fragmento esté implicado en la unión a carbohidratos, y su función es aún desconocida. Se ha sugerido que podría actuar como un fragmento rígido espaciador entre los dominios H<sub>N</sub>-TeNT y H<sub>CC</sub>-TeNT y estar involucrado en el proceso de translocación de la cadena L.



**Figura 5. Estructura tridimensional del dominio H<sub>C</sub>-TeNT.** En la zona N-terminal se encuentra el subdominio H<sub>CN</sub>-TeNT, compuesto por un motivo *jelly roll*. En la parte C-terminal está el subdominio H<sub>CC</sub>-TeNT, constituido por un motivo estructural *β-trefoil*, y que contiene los dos sitios de unión a gangliósidos. Extraído de Fotinou et al., 2001.

El subdominio H<sub>CC</sub> (residuos 1111–1315) está en el extremo C-terminal y presenta una estructura *β-trefoil* (Umland et al., 1997). Este subdominio presenta dos sitios de unión a gangliósidos, que serán comentados en profundidad más adelante, y las características necesarias para el reconocimiento de la célula diana y su internalización. Estudios realizados mediante deleciones hechas sobre la secuencia de H<sub>CC</sub>-TeNT demuestran que este subdominio aislado presenta mayor eficiencia que el H<sub>C</sub>-TeNT entero en unirse a las células neuronales (Halpern and Loftus, 1993).

### Dominio H<sub>N</sub>-TeNT

El dominio H<sub>N</sub>-TeNT tiene la capacidad de generar un canal a través de la membrana vesicular que permite la translocación del L-TeNT desde la vesícula que lo contiene hasta el citosol de la neurona diana. Destacan en su estructura dos hélices-α muy largas, de unos 11 nm de longitud y que serían las responsables de la formación de este canal de translocación. El ambiente ácido del lumen vesicular

(pH 5,3) elimina las interacciones electrostáticas entre el H<sub>CN</sub>-TeNT, el H<sub>N</sub>-TeNT y la membrana, permitiendo que el H<sub>N</sub>-TeNT penetre en la membrana de la vesícula para formar un pequeño canal (Galloux et al., 2008).

La formación del canal se produce en 2 pasos secuenciales (Burns and Baldwin, 2014). En la primera etapa la interacción del H<sub>C</sub>-TeNT con su receptor orienta el H<sub>N</sub>-TeNT correctamente en acidificarse el endosoma, y seguidamente, el pH ácido en conjunto con los lípidos ácidos dentro de la membrana generaran el cambio conformacional de H<sub>N</sub>-TeNT necesario para la formación del canal. A continuación se despliega parcialmente el L-TeNT para pasar a través del canal generado, se repliega en el citosol y finalmente se libera del H<sub>N</sub>-TeNT gracias a la reducción del puente disulfuro presente entre estos dominios (Fischer and Montal, 2007). Sin embargo, la forma en la que la cadena L pasa a través del poro no está del todo elucidada. Una posibilidad sería que fuese necesaria la cooperación entre varias cadenas H<sub>N</sub>-TeNT para formar canales más grandes por los que pudiera pasar la cadena L. Otra posibilidad es que la llamada región cinturón, un segmento de 54 aminoácidos en el extremo N-terminal de H<sub>N</sub>-TeNT que envuelve el dominio catalítico, actúe como una chaperona asistiendo este paso. Así se facilitaría la exposición de las hélices hidrofóbicas y su subsecuente inserción en la membrana.

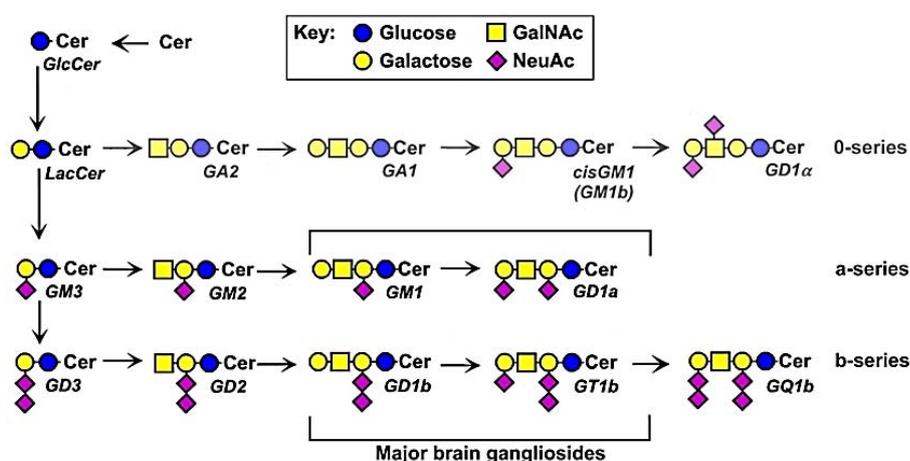
### **Dominio L-TeNT**

Una vez reducido el puente disulfuro que la une al H<sub>N</sub>-TeNT y liberada en el citosol, la cadena L funciona como una endopeptidasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> con una selectividad y especificidad de sustrato muy elevada (Schiavo et al., 1990). Las secuencias aminoacídicas de las cadenas L de las diferentes CNTs presentan una baja homología excepto en la región central, donde se encuentra el motivo de unión a Zn<sup>2+</sup> (HE-XX-H) (Jongeneel et al., 1989). En el caso de la TeNT, tal y como revela el análisis de su estructura (Breidenbach and Brunger, 2005; Rao et al., 2005), el átomo de Zn<sup>2+</sup> del sitio activo está coordinado por los residuos H233 y H237, por una molécula de H<sub>2</sub>O unida a los residuos E234 y E271, y por la acción de la Y375. Esta Y375 está altamente conservada en todas las CNTs e incluso en el ántrax, sugiriendo su posible participación en la hidrólisis del enlace peptídico (Rossetto et al., 2013). Esta hipótesis viene respaldada por distintos estudios en los que se ha demostrado que la sustitución de los residuos Y375 y E271 (Rossetto et al., 2001), de los residuos Y375 y R372 (Blum et al., 2014a), e incluso que la mutación en el E234 (Ovsepian et al., 2015) provoca una pérdida total de la actividad proteolítica de la toxina.

### **2.2. Mecanismo de unión de la TeNT a las membranas neuronales**

La toxina tetánica es capaz de unirse con una altísima especificidad y afinidad a los terminales nerviosos de las uniones neuromusculares, y esta unión específica se debe únicamente a la interacción de su dominio H<sub>C</sub>-TeNT con las áreas no mielinizadas de los terminales nerviosos colinérgicos. En concreto, el H<sub>C</sub>-TeNT se asocia a unas regiones dentro de la membrana plasmática conocidas como *lipid rafts*, unos microdominios enriquecidos en esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (*Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins*) (Herreros et al., 2001). Los *lipid rafts* están implicados en distintos procesos intracelulares como la

destinación y distribución de las vesículas endocíticas, en el tráfico vesicular hacia la membrana apical, y en la señalización celular (Simons and Toomre, 2000). Dentro de los *lipid rafts*, la TeNT se une específicamente a los gangliósidos presentes en la cara extracelular de las membranas neuronales. Considerados como una clase de esfingolípidos, los gangliósidos se encuentran en alto porcentaje en las membranas neuronales y están constituidos por una molécula de glicoesfingolípido (ceramida + oligosacárido) unida a uno o más residuos de ácido siálico, generalmente ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc) (Schnaar et al., 2014). Se encuentran predominantemente en el sistema nervioso, donde constituyen un 6% de todos los fosfolípidos de membrana. Sus residuos de oligosacáridos y su ubicuidad en la parte extracelular de la membrana les permiten funcionar como transductores de señal bioactivos (Calvo et al., 2012).



**Figura 6. Estructura molecular y tipos de gangliósidos.**

En la imagen se encuentran detallados los diferentes tipos de gangliósidos y su composición. La estructura básica está compuesta por una molécula de ceramida unida a glucosa y galactosa (lactosa), a la que se le pueden añadir varios residuos de ácido siálico (NeuAc), y residuos de GalNAc (*N*-Acetylgalactosamine). Los gangliósidos mayormente expresados en SNC están remarcados y son el GM1, GD1a, GD1b y GT1b. Extraído de Schnaar et al., 2014.

La TeNT se une específicamente a los polisialogangliósidos o gangliósidos complejos (con más de un residuo NeuAc) de las series GD1b, GT1b y GQ1b (con dos, tres y cuatro residuos NeuAc respectivamente). Sin embargo, no puede unirse a GM1, serie compuesta por los gangliósidos con un solo residuo de NeuAc (Emsley et al., 2000; Sinha et al., 2000). Del mismo modo se ha comprobado que, de todas las uniones, la asociación de la TeNT con GT1b es la más fuerte y específica (Conway et al., 2006). Algunos autores han sugerido también que la interacción entre la TeNT y los gangliósidos provocaría cambios conformacionales en la toxina, aumentando el porcentaje de hélices- $\alpha$ , y que llevarían a la formación de macromoléculas de agregados en la membrana (Lazarovici et al., 1987).

El estudio mediante cristalografía de rayos X de la estructura cristalizada del fragmento H<sub>C</sub>-TeNT conjuntamente con lactosa, galactosa, *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido siálico y un análogo de GT1b ha permitido detectar la presencia de 4 puntos de unión a carbohidratos en la superficie de

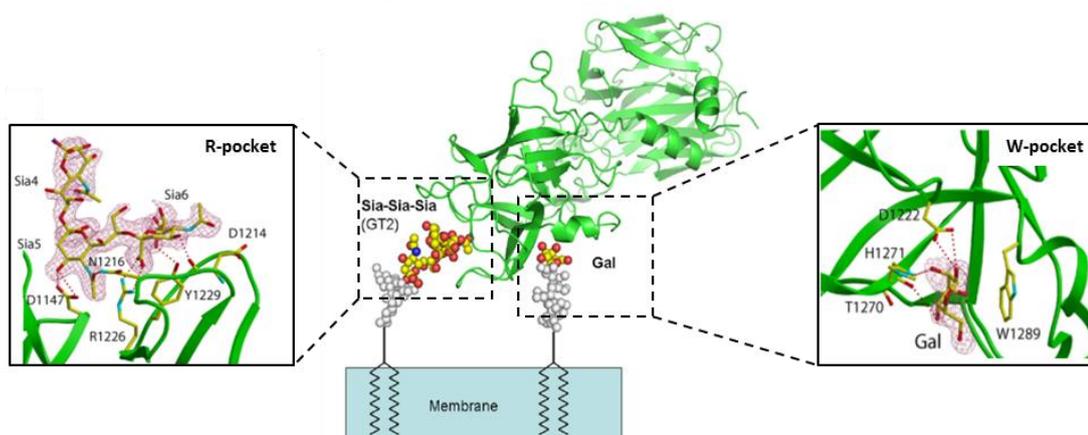
TeNT, separados por al menos 10 Å entre ellos (Emsley et al., 2000; Sinha et al., 2000; Fotinou et al., 2001).

El primer sitio de unión se encuentra en las proximidades del residuo W1289, y recibe el nombre de bolsillo W (*W-pocket*). Este sitio une una molécula de lactosa la cual interacciona con los residuos D1222, T1270, S1287, Y1290 y G1300. Está constituido por el motivo peptídico H.....SXWY.....G, que se encuentra conservado en todas las CNTs (Benson et al., 2011). También se ha observado que este dominio presenta características compartidas con otras toxinas proteicas tales como la ricina y la toxina del cólera (Binz and Rummel, 2009). Esta cavidad es esencial para la actividad biológica de la toxina y la mutación de varios de sus residuos provoca una disminución de la unión de H<sub>c</sub>-TeNT a GT1b *in vitro* y a células PC12 diferenciadas (Louch et al., 2002; Chen et al., 2008, 2009). De igual manera, se ha observado en ensayos de MPN (*Mice Phrenic Nerve hemidiaphragm*) que una única mutación en el residuo W1289 disminuye 350 veces la neurotoxicidad de H<sub>c</sub>-TeNT (Rummel et al., 2003).

El segundo sitio de unión engloba el residuo R1226, por lo cual ha sido designado como bolsillo R (*R-pocket*). En esta cavidad se une una molécula de ácido siálico (*N*-acetylneuraminic acid, NeuNAc) que interacciona con los residuos N1216, D1214, D1147 y Y1229 (Chen et al., 2008). Aunque la unión de un gangliósido a este bolsillo está demostrada, sería posible que éste fuera posteriormente substituido por una interacción directa con otras glicoproteínas ancladas a GPI que contengan ácidos siálicos (Herrerros et al., 2000, 2001). La unión descrita del tripéptido Tyr-Glu-Trp (YEW) a esta cavidad y su capacidad de competir con una disialolactosa por este sitio, apoyan la teoría de que una proteína, así como un gangliósido, podría unirse a este dominio (Jayaraman et al., 2005). El sitio de unión a ácido siálico es también esencial para el funcionamiento de la toxina, ya que la mutación en R1226 reduce 70 veces la actividad en un ensayo MPN (Rummel et al., 2003).

Los otros dos sitios de unión adicionales fueron identificados en co-cristales con galactosa o *N*-acetilgalactosamina (Emsley et al., 2000). Sin embargo, es poco probable que estos dos últimos sitios funcionen como bolsillos de unión para los polisialogangliósidos debido a la falta de espacio para la unión de un gangliósido completo o por un esqueleto de carbono demasiado flexible (Binz and Rummel, 2009).

De forma similar a la TeNT, las BoNTs también se unen a las membranas neuronales mediante la interacción de su dominio H<sub>c</sub> con los gangliósidos. De esta manera los serotipos A, B, C y F de las BoNTs se unen a los gangliósidos GT1b, GD1b y GD1a, mientras que la BoNT/E se une a GT1b y GT1a, BoNT/D interacciona con la fosfatidiletanolamina (*phosphatidylethanolamine*, PE) y la BoNT/G reconoce todos los gangliósidos con aproximadamente la misma afinidad (Montal, 2010). A diferencia de la TeNT, las BoNT/A, /B, /E, /F y /G solo presentan un sitio de unión a carbohidratos homólogo al bolsillo W de la TeNT, mientras que las BoNT/C y /D tienen dos bolsillos de unión (Rummel, 2013). Aún no está claro si el hecho de que la TeNT tenga dos sitios de unión a gangliósidos es una peculiaridad de esta toxina o si esta característica está relacionada con su capacidad de transporte retroaxonal.



**Figura 7. Sitios de unión a gangliósidos en H<sub>c</sub>-TeNT: R-pocket y W-pocket**

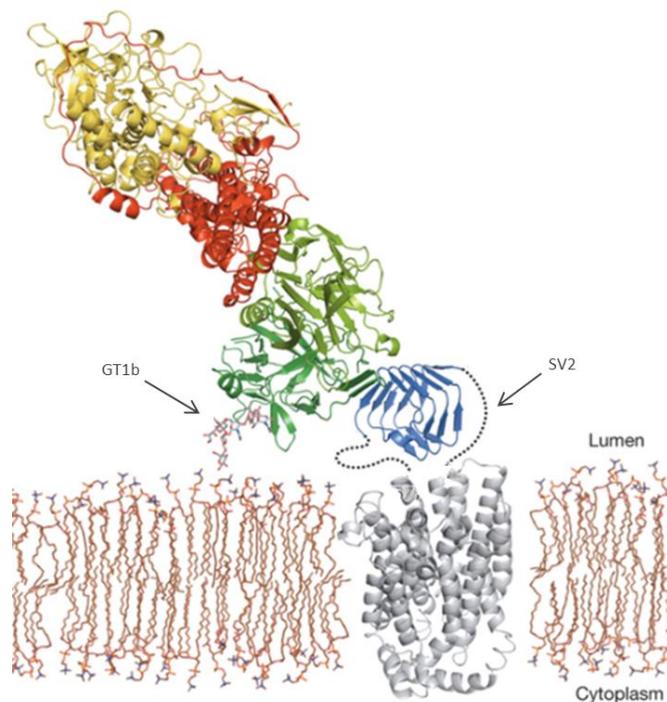
En el centro de la imagen se muestra el modelo de unión propuesto para H<sub>c</sub>-TeNT en complejo con el gangliósido GT2 y una lactosa. La estructura del H<sub>c</sub>-TeNT se encuentra coloreada en verde y los átomos del GT2 y la lactosa están coloreados en rojo, amarillo y azul. A la izquierda se puede observar una ampliación de la unión del GT2 al bolsillo R de la TeNT, con los residuos del H<sub>c</sub>-TeNT que participan en la interacción señalados. A la derecha se muestra una ampliación del bolsillo W, con los residuos de H<sub>c</sub>-TeNT que están interaccionando con la lactosa anotados. Adaptado de Chen et al., 2009.

### **Postulación del modelo de unión de receptor dual**

Numerosos estudios demuestran la presencia necesaria de los gangliósidos en el proceso infeccioso de las CNTs. De este modo se ha descrito que la eliminación de los residuos de ácido siálico presentes en cultivos primarios de motoneuronas, mediante un tratamiento con neuraminidasa, reduce drásticamente la potencia de la TeNT. En la misma dirección, el pretratamiento con gangliósidos exógenos en células que no presentan polisialogangliósidos complejos, las hace sensibles a TeNT (Pierce et al., 1986; Williamson et al., 1999). Corroborando los experimentos anteriores, también se ha descrito que ratones deficientes en GD3 sintasa, que solo expresan lactosa-ceramida, GM3, GM2, GM1 y GD1a, son resistentes a TeNT (Kitamura et al., 2005). Todos estos resultados han permitido demostrar que los polisialogangliósidos complejos como GD1a, GD1b y GT1b tienen un papel crucial en la unión de las CNTs a las células neuronales. Sin embargo existen muchas otras evidencias que demuestran que los polisialogangliósidos no pueden ser los únicos receptores de la TeNT.

Se ha observado que hay una gran diferencia entre la afinidad de unión de la TeNT calculada *in vivo* en sinaptosomas preparados a partir de tejido nervioso ( $10^{12}$  M) e *in vitro* en ensayos de interacción con gangliósidos ( $10^6$  -  $10^8$  M) (Bakry et al., 1991; Janshoff et al., 1997). La observación de la marcada reducción de TeNT unida a sinaptosomas de rata, o a líneas neuronales, previamente tratadas con proteasas (Lazarovici and Yavin, 1986; Pierce et al., 1986), indicaría la posible intervención de un receptor proteico en este proceso. Esto explicaría también el hecho de que tanto la TeNT como BoNT, se unen a la misma clase de gangliósidos, pero una vez internalizadas en distintos tipos de vesículas, puedan tener diferente diana de acción (Sinha et al., 2000).

Para dar explicación a todas estas discordancias se ha propuesto un modelo de receptor dual y que involucraría dos pasos de unión secuenciales (Montecucco, 1986). Este modelo sugiere que la toxina se uniría inicialmente a los abundantes polisialogangliósidos con una baja afinidad, acumulándose de este modo en zonas concretas de la membrana neuronal. Entonces la toxina unida al gangliósido difundiría lateralmente por la membrana hasta poder acceder a un receptor proteico, más escasamente expresado, al que se unirá con una alta afinidad y que propiciará el siguiente paso de endocitosis de la toxina. Este movimiento lateral por la membrana podría involucrar a varias proteínas glicosiladas que interaccionarían con los sitios de unión a carbohidratos del H<sub>c</sub>-TeNT, previamente ocupados por gangliósidos (Rummel et al., 2003).



**Figura 8. Modelo de receptor dual propuesto para las CNTs.**

En la imagen se muestra la estructura de la BoNT/A en complejo con el gangliósido GT1b y la proteína SV2C en la membrana plasmática. El GT1b y la SV2C se unen a la BoNT/A por sitios opuestos de su dominio C-terminal (en verde). La región transmembrana de SV2C se muestra en gris y la parte extracelular que interacciona con BoNT/A en azul. Extraído de Benoit et al., 2014.

No obstante algunos autores discrepan sobre la teoría de que la intervención de un receptor proteico sea necesaria para la unión e internalización de la toxina. Algunos autores han descrito que la unión de alta afinidad de la TeNT requiere de la interacción simultánea con dos moléculas de gangliósido, y que esta unión simultánea es necesaria y suficiente para su entrada tanto en células neuronales como en no neuronales (Chen et al., 2009). Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que se ha observado que la unión simultánea a dos gangliósidos presenta una afinidad mayor que la observada para cada uno de los bolsillos de H<sub>c</sub>-TeNT individualmente, lo que sugiere que la unión sería sinérgica (Chen et al., 2008).

Algunos autores cuestionan también que el dominio H<sub>C</sub>-TeNT sea el único involucrado en el proceso de unión de la toxina a las membranas, e indican que secuencias externas a este dominio podrían intervenir en el proceso de unión y transporte retroaxonal (Blum et al., 2014a; Ovsepian et al., 2015).

## 2.3. Unión de las CNTs a receptores proteicos

### 2.3.1. Receptores proteicos descritos para BoNTs

El modelo de receptor dual ha quedado confirmado en el caso de las BoNTs, para las cuales se han identificado varios receptores proteicos. Las BoNTs son endocitadas también en los terminales sinápticos de las motoneuronas pero a través de un mecanismo distinto que la TeNT, lo que provoca que sean transportadas a lugares diferentes dentro de la célula causando así los diferentes efectos de ambas toxinas. Las BoNTs son internalizadas mediante un mecanismo de reciclaje de vesículas sinápticas dependiente de actividad (Montal, 2010; Blum et al., 2012). Este mecanismo se inicia cuando un potencial de acción en membrana induce la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup>, permitiendo su entrada en la célula. La alta concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> estimula la exocitosis de las vesículas sinápticas y la liberación de sus neurotransmisores al espacio sináptico. Durante el proceso de fusión con la terminal sináptica, las proteínas presentes en las vesículas quedan expuestas en la cara extracelular de la membrana plasmática unos breves momentos antes que vuelvan a endocitarse para su reciclaje. Es en este momento cuando las BoNTs reconocen a estas proteínas de la vesícula sináptica expuestas en la membrana, y se unen a ellas juntamente con los gangliósidos.

Las vesículas sinápticas contienen básicamente dos clases de proteínas, las proteínas transportadoras, involucradas en la internalización de los neurotransmisores, y las proteínas de tráfico, que participan en la exocitosis, la endocitosis y el reciclaje de las vesículas. Dentro del primer grupo se encuentran proteínas como la vATPasa, que es la bomba de protones que genera el potencial electroquímico que permite la internalización del neurotransmisor, y por otro lado transportadores de neurotransmisores y que los incorporan en la vesícula (ej. transportador vesicular de glutamato,...). Dentro del grupo de proteínas de tráfico se incluyen proteínas intrínsecas de membrana y proteínas del complejo SNARE, tales como SV2, sinaptotagmina (Syt), sinaptofisina (Syp) o VAMP2 (Baldwin and Barbieri, 2009). Se ha descrito que diferentes serotipos de las BoNTs son capaces de reconocer específicamente algunas de estas proteínas características de las vesículas sinápticas en la membrana, permitiendo su unión e internalización dentro de la célula. Concretamente se han encontrado interacciones con las proteínas sinaptotagmina (Syt) y SV2 y que se detallan a continuación (Lam et al., 2015).

La Syt presenta dos isoformas principales (SytI y SytII), y ambas actúan como sensores de calcio que regulan la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana durante la exocitosis (Südhof, 2002). La BoNT/B y Syt son capaces de interactuar *in vitro* (Nishiki et al., 1994, 1996; Kozaki et al., 1998) así como en cultivos de células neuronales (Dong et al., 2003), presentando la toxina una mayor afinidad para SytII. Está descrito también que la BoNT/G puede interactuar con las dos isoformas de Syt, tanto *in vitro* como *in vivo* y con afinidades similares (Rummel et al., 2004). En ambos casos, reconocen el dominio luminal N-terminal de la SytI y SytII.

La SV2 es una glicoproteína transmembrana multidominio que presenta tres isoformas distintas: SV2A, SV2B y SV2C. Está demostrado que actúan como receptores proteicos para BoNT/A (Dong et al., 2006; Mahrhold et al., 2006), BoNT/E (Dong et al., 2008), BoNT/F (Chen et al., 2009; Fu et al., 2009), y BoNT/D (Peng et al., 2011). SV2C es la isoforma que presenta mayor afinidad para BoNT/A seguida de SV2A y SV2B, en cambio en el caso de BoNT/E presenta mayor afinidad por SV2A, y la BoNT/D se une preferentemente a SV2B, seguido de SV2C y de SV2A (Brunger and Rummel, 2009).

En el caso de BoNT/A, se ha identificado también que puede unirse a otro receptor proteico: el *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) (Jacky et al., 2013). El FGFR3 pertenece a la familia de los receptores tirosina cinasa y actúa como receptor para varios FGFs (*Fibroblast Growth Factors*). Se compone de un dominio extracelular de unión al ligando semejante al de inmunoglobulinas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosina cinasa. En unirse a sus ligandos, se promueve la autofosforilación en tirosinas de su dominio intracelular, iniciándose la activación de varias cascadas de señalización involucradas en proliferación y diferenciación celular. Se ha demostrado que BoNT/A (más concretamente su dominio H<sub>c</sub>) compite con los ligandos naturales de FGFR3, promoviendo autofosforilación del receptor cuando se une a la toxina.

Por lo que se refiere al BoNT/C, hasta la fecha aún no se ha descrito ningún otro receptor proteico con el que se pueda interactuar. A continuación se muestra una tabla resumen en la que se indican los distintos tipos de receptores proteicos descritos hasta ahora para las diferentes BoNTs.

Toxina	Receptor proteico
BoNT/A	SV2C > SV2A > SV2B, FGFR3
BoNT/B	SytI > SytII
BoNT/C	?
BoNT/D	SV2B > SV2C > SV2A
BoNT/E	SV2A > SV2B
BoNT/F	SV2
BoNT/G	SytI ~ SytII

**Tabla 1. Receptores proteicos descritos para los diferentes serotipos de BoNTs.** Para cada serotipo de toxina botulínica se indican los diferentes receptores proteicos que han sido descritos, así como también por cuales presentan una mayor afinidad.

### 2.3.2. Receptores proteicos descritos para TeNT

Para la TeNT se han descrito también algunas proteínas que interaccionan con ella en membrana, aunque no se ha podido demostrar la implicación de éstas en el proceso biológico de infección de la toxina. La habilidad única de la TeNT de viajar desde el SNP hasta el SNC ha hecho que la determinación de su receptor proteico sea un gran reto. La identificación del receptor para la TeNT conlleva la complicación de que, con alta probabilidad, los receptores proteicos para TeNT en interneuronas inhibitorias y en motoneuronas son distintas proteínas. El receptor de TeNT en motoneuronas promueve su internalización en compartimentos no ácidos para evitar la translocación de la cadena L, mientras que en interneuronas el receptor la dirige a vesículas que se acidifican, permitiendo que la toxina realice su acción tóxica en el citosol de estas células.

La Thy-1 es una glicoproteína de 15 kDa presente en los *lipid rafts* que se ha descrito se une al dominio H<sub>c</sub>-TeNT en células PC12 diferenciadas con NGF y en motoneuronas de médula espinal

(Herreros et al., 2000). Se ha descrito que puede estar implicada en varios procesos como el crecimiento neurítico, potenciación a largo plazo (*long-term potentiation*), y en señalización del receptor de células T. Sin embargo hay evidencias experimentales que indican que Thy-1 no es el receptor de TeNT en neuronas, ya que neuronas de médula espinal aisladas de ratones deficientes en Thy-1 presentan una sensibilidad a H<sub>c</sub>-TeNT similar a la de las mismas neuronas de los ratones *wild-type*. Esto indicaría que aunque Thy-1 no sea un receptor esencial para TeNT, sí podría ser que interactuara con ella mimetizando a los gangliósidos y permitiendo el movimiento lateral por la membrana plasmática (Herreros et al., 2001).

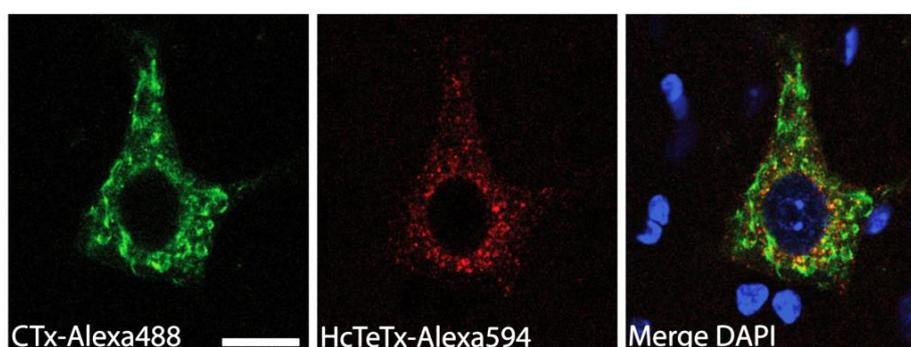
Otra proteína descrita como diana de TeNT es la SV2, cuya unión a algunos serotipos de BoNT ya se ha comentado. Algunos autores han descrito que la TeNT entra en neuronas hipocámpales y en neuronas de médula espinal mediante un mecanismo de reciclaje de vesículas sinápticas. Este mecanismo es dependiente de actividad neuronal (despolarización de membrana) y de calcio en el medio extracelular, y se da a través de una interacción directa con SV2 de manera similar a como lo hace BoNT/A (Matteoli et al., 1996; Yeh et al., 2010). De este modo se ha demostrado que TeNT ve muy reducida su unión a neuronas doble KO para SV2A y SV2B, así como que se da una competencia por la unión a SV2 entre TeNT y BoNT/E (Yeh et al., 2010). Los resultados de este trabajo indicarían que SV2 no sería el receptor en motoneuronas sino que sería el receptor después del salto transináptico, en interneuronas; ya que entrando mediante este mecanismo, la TeNT se dirigiría a vesículas acídicas que promoverían la liberación de la cadena L al citosol. El hecho de que TeNT no se una a SV2 en las motoneuronas y utilice otra ruta de entrada, se explicaría porque su receptor proteico en estas células estaría más expresado que SV2 o tendría más afinidad de unión por la TeNT en conjunto con los gangliósidos.

Recientemente se ha identificado también el nidógeno como un receptor de la TeNT. El nidógeno es un componente de la membrana basal e interactúa con otras moléculas de la matriz como el colágeno VI, los proteoglicanos, la laminina y la fibronectina. La inhibición de la interacción entre TeNT-nidógeno usando pequeños péptidos derivados del nidógeno o mediante *knockout* de esta proteína impide la unión del TeNT a las neuronas y protege a los ratones de sus efectos tóxicos. El mecanismo propuesto por los autores es que el nidógeno actuaría concentrando la toxina en regiones especializadas de la membrana presináptica en las NMJ, donde se uniría también a los gangliósidos. El nidógeno también concentraría en estas zonas otras moléculas como las neurotrofinas para facilitar su internalización y clasificación en orgánulos de transporte retroaxonal (Bercsenyi et al., 2014). En estas regiones de membrana la TeNT podría interactuar también con otros receptores de membrana que se ha descrito interactúan con los nidógenos.

#### **2.4. Proceso de internalización de la TeNT en las neuronas**

Una vez unida a sus receptores lipídicos y proteicos en la membrana neuronal, la TeNT pasa a la siguiente etapa de su proceso infectivo y se endocita en la membrana presináptica de las terminaciones de las motoneuronas. Existen diversos mecanismos de endocitosis en las células neuronales. De todos ellos el mejor caracterizado es la endocitosis mediada por clatrina, pero existen otros mecanismos independientes de clatrina como la endocitosis dependiente de caveolina, la

fagocitosis, la macropinocitosis y la endocitosis masiva dependiente de actividad (en inglés, *bulk endocytosis*). Todos estos mecanismos tienen un papel esencial en la fisiología de la célula y se encuentran altamente conservados en todos los tipos celulares. Es por esta razón que muchos agentes patógenos, virus y toxinas, incluyendo las CNTs, han adaptado sus mecanismos infecciosos para acceder a las células huésped aprovechando esta maquinaria endocítica. La toxina colérica (CTx), por ejemplo, se une a los gangliósidos GM1 presentes en los *lipid rafts*, y se internaliza a través de una vía independiente de clatrina en un tipo de endosomas distintos a los utilizados por la TeNT, y que son retroaxonalmente transportados hasta el retículo endoplasmático (Lencer and Tsai, 2003; Roux et al., 2005). Otro ejemplo es la toxina shiga, que se une a través de su subunidad B al glicosíngolípido neutro de membrana Gb3 (*globotriasylceramide*), es endocitada en endosomas tempranos y se transporta de forma retrógrada a través de la red trans-golgi hasta el lumen del retículo endoplasmático (Ewers and Helenius, 2011).



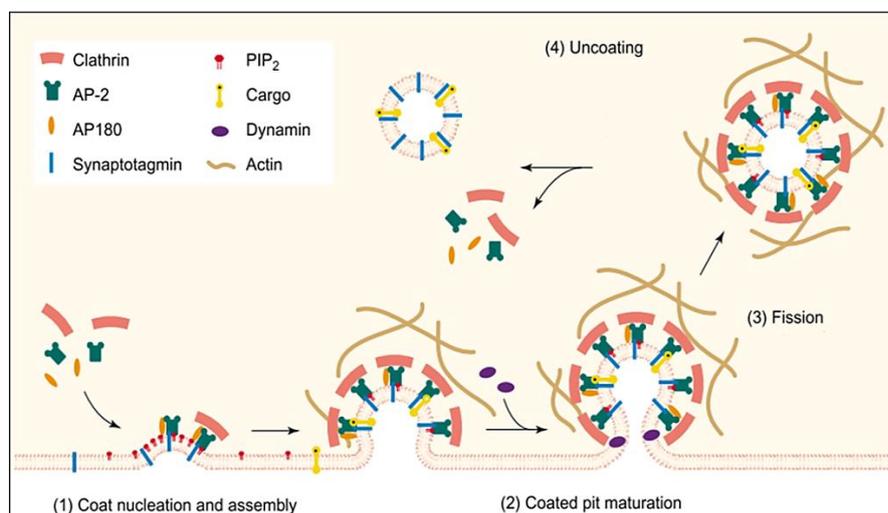
**Figura 9. Compartimentalización intracelular del fragmento Hc-TeNT y de la toxina colérica.**

El Hc-TeNT y la toxina colérica (CTx) se inyectan intramuscularmente en el gastrocnemio de ratones adultos, donde son internalizados en las NMJ y transportados retroaxonalmente hasta el soma de las motoneuronas que inervan a este músculo. Se observa como ambas toxinas no coinciden en los mismos compartimentos confirmando que siguen rutas de transporte distintas (Escala 20  $\mu\text{m}$ ). Extraído de la tesis doctoral de M. Herrando-Grabuosa.

La internalización de TeNT en motoneuronas se produce principalmente a través de un mecanismo especializado dependiente de clatrina. Este tipo de endocitosis es una de las más estudiadas. Se produce en 4 etapas, la primera de las cuales es la movilización a ciertas zonas de la membrana de determinados lípidos, como por ejemplo el fosfatidilinositol(4,5)bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), que serán posteriormente reconocidos por diversas proteínas adaptadoras y accesorias, como la AP2 (*Adaptor Protein 2*) y las epsinas. En una segunda etapa, estas proteínas reclutadas inducen la curvatura de la membrana haciéndola más accesible a las moléculas de clatrina, propiciando así la nucleación de éstas en zonas específicas de la membrana y formándose así las depresiones recubiertas de clatrina. Una vez está formada la invaginación, la tercera etapa consiste en que la vesícula recubierta de clatrina se escinde de la membrana gracias a la acción de la dinamina, una GTPasa involucrada en la remodelación de la membrana. Finalmente el recubrimiento de clatrina es eliminado por diversos factores citoplasmáticos para dar paso a una vesícula no recubierta. Los adaptadores de clatrina se ensamblan de una manera selectiva según las proteínas transportadas en la vesícula, generando así

diferentes poblaciones de endosomas tempranos con diferentes destinos dentro de la célula (Saheki and De Camilli, 2012; Kirchhausen et al., 2014).

En el caso de la TeNT, ésta ya unida a su complejo de receptores, se concentra en la membrana neuronal en zonas de depresiones recubiertas de clatrina para ser endocitada. Aunque la TeNT colocaliza con GD1b en la membrana, no se detecta este gangliósido en las depresiones recubiertas de clatrina, sino que se encuentra normalmente en los bordes de las invaginaciones. Esto sugiere que, aunque son esenciales para su unión, los gangliósidos no permanecen unidos al Hc-TeNT durante el proceso de internalización. Esta hipótesis se ve reforzada por las lentas cinéticas de transporte retrogrado descritas para gangliósidos *in vivo*, que no se corresponden con las rápidas velocidades descritas para TeNT (Deinhardt et al., 2006a). También se ha descrito que la endocitosis de TeNT es sensible a la disminución de colesterol en la membrana (Herreros et al., 2001).



#### Figura 10. Endocitosis mediada por clatrina

Esquema del proceso de endocitosis mediada por clatrina. En una primera etapa de nucleación se movilizan determinados lípidos a una zona de la membrana, que reclutan distintas proteínas adaptadoras como AP-2 o AP180. En la segunda fase de maduración las moléculas de clatrina se unen a las proteínas adaptadoras provocando la curvatura de la membrana. La acción de la dinamina propicia la tercera fase de escisión de la vesícula, y finalmente en la última etapa se pierde el recubrimiento de clatrina. Extraído de Takei et al., 2001.

Mediante diversos constructos que interfieren con proteínas involucradas en distintos pasos del mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina se ha podido determinar la identidad de algunas proteínas adaptadoras necesarias en el proceso de internalización de la TeNT. Se ha descrito que la dinamina es necesaria en el proceso, así como las proteínas adaptadoras AP180 y AP2, encargadas de mediar el reclutamiento de clatrina en la membrana. Por el contrario la epsina1, una proteína adaptadora que se une a receptores ubiquitinizados y los dirige hacia endosomas tardíos y la vía lisosomal, no parece intervenir en el proceso (Deinhardt et al., 2006a).

### 2.4.1. Internalización de TeNT mediante otros mecanismos de endocitosis

Durante su proceso infectivo natural, la toxina tetánica se internaliza en dos tipos neuronales diferentes, primero en motoneuronas a través de las uniones neuromusculares y más tarde en interneuronas inhibitorias mediante un mecanismo de transcitosis desde las motoneuronas. Tal como se ha comentado, en cada uno de estos tipos neuronales la toxina se internaliza por diferentes mecanismos, en distintos tipos de vesículas, y sufre un destino determinado dentro de la célula. A parte de la endocitosis mediada por clatrina, que es la vía de entrada principal de la toxina en motoneuronas, se ha descrito que la TeNT puede entrar en la célula por otros mecanismos como los de recuperación de vesículas sinápticas en la membrana plasmática, comentados más detalladamente a continuación.

Tal y como ya se ha comentado, la entrada de TeNT vía reciclaje de vesículas sinápticas ha sido descrita en diversos tipos neuronales bajo diferentes condiciones (Matteoli et al., 1996; Yeh et al., 2010). Las neuronas utilizan un mecanismo de endocitosis especial para regenerar las vesículas sinápticas pocos segundos después de que se fusionen con la membrana plasmática para liberar los neurotransmisores que contienen. Esta recuperación puede producirse por diferentes vías, siendo la más importante la endocitosis mediada por clatrina que permite una recuperación inmediata de las vesículas. Otro mecanismo descrito es el conocido como *kiss-and-run*, en el cual la vesícula excitada no se acaba de fusionar completamente con la membrana, solo lo suficiente para permitir crear un poro por el que se libera su contenido al medio extracelular. Antes de que prosiga su fusión con la membrana, la vesícula ya es de nuevo reciclada prácticamente intacta. El hecho de que el poro de fusión creado sea demasiado pequeño y altamente selectivo hace imposible que sea esta la vía de entrada de la TeNT. El último mecanismo descrito es el llamado endocitosis masiva, y es el menos específico. Ocurre bajo condiciones de alta actividad, como en la despolarización de la membrana, durante la cual se recuperan grandes cantidades de membrana plasmática en forma de “cisternas” que más tarde formaran las vesículas. De todos estos tres mecanismos, se cree que la TeNT probablemente esté utilizando este último método para entrar en la vía de reciclaje de vesículas sinápticas (Blum et al., 2014b).

Otros autores incluso defienden que la interacción de la TeNT con dos gangliósidos puede ser suficiente para iniciar la endocitosis vía curvatura de la membrana plasmática descrita recientemente para otros virus y toxinas (Chen et al., 2009).

### 2.4.2. Diferencias entre los mecanismos infectivos de BoNT y TeNT

Tal y como ya se ha comentado, tanto la TeNT como la BoNT son endocitadas en los terminales de las motoneuronas pero cada una de ellas lo hace a través de un mecanismo distinto. La TeNT es endocitada principalmente mediante un mecanismo dependiente de clatrina, mientras que las BoNTs son internalizadas por un mecanismo de reciclaje de vesículas sinápticas. Esto provoca que sean transportadas a lugares diferentes dentro de la célula y que tengan diferentes efectos clínicos (Montal, 2010; Blum et al., 2012). Aún se desconoce si esta diferencia en el tráfico de TeNT y BoNT es debida a su unión específica a diferentes receptores en la membrana, que las destinarían a diferentes

compartimentos endocíticos, o si es debida al reclutamiento en la vesícula de determinadas proteínas que la destinarán a un compartimento concreto tras la internalización.

Sin embargo varios autores apuntan a que los mecanismos de internalización utilizados por la TeNT y las BoNT podrían no ser exclusivos. Se ha observado que el tratamiento con altas cantidades de TeNT puede causar una parálisis flácida como la producida por las BoNT, y viceversa, altas concentraciones de BoNT pueden provocar síntomas semejantes a los causados por la TeNT. En estos tratamientos a altas concentraciones la TeNT estaría entrando en las NMJ mediante una vía endocítica durante el reciclaje de vesículas sinápticas (Blum et al., 2012). El hecho de que este fenómeno solo se dé a elevadas concentraciones indica que la toxina tiene baja afinidad por la vía que lleva a esta parálisis flácida aberrante. En el caso de los tratamientos con altas dosis de BoNT/A se ha observado que ésta tiene capacidad de ser transportada retroaxonalmente en diferentes tipos neuronales (Antonucci et al., 2008; Restani et al., 2012a) e incluso de realizar saltos transinápticos en el sistema visual (Restani et al., 2011, 2012b). Todas estas observaciones implican que el sistema de entrada de las CNTs en las neuronas podría estar basado en preferencias de unión y distintas afinidades a sus receptores (Blum et al., 2014b).

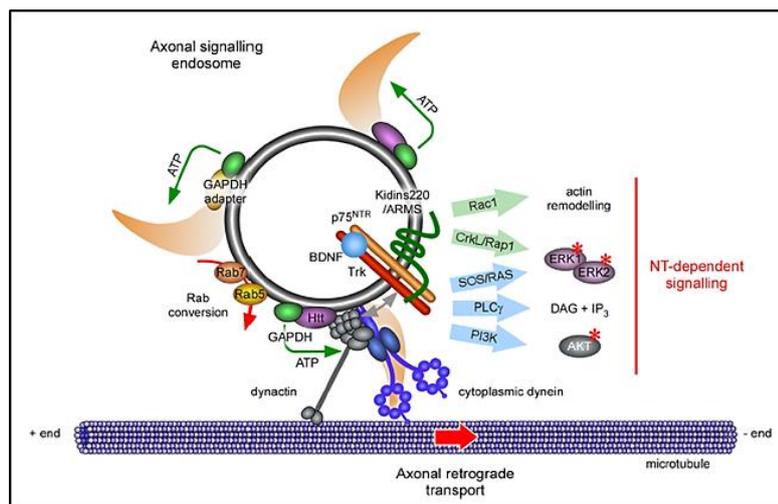
## 2.5. Transporte retroaxonal de la TeNT

La TeNT se internaliza en diferentes tipos de vesículas que se pueden dividir básicamente en dos clases: vesículas redondas, caracterizadas por un movimiento más discontinuo y lento, y vesículas tubulares, que presentan un movimiento más continuo y rápido. Estas vesículas pueden estar recubiertas o no de clatrina, y ser estacionarias u oscilatorias (Matteoli et al., 1996; Lalli and Schiavo, 2002; Lalli et al., 2003a; Roux et al., 2005). La velocidad de transporte de la H<sub>c</sub>-TeNT en un cultivo primario de motoneuronas embrionarias está calculada entre 1-5 m/s, lo que la coloca dentro del rango de velocidad adjudicado al transporte axonal rápido (Nakata et al., 1998; Goldstein and Yang, 2000; Kaether et al., 2000). Esta cifra se acerca a la velocidad registrada para H<sub>c</sub>-TeNT *in vivo* en nervio ciático y en neuronas sensoriales (0,8-3,6 m/s) (Stoeckel et al., 1975; Bilsland et al., 2010), siendo ésta última ligeramente superior debido a la mielinización de los axones, o a su estado de desarrollo más avanzado.

Para el transporte de las vesículas dentro de la célula es necesaria la intervención de proteínas motoras que enlazan la vesícula a los filamentos del citoesqueleto y propician su movimiento a través de éstos mediante el consumo de ATP. En células eucariotas existen 3 superfamilias de proteínas motoras, las kinesinas, las dineinas y las miosinas. Las kinesinas y las dineinas transportan las vesículas sobre estructuras de microtúbulos (MT), mientras que las miosinas dependen de una estructura de F-actina (Stiess and Bradke, 2010). Los MT y los microfilamentos de actina son estructuras altamente polarizadas que se extienden longitudinalmente dentro de la célula, con los MT principalmente situados en los axones y dendritas y los filamentos de actina más concentrados en las regiones sinápticas. El transporte axonal rápido depende de MT y ocurre tanto en dirección anterógrada (del cuerpo celular hacia la periferia) como en dirección retrógrada (desde los extremos de los axones hacia el soma), por medio de kinesinas y dineinas respectivamente (Hirokawa et al., 2010). La miosina también participa en el transporte axonal en las proximidades de las regiones

sinápticas o en las zonas donde la distribución de los MT es menos uniforme (Langford, 2002). En motoneuronas el transporte retroaxonal rápido requiere de una estrecha asociación de los MT con los microfilamentos de actina. El avance de las vesículas que contienen TeNT a lo largo del axón requiere participación tanto de los MTs como de la F-actina, y por lo tanto necesita la coordinación tanto de la dineína y la kinesina citoplasmáticas como de la miosina Va. La dineína funciona como motor principal propiciando el transporte retrogrado rápido mientras que las kinesinas intervienen en el movimiento de las vesículas oscilatorias y lentas (Lalli et al., 2003a). La miosina Va contribuiría permitiendo el movimiento en las microfibras de F-actina durante la transición de un MT a otro (Lalli et al., 2003b).

La TeNT se endocita en las motoneuronas utilizando la misma ruta de transporte axonal retrógrado que utilizan las neurotrofinas y sus respectivos receptores para llegar desde los terminales sinápticos hasta el soma neuronal. Se ha descrito una elevada colocalización entre H<sub>C</sub>-TeNT, NGF y p75<sup>NTR</sup> (Lalli and Schiavo, 2002), y también con BDNF y TrkB (Deinhardt et al., 2006b) en endosomas de transporte retroaxonal tanto en cultivos primarios de motoneuronas como en neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRG), indicando así una vía común de transporte.



**Figura 11. Transporte retrogrado axonal de los endosomas de señalización**

Los endosomas de señalización que contienen a los receptores con sus ligandos internalizados utilizan un motor de dineína para desplazarse a lo largo de los microtúbulos. La energía para el desplazamiento se consigue mediante la hidrólisis de ATP, proporcionado por la GAPDH (*glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*) localizada en los endosomas. La conversión de Rab5 a Rab7 dirige al endosoma hacia la ruta de transporte axonal rápido. El complejo receptor/neurotrofina permanece activo dentro del endosoma e interacciona con diferentes proteínas adaptadoras (como Kidins/ARMS) para propagar la cascada de señalización en el transcurso de su recorrido. Extraído de Schmiege et al., 2014.

Los mecanismos de transporte retroaxonal son muy importantes en las células del sistema nervioso y especialmente en las motoneuronas, en las que los estímulos externos recibidos en la unión neuromuscular deben ser rápidamente transmitidos hasta el soma a través de su largo axón. Las neurotrofinas y sus receptores, los Trk (*Tropomyosin Receptor Kinase*) y p75<sup>NTR</sup> (*p75 Neurotrophin*

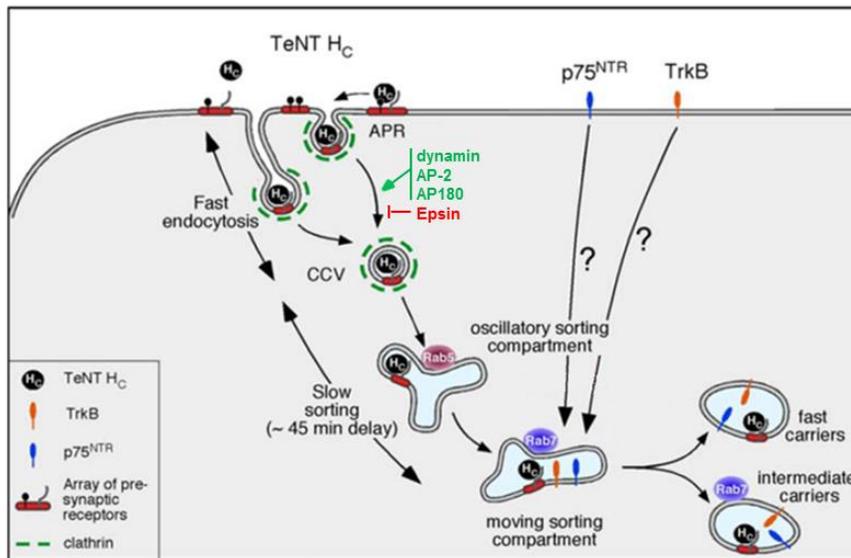
*Receptor*), los cuales serán descritos más detalladamente en el capítulo 3 de la introducción, son uno de los ejemplos mejor estudiados para este tipo de transporte retroaxonal rápido. Las neurotrofinas interactúan con sus receptores en los terminales, se endocitan de forma dependiente de clatrina y son dirigidas a un tipo de orgánulo de transporte designado como endosoma de señalización. Estas estructuras permiten que los complejos neurotrofina-receptor se mantengan activos mientras son transportados, activando las vías de señalización que se derivan de ellos a su paso por el axón mediante diferentes proteínas acopladas a la superficie del endosoma. Estos orgánulos entran en el sistema de transporte retroaxonal rápido para llegar hasta el núcleo, donde promueven fenómenos de expresión génica que controlan la diferenciación y la supervivencia en la mayoría de tipos neuronales (Matusica and Coulson, 2014; Schmiege et al., 2014).

En este proceso, la acción secuencial de las proteínas Rab5 y Rab7 es esencial para dirigir la endocitosis dependiente de clatrina hacia el transporte retroaxonal rápido (Rink et al., 2005). Ambas proteínas, Rab5 y Rab7, son pequeñas GTPasas que se acoplan a la superficie del endosoma. Las proteínas Rab regulan procesos relacionados con el tráfico de membranas a través de diversas moléculas efectoras específicas para cada tipo de Rab. Existen más de 70 tipos de Rab en mamífero que intervienen en diferentes etapas de la formación de la vesícula, el transporte de ésta y la fusión con otras vesículas o membranas celulares (Bucci et al., 2014). La Rab5 controla las etapas iniciales de los procesos de internalización, incluyendo la endocitosis mediada por clatrina, la maduración de las vesículas hacia endosomas tempranos y la posterior fusión de endosomas. La Rab7 en cambio, actúa en etapas más avanzadas, regulando el transporte rápido de las vesículas a lo largo del axón, desde los endosomas tempranos a los tardíos (Zerial and McBride, 2001; Pfeffer, 2012). El bloqueo de la actividad de Rab7 lleva a un completo bloqueo del transporte retroaxonal de H<sub>C</sub>-TeNT, lo que implica un control estricto por parte de Rab7 de una etapa que precede o coincide con el reclutamiento de transportadores a lo largo del citoesqueleto (Deinhardt et al., 2006b).

Esta relación entre el transporte de la TeNT y las neurotrofinas está respaldada por diversas observaciones. Se ha demostrado que el BDNF incrementa la eficiencia de internalización de H<sub>C</sub>-TeNT en las NMJ de ratón de una manera dependiente de dosis. Además otras neurotrofinas como NT-4/5 tienen también efectos similares en la localización e internalización de la TeNT aunque con menos potencia que el BDNF (Roux et al., 2006). También está descrito que tanto la TeNT como el H<sub>C</sub>-TeNT son capaces de activar a los receptores Trk y a sus efectores *downstream* como ERK-1/2 (*Extracellular Signal-Regulated kinase 1/2*), Akt y PLC $\gamma$ -1 (*Phospholipase C  $\gamma$ -1*) de manera dependiente de dosis (Gil et al., 2000, 2001, 2003).

Otra característica importante del proceso de endocitosis de la TeNT es que es capaz de eludir la vía de degradación lisosomal. Las vesículas en las que es internalizada en la motoneurona poseen un pH neutro en el lumen (Lalli et al., 2003b; Bohnert and Schiavo, 2005), y esta característica es muy importante para el funcionamiento de la toxina, ya que un pH ácido en la vesícula promovería la liberación de la cadena L en el citoplasma y la acción tóxica se daría en la motoneurona. El hecho que el pH del lumen vesicular sea neutro permite que la TeNT sea transportada intacta hasta el soma para que pueda realizar el salto transináptico. Se ha descrito que es necesaria la presencia transitoria de la vATPasa en las etapas iniciales del proceso de endocitosis para que la TeNT sea derivada hacia su ruta de transporte retrógrado (Bohnert and Schiavo, 2005). En etapas más avanzadas la vATPasa se separa

de la vesícula y, como consecuencia, estos orgánulos presentan un pH neutro en el lumen, de manera que se protege la conformación nativa de las moléculas (lábil al ácido) contenidas en la vesícula y se estabilizan las interacciones entre receptores y ligandos. La baja capacidad degradativa del compartimento está acorde con la larga vida media que presenta el H<sub>C</sub>-TeNT internalizado (unos 5-6 días en cultivos primarios de motoneuronas) (Habig et al., 1986). Estas condiciones no ácidas dentro de la vesícula permiten la interacción sostenida que mantienen en el lumen las neurotrofinas y sus receptores (Bohnert and Schiavo, 2005) (Figura 12).



**Figura 12. Esquema del mecanismo de endocitosis y transporte retroaxonal para Hc-TeNT**

El Hc-TeNT se une a un complejo lípido-proteína en la NMJ y se desplaza lateralmente hasta zonas de depresiones recubiertas de clatrina, desprendiéndose en este punto del gangliósido unido. Se internaliza vía endocitosis mediada por clatrina, dependiente de dinamina, AP-2 y AP180, pero no de epsina. Una vez endocitado, la vesícula que lo contiene se desprende del recubrimiento de clatrina y es dirigida a una ruta de transporte retrógrado. Primero en vesículas estacionarias positivas para Rab5 que posteriormente progresan a vesículas en movimiento positivas para Rab7. Este proceso es lento, de aproximadamente 45 min. Las vesículas positivas para Rab7 pueden generar vesículas de velocidad intermedia Rab7-positivas o vesículas rápidas Rab7-negativas. La ruta de transporte retroaxonal de Hc-TeNT es compartida por los receptores de neurotrofinas TrkB y p75<sup>NTR</sup>, así como por sus agonistas NGF y BDNF, aunque no está descrito en qué punto convergen ambas rutas. Adaptado de Deinhardt et al., 2006.

## 2.6. Aplicaciones del Hc-TeNT en la neurociencia y la medicina

### Hc-TeNT como trazador

La capacidad natural del Hc-TeNT de utilizar la maquinaria celular de transporte retroaxonal y de saltar transinápticamente a neuronas de orden superior del SNC lo convierte en una herramienta molecular muy útil para la investigación en neuroanatomía. Su utilización ha facilitado en gran medida el estudio de diversos procesos neuronales como la endocitosis, la clasificación de diversas

proteínas en vesículas endocíticas, y el transporte retroaxonal tanto *in vitro* como *in vivo*. Para su uso como trazador, el Hc-TeNT se conjuga química o genéticamente a una molécula marcadora detectable mediante histoquímica o fluorescencia. Este Hc-TeNT marcado puede ser utilizado tanto en forma de proteína recombinante o como plásmido no viral de DNA desnudo (*naked DNA*). En este último caso el plásmido se inyecta directamente en el tejido donde será incorporado en las células, transcrito como mRNA, traducido a proteína y secretado (Toivonen et al., 2010). Todas estas características hacen del Hc-TeNT un importante agente para neurografía en humanos gracias a su administración no invasiva y a su atoxicidad.

### **Hc-TeNT como vacuna contra el tétanos**

El fragmento Hc-TeNT ha sido propuesto también como sustituto a la actual vacuna contra el tétanos por sus propiedades antigénicas. Actualmente la vacuna contra el tétanos que se administra a la población está basada en el toxoide tetánico, una forma inactiva de la toxina, que al inyectarse desencadena una inmunización activa. El toxoide se obtiene tratando la toxina tetánica con formaldehído para inactivarla y es muy inmunogénico (Schiavo et al., 2000). Sin embargo la inducción de una inmunidad protectora a largo plazo en los individuos requiere de múltiples vacunaciones de refuerzo a intervalos regulares. Además el proceso de producción es complicado por la peligrosidad que conlleva, y el tratamiento con formaldehído para su inactivación puede causar hipersensibilidad (Johnston et al., 2009). El fragmento Hc-TeNT producido en forma de proteína recombinante induce la producción de anticuerpos protectores en animales inyectados mediante diversos sistemas de suministro y rutas. El Hc-TeNT tendría claras ventajas sobre el toxoide como por ejemplo una producción y caracterización más fácil, segura y homogénea (Qazi et al., 2006).

### **Hc-TeNT como vector de moléculas terapéuticas hasta SNC**

El Hc-TeNT ha sido utilizado en numerosas ocasiones para producir constructos híbridos que transporten otras proteínas “pasajeras” al SNC desde la periferia. El envío de sustancias terapéuticas al cerebro o a médula espinal es a menudo problemática ya que muchas de estas moléculas son demasiado grandes para atravesar la barrera hematoencefálica (Fishman et al., 2009; Toivonen et al., 2010). Diversas moléculas se han fusionado a Hc-TeNT sin sufrir una pérdida de actividad biológica aparente, lo que proporciona una valiosa herramienta terapéutica para luchar contra la neurodegeneración. Se ha demostrado que proteínas de incluso más de 150 kDa pueden ser transportadas conjuntamente con el Hc-TeNT y ser eficientemente internalizadas. Las proteínas de fusión o híbridas de Hc-TeNT muestran una internalización y transporte aumentados a motoneuronas administrándolas de forma intramuscular o sistémica (Figueiredo et al., 1997; Francis et al., 2004a). La capacidad de transcitosis del Hc-TeNT permite además el envío de proteínas híbridas al cerebro mediante inyección intraparenquimal o administrándola en el fluido cerebroespinal (Francis et al., 2004a). Entre las diferentes proteínas que se han fusionado al dominio Hc-TeNT se encuentran diversas enzimas como SOD1 (Benn et al., 2005), SMN (Francis et al., 2004b), y también neurotrofinas y factores de crecimiento como GDNF (Larsen et al., 2006; Ciriza et al., 2008), IGF-1 (Chian et al., 2009) y BDNF (Calvo et al., 2011).

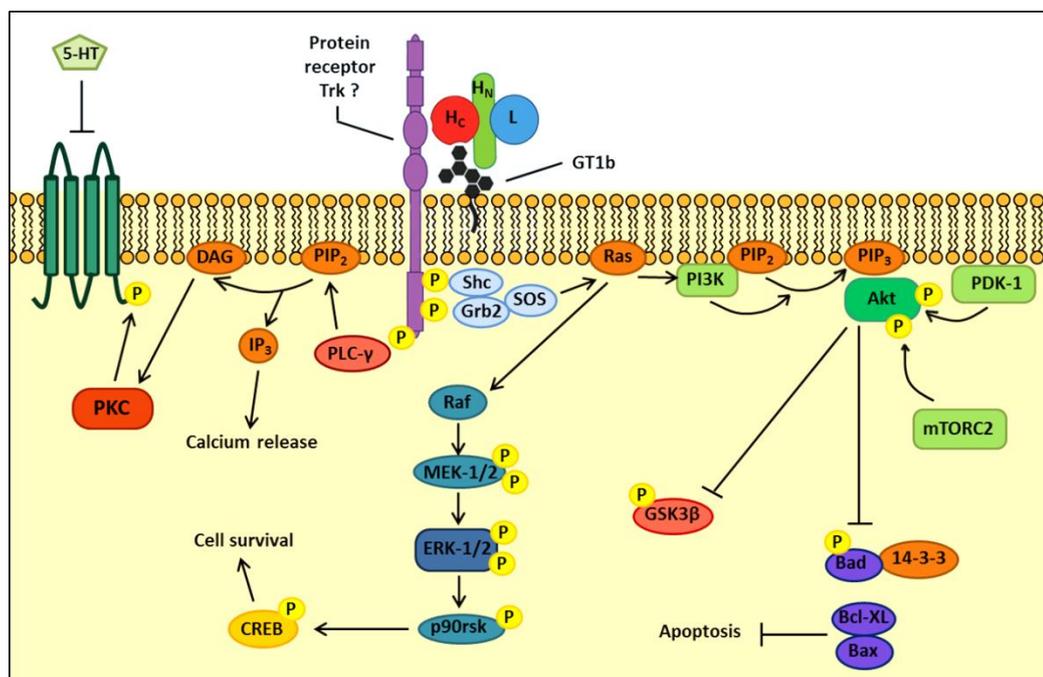
### **Hc-TeNT como agente neuroprotector**

Se ha descrito que la TeNT induce un incremento en la síntesis de serotonina en el SNC, a la vez que desencadena la translocación de PKC (*protein kinase C*), de la forma citosólica inactiva a la forma activa en membrana (Aguilera et al., 1990). Concretamente se ha observado que la TeNT produce una inhibición específica de la recaptación de serotonina en sinaptosomas del SNC de rata a través de la fosforilación del transportador de serotonina mediada por PKC (Najib et al., 2000; Pelliccioni et al., 2001). La TeNT induce la fosforilación de la PLC $\gamma$ -1, que provoca la hidrólisis de fosfoinositol, que producen la translocación y activación de les PKC (Gil et al., 1998, 2000; Inserte et al., 1999). Se han caracterizado también los efectos de la TeNT sobre las diferentes isoformas de PKC, observando activación en las isoformas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , ligeros cambios en las isoformas  $\xi$  y  $\alpha$ , mientras que no se ha observado ningún cambio en la forma atípica  $\zeta$  (Gil et al., 2000).

Varios estudios evidencian que el dominio Hc-TeNT por si solo presenta propiedades terapéuticas (Moreno-Igoa et al., 2010). De este modo la unión del Hc-TeNT a sinaptosomas aislados de cerebro de rata activa la señalización intracelular dependiente de Trk, mimetizando la acción de sus ligandos naturales, las neurotrofinas (Gil et al., 2000, 2001). La estimulación de los receptores Trk por efecto del Hc en cultivos primarios de neuronas corticales y neuronas granulares de cerebelo de rata (Gil et al., 2003; Chaïb-Oukadour et al., 2004) produce una activación de la vía de supervivencia PI-3K/Akt, demostrada por la fosforilación de Akt (en Ser 473 y Thr 308) y de su sustrato GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* ). Además, el Hc activa también la vía de MAPK/ERK como demuestra la fosforilación que provoca en ERK-1/2 (en Thr 202 y Tyr 204), en dos de sus cinasas *upstream* y algunas dianas *downstream* como la Rsk/S6K (*Ribosomal protein S6 kinase*) y la CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*). La inhibición específica de los Trk o de PI3-K conlleva la inhibición de la activación por Hc de estas dos vías de señalización. Mediante la activación de estas vías, el Hc es capaz de proteger las neuronas granulares de cerebelo de la muerte apoptótica provocada por una concentración baja de K<sup>+</sup> extracelular (Chaïb-Oukadour et al., 2004), preservando la función mitocondrial, disminuyendo la fragmentación nuclear y reduciendo la activación de la pro-caspasa 3. También en cultivos organotípicos de medula espinal de rata se ha observado un efecto neuroprotector del Hc-TeNT en las motoneuronas frente a un estrés excitotóxico, y efectos en las vías de las MAPK y PI3K (Herrando-Grabulosa et al., 2013). Aunque mecanismo detallado por el cual el Hc-TeNT produce esta activación de los receptores Trk aun han de ser esclarecido, existen claras similitudes con la acción que producen las neurotrofinas y factores de crecimiento (Toivonen et al., 2010).

Las propiedades antiapoptóticas mostradas por el Hc-TeNT no se limitan únicamente a los estudios *in vitro*. En estudios realizados en un modelo de ALS en ratón (SOD1G93A) se ha observado que el tratamiento de estos animales con Hc-TeNT inyectando en forma de DNA plasmídico produce una mejora de la inervación muscular de las extremidades posteriores, un retraso significativo en la aparición de los síntomas y déficits funcionales y un aumento en la supervivencia de las motoneuronas espinales (Miana-Mena et al., 2004; Moreno-Igoa et al., 2010; Calvo et al., 2011). También en modelos de parkinsonismo en ratas sometidas a tratamientos con MPTP (*1-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine*), basado en la destrucción específica de las neuronas dopaminérgicas, el tratamiento con Hc-TeNT en forma de proteína recombinante protege a las células de la apoptosis y

promueve una mejora de los déficits motores así como un aumento de los niveles de dopamina (Mendieta et al., 2009). Además el tratamiento con Hc-TeNT sobre neuronas granulares de cerebelo sometidas a MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium) resulta en una mayor supervivencia neuronal (Chaïb-Oukadour et al., 2009).



**Figura 13. Vías de señalización activadas por TeNT.**

El dominio Hc-TeNT se une a los polisialogangliósidos presentes en la membrana y a un receptor proteico que podría tratarse de uno de los receptores Trk. Hc-TeNT activa los receptores Trk provocando su fosforilación y activando las vías PI3K/Akt, Ras/MAPK y PLC/PKC. La activación de estas vías deriva en efectos de promoción de la supervivencia e inhibición de la apoptosis, así como inhibición de la captación de serotonina (5-HT).

### 3. LOS RECEPTORES DE NEUROTROFINAS

#### 3.1. Las neurotrofinas

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que intervienen en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico. Estas proteínas controlan diversos aspectos de la actividad neuronal que van desde la regulación del crecimiento, la supervivencia y la apoptosis, hasta la diferenciación neuronal. Regulan también otros procesos como la sinaptogénesis, la liberación de neurotransmisores, la potenciación a largo plazo (*LTP*, *Long-term potentiation*) y la plasticidad sináptica (Chao, 2003). Las neurotrofinas pueden ejercer sus efectos tanto a nivel local en la terminación nerviosa, o también mediante señalización retrógrada transportándose desde la terminación axonal hasta el soma para regular la expresión génica.

En mamífero, esta familia de proteínas está compuesta por el NGF (*nerve growth factor*), el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), la NT-3 (*neurotrophin 3*) y la NT-4/5 (*neurotrophin 4/5*). Todas ellas comparten características estructurales y funcionales similares. Ejercen su acción uniéndose en la superficie de las células a dos clases de receptores transmembrana, los receptores Trk (*tropomyosin-related kinase receptor*) y el receptor p75<sup>NTR</sup> (*p75 neurotrophin receptor*) (Reichardt, 2006). Todas las neurotrofinas se unen con una afinidad similar al receptor p75<sup>NTR</sup>, mientras que los diferentes tipos de receptores Trk (TrkA, TrkB y TrkC) presentan una elevada selectividad de sustrato. De esta manera el NGF se une específicamente a TrkA, el BDNF y la NT-4/5 se unen a TrkB, y la NT-3 se une a TrkC. La NT-3 puede interactuar también con TrkA y TrkB aunque con menos eficiencia. La unión a estos receptores iniciará la activación de diversas vías de señalización que llevarán a los diferentes efectos de las neurotrofinas en la célula.

Las neurotrofinas y sus receptores se expresan tanto durante las etapas de desarrollo como en la etapa adulta en muchos tipos celulares en el sistema nervioso central y el periférico, así como en células no neuronales. Son esenciales para el desarrollo puesto que modelos *knock-out* sin expresión de neurotrofinas mueren durante las primeras semanas de vida, y modelos que expresan niveles reducidos de neurotrofinas, aunque son viables, muestran diversos déficits cognitivos y trastornos de comportamiento (Chao, 2003).

Las neurotrofinas son sintetizadas a una distancia considerable del cuerpo neuronal, en tejidos periféricos u otras neuronas inervadas por las neuronas donde la neurotrofina ejercerá su función. Durante el desarrollo se establece un circuito de transporte retroaxonal de las neurotrofinas desde el tejido productor hasta el soma de la neurona receptora. Las neuronas que no pueden establecer correctamente este circuito no sobreviven al periodo de muerte neuronal y degeneran. Este circuito creado se mantiene durante toda la vida de la neurona para mantener su estado de diferenciación y su funcionalidad. Otras formas de obtención de las neurotrofinas son por sistemas autocrinos y paracrinos no dependientes de inervación (Skaper, 2012).

Se sintetizan en forma de precursores o pro-neurotrofinas de 31-35 kDa, que deben ser procesados por proteólisis para dar paso a la neurotrofina madura, de unos 12 kDa. Este prodominio situado en la parte N-terminal, tiene funciones importantes en el transporte intracelular y el plegamiento de la neurotrofina. Las pro-neurotrofinas son proteolizadas intracelularmente por la furina y otras

pro-convertasas en un sitio de corte altamente conservado formado por un par de aminoácidos básicos. También pueden ser procesadas por otras diversas proteasas, como plasmina y metaloproteinasas de la matriz extracelular. La regulación de este paso es un importante control post-transcripcional que limita y añade especificidad a las acciones de estas proteínas. No toda la neurotrofina sintetizada es procesada, sino que una parte se mantiene en forma de pro-neurotrofina y adquiere funciones biológicas diferentes a las de su forma madura. Las proteínas ya maduras forman homodímeros estables unidos no covalentemente, aunque en algunas ocasiones también pueden formar heterodímeros (Skaper, 2008).

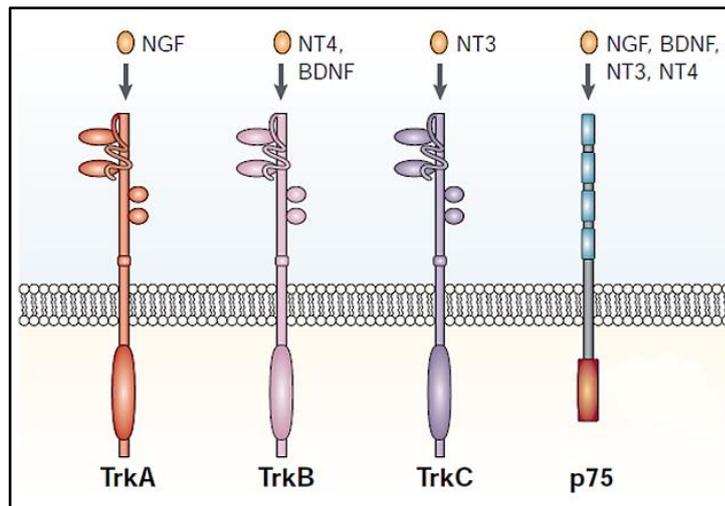
Las diferentes neurotrofinas, así como los genes que las codifican, comparten homologías en su secuencia y estructura, lo cual sugiere que tienen origen en duplicaciones de un gen ancestral. Todas ellas comparten un plegamiento terciario similar y un motivo estructural que consiste en seis histidinas que forman tres puentes disulfuro intracadena, estabilizando así el plegamiento muy fuerte de la proteína en su forma activa. La interfaz del dímero está compuesta de hojas  $\beta$  que mantienen la conformación, estos aminoácidos hidrofóbicos están altamente conservados, mientras que los giros  $\beta$  son altamente variables. Los aminoácidos implicados en la unión de la neurotrofina están más conservados y conforman la interfaz de unión con los receptores Trk, mientras que los aminoácidos que difieren entre las diversas neurotrofinas son los que definen su especificidad frente a un receptor concreto (Reichardt, 2006).

Las funciones neuroprotectoras y regenerativas que presentan las neurotrofinas las hacen una diana muy atractiva para el tratamiento de diversas enfermedades del sistema nervioso como el Alzheimer, el Parkinson, la isquemia y la esclerosis lateral amiotrófica entre otras. También existen muchos estudios que señalan a las neurotrofinas y a sus receptores como importantes dianas para la terapia contra el cáncer.

### **3.2. Los receptores Trk**

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, existen en mamífero tres clases de receptores tirosina cinasa Trk: TrkA, TrkB y TrkC. Tal y como muestra la Figura 14, cada receptor Trk tiene una neurotrofina preferencial por la que presenta una mayor afinidad de unión, mientras que todas ellas pueden unirse al receptor  $p75^{\text{NTR}}$  con afinidades similares, como se comentará en el siguiente apartado. Todos los Trks son glicoproteínas transmembrana de tipo I, de aproximadamente 140 kDa (unos 800 aminoácidos), y que pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina cinasa (Banfield et al., 2001). La activación de los receptores Trk por la unión a las neurotrofinas conduce a la supervivencia celular, la diferenciación, el crecimiento axonal, la regulación de la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica.

Los diferentes subtipos de receptores Trk se expresan diferencialmente en función del tipo de célula. El patrón de distribución de TrkC en los tejidos no neuronales es similar al de TrkA, pero con una expresión más débil, mientras que en sistema nervioso TrkC y TrkB siguen patrones de expresión más parecidos (Bertrand et al., 2012).



**Figura 14. Tipos de neurotrofinas y receptores.**

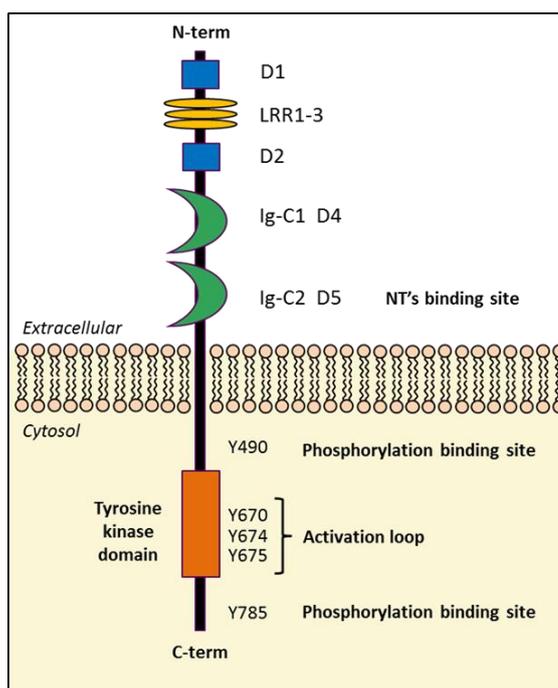
Cada neurotrofina se une con una afinidad específica a un receptor concreto. El NGF se une específicamente a TrkA, el BDNF y la NT-4/5 se unen a TrkB, y la NT-3 se une a TrkC. Todas ellas pueden unirse además al receptor p75<sup>NTR</sup> con menor afinidad. Extraído de Chao, 2003.

### 3.2.1. Estructura molecular

Los tres tipos de receptores Trk presentan una significativa homología de secuencia y una organización en dominios muy conservada. Se componen de una región extracelular encargada de la unión a sus agonistas, un dominio transmembrana, y una región intracelular con actividad tirosina cinasa. El dominio extracelular contiene, en la zona N-terminal, dos regiones ricas en cisteínas (dominios 1 y 3, D1 y D3) que flanquean un dominio compuesto por tres motivos ricos en leucinas consecutivos (dominio 2, D2). La zona C-terminal más cercana a la membrana plasmática, consiste en dos dominios tipo inmunoglobulina denominados Ig-C1 (dominio 4, D4) y Ig-C2 (dominio 5, D5) (Figura 15) (Skaper, 2012). Diferentes estudios han demostrado que el D5 es el subdominio responsable de la unión a la neurotrofina y es la parte que concede al receptor su especificidad de unión (Ultsch et al., 1999), mientras que el D4 tiene un papel en la regulación de la dimerización del receptor y su consecuente activación (Zaccaro et al., 2001; Arévalo et al., 2004). Las estructuras cristalinas obtenidas del dominio D5 de TrkA unido a NGF (Ultsch et al., 1999) y del D5-TrkB unido a NT-4/5 (Banfield et al., 2001) confirman que este dominio es el responsable tanto de la afinidad de unión como de la alta especificidad por sus agonistas. Las afinidades de unión de las neurotrofinas por este dominio se corresponden con las calculadas con el receptor intacto. En el caso del D5-TrkB se ha observado que se une a NT-4/5 con una constante de disociación (Kd) de 260 pM y a BDNF con una Kd de 790 pM. Esta constante para BDNF se ajusta también a la observada para el receptor íntegro en la superficie celular (Kd = 990 pM) (Dechant et al., 1993).

A pesar de tener la misma organización en subdominios, las regiones extracelulares de los diferentes receptores Trk presentan tan solo un 50% de homología, debido a la especificidad y selectividad en la unión a sus agonistas. El dominio transmembrana enlaza la región extracelular con la citoplasmática y estabiliza al receptor en la superficie celular. La región intracelular consta de un dominio tirosina

cinasa y un extremo carboxilo-terminal. La función de esta región viene regulada por la fosforilación de determinados residuos de tirosina que forman un *loop* de activación (Cunningham et al., 1997). La fosforilación en otros residuos de tirosina sirve para unir a diferentes proteínas adaptadoras específicas. Todos los receptores Trk presentan una elevada homología en sus dominios citoplasmáticos, con alrededor de un 75% de homología en su secuencia. Los sitios de fosforilación y las vías activadas por todos ellos son muy similares (Atwal et al., 2000).



**Figura 15. Estructura de los receptores Trk.**

Empezando por el extremo N-terminal, los receptores Trk se componen de 2 dominios ricos en cisteínas (D1 y D2) separados por tres dominios ricos en leucinas (LRR1-3), dos dominios tipo inmunoglobulina (D4 y D5), una región transmembrana, y un dominio tirosina cinasa en la región citoplasmática. Dentro del dominio tirosina cinasa se encuentra el loop de activación compuesto por las tirosinas Y670, Y674 e Y675, en el receptor TrkA. Las otras dos tirosinas sirven como sitio de unión para distintas proteínas adaptadoras. En el receptor TrkB el loop de activación lo componen las Y702, Y706 y Y707 (en humano, en ratón y rata son Y701, Y705 y Y706), y las otras dos principales son Y516 y Y817 (Y515 y Y816 en ratón y rata).

### Variantes de splicing

Los receptores Trk, como ya hemos comentado, son glicoproteínas de aproximadamente 140 kDa. Sin embargo existen diferentes isoformas de estos receptores producto de fenómenos de *splicing* alternativo. Para TrkA y TrkB se han descrito isoformas que contienen deleciones y/o inserciones en el dominio extracelular que limitan su capacidad de interacción con las neurotrofinas (Barker et al., 1993; Strohmaier et al., 1996). En el caso de TrkC también existen isoformas con inserciones en el dominio tirosina cinasa que impiden la propagación de la señalización (Lamballe et al., 1993).

Además también se producen variantes de TrkB y TrkC truncadas en la región citoplasmática. A estas variantes les falta el dominio tirosina cinasa y en su lugar solo tienen una corta cola intracelular. En el caso de TrkB, sus formas truncadas (designadas como TrkB.T1, TrkB.T2 y TrkB.shc) se expresan en altos niveles en el cerebro adulto (Middlemas et al., 1991; Stoilov et al., 2002). En general, su funcionalidad no está clara, aunque existen evidencias que indican que dichas formas truncadas ayudan a regular la expresión en la superficie del receptor entero y funcional. También se cree que atenúan la función de los receptores completos, uniendo y secuestrando sus agonistas, y formando heterodímeros inactivos con las formas funcionales del receptor (Biffo et al., 1995; Eide et al., 1996;

Haapasalo et al., 2001). Estudios recientes indican además que, estos receptores Trk truncados en la región citoplasmática, podrían activar por sí mismos determinadas cascadas de señalización específicas. Se ha descrito, por ejemplo, que la isoforma TrkB.T1 es capaz de regular la liberación de  $Ca^{2+}$  de reservorios internos en astrocitos (Rose et al., 2003). También la isoforma deficiente en el dominio cinasa de TrkC puede activar la vía de señalización Arf6-Rac en respuesta a NT-3 (Esteban et al., 2006).

### 3.2.2. Mecanismo de activación y proteínas adaptadoras

El primer paso en la activación de los receptores Trk es la unión de la neurotrofina al dominio extracelular, que da paso a la dimerización del receptor. Esta dimerización induce la actividad cinasa intrínseca del receptor, que conduce a una transfosforilación de una serie de residuos de tirosina presentes en el llamado *loop* de autofosforilación o *loop* de activación (Y670, Y674 y Y675 en TrkA, o los residuos correspondientes en TrkB y TrkC). La fosforilación de estas tirosinas provoca cambios estructurales en el receptor, que pasa a adquirir una conformación estable y funcionalmente activa, que permite el acceso de sustratos al centro activo del dominio cinasa. Esto conduce a una activación cinasa completa y a una autofosforilación de tirosinas fuera del *loop*, que permite la unión y activación de moléculas adaptadoras específicas (Friedman and Greene, 1999). Estas proteínas adaptadoras contienen un motivo PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) y/o un motivo SH2 (*Src Homology 2*), que les permiten interactuar con residuos de tirosina fosforilados. Finalmente, estas proteínas adaptadoras propagan la señal de activación a través de diversas vías de señalización intracelulares, principalmente la vía de Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la vía de PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*)/Akt, y la vía de PLC- $\gamma$  (*Phospholipase C gamma*).

Existen 10 residuos de tirosina en el dominio intracelular de los receptores Trk que pueden ser fosforilados, incluyendo las tres tirosinas del *loop* de activación. Los residuos Y490 y Y785 son las principales tirosinas fosforiladas implicadas en la propagación de la señalización a través de las diferentes vías. El residuo Y490 fosforilado interactúa con la proteína Shc o con la FRS2 (*fibroblast growth factor receptor substrate 2*) provocando la activación de las vías Ras/MAPK y PI-3K/Akt. La pY490 une a la proteína adaptadora Shc a través del dominio PTB de ésta, e induce su fosforilación y consecuente activación. La proteína Shc fosforilada interactúa a su vez con el complejo Grb2-SOS, que interviene en la activación de Ras. Esta misma pY490 es también capaz de unir y fosforilar a la proteína FRS2, que activa la vía Ras/MAPK reclutando un complejo formado por las proteínas SHP2, GRB2, SOS y Crk. Otra fosforilación importante se da en la Y785, situada en el extremo más C-terminal del receptor, ya fuera del dominio tirosina cinasa. En esta posición se recluta la PLC- $\gamma$  a través de su dominio SH2, promoviendo un efecto en la plasticidad sináptica (Bibel and Barde, 2000; Huang and Reichardt, 2003). Los otros cinco residuos de tirosina fosforilados en el dominio citoplasmático contribuyen también en la señalización, pero los detalles no son del todo conocidos. Se ha descrito que la mutación de al menos tres de estos cinco residuos provoca una inhibición del crecimiento neurítico promovido por NGF en células PC12 (Inagaki et al., 1995).

También diversas proteínas adaptadoras con dominios SH2 se unen a las tirosinas fosforiladas del *loop* de activación del dominio cinasa. Las proteínas rAPS y SH2-B forman dímeros tras la activación

de Trk, se unen a Grb2 y promueven la activación de la vía Ras/ERK a través de SOS, y la activación de la vía PI3K a través de Gab (Qian et al., 1998).

Aunque la mayor parte de los estudios se centren en las vías de señalización controladas por Shc, Frs2 y PLC- $\gamma$ 1, existen algunas otras proteínas adaptadoras y complejos de señalización que interactúan con los receptores Trk activados. Algunas de estas proteínas dependen del transporte de los receptores a otros compartimentos membranosos intracelulares.

### 3.2.3. Mecanismos de transactivación de los receptores Trk

A parte de la activación a través de la vía clásica de unión a su neurotrofina correspondiente, los receptores Trk pueden ser activados también como resultado de una transactivación mediada por otros sistemas de receptores. Se ha descrito que los receptores Trk pueden ser activados por los receptores acoplados a proteína G (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs). El tratamiento con adenosina, un conocido neuroregulador que actúa a través de los GPCRs, provoca la autofosforilación y activación de los receptores Trk, en ausencia de neurotrofinas (Lee et al., 2001, 2002). También el tratamiento con PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*), otro neuropéptido que interactúa con los GPCRs, es capaz de transactivar los Trk. Esta transactivación a través de GPCRs provoca una activación preferencial de la vía de PI3K/Akt frente a la vía Ras/MAPK, y resulta en un efecto de supervivencia celular. Además esta transactivación sigue unas cinéticas más lentas que las observadas para la interacción directa con neurotrofinas. Como punto en común entre los receptores GPCR y Trk, se ha descrito que TrkA puede asociarse a la proteína GAIP, la cual contiene un dominio regulador de señalización de proteína G (Lou et al., 2001).

Además los fenómenos de transactivación pueden darse también en sentido contrario, de forma que los receptores Trk pueden provocar la activación de otros receptores de membrana aparentemente no relacionados, como es el caso del receptor Ret. Este receptor Ret es del tipo tirosina cinasa y se activa al unirse a sus agonistas de la familia del GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*). Se ha descrito como el NGF produce una activación de Ret independiente de la interacción del receptor con GDNF (Tsui-Pierchala et al., 2002). Además del Ret, se ha descrito que en neuronas hipocámpales la activación de TrkB por BDNF provoca la fosforilación y activación de la subunidad NR2B del receptor NMDA (Levine et al., 1998). También se ha descrito que los receptores Trk son capaces de transactivar canales iónicos. La expresión del canal iónico TRPV1 se encuentra incrementada tras el tratamiento con NGF (Zhang et al., 2005).

Por otro lado existen otros mecanismos por los que los receptores Trk pueden ser también activados. Por ejemplo, elevados niveles de sobreexpresión de receptores Trk provocan la autofosforilación de éstos en ausencia de neurotrofinas. También algunos glicolípidos, como el gangliósido GM1 (Mutoh et al., 1998; Duchemin et al., 2002, 2008; Rabin et al., 2002) y la ceramida (MacPhee and Barker, 1999), pueden provocar autofosforilación y señalización de Trk, como si mimetizaran la acción de las neurotrofinas.

### 3.2.4. Vías de señalización activadas por los receptores Trk

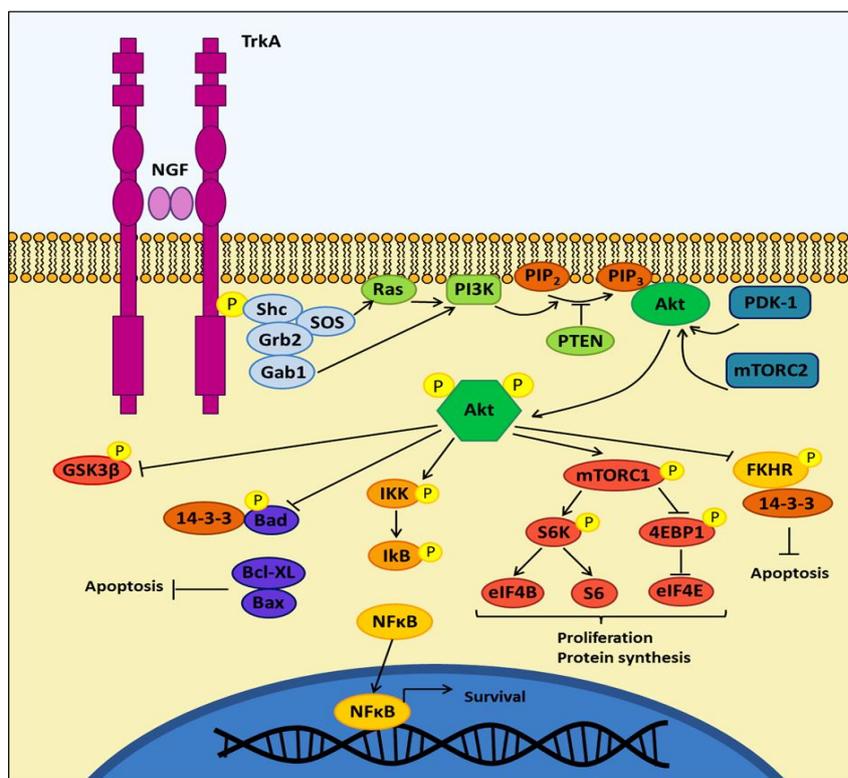
Las principales vías de señalización activadas por los receptores Trk son la vía de PI3K/Akt, la vía de Ras/MAPK y la vía de PLC- $\gamma$  (Reichardt, 2006). Estas vías controlan diferentes procesos celulares tan importantes como el crecimiento, la diferenciación neuronal y la supervivencia, entre otros, por lo cual los mecanismos de regulación tanto positiva como negativa de estas vías son muy importantes. Además la endocitosis y el transporte de los receptores Trk a diferentes compartimentos dentro de la célula controlan la eficiencia y la duración de la señalización desencadenada.

#### Vía de señalización de PI3K/Akt

La vía de señalización de la PI3K/Akt está implicada en múltiples procesos celulares como la supervivencia, el crecimiento celular, la migración, la plasticidad sináptica y el metabolismo entre otros. La PI3K puede ser activada a través de vías dependientes o independientes de Ras. En la mayoría de neuronas PI3K es directamente activada por Ras promoviendo así la supervivencia celular. En la vía independiente de Ras, la proteína Shc se une a los residuos de pY490 de los receptores Trk, donde se fosforila y activa, reclutando así a las proteínas Grb2 y Gab1 (*Grb2-associated binder-1*). A su vez, la proteína Gab1 fosforilada es capaz de reclutar y activar a PI3K. La PI3K activa se localiza cerca de la membrana plasmática, donde fosforila PIP<sub>2</sub> generando PIP<sub>3</sub>, el cual es capaz de unir y reclutar en la membrana proteínas que contengan dominios PH (*pleckstrin homology*). De esta manera el siguiente paso en la vía es la unión de PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) a PIP<sub>3</sub>, activándose y fosforilando a la proteína Akt en el residuo T308, también translocada a membrana a través de su dominio PH. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en Akt que deja accesible un segundo sitio de fosforilación en la S473, que en este caso será fosforilada por mTORC2 (complejo rictor/mTOR). Esta doble fosforilación conduce a la activación total de la actividad serina/treonina cinasa de Akt, que es capaz de fosforilar a una gran diversidad de sustratos, algunos comentados a continuación.

Por un lado, Akt activa a la proteína mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), lo que resulta en un incremento de la síntesis proteica, así como de la supervivencia celular a través de la fosforilación de varios efectores de mTORC1, como S6K (*ribosomal S6 kinase*) y 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein 1*) (Patapoutian and Reichardt, 2001). Akt también controla la actividad de varias proteínas implicadas en la vía de las caspasas, una de las cuales es Bad. Bad es un miembro de la familia de Bcl-2 que promueve la apoptosis a través de su interacción con Bcl-XL, impidiendo así que ésta pueda inhibir a la proteína pro-apoptótica Bax (Datta et al., 1997). La fosforilación de Bad provoca que ésta se una a la proteína 14-3-3, impidiendo así que desarrolle su función pro-apoptótica. Otro de los procesos en los que está involucrada Akt es la regulación de diversos factores de transcripción. Mediante la fosforilación de FKHR (*forkhead transcription factor*) provoca su unión al complejo 14-3-3, que la secuestra en el citoplasma impidiendo así la transcripción de genes implicados en la apoptosis (Brunet et al., 2001). Otro de los sustratos de Akt implicado en la supervivencia celular es GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3- $\beta$* ). La fosforilación de GSK3 $\beta$  mediada por Akt provoca su inactivación e impide su efecto pro-apoptótico (Hetman et al., 2000). También la señalización a través de NF $\kappa$ B se ve afectada por Akt. El NF $\kappa$ B promueve la transcripción de genes implicados en la supervivencia neuronal cuando no se encuentra unido a su inhibidor I $\kappa$ B. La fosforilación de I $\kappa$ B

mediada por Akt promueve su degradación. También otras dianas de PI3K, como Cdc42-Rac-Rho, son capaces de promover el crecimiento axonal y la diferenciación neuronal mediante la regulación de la organización del citoesqueleto de F-actina (Yuan et al., 2003).



**Figura 16. Cascada de señalización de PI3K/Akt.**

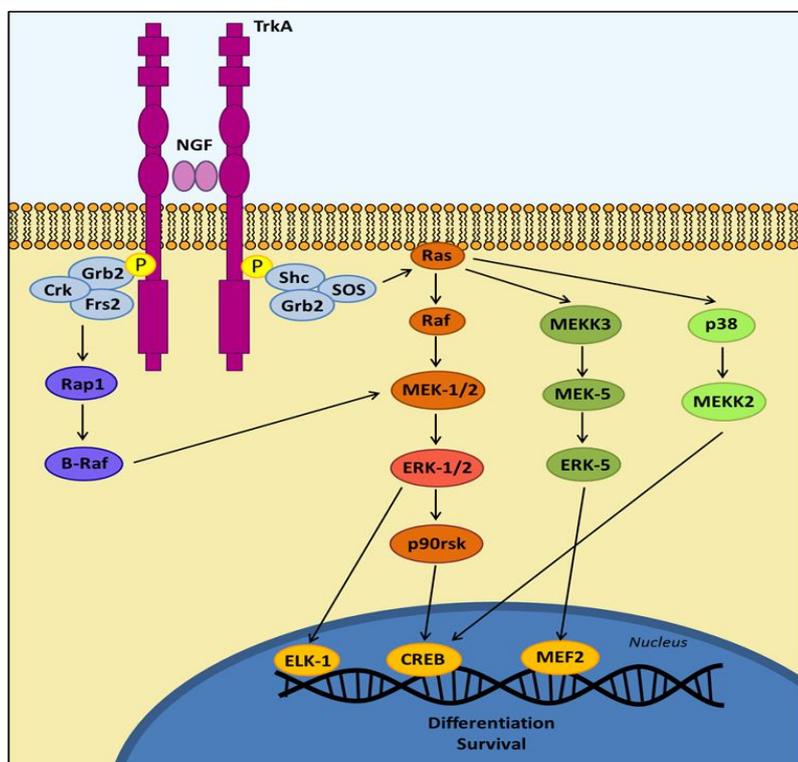
El NGF se une al receptor TrkA induciendo su dimerización y la autofosforilación en tirosinas del dominio intracelular. La Y490 recluta a un conjunto de proteínas adaptadoras que activan a Ras y ésta a la PI3K. PI3K fosforila PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> permitiendo la unión a membrana de Akt, donde será fosforilada por PDK-1 y mTORC2. Akt fosforila múltiples sustratos en la célula, entre ellos Bad, GSK3β y FKHR, inhibiendo así la apoptosis. También permite la activación de NFκB y mTORC1 que conducen a la expresión de genes involucrados en la supervivencia y a la proliferación celular y la síntesis proteica.

### Vía de señalización de Ras/MAPK

La activación de la cascada de señalización Ras/MAPK es esencial para la diferenciación neuronal, así como para la supervivencia de muchas subpoblaciones neuronales. La fosforilación de la Y490 de TrkA (y de los residuos homólogos en TrkB y TrkC) posibilita la unión de la proteína adaptadoras Shc, que a su vez recluta el complejo Grb2-SOS (*son of sevenless*). La translocación de este complejo a la parte interna de la membrana plasmática propicia la activación de Ras, iniciando así la estimulación de diversas vías de señalización que incluyen las mediadas por PI3K, Raf y p38MAPK (Huang and Reichardt, 2003).

El primer paso en la vía mediada por Raf, es la fosforilación de MEK-1 y/o MEK-2. A su vez, MEK-1 y MEK-2 activan a ERK-1 y ERK-2 fosforilándolas. La estimulación de Ras por esta vía promueve una activación de ERK transitoria, que es finalizada por la fosforilación de SOS mediada por ERK y Rsk, que resulta en una disociación del complejo Grb2-SOS (Kao et al., 2001).

Una activación más prolongada de ERK depende de una vía de señalización diferente, en la que está involucrada la proteína adaptadora Frs2 (*fibroblast growth factor receptor substrate-2*). Esta proteína se une al pY490 activándose y reclutando a Grb2 y Crk, que activan a Rap1 y ésta a su vez estimula a B-Raf, que acaba iniciando la cascada de las ERK. Ras también media la activación de la p38MAPK, a través de la activación secuencial de Ra1-GTP, Ra1 y Scr (Huang and Reichardt, 2003). La p38 MAPK a su vez activa a MEKK2 (*MAP kinase-activated protein kinase-2*). También Ras desencadena la activación de ERK-5 a través de la activación de MEKK3 y MEK5 (Watson et al., 2001).



**Figura 17. Cascada de señalización de Ras/MAPK.**

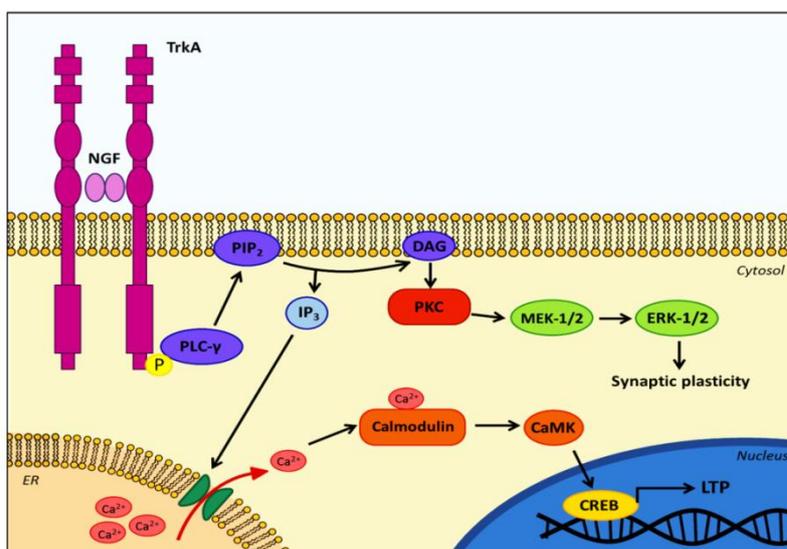
La unión de la neurotrofina al receptor Trk provoca su activación y autofosforilación en tirosinas. La Y490 fosforilada sirve de anclaje a diversas proteínas adaptadoras que activan a Ras. Ras a su vez activa a diferentes MAPK como ERK-1/2, ERK-5 y p38. Estas cinasas fosforilan distintos sustratos dentro de la célula que conducen a la transcripción de genes implicados en la diferenciación y en a supervivencia.

Las diversas cascadas de las MAPK mencionadas tienen elementos solapantes así como otras dianas específicas dentro de la célula. ERK-1/2 y ERK-5 fosforilan y activan a diversos miembros de la familia de proteínas cinasa Rsk (*ribosomal S6 kinases*). Las Rsk y MEKK2 fosforilan factores de transcripción como CREB (*cAMP-response element-binding protein*), que activa genes implicados en la

diferenciación y la supervivencia (Huang and Reichardt, 2003). Además de estas dianas compartidas, las diferentes cascadas de las MAPK también tienen diferentes factores de transcripción específicos como dianas. Por ejemplo ERK-5 activa a MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Marinissen et al., 1999), mientras que ERK-1/2 activa a ELK-1 (Gille et al., 1992).

### Vía de señalización de PLC- $\gamma$ /PKC

La cascada de señalización iniciada por PLC- $\gamma$  (*phospholipase C- $\gamma$* ) se encuentra implicada en procesos de modulación de la transmisión sináptica y de potenciación a largo plazo (Minichiello et al., 2002). Como ya se ha comentado, PLC- $\gamma$  se une a la pY785 (en TrkA y en sitios análogos en TrkB y TrkC) y es activado mediante fosforilación. El PLC- $\gamma$  activo hidroliza a PIP<sub>2</sub> (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) para generar IP<sub>3</sub> (*inositol 1,4,5-trisphosphate*) y DAG (*diacylglycerol*). El IP<sub>3</sub> producido promueve la liberación de Ca<sup>2+</sup> de reservorios citoplasmáticos, mientras que el DAG estimula algunas isoformas de la PKC (*protein kinase C*). Estas dos moléculas generadas por la acción de PLC- $\gamma$  activan numerosas enzimas intracelulares, incluyendo todas las isoformas de la PKC, la CaMK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*), así como otras dianas reguladas por el complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (Skaper, 2008).



**Figura 18. Cascada de señalización de PLC- $\gamma$ /PKC.**

La cascada se inicia con la unión de la neurotrofina al receptor Trk, provocando su activación y autofosforilación en tirosinas. En la Y785 fosforilada se recluta la PLC- $\gamma$  a través de su dominio SH2. PLC- $\gamma$  procesa PIP<sub>2</sub> produciendo así DAG e IP<sub>3</sub>, lo cual conduce a la liberación de calcio de reservorios internos y a la activación de diversas isoformas de PKC, promoviendo la plasticidad sináptica.

### 3.3. El receptor p75<sup>NTR</sup>

El receptor p75<sup>NTR</sup> fue descrito por primera vez como un receptor de baja afinidad para el NGF, con una constante de disociación alrededor de  $10^{-11}$ M. Más adelante se ha descrito que este receptor también es capaz de unirse con afinidades similares a las demás neurotrofinas en diferentes tipos celulares (Rodríguez-Tebar et al., 1990; Squinto et al., 1991; Rodríguez-Tébar et al., 1992). Además el p75<sup>NTR</sup> es capaz de unir las formas precursoras de las neurotrofinas con una afinidad mayor que para sus formas procesadas (Roux and Barker, 2002). Además de las neurotrofinas se ha descrito que el p75<sup>NTR</sup> puede ser receptor también de varios virus de la rabia, con lo cual se ha discutido que podría tener un papel importante en la entrada del virus en la célula (Tuffereau et al., 1998).

Es ampliamente expresado en el sistema nervioso central y periférico en desarrollo durante el período de la sinaptogénesis y de muerte celular. En el cerebro adulto sin embargo su expresión se encuentra *down*-regulada, mientras que vuelve a promoverse su expresión después de una lesión o daño. Una vez expresado, el p75<sup>NTR</sup> puede ser dirigido dentro de la célula a las membranas axonales a través de la glicosilación, o a dominios de *lipid rafts* en la membrana plasmática a través de la palmitoilación. En este último caso, esta modificación post-traducciona puede facilitar la endocitosis, el transporte vesicular, y/o transducción de la señal endosomal del p75<sup>NTR</sup>, regulando de este modo la capacidad del receptor para activar sus diferentes segundos mensajeros (Underwood and Coulson, 2008).

El receptor p75<sup>NTR</sup> pertenece a la familia de receptores TNFR (*tumor necrosis factor receptors*), al igual que otros receptores como el TNFR1 y el TNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 1* y *2*, respectivamente), Fas, RANK y CD40 (Baker and Reddy, 1998). Todos los miembros de esta familia de receptores contienen regiones ricas en cisteínas en sus dominios extracelulares.

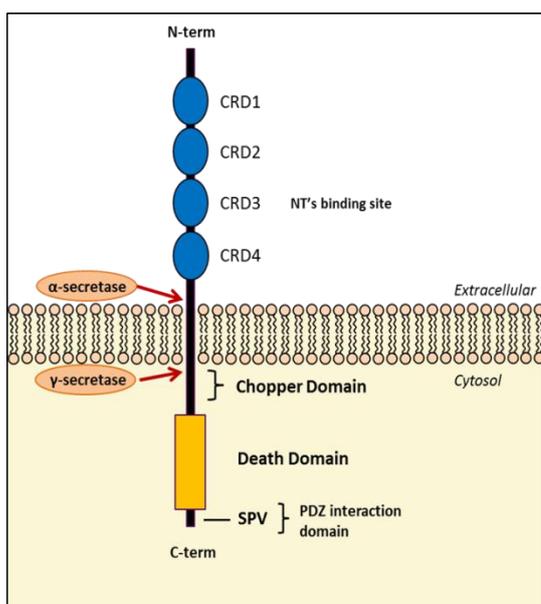
Es capaz de interactuar con diversos receptores en la membrana, y dependiendo del tipo de interacciones que establezca activará determinadas vías de señalización. La señalización a través de p75<sup>NTR</sup> es compleja debido a las muchas cascadas que pueden iniciarse a través de este receptor. Además diferentes procesos pueden afectar o estar contribuyendo a dirigir la señal hacia una determinada cascada: la formación de diferentes tipos de complejos heterodiméricos de receptores, la activación por neurotrofinas maduras o por pro-neurotrofinas, el procesamiento proteolítico del receptor tras su activación, y la transactivación y el transporte intracelular del receptor.

#### 3.3.1. Estructura molecular

El receptor p75<sup>NTR</sup> es una proteína transmembrana de tipo I, con un peso molecular de unos 75 kDa (unos 399 aminoácidos). El dominio extracelular contiene, empezando desde el extremo N-terminal, un péptido señal de 28 aminoácidos que es procesado. Este péptido señal viene seguido de cuatro repeticiones de módulos de seis cisteínas, un rasgo característico de los miembros de la familia de receptores TNFR. Cada uno de estas regiones ricas en cisteínas, designadas como CRD1-CRD4 (*Cysteine Rich Domain 1-4*), contienen tres puentes disulfuro intracatenarios que conforman la estructura alargada del receptor. La región CRD3 se ha considerado la principal responsable de la unión a las neurotrofinas (Yan and Chao, 1991; Chapman and Kuntz, 1995; Shamovsky et al., 1999). En

otros miembros de la familia TNFR el CDR1 está implicado en la trimerización de estos receptores independiente de ligando, pero este rol no ha sido descrito en p75<sup>NTR</sup>. El dominio extracelular contiene también un único sitio de glicosilación ligado a asparagina (-NH<sub>2</sub>) y varios ligados a grupos hidroxilo (-OH).

En la región intracelular de p75<sup>NTR</sup> se encuentra el dominio *Chopper*, compuesto por 29 aminoácidos situados en la zona yuxtamembrana, que se ha descrito que es capaz de inducir la muerte celular. También en esta región intracelular se encuentra el llamado dominio de muerte (DD, *Death Domain*), una región de unos 80 aminoácidos que inicialmente fue identificada en otros miembros de los TNFR pro-apoptóticos como un dominio implicado en la activación de las caspasas (Liepinsh et al., 1997). Existen dos tipos diferentes de dominios de muerte en los receptores TNFR según su estructura, por un lado están los clasificados como tipo I (presentes por ejemplo en TNFR1 y Fas) y por otro los de tipo II (presentes en p75<sup>NTR</sup> y la DAP cinasa). A diferencia de los del tipo I, el DD de p75<sup>NTR</sup> no tiene tendencia a autoagregarse y por lo tanto no puede interactuar con las mismas proteínas que los receptores con DD tipo I, ni de iniciar las mismas cascadas de señalización que éstos (Barrett, 2000; Roux and Barker, 2002). En el extremo C-terminal del dominio citosólico presenta un tripéptido SPV conservado, que es una secuencia consenso de unión a dominios PDZ. Las proteínas que contienen este tipo de dominio PDZ son típicamente proteínas adaptadoras que permiten el ensamblaje de diversos complejos de señalización. Además, la parte intracelular está palmitoilada en la C279 (Barker et al., 1994), y fosforilada en residuos de serina y treonina (Taniuchi et al., 1986). Se especula que estas modificaciones post-traduccionales pueden tener un papel en las interacciones proteína-proteína, en el correcto plegamiento del receptor, o bien en su localización celular. El p75<sup>NTR</sup>, al igual que el resto de miembros de los TNFR, no posee una capacidad catalítica intrínseca, por lo cual la señalización ocurre a través de la asociación con diversas proteínas adaptadoras citoplasmáticas.



**Figura 19. Estructura del receptor p75<sup>NTR</sup>.**

La región extracelular se compone de cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD1-4), de los cuales el CRD3 es donde se unen las neurotrofinas. A continuación se encuentra la región transmembrana, seguida de una región yuxtamembrana designada como *chopper domain*. En la parte intracelular se encuentra el dominio de muerte (*death domain*) y, en el extremo C-terminal, se sitúa el tripéptido SPV, una secuencia consenso de unión a dominios PDZ. Diversas proteínas adaptadoras se unen a la parte intracelular iniciando varias cascadas de señalización. El p75<sup>NTR</sup> puede ser proteolizado en su región extracelular por la  $\alpha$ -secretasa, y en la cara citosólica por la  $\gamma$ -secretasa, liberando así en el citosol el dominio intracelular (ICD).

En la superficie celular el p75<sup>NTR</sup> puede formar un homodímero a través de la región transmembrana y une las neurotrofinas en una relación 2:2, formando un complejo receptor-ligando simétrico. Sin embargo también han sido descritas formas asimétricas con un solo receptor unido a dos ligandos (Skeldal et al., 2011).

### **Isoformas y procesamiento de p75<sup>NTR</sup>**

Existe una isoforma truncada de p75<sup>NTR</sup>, designada como s-p75<sup>NTR</sup>, producida por fenómenos de *splicing* alternativo. Esta proteína posee los dominios transmembrana e intracelulares intactos, pero le falta el dominio extracelular, por lo que es incapaz de unir neurotrofinas. Sin embargo, aun sin el dominio de unión a neurotrofinas, parece que esta isoforma sigue siendo capaz de iniciar ciertas vías de señalización (Nykjaer et al., 2005).

Por otro lado, el receptor p75<sup>NTR</sup> se ve afectado también por fenómenos de proteólisis, en un proceso conocido como *shedding* (desprendimiento) (DiStefano et al., 1993). Puede ser procesado extracelularmente por la  $\alpha$ -secretasa ADAM17/TACE (*ADAM metallopeptidase domain 17/Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*). Esta proteólisis genera un dominio extracelular soluble y capaz de unir neurotrofinas, y un fragmento C-terminal restante intracelular. Este fragmento que permanece en la membrana después del corte, puede ser posteriormente procesado dentro del dominio de transmembrana por la presenilina, un co-factor en el complejo  $\gamma$ -secretasa, produciendo un fragmento intracelular soluble (ICD, *intracellular domain*). Este proceso puede ser regulado por los niveles de colesterol celular y por la palmitoilación. La función biológica de este fenómeno de proteólisis no es del todo bien conocida. Se ha descrito que la forma soluble extracelular se produce en altos niveles durante el desarrollo y tras un daño nervioso periférico (Zupan et al., 1989; DiStefano et al., 1991). También se sabe que los dominios generados en este procesamiento pueden activar diferentes segundos mensajeros, lo cual explica en parte la diversidad de funciones mediadas por p75<sup>NTR</sup> (Skeldal et al., 2011).

### **3.3.2. Interacción con otras proteínas transmembrana**

La señalización mediada por p75<sup>NTR</sup> es muy compleja y quedan aún muchos aspectos desconocidos, por lo cual está en continuo estudio. Tal y como ya se ha comentado, el p75<sup>NTR</sup> no posee actividad catalítica intrínseca por lo que requiere de la interacción con diversas proteínas de membrana o de proteínas adaptadoras citoplasmáticas para propagar su activación. Primeramente nos centraremos en los co-receptores de membrana con los que se ha descrito que interacciona p75<sup>NTR</sup>. Los receptores de neurotrofinas pueden actuar como homodímeros o como heterodímeros, y esto determinará el tipo de respuesta que desencadene la neurotrofina en unirse. Diferentes combinaciones de ligandos y co-receptores darán lugar a diferentes respuestas, aunque también tiene una gran importancia el nivel de expresión de estos receptores en la célula para acabar de determinar qué vías de señalización serán activadas finalmente. Los principales co-receptores descritos para p75<sup>NTR</sup> son: los receptores Trk (A, B y C), la sortilina y el receptor Nogo. A continuación se describirá cada uno de ellos con más detalle.

### **Sortilina**

La sortilina es el co-receptor de p75<sup>NTR</sup> mejor estudiado. Las pro-neurotrofinas se unen con alta afinidad al heterodímero formado por la sortilina y p75<sup>NTR</sup>, y desencadenan la activación de las vías apoptóticas a través del factor de transcripción JNK-3 y la activación de c-Jun (Lee et al., 2001). La sortilina es una proteína de membrana implicada en el tráfico de vesículas endocíticas, que se encuentra mayoritariamente asociada a la red trans-Golgi y a vesículas endocíticas de la zona perinuclear. Tan solo la pequeña porción de sortilina que es expresada en membrana colocaliza con p75<sup>NTR</sup>. Por esta razón se ha sugerido que la sortilina podría actuar regulando el *shedding*, y de esta manera la señalización derivada de p75<sup>NTR</sup>, interviniendo en procesos como el reciclaje del p75<sup>NTR</sup> en membrana, el direccionamiento de éste a lisosomas, o el transporte retrógrado del p75<sup>NTR</sup>.

### **NogoR/Lingo-1**

La interacción entre p75<sup>NTR</sup>, el receptor Nogo (NogoR) y la proteína transmembrana LINGO-1 es importante para el control del crecimiento neuronal. Las proteínas inhibitoras asociadas a mielina como Nogo-66, MAG (*myelin associated glycoprotein*) y OMgp (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*) se unen al complejo NogoR/LINGO-1/p75<sup>NTR</sup> y suprimen el crecimiento y la regeneración axonal. Al unirse estos ligandos al complejo de receptores, modulan la activación de la proteína RhoA, un regulador intracelular del citoesqueleto que al activarse inhibe la elongación axonal (Yamashita et al., 1999; Mi et al., 2004).

### **Receptores Trk**

El receptor p75<sup>NTR</sup> y los receptores Trk pueden funcionar de manera sinérgica, antagonística o independiente el uno del otro, en diferentes tipos celulares. Por separado, el p75<sup>NTR</sup> y los Trk interactúan con las formas maduras de las neurotrofinas con una afinidad similar ( $K_d \sim 10^{-9}$  M) (Rodríguez-Tebar et al., 1990; Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991; Squinto et al., 1991; Rodríguez-Tébar et al., 1992). Sin embargo, la co-expresión de p75<sup>NTR</sup> y TrkA provoca la formación de complejos heterodiméricos con sitios de unión de alta afinidad para NGF ( $K_d \sim 10^{-12}$  M) (Mahadeo et al., 1994). De esta manera, el p75<sup>NTR</sup> es capaz de interactuar con los tres tipos de receptores Trk a través de sus dominios citosólico y transmembrana, formando complejos multiproteicos (Esposito et al., 2001). En esta interacción, el p75<sup>NTR</sup> asume el papel de co-receptor que refina la afinidad y especificidad de los receptores Trk por las diferentes neurotrofinas. Por ejemplo, p75<sup>NTR</sup> incrementa la afinidad de TrkA por NGF a la vez que restringe su interacción con NT-3, lo que provoca un cambio en la señalización promovida por el receptor (Nykjaer et al., 2005). Además el p75<sup>NTR</sup> provoca un aumento de la señalización pro-supervivencia promovida por los Trk. El p75<sup>NTR</sup> puede unir Shc, estimulando su fosforilación y activación, e incrementando así la activación de las cascadas de señalización iniciadas por los Trk. La proteína transmembrana ARMS (*ankyrin-rich membrane spanning protein*) es capaz de interactuar tanto con p75<sup>NTR</sup> como con TrkA, y que juega un papel importante en la regulación de la señalización promovida por los receptores (Kong et al., 2001; Arévalo et al., 2004, 2006).

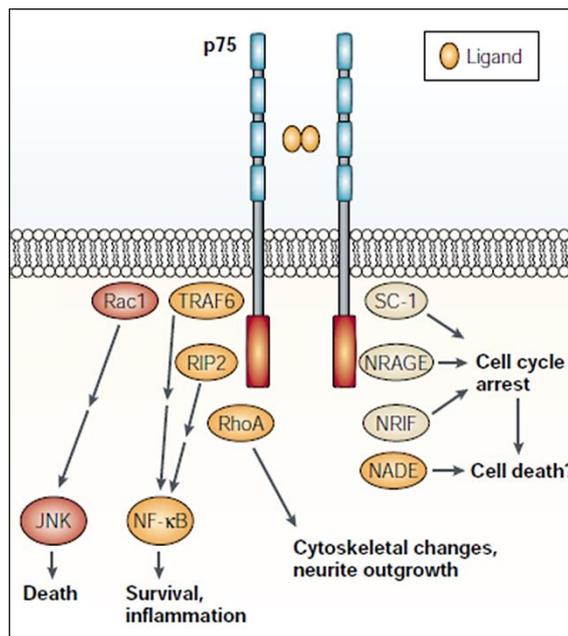
La interacción entre p75<sup>NTR</sup> y los Trk no es unidireccional y de la misma manera que p75<sup>NTR</sup> interfiere en la afinidad y la actividad de los Trk, éstos también son capaces de modular la señalización de

p75<sup>NTR</sup>. La señalización pro-supervivencia promovida por TrkA silencia la cascada apoptótica iniciada por p75<sup>NTR</sup>, mientras que no afecta a otras como la vía de NF-κB (Yoon et al., 1998; Salehi et al., 2000). El mecanismo por el cual sucede esto no está del todo claro, pero se sabe que la actividad esfingomielinasa promovida por la activación de p75<sup>NTR</sup> y la consecuente producción de ceramida se ven bloqueadas por la acción de TrkA, probablemente a través de PI3K (Dobrowsky et al., 1994, 1995; Bilderback et al., 2001). También la asociación de p75<sup>NTR</sup> con diferentes proteínas citoplasmáticas se ve modificada en la formación de los complejos de co-receptores.

### 3.3.3. Vías de señalización activadas y proteínas adaptadoras

Dependiendo del tipo neuronal y del contexto celular, el receptor p75<sup>NTR</sup> puede activar diversas vías de señalización con diferentes efectos, que pueden ser incluso opuestos entre ellos. El dominio intracelular de p75<sup>NTR</sup> no posee una actividad catalítica intrínseca, por lo cual requiere de la interacción con diversas proteínas de membrana o adaptadoras que propaguen la señal. Se ha descrito una gran variedad de proteínas adaptadoras que permiten modular las diversas vías de señalización activadas por el receptor, sin embargo el mecanismo por el cual actúan muchas de ellas no está del todo elucidado. De esta manera, dependiendo de con qué co-receptores esté interaccionando el p75<sup>NTR</sup> y de la localización subcelular del receptor en el momento de recibir la señal, éste será capaz de interaccionar con unas determinadas proteínas adaptadoras que conducirán a la activación de unas vías de señalización u otras. En general la unión de las neurotrofinas al p75<sup>NTR</sup> conduce a la activación de tres vías principales, dependiendo del contexto celular: la vía de NF-κB que conduce a un efecto en la supervivencia celular, la vía de JNK (*c-Jun kinase*) que desemboca en un efecto apoptótico, y finalmente la vía de la esfingomielinasa y la ceramida. Ésta última será comentada más adelante con más detalle.

La función mejor caracterizada de p75<sup>NTR</sup> es su papel en la activación de las vías de muerte celular. Esta función es ejercida al interaccionar con las neurotrofinas de forma independiente de los receptores Trk. En esta vía de señalización apoptótica, p75<sup>NTR</sup> activa a JNK3 (*c-Jun kinase 3*) mediante una proteína adaptadora. Algunas de las proteínas adaptadoras de p75<sup>NTR</sup> capaces de activar JNK son: NRIF (*neurotrophin-receptor interacting factor*), NADE (*p75<sup>NTR</sup>-associated Death Executor*), NRAGE (*neurotrophin receptor interacting MAGE homolog*) y las TRAFs (*tumour necrosis factor receptor-associated factors*). La proteína JNK3 activada regula positivamente a la α-secretasa TACE/ADAM17, lo que provoca un incremento de la proteólisis de p75<sup>NTR</sup> y la liberación de su dominio intracelular (ICD). Este fragmento ICD liberado en el citosol se asocia con NRIF, que con la colaboración de TRAF, es translocado al núcleo donde supuestamente promueve la transcripción de genes pro-apoptóticos (Gentry et al., 2004; Kenchappa et al., 2006, 2010). Además p75<sup>NTR</sup> puede interaccionar también con NRAGE provocando la activación de JNK y la fosforilación de c-jun, así como la activación de p53 y de las proteínas pro-apoptóticas Bad y Bim. Esto conduce a la translocación de Bax y a la liberación de citocromo c desde la mitocondria, seguida de la activación de las caspasas 9, 6 y 3 (Nykjaer et al., 2005).



**Figura 20. Vías de señalización iniciadas por p75<sup>NTR</sup>.**

Las principales vías inducidas por el receptor p75<sup>NTR</sup> son las que desencadenan la activación de NF-κB, JNK y RhoA. Estas respuestas están mediadas por diversas proteínas adaptadoras que se unen a la región citosólica del receptor, y que tienen efectos en la apoptosis, la supervivencia, la elongación neurítica y el arresto del crecimiento. Adaptado de Chao, 2003.

La proteólisis de p75<sup>NTR</sup> por la acción de la α-secretasa impide la señalización mediada por ligando, pero el fragmento carboxilo-terminal que permanece unido a la membrana sigue siendo capaz de interactuar con los receptores Trk o incluso de iniciar una cascada de señalización por sí solo. El dominio intracelular liberado al citosol después de la acción de la γ-secretasa, es capaz de translocarse al núcleo donde se ha especulado podría funcionar como factor de transcripción. Este fragmento ICD puede asociarse a TRAF6 y desencadenar la activación de NF-κB, que es un factor de transcripción que promueve la transcripción de genes implicados en la supervivencia celular (Carter et al., 1996; Khursigara et al., 2001). Varias de las proteínas adaptadoras que se pueden unir al ICD de p75<sup>NTR</sup> podrían estar implicadas en procesos de regulación transcripcional. Algunas de estas proteínas son NRAGE, NADE, TRAF, así como NRIF y SC-1 de las que se ha descrito que se localizan en núcleo después de un estímulo con NGF.

Proteínas adaptadoras	Región de p75 <sup>NTR</sup>	Vía de señalización	Referencias
Neurotrophin receptor-interacting factor (NRIF)	YM y DD aa 244-396	Apoptosis, bloqueo del ciclo celular	(Casademunt et al., 1999)
Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE)	YM aa 250-330	Apoptosis, bloqueo del ciclo celular	(Salehi et al., 2000)
p75 <sup>NTR</sup> -associated death executor (NADE)	DD aa 338-396	Apoptosis	(Mukai et al., 2000)

Schwann cell factor-1 (SC-1)	YM aa 250-322	Bloqueo del ciclo celular	(Chittka and Chao, 1999)
RhoA	DD aa 331-416	Elongación neurítica	(Yamashita et al., 1999)
Fas-associated phosphatase-1(FAP-1)	SPV aa 396	Supervivencia, activación NF-kB	(Irie et al., 1999)
Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4)	YM aa 245-313	Apoptosis, supervivencia, activación NF-kB	(Krajewska et al., 1998; Ye et al., 1999a, 1999b)
Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)	YM aa 268-283	Apoptosis, supervivencia, activación NF-kB	(Khursigara et al., 1999; Ye et al., 1999a, 1999b)
Receptor-interacting protein 2 (RIP2)	DD	Supervivencia, activación NF-kB	(Khursigara et al., 2001)

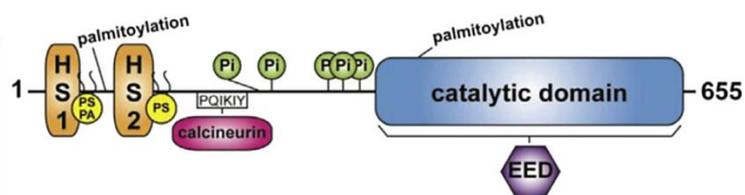
**Tabla 2. Proteínas adaptadoras de p75<sup>NTR</sup>.**

En la primera columna se muestran algunas de las proteínas adaptadoras que se ha descrito interaccionan con p75<sup>NTR</sup>. En la segunda columna se detalla la zona dentro de p75<sup>NTR</sup> con la que interaccionan estas proteínas y en la tercera columna, las vías de señalización en las que están implicadas. YM, dominio yuxtamembrana; DD, dominio de muerte; aa, aminoácidos. Tabla adaptada de Roux and Barker, 2002.

### 3.3.4. Actividad esfingomielinasa activada por p75<sup>NTR</sup>

Además de las vías comentadas hasta ahora, la activación del receptor p75<sup>NTR</sup> puede resultar también en la estimulación de las esfingomielinasas (SMasas). En ausencia de receptores Trk las neurotrofinas se unen al p75<sup>NTR</sup> e inducen la actividad SMasa. Sin embargo, cuando p75<sup>NTR</sup> y los receptores Trk están co-expresados, la activación de TrkA por NGF, inhibe la señalización de la SMasa a través de p75<sup>NTR</sup> (Dobrowsky et al., 1995; Bilderback et al., 2001).

Las esfingomielinasas son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de la esfingomielina presente en las membranas, dando lugar a ceramida y fosforilcolina. Dependiendo de la localización del receptor y del pH del entorno celular, éste puede activar distintos tipos de SMasas: la esfingomielinasa neutra (nSMasa), la esfingomielinasa ácida o la esfingomielinasa alcalina. La actividad de la nSMasa es óptima a pH neutro, es dependiente de magnesio, y es potenciada por ácidos grasos insaturados y fosfolípidos aniónicos (Marchesini et al., 2003). En mamífero se han descrito cuatro subtipos de nSMasa: la nSMasa1, la nSMasa2, la nSMasa3 y la MA-nSMasa (*mitochondrial-associated nSMase*). La nSMasa2 es la isoforma más estudiada y juega un papel importante en la producción de ceramida en respuesta a estrés celular, así como en procesos como el bloqueo del crecimiento celular, la formación de exosomas, la respuesta inflamatoria, e incluso la mineralización ósea. Cada isoforma está preferencialmente expresada en un compartimento celular concreto. La nSMasa2 se localiza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, en aparato de Golgi y en compartimentos de reciclaje (Wu et al., 2010).



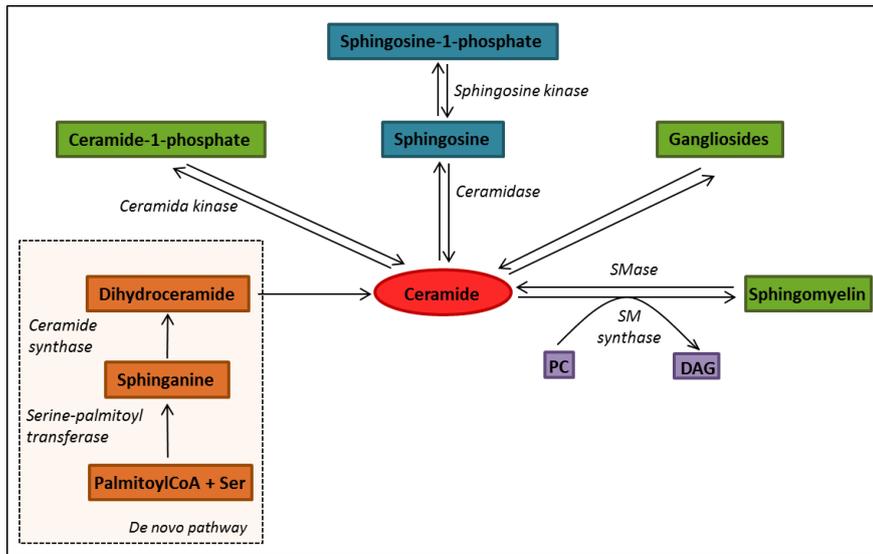
**Figura 21. Estructura y dominios de la nSMasa2.**

En el extremo N-terminal presenta dos segmentos hidrofóbicos (HS1 y HS2) con los cuales se asocia a la membrana, y el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico (azul). Están marcados los sitios de unión a fosfolípidos aniónicos (amarillo), los sitios de fosforilación (verde) y los sitios de palmitoilación. La calcineurina y EED son dos proteínas que interactúan con la nSMasa. Extraído de Shamseddine et al., 2015.

A nivel estructural, todas las nSMasas están formadas por un dominio N-terminal hidrofóbico anclado a membrana, y un dominio catalítico C-terminal (Airola and Hannun, 2013). La región que separa estos dos dominios está probablemente involucrada en la regulación de la actividad de la enzima, ya que contiene varios sitios de fosforilación en serina (Filosto et al., 2012) y un sitio de unión a calcineurina (Filosto et al., 2010). La calcineurina es una fosfatasa que interactúa con la nSMasa, funcionando como un regulador negativo de ésta a través de vías dependientes de p38MAPK y PKC (Clarke et al., 2007, 2008). El mecanismo exacto por el cual el p75<sup>NTR</sup> activa la nSMasa no es conocido aun, y no se sabe si se da mediante interacción directa o mediante otra proteína adaptadora. La activación de la nSMasa, en cambio, sí que está bien descrita en la respuesta celular a TNF y a otras citoquinas. En este caso el receptor de TNF se asocia con FAN (*factor associated with nSMase activation*) e interactúa con RACK1, que a su vez interactúa con EED (*embryonic ectodermal development*) y ésta con nSMasa2 (Shamseddine et al., 2015).

La ceramida generada por la acción nSMasa actúa como segundo mensajero lipídico en diversos procesos de señalización intracelulares, que pueden ser tan opuestos como la promoción de la supervivencia celular, el crecimiento y la diferenciación, o la apoptosis. La ceramida es capaz de activar diversas enzimas implicadas en la señalización celular en respuesta a estrés, aunque el mecanismo por el cual esto sucede aún no ha sido descubierto. Por un lado se ha descrito que activa a las proteínas cinasas SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinases*) como las JNKs (*jun kinases*), también a KSR (*Kinase Suppressor of Ras*) y a la isoforma atípica de la proteína cinasa c PKC-ζ. Por otra parte también activa a proteínas fosfatasas como PP1 (*protein phosphatase 1*) y PP2A (*protein phosphatase 2A*) (Ruvolo, 2003).

Los efectos de la ceramida en la célula son complejos y dependen de varios factores como su concentración y localización, así como las variaciones en su composición molecular y en la longitud de la cadena acílica. También se debe tener en cuenta la rápida conversión que puede sufrir esta ceramida dentro de la célula, dando lugar a otras moléculas como diacilglicerol (DAG), esfingosina o S1P (*sphingosine-1-phosphate*). Estas moléculas también pueden actuar como transductores de señal, a menudo con efectos completamente opuestos a los de la ceramida, y permiten a la célula adaptarse y responder a situaciones muy diversas (Horres and Hannun, 2012).



**Figura 22. Metabolismo de la ceramida y otras moléculas lipídicas derivadas.**

La ceramida puede ser obtenida por dos vías principales, por un lado sintetizada de novo a partir de palmitoilCoA y serina, o bien puede obtenerse de la hidrólisis de esfingomielina catalizada por la SMasa. Además puede ser rápidamente transformada en otros lípidos bioactivos como ceramida-1-fosfato (C1P) o esfingosina-1-fosfato (S1P). La transferencia de un grupo colina-fosfato de una fosfatidilcolina (PC) a una molécula de ceramida, por acción de la esfingomielina sintasa (SM synthase), resulta en la formación de esfingomielina y diacilglicerol (DAG). Adaptado de Horres and Hannun, 2012.

## **II. OBJETIVOS**



La TeNT es una de las neurotoxinas existentes más potentes, que actúa bloqueando la liberación de neurotransmisores inhibitorios y causando una parálisis espástica. Su extrema neuroespecificidad viene determinada por la interacción de su dominio carboxilo terminal (Hc-TeNT) con las membranas neuronales mediante un mecanismo de receptor dual. Primeramente se une a polisialogangliósidos y posteriormente a un receptor proteico específico aún desconocido, que permite su internalización en la neurona. Está descrito que la TeNT es transportada retroaxoalmente en endosomas de señalización siguiendo la misma ruta endocítica que las neurotrofinas y sus receptores. Además resultados previos de nuestro grupo indican que, tanto la TeNT como su dominio Hc-TeNT aislado, activan éstos receptores y las vías de señalización que de ellos se derivan, provocando así un efecto neuroprotector en algunas células. En base a todos estos datos nos planteamos la hipótesis de que los receptores de neurotrofinas pueden actuar como receptores proteicos de alta afinidad para la TeNT, permitiendo su endocitosis y su transporte hasta el SNC. Los objetivos concretos que se plantean son:

- Determinación de las regiones en Hc-TeNT y en los receptores Trk implicadas en la interacción entre ambas moléculas mediante modelaje molecular *in silico*.
- Demostración bioquímica de la unión de alta afinidad entre el fragmento recombinante Hc-TeNT y el receptor TrkB.
- Utilización de un péptido sintético basado en el dominio D5 extracelular de TrkB para bloquear la unión e internalización del Hc-TeNT.
- Determinar si el fragmento Hc-TeNT y TrkB localizan conjuntamente en las uniones neuromusculares y en las motoneuronas tras inyectar el fragmento intramuscularmente en ratones.
- Validación del modelo molecular mediante la mutación de ciertos residuos en la secuencia del Hc-TeNT, situados en la zona de interacción con TrkB, con la finalidad de disminuir la afinidad de éste fragmento por el receptor.
- Determinar la implicación tanto de los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> como de la esfingomielinasa neutra en las vías de señalización pro-supervivencia inducidas por las neurotrofinas y por el fragmento Hc-TeNT.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TOXINA TETÁNICA (HC-TeNT)

### 1.1. Expresión del fragmento Hc-TeNT

La secuencia nucleotídica codificante para Hc-TeNT (1398 pb) (Figura 23) se encuentra clonada entre las dianas *Bam*HI y *Pst*I del vector de expresión pQE3 (Qiagen), obteniendo así el plásmido pYN1-Hc (4808 pb). La proteína recombinante se encuentra bajo el control de un promotor T5 inducible por IPTG y contiene en el extremo C-terminal una cola de seis histidinas para facilitar su posterior purificación. De esta manera el fragmento Hc-TeNT recombinante, (correspondiente a los aminoácidos 864 al 1315 de la secuencia *wild type* de la TeNT) es expresado en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pYN1-Hc. Este fragmento proteico recombinante se utiliza en nuestro grupo como herramienta básica de estudio de la TeNT, ya que presenta las ventajas de ser atóxico y, al mismo tiempo, de conservar intacta la capacidad de unión a los terminales nerviosos y de transporte retroaxonal propia de la neurotoxina entera.

1	atgaaaaatctggattgttgggttgataatgaagaagatatagatggttatataaaaaag
	M K N L D C W V D N E E D I D V I L K K
61	agtacaattttaaatttagatattaataatgatattatatacagatatatctgggtttaat
	S T I L N L D I N N D I I S D I S G F N
121	tcatctgtaataacatatccagatgctcaattgggtgcccggaataaatggcaagcaata
	S S V I T Y P D A Q L V P G I N G K A I
181	catttagtaacaatgaaatcttctgaagttatagtcataaagctatggatattgaatat
	H L V N N E S S E V I V H K A M D I E Y
241	aatgatatgtttaataatttaccggttagcttttgggtgagggttcctaaagtatctgct
	N D M F N N F T V S F W L R V P K V S A
301	agtcatttagaacaatatggcacaatagatattcaataatagctctatgaaaaaacat
	S H L E Q Y G T N E Y S I I S S M K K H
361	agtcctacaataggatctgggttgagtgatcacttaaggtataacttaaataggact
	S L S I G S G W S V S L K G N N L I W T
421	ttaaaagattcccggggagaagttagacaaaataacttttagggatttacotgataaattt
	L K D S A G E V R Q I T F R D L P D K F
481	aatgcttatttagcaataaaatgggtttttataactattactaatgatagattatctct
	N A Y L A N K W V F I T I T N D R L S S
541	gctatttgtatataaatggagtaactttagggagtgagaaattactggtttaggagct
	A N L Y I N G V L M G S A E I T G L G A
601	attagagaggataataataaacattaaaactagatagatgtaataataataatcaatac
	I R E D N N I T L K L D R C N N N N Q Y
661	gtttctattgataaatttaggatattttgcaagcattaaatccaaaagagattgaaaaa
	V S I D K F R I F C K A L N P K E I E K
721	ttatacacaagttattatctataaccccttttaagagactctctggggaaccctttacga
	L Y T S Y L S I T F L R D F W G N P L R
781	tatgatacagaatatatttaataaccagtagcttcttagttctaaagatggtcaattgaaa
	Y D T E Y Y L I P V A S S S K D V Q L K
841	aatataacagattatattgataatggactaaacttattataaaaagatatacaccta
	N I T D Y M Y L T N A P S Y T N G K L N
901	atataattagaaggttatataatggactaaacttattataaaaagatatacaccta
	I Y Y R R L Y N G L K F I I K R Y T P N
961	aatgaaatagattcttttggtaaatcaggtgatttttaataattatgtatcatataac
	N E I D S F V K S G D F I K L Y V S Y N
1021	aaataatgagacacattgtaggttatccgaaagatggaaatgccttttaataatcttgataga
	N N E H I V G Y P K D G N A F N N L D R
1081	attctaaagtaggttataatgccccaggtatccctctttataaaaaatggagcagta
	I L R V G Y N A P G I P L Y K K M E A V
1141	aaattgctgtatttaaaaaccattctgtacaacttaaatatagatgataaaaatgca
	K L R D L K T Y S V Q L K L Y D D K N A
1201	tccttaggactagtaggtaccataatgggtcaaataggcaacgatccaaatagggtatata
	S L G L V G T H N G Q I G N D P N R D I
1261	ttaatgcaagcaactggtactttaatcatttaaaaagataaaaatttaggatgtgattgg
	L I A S N W Y F N H L K D K I L G C D W
1321	tactttgtacctacagatgaaggatggacaaatgatccgccaactcccggtcatcaccat
	Y F V P T D E G W T N D P P T P G H H H
1381	caccatcactaaatctaa
	H H H -

**Figura 23. Secuencia nucleotídica de Hc-TeNT clonada en pYN1 y traducción en aminoácidos.**

Los residuos marcados (Y266, K311, E343) son los que serán mutados y sustituidos por alaninas en la proteína mutada Hc-A266-311-343. La numeración de los aminoácidos corresponde a su posición dentro del fragmento Hc-TeNT, no a su posición en la toxina completa.

Para la expresión del Hc-TeNT, se inoculan en 1 L de medio LB (10 g/L Triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura) 6 mL del cultivo *E.coli* BL21 (DE3) crecido previamente durante la noche (*o/n*). El

medio de cultivo se complementa con 100 µg/mL de ampicilina, como método de selección para las bacterias portadoras del plásmido, y se incuba a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0,8 u.a (unidades de absorbancia) a 600 nm, se induce la expresión de Hc-TeNT con 0,4 mM de IPTG durante 4h a 37°C. Pasado este tiempo, el cultivo se centrifuga a 4000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento resultante se resuspende con 50 mL de tampón de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 8). Para lisar las células, la muestra es sonicada en 6 series de 1 min con 30s de pausa entre sí. Finalmente el extracto se centrifuga a 18000 x g durante 30 min a 4°C, se recupera el sobrenadante que contiene la proteína expresada, y se mantiene a 4°C hasta la etapa de purificación.

### 1.2. Purificación de Hc-TeNT del lisado celular

El Hc-TeNT recombinante, se purifica mediante una cromatografía de afinidad por iones de cobalto, los cuales interaccionan con la cola de histidinas que la proteína posee en su extremo C-terminal. Se emplea una columna empaquetada con la resina TALON Metal Affinity Resin (Clontech), acoplada a un sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*; Pharmacia Biotech). Se equilibra la resina con el *Tampón A* (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, pH 7) durante 30 min a un flujo de 1 mL/min y seguidamente se carga en la columna el lisado celular. Una vez ha pasado el lisado, se aplica *Tampón A* durante unos 30 min para eliminar las proteínas no unidas a la resina. El Hc-TeNT unido a la resina es eluido con el *Tampón B* (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7), que contiene una elevada concentración de imidazol para desplazar la unión de las histidinas al cobalto. Se recogen alícuotas de 0,5 mL durante todo el pico de elución y se analizan mediante un SDS-PAGE para determinar cuáles contienen una mayor cantidad de proteína, así como la pureza con la que ésta se ha obtenido. Para eliminar las trazas de imidazol, las alícuotas seleccionadas se dializan durante unas 16h en *Tampón C* (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) y al día siguiente se renueva el tampón y se dializan durante 2h más. Finalmente se determina la cantidad de proteína obtenida en la purificación mediante el ensayo de BCA (*Pierce BCA Protein Assay*, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante (apartado 4.4. de Materiales y métodos). Se alícuota la proteína, se liofiliza y se conserva a -20°C hasta su utilización.

### 1.3. Marcaje del Hc-TeNT con AlexaFluor555

En algunos de los experimentos se ha utilizado Hc-TeNT marcado con un fluoróforo. Para ello se utiliza el *AlexaFluor555 Protein Labeling kit* (Invitrogen) que permite unir proteínas de más de 40 kDa a una molécula de AlexaFluor555. El kit permite reaccionar el radical succinimidil ester que contiene el AlexaFluor555 con las aminas primarias presentes en las proteínas, dando lugar a complejos estables entre fluoróforo y proteína.

El marcaje se realiza siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante, tal como se describe a continuación. Para realizar la conjugación, se incuba en medio alcalino 1 mg de Hc-TeNT a una concentración final de 2 mg/mL con el fluoróforo durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente la muestra se carga en una columna con una resina de exclusión molecular que separa las moléculas de fluoróforo libre de las de Hc-TeNT unidas al fluoróforo (Hc-TeNT-A555) que serán eluidas en primer lugar, en tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4).

Para determinar la concentración del complejo obtenido, se mide la absorbancia a 280 nm y a 555 nm, y se aplica la siguiente fórmula matemática:

$$[H_c \text{ A555}] = \frac{[A_{280} - (A_{555} \times 0,08)] \times FD}{\epsilon_{Hc}}$$

donde 0,08 es el factor de corrección para la absorción del AlexaFluor555 a 280 nm, FD es el factor de dilución en el que se encuentra la muestra, y  $\epsilon_{Hc}$  es el coeficiente de extinción molar para el Hc-TeNT, calculado en 91.470 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>.

También se determina el grado de marcaje de cada lote obtenido de Hc acoplada a fluoróforo, es decir, los moles de AlexaFluor555 incorporados por cada mol de Hc-TeNT, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Moles } A_{555} / \text{Mol } H_c = \frac{A_{555} \times FD}{\epsilon_{A555} \times [H_c - A555]}$$

donde el coeficiente de extinción molar para el AlexaFluor555 es 150000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>.

## 2. ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE MODELADO MOLECULAR

La secuencia de la holoproteína de la TeNT utilizada en los estudios se extrajo de la web UniProtKB/Swiss-Prot, anotada con el código de registro P04958-2.

Para estudiar si existe homología entre el fragmento Hc-TeNT y las diferentes neurotrofinas se utilizan los programas Blast y Clustal W. El motor de búsqueda Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) encuentra secuencias de aminoácidos similares (Altschul et al., 1997). Los estudios de alineación de secuencias múltiples son realizados con el programa *Clustal W* (Larkin et al., 2007) y son interpretados con respecto a residuos conservados y homologías.

El modelado molecular se ha basado en las estructuras cristalinas del fragmento Hc-TeNT (código PDB: 1A8D) (Knapp et al., 1998), del dominio D5 de TrkA unido a NGF (código PDB: 1WWW) (Ultsch et al., 1999), del complejo formado por NT-4/5 y el dominio D5 de TrkB (código PDB: 1HCF) (Banfield et al., 2001), y de BoNT/B (código PDB: 1EPW) (Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000). Todas estas estructuras fueron recuperadas de la base de datos del PDB (*Protein Data Bank*) en [www.pdb.org](http://www.pdb.org) (Berman et al., 2000) y la calidad de estas estructuras fue comprobada con el software *What\_check* (Hooft et al., 1996). El modelado molecular se realizó utilizando los programas informáticos *What if* (Vriend, 1990), *Yasara* (Krieger et al., 2002), *Vega ZZ* (Pedretti et al., 2004) y *Sybyl X*, con los que se analizan la complementariedad de superficies, los potenciales puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas y los efectos estéricos.

### 3. MUTAGÉNESIS DEL FRAGMENTO Hc-TeNT

Para introducir las mutaciones en las posiciones Y266, K311 y E343 de Hc-TeNT, se sintetizó un constructo basado en un segmento del extremo C-terminal de Hc-TeNT que contiene los tres residuos a mutar. Este fragmento de 905 pb, fue clonado entre las dianas de restricción *SacII* y *KpnI* del vector pMK (Geneart, Life Technologies), obteniendo así el plásmido pMK-Hc de 3205 pb con resistencia a kanamicina. Este segmento recoge de la base 431 a la 1221 de la secuencia de Hc-TeNT *wild type*, e incluye intercaladas varias repeticiones de la secuencia de interés, permitiendo incluir en el mismo constructo los aminoácidos señalados tanto en su forma *wild type* como en su forma mutada. En los extremos de cada una de estas repeticiones se han introducido diversas dianas de restricción que delimitan cada uno de los residuos de interés. De esta manera, mediante diversas rondas de digestiones y ligaciones, se pueden aislar los fragmentos que contienen cada uno de los residuos seleccionados e introducirlos en la secuencia de Hc-TeNT *wt*, pudiendo conseguir así mutantes simples, dobles o triples, según se desee. En la Figura 24 se muestra la secuencia del constructo sintético, los aminoácidos mutados y las dianas de restricción incluidas. Para introducir estas dianas se han realizado algunos cambios nucleotídicos conservativos en la secuencia.

La estrategia seguida para la obtención del mutante triple Hc-A266-311-343 es la siguiente. Primeramente se digiere el plásmido pMK-Hc con la enzima *Sall* con el fin de eliminar el segmento que codifica para el residuo K311, y luego se religa el vector resultante de 3157 pb que ha quedado linealizado. Una vez recircularizado, se digiere con *MluI* y se religa de nuevo para quitar el segmento codificante para el E343, obteniendo un vector de 3091 pb. Finalmente se digiere el plásmido pMK resultante con *SacII* y *KpnI* para obtener el segmento de 786 pb que contiene la secuencia de Hc con las 3 mutaciones en el orden correcto, y se introduce en el vector pYN1-Hc digerido por las mismas enzimas de restricción (4022 pb) para obtener el vector de expresión pYN1-Mut.

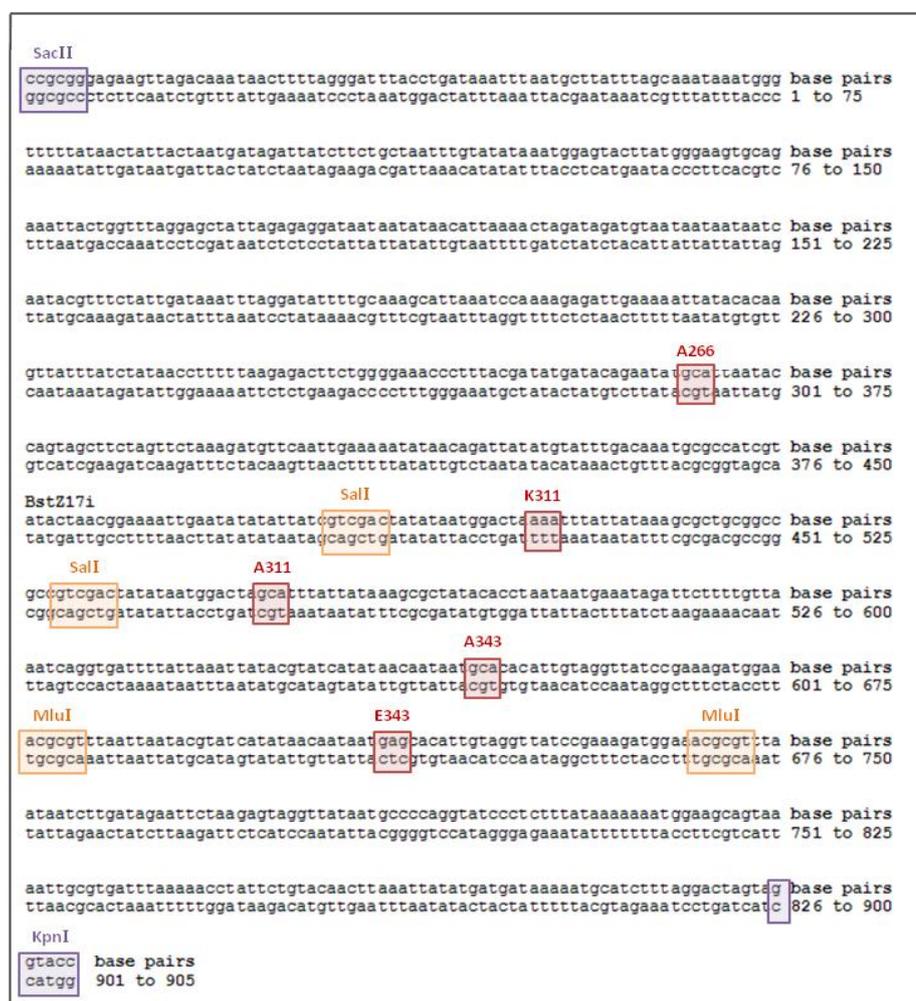
#### 3.1. Reacciones de digestión y ligación

Las digestiones se realizan con los enzimas de restricción *Sall*, *MluI*, *SacII* y *KpnI* (*New England Biolabs*) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las reacciones de digestión se llevan a cabo en un volumen final de 250  $\mu$ L, mezclando *Tampón* de digestión, BSA (si se requiere) y 50 U de la enzima por 5  $\mu$ g del plásmido, y se incuban a 37°C o/n. El producto de las digestiones se analiza en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mM Tris, 0.1% p/v ácido acético, 1 mM EDTA) con el fin de separar los fragmentos resultantes y cortar la banda de interés en cada caso. El DNA de las bandas recortadas se extrae y se purifica mediante el kit comercial *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

Las reacciones de ligación se realizan mezclando *Ligation Buffer*, 60 fmol del vector, 180 fmol del inserto y 0,1 U de T4 DNA Ligasa (*Invitrogen*) en un volumen final de 20  $\mu$ L, y se incuban a 23°C-26°C durante 1h.

### 3.2. Transformación en células competentes

El DNA producto de la ligación se transforma en las células ultracompetentes *E. coli* XL10-Gold (Stratagene). Para ello, se descongelan las células en hielo y se mezclan 50  $\mu$ L de éstas con 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol incubándolas de nuevo en hielo durante 10 min, agitando suavemente cada 2 min. Seguidamente se añaden 2  $\mu$ L de la reacción de ligación y se incuban en hielo durante 30 minutos más. El choque térmico es realizado a 42°C durante 30s seguido de 2 min en hielo. A continuación se añaden 0,5 mL de medio LB precalentado a 42°C y se incuba a 37°C durante 1h a 225 rpm. El producto de la transformación se siembra en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina en el caso del plásmido pYN1 y kanamicina para el pMK) y se incuban a 37°C *o/n*.



**Figura 24. Secuencia del constructo sintético clonado en pMK-Hc.**

Secuencia sintética homóloga al segmento C-terminal de Hc-TeNT insertada en el plásmido pMK-Hc entre las dianas *SacII* y *KpnI*. En color naranja están señaladas las dianas de restricción utilizadas, en rojo los residuos de interés, y en lila las dos dianas de restricción que delimitan el fragmento.

### 3.3. Secuenciación

Para poder analizar si las colonias transformantes contienen el inserto con las mutaciones deseadas, se inoculan de forma independiente en 5 mL de LB con el correspondiente antibiótico de selección y se incuban a 37°C o/n a 225 rpm. Una pequeña parte del cultivo es usado para la criopreservación de los clones, mientras que la otra se usara para la extracción del plásmido y la comprobación de la introducción de las mutaciones deseadas mediante secuenciación. Los plásmidos se extraen mediante el kit *Gen Elute Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial y se envían a secuenciar al Servicio de Genómica del Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB para comprobar la correcta introducción de las mutaciones. Los *primers* usados para la secuenciación son los siguientes:

Para la secuenciación del plásmido pYN1 se utilizan los *primers*:

Promoter Region Primer → 5' – CCCGAAAAGTGCCACCTG – 3'

Reverse Sequencing Primer → 5' – GTTCTGAGGTCATTACTGG – 3'

Para el plásmido pMK se utilizan los *primers*:

T7 Promoter FW: 5' - TAATACGACTCACTATAGGG- 3'

M13 reverse: 5' - GAAGGAAACAGCTATGAC - 3'

### 3.4. Expresión de Hc-A266-311-343

Finalmente el plásmido pYN1-Mut, que contiene todas la mutaciones, se transforma en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene), adecuada para la producción de la proteína recombinante. La expresión de la proteína mutada así como su posterior purificación se realiza igual que en el caso del H<sub>c</sub>-TeNT, mediante HPLC tal como se ha comentado en apartados anteriores.

La proteína Hc-A266-311-343 purificada es analizada posteriormente por el Servicio de Proteómica CSIC/UAB mediante MALDI-TOF y *Peptide Mapping Fingerprinting*, confirmando la presencia de los tres aminoácidos mutados.

## 4. CULTIVOS Y LÍNIAS CELULARES

### 4.1. Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGNs) se obtienen a partir de ratas de la cepa *Sprague-Dawley* de 7-8 días de edad postnatal. Los animales se obtienen del Servicio de Estabulario de la Universitat Autònoma de Barcelona y se actúa en base al procedimiento aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Generalitat de Catalunya (CEEH 622, Procedimiento de Experimentación 2828).

Para la realización del cultivo se necesitan las siguientes soluciones que serán filtradas previamente a su uso:

Solución 1: 50 mL de tampón Krebs (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 14,3 mM glucosa), 0,15 g de BSA (*Bovine Serum Albumine*, #05470, Sigma-Aldrich) y 0,4 mL de una solución de  $\text{MgSO}_4$  al 3,8%.

Solución 2: 10 mL de solución 1 y 2,5 mg de tripsina (T9201, Sigma-Aldrich).

Solución 3: 10 mL de solución 1 con 0,8 mg de DNasa (D5025, Sigma-Aldrich), 5,2 mg de inhibidor de tripsina (#17075-029, Gibco) y 0,1 mL de  $\text{MgSO}_4$  al 3,8%.

Solución 4: 8,4 mL de solución 1 y 1,6 mL de Solución 3.

Solución 5: 5 mL de solución 1, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  al 3,8% y 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  al 1,2%.

Para el cultivo, se separa el cerebelo de las ratas, se retiran las meninges y se corta en pequeñas secciones cúbicas que se resuspenderán en 15 mL de solución 1. A continuación se centrifugan a  $0,4 \times g$  durante 30s, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en la solución 2. La mezcla se incuba durante 10 min en un baño a  $37^\circ\text{C}$  para que la tripsina que contiene la solución disgregue el tejido. Después de este tiempo se le añade la solución 4, que contiene tanto inhibidor de tripsina como DNasa para detener el efecto de la tripsina y degradar el DNA liberado como consecuencia de la lisis del paso anterior. Se centrifuga de nuevo a  $0,4 \times g$  durante 30s y se añade al precipitado obtenido la solución 3, que contiene mayores concentraciones de inhibidor de tripsina y DNasa. A continuación se procede a una disgregación mecánica del tejido mediante una pipeta pasteur por la que se pasa la muestra 10 veces. Seguidamente se filtra con una malla de nylon de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro utilizando la misma pipeta y pasando la muestra por ella otras 10 veces más. La suspensión celular obtenida se añade a la solución 5, que contiene calcio y magnesio a una concentración fisiológica, y se centrifuga a  $0,2 \times g$  durante 5 min. Las células que quedan en el precipitado son resuspendidas con medio de cultivo BME (*Basal Medium Eagle*, #1522, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS), 30 mM glucosa, 2 mM glutamina, 50 U/mL penicilina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomycin y 20 mM KCl, y se siembran en placas previamente tratadas con poli-L-lisina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a una densidad de  $7 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . A las 24h de ser sembradas se tratan con 10  $\mu\text{M}$  *cytosine- $\beta$ -D-arabino-furanoside*, un antimetabólico para impedir la proliferación de las células no neuronales. Las células se mantienen en atmosfera humidificada a  $37^\circ\text{C}$  y a 5% de  $\text{CO}_2$  durante 7 días *in vitro* (DIV) antes de ser utilizadas en los experimentos, permitiendo así su maduración y la extensión de neuritas.

## 4.2. Línea celular PC12

Las PC12 son una línea celular derivada de feocromocitoma de medula adrenal de rata y se caracterizan por la capacidad de parar su proliferación e iniciar procesos de extensión de neuritas, de forma parecida a como lo harían las neuronas ganglionares simpáticas en cultivo, en respuesta a NGF (Greene and Tischler, 1976). Las PC12 se cultivan en medio DMEM (D-5796, Sigma-Aldrich) suplementado con 7% FBS, 7% HS (*Horse Serum*), 20 U/ml penicilina y 20 µg/ml estreptomicina, 11,4 mM HEPES pH 6,8) en una atmosfera humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para los diversos experimentos planteados las células son sembradas en general a una densidad de  $1,25 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> en placas pre-tratadas con colágeno tipo 1 (*Corning*) a concentración 80 µg/mL. Las células se diferencian añadiendo al medio NGF (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 ng/mL el día siguiente a la siembra, y manteniéndolo durante 6 DIV. Cada 2 días se cambia la mitad de medio por medio completo nuevo, añadiendo el NGF correspondiente.

### 4.2.1. Transfección PC12

En algunos experimentos se ha necesitado realizar un silenciamiento de la expresión proteica de nSM2 para disminuir sus niveles dentro de las células. Para ello se han transfectado cultivos de la línea PC12 con siRNAs (*small interfering RNAs*) específicos frente al mRNA de nSMAsa2, uniéndose y bloqueándolo, impidiendo así que se traduzca en los ribosomas.

Con esta finalidad, las células se transfectan usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo consiste en una mezcla de lípidos neutros y cargados positivamente que, en medio acuoso, pueden formar liposomas que interaccionan y engloban las moléculas de siRNA cargadas negativamente. De esta manera el complejo formado, cargado positivamente en su superficie, puede fusionarse con la membrana plasmática de las células permitiendo que el material de transfección se libere en el citoplasma.

Se utilizó una combinación de 4 siRNAs específicos para nSMAsa2 (Qiagen), con las siguientes secuencias:

siRNA#1 (SI01992571) 5'CAGGAGGTGTTTGACAAGCGT3'  
 siRNA#2 (SI01992578) 5'CTCGCAAGGCTCAATAATGTT3'  
 siRNA#3 (SI01992585) 5'TAACAGTAAGCTGCTGTATAA3'  
 siRNA#4 (SI01992592) 5'TCGGTTAGGGTCTGTAAGTCA3'

Como control negativo de la transfección se usó un siRNA sin diana conocida dentro de la célula (*AllStars Negative Control siRNA*, Qiagen).

Las células fueron sembradas a una densidad de  $1,25 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm o en placas de 24 pozos (según si se analizarán por western blot o si se harán ensayos de viabilidad respectivamente), y 24h después de la siembra se realiza la transfección. El primer paso es, 4h antes a la transfección, cambiar el medio en el que están sembradas las PC12 por DMEM sin suero y sin antibióticos. Pasado este tiempo se mezclan 10 µL de lipofectamina en 250 µL de medio Opti-MEM (#31985-070, Gibco), en el caso de las placas de 35 mm, o 2 µL de lipofectamina en 50 µL de Opti-MEM para las placas de 24 pozos, y se incuba 5 min a temperatura ambiente. En otro *ependorf* se

preparan 100 pmol de cada siRNA en 250  $\mu$ l Opti-MEM, para las placas de 35 mm, y 20 pmol de cada siRNA en 50  $\mu$ l Opti-MEM para las de 24 pozos. Pasados los 5 min de incubación de la lipofectamina, ésta es añadida a la mezcla de siRNAs y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de liposomas que contendrán los siRNA. Después se añade la mezcla de liposomas a las células, 500  $\mu$ L a las placas de 35 mm y 100  $\mu$ L a las de 24 pozos, dejándola caer suavemente en forma de gotas repartiéndolas por el pozo. 4h después de la transfección se vuelve a cambiar el medio a DMEM completo, con suero y antibióticos. Las células se mantienen durante 72h más antes de proceder al experimento, tiempo en el cual se ha observado la mayor disminución de nSMasa2.

### 4.3. Línea celular NSC-34

La línea celular híbrida NSC-34 está producida por fusión entre células de neuroblastoma y preparaciones de médula espinal embrionaria de ratón enriquecidas en motoneuronas (Cashman et al., 1992). Esta línea celular fue cedida amablemente por el Dr. Kevin Talbot de la *Oxford University*.

Las células se mantienen en medio DMEM (#41965-039, Gibco) complementado con 10% FBS, 50 U/mL penicilina, 50  $\mu$ g/mL estreptomina, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> en una atmosfera humidificada. Para los experimentos las células se siembran a una densidad de 2,5 x 10<sup>4</sup> cel/cm<sup>2</sup> en placas pre-tratadas con 0,01 mg/mL de poli-D-lisina.

#### 4.3.1. Transfección NSC-34

En algunos experimentos se ha necesitado realizar un silenciamiento de la expresión proteica de nSMasa2 para disminuir sus niveles dentro de las células. Para ello se transfectan los cultivos de NSC-34 con una combinación de 4 siRNAs específicos (Qiagen) frente al mRNA de nSMasa2, las secuencias de los cuales se muestran en el apartado 4.2.1. de Materiales y métodos. Como control negativo de la transfección se usa un siRNA sin diana conocida dentro de la célula (*AllStars Negative Control siRNA*, Qiagen). Las células fueron sembradas 24h antes de la transfección a una densidad de 2,5 x 10<sup>4</sup> cel/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm (para western blot) o en placas de 24 pozos (para ensayos de viabilidad). El protocolo para la transfección es el mismo que en el caso de las PC12 cambiando las cantidades de lipofectamina y de siRNAs añadidos. 4h antes de la transfección se reemplaza el medio por DMEM sin suero y sin antibióticos. Pasado este tiempo se incuban durante 5 min 5  $\mu$ L de lipofectamina en 250  $\mu$ L de Opti-MEM (#31985-070, Gibco), en el caso de las placas de 35 mm, o 1  $\mu$ L de lipofectamina en 50  $\mu$ L de Opti-MEM para las placas de 24 pozos. En otro *ependorf* se mezclan 100 pmol de cada siRNA en 250  $\mu$ l Opti-MEM, para las placas de 35 mm, y 20 pmol de cada siRNA en 50  $\mu$ l Opti-MEM para las de 24 pozos. A continuación la lipofectamina se añade a la mezcla de siRNAs y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se añade 500  $\mu$ L de la mezcla de liposomas a las placas de 35 mm y 100  $\mu$ L a las de 24 pozos. Tras 4h se vuelve a cambiar el medio a DMEM completo, con suero y antibióticos. Las células se mantienen durante 72h más antes de proceder al experimento, tiempo en el cual se ha observado la mayor disminución de nSMasa2.

#### 4.4. Lisado de las células y cuantificación de proteína total

Para la obtención de extractos celulares totales de los cultivos previamente tratados para su posterior análisis inmunológico mediante *western blot* se procedió como se detalla a continuación. Las células cultivadas en placa son lavadas con PBS frío y resuspendidas con la ayuda de un *scraper* en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA, pH 7,6) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). Los lisados son incubados en hielo durante 30 min para ser posteriormente tratados con un homogenizador de eppendorfs (Z359971, Sigma-Aldrich) y sonicados. Finalmente los extractos son centrifugados a 14000 x g durante 10 min a 4°C y se recupera el sobrenadante obtenido.

La concentración de proteína total contenida en los extractos se determina utilizando el ensayo de BCA (*Bicinchoninic acid*, Pierce Thermo Scientific). Para ello se analiza conjuntamente con la muestra problema una recta patrón con concentraciones crecientes de BSA diluida en el mismo tampón de lisis. Tanto la muestra problema como la recta patrón son incubadas con el reactivo BCA en una placa de 96 pocillos a 37°C durante 30 min, según las instrucciones del fabricante. A continuación se mide la absorbancia de cada muestra a 562 nm en un lector de placas (Power Wave, Biotek) y se calcula la concentración de proteína a partir de la extrapolación con su recta patrón.

## 5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR Y ENZIMÁTICOS

### 5.1. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Sigma-Aldrich) es un método ampliamente utilizado para determinar la viabilidad celular en un cultivo. Se basa en la habilidad de las células vivas de romper los enlaces de tetrazolium del MTT a través de una reacción catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, dando lugar a cristales insolubles de formazán de coloración azul e impermeables a las membranas de las células vivas, acumulándose así en su interior. La adición de DMSO a las células, causa la lisis de sus membranas y la solubilización de los cristales de formazán originados. Mediante un espectrofotómetro se podrá determinar la concentración de formazán formado midiendo las relaciones de absorbancia a 560 y 620 nm ( $A_{560}/A_{620}$ ), que será directamente proporcional a la actividad mitocondrial y por lo tanto, a una mayor viabilidad celular.

Para realizar el ensayo, las células son previamente sembradas en placas de 24 pozos y sometidas al tratamiento que corresponda. 24h después del tratamiento realizado se añade a las células 0,25 mg/mL de MTT y se incuban durante 40 min a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán. Seguidamente se aspira el medio, se añaden 400 µL de DMSO (Sigma-Aldrich) para disolver el formazán formado y finalmente se mide la absorbancia a 560 nm y 620 nm utilizando un lector de placas (*Power Wave*, Biotek).

### 5.2. Tinción de núcleos con Hoescht 33258

Otra manera de medir la viabilidad de un cultivo es haciendo un recuento de los núcleos apoptóticos. El Hoescht 33258 es un compuesto fluorescente que se une al DNA celular y permite visualizar el núcleo. Si las células están en un proceso de muerte apoptótica, presentarán una cromatina más condensada y fragmentada que se teñirá más intensamente con el Hoescht, permitiendo diferenciar los núcleos apoptóticos del resto.

Para realizar el experimento se siembran las PC12 en placas de 24 pozos a una densidad de  $1,25 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>, se transfectan durante 72h y se realiza el tratamiento pertinente. Transcurridas 24h se retira la mitad de medio del pozo y se substituye por 4% PFA (paraformaldehído) y hoescht a una concentración final de 1 µg/mL. La placa se mantiene a 4°C hasta ser analizada en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-E) a una longitud de onda de excitación/emisión de 350/460 nm. Se analizan un total de 30 campos por condición, de aproximadamente unas 100 células cada uno. El porcentaje de apoptosis se expresa como la ratio entre las células apoptóticas y las totales.

### 5.3. Ensayo de actividad caspasa-3

La actividad caspasa-3 se mide utilizando un ensayo basado en la utilización del péptido Acetyl-DEVD-AMC (#3171-v, Peptanova) que es un sustrato selectivo de la caspasa-3. El residuo AMC fluorogénico es liberado en procesarse el péptido por la actividad de la caspasa-3 y la fluorescencia emitida por éste puede ser medida en un espectrofluorímetro.

En este experimento se utilizan células PC12 sembradas en placas de 24 pozos y transfectadas. 72h después de la transfección se realiza el tratamiento correspondiente. A continuación las células se lavan con PBS frío y seguidamente son lisadas en tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Triton X-100) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). Se dejan 30 min en hielo y se homogenizan con el homogeneizador de eppendorf (Z359971, Sigma-Aldrich). En una placa opaca de 96 pozos, se añaden 25  $\mu$ L de muestra, 25  $\mu$ L de tampón de lisis y 50  $\mu$ L de tampón de reacción (compuesto por 200  $\mu$ M Ac-DEVD-AMC, 42 mM Hepes, 2,2 % glicerol, 4,2 mM DHT, pH 7,5). Las muestras se incuban durante 5h a 37°C y se mide la fluorescencia de cada pozo a 460 nm en un lector de placas (Synergy HT, Biotek). El valor de fluorescencia obtenido es proporcional a la actividad caspasa-3 del lisado y se expresa como porcentaje respecto a la condición control sin privación de suero. Todas las actividades son estandarizadas por la concentración de proteína total del lisado, que es cuantificada en paralelo mediante el ensayo de BCA comentado en apartados anteriores.

#### 5.4. Ensayo actividad esfingomielinasa

Para poder determinar la actividad esfingomielinasa de las células, se emplea el *Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen)*. Este kit permite medir la actividad esfingomielinasa indirectamente a través de varias reacciones enzimáticas acopladas que acaban en la producción de resorufina, una molécula fluorogénica. Primero la esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina, y ésta última a su vez es hidrolizada a colina por la acción de la fosfatasa alcalina. La colina es oxidada a betaina y  $H_2O_2$ , que finalmente, en presencia de HRP (Horseradish peroxidase), reacciona con el reactivo AmplexRed (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) para generar la resorufina.

Para realizar el ensayo, las células son resuspendidas en 500  $\mu$ L de *Reaction Buffer* (0,1 M Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 1% Triton X-100, pH 7,4), se sonicán y posteriormente se centrifugan a 9000 x g durante 30 min a 4°C. A continuación se determina la actividad de la esfingomielinasa neutra siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclan en una placa de 96 pozos 100  $\mu$ L del lisado celular con 100  $\mu$ L de la *Working Solution* (100  $\mu$ M reactivo Amplex® Red, 2 U/mL HRP, 0,2 U/mL colina oxidasa, 8 U/mL fosfatasa alcalina, 0,5 mM esfingomielina). Como control positivo se utiliza una solución 0,04 U/mL de esfingomielinasa, y como control negativo se prepara una solución sin esfingomielinasa. La reacción se incuba durante 30 min a 37°C protegida de la luz. Finalmente la fluorescencia emitida a 585 nm se determina mediante un lector de placas Series BioAssay Reader (Perkin Elmer Instruments; Waltham).

## 6. ENSAYOS DE UNIÓN E INTERNALIZACIÓN DE Hc-TeNT

### 6.1. Desplazamiento de la unión

Para los ensayos de desplazamiento de la unión de Hc-TeNT a membrana se parte de un cultivo de CGNs de 7 DIV sembradas en placas sobre cubreobjetos. Las células se tratan con 10 nM de Hc-TeNT-A555 durante 30 min a 4°C, y a al mismo tiempo se añaden también las diferentes moléculas de estudio en distintas concentraciones según la condición. En el caso del desplazamiento con BDNF se ensayan las concentraciones de 0, 50, 200 y 400 ng/mL. En el desplazamiento con NGF, se añade a 0, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/mL y en el caso del péptido D5 se ha utilizado a 0, 5, 25, 50, 200, 400 y 600 µg/mL.

Una vez pasados los 30 min de incubación se retira el medio y las células se lavan con PBS frío. Se fijan durante 20 min con PFA 4% y seguidamente se realizan 3 lavados de 10 min cada uno con PBS. Se tiñen los núcleos con 0,5 µg/mL de DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) (Life Technologies) durante 5 min y se realizan 3 lavados más. Finalmente las células se montan sobre portaobjetos con medio de montaje *FluoromountG* (Southern Biotech) y se dejan secar. Los portaobjetos se visualizan en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss) con un objetivo 63X. Con el software ImageJ (U.S. *National Institutes of Health*) se determina la intensidad de fluorescencia integrada en el canal rojo (Hc-TeNT). La intensidad integrada se calcula multiplicando el área marcada en rojo por la media de intensidad de fluorescencia de ésta. Se trabaja con porcentajes de intensidad respecto al control sin competidor para estandarizar todas las condiciones. Los resultados fueron procesados mediante el software GraphPad Prism, obteniendo de esta forma las curvas de competencia y los valores de las constantes de inhibición mediante la ecuación *One site – Fit LogIC50*, con la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{Y^f + (Y^0 - Y^f)}{1 + 10^{X - \text{LogIC}_{50}}}$$

donde Y es la intensidad respecto al control, X es la concentración de competidor,  $Y^f$  es la intensidad obtenida en la concentración más alta de competidor, y  $Y^0$  es la intensidad obtenida en la condición sin competidor. Con el fin de calcular la  $IC_{50}$  de una forma más precisa se añade un punto no experimental en las curvas de BDNF y D5, fijando una intensidad del 30% a una concentración de competidor de 1mM. Esto permite definir una fase de *plateau* en  $Y^0$  que no se puede conseguir experimentalmente por la gran cantidad de competidor que se tendría que añadir. Si no se puede hacer un rango de concentraciones de competidor suficiente para definir bien las fases de *plateau*, el programa tiene problemas para calcular correctamente la  $IC_{50}$ , generando mensajes de error o calculando un valor sin sentido.

### 6.2. Ensayos de internalización

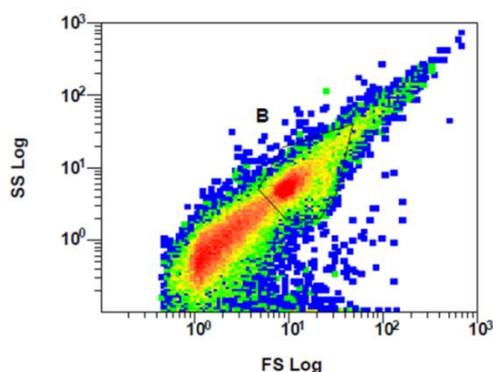
Para los ensayos de internalización de Hc-TeNT y para los ensayos de competencia en la internalización con diferentes moléculas, se utilizan CGNs de 7 DIV sembradas en placas sobre cubreobjetos. Las células se tratan con 20 nM de Hc-TeNT-A555 durante 1h a 37°C, añadiendo al mismo tiempo un anticuerpo contra TrkB (ab33566) (dil. 1/500). Para los desplazamientos se añade 20 µM de D5 (molar ratio 1:1000), 400 ng/mL de BDNF (15 nM) o 400 ng/mL de NGF (15 nM). En el

caso del péptido D5, éste es preincubado con el Hc-TeNT-A555 a temperatura ambiente durante 1h y a continuación son simultáneamente añadidos en el cultivo.

Pasado el tiempo de incubación se retira el medio y las células se lavan con PBS frío. Se realiza entonces un tratamiento con una solución ácida (10 mM Citrate-NaOH, 140 mM NaCl, pH 2) durante 1 min para eliminar la señal de Hc-TeNT que haya quedado unido a membrana y no haya sido internalizado. Se fijan durante 20 min con PFA 4% y seguidamente se realizan 3 lavados de 10 min cada uno con PBS. Las células son posteriormente permeabilizadas durante 10 min con 0,1% Triton X-100 en PBS y los sitios de unión inespecíficos se bloquean con 5% BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados con PBS y se les añade el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo contra el anti-TrkB (dil. 1/1000). Los núcleos neuronales se tiñen durante 5 min con 0,5 µg/mL de DAPI y se realizan 3 lavados más. Finalmente las células se montan sobre portaobjetos con medio de montaje *FluoromountG* (Southern Biotech). Las preparaciones son analizadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss) con un objetivo 63X. Los puntos de colocalización entre Hc y TrkB (canal rojo y verde respectivamente) son determinados mediante el software Imaris (Imaris, Bitplane) y las intensidades de los canales con el software ImageJ (U.S. *National Institutes of Health*).

## 7. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas e individualmente por un fino tubo transparente en el que incide un haz de láser focalizado. La luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, la forma y complejidad, y cualquier componente celular que pueda ser marcado con un fluoróforo. El detector frontal FS (*Forward Scatter*) brinda información acerca del volumen de la partícula, mientras que el detector lateral SS (*Side Scatter*) da información acerca de la granularidad o complejidad interna de la misma. También dispone de detectores de fluorescencia (FL1, FL2 y FL3) que recogen la fluorescencia emitida por las partículas en función de las diferentes longitudes de onda. Esta técnica permite analizar una gran cantidad de células de forma individualizada en muy poco tiempo (orden de miles de células por segundo), permitiendo así obtener información representativa sobre el conjunto de la población celular. Asimismo, también permite restringir el análisis a una subpoblación dentro de la muestra en función de alguna característica concreta, limitando en los gráficos obtenidos con los datos generados un área o región, denominada *gate*. En nuestro caso esta subpoblación se selecciona en un diagrama de puntos, en función del tamaño (FS) y la granularidad de las células (SS), limitándonos a aquellas que se consideran íntegras y de un tamaño apropiado. Éstas son englobadas en una región que denominaremos *gate B* y que se muestra en la Figura 25.



**Figura 25. Diagrama de puntos con un *gate* que engloba a la población de CGN.**

Representación obtenida al analizar un cultivo de CGN en el citómetro de flujo. Cada punto representa un evento analizado situado en la gráfica según su tamaño (FS Log, eje horizontal) y su granularidad (SS Log, eje vertical). Las zonas de puntos en rojo son las que concentran una mayor cantidad de eventos registrados y las zonas azules en las que menos cantidad de células han registrado. El *gate* seleccionado en nuestro estudio se encuentra recuadrado y señalado con una B.

Para calcular la unión y la internalización del Hc-TeNT en las células, se dispone de un cultivo de CGNs de 7 DIV sembradas en placas de 24 pozos. Se añade a cada pozo 500 nM de Hc-TeNT-A555, en un volumen final de 400  $\mu$ L. Se incuban 30 min a 4°C para los ensayos de unión, y 2h a 37°C dentro del incubador para los ensayos de internalización. Transcurrido el tiempo de incubación se pasan las células por un citómetro de flujo (*Cytomics FC500, Beckman Coulter*), analizando por cada condición 30.000 eventos y registrando el valor de intensidad de fluorescencia de cada célula, dentro del *gate B*, a 565 nm con el detector FL2. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el programa informático *CXP (Beckman Coulter)*. Los histogramas muestran el número de eventos o células registrados para cada valor de intensidad de fluorescencia.

## 8. INYECCIÓN INTRAMUSCULAR DE HC-TENT EN RATÓN Y TRAZADO RETROAXONAL

### 8.1. Inyección intramuscular y sacrificio de los animales

Para los experimentos de trazado retrogrado del Hc se utilizaron ratones de la cepa CD1 adultos, de unos dos meses de edad, obtenidos de Harlan Laboratories (Castellar del Vallès, España). Todos los procedimientos de experimentación se llevaron a cabo de acuerdo con el Comité de Cuidado y Uso Animal de la Universitat de Lleida. Para la inyección los animales fueron previamente anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina. Se utilizaron un total de 4 ratones, dos de los cuales se inyectaron en sus patas derechas Hc-TeNT y en las izquierdas, Hc-A266-311-343. A los otros 2 ratones restantes se les inyectó en sus patas derechas una solución control, que solo contenía AlexaFluor555, y la izquierda de uno de ellos con Hc-TeNT y la izquierda del otro con Hc-A266-311-343. Se realiza un corte en la piel del animal para poder aplicar las inyecciones de forma intramuscular en 3 puntos del tibial anterior mediante una microaguja y un soporte de precisión para ésta. En total se inyectaron 5 µg de Hc en cada caso (unos 2 µL por inyección). El corte es posteriormente suturado y se deja reposar al animal para que el fragmento Hc se internalice en el músculo y sea transportado retrógradamente hasta las motoneuronas de la médula que inervan el músculo tibial anterior.

Pasadas 24h después de la inyección se procede a perfundir a los animales. El objetivo de la perfusión es preservar rápida y uniformemente el tejido haciendo circular un fijador (paraformaldehído) a través del sistema circulatorio para que llegue rápidamente a todos los órganos. Antes de la cirugía, se administra una mezcla de ketamina/xilacina mediante inyección intraperitoneal para anestesiarse al ratón. A continuación se realiza una incisión en el abdomen justo debajo de la caja torácica para dejar expuesto el corazón. Se inserta una aguja conectada a un sistema de bombeo en el ventrículo izquierdo e inmediatamente se realiza un corte en la aurícula derecha con unas tijeras. Con la ayuda de una bomba peristáltica (a un flujo no mayor de 0,5 ml/min) se empieza bombear en el ratón una solución de salina fisiológica (0,9% NaCl) hasta que el hígado se vuelva de un color marrón claro. En este punto, se cambia a una solución fijadora (4% PFA en 0,1M tampón fosfato (22,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 76,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a pH 7,4) durante unos 15 min. Comprobando la rigidez de la cola se puede determinar si el animal ha quedado correctamente fijado.

### 8.2. Preparación de los tejidos de médula y músculo

Una vez perfundido el animal se realiza la disección de los tejidos de interés. En el caso del músculo, se extrae el tibial anterior de ambas patas traseras, se incuba durante 30 min en PFA 4% a 4°C y seguidamente se pasa a una solución de sacarosa al 30% en 0,1 M tampón fosfato y 0,02 % azida sódica, para su crioprotección. Para la extracción de la médula espinal se expone la columna vertebral en la zona lumbar y se disecciona la sección L3, cortando entre la T11 y la L1, lugar donde se encuentran las motoneuronas que inervan directamente al músculo tibial. Para conservar la orientación de la médula se bisela por el lado derecho caudal. A continuación se incuba con PFA 4% a 4°C durante 24h y se traspasa después a una solución de sacarosa 30%. Los tejidos se pueden conservar a 4°C en la solución de sacarosa.

A continuación se procede al corte de los tejidos con el criostato. Para ello es necesario congelarlos previamente a -80°C en bloques con medio *Tissue-Tek O.C.T* (VWR). Los cortes se realizan

longitudinalmente, de unos 30  $\mu\text{m}$  de grosor para el músculo y 16  $\mu\text{m}$  para la médula. Se recogen en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejan secar a temperatura ambiente.

### 8.3. Inmunohistoquímica

Las muestras de músculo y médula preparadas en los portaobjetos previamente gelatinizados, se permeabilizan durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave con PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) complementado con 0,1% Triton X100. Se hace un lavado de 5 min con PBS y seguidamente se bloquea la muestra con PBS + 10% *Normal Goat Serum* (NGS) durante 1h. Las muestras de tejido se incuban durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a la concentración pertinente (mirar tabla adjunta). Al día siguiente, se realizan 3 lavados con PBS de 10 min cada uno y se incuban las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a un fluoróforo durante 1h a temperatura ambiente en oscuridad. En el caso del tejido muscular, conjuntamente con los anticuerpos secundarios, también se incubaba la  $\alpha$ -bungarotoxina acoplada a AlexaFluor488. Seguidamente se realizan 3 lavados con PBS de 10 min más cada uno. En el caso de las muestras de médula se continúa con el protocolo realizando una tinción con Nissl-405 durante 20 min, seguido de un lavado de 10 min con PBS + 0,1% Triton X-100 y otro de 5 min con PBS seguido de 2h más de lavado, todo en oscuridad. Finalmente se monta el portaobjetos con un cubreobjetos utilizando el siguiente medio de montaje (0,1 M Tris-HCl a pH 8,5, 20% glicerol, 10% Moviol, 0,1% 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane).

Para las imágenes digitales tomadas del músculo y la médula se utilizó un microscopio confocal Fluoview FV10i (Olympus) con un objetivo 60X, o un confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss), con un objetivo 63X. Se capturan imágenes a diferentes planos a una distancia entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$  en el eje z. El análisis y procesamiento posterior de las imágenes se realizó con el *software* ImageJ (U.S. *National Institutes of Health*) y con Imaris (Imaris, Bitplane).

Para el estudio del transporte retroaxonal de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 se tomaron imágenes de 25 campos por cada condición (unas 8-9 fotos por individuo) en un microscopio confocal FV500 Fluoview (Olympus), manteniendo los mismos parámetros, con un Z-stack de 1  $\mu\text{m}$ . El análisis de las vesículas así como la reconstrucción 3D se realizaron utilizando el *software* Imaris 8 (Imaris, Bitplane) y mediante su aplicación *Spots* se determinó el número, volumen e intensidad de las vesículas.

Anticuerpos primarios			
Nombre	Animal productor	Dilución	Casa comercial
TrkB	<i>Rabbit</i>	1:100	Abcam (ab33655)
SV2	<i>Mouse</i>	1:1000	
NRG-1	<i>Rabbit</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-348)
vAChT	<i>Guinea Pig</i>	1:500	Synaptic Systems (139105)
GM130	<i>Mouse</i>	1:200	BD Transduction
p75 <sup>NTR</sup>	<i>Rabbit</i>	1:500	Abcam ab70481
Rab5	<i>Mouse</i>	1:100	Synaptic Systems (108011)
EEA1	<i>Mouse</i>	1:100	Abcam (ab70521)
Rab3	<i>Mouse</i>	1:100	

<b>Anticuerpos secundarios</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Animal productor</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
Cy5 anti rabbit	<i>Donkey</i>	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Cy5 anti guinea pig	<i>Donkey</i>	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Cy5 anti mouse	<i>Donkey</i>	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories
AlexaFluor 488 anti mouse	<i>Donkey</i>	1:500	Life technologies
AlexaFluor 488 anti rabbit	<i>Donkey</i>	1:500	Life technologies
DyLight 405 anti mouse	<i>Donkey</i>	1:100	Life technologies
DyLight anti rabbit	<i>Donkey</i>	1:100	Life technologies
AlexaFluor 647 anti rabbit	<i>Goat</i>	1:500	Life technologies

<b>Tinciones</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
DAPI	1:10000	Life technologies
NeuroTrace 435/455 Nissl	1:150	Life technologies
$\alpha$ -bungarotoxin-A488	1:500	Life technologies

**Tabla 3. Anticuerpos y tinciones utilizados para la inmunohistoquímica, dilución usada y referencias de la casa comercial.**

## 9. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN

### 9.1. Western Blot

#### Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica en la que las proteínas de una muestra son separadas y visualizadas en condiciones desnaturizantes según su peso molecular. Para la preparación de los geles se utilizan placas de vidrio de 10 x 7 cm de 1,5 mm de grosor. El gel apilador presenta una concentración de acrilamida constante (3,5%) y el separador variable (en general del 10%). Las proporciones de cada gel se preparan como se indica en la Tabla 4. Las muestras son previamente preparadas dejándolas todas a la misma concentración y añadiendo tampón de muestra reductor 4X (280 mM Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS, 44% glicerol, 0,02% bromophenol blue, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol) para finalmente desnaturizarlas a 99°C durante 5 minutos. Se disponen los geles dentro de la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis (25mM Tris, 192 mM glicina, 3,5 mM SDS) y se cargan las muestras en los bolsillos del gel. Se corren las muestras a un voltaje constante de 100V.

Composición	Gel Separador			Composición	Gel Apilador
	10%	12%	15%		
Acrilamida (mL)	2,5	3	3,75	Acrilamida (mL)	0,7
Solución B (mL)	1,875	1,875	1,875	Solución C (mL)	1,5
H <sub>2</sub> OmQ (mL)	3,125	2,625	1,875	H <sub>2</sub> OmQ (mL)	3,8
TEMED ( $\mu$ L)	10	10	10	TEMED ( $\mu$ L)	10
PSA 10% ( $\mu$ L)	100	100	100	PSA 10% ( $\mu$ L)	100

Tabla 4. Composición de los geles de SDS-PAGE para un gel de 1,5 mm de grosor.

#### Tinción de los geles SDS-PAGE en azul de coomassie:

Una vez las muestras se han separado en el gel, éste puede ser usado para transferir las proteínas a una membrana o bien puede ser teñido para visualizar y determinar la presencia de proteínas en el gel. La tinción del gel se realiza con una solución de azul de coomassie (50% metanol, 10% ácido acético, 40% H<sub>2</sub>O, 0,1% *coomassie brilliant blue*) durante 15 min y después se destiñe con una solución de igual composición pero sin el colorante.

#### Análisis inmunológico por western blot

El western blot es una técnica de análisis semicuantitativa que permite la detección de proteínas en una muestra mediante el uso de anticuerpos específicos contra los epítomos de la proteína de interés. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, GE Healthcare) utilizando un dispositivo para *western blot Mini TransBlot Cell* (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) sumergido en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanol). El proceso de transferencia se realiza durante 1h a 100V. Para

comprobar que la transferencia se ha realizado correctamente, se tiñe la membrana con *Ponceau-S red* durante 5 min. La tinción se elimina lavando la membrana con H<sub>2</sub>O y con TTBS (75 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 12,4 mM Tris, 0,1% Tween-20, pH 7,4). A continuación la membrana es bloqueada con solución de bloqueo (TTBS + 5% leche desnatada en polvo) durante 1h a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente se incuba la membrana con el anticuerpo primario deseado, diluido generalmente en TTBS + 5% (p/v) BSA, durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. La lista y características de los anticuerpos usados se indican en la Tabla 5. Al día siguiente se hacen 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno. Se incuba la membrana durante 1h, en agitación constante y a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (*Horseradish Peroxidase*), diluido en solución de bloqueo para proceder a continuación con 3 lavados más de TTBS de 10 minutos. Finalmente, las membranas se revelan usando una mezcla quimioluminiscente de dos soluciones en relación 1:1 (0,5 M luminol, 79,2 mM *p-coumaric acid*, 1 M Tris-HCl; pH 8,5) y (8,8 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 M Tris-HCl; pH 8,5). El resultado se visualiza usando un sistema de detección de quimioluminiscencia (*GeneGnome HR*) acoplado a una cámara CCD (*Syngene*; Cambridge, UK). El peso molecular de las diferentes proteínas detectadas se determina utilizando un marcador de peso molecular pre-teñido que se corre junto con las muestras (*All Blue*; Pierce Chemical Co.). La densitometría de las bandas se realiza con el software ImageJ (U.S. *National Institutes of Health*). Para detectar el total de cada proteína específica se realiza un lavado de la membrana con tampón de *stripping* (0,1 mM Glicina, pH 2,3) durante una hora a temperatura ambiente, seguido de 1h de bloqueo y la incubación con el correspondiente anticuerpo primario.

<b>Anticuerpos primarios</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Animal productor</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
TrkB	<i>Rabbit</i>	1:1000	Abcam (ab33655)
pTrkB (Y705)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Abcam ( <b>ab52191</b> )
TrkA	<i>Rabbit</i>	1:1000	Upstate Biotech (#06-574)
Phospho-TrkA(Y674/675) /TrkB(Y706/707)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#4621)
Anti-His	<i>Mouse</i>	1:1000	Amersham Pharmacia Biotech (#27-471001)
Phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#9101)
p44/42 MAP Kinase	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#4695)
Phospho-Akt (T308)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#9275)
Phospho-Akt (S473)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#4060)
Akt	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#9272)
Phospho-p38 (T180/Y182)	<i>Rabbit</i>	1:1000	Cell Signaling (#9211)
nSMase2	<i>Mouse</i>	1:500	Santa Cruz Biotechnologies, (sc166637)
β-tubulina	<i>Mouse</i>	1:10000	BD Pharmingen (#556321)
β-actina	<i>Mouse</i>	1:1000	Sigma-Aldrich
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Anti mouse HRP	<i>Goat</i>	1:5000	BioRad
Anti rabbit HRP	<i>Goat</i>	1:3000	Thermo Scientific

**Tabla 5. Anticuerpos y tinciones utilizados para el western blot, dilución de cada uno y casa comercial**

## 9.2. Dot Blot

El *dot blot* es una técnica de inmunodetección simple y rápida usada para detectar, analizar e identificar proteínas, similar al *western blot* pero, por el contrario a éste, en un *dot blot* las moléculas no son separadas en una electroforesis previa, sino que se aplican directamente a una membrana en forma de gotas circulares. Esta técnica también se puede aplicar para detectar interacciones entre 2 proteínas *in vitro*, utilizando una proteína “anzuelo” (*bait protein*) unida a la membrana y una segunda proteína “presa” (*prey protein*) de la cual se quiere saber si se une a la primera. En este caso se ha utilizado para detectar la unión entre el péptido D5 y el Hc-TeNT.

El péptido D5 fue producido sintéticamente (*Peptide Specialty Laboratories GmbH*, Heidelberg, Germany) con una secuencia homóloga a un segmento del dominio D5 extracelular de TrkB. Tal como se muestra a continuación, consta de 27 aminoácidos que incluyen 2 repeticiones del mismo fragmento, en el que se ha cambiado una metionina por una cisteína para ciclar el péptido.



El protocolo seguido es el siguiente. Primero se unen 10 y 20  $\mu\text{g}$  del péptido D5 (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) a una membrana de nitrocelulosa (*Whatman*, GE Healthcare), añadiéndolo sobre la membrana en gotas de 1  $\mu\text{L}$ , dejando secar la membrana entre gota y gota. Una vez unido el péptido a la membrana, se deja secar bien la membrana durante 1h y a continuación se bloquea con una solución al 5% de leche desnatada en TTBS durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente se realizan 3 lavados de 10 min cada uno con TTBS y luego se incuba la membrana en una solución a una concentración 1 mg/mL de Hc-TeNT o de Hc-A266-311-343 durante 1h más. Se lava la membrana 3 veces más con TTBS y pasa a incubarse con un anticuerpo primario a 4°C *o/n*. A la mañana siguiente se realizan 3 lavados más y se incuba el anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente. La membrana se revela siguiendo el mismo protocolo que en el caso del *western blot*. Como control negativo se añade al experimento un péptido, designado como H4, de igual tamaño al D5. Los puntos detectados son cuantificados con el programa *QuantityOne* (BioRad)

## 9.3. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es una técnica mediante la cual una proteína es precipitada de una solución usando un anticuerpo que se une específicamente a ella. Este anticuerpo debe estar acoplado a un substrato sólido, como la agarosa. Este proceso puede ser usado para aislar y concentrar una proteína particular de una muestra heterogénea.

Se utilizan células CGN sembradas en placas de 60 mm a una densidad de  $7 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup> de 7 DIV. 4h antes del tratamiento son privadas de suero (medio BME con 30 mM glucosa, 2 mM glutamina, 50 U/mL penicilina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomycin y 20 mM KCl). El tratamiento es realizado con 100 nM de Hc-TeNT o de Hc-A266-311-343 (20  $\mu\text{g}/\text{pozo}$ ), o con 50 ng/mL BDNF (Alomone), durante 1h a 37°C. Pasado este tiempo se aspira el medio y se lavan las células con PBS frío, y son resuspendidas en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se homogeniza la muestra con el homogeneizador de

*ependorf* y se incuba en hielo durante 30 min. La cantidad de proteína total se calcula con el ensayo del BCA.

Para cada inmunoprecipitación se preparan 500 µg de proteína total del lisado celular en un volumen final de 750 µL añadiendo *tampón* de lisis, y se adicionan 5 µL de anticuerpo anti fosfotirosinas acoplado a agarosa (PY99-AC, Santa Cruz). La mezcla se incuba a 4°C en rotación orbital *o/n* para permitir que el anticuerpo se una a su diana. Al día siguiente se centrifuga la muestra a 1700 x g durante 3 min a 4°C, se reserva el sobrenadante como control, y el sedimento se resuspende en 700 µL de *tampón* de lisis para eliminar las uniones inespecíficas del anticuerpo. Seguidamente se realizan tres lavados de 10 min cada uno en rotación a 4°C, utilizando cada vez una menor concentración de NP-40 en el *tampón* de lisis (primer lavado a 1% NP-40, segundo lavado a 0,1% y tercer lavado a 0%). Después del último lavado se centrifuga la muestra a 1700 x g durante 3 min, se resuspende el sedimento en 25 µL de *Loading Buffer 2X* (140 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,2% SDS, 22% glicerol, 0,02% *bromophenol blue*, 1% β-mercaptoetanol) y se desnaturaliza a 99°C durante 5 min para romper la unión de la agarosa con el anticuerpo. Finalmente las muestras son centrifugadas a 15000 x g durante 2 min, y se analizan mediante *western blot*.

#### 9.4. Inmunocitoquímica

Las CGN se siembran sobre cubreobjetos y después de 7 DIV se realiza el tratamiento correspondiente. A continuación se retira el medio de las células y se hace un lavado con PBS frío. La fijación de las células se realiza con en PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente y seguidamente se lavan 3 veces con PBS durante 10 min. Se bloquean los epítomos inespecíficos con solución de bloqueo (10% HS, 0,2% Triton X-100, 10 mM Glycine en PBS) durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se incuba *o/n* a 4°C el anticuerpo primario diluido 1/500 en solución de bloqueo. Al día siguiente se realizan 3 lavados con PBS + 0,2% Tween-20 de 10 min cada uno y se incuba durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo diluido 1/500 en solución de bloqueo. Se hacen 3 lavados más y se tiñen los núcleos con 0,5 µg/mL de DAPI durante 5 min. Finalmente se montan las preparaciones en el portaobjetos usando el medio de montaje *FluoromountG*. Las imágenes de las células fueron tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss) y el objetivo de 63X.



## **IV.RESULTADOS**



## **CAPÍTULO 1:**

### **PAPEL DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkB**

### **COMO RECEPTOR PROTEICO DE ALTA AFINIDAD PARA LA TOXINA**

### **TETÁNICA**



## 1. PAPEL DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TRKB COMO RECEPTOR PROTEICO DE ALTA AFINIDAD PARA LA TOXINA TETÁNICA

### 1.1. La toxina tetánica es capaz de acoplarse *in silico* a Los receptores Trk

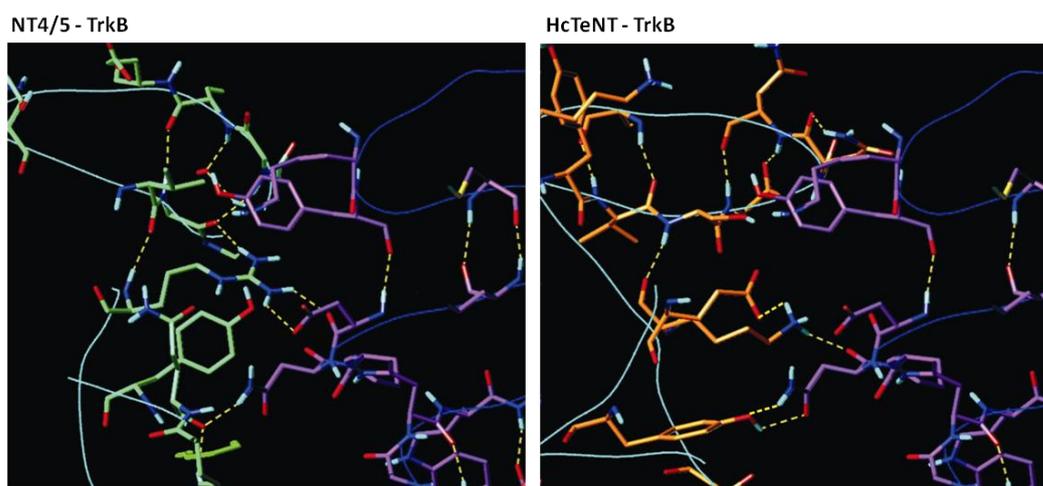
En publicaciones previas se ha podido observar indicios de que existe cierta interacción entre la toxina tetánica (TeNT), o de su dominio carboxilo terminal (Hc-TeNT), con los receptores de las neurotrofinas. Como ya se ha comentado anteriormente, el fragmento recombinante Hc-TeNT es transportado retrógradamente en motoneuronas en cultivo conjuntamente con neurotrofinas y sus receptores, coincidiendo en los mismos endosomas de señalización (Lalli and Schiavo, 2002; Deinhardt et al., 2006b). Además, en trabajos anteriores del Grupo, se ha demostrado que la TeNT entera, así como su dominio Hc aislado y expresado recombinantemente, son capaces de interactuar tanto con TrkA como con TrkB, provocando la dimerización, la autofosforilación de éstos en tirosinas y causando así la activación de las cascadas de señalización que de ellos se derivan (Gil et al., 2000, 2001, 2003; Chaïb-Oukadour et al., 2004). En base a todas estas evidencias se ha propuesto que la TeNT podría actuar sobre las neuronas mimetizando a las neurotrofinas, aprovechando su maquinaria de transporte retroaxonal para su proceso infectivo y poder llegar así hasta las neuronas del SNC. De esta manera la TeNT interactuaría con los receptores TrkA, TrkB, TrkC y/o p75<sup>NTR</sup> en los terminales presinápticos de las motoneuronas y se uniría a ellos, previa unión a los polisialogangliósidos, para endocitarse en las células diana.

En primer lugar, para estudiar si esta hipotética interacción entre el dominio Hc-TeNT y los receptores Trk es posible, se realiza una aproximación *in silico*. Utilizando diversos programas bioinformáticos se analizan las estructuras moleculares tanto de los receptores TrkA, TrkB y TrkC, como del dominio Hc para comprobar si es posible un acoplamiento entre ellas. Las estructuras se extraen de la base de datos del PDB (*Protein Data Bank*), donde están anotadas las estructuras cristalinas analizadas por cristalografía de rayos X. La estructura de la TeNT entera aún no ha sido resuelta, pero sí que se dispone de la estructura tridimensional del dominio Hc (código del PDB: 1AF9 (Umland et al., 1997), 1A8D (Knapp et al., 1998). También se dispone de varias estructuras en las que se ha cristalizado el Hc-TeNT conjuntamente con otras moléculas como gangliósidos o diversos azúcares. Por ejemplo se ha cristalizado el Hc-TeNT formando un complejo con una lactosa y el polisialogangliósido GT2 (3HN1, 3HMY, 1DLL) (Emsley et al., 2000; Chen et al., 2009), y también con una disialolactosa y el tripéptido YEW (1YXW, 1YYN) (Jayaraman et al., 2005). En cuanto a los receptores Trk, se dispone de la estructura tridimensional del dominio extracelular D5 de TrkA, TrkB y TrkC (1WWA, 1WWB, 1WWC respectivamente) (Ultsch et al., 1999). Este dominio D5 es un fragmento de la parte extracelular de los receptores donde se ha descrito se unen las diferentes neurotrofinas (McDonald and Chao, 1995; Banfield et al., 2001).

El estudio de modelado molecular realizado se ha basado en cuatro estructuras tridimensionales ya cristalizadas:

- El fragmento Hc-TeNT (PDB code: 1A8D) (Knapp et al., 1998)
- El dominio D5 de TrkA unido a NGF (PDB code: 1WWW) (Ultsch et al., 1999)
- El complejo entre NT-4/5 y el dominio D5 de TrkB (PDB code: 1HCF) (Banfield et al., 2001)
- La estructura completa de BoNT/B (PDB code: 1EPW) (Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000)

Tal y como se ha comentado no se dispone de la estructura cristalizada de la TeNT completa por lo que se ha trabajado con la del dominio Hc. Sin embargo, utilizando para el modelado tan solo la estructura del fragmento Hc-TeNT aislado, podrían cometerse errores como no considerar posibles impedimentos estéricos que pudieran existir en la unión a la neurotoxina entera. Para solucionar este problema y conseguir un modelo más exacto, se utiliza la estructura de la BoNT/B. Gracias a la gran homología existente entre todas las neurotoxinas clostridiales se puede utilizar la estructura de BoNT/B, que sí está resuelta, como sustituta de la TeNT. De esta manera se utiliza la estructura de BoNT/B como plantilla para encajar la estructura del fragmento Hc-TeNT. Así se consigue simular mejor la interacción entre la TeNT y los receptores, y valorar más cuidadosamente los posibles efectos estéricos. En base a todos estos datos, utilizando un *software* de modelado molecular, se modela una interfaz de unión entre Hc-TeNT y el dominio D5 de los diferentes receptores Trk y se definen las regiones que la componen. El *software* analiza si las superficies de las moléculas son complementarias y los impedimentos estéricos que pueden existir entre ellas, así como las interacciones electroestáticas y los posibles puentes de hidrógeno que entre ellas puedan formarse. Para modelar estas interfaces de unión se han utilizado como guía las estructuras conocidas del complejo formado por el dominio D5 de TrkA y NGF, y por el complejo D5-TrkB unido a NT-4/5. Aunque no existe homología de secuencia entre el dominio Hc-TeNT y NGF o NT-4/5, ya que presentan menos del 30% de similitud aminoacídica, sí que parece haber una analogía entre ellas, ya que ambas son capaces de unirse *in silico* al mismo dominio D5 de los Trk. Además la interfaz de unión que se forma entre la NT-4/5 y TrkB, y la calculada en el modelado entre Hc y TrkB presentan una elevada analogía entre ellas. Tanto la NT-4/5 como el Hc-TeNT se pliegan formando un bucle que sobresale de su estructura, tal y como se puede observar en la parte superior izquierda de cada panel de la Figura 25.



**Figura 25. Analogía entre la unión de la NT-4/5 a TrkB y la unión de TeNT a TrkB.**

Modelo estructural obtenido *in silico* del complejo formado por la NT-4/5 y TrkB (panel izquierdo) y del complejo formado por la TeNT y TrkB (panel derecho). El esqueleto de la NT-4/5 y la TeNT están dibujados como una línea de color azul claro, y el del TrkB en azul oscuro. Los puentes de hidrógeno formados están representados como líneas amarillas discontinuas. Código de colores: Átomos de Carbono de la NT-4/5 en verde, los átomos de Carbono de TeNT en naranja, los átomos de Carbono de TrkB en lila, de Oxígeno en rojo, de Nitrógeno en azul, y los átomos de Hidrógeno polares en azul claro.

El análisis bioinformático señala ciertos residuos de la secuencia de Hc-TeNT, situados en el dominio  $\beta$ -*trefoil*, que podrían estar directamente involucrados en la unión a los receptores Trk. Estos residuos, listados en la Tabla 6, se encontrarían formando uniones no covalentes con residuos del receptor, principalmente formando puentes de hidrógeno y puentes salinos. Estos tipos de interacciones son los principales contribuyentes en las interacciones electroestáticas entre proteínas, y juegan un papel importante en la unión. La numeración de los residuos de la TeNT corresponde a la posición que tienen dentro del dominio Hc-TeNT.

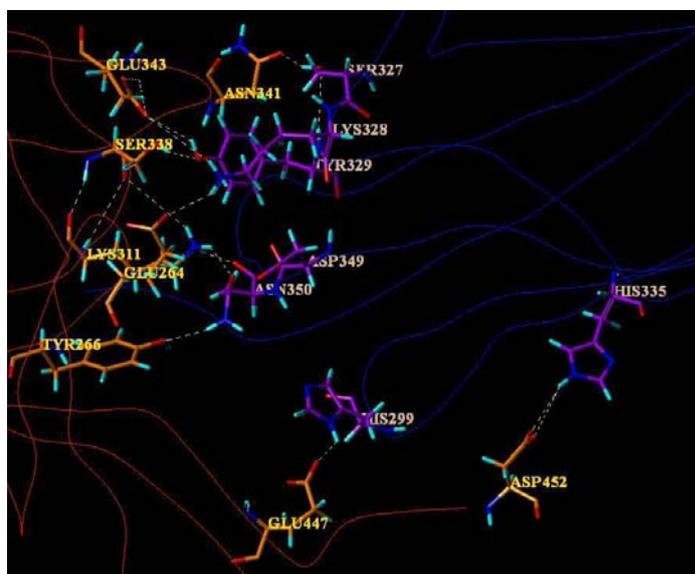
Residuos Hc-TeNT	Hc-TeNT y TrkA		Hc-TeNT y TrkB		Hc-TeNT y TrkC	
	Residuos TrkA	Tipo de interacción	Residuos TrkB	Tipo de interacción	Residuos TrkC	Tipo de interacción
N341	T325	H-bond	S327	H-bond	S345	H-bond
E264 E343	S326	n.o. n.o.	K328	+ - + -	K346	+ - + -
S338 E343	F327	n.o. n.o.	Y329	H-bond H-bond	I347	n.o. n.o.
K311	N349	H-bond	D349	+ -	N366	H-bond
E264 Y266 K311	Q350	n.o. H-bond H-bond	N350	n.o. H-bond H-bond	K367	+ - H-bond n.o.
E447	H297	H-bond / + -	H299	H-bond / + -	R316	+ -
D452	L333	n.o.	H335	H-bond / + -	Y353	H-bond / + -

**Tabla 6. Interacciones no covalentes observadas y calculadas en las interfaces de unión entre los receptores Trk y sus aceptores, y entre los receptores Trk y el fragmento Hc-TeNT.**

En la primera columna se presenta un listado de los residuos de Hc-TeNT que, según se ha calculado en el modelado molecular, podrían establecer interacciones no covalentes con los receptores Trk. Los residuos de cada receptor Trk implicados y el tipo de interacciones no covalentes que se formarían en la interfaz de unión de ambas moléculas se indican en las columnas 2 y 3 (complejo Hc-TeNT/TrkA), columnas 4 y 5 (complejo Hc-TeNT /TrkB) y columnas 6 y 7 (complejo Hc-TeNT /TrkC). Código: H-bond = puente de hidrógeno; + - = puente salino; n.o. = no observado.

En la primera columna de la Tabla 6 se detallan los residuos de Hc-TeNT que se ha calculado, según el modelo propuesto en este trabajo, que forman interacciones en la interfaz con los residuos de los receptores TrkA, TrkB y TrkC, listados en las columnas segunda, cuarta y sexta respectivamente. En las columnas 3, 5 y 7 se detalla el tipo de interacción no covalente que se da entre los residuos del Hc-TeNT y los de cada receptor. Tal y como se observa en la tabla, en la interfaz de unión entre Hc-TeNT y TrkA se calculan cinco posibles puentes de hidrógeno y un puente salino. En el caso del complejo Hc-TeNT/TrkB se ha calculado que podrían formarse entre ambas moléculas siete puentes de hidrógeno y cinco puentes salinos, lo cual indica que sería una interacción muy fuerte. Finalmente entre Hc-TeNT y TrkC se podrían formar cuatro puentes de hidrógeno y cinco puentes salinos. Por lo tanto, según el modelado molecular realizado, el Hc-TeNT interaccionaría más fuertemente con TrkB que con TrkA y TrkC, ya que entre ambas moléculas se forman un mayor número de enlaces. Por este motivo el siguiente estudio se centrará en el receptor TrkB y en su interacción con el Hc-TeNT a través de su dominio D5. La Figura 27 muestra una imagen más detallada de la interfaz de unión entre Hc-TeNT y TrkB, con los residuos implicados de cada molécula. Los aminoácidos de Hc-TeNT que según el estudio estarían implicados en la unión, están listados en la Tabla 6 (primera columna) y son,

en orden de relevancia: K311, Y266, E343 o S338, E264, N341, E447 y D452.



**Figura 27. Modelo molecular propuesto para la interfaz de unión entre TeNT y el receptor TrkB.**

Se muestran detallados los aminoácidos de la TeNT y del TrkB implicados en la interfaz de unión entre ambas moléculas. La numeración de los residuos corresponde a la posición que tienen dentro del dominio Hc-TeNT. Los átomos de C de la TeNT y su esqueleto están marcados en naranja mientras que los de TrkB están dibujados en color lila. Las interacciones no covalentes formadas se representan como líneas amarillas discontinuas. Código de colores: Átomos oxígeno en rojo, átomos de nitrógeno en azul, átomos de hidrógeno polares en azul claro.

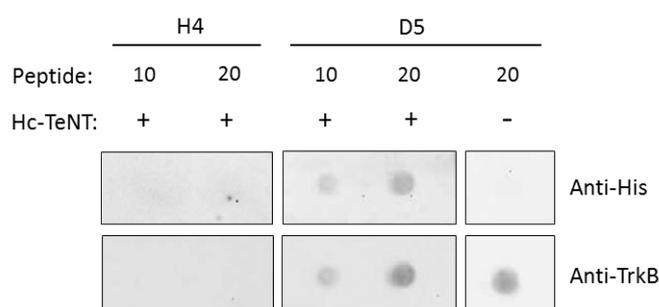
El modelo molecular realizado revela que el dominio Hc-TeNT es capaz de acoplarse perfectamente en el dominio D5 del receptor TrkB, tal y como se puede observar en la Figura 27. En el modelo propuesto los bolsillos de unión a carbohidratos W y R son complementados con un nuevo sitio de unión situado en un bucle en la estructura del dominio Hcc-TeNT. Este sitio de unión, que se encuentra a medio camino entre los dos sitios de unión a gangliósidos, se acopla perfectamente al dominio extracelular de unión D5 de los receptores Trk. Por lo tanto, en este modelo, la asociación de Hc-TeNT con TrkB no interferiría en la interacción entre Hc-TeNT y los polisialogangliósidos de membrana, ya que el nuevo sitio de unión descrito se encuentra a distancia suficiente de los dos sitios de unión a gangliósidos descritos. De esta manera tanto los polisialogangliósidos como el TrkB podrían unirse a Hc-TeNT simultáneamente tal y como postula la teoría del receptor dual.

## 1.2. Hc-TeNT interactúa con el receptor TrkB en cultivos neuronales

### 1.2.1. El fragmento Hc-TeNT se une a un péptido homólogo al dominio D5 de TrkB

En el apartado anterior se ha comprobado que la unión entre la TeNT y el receptor TrkB no tan solo es posible *in silico*, sino que además ambas moléculas encajan perfectamente y se dan interacciones no covalentes muy fuertes entre ellas. Por lo tanto, el siguiente paso en el estudio de esta unión es

validar bioquímicamente los datos obtenidos en el análisis computacional. El modelo molecular propuesto para la unión de Hc-TeNT a TrkB indica que la neurotoxina se uniría concretamente al dominio extracelular D5, al cual se unen también el resto de neurotrofinas. Por este motivo se sintetiza un péptido con una secuencia homóloga al dominio D5 de TrkB, al que nos referiremos como péptido D5. Es un péptido ciclado que consta de una doble repetición de unos 13 aminoácidos idénticos a la secuencia de una región del dominio D5 (la secuencia exacta está descrita en el apartado 9.2. de Materiales y métodos. Una manera de comprobar bioquímicamente si esta interacción entre Hc-TeNT y TrkB se da *in vitro* es mediante un ensayo de *dot-blot*. En este ensayo se adhieren dos cantidades del péptido D5 (10  $\mu$ g y 20  $\mu$ g) a una membrana de nitrocelulosa, y a continuación, se incuba esta membrana con el dominio Hc-TeNT expresado recombinantemente tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Revelando la membrana con un anticuerpo contra la cola de polihistidinas de la proteína recombinante Hc-TeNT, se consigue detectar si hay Hc-TeNT unido al péptido, y mediante un anticuerpo contra TrkB se detecta el péptido D5 unido a la membrana de nitrocelulosa.



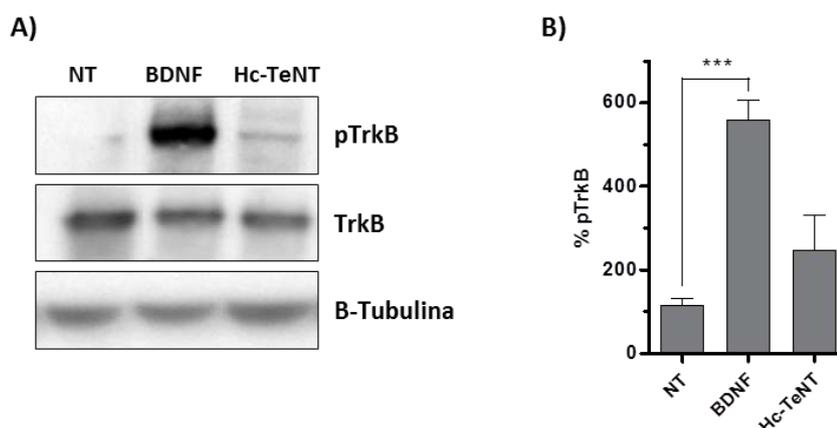
**Figura 28. El fragmento Hc-TeNT se une *in vitro* a un péptido sintético basado en el dominio D5 de TrkB.**

El péptido D5 se une a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente es bloqueada e incubada con Hc-TeNT. El *dot-blot* se analiza utilizando un anticuerpo contra polihistidinas y otro contra TrkB. Los controles sin Hc-TeNT o sin péptido D5 se analizan en paralelo.

Tal y como se demuestra en la Figura 28, el Hc-TeNT es capaz de unirse específicamente al péptido D5. A mayor cantidad de péptido unido a la membrana, mayor cantidad de Hc-TeNT unida a él, detectándose aproximadamente el doble de Hc-TeNT en la condición con 20  $\mu$ g que en la de 10  $\mu$ g. Además el control con péptido D5 y sin Hc-TeNT, demuestra que no hay inespecificidad de los anticuerpos utilizados. Como comprobación de que esta unión al péptido D5 es específica, se realiza un ensayo de *dot-blot* en paralelo, utilizando otro péptido sintético del mismo tamaño y de secuencia aleatoria denominado péptido H4. De este péptido se adhieren también 10  $\mu$ g y 20  $\mu$ g en la membrana y posteriormente se incuba con Hc-TeNT. Como se puede observar en la Figura 28 no hay Hc-TeNT unida al péptido H4 en ninguna condición, por lo cual se puede deducir que la unión al péptido D5 es específica. Por lo tanto el experimento parece corroborar el estudio de modelado molecular y que el Hc-TeNT tiene capacidad de unirse al dominio extracelular D5 de TrkB, al igual que se unen sus agonistas endógenos específicos.

### 1.2.2. El Hc-TeNT es capaz de inducir la fosforilación del receptor TrkB

Una vez demostrada la unión *in vitro* en el apartado anterior, el siguiente objetivo propuesto es determinar si esta unión viene acompañada de una activación del receptor. Los receptores Trk sufren un cambio conformacional al unirse a sus agonistas, lo que promueve la autofosforilación de varios residuos de tirosina situados en el dominio citosólico. Así que si la TeNT está interactuando con TrkB mimetizando a la NT-4/5 o al BDNF debería causar también este efecto de fosforilación en el receptor. En trabajos previos del Grupo se ha descrito que el tratamiento con Hc-TeNT o con la neurotoxina entera en neuronas corticales provoca la activación de varias vías de señalización dependientes de Trk (Gil et al., 2003). En este caso se han determinado los niveles de fosforilación de TrkB en neuronas granulares de cerebelo (CGNs) después de un tratamiento con Hc-TeNT. Las CGNs de rata se desarrollan de forma postnatal, y expresan en su superficie los receptores TrkB, p75<sup>NTR</sup> y TrkC en menor proporción, y no expresan TrkA (Nonomura et al., 1996; Courtney et al., 1997). Anteriormente en el Grupo se había descrito en CGNs activación de Akt y ERK-1/2 después de un tratamiento con Hc-TeNT. También se había observado fosforilación de receptores Trk en general y concretamente de TrkB mediante una inmunoprecipitación contra fosfotirosinas (Chaïb-Oukadour et al., 2004). En este caso se ha utilizado un anticuerpo específico contra TrkB fosforilado en el residuo Y705. Al unirse las neurotrofinas al receptor TrkB inducen su dimerización y provocan que se autofosfore en las Y705/Y706, presentes en su dominio catalítico intracelular. A su vez esto induce la fosforilación de los residuos Y515 y Y816, que funcionan como sitios de reclutamiento y activación de las vías de señalización Ras-MAPK, PI3K-Akt y PLC $\gamma$ 1-PKC (Huang and Reichardt, 2003).



**Figura 29. Niveles de TrkB fosforilado en CGN después de un tratamiento con Hc-TeNT.**

Las neuronas granulares de cerebelo son privadas de suero y en bajas concentraciones de potasio previamente al tratamiento. Se añade 10 nM de Hc-TeNT o 50 ng/mL de BDNF durante 10 min. Los lisados celulares se analizan mediante western blot para detectar los niveles de pTrkB(Y705), TrkB total y  $\beta$ -tubulina. \*\*\*  $p < 0,001$  utilizando *one-way* ANOVA con un test de comparación múltiple de Dunnett.

En el experimento las neuronas se privan de suero y se reduce el potasio a 5 mM durante 4h para disminuir los niveles endógenos de fosforilación, y posteriormente se tratan con 10 nM de Hc-TeNT o con 50 ng/mL de BDNF durante 10 min. El BDNF es el principal agonista endógeno de TrkB que

provoca su activación en unirse a él, por lo cual se ha utilizado como control positivo. Las neuronas se lisan y se analizan mediante western blot, cargando 30  $\mu\text{g}$  de proteína total por condición y siguiendo el protocolo detallado en el Apartado 9.1. de Materiales y métodos. En la Figura 29 se muestran los niveles de pTrkB (Y705), así como los niveles de TrkB total y los de  $\beta$ -tubulina. Se observa como la condición no tratada, prácticamente no expresa pTrkB, mientras que los tratamientos con BDNF o con Hc-TeNT inducen un aumento de la fosforilación. En la gráfica de la Figura 29B se muestra el porcentaje de pTrkB, estandarizado por los niveles de TrkB total, en cada condición respecto a la condición sin tratamiento. El Hc-TeNT induce la activación del receptor aunque no de manera tan significativa como el BDNF a las condiciones fijadas. Los niveles de expresión de TrkB total y de  $\beta$ -tubulina se mantienen invariables en todas las condiciones.

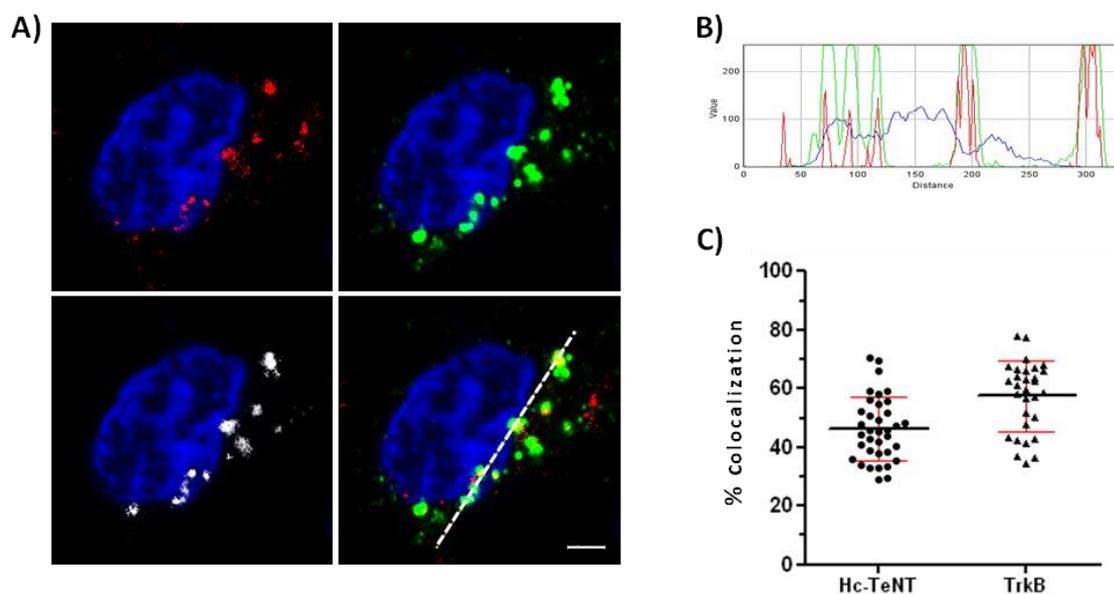
### 1.2.3. El Hc-TeNT colocaliza con TrkB en neuronas en cultivo

Se ha comprobado que Hc-TeNT y TrkB son capaces de interactuar *in vitro*, y parece que esta interacción podría resultar en la fosforilación del receptor. Otro aspecto interesante que se plantea es si, al igual que las neurotrofinas, el fragmento Hc-TeNT se internaliza en neuronas acompañado del receptor TrkB. Como ya se ha comentado en la introducción, la TeNT se une en primer lugar a los polisialogangliósidos presentes en las membranas neuronales, hasta que encuentra a su receptor proteico, que es el que promueve su internalización dentro de las neuronas. De esta manera el receptor proteico quedaría endocitado junto con la neurotoxina en las mismas vesículas. Ha sido descrito que TrkB y Hc-TeNT colocalizan en motoneuronas en cultivos, y que viajan juntos retroaxonalmente hasta el soma neuronal en el mismo tipo de endosomas (Deinhardt et al., 2006b). Por lo tanto el siguiente objetivo es comprobar si ambas moléculas también se encuentran localizadas conjuntamente en las mismas estructuras celulares en el modelo celular de neuronas granulares en el que se está trabajando.

Las CGNs se incuban con Hc-TeNT (20 nM) acoplado al fluoróforo AlexaFluor555 durante 1h a 37°C para promover su endocitosis. Al mismo tiempo se incuban en el cultivo un anticuerpo contra TrkB que se unirá al receptor presente en la superficie celular y que será internalizado con él. Transcurrido este tiempo se realiza un lavado de las células con una solución ácida para eliminar el marcaje del Hc-TeNT que haya quedado unido a la membrana sin internalizarse, y a continuación se realiza una inmunocitoquímica y se analizan las neuronas mediante microscopía confocal. El resultado se muestra en la Figura 30A, donde el Hc-TeNT que ha sido endocitado está marcado con AlexaFluor555 en color rojo, mientras que el TrkB es detectado mediante un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488 (marcaje en verde). Los núcleos de las neuronas han sido teñidos con DAPI y se visualizan en la imagen en color azul.

Tal y como se observa en la Figura 30, existe una elevada coincidencia entre el marcaje del Hc-TeNT y el del TrkB en el interior de las células. Ambas moléculas parecen encontrarse localizadas en las mismas vesículas endocíticas repartidas por todo el citoplasma y en las neuritas, coincidiendo sobretodo en la zona perinuclear. Mediante el *software* ImageJ se analiza con más detalle la intensidad de fluorescencia detectada para cada canal a lo largo de la línea blanca trazada en la Figura 30A (panel de abajo a la derecha). El perfil de intensidades de señal obtenido demuestra como los

picos de señal del canal rojo (Hc-TeNT) coinciden perfectamente con los del canal verde (TrkB). Los píxeles en los que solapan las señales verde y roja son detectados con el *software* Imaris y se muestran marcados en blanco en el panel inferior izquierda de la Figura 30A. Este mismo programa permite determinar también el grado de colocalización entre las dos moléculas, mediante el cálculo del porcentaje de píxeles de un canal que colocalizan con píxeles del otro canal. Se han analizado un total de 35 campos obteniendo que, aproximadamente un  $46,95\% \pm 7,17\%$  del Hc-TeNT marcado colocaliza con TrkB, mientras que alrededor de un  $61,24\% \pm 11,1\%$  del TrkB marcado coincide con Hc-TeNT. Esto indica que casi la mitad del Hc-TeNT internalizado se encuentra asociado a TrkB en las mismas estructuras celulares, por lo que se puede deducir que han sido endocitados conjuntamente.



**Figura 30. Colocalización entre Hc-TeNT y TrkB en un cultivo de CGN.**

(A) Inmunocitoquímica de la internalización de Hc-TeNT (marcado en rojo) en cultivos de CGN. En color verde está marcado el TrkB y los núcleos han sido teñidos con DAPI (marcado en azul). En el panel de abajo a la derecha se muestra el *merge* de los diferentes canales. Los píxeles colocalizados se marcan en blanco (panel abajo izquierda). (Escala = 2  $\mu$ m). (B) Perfil de intensidad de señal de los diferentes canales en la sección marcada con una línea discontinua blanca en (A). (C) Porcentajes de colocalización para TrkB y Hc-TeNT calculados en Imaris. Se analizaron un total de 35 campos de dos experimentos independientes.

Existen varias razones que explicarían el casi 50% de Hc-TeNT restante que no se encuentra colocalizado compartiendo vesículas con TrkB. Por un lado este Hc-TeNT podría haber entrado mediante un mecanismo de endocitosis diferente como podría ser el reciclaje de vesículas sinápticas dependiente de actividad, y por otro lado podría ser que se hubiese unido a otro receptor de la membrana que permita también su endocitosis. Este tipo neuronal expresa también TrkC y p75<sup>NTR</sup>, como ya se ha comentado, y en el análisis *in silico* se ha visto como Hc-TeNT podría formar varias interacciones no covalentes con TrkC. En el caso del TrkB más de la mitad del receptor marcado, aproximadamente el 60%, coincide con Hc-TeNT localizándose en el mismo tipo de vesículas. Como el anticuerpo primario se añadió en el mismo medio de cultivo solo pudo acceder y unirse al TrkB

presente en la superficie de la membrana. Por esta razón se asume que todo el TrkB que se ha marcado en la célula fue endocitado durante la hora de incubación y no se trata de TrkB sintetizado de nuevo por la célula o que se encontrara en otras estructuras internas. De esta manera se puede deducir que el Hc-TeNT se unió a aproximadamente el 60% del TrkB marcado en membrana y ambas moléculas se internalizaron conjuntamente en la célula. El receptor marcado no colocalizado podría haberse internalizado por interacción con otros agonistas presentes en el medio de cultivo, o bien podría haberse endocitado con Hc-TeNT y más tarde haber sido redirigidos hacia diferentes compartimentos endocíticos, como podrían ser los lisosomas.

#### **1.2.4. Hc-TeNT compite con BDNF por la unión a membrana en neuronas granulares**

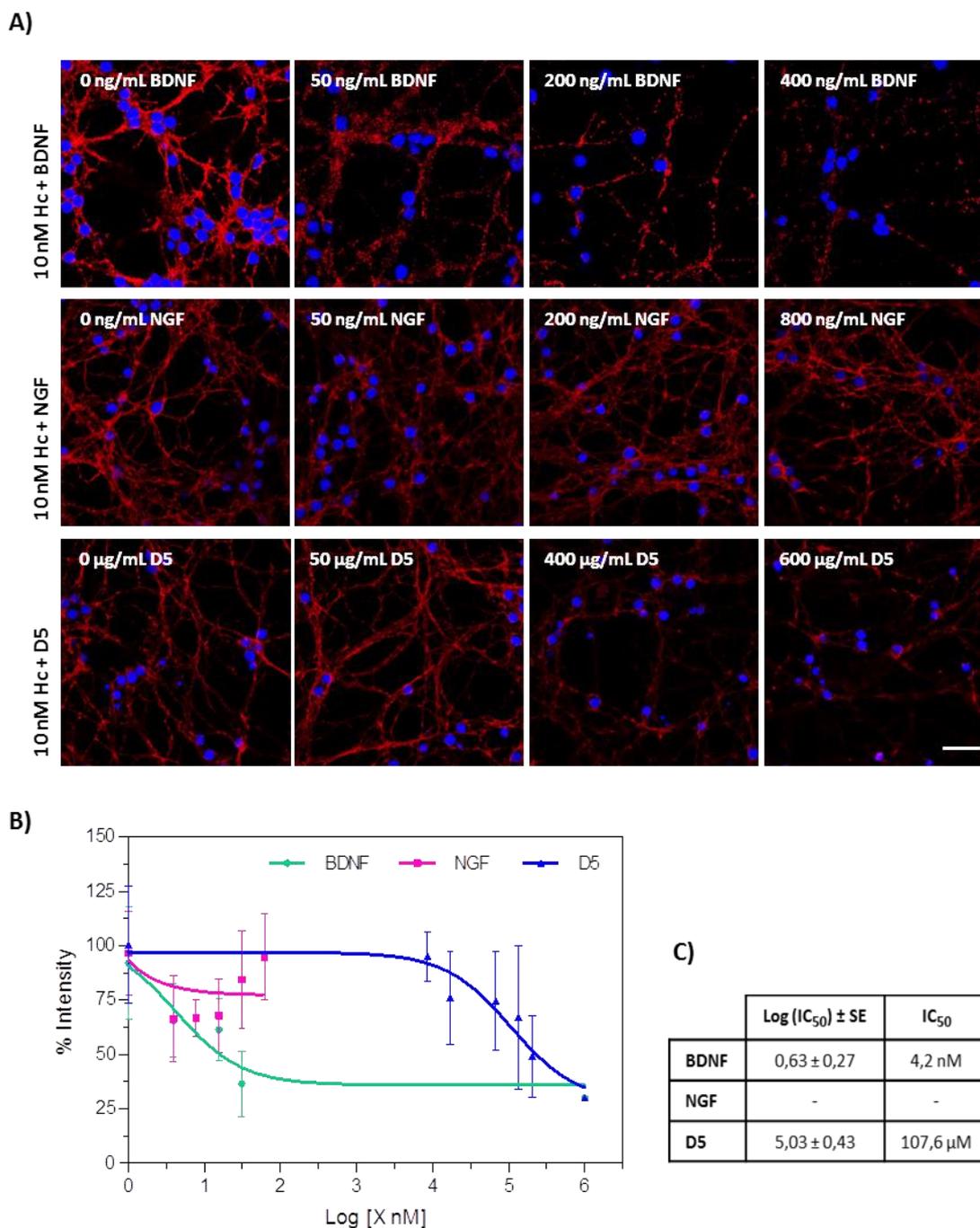
Con los experimentos anteriores se ha demostrado que Hc-TeNT es capaz de provocar una fosforilación en el receptor TrkB, y que además se une a un péptido basado en el dominio extracelular D5 del receptor. Para investigar hasta qué punto esta interacción con TrkB es específica se han realizado ensayos de unión al receptor en presencia de otras moléculas competidoras. Los experimentos de unión competitivos miden la unión de una molécula marcada a una concentración determinada en presencia de varias concentraciones de competidor no marcado. Si la unión de Hc-TeNT es desplazada por la presencia de otros ligandos específicos de TrkB significa que ambas moléculas estarían compitiendo por el mismo sitio de unión específico al receptor. En el ensayo de desplazamiento de unión se han utilizado dos neurotrofinas diferentes. Por un lado se utiliza BDNF como agonista endógeno de TrkB, y por otro lado se utiliza NGF, que se une específicamente al receptor TrkA. El NGF en este modelo estaría interactuando principalmente con p75<sup>NTR</sup>, ya que su receptor de muy alta afinidad TrkA no es expresado en estas neuronas. Ambas moléculas además se unen con menor afinidad a p75<sup>NTR</sup>. De esta manera el NGF servirá como control negativo al ser una molécula que se conoce no interacciona con TrkB pero con características similares al BDNF. También se ha utilizado el péptido D5, homólogo al sitio de unión en TrkB, para bloquear el posible sitio de unión en Hc-TeNT a TrkB.

Para realizar los ensayos de desplazamiento se incuban los cultivos de CGNs de 7 DIV con 10 nM de Hc-TeNT marcado con AlexaFluor555 durante 30 min a 4°C, condiciones que permiten la unión a la membrana plasmática pero no la internalización. Al mismo tiempo se añaden también las diferentes moléculas de estudio a concentraciones crecientes en cada condición, detalladas en el apartado 6.1. de Materiales y métodos. Transcurridos los 30 min de incubación se realiza la fijación de las células, se tiñen los núcleos con DAPI y las neuronas son analizadas mediante microscopia confocal. En la Figura 31A se observa una muestra representativa de las imágenes tomadas en las diferentes condiciones. El marcaje en rojo corresponde al Hc-TeNT-A555 y los núcleos de las células se visualizan en color azul. Tal y como se puede observar, la adición de BDNF en el cultivo provoca una disminución del marcaje de Hc-TeNT, que se hace más pronunciada cuanto más cantidad de competidor se añade. En la condición con mayor concentración de BDNF (400 ng/mL) se puede observar claramente una menor cantidad de Hc-TeNT unido a membrana en comparación con el control sin competidor. En el caso del NGF, en las concentraciones ensayadas no se observa ningún efecto en la cantidad de Hc-TeNT unida a membrana, por lo cual no parece competir por la unión al receptor. Finalmente el péptido D5

provoca también un desplazamiento de la unión de Hc-TeNT a las células, aunque en un rango de concentraciones superior al observado para BDNF.

La cantidad de Hc-TeNT unido a membrana en cada condición es cuantificada mediante el programa ImageJ, que permite calcular la intensidad de fluorescencia del canal rojo. Los datos obtenidos en cada condición se ajustan en un modelo de regresión no lineal para obtener las curvas de competición y determinar así el valor de la  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration 50%*) de cada molécula. La  $IC_{50}$  es la concentración de competidor no marcado necesaria para desplazar el 50% del Hc-TeNT unido específicamente. Las curvas de competición obtenidas se muestran en la gráfica de la Figura 31B. En el eje horizontal se representan las diferentes cantidades de competidor ensayadas expresadas como logaritmo de la concentración de competidor. El eje vertical se expresa en porcentaje de intensidad de fluorescencia, de manera que la parte superior de la curva (100%) indica la intensidad en la condición de unión total del Hc-TeNT a las células en ausencia de competidor. La parte inferior de la curva indica la intensidad del Hc-TeNT que permanece unido inespecíficamente a la máxima concentración de competidor, es decir, el Hc-TeNT que no es desplazado por el competidor. En este caso con la adición de la máxima concentración de competidor se consigue disminuir la unión del Hc-TeNT hasta el 30% aproximadamente. Este Hc-TeNT que sigue unido a la membrana puede encontrarse unido inespecíficamente a las células o puede ser el Hc-TeNT unido a los polisialogangliósidos de la membrana, ya que los competidores añadidos no compiten en principio por el sitio de unión a gangliósidos. Como no se han podido hacer un rango de concentraciones de competidor suficiente para definir bien la fase de *plateau* final, el programa no puede calcular el valor de la  $IC_{50}$  con suficiente precisión. Para solucionar este problema se añade un punto no experimental en las curvas de BDNF y de péptido D5, fijando una intensidad del 30% a una concentración de competidor de 1mM. En la gráfica se puede observar cómo tanto el BDNF (representado en verde) como el péptido D5 (en azul) son capaces de competir con Hc-TeNT por la unión a las células y desplazarlo, aunque el D5 a una concentración mucho más elevada. El tratamiento con NGF no provoca una disminución de la intensidad de marcaje del Hc-TeNT, por lo cual no se puede ajustar a ninguna curva, ya que ésta queda interrumpida y el programa no puede calcular una  $IC_{50}$ . En la tabla de la Figura 31C se muestran las constantes de inhibición calculadas para cada competidor. El BDNF presenta una  $IC_{50}$  de 4,2 nM (60 ng/mL) mientras que para el péptido D5 es de 107,6  $\mu$ M (317,3  $\mu$ g/mL). Cuanto mayor sea la afinidad del competidor por el receptor, la  $IC_{50}$  calculada será menor, ya que se necesitará una menor concentración del competidor para desplazar la molécula de interés.

El BDNF es un agonista natural de TrkB y presenta una constante de disociación ( $K_D$ ) muy alta por el receptor, calculada por algunos grupos en 1 nM aproximadamente y por otros alrededor de 10 pM, según la técnica utilizada para determinarla (Soppet et al., 1991; Dechant et al., 1993; Urfer et al., 1995; Windisch et al., 1995). El hecho de que BDNF sea capaz de desplazar la unión de Hc-TeNT de la membrana, indica que ambas moléculas compiten por un mismo sitio de unión a su receptor. En el modelo celular utilizado de neuronas granulares de cerebelo el BDNF se encuentra interactuando principalmente con TrkB y también, aunque con menor afinidad, con  $p75^{NTR}$ .



**Figura 31. El BDNF y el péptido D5, pero no NGF, compiten con Hc-TeNT por la unión a neuronas granulares de cerebelo.** **(A)** Las células fueron tratadas durante 30 min a 4°C con Hc-TeNT acoplado a AlexaFluor555 (marcado en rojo en la imagen) añadiendo en cada punto concentraciones crecientes de BDNF, NGF o del péptido D5. Las neuronas fueron fijadas y los núcleos teñidos con DAPI (marcado en azul). Se toman imágenes en el microscopio confocal y se analizan para medir la media de intensidad de señal del canal rojo en cada condición. (Escala 20 μm). **(B)** Las curvas de competencia por la unión obtenidas con los distintos competidores se muestran en la gráfica (la competición con BDNF en verde, con NGF en lila y en azul para el péptido D5). **(C)** Tabla con las constantes de inhibición calculadas para cada curva utilizando el *software* GraphPad Prism.

La condición con NGF permite descartar que el desplazamiento del Hc-TeNT producido por BDNF sea debido a una competencia entre las dos moléculas por el receptor p75<sup>NTR</sup>, ya que de ser así, la adición de NGF también provocaría una disminución del Hc-TeNT unido. Por lo tanto parece ser que el efecto de desplazamiento observado con BDNF es debido a una competencia por TrkB, y no por p75<sup>NTR</sup> en este modelo.

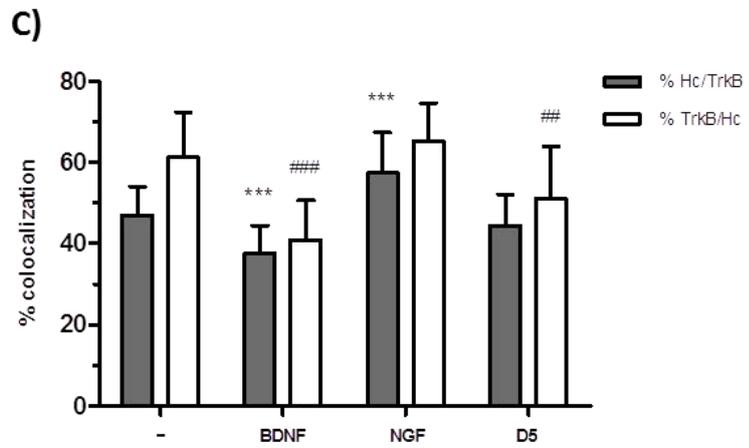
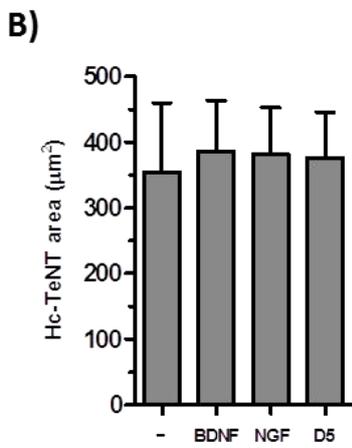
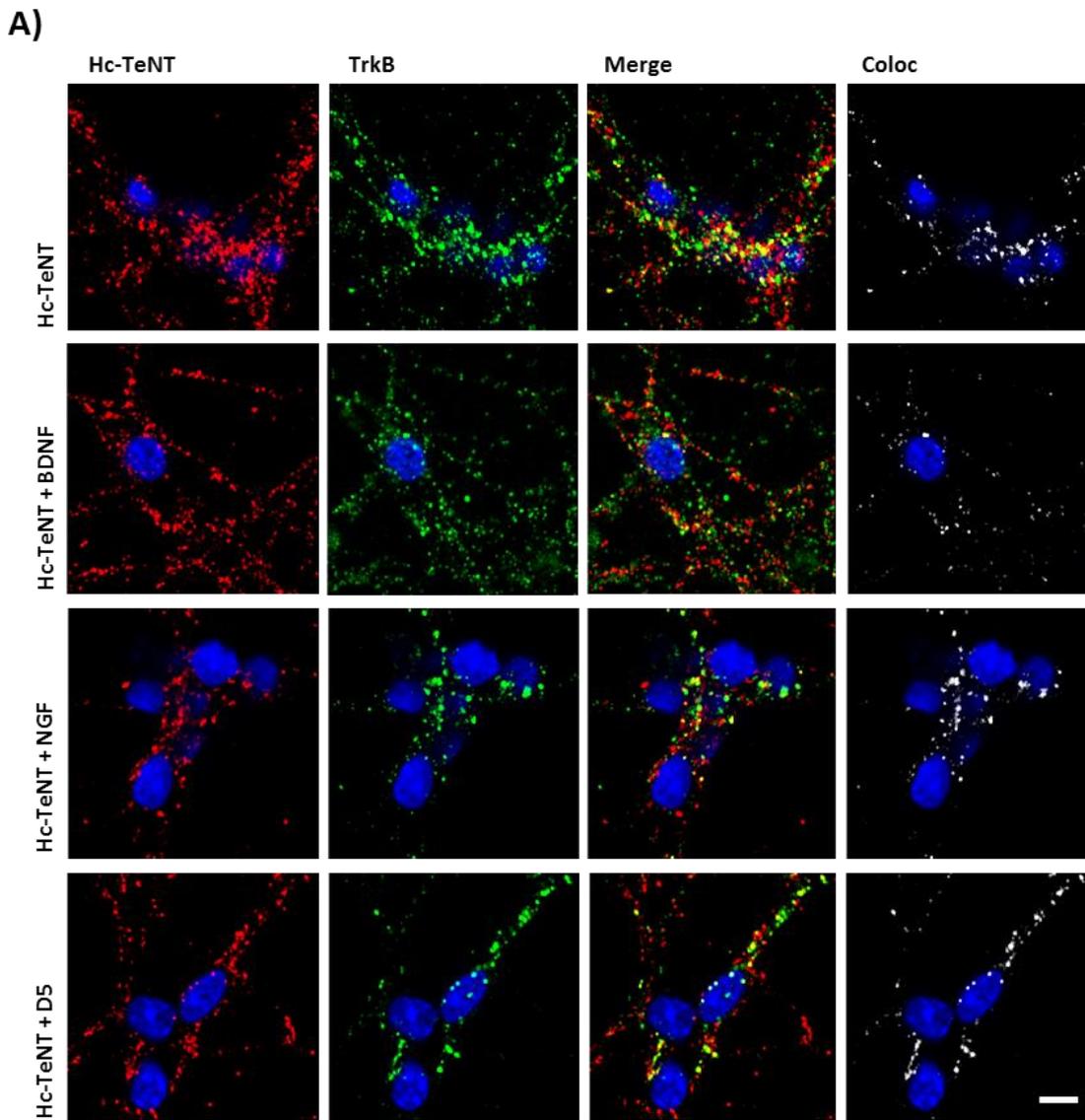
Según los estudios *in vitro* previos el péptido D5 se une en el sitio de unión de Hc-TeNT a TrkB, bloqueando así la región responsable de la interacción con el receptor e impidiendo que se unan. El resultado de los ensayos de competición corroboran esta idea aunque el péptido D5 desplaza el Hc-TeNT unido con una eficacia mucho menor que el BDNF. El hecho de que sean necesarias concentraciones tan altas del péptido D5 para desplazar la unión del Hc-TeNT indica que, o bien hay otras regiones en Hc-TeNT implicadas en la unión que no son bloqueadas por este péptido, o bien que el péptido no es suficientemente grande como para bloquear toda la zona de interacción.

### **1.2.5. BDNF desplaza la interacción entre Hc-TeNT y TrkB en vesículas endocíticas**

En el apartado anterior hemos visto como el BDNF, un agonista endógeno de TrkB, es capaz de competir por la unión a membrana plasmática con Hc-TeNT, indicando de esta manera que ambas moléculas compiten por un mismo sitio de unión en el receptor. También el péptido D5 es capaz de unirse y bloquear el Hc-TeNT, desplazando así su unión a las CGNs. El hecho de que la unión de Hc-TeNT a las membranas celulares se vea disminuida por la presencia de estas moléculas sugiere que, al reducir su unión al receptor, también su capacidad de internalización podría encontrarse afectada. Para comprobarlo se han realizado ensayos de internalización de Hc-TeNT en presencia de los mismos competidores utilizados anteriormente: BDNF, NGF y el péptido D5. En los experimentos, se añade 20 nM de Hc-TeNT marcado con AlexaFluor555 en un cultivo de CGNs y se incuban a 37°C durante 1h, de forma que se permita la internalización de la proteína en las células. En las condiciones con competidor se añade 20 µM del péptido D5, 400 ng/mL de BDNF (30 nM) o 400 ng/mL de NGF (30 nM) según corresponda. En el caso del péptido D5, éste se preincuba con el Hc-TeNT-A555 a temperatura ambiente durante 1h y a continuación son simultáneamente añadidos en el cultivo. También se añade en el cultivo un anticuerpo contra TrkB, que reconocerá al receptor expresado en la membrana y será endocitado con él. Transcurrida la hora de incubación se realiza un lavado de las células con una solución ácida, que eliminará el marcaje de Hc-TeNT que haya quedado en la membrana plasmática. Este lavado ácido permite diferenciar correctamente el Hc-TeNT endocitado del que queda en membrana, de manera que no se confundan los efectos en la internalización con los efectos en la unión. A continuación se procede a realizar una inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo del apartado 6.2. de Materiales y métodos, en la que se utiliza un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488 para detectar el TrkB y los núcleos son teñidos con DAPI. Las células se analizan mediante microscopía confocal y se contabilizan un mínimo de 20 campos por condición. El resultado se muestra en la Figura 32A, donde el Hc-TeNT-A555 que ha sido endocitado está marcado en color rojo, el TrkB en color verde y los núcleos de las neuronas se visualizan en color azul. En primer lugar se analiza la cantidad de Hc-TeNT que ha sido internalizado en la célula en cada condición. Para ello se calcula el área ocupada por el marcaje de Hc-TeNT en las imágenes mediante el programa ImageJ. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la Figura 32B y, tal y como

se puede observar, no se detectan cambios en la cantidad de Hc-TeNT endocitado entre la condición control y las condiciones con competidor. Este resultado parece contradecirse con el observado en el desplazamiento del Hc-TeNT unido a membrana en presencia de los mismos competidores. En este caso, ni el BDNF ni el péptido D5 parecen bloquear la internalización del Hc-TeNT, mientras sí que competían por la unión a la membrana plasmática.

El hecho de que la cantidad total de Hc-TeNT endocitada no se vea afectada por la adición de los competidores nos hace plantear si el nivel de colocalización entre TrkB y Hc-TeNT se mantendrá también invariable. Parece ser que la proteína se está internalizando en igual cantidad pero podría ser que lo estuviera haciendo de distinta manera, por un mecanismo diferente independiente de TrkB. Ya se ha mostrado que en neuronas granulares en cultivo tratadas con Hc-TeNT, aproximadamente un 47% de la proteína colocaliza con TrkB en las mismas vesículas endocíticas (Figura 30). Así que también en estos ensayos de internalización se determina también el porcentaje de colocalización entre Hc-TeNT y TrkB de la misma manera, para comprobar si hay diferencias entre las distintas condiciones. Los píxeles colocalizados están marcados en blanco en la Figura 32A, y en la Gráfica 32C se muestran los porcentajes de colocalización calculados de Hc-TeNT con TrkB y viceversa. Los resultados indican que en presencia de BDNF se da una disminución significativa del Hc-TeNT asociado con TrkB, reduciéndose el porcentaje de colocalización hasta el 37% aproximadamente. Paralelamente también el porcentaje de TrkB colocalizado con Hc-TeNT disminuye, pasando de un 61% a un 40%. Esto probablemente es debido a que el BDNF añadido, que es el ligando específico de TrkB, se esté uniendo al receptor con mayor afinidad que el Hc-TeNT. El BDNF ocuparía prioritariamente los sitios de unión y sería internalizado conjuntamente con TrkB, desplazando de estas vesículas endocíticas al Hc-TeNT. En la condición con NGF se observa un efecto contrario al del BDNF, ya que al añadir esta neurotrofina aumenta el porcentaje de solapamiento entre Hc-TeNT y TrkB, que llega a alcanzar un 57% aproximadamente. En este caso la cantidad de TrkB colocalizado con Hc-TeNT no cambia significativamente. El hecho de que la adición de NGF favorezca la interacción entre Hc-TeNT y TrkB podría explicarse si el Hc-TeNT, al igual que otras neurotrofinas, pudiera unirse a más de un receptor de neurotrofinas. De esta manera el NGF estaría desplazando la interacción entre Hc-TeNT y este otro receptor y aumentaría la cantidad de toxina disponible para interactuar con TrkB. Como ya se ha comentado, el NGF tan solo interactúa con  $p75^{NTR}$  en este modelo celular. Se ha descrito que Hc-TeNT y  $p75^{NTR}$  comparten vesículas endocíticas en motoneuronas en cultivo, así como que ambas moléculas son capaces de interactuar y provocar la activación de ciertas vías de señalización (Lalli and Schiavo, 2002; Cubí et al., 2013). Si el NGF añadido está interactuando con el  $p75^{NTR}$  presente en las células, desplazaría una hipotética unión entre Hc-TeNT y  $p75^{NTR}$ , y así se explicaría que el Hc-TeNT se estuviera uniendo en mayor proporción a su otro receptor, el TrkB. Que la cantidad de TrkB colocalizando con Hc-TeNT no cambie puede significar que la unión ya esté saturada y que por más cantidad de Hc-TeNT que haya disponible no podrá internalizarse más. En el ensayo de internalización en presencia del péptido D5 no se observan diferencias significativas en el porcentaje de colocalización entre Hc-TeNT y TrkB respecto al control sin competidor, mostrando aproximadamente un 44% de solapamiento en comparación del 47% del control. En cambio, el porcentaje de colocalización de TrkB con Hc-TeNT sí que se ve significativamente reducido respecto al control, de 61% a 51%.



##  $p < 0.01$ , \*\*\* & ###  $p < 0.001$  in Dunnett's test

---

**Figura 32. Competición en la internalización entre Hc-TeNT y BDNF, NGF y el péptido D5.**

**(A)** Las CGN son incubadas con Hc-TeNT marcado con AlexaFluor555 (20 nM) durante 1h a 37°C (marcaje rojo). Al mismo tiempo se incubaba también un anticuerpo contra TrkB (ab33566). En algunas condiciones se añade 20 µM de D5, 400 ng/mL de BDNF o 400 ng/mL de NGF. Pasado el tiempo de incubación las neuronas se lavan con PBS1X, se fijan en PFA 4% y se realiza una inmunotinción utilizando un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488 contra el anti-TrkB (marcado en verde en la imagen). Los núcleos son teñidos con Dapi (azul). Las imágenes son tomadas con un microscopio confocal y analizadas con el programa Imaris. Los puntos de colocalización entre los dos canales (rojo y verde) se marcan en blanco. (Escala = 5 µm). **(B)** Área que ocupa la señal fluorescente de Hc-TeNT en cada una de las condiciones. **(C)** El porcentaje de colocalización del canal rojo (Hc-TeNT) con el canal verde (TrkB) en cada condición está representado en la gráfica.

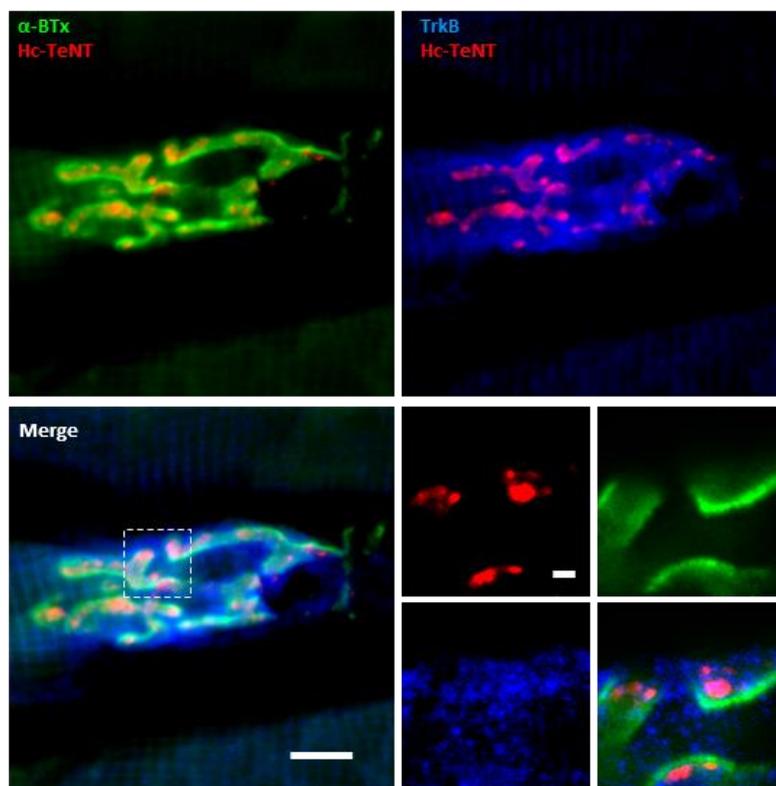
---

En los ensayos de unión, altas concentraciones de péptido eran capaces de bloquear la unión de Hc-TeNT, presumiblemente interfiriendo en su unión a TrkB. Sin embargo en los ensayos de internalización no se observan diferencias en el porcentaje de colocalización de Hc-TeNT con TrkB en presencia del péptido D5. Una posible explicación es que a la concentración a la que se ha ensayado el péptido no produce un efecto de bloqueo suficiente. También podría ser que el péptido no fuera lo suficientemente grande como para bloquear toda la zona de interacción entre Hc-TeNT y TrkB, ya que el dominio D5 de TrkB ocupa alrededor de 115 aminoácidos y el péptido consta de 27 residuos (*Urfer et al., 1995*)

### 1.3. Internalización de Hc-TeNT en uniones neuromusculares y transporte retroaxonal hasta el soma de las motoneuronas

Algunos trabajos han descrito que dependiendo del tipo celular, el Hc-TeNT puede encontrarse interaccionando con diferentes proteínas que podrían funcionar como receptores celulares. Por ejemplo, en cultivos de neuronas corticales la neurotoxina se ha encontrado interaccionando con SV2, mientras que no se ha observado esta asociación en motoneuronas (Yeh et al., 2010). Esto coincide con la idea de que en los diferentes tipos neuronales que infecta la toxina, ésta puede estar utilizando diferentes receptores para endocitarse que finalmente la conducirán a un destino distinto dentro de la célula. En esta línea nos planteamos si esta interacción entre Hc-TeNT y TrkB que se ha observado en neuronas granulares, existe realmente en el proceso infectivo de la neurotoxina. En la introducción ya se ha explicado detalladamente que la TeNT difunde en el organismo hasta llegar a las uniones neuromusculares donde las motoneuronas del SNC inervan el músculo. Es allí donde se une a los polisialogangliósidos y a su receptor proteico, presentes en la membrana presináptica de las motoneuronas, y se internaliza para llegar hasta el soma situado en la médula espinal. Así que queremos determinar si el Hc-TeNT se une a TrkB en las uniones neuromusculares en un modelo *in vivo*, y por lo tanto, si TrkB es el receptor proteico de TeNT en las motoneuronas. Con este objetivo, se emula la infección natural de la neurotoxina inyectando el fragmento Hc-TeNT en el músculo tibial anterior de ratones adultos. El fragmento recombinante Hc-TeNT acoplado al fluoróforo AlexaFluor555 (5 µg) se inyecta intramuscularmente en ratones y tras 24h el fragmento no tóxico se habrá internalizado en las uniones neuromusculares y habrá llegado hasta las motoneuronas de la médula espinal que inervan el músculo tibial. Transcurrido este tiempo los animales son sacrificados, se perfunden y se recoge tejido de los músculos tibial y de la zona lumbar de la médula espinal donde se encuentran los somas de las motoneuronas que nos interesan. En trabajos anteriores del Grupo se

ha descrito cómo tras una inyección intramuscular de Hc-TeNT, ésta es transportada únicamente a las motoneuronas que inervan el músculo concreto donde se inyectó, no hay difusión hacia otras zonas contralaterales ni otras áreas de la médula espinal.

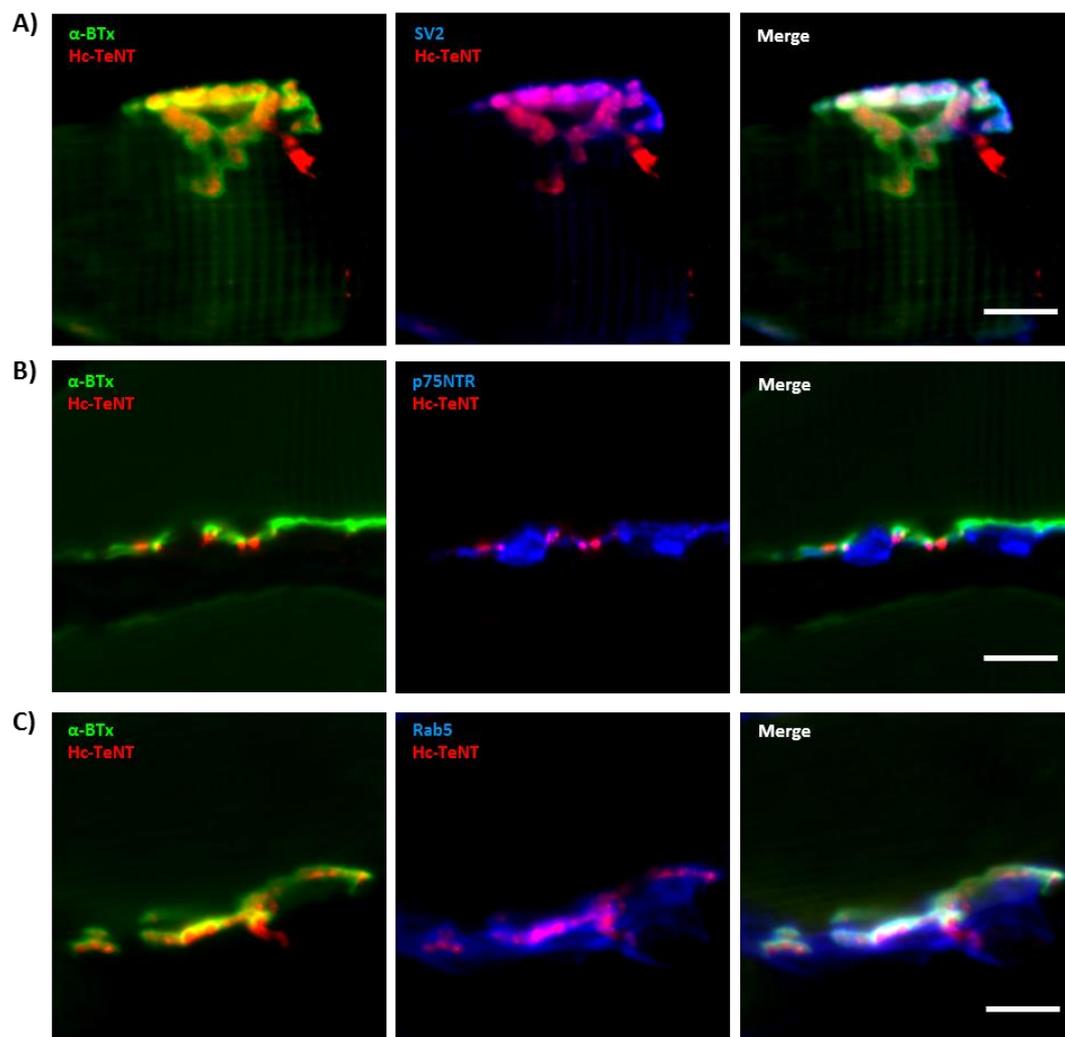


**Figura 33. Localización del fragmento Hc-TeNT y el receptor TrkB en las uniones neuromusculares del músculo tibial de ratón.**

El Hc-TeNT (rojo) se visualiza en las uniones neuromusculares 24h después de una inyección intramuscular. Los receptores de acetilcolina postsinápticos están marcados con  $\alpha$ -bungarotoxina (verde) y el receptor TrkB en azul. La suma de todos los canales se muestra en el panel inferior izquierda (escala 10  $\mu$ m). El panel inferior derecha muestra una ampliación de un solo plano en la zona recuadrada (escala 1  $\mu$ m).

En primer lugar se analiza la localización del fragmento Hc-TeNT y del receptor TrkB en el músculo tibial. Se realizan cortes del músculo y se realiza una inmunohistoquímica para visualizar las uniones neuromusculares. Se utiliza la  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BTx) acoplada al fluoróforo AlexaFluor488 para marcar las membranas postsinápticas de la unión. Este compuesto se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina de las membranas postsinápticas del músculo. Por otro lado se utiliza un anticuerpo contra el receptor TrkB, que es expresado tanto en las membranas de las motoneuronas como en el músculo (Personius and Parker, 2013; Tomàs et al., 2014). En la Figura 33 se muestra una imagen de una unión neuromuscular marcada con Hc-TeNT en color rojo, las membranas postsinápticas en verde y en azul el TrkB. Tal y como se puede observar aún queda Hc-TeNT en el músculo 24h después de la inyección. Ampliando la zona enmarcada en el recuadro blanco se puede observar como el Hc-TeNT coincide con el marcaje de TrkB en los terminales nerviosos. En la Figura 34A se demuestra como el

Hc-TeNT se encuentra en la zona presináptica de la unión neuromuscular, marcada con SV2 en color azul. La SV2 es una proteína de membrana presente en las vesículas sinápticas. Como ya se ha comentado en la introducción esta proteína ha sido descrita como receptor para diversos serotipos de BoNT (Dong et al., 2006, 2008; Mahrhold et al., 2006; Rummel et al., 2009) y también como receptor para la TeNT en neuronas hipocampales y corticales (Yeh et al., 2010). En las imágenes obtenidas Hc-TeNT coincide con SV2 pero el marcaje de esta última es bastante difuso y no permite concretar que ambas moléculas estén interaccionando. El marcaje con SV2 tan solo proporciona información de la localización de la toxina, permitiéndonos saber que el Hc-TeNT colocalizado con TrkB se encuentra en la zona presináptica.

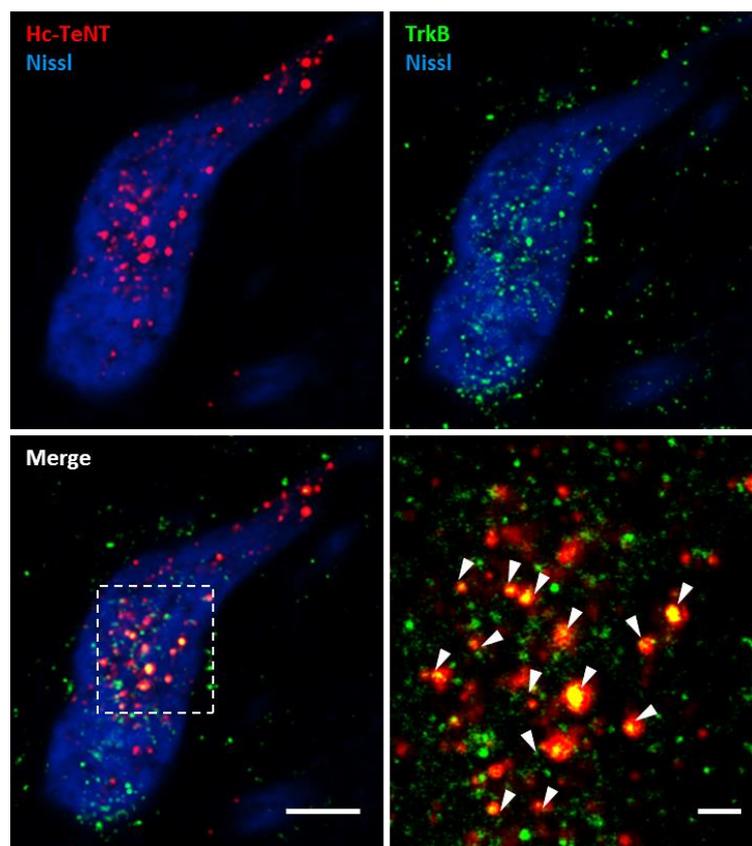


**Figura 34. Internalización del fragmento Hc-TeNT en las uniones neuromusculares del músculo tibial de ratón.** Inmunohistofluorescencias de cortes de músculo tibial 24h después de una inyección intramuscular de 5 µg de Hc-TeNT acoplada a AlexaFluor555 (rojo). Las membranas postsinápticas de las uniones musculares se marcan con  $\alpha$ -bungarotoxina (verde), y se utilizan también anticuerpos contra SV2 (A), p75<sup>NTR</sup> (B), y Rab5 (C), marcados en azul en las imágenes. El panel derecho de cada fila muestra el *merge* de todos los canales (escala 10 µm).

También se tiñen los cortes de músculo con un anticuerpo contra p75<sup>NTR</sup>, como se muestra en la Figura 34B en azul. Ya se había descrito que Hc-TeNT y p75<sup>NTR</sup> colocalizan en los axones de motoneuronas en cultivo y que comparten vesículas de transporte retroaxonal (Lalli and Schiavo, 2002). En este caso, en motoneuronas en tejido, se observa también una coincidencia entre ambos marcajes en la membrana presináptica de las uniones, así como en los axones de las motoneuronas. Por último también se ha utilizado un anticuerpo contra Rab5 (Figura 34C), ya que se ha observado que esta proteína colocaliza también en endosomas con Hc-TeNT en cultivos primarios de motoneuronas de ratón (Deinhardt et al., 2006b). Rab5 es una GTPasa que se une en las primeras etapas de la formación de los endosomas de señalización. En las imágenes se observa como Rab5 y Hc-TeNT coinciden en la zona presináptica de la unión neuromuscular.

Hasta ahora se ha comprobado la localización del fragmento Hc-TeNT inyectado en las uniones neuromusculares pero, tal y como esta descrito, después de 24h el Hc-TeNT internalizado en los terminales se ha transportado retroaxonalmente en gran parte hasta el soma las motoneuronas que inervan el músculo tibial. Por lo tanto, para determinar la localización de Hc-TeNT en los cuerpos neuronales, se extrae tejido de la zona lumbar de la médula espinal. Se realizan cortes de la zona ventral, en la cual se sitúan los somas de las motoneuronas de interés, y se realizan diversas inmunohistofluorescencias. En primer lugar nos interesa saber si el Hc-TeNT inyectado localiza también junto a TrkB en el citoplasma de las motoneuronas. Ya hemos visto como ambas moléculas se encuentran en la zona presináptica de las uniones neuromusculares, así que lo que nos interesa saber a continuación es si este Hc-TeNT ha sido transportado a través del axón de la motoneurona en compañía de TrkB y, de ser así, si están colocalizando en las vesículas endocíticas presentes en el citoplasma. La toxina tetánica llega hasta el soma de las motoneuronas infectadas en vesículas endocíticas que son redirigidas hacia rutas de exocitosis, para así ser captada en las interneuronas inhibitorias, donde llevara a cabo su acción proteolítica.

En la Figura 35 se puede observar como efectivamente el Hc-TeNT inyectado en el músculo ha sido capaz de transportarse retrógradamente hasta el soma neuronal. Las motoneuronas alcanzadas por el fragmento Hc-TeNT presentan un gran número de vesículas de forma redondeada que contienen el Hc-TeNT, y que están distribuidas por todo el citoplasma, aunque especialmente concentradas en la zona perinuclear. En los ratones inyectados con solución control, que solo contiene el fluoróforo AlexaFluor555 sin acoplar, no se aprecia marcaje. Los cuerpos de las neuronas se han teñido con Nissl (visualizado en azul en las imágenes), que es un compuesto que se une a estructuras de carácter básico. Tal y como se muestra en la Figura 35, un número considerable de vesículas positivas para Hc-TeNT son detectadas también con un anticuerpo contra TrkB (en verde en la imagen). En la ampliación del panel inferior derecha de la Figura 35 se señalan con flechas blancas las vesículas en las que colocalizan ambas moléculas. El marcaje de TrkB en estas células se ve punteado y distribuido principalmente por todo el citoplasma.



**Figura 35. El receptor TrkB se encuentra en vesículas endocíticas positivas para Hc-TeNT en motoneuronas.**

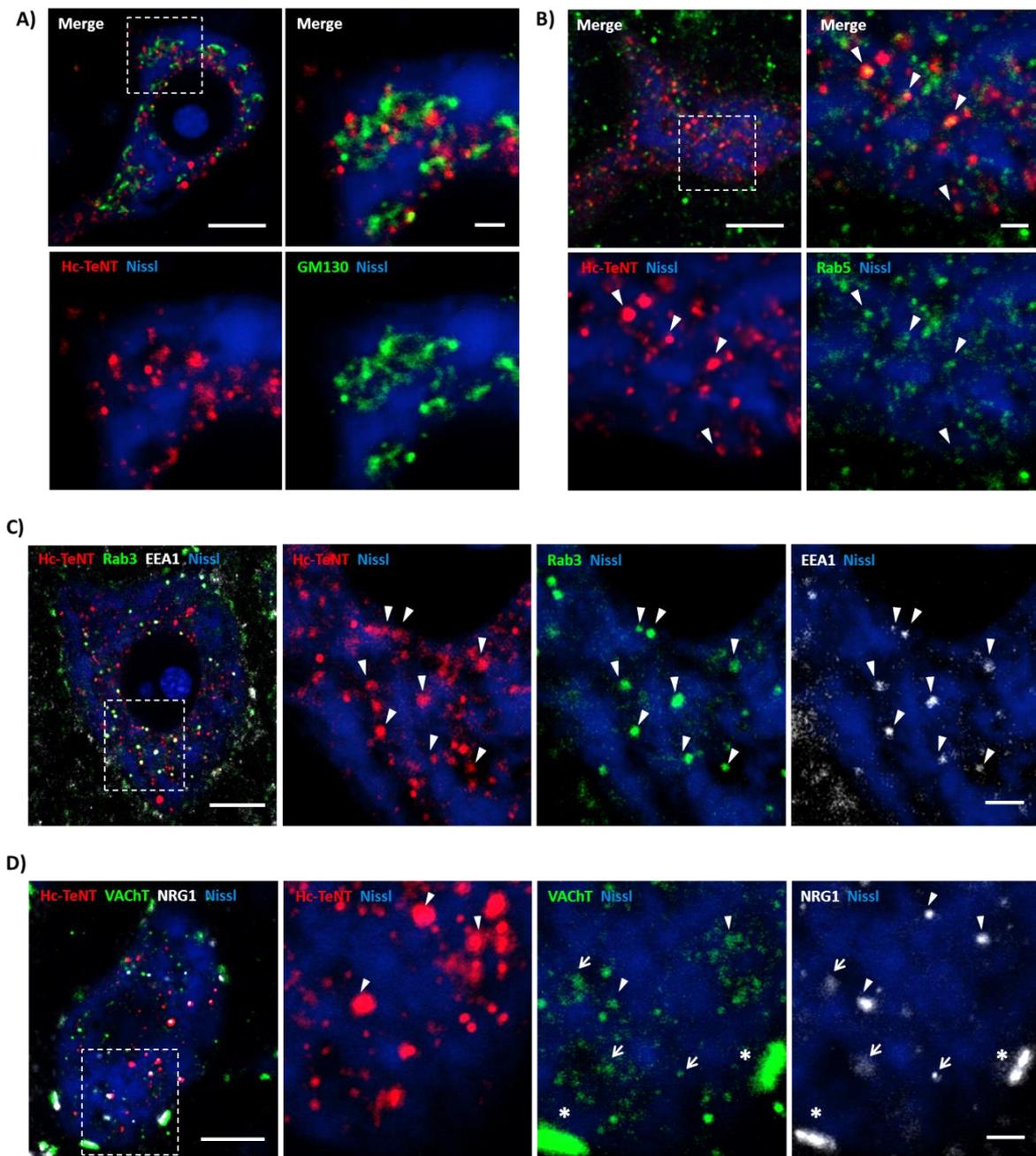
El Hc-TeNT acopado a AlexaFluor555 (rojo) fue inyectado en el músculo tibial de ratón. Después de 24h ha sido transportado retroaxonalmente al soma de las motoneuronas en la médula espinal. Los animales fueron sacrificados y perfundidos, y la medula espinal fue diseccionada y cortada para realizar una inmunohistoquímica. Se utiliza un anticuerpo contra TrkB (verde) y la tinción de Nissl para visualizar las motoneuronas (azul). En la imagen se muestra una sección de una de las motoneuronas marcadas (escala = 10  $\mu\text{m}$ ). En el panel inferior derecha se muestra una ampliación de la zona recuadrada en el panel inferior izquierda (escala = 2  $\mu\text{m}$ ).

A parte de determinar si Hc-TeNT y TrkB se encuentran localizados conjuntamente en las motoneuronas, también es interesante saber en qué tipo de estructuras o con que otras moléculas se encuentra asociado el Hc-TeNT en este sistema *in vivo*. Con esta finalidad se han teñido los cortes obtenidos de la medula espinal con diferentes marcadores que se muestran en la Figura 36. En primer lugar, en la Figura 36A se ha utilizado un marcador de aparato de Golgi, el GM130 (*Golgi Matrix 130 kDa Protein*), para determinar si el Hc-TeNT se encuentra o no asociado a esta estructura. La GM130 es una proteína componente de la red *cis*-Golgi, que se encuentra unida en la cara citoplasmática de las membranas de este orgánulo (Nakamura, 2010). Se ha descrito que otras toxinas capaces de transportarse retroaxonalmente, como la toxina colérica B o la toxina Shiga, se encuentran asociadas al aparato de Golgi (Sandvig et al., 2013). Estas toxinas viajan retroaxonalmente a través de los endosomas y de la red *trans*-Golgi para llegar finalmente al retículo endoplasmático, desde donde se liberan al citoplasma para ejercer su efecto tóxico. En las imágenes de la Figura 36A se observa claramente como los marcajes de Hc-TeNT y GM130 no coinciden, por lo cual el Hc-TeNT endocitado,

a diferencia de estas otras toxinas mencionadas, no es destinado la red membranosa del aparato de Golgi.

También es interesante analizar diferentes marcadores de vesículas sinápticas en estas muestras, para determinar en qué tipo de endosomas se encuentra localizado el Hc-TeNT. Se han teñido los cortes de médula con un anticuerpo contra la GTPasa Rab5, que en las uniones neuromusculares habíamos visto estaba localizada junto con el Hc-TeNT en la membrana presináptica. En el caso de la médula, se puede observar en la Figura 36B como algunas de las vesículas positivas para Hc-TeNT (marcadas en color rojo) contienen también Rab5 (en verde). Como ya se ha mencionado, Rab5 es un marcador de endosomas tempranos con importantes funciones como la fusión de vesículas y el reclutamiento de diversas moléculas efectoras (Sönnichsen et al., 2000). A parte de Rab5, se realizan inmunofluorescencias contra otros marcadores implicados en el ciclo de las vesículas endocíticas. En la Figura 36C se muestra una motoneurona marcada con Hc-TeNT (color rojo), con la GTPasa Rab3 (color verde) y con el marcador endosomal EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) (color blanco). Rab3 es una GTPasa involucrada en procesos de exocitosis mientras que EEA1 es una molécula efectora de Rab5 que interviene en la fusión de vesículas. Tal y como se puede observar, Hc-TeNT colocaliza tanto con Rab3 como con EEA1 en un gran número de vesículas. También entre Rab3 y EEA1 se observa una elevada colocalización, incluso en vesículas no positivas para Hc-TeNT.

Por último nos interesa detectar el Hc-TeNT en el proceso de transcitosis, de salto a las interneuronas inhibitorias. Con esta finalidad se marcaron las motoneuronas con Hc-TeNT (rojo), VAcHT (verde) y NRG1 (blanco), tal y como se muestra en la Figura 36D. La NRG1 (*Neuregulin 1*) es un factor de crecimiento transportado de forma retroaxonal en las motoneuronas y que se libera de forma post-sináptica en los botones o sinapsis C para ser captada por las interneuronas. Estos botones C pueden ser marcados con el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). En la Figura 36D se pueden observar dos tipos de estructuras claramente diferenciadas marcadas con VAcHT y NRG1. Por un lado los terminales C, en los que ambas moléculas se sitúan adosadas una al lado de la otra (marcado con asteriscos en la imagen), y por otro lado también se observan estructuras vesiculares repartidas por el citoplasma (flechas blancas). Mientras que no se ha detectado marcaje de Hc-TeNT en los terminales C, sí que en algunas vesículas se observa coincidencia de los marcajes. La NRG1 y la Hc-TeNT colocalizan en varias vesículas (cabezas de flecha blancas), y también en algunas se observa VAcHT. No se observa asociación entre Hc-TeNT y zonas de sinapsis colinérgicas que pudieran ser marcadas con el VAcHT.



**Figura 36. Localización del fragmento Hc-TeNT internalizado en las motoneuronas de la medula espinal.**

El Hc-TeNT marcado con AlexaFluor555 (rojo) ha viajado retroaxonalmente hasta el soma de las motoneuronas que inervan el músculo tibial donde fue inyectado 24h antes. Los animales fueron sacrificados, perfundidos y las médulas espinales fueron extraídas y seccionadas para realizar las inmunofluorescencias. Se realiza una tinción de Nissl para marcar las motoneuronas (azul) y se utilizan diferentes anticuerpos contra distintas proteínas. **(A)** Anticuerpo contra GM130 (verde), **(B)** Rab5 (verde), **(C)** Rab3 (verde) y EEA1 (blanco), y **(D)** VAcHT (verde) y NRG1 (blanco). La zona recuadrada en la primera imagen de cada inmunohistoquímica (escala = 10  $\mu$ m), se muestra ampliada en las siguientes imágenes de cada panel (escala = 2  $\mu$ m).

#### **1.4. Implicación de los residuos Y266, K311 y E343 de Hc-TeNT en su interacción con TrkB**

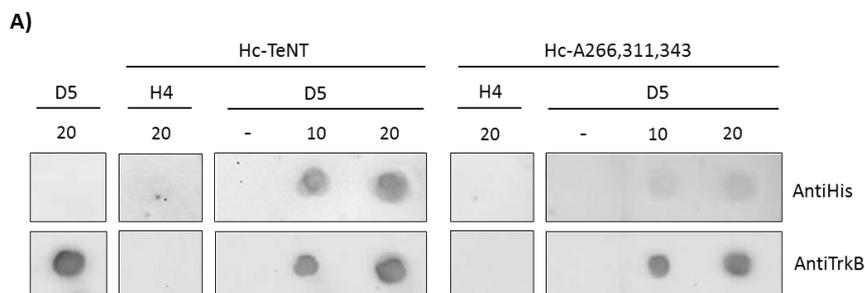
Se han mostrado muchas evidencias de la interacción existente entre Hc-TeNT y TrkB. Por un lado se ha visto cómo ambas moléculas son capaces de unirse específicamente *in vitro* y cómo Hc-TeNT induce la activación del receptor. También se ha demostrado que el Hc-TeNT compite por la unión e internalización en las células con un aceptor natural del TrkB como es el BDNF, y cómo el péptido D5 bloquea también su acción. Además ambas moléculas colocalizan dentro de la célula, ocupando los mismos compartimentos endocíticos, tanto en cultivos de neuronas granulares de cerebelo como en un modelo *in vivo*, inyectando el Hc-TeNT en ratones.

Finalmente, para confirmar la validez del modelo estructural propuesto para esta unión, se pretende delimitar la región de Hc-TeNT encargada de esta interacción. En el modelo se predice la existencia de un nuevo sitio de unión de la TeNT en su dominio carboxilo terminal, en el que se encontrarían los residuos responsables de la interacción con TrkB. En base al análisis bioinformático se han propuesto varios aminoácidos en la secuencia de Hc-TeNT que estarían directamente involucrados en la formación del complejo con TrkB, formando uniones no covalentes. Estos residuos son, en orden de relevancia: K311, Y266, E343 o S338, E264, N341, E447 y D452 (Tabla 6). En el modelo propuesto el residuo Y266 se encontraría formando un puente de hidrógeno con el residuo N350 de TrkB. La K311 podría formar un puente salino con el residuo D349 del receptor o un puente de hidrógeno con el N350. El residuo E343 podría estar interaccionando con la K328 de TrkB mediante un puente salino, o con la Y329 mediante un puente de hidrógeno. Con la finalidad de verificar que estas posiciones son responsables de la interacción entre las dos moléculas, se han mutado los tres residuos más probablemente implicados de entre los sugeridos. De esta manera se obtiene el fragmento mutado Hc-A266-311-343, en cuya secuencia los residuos Y266, K311 y E343 han sido substituidos por alaninas, un aminoácido neutro que supuestamente no causará alteraciones en la estructura secundaria debido a su débil impedimento estérico.

##### **1.4.1. La mutación en tres residuos de Hc-TeNT provoca una pérdida de afinidad por el receptor TrkB**

Para determinar si las mutaciones introducidas en Hc-TeNT están afectando en su interacción con TrkB, se analiza en primer lugar si ha perdido capacidad de unirse al péptido D5. En la Figura 37 se muestra el resultado de un dot-blot realizado según se ha descrito en el apartado 9.2. de Materiales y métodos. En este experimento se aplica el péptido D5 (10  $\mu$ g y 20  $\mu$ g) sobre la membrana, y posteriormente ésta se incuba con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343, ambas a igual concentración. Tanto el Hc-TeNT como el Hc-A266-311-343 unidos se detectan mediante un anticuerpo contra la cola de polihistidinas, mientras que el péptido D5 se detecta con un anticuerpo anti-TrkB. La condición con el péptido D5 y sin Hc-TeNT demuestra que el anticuerpo anti-polihistidinas utilizado no reconoce inespecíficamente al péptido. El péptido H4 (20  $\mu$ g) se adhiere también a la membrana y se incuba con Hc-TeNT o con la proteína mutada para demostrar que no se une a ninguna de las dos y que por lo tanto, la unión observada al péptido D5 es específica. El resultado indica que el Hc-A266-311-343 se une en menor proporción que el Hc-TeNT al péptido D5. Tanto en la condición con 10  $\mu$ g como en la de 20  $\mu$ g de péptido D5, las mutaciones introducidas reducen la capacidad de unión del Hc-TeNT

alrededor de un 60%. Por lo tanto estos aminoácidos mutados sí parecen tener un papel importante en la unión a TrkB.

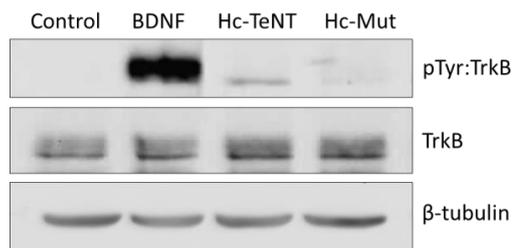


**Figura 37. Unión *in vitro* de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 al péptido D5.**

Se realiza un ensayo de dot-blot en el que el péptido se une a una membrana de nitrocelulosa (10 y 20  $\mu$ g), que es posteriormente bloqueada e incubada con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343. Se analiza utilizando un anticuerpo contra la cola de polihistidinas y con otro contra TrkB para detectar el péptido. Los controles sin Hc-TeNT o sin D5, así como con un péptido aleatorio del mismo tamaño que D5 (péptido H4), se analizan en paralelo.

Además de unirse *in vitro*, se ha demostrado que el fragmento Hc-TeNT es capaz de inducir la fosforilación de TrkB en CGNs en cultivo de una forma similar a la que lo haría el BDNF. Para ver si los residuos mutados en el Hc-TeNT son importantes en la unión, se analizan mediante western blot los niveles de fosforilación del TrkB en presencia de Hc-TeNT o del fragmento mutado. Las CGNs se privan de suero durante las 4h previas al experimento, y a continuación se realiza el tratamiento con 100 nM de Hc-TeNT o con 100 nM de Hc-A266-311-343 (Hc-Mut), incubándolos durante 5 min a 37°C. Se añade una condición con BDNF a 50 ng/mL como control positivo de la fosforilación de TrkB. Pasado este tiempo las células se recogen, se lisan y un total de 500  $\mu$ g de proteína total por cada condición se incuban con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas acoplado a agarosa. De esta manera se realiza una inmunoprecipitación de las proteínas del lisado que contienen residuos de tirosina fosforilados. Las proteínas retenidas por el anticuerpo unido a agarosa se cargan en un gel SDS-PAGE y se analizan por western blot revelando con un anticuerpo contra TrkB, lo que permite determinar los niveles de pTrkB.

Tal y como se observa en la Figura 38, se detecta pTrkB en la condición con Hc-TeNT pero no en la condición tratada con Hc-A266-311-343, por lo que se deduce que las mutaciones han afectado a la capacidad de activar el TrkB. La condición sin tratamiento no presenta pTrkB, y el control con BDNF muestra los niveles de pTrkB más altos. Los niveles de TrkB total y de  $\beta$ -tubulina se comprueban en el lisado celular y se observa cómo se mantienen invariables en todas las condiciones, demostrando que la carga ha sido equivalente en todas ellas.



**Figura 38. Niveles de TrkB fosforilado en CGN después de un tratamiento con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343.**

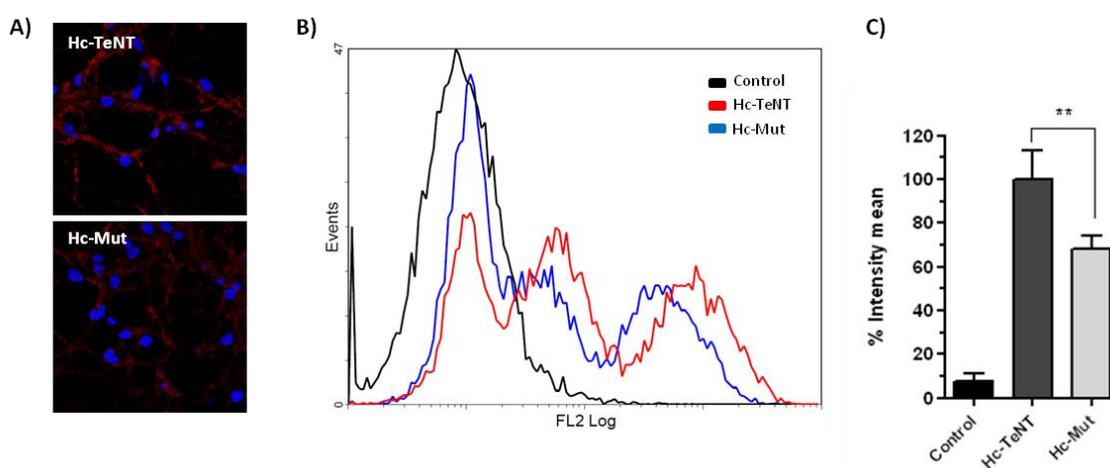
Las células son privadas de suero antes del tratamiento con 100 nM de Hc-TeNT, 100 nM Hc-A266-311-343 (Hc-Mut) o 50 ng/mL de BDNF. Se realiza una inmunoprecipitación con un anticuerpo contra las tirosinas fosforiladas presentes en los lisados celulares y se analiza mediante western blot utilizando un anticuerpo contra TrkB. Los lisados celulares también se analizan para determinar los niveles de TrkB total y de  $\beta$ -tubulina.

#### 1.4.2. Capacidad de unión a membranas neuronales de Hc-A266-311-343

Como ya se ha comentado el Hc-TeNT se une a las membranas de las CGNs, según nuestra hipótesis, gracias a la interacción con los polisialogangliósidos y con su receptor proteico, TrkB. En el apartado anterior se ha mostrado que la mutación de los residuos Y266, K311 y E343 de Hc-TeNT afecta a la capacidad de unión de éste al dominio D5 de TrkB y a la capacidad de inducir la activación del receptor, por lo que parece que el Hc mutado realmente sufre una pérdida de afinidad por TrkB. El hecho de que se haya afectado la unión *in vitro* con TrkB al introducir las mutaciones, hace suponer que también se verá reducida la unión del Hc-TeNT mutado a las membranas neuronales. Para corroborarlo se realiza un cultivo de CGNs de 7 DIV y se incuban con 10 nM de Hc-TeNT o 10 nM de Hc-A266-311-343 acoplados a AlexaFluor555. Las células se incuban a 4°C durante 30 min antes de fijarlas para permitir que el Hc-TeNT se una a la membrana sin internalizarse. El resultado se muestra en la Figura 39A, donde los fragmentos Hc-TeNT se visualizan en rojo y los núcleos, que se han teñido con DAPI, están marcados en azul. Se observa menos cantidad de Hc-TeNT unida en las neuronas tratadas con Hc-A266-311-343, corroborando que las mutaciones afectan a la capacidad de unión a membrana reduciéndola.

Para cuantificar mejor esta unión se analiza la cantidad de marcaje de las células mediante citometría de flujo. Las CGN sembradas en placas de 24 pozos se tratan con 500 nM de Hc-TeNT o Hc-A266-311-343 marcados con AlexaFluor555 durante 30 min a 4°C en ensayos de unión, siguiendo el protocolo comentado en el apartado 9.4. de Materiales y métodos. Pasado el tiempo de incubación las células son analizadas mediante citometría de flujo. Se analizan 30000 eventos por condición y se determina la fluorescencia a 565 nm emitida por cada célula. En la Figura 39B se muestra un histograma en el que se observa, en el eje vertical, el número de eventos contabilizados para cada valor de intensidad de fluorescencia, representada en escala logarítmica en el eje horizontal. En la condición control sin tratamiento, representada en negro, se observa como toda la población celular se sitúa en la zona de baja fluorescencia. Las células tratadas con Hc-TeNT (representadas en color rojo) en cambio se distribuyen hacia la zona de más alta intensidad, observándose tres picos de población, uno en la zona de más fluorescencia, otro de células marcadas en menor grado y uno en la zona de baja intensidad. Esto indica que, aunque la mayor parte de las células presentan Hc-TeNT en la membrana, aún quedan células a las que casi no se ha unido. En la condición tratada con

Hc-A266-311-343 también se observan éstos tres picos de población, sin embargo el histograma esta desplazado hacia fluorescencias más bajas que las presentadas por la condición tratada con Hc-TeNT. También se registran muchos más eventos en la zona de baja fluorescencia, es decir células no marcadas. En la gráfica de la Figura 39C se representa la media de fluorescencia registrada en la población de células seleccionadas, corregida por el número de células contabilizadas en esta región. De esta manera se observa como la media de fluorescencia de las células tratadas con Hc-A266-311-343 es significativamente inferior a la presentada por las células tratadas con el Hc-TeNT no mutado, aproximadamente un 30% menor. Esto indica que las mutaciones están realmente afectando la capacidad de la neurotoxina de unirse a la membrana de las neuronas, dificultando la interacción con sus receptores.

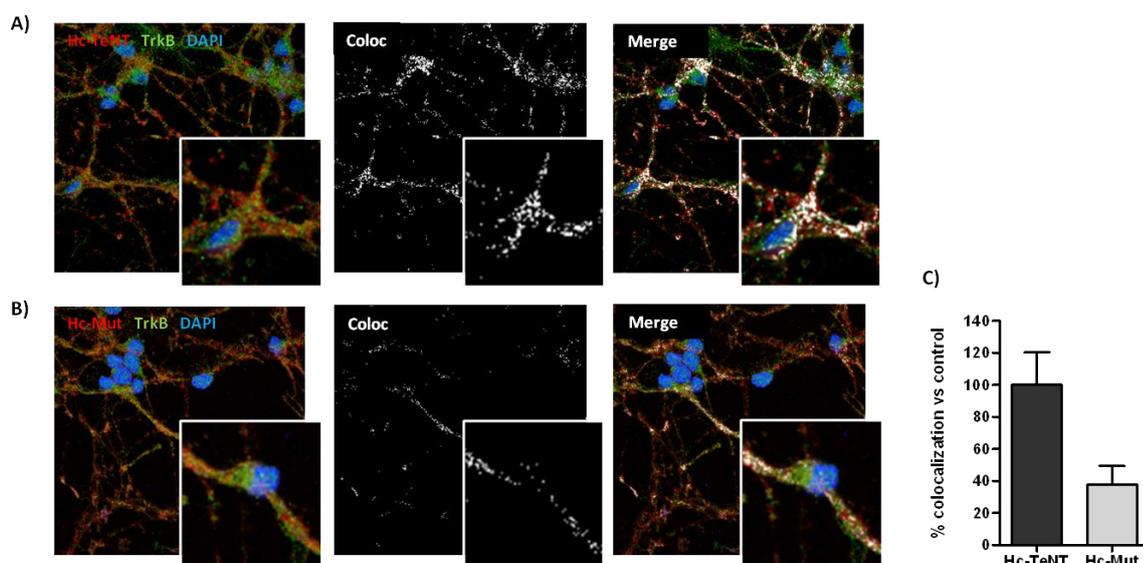


**Figura 39. Unión de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 a neuronas granulares de cerebelo.**

Las CGN son tratadas con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343 marcadas con AlexaFluor555 (rojo) durante 30 min a 4°C en ensayos de unión. **(A)** Las células fueron fijadas en PFA 4% y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal y la intensidad del canal rojo fue medida para cada condición. **(B)** Pasado el tiempo de incubación las células se recogen y se analizan para medir su intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma donde se representa en número de células contadas para cada valor de intensidad. El control sin tinción de Hc se muestra en negro, las incubadas con Hc-TeNT en rojo y en azul las incubadas con Hc-A266-311-343. **(C)** Porcentaje de la media de intensidad de fluorescencia calculada para cada condición respecto al control tratado con Hc-TeNT. \*\*  $p < 0,01$  utilizando *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni.

Una vez demostrado que el Hc-A266-311-343 se une en menor cantidad a las membranas de las CGN se determina si esta menor unión se correlaciona con una menor proporción de Hc-TeNT colocalizando con TrkB. Las CGNs son tratadas con 10 nM de Hc-TeNT o 10 nM de Hc-A266-311-343 acoplados al fluoróforo AlexaFluor555 durante 30 min a 4°C. Son fijadas en PFA 4% y se realiza una inmunocitofluorescencia utilizando un anticuerpo primario contra TrkB, detectado con un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488. Las preparaciones se analizan mediante microscopía confocal y el resultado se muestra en la Figura 40. El Hc-TeNT (Figura 40A) y el Hc-A266-311-343 (Figura 40B) se visualizan en rojo, TrkB está marcado en verde y los núcleos se marcan en azul, por la tinción con DAPI. Utilizando el programa ImageJ se analizan los píxeles en los que se solapan las señales de

Hc-TeNT y de TrkB (marcados en blanco en la Figura 40), obteniendo así los porcentajes de Hc-TeNT colocalizando con TrkB que se muestran en la Gráfica 40C. En el análisis no se tiene en cuenta la diferencia en el nivel de marcaje entre ambas proteínas sino que, del total de píxeles rojos (Hc-TeNT) existentes en la imagen, calcula que porcentaje de éstos coinciden con píxeles verdes (TrkB). Los resultados del análisis indican que la proteína mutada colocaliza aproximadamente un 60% menos con TrkB que la Hc-TeNT. Por lo tanto la disminución en la cantidad de Hc-A266-311-343 unida se correlaciona con una menos proporción de la proteína colocalizando con TrkB.



**Figura 40. Colocalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 con TrkB en ensayos de unión.**

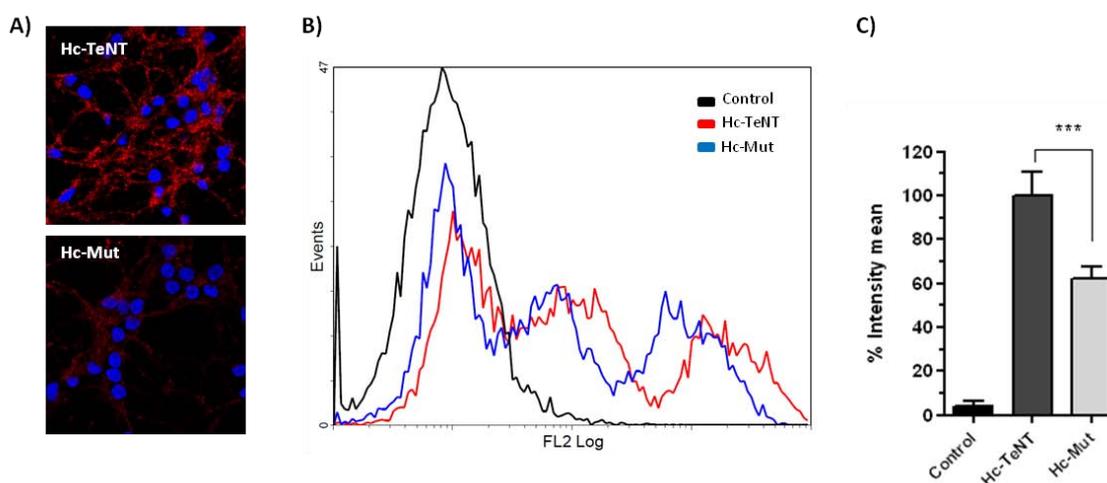
Inmunocitoquímica de CGNs tratadas con 10 nM Hc-TeNT (A) o 10 nM Hc-A266-311-343 (B) marcados con AlexaFluor555 (rojo) durante 30 min a 4°C. Se ha utilizado un anticuerpo para detectar TrkB (verde) y los núcleos han sido teñidos con DAPI (azul). En blanco están marcados los píxeles en los que colocalizan los canales rojo y verde. (C) Porcentaje de píxeles rojos colocalizando con píxeles verdes en cada tratamiento calculados mediante un análisis de colocalización con el programa ImageJ.

### 1.4.3. Capacidad de internalización de Hc-A266-311-343

El hecho de que las mutaciones introducidas en Hc-TeNT reduzcan su capacidad para unirse a las membranas de las neuronas, hace suponer que también se verá afectada la internalización del fragmento en las células. Como ya se ha comentado en la introducción, el receptor proteico de la neurotoxina es el que permite su endocitosis dentro de la célula, ya que los gangliósidos no son internalizados junto con la neurotoxina. Al unirse el Hc-A266-311-343 con menos efectividad a las CGN se espera que también tenga más dificultades para entrar en las neuronas. Para comprobarlo se realiza un experimento similar al anterior pero en condiciones de tiempo y temperatura que permitan la endocitosis de la neurotoxina.

Para ello se trata un cultivo de CGN con 500 nM de Hc-TeNT o con 500 nM de Hc-A266-311-343, ambas acopladas a un fluoróforo, y se incuban las células a 37°C durante 2h. A continuación se

analizan las células en un citómetro de flujo y se determina la intensidad de fluorescencia que emite cada una. De esta forma se obtienen histogramas como el mostrado en la Figura 41B, donde se representa el número de células registradas para cada valor de fluorescencia. En la condición control sin tratamiento, representada en color negro, todas las células se sitúan en la zona de fluorescencia basal o nula, mientras que en los tratamientos con Hc-TeNT la población está desplazada hacia las zonas de alta fluorescencia, lo que indica que han incorporado la proteína. Las neuronas tratadas con Hc-TeNT (color rojo) están marcadas en mayor número y más intensamente que las tratadas con Hc-A266-311-343 (color azul). Se ha calculado también la media de intensidad de fluorescencia de las células en cada condición, obteniendo que las neuronas tratadas con el Hc-TeNT mutado presentan una intensidad significativamente inferior, alrededor de un 40% menos, que las neuronas tratadas con la misma cantidad del Hc-TeNT (Figura 41C). En el ensayo de unión la proteína mutada se unió un 30% menos que la normal, así que las diferencias entre ambas parecen incrementarse en el paso de internalización. Esto también puede explicarse por el hecho de que en el ensayo de internalización no todo el Hc-TeNT añadido ha sido internalizado, una parte probablemente seguirá unida a la membrana, de forma que se puede estar produciendo un efecto sumatorio.

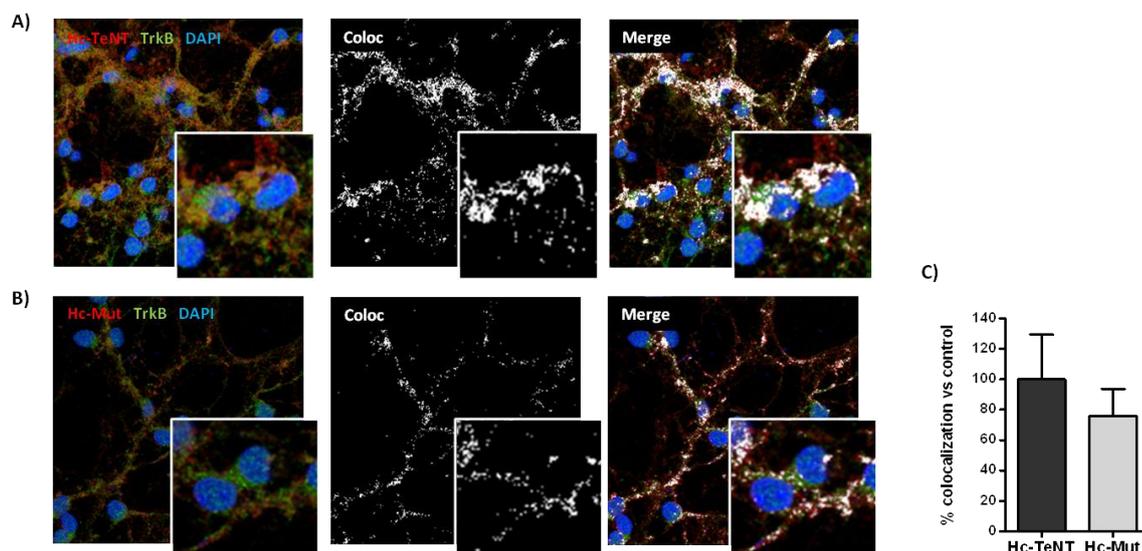


**Figura 41. Internalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 en neuronas granulares de cerebelo.**

Las CGN son tratadas con Hc-TeNT o Hc-A266-311-343 marcadas con AlexaFluor555 (en rojo) durante 2h a 37°C en ensayos de internalización. **(A)** Las células fueron fijadas en PFA 4% y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal y la intensidad del canal rojo fue medida para cada condición. **(B)** Pasado el tiempo de incubación las células se recogen y se analizan para medir su intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma donde se representa en número de células contadas para cada valor de intensidad. El control sin tinción de Hc-TeNT se muestra en negro, las incubadas con Hc-TeNT en rojo y en azul las incubadas con Hc-A266-311-343. **(C)** El porcentaje con la media de intensidad calculada para cada condición se muestra en la gráfica de la derecha. \*\*\*  $p < 0,001$  utilizando *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni.

Estos resultados se corroboran también mediante inmunofluorescencia, tal y como se muestra en la Figura 41A. El cultivo de CGN se trata a 10 nM de Hc-TeNT o de Hc-A266-311-343 acoplados a AlexaFluor555, en condiciones de internalización, y el resultado se analiza mediante microscopía confocal. El Hc-TeNT se visualiza en rojo y los núcleos, que se han teñido con DAPI, están marcados en

azul. Las neuronas tratadas con Hc-A266-311-343 presentan un menor grado de marcaje, corroborando los resultados obtenidos por citometría. Todos estos resultados indican que las mutaciones introducidas afectan también a la capacidad de internalización en las células, y que estos tres aminoácidos juegan un papel importante en este paso.



**Figura 42. Colocalización de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 con TrkB en ensayos de internalización.**

CGNs tratadas con 10 nM Hc-TeNT (A) o 10 nM Hc-A266-311-343 (B) marcados con AlexaFluor555 (rojo) durante 2h a 37°C. Se realiza una inmunocitoquímica de las células utilizando un anticuerpo anti-TrkB (verde) y los núcleos son teñidos con DAPI (azul). En blanco se marcan los píxeles en los que colocalizan los canales rojo y verde. (C) Porcentaje de píxeles rojos que coinciden con píxeles verdes en cada tratamiento calculados mediante un análisis de colocalización.

Al igual que en el caso del estudio de la unión a membrana, también en los ensayos de internalización se quiere comprobar si, aparte de endocitarse en menor cantidad, el Hc-TeNT mutado colocaliza en menor proporción con TrkB dentro de la célula. En la Figura 42 se muestran unas inmunofluorescencias de CGNs tratadas con 10 nM de Hc-TeNT o 10 nM de Hc-A266-311-343 acoplados a AlexaFluor555 durante 2h a 37°C. A continuación se realiza una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario contra TrkB. Las células son analizadas mediante microscopia confocal y se cuantifica la colocalización entre los píxeles rojos (Hc) y verdes (TrkB). El Hc-TeNT (Figura 42A) y el Hc-A266-311-343 (Figura 42B) se visualizan en rojo, TrkB se detecta con un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488 (verde) y los núcleos se tiñen con DAPI (azul). En los paneles centrales de la Figura 42A y B los píxeles colocalizados se muestran en blanco. El resultado del análisis indica que, aunque el porcentaje de Hc colocalizada con TrkB es menor en las células tratadas con Hc-A266-311-343, no hay diferencias significativas entre las dos condiciones (Figura 42C). Este dato que podría parecer contradictorio se explica por qué el porcentaje de colocalización calculado no tiene en cuenta la cantidad de marcaje de la muestra, es decir si hay más o menos Hc endocitada, sino que en base a los píxeles rojos totales calcula el porcentaje de éstos que localizan con píxeles

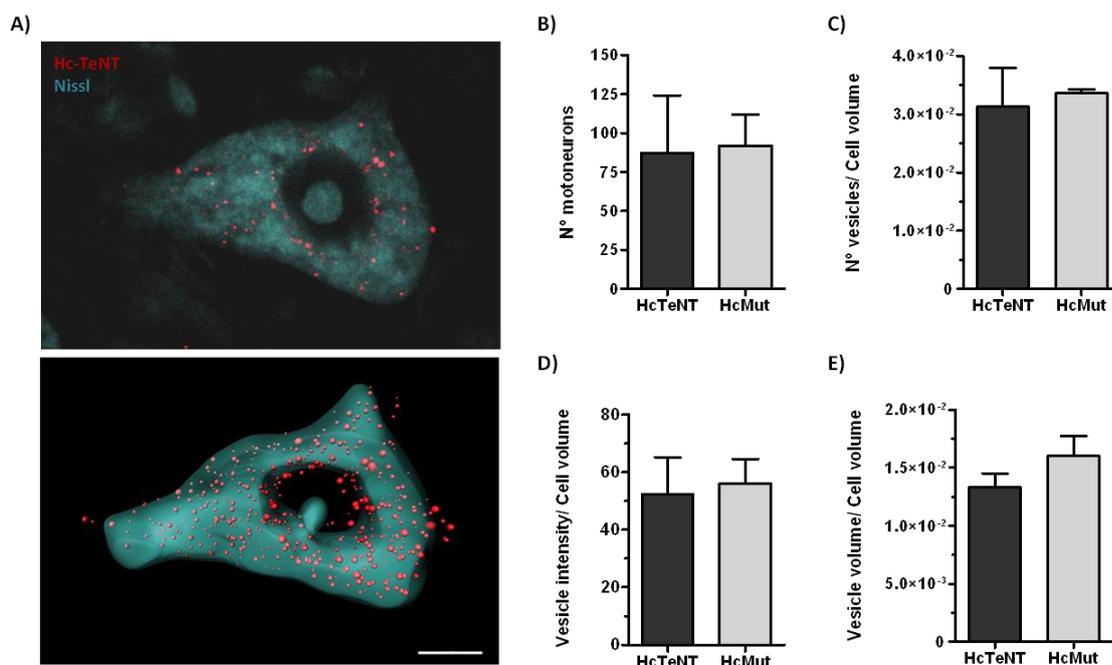
verdes. De esta manera, aunque hay menos cantidad de Hc-A266-311-343 internalizada, el que logra endocitarse colocaliza con TrkB en una proporción similar al Hc no mutado.

#### 1.4.4. Capacidad de transporte retroaxonal de Hc-A266-311-343

En los experimentos mostrados hasta ahora se ha podido observar como la mutación de los aminoácidos Y266, K311 y E343 en la secuencia de Hc-TeNT afecta a su eficiencia para unirse e internalizarse en las neuronas. El fragmento Hc-TeNT mutado pierde capacidad de interacción con el receptor TrkB, y tanto su unión a las membranas celulares como su internalización en las células se ve disminuida. Estos resultados en neuronas en cultivo nos hacen plantear si el Hc-TeNT mutado perdería también capacidad de interactuar con sus células diana en un modelo *in vivo*. Tal y como ya se ha comentado en la Introducción, el dominio Hc-TeNT es el responsable, mediante su interacción con su receptor proteico, de que la toxina se una a las membranas presinápticas de las motoneuronas durante su proceso infectivo, y de que se endocite y transporte a través del axón hasta el soma. Para determinar si estos aminoácidos juegan un papel importante en el proceso infectivo de la neurotoxina se utiliza un modelo animal al que se aplicarán ambas proteínas, la normal y la mutada. Se decide inyectar tanto el fragmento normal como el mutado intramuscularmente en ratones, y analizar si son capaces de ser retrógradamente transportados de igual manera hasta el soma de las motoneuronas. Para hacerlo se inyectan 5 µg de cada proteína marcada con AlexaFluor555 en el músculo tibial anterior de ratones adultos, tal y como se especifica en el apartado 8.1. de Materiales y métodos. El Hc-TeNT y el Hc-A266-311-343 se inyectan en patas diferentes, cada uno en una de las patas traseras del animal. En total se inyectan cuatro ratones, dos con un fragmento en cada pata y otros dos inyectados en una pata con uno de los fragmentos y en la otra con un control solo con AlexaFluor555 no acoplado. De esta manera tenemos tres muestras con Hc-TeNT y 3 muestras con Hc-A266-311-343. Anteriormente ya se ha descrito que no hay difusión entre los dos hemisferios del animal, el Hc inyectado en la pata derecha solamente llega a las motoneuronas del lado derecho de la médula. Transcurridas 24h desde la inyección, el Hc ya ha llegado al soma de las motoneuronas, así que se sacrifican y perfunden los animales y se extrae la zona lumbar de la médula espinal. En la zona ventral de la región lumbar se encuentran los cuerpos neuronales de las motoneuronas que inervan el músculo tibial anterior. Se realizan cortes de la médula y se tiñen con Nissl, que es una tinción básica que permite visualizar el soma de las neuronas y el núcleo. En la Figura 43A (panel superior) se muestra una imagen tomada con microscopio confocal de una motoneurona marcada con Hc-TeNT (en color rojo) y con la tinción de Nissl (azul claro). Tanto el Hc-TeNT como la proteína mutada se transportan eficazmente desde el músculo hasta el soma de la motoneurona, y se encuentran internalizados en vesículas endocíticas repartidas por todo el citoplasma. En los controles donde solo se inyectó fluoróforo no se observa marcaje ninguno.

Para determinar si existen diferencias entre el transporte del fragmento Hc-TeNT y del fragmento Hc-A266-311-343 se han medido diferentes parámetros relacionados con el número de motoneuronas marcadas y con diferentes características de las vesículas en las que viaja. El primer parámetro analizado es el número de motoneuronas marcadas en los animales inyectados con Hc-TeNT y en los inyectados con Hc-A266-311-343. Se contabilizan todas las neuronas marcadas en rojo en todos los cortes de médula de cada animal y la media de los valores obtenidos se representa en la

gráfica de la Figura 43B. No se observan cambios significativos entre los animales tratados con el Hc-TeNT y los tratados con la proteína mutada, parece que ambas son capaces de transportarse retroaxonalmente con igual eficacia y llegar a un número de motoneuronas similar.



**Figura 43. Transporte retroaxonal hasta las motoneuronas de la médula espinal de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343 inyectados intramuscularmente.**

(A) Soma de una motoneurona marcada con Hc-TeNT (rojo) y teñida con Nissl (azul claro). En el panel superior se muestra una imagen de un solo plano en Z de una célula, adquirida en el microscopio confocal, y en la inferior una reconstrucción tridimensional de la misma neurona utilizando el programa Imaris (escala = 10  $\mu$ m). Mediante este programa se calculan diversos parámetros representados en las gráficas. Cada barra muestra la media de los valores promedio obtenidos por cada inyección (n=3), y la barra de error el SEM de los valores. (B) (C) Número de vesículas contabilizadas en cada motoneurona estandarizadas por el volumen celular. (D) Valores de intensidad de fluorescencia total de las vesículas de cada motoneurona estandarizado por el volumen celular. (E) Volumen ocupado por las vesículas estandarizado por el volumen total de la neurona.

A parte del número total de motoneuronas marcadas también es interesante analizar si éstas se encuentran marcadas en igual proporción, es decir, si el Hc-TeNT ha llegado a todas ellas en cantidades similares. Para el análisis de estos datos se ha utilizado el software Imaris8, que permite hacer un estudio en tres dimensiones de todos los planos en el eje z obtenidos en una imagen de confocal. El programa ajusta una reconstrucción tridimensional de la neurona como la mostrada en el panel inferior de la Figura 43A, y en base a este modelo calcula los diversos parámetros. Concretamente nos hemos centrado en datos sobre el número, volumen y fluorescencia de las vesículas endocíticas, así como el volumen total de cada neurona analizada. Se analizan un total de 25 motoneuronas marcadas con Hc-TeNT, y 25 más marcadas con el fragmento mutado, entre 6-9 motoneuronas por animal inyectado. En primer lugar se analiza el número de vesículas que contiene

cada motoneurona analizada. Se estandariza este valor por el volumen que ocupa la célula analizada y el promedio de valores por cada animal se grafica en la Figura 43C. En este caso tampoco se observan diferencias entre el número de vesículas positivas para Hc-TeNT en los animales inyectados con el fragmento *wild type* o el mutado. También se examina la intensidad de fluorescencia de cada vesícula, se suman para obtener la intensidad total de marcaje de Hc en cada motoneurona, y se estandarizan los valores por el volumen de la célula analizada. El valor de intensidad de fluorescencia se puede correlacionar con la cantidad de Hc presente en las vesículas. En la gráfica de la Figura 43D se puede observar como tampoco en cuanto a la intensidad de las vesículas se detectan diferencias entre las dos proteínas. Finalmente se calcula el volumen que ocupan las vesículas marcadas con Hc dentro de la motoneurona, estandarizando por el volumen celular, y se comparan las medias obtenidas para el Hc-TeNT y el mutado. Tal y como se muestra en la Figura 43E tampoco en este caso se observan diferencias significativas entre las dos condiciones. Así que, de todos estos resultados podemos concluir que, en las condiciones de tiempo y de cantidad de proteína inyectada utilizados en este experimento, no se observan diferencias de transporte significativas entre el fragmento Hc-TeNT y el Hc-A266-311-343. Ambas parecen transportarse a una velocidad similar y en vesículas de características parecidas, ya que no hay grandes diferencias en el tamaño de las vesículas ni en la cantidad de Hc que contienen, y el número de motoneuronas a las que llega el Hc es similar en ambas condiciones.



## **CAPÍTULO 2:**

# **IMPLICACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR LOS RECEPTORES TRK**

**Trabajo publicado en FEBS Letters y PlosOne**



## 2. IMPLICACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR LOS RECEPTORES TRK

### 2.1. La actividad esfingomielinasa es esencial en el efecto neuroprotector inducido por las neurotrofinas

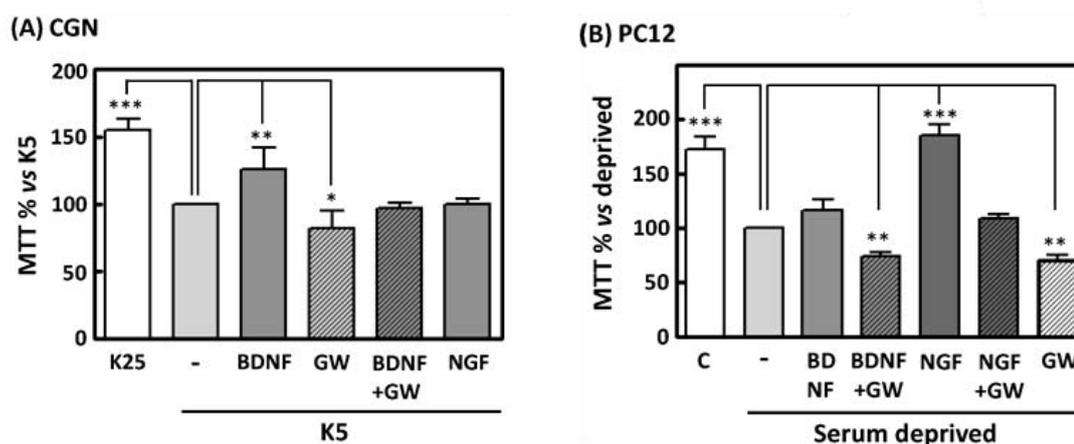
Las neurotrofinas pueden causar diferentes efectos sobre sus células diana dependiendo de un complejo sistema de balance entre la proporción de receptores Trk, p75<sup>NTR</sup> y de otros co-receptores expresados en ese momento así como del estado celular. Bajo condiciones de estrés celular o en condiciones patológicas producen una inhibición de la apoptosis a través de diversas vías de señalización en las neuronas. Estas vías de señalización son activadas por los receptores de neurotrofinas Trk (TrkA, TrkB y TrkC). Tal y como ya se ha comentado en la introducción, al unirse a sus agonistas naturales, estos receptores sufren un cambio conformacional que promueve su autofosforilación en residuos de tirosina. A partir de aquí se inician varias cascadas de señalización, como son las de la vía PI3K/Akt, la vía de las Ras/MAPK y la vía de la PLC $\gamma$ /PKC. Además de los tres receptores Trk, también el p75<sup>NTR</sup> es un receptor de neurotrofinas que puede interactuar con todas ellas con una afinidad menor que con los receptores Trk. Al no tener un dominio de activación intrínseco, este receptor activa unas vías de señalización diferentes a través de varias proteínas adaptadoras, que pueden derivar en un efecto de supervivencia celular. Una de las vías inducidas por p75<sup>NTR</sup> es la de la esfingomielinasa neutra (nSMasa), que permite hidrolizar la esfingomielina presente en membrana aumentando así los niveles de ceramida intracelulares. Esta ceramida está involucrada en diversos procesos tanto de apoptosis como de viabilidad celular. El objetivo de este trabajo es evaluar la importancia de la actividad esfingomielinasa en condiciones de estrés celular, y cuál es su implicación en las vías de supervivencia celular activadas por las neurotrofinas. En este estudio se trabajará con dos modelos celulares distintos, que nos permitirán comparar dos escenarios con diferentes receptores de neurotrofinas presentes. Por un lado se trabajará con cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata (CGNs). Como ya se ha comentado anteriormente, estas células expresan en su superficie los receptores TrkB, p75<sup>NTR</sup> y TrkC (este último en menor proporción), pero no presentan TrkA (Brandoli et al., 1998; Marini et al., 1998). Por otro lado se utilizará la línea celular PC12 que, por contra de las CGNs, expresa los receptores TrkA, p75<sup>NTR</sup> y TrkC, pero no el receptor TrkB. De esta manera, alternando ambos modelos celulares, podemos discernir la implicación de cada tipo de receptor de neurotrofinas en la actividad esfingomielinasa y su contribución al efecto final en la viabilidad celular.

En primer lugar se pretende determinar si la nSMasa interfiere en los procesos de supervivencia celular activados por las neurotrofinas. Para ello se utilizan tanto cultivos de CGN como cultivos de PC12, que son sometidos a condiciones de estrés para promover una pérdida de viabilidad celular. Al mismo tiempo se realiza un tratamiento con diferentes neurotrofinas que inducirán la activación de vías de supervivencia celular y por lo tanto un efecto de neuroprotección. En algunas condiciones se bloqueará la actividad esfingomielinasa con GW4869, un inhibidor no competitivo selectivo para la esfingomielinasa neutra, y que no afecta a la actividad de la esfingomielinasa ácida.

En el modelo de neuronas granulares, las células se mantienen en medio completo con suero y potasio a 25 mM (medio K25) durante 7 días. Las CGN requieren unas condiciones de potasio

despolarizantes (25 mM KCl) que mimetizan los estímulos excitatorios (entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que estas neuronas reciben *in vivo* (Galli et al., 1995). Para inducir la muerte neuronal apoptótica se incuban las células con un medio sin suero y a baja concentración de potasio (5 mM KCl; medio K5) durante 24 h (D'Mello et al., 1993). A 30 min antes del cambio de medio se añade BDNF (50 ng/mL) o NGF (50 ng/mL) donde corresponda, manteniéndolos a la misma concentración después del cambio a medio K5. En las condiciones en las que se requiera, se añade 10  $\mu\text{M}$  de GW4869 1h antes de adicionar las neurotrofinas, para bloquear la actividad de la nSMasa, y se mantiene el inhibidor después del cambio de medio. Transcurridas 24h la viabilidad del cultivo se determina mediante el ensayo de MTT, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 5.1. de Materiales y métodos. El resultado obtenido se muestra en la Figura 44A, en la que se muestra el porcentaje de supervivencia de cada condición respecto a la condición K5. Las neuronas privadas de suero y bajo potasio (K5) ven reducida significativamente su viabilidad, alrededor de un 40%, en comparación con las neuronas con niveles de potasio normales (K25). El tratamiento con BDNF es capaz de recuperar la viabilidad aproximadamente en un 20%, mientras que el NGF no parece producir ningún efecto. El BDNF protege de la muerte apoptótica actuando a través de la activación del receptor TrkB presente en estas células y de las vías de señalización derivadas. El NGF en cambio estaría actuando en estas células a través del receptor  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ , ya que no expresan su receptor de alta afinidad TrkA. Por lo tanto parece que el  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  no es capaz de activar una respuesta de supervivencia en estas condiciones. El efecto de supervivencia provocado por el BDNF es suprimido cuando las células son pre-tratadas con el inhibidor GW4869. El tratamiento con el inhibidor solo produce una leve disminución de la supervivencia, lo que podría indicar un papel de la actividad nSMasa basal en la viabilidad celular.

Independientemente se realiza un experimento similar esta vez en la línea celular PC12. Las PC12 son privadas de suero para inducir la muerte neuronal. El tratamiento con BDNF o NGF (50 ng/mL) se realiza 30 minutos antes del cambio de medio y las neurotrofinas se mantienen en el medio nuevo durante 24h. En las condiciones en las que se requiere el GW4869 (10  $\mu\text{M}$ ) es añadido 1h antes que las neurotrofinas. Pasadas las 24h se realiza el ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las neuronas en cada condición (Figura 44B). Se observa que al retirar el suero del medio se produce una pérdida de viabilidad significativa, que es recuperada con el tratamiento con NGF pero no con el BDNF. La falta de efecto por parte del BDNF es previsible por la falta de TrkB en estas células, de modo que solo puede interactuar con el  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ . El NGF se encontraría actuando a través de TrkA en este modelo celular, mediante el cual provocaría el efecto de activación de las vías de supervivencia. La adición de GW4869 suprime totalmente el efecto neuroprotector de NGF, y en las condiciones en las que solamente hay inhibidor en el medio se observa una leve disminución de la viabilidad, al igual que en el caso anterior en las CGN. Estos resultados parecen indicar que el bloqueo de la actividad nSMasa impide que se produzca el efecto neuroprotector promovido por las neurotrofinas, lo que señala a un papel de la nSMasa en la inducción de la viabilidad a través de los receptores Trk en condiciones de estrés.



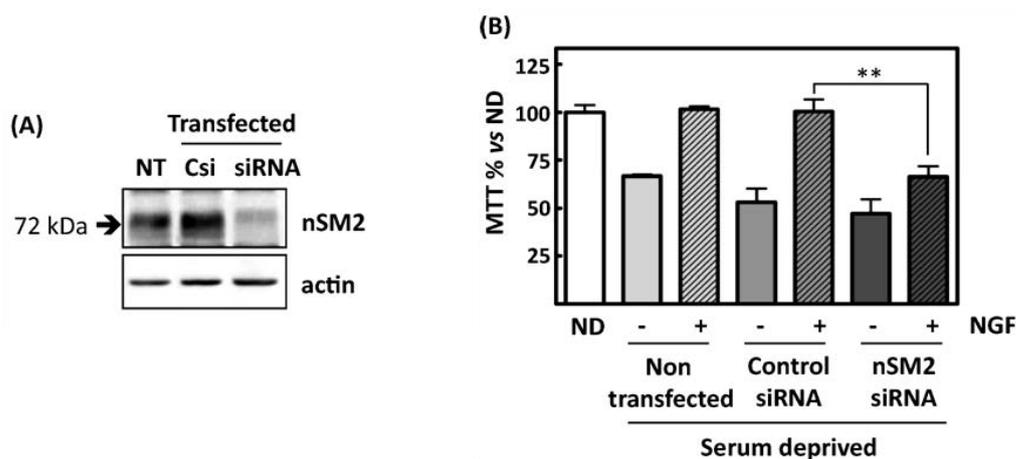
**Figura 44. Efecto neuroprotector de BDNF y NGF en células CGNs y PC12 sometidas a un estrés apoptótico.**

**(A)** Las CGN se someten a una privación de suero y a una baja concentración de potasio (medio K5) en presencia o no de BDNF (50 ng/mL) o NGF (50 ng/mL) durante 24h. En algunas condiciones se realiza un tratamiento con GW4869 (10  $\mu$ M), un inhibidor de la actividad nSMasa. Transcurrido este tiempo se determina la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Los resultados se representan en porcentaje de viabilidad respecto al control de privación. **(B)** Se realiza un estrés de privación de suero en un cultivo de PC12 durante 24h, añadiendo BDNF o NGF (50 ng/mL cada uno) en algunas condiciones. En algunas condiciones la actividad esfingomielinasa se inhibe con la adición de GW4869 (10  $\mu$ M). La viabilidad celular se determina mediante un ensayo MTT y los resultados se expresan en forma de porcentaje de viabilidad respecto a la condición control privada de suero. El análisis estadístico se realiza usando *one-way* ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Para asegurar que los efectos observados en la Figura 44 son debidos al bloqueo específico de la nSMasa, se decide silenciar la expresión de la esfingomielinasa neutra 2 (nSMasa2), que es la isoforma de nSMasa predominante en las células. Por lo tanto, se silencia esta proteína en las PC12 mediante la transfección con siRNAs específicos contra el producto del gen *smpd3*. De esta manera se transfectan las PC12 siguiendo el protocolo detallado en el apartado 4.2.1. de Materiales y métodos, y se mantienen durante 72h para conseguir los niveles mínimos de nSMasa2. En la Figura 45A se demuestra mediante western blot que se ha conseguido disminuir claramente los niveles de expresión de nSMasa2 en las células transfectadas, en comparación con la condición no tratada (NT). Como control de que el efecto producido es consecuencia del siRNA contra nSMasa2 y no artefacto de la transfección, se transfectan las células en paralelo con un siRNA negativo sin ninguna diana conocida (Csi). Se utiliza un anticuerpo contra los aminoácidos 461 al 655 de la región C-ter de la nSMasa2 humana, que presenta una muy baja homología con la nSM1 y la nSM3. También se analizan en paralelo los niveles de actina para comprobar que la carga ha sido homogénea.

A continuación se determina la viabilidad de estas PC12 transfectadas en condiciones de privación de suero, en presencia o no de NGF. Para realizar el experimento se siembran las células PC12 en placas de 24 pozos a una densidad  $1,25 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>, se transfectan y se mantienen durante 72h. Pasado éste tiempo se realiza el tratamiento, cambiando el medio de crecimiento de las células a un medio de privación de suero con o sin NGF (50 ng/mL). Éste último se añade 30 minutos antes del cambio de medio y se mantiene después en el medio fresco durante 24h más. Transcurrido este tiempo se realiza el ensayo de MTT y los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se

muestran en la Figura 45B. La privación de suero provoca una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente un 35%. El tratamiento con NGF es capaz de inducir la supervivencia en el caso de las células no transfectadas y en las células transfectadas con el siRNA control, pero no en el caso de las células silenciadas para nSMasa2. La disminución de los niveles de expresión de nSMasa2 suprime el efecto protector del NGF. Por lo tanto los resultados de este experimento corroboran los obtenidos con el inhibidor GW4869, confirmando así el importante papel que tiene la actividad nSMasa en la viabilidad celular inducida por NGF en las PC12.

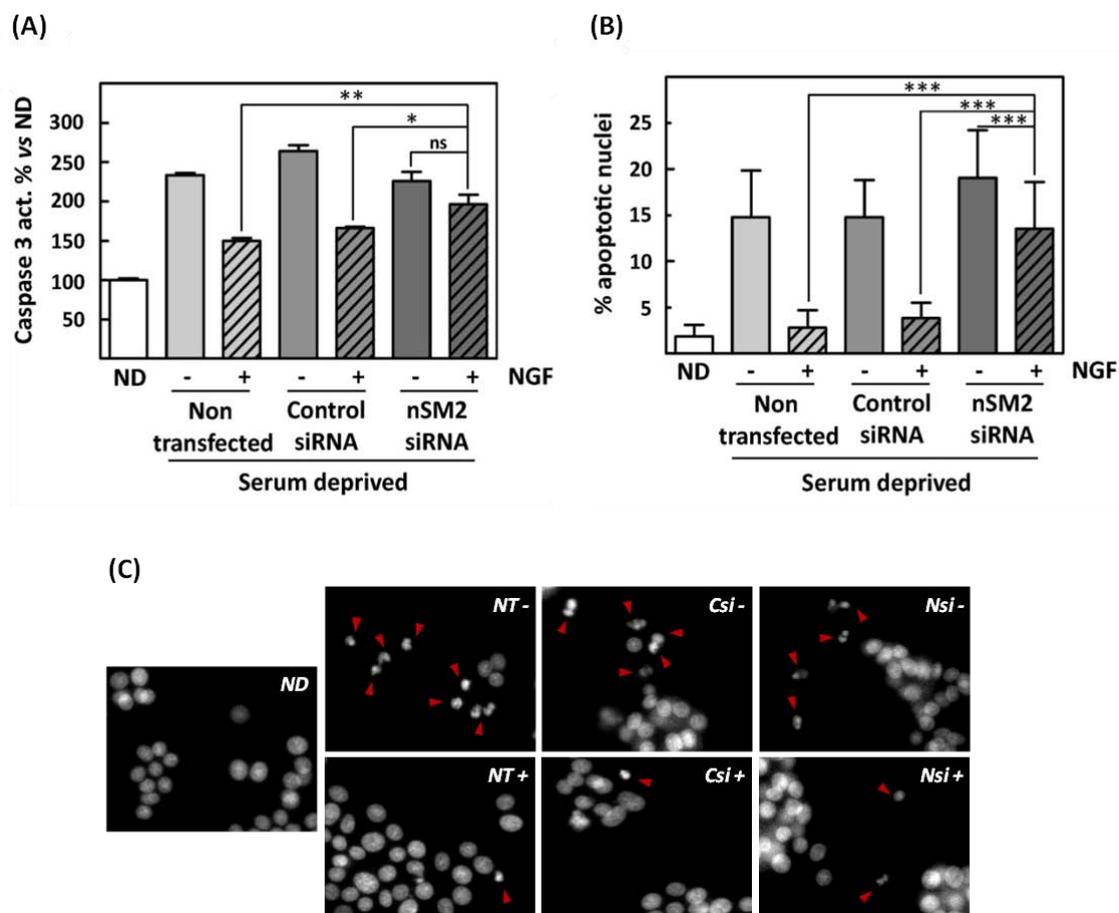


**Figura 45. Efecto del silenciamiento de la expresión de nSMasa2 en la viabilidad celular inducida por NGF.**

**(A)** Los niveles de nSMasa2 en el cultivo de PC12 son reducidos mediante la transfección con siRNAs. Se realiza un western blot de los lisados para comprobar el silenciamiento utilizando un anticuerpo contra nSMasa2 (nSM2), y se determinan los niveles de actina como control de carga. **(B)** Las PC12 transfectadas son privadas de suero en presencia o no de NGF (50 ng/mL) durante 24h. La viabilidad celular se determina con un ensayo de MTT y los resultados son expresados en porcentaje de supervivencia respecto al control no privado de suero (ND). \*\*  $p < 0,01$  usando un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni.

Para corroborar que la muerte en estas células ocurre de forma apoptótica y que la nSMasa2 interfiere en este proceso, se realizan otros ensayos que respalden los resultados obtenidos en el MTT. En primer lugar se determina la actividad caspasa-3 en los lisados obtenidos en un experimento igual al anterior, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.3. de Materiales y métodos. El papel esencial de la caspasa-3 en el proceso de apoptosis neuronal está ampliamente definido. Se expresa en la célula en forma de zimógeno inactivo que puede activarse, tanto por factores extrínsecos como intrínsecos, mediante otras caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9 respectivamente). Una vez activa procesa proteolíticamente, conjuntamente con otras caspasas ejecutoras (o efectoras), sustratos como proteínas estructurales, moléculas implicadas en varias vías de señalización o enzimas de reparación de DNA (Hengartner, 2000; Kumar, 2007). En la Figura 46A se observa como la privación de suero en las PC12 provoca un evidente aumento en la actividad caspasa, que es revertido con la adición de NGF en el medio. Sin embargo en las PC12 transfectadas para nSMasa2, el NGF es incapaz de impedir este aumento de actividad caspasa-3. En segundo lugar se realiza también una tinción de los núcleos de las PC12 con Hoechst. Las células que se encuentran en un estado de muerte

apoptótica presentan un núcleo con la cromatina más condensada y fragmentada. El Hoechst se une al DNA de las células y permite diferenciar los núcleos apoptóticos de los normales, ya que los primeros se visualizan mucho más compactos e intensamente teñidos. De esta manera, el recuento de núcleos apoptóticos en las PC12 privadas de suero y tratadas con NGF, permite también determinar la viabilidad del cultivo.



**Figura 46. Efecto del silenciamiento de la expresión de nSMa2 en los eventos antiapoptóticos promovidos por NGF en PC12 sometidas a un estrés de suero.**

Las células PC12 son transfectadas para disminuir los niveles de nSMa2 y, 72h después son tratadas con NGF (50 ng/mL) en condiciones de privación de suero. **(A)** Pasadas 24h del tratamiento se recogen los lisados de cada condición y se analizan mediante un ensayo para determinar la actividad caspasa 3. Los resultados se muestran como porcentajes respecto a la condición control no privada de suero (ND). **(B)** 24h después del tratamiento, se tiñen los núcleos de las PC12 con Hoechst y se visualizan en un microscopio de fluorescencia. La gráfica muestra el porcentaje de núcleos apoptóticos observados respecto al total de núcleos contabilizados para cada condición. El análisis estadístico se realiza mediante *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns: no significativo) **(C)** Imágenes representativas de los resultados mostrados en (B). Las flechas blancas marcan los núcleos condensados. (ND, no privado de suero; NT-, no transfectado, sin NGF; NT+, no transfectado, con NGF; CSi-, control siRNA, sin NGF; CSi+, control siRNA, con NGF; Nsi-, nSMa2 siRNA, sin NGF; Nsi+, nSMa2 siRNA, con NGF).

En la Figura 46B se muestra el porcentaje de núcleos apoptóticos respecto al número total de núcleos contabilizados en cada condición y en la Figura 46C se muestran algunas imágenes representativas de las tinciones con Hoechst. Las células sometidas a estrés muestran un porcentaje de núcleos apoptóticos muy superior al control sin privación de suero (ND), y el tratamiento con NGF previene esta mortalidad en el caso de las PC12 no transfectadas o transfectadas con el siRNA control (Csi). La reducción de los niveles de expresión de nSMasa2 mediante siRNAs bloquea la acción del NGF y, en este caso, el número de núcleos apoptóticos contabilizados es significativamente superior que en las células no transfectadas tratadas con NGF. El porcentaje de núcleos apoptóticos en la condición transfectada tratada con NGF es también significativamente menor que el registrado en su condición control, aunque no se ve reducido en la misma proporción que en los controles no transfectados. Por lo tanto, el resultado corrobora de nuevo que el silenciamiento de nSMasa2 en las PC12 suprime el efecto neuroprotector del NGF en condiciones de estrés apoptótico.

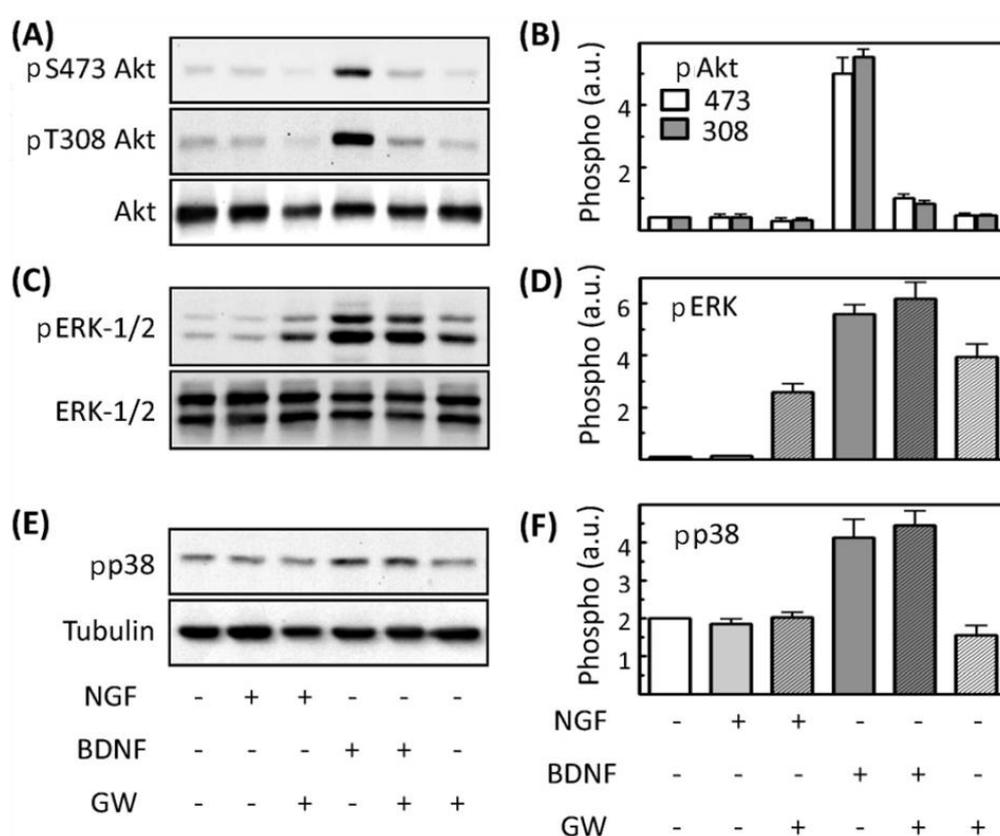
## 2.2. Papel de la nSMasa en las vías de señalización activadas por las neurotrofinas

### 2.2.1. La activación de Akt inducida por TrkB es dependiente de nSMasa

Hasta ahora se ha demostrado que la actividad esfingomielinasa neutra es necesaria para el efecto neuroprotector de las neurotrofinas ante un estrés apoptótico. El siguiente objetivo que nos proponemos es saber sobre qué vías de señalización inducidas por las neurotrofinas está interfiriendo la nSMasa2. Como ya se ha comentado, NGF y BDNF, a través de sus receptores Trk, activan las vías de señalización de PI3K/Akt, Ras/MAPK y PLC- $\gamma$ /PKC. Como indicador del estado de la vía PI3K/Akt se ha decidido analizar el estado de activación de Akt. La proteína cinasa Akt se activa al fosforilarse en el residuo T308, situado en el dominio catalítico, y el residuo S473, en la región hidrofóbica (Andjelković et al., 1997). Ambas fosforilaciones son reguladas por distintos mecanismos, en el caso de la posición T308 está mediada por PDK-1 (Alessi et al., 1997) mientras que en S473 interviene el complejo mTORC2 (Sarbasov et al., 2005; Guertin and Sabatini, 2007). Una vez activado, el Akt fosforila diversos sustratos *downstream* implicados en el crecimiento, la proliferación y la supervivencia (Manning and Cantley, 2007). Como indicadores de la vía Ras/MAPK se analizan ERK-1/2 y p38 MAPK. ERK-1 y ERK-2 son proteínas serina/treonina cinasas que participan en la regulación de múltiples procesos celulares y que catalizan la fosforilación de cientos de sustratos, tanto citoplasmáticos como nucleares, incluyendo moléculas reguladoras y factores de transcripción. ERK-1/2 es activada por MEK-1/2 mediante la fosforilación en sus residuos Y204/187 y en T202/185 (Roskoski, 2012). La p38 MAPK es una proteína cinasa que puede ser activada por múltiples estímulos, entre ellos el estrés celular. Esta proteína está implicada en la activación de diversos procesos como la degradación de proteínas, la apoptosis, la endocitosis o la migración celular, dependiendo del tipo celular y del estímulo inductor (Zarubin and Han, 2005; Cuadrado and Nebreda, 2010).

Para estudiar el estado de estas vías, se priva de suero y potasio (medio K5) durante 1h un cultivo de CGN de 7DIV con la finalidad de partir de un estado de fosforilación basal en las moléculas de interés. Pasado este tiempo se añade BDNF o NGF (50ng/mL) durante 15 min. En las condiciones donde se requiere se incuban las células con el inhibidor de nSMasa GW4869 1h antes de añadir las neurotrofinas. Transcurridos los 15 min las células se recogen y se lisan para ser analizadas por

western blot. Tal y como se muestra en la Figura 18, se han determinado los niveles de Akt fosforilado en las posiciones T308 y S473, de pERK-1/2 y de p38-MAPK fosforilada, así como el total de Akt y ERK-1/2. Los niveles de tubulina se analizan como control de carga del western para asegurar que en todas las condiciones se ha cargado la misma cantidad de proteína total. En la Figura 47A y B se observa como el BDNF es capaz de inducir la fosforilación de Akt en las dos posiciones analizadas, mientras que el tratamiento simultáneo con GW4869 suprime este efecto. Por el contrario el NGF no provoca la fosforilación de Akt en este modelo, ya que estas células no expresan TrkA y por lo tanto se encuentra interaccionando con p75<sup>NTR</sup>. Este resultado está en concordancia con el obtenido en los ensayos de viabilidad, ya que está ampliamente descrito que la vía PI3K/Akt promueve la supervivencia celular.



**Figura 47. Niveles de pAkt, pERK-1/2 y pP38 en CGNs tratadas con BDNF y NGF en presencia de un inhibidor de la esfingomielinasa.**

El cultivo de CGNs es privado de suero y potasio (medio K5) durante 1h previa al tratamiento. Se añade BDNF o NGF (50 ng/mL), según se requiera, durante 15 min. En algunas condiciones se añade 10  $\mu$ M de GW4869 1h antes de incorporar la neurotrofina. Los lisados son recogidos y analizados mediante western blot (15  $\mu$ g de proteína total por carril). Se determinan los niveles de pAkt en las posiciones T308 y S473 (A), los niveles de pERK-1/2 (B), y los de pP38 (C), además de sus respectivos totales y tubulina como control de carga. Se calcula la intensidad de las bandas y se representa la media de 3 experimentos en las gráficas (B, D y F).

En cuanto a los niveles de ERK-1/2 fosforilado en las posiciones T202 y Y204, aumentan en las células tratadas con BDNF, pero no en las tratadas con NGF (Figura 47 C y D). Curiosamente la inhibición de la

actividad nSMasa en las células tratadas solamente con GW4869 resulta en un aumento de la fosforilación de ERK-1/2. Este efecto indica que, o bien la actividad nSMasa o algún mecanismo derivado de ella, intervienen de alguna manera en la regulación negativa de la vía de ERK-1/2. El co-tratamiento con BDNF y GW4869 muestra unos niveles de pERK-1/2 parecidos al tratamiento con BDNF solamente, así que en este caso el inhibidor no parece tener ningún efecto. Finalmente en las Figuras 47E y F se observa como el tratamiento con BDNF induce también una fosforilación moderada de p38 en los residuos T180 y Y182, mientras que NGF no parece tener ningún efecto en esta vía. Esta fosforilación inducida por BDNF no parece ser dependiente de nSMasa, ya que el co-tratamiento con el inhibidor no afecta a los niveles.

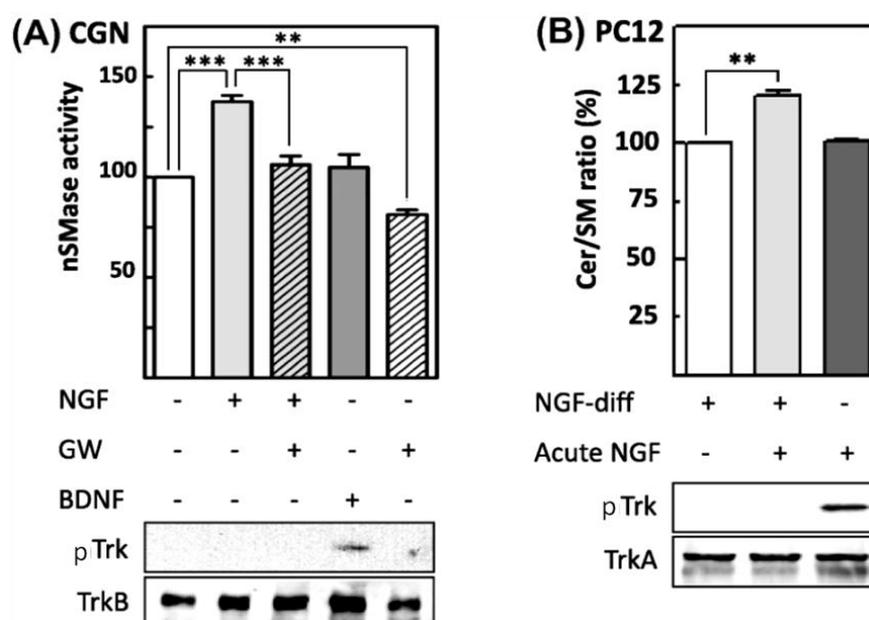
### 2.2.2. El NGF induce la producción de ceramida en ausencia del receptor TrkA

Tal y como se ha demostrado, el efecto antiapoptótico ejercido por las neurotrofinas es dependiente de esfingomielinasa, ya que al inhibirla o silenciar su expresión se suprime este incremento de la viabilidad. Está ampliamente descrito que las neurotrofinas ejercen su función neuroprotectora a través de la activación de los receptores Trk, que a su vez activan las cascadas de señalización comentadas anteriormente. La actividad esfingomielinasa, en cambio, es promovida por la acción de la neurotrofina sobre el receptor  $p75^{NTR}$ . Así que nuestro siguiente objetivo es estudiar bajo qué condiciones se activa la esfingomielinasa, y como se relaciona esta activación con la supervivencia neuronal inducida por los Trk.

Con esta finalidad se trata un cultivo de CGN de 7 DIV con 50 ng/mL de NGF o de BDNF, en presencia o no del inhibidor GW4869 (10  $\mu$ M) durante 1h. Se recogen los lisados y una parte de ellos se utiliza para determinar la actividad nSMasa con un kit comercial, según lo descrito en el apartado 5.4. de Materiales y métodos. La otra parte del lisado se analiza por western blot para comprobar el estado de fosforilación de los receptores Trk en cada condición, utilizando un anticuerpo que reconoce tanto TrkA como TrkB fosforilados en las posiciones Y674/675 y Y706/707 respectivamente. Si la neurotrofina añadida interacciona con su receptor Trk, éste se encontrará fosforilado. El TrkB total se analiza para comprobar que en todas las condiciones se expresa esta proteína en cantidades comparables. En este caso, al ser las CGN un sistema  $TrkA^{-}$ ,  $TrkB^{+}$ ,  $TrkC^{+}$ ,  $p75^{NTR+}$ , el Trk fosforilado que se detecta corresponde a TrkB, ya que es el receptor principalmente expresado. En la Figura 48A se detecta un aumento significativo de la actividad nSMasa después del tratamiento con NGF, efecto que es suprimido al co-tratar con el GW4869. No se detecta activación de los receptores Trk tras el tratamiento con NGF, ya que en este sistema celular el NGF se encuentra interactuando con su receptor de baja afinidad  $p75^{NTR}$ , a través del cual induce la actividad esfingomielinasa. Por el contrario el BDNF sí que provoca una fosforilación de TrkB, mientras que no produce ningún efecto sobre la actividad nSMasa. La adición de GW4869 solamente en el cultivo provoca una disminución de la actividad nSMasa basal de la condición control sin tratamiento.

La misma metodología empleada en las CGN se aplica en este caso en un cultivo de PC12. En este caso el anticuerpo contra pTrk detecta básicamente TrkA, ya que en este modelo no se expresa TrkB, por lo tanto se determinan también los niveles de TrkA totales como control de que la carga ha sido equitativa. Se tratan células PC12 diferenciadas mediante NGF durante 6 días con una dosis aguda de

NGF (50 ng/mL) durante 1h. El tratamiento con NGF de las células diferenciadas induce la actividad nSMasa pero no provoca la fosforilación de TrkA. En paralelo se trata un cultivo de células PC12 no diferenciadas también con una dosis de 50 ng/mL de NGF. Por el contrario de lo observado en las células diferenciadas, en este caso el tratamiento agudo con NGF no aumenta la actividad esfingomielinasa, sino que causa la fosforilación de TrkA. Estos resultados parecen indicar que las PC12 diferenciadas sufren una insensibilización del receptor TrkA al efecto del NGF, ya que el tratamiento agudo no causa su fosforilación. En estas células diferenciadas la inducción de la actividad esfingomielinasa tras el tratamiento agudo con NGF sería entonces consecuencia de la interacción entre el NGF y el p75<sup>NTR</sup>. Por lo tanto parece ser que las neurotrofinas inducen la viabilidad celular a través de los receptores Trk sin que haya un aumento de actividad nSMasa. Sin embargo sí parece que requieren de una actividad nSMasa basal, puesto que al bloquearla se impide el efecto neuroprotector.

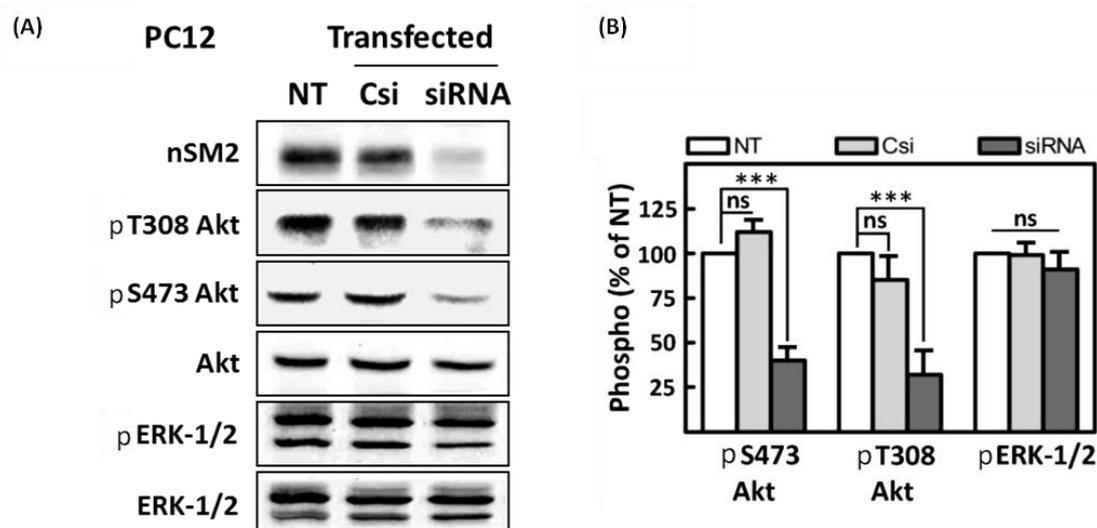


**Figura 48. Correlación entre la actividad esfingomielinasa y la actividad Trk en cultivos de CGN y PC12.**

**(A)** Las CGN son tratadas con 50 ng/mL NGF o BDNF, con o sin GW4869 según la condición. Se recogen los lisados y se determina la actividad esfingomielinasa. Los resultados obtenidos se representan como porcentaje de actividad respecto a la condición control no tratada. Los valores se analizan mediante one-way ANOVA seguido de un test de Dunnett (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). En paralelo se analizan también los lisados mediante western blot para determinar los niveles de pTrk, así como los de TrkB total. **(B)** Se añade NGF (50 ng/mL) en cultivos de PC12 diferenciadas y no diferenciadas. Se recojen los lisados y se determina la actividad esfingomielinasa, así como los niveles de Trk fosforilado y TrkA total mediante western blot. Se realiza un análisis one-way ANOVA seguido de un test de Bonferroni para comparar las diferentes condiciones (\*\*  $p < 0,01$ ).

### 2.2.3. La nSMasa2 está implicada en el mantenimiento de la fosforilación basal de Akt

De acuerdo con los resultados anteriores, las neurotrofinas necesitan de la actividad esfingomielinasa para inducir el efecto antipoptótico a través de sus receptores Trk, puesto que al inhibir esta actividad se suprime el efecto en la supervivencia. Sin embargo la acción de las neurotrofinas sobre los receptores Trk no promueve el aumento de la actividad esfingomielinasa. Solo se registra un aumento de la actividad nSMasa cuando la neurotrofina está actuando a través de p75<sup>NTR</sup>, pero en estas condiciones no promueve la supervivencia. Por lo tanto parece que el efecto en la supervivencia por parte de la neurotrofina depende más bien de una actividad basal de nSMasa. A consecuencia de estas observaciones nos proponemos determinar si la actividad nSMasa basal tiene alguna implicación en la transducción de las vías de señalización estudiadas. Para ello se determinan los niveles de fosforilación de Akt y de ERK-1/2 en células PC12 transfectadas para silenciar la expresión de la nSMasa2 y en PC12 no transfectadas.



**Figura 49. Determinación de los niveles de pAkt y pERK-1/2 en PC12 silenciadas para nSMasa2.**

**(A)** El cultivo de PC12 se transfecta con un siRNA control (Csi) o con siRNAs contra nSMasa2 durante 72h. Se analizan los lisados por western blot (15 µg de proteína total por muestra) utilizando anticuerpos contra nSMasa2 (nSM2), Akt fosforilado en la posición T308 y S473, pERK-1/2, así como con anticuerpos contra Akt y ERK-1/2 totales. **(B)** La señal de las bandas se determina mediante densitometría, y los niveles de proteína fosforilada se expresan en porcentaje respecto a la condición no tratada (NT). Los valores se comparan usando un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test de Dunnett. \*\*\* p < 0,001; ns, no significativo.

Para ello se transfecta un cultivo de PC12 con la mezcla de siRNAs contra nSMasa2 y 72h después se recoge el lisado celular y se analiza por western blot. Como se puede observar en la Figura 49, las PC12 transfectadas muestran niveles de nSMasa2 muy inferiores a los detectados en células no transfectadas (NT) o transfectadas con un siRNA control sin diana (Csi). Estudiando el estado de Akt con anticuerpos contra la molécula fosforilada en la posición T308 y en la S473, observamos como las

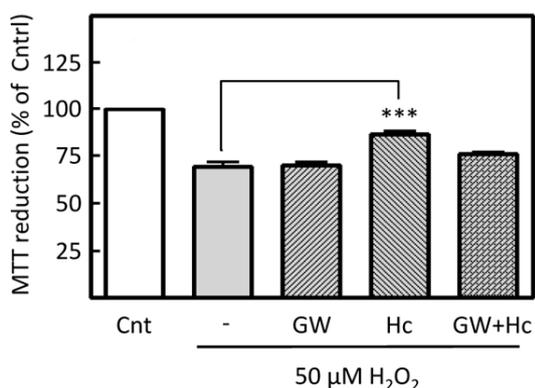
células silenciadas presentan una disminución significativa de la fosforilación basal de Akt en ambas posiciones. La transfección con el siRNA control no afecta a los niveles de fosforilación detectados. Finalmente, al determinar los niveles de ERK-1/2 fosforilado en las posiciones T202 y Y204, no se detecta que tenga ningún efecto la supresión de la expresión de nSMasa2. Por lo tanto en este caso no parece que la actividad nSMasa basal este teniendo ninguna implicación en el mantenimiento de pERK-1/2. Estos resultados demuestran que en PC12 no estimuladas, el nivel de fosforilación basal de Akt depende en gran medida de la actividad basal de nSMasa2.

### **2.3. El efecto de supervivencia celular inducido por Hc-TeNT es dependiente de actividad esfingomielinasa**

Hasta ahora hemos visto el efecto de las neurotrofinas en la supervivencia celular actuando a través de los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup>, y la implicación de la esfingomielinasa neutra en el proceso. Numerosos trabajos previos del grupo demuestran que el fragmento Hc de la toxina tetánica tiene un efecto neuroprotector similar al observado para las neurotrofinas en diversos modelos animales y celulares sometidos a diferentes tipos de estrés (Gil et al., 2001, 2003; Chaïb-Oukadour et al., 2004, 2009; Mendieta et al., 2009; Moreno-Igoa et al., 2010). Así que nos planteamos si, al igual que en el caso del BDNF y el NGF, el efecto neuroprotector inducido por el Hc-TeNT es también dependiente de la actividad esfingomielinasa. Nuestro grupo ha demostrado que la incubación de células CGN y de PC12 con Hc-TeNT provoca un incremento de la ratio ceramida/esfingomielina. Además este efecto viene acompañado de un aumento de la actividad esfingomielinasa, que es revertido al pre-tratar las células con GW4869, un inhibidor específico de la nSMasa. Esta inducción de la actividad nSMasa promueve la formación de plataformas de ceramida en la membrana plasmática sin que estas estructuras interfieran en el proceso de internalización del Hc-TeNT (Cubí et al., 2013).

En primer lugar se ensayan los efectos de Hc-TeNT en un modelo de células PC12 diferenciadas, que ya se ha utilizado en los apartados anteriores. En este caso se induce la muerte celular en el cultivo mediante estrés oxidativo con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se ha demostrado que provoca apoptosis en cultivos de PC12 (Maroto and Perez-Polo, 1997; Ray et al., 2000). Las células se tratan durante 24h con 10 nM Hc-TeNT, añadido en el medio a la vez que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM). En las condiciones donde se requiera se añade 10 µM del inhibidor GW4869 una hora antes de añadir el Hc-TeNT y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se realiza un ensayo MTT para determinar el porcentaje de muerte celular respecto al control.

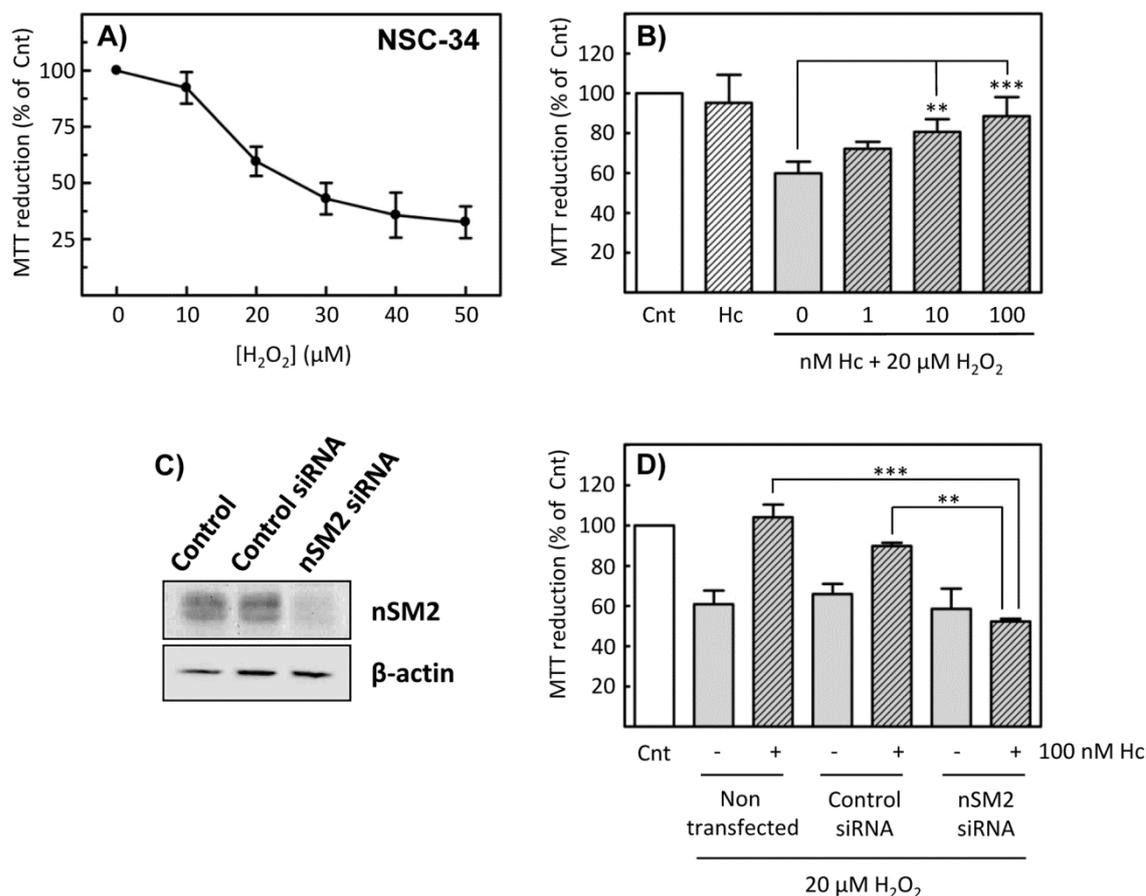
En la Figura 50 se observa como la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca una reducción de la viabilidad celular de aproximadamente un 40% respecto a la condición sin estrés. Las células en las que se ha añadido Hc-TeNT muestran un porcentaje de viabilidad significativamente superior al registrado en el control de estrés sin tratamiento. El tratamiento con el inhibidor solamente no causa ningún efecto, sin embargo al añadirlo conjuntamente con el Hc-TeNT revierte el efecto en la supervivencia de éste. Por lo tanto el resultado demuestra que, al igual que en el caso de las neurotrofinas, la actividad nSMasa es esencial en la protección ejercida por el Hc-TeNT en las células sometidas a un estrés apoptótico.



**Figura 50. Efecto en la supervivencia celular inducida por Hc-TeNT ante un estrés oxidativo en células PC12.** PC12 diferenciadas durante 7 DIV se incuban con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  para provocar un estrés apoptótico. 1h antes se añade 10  $\mu\text{M}$  GW4869. El Hc-TeNT se adiciona al mismo tiempo que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A las 24h se realiza un ensayo de MTT y el resultado se expresa como porcentaje de viabilidad respecto a la condición control (Cnt). Los valores obtenidos se comparan usando un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$ .

A continuación planteamos un experimento similar pero en un modelo celular diferente en el que, en vez de utilizar un inhibidor químico de la nSMasa, se realizará un silenciamiento de la expresión de la nSMasa2. En este caso se ha utilizado la línea celular NSC-34, que presenta un fenotipo similar a motoneurona. Estas células se someten a un estrés oxidativo añadiendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  a diferentes concentraciones durante 24h, con el objetivo de determinar la concentración a la que produce un índice de mortalidad que nos resulte adecuado. Después de las 24h se realiza un ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular en cada condición (Figura 51A), observando que a partir de 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  la mortalidad empieza a ser notable, alrededor de un 40%, y va aumentando a medida que se incrementa la concentración de peróxido, hasta llegar a un 65% aproximadamente. Se decide tratar las células a 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  para obtener una mortalidad moderada sobre la que ensayar distintas concentraciones de Hc-TeNT, con el fin de determinar cuál es la que provoca un mayor efecto neuroprotector. Las células, sembradas el día anterior, se tratan añadiendo al medio  $\text{H}_2\text{O}_2$  y Hc-TeNT, y 24h después se realiza el ensayo de reducción de MTT. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 51B, donde se observa que las tres concentraciones de Hc-TeNT probadas tienen un efecto sobre la viabilidad. A 10 nM y 100 nM Hc-TeNT el aumento de la supervivencia celular producido es significativo. Se añade también una condición tratada únicamente con Hc-TeNT (100 nM), sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para corroborar que la proteína por sí sola no parece tener ningún efecto en la viabilidad de las células no sometidas a estrés. Una vez seleccionadas las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de Hc-TeNT más adecuadas, el siguiente paso es comprobar el efecto del bloqueo de la nSMasa en la acción neuroprotectora de Hc-TeNT. En este caso se realiza un silenciamiento de la expresión de la nSMasa2 utilizando un conjunto de siRNAs contra el producto del gen *smpd3*, que impedirán la traducción de la proteína. Siguiendo los pasos detallados en el apartado 4.3.1. de Materiales y métodos, se realiza la transfección de las células. A las 72h las NSC-34 ya presentan unos niveles de nSMasa2 muy disminuidos respecto al control, tal y como se puede observar en el western blot mostrado en la Figura 51C. En paralelo se ha utilizado un siRNA control sin ninguna diana conocida para descartar que los cambios observados se deban al proceso de transfección. Se han analizado también los niveles de  $\beta$ -actina para comprobar que se ha cargado la misma cantidad de lisado en todas las condiciones. Por lo tanto, 48h después de la transfección se añade 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  y 100 nM Hc-TeNT al medio, y 24h más tarde se analizan los niveles de reducción de MTT. En la Figura 51D se muestra como la disminución de la viabilidad celular causada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es revertida con la adición de Hc-TeNT en las condiciones control (Cnt) sin transfectar y en las transfectadas con el siRNA control. Sin

embargo en las células silenciadas para la nSMasa2 el Hc-TeNT no es capaz de promover el efecto protector observado en los controles. Este resultado confirma el importante papel de la actividad nSMasa en neuroprotección ejercida por el Hc-TeNT.

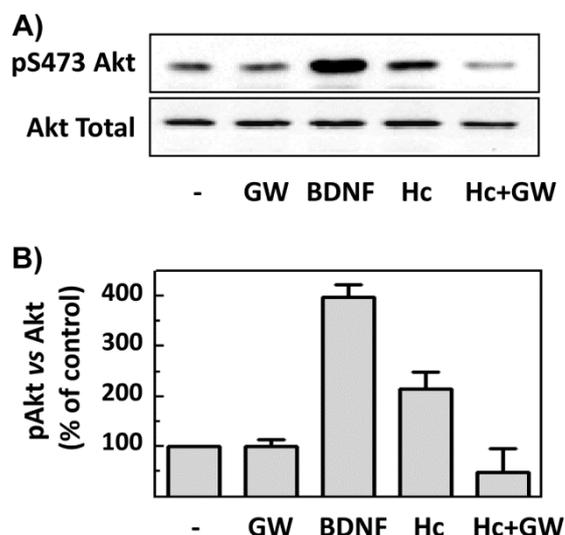


**Figura 51. Efecto en la viabilidad celular inducida por Hc-TeNT en células NSC34 silenciadas para nSMasa2.**

**(A)** El cultivo de NSC-34 se trata con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h, y la viabilidad celular de cada condición se determina mediante un ensayo de MTT. La curva muestra los valores medios de 6 muestras. **(B)** Las NSC-34 son tratadas con 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h, añadiendo o no concentraciones crecientes de Hc-TeNT. (Cnt, control). En la gráfica se muestra el resultado del ensayo de MTT. Se representan las medias de 6 valores (SD) obtenidos de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, usando un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. **(C)** Western blot para detectar los niveles de nSMasa2 (nSM2) y β-actina en los lisados de NSC-34 no tratadas (Control), transfectadas con siRNAs contra nSMasa2 (nSMasa2 siRNA), o con un siRNA control que no produce silenciamiento (Control siRNA). **(D)** Las NSC-34 son transfectadas y tratadas con 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 100 nM Hc-TeNT, y la viabilidad celular se determina utilizando un ensayo de MTT. Cada barra es la media de 6 valores (SD) obtenidos en 3 experimentos independientes. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, usando un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni.

Al igual que en los experimentos con NGF y BDNF anteriores, también con Hc-TeNT queremos estudiar qué vías de señalización se ven afectadas al bloquear la actividad nSMasa. En estudios previos de nuestro grupo se ha demostrado el efecto en la supervivencia celular del Hc-TeNT, y que

este efecto es dependiente de la señalización a través de Akt y ERK-1/2 (Chaïb-Oukadour et al., 2004, 2009; Herrando-Grabulosa et al., 2013). Como ya hemos visto, el BDNF produce un efecto neuroprotector en CGN sometidas a un estrés, a través de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt, Ras/MAPK y PLC- $\gamma$ /PKC. Al bloquear la actividad nSMasa en estas células mediante la adición del inhibidor GW4869, el BDNF es incapaz de promover la fosforilación de Akt tanto en la T308 como en la S473.



**Figura 52. Determinación de los niveles de pAkt en CGN tratadas con BDNF, Hc-TeNT y un inhibidor de nSMasa.**

**(A)** Se analiza mediante western blot los niveles de fosforilación de Akt en la S473 en lisados de CGN tratados durante 15 min con Hc-TeNT (10 nM) en condiciones de privación de suero y potasio, pre-tratados o no con GW4869 (10  $\mu$ M) durante 1h. Se utiliza BDNF (50 ng/mL) como control positivo de fosforilación, añadiéndolo también al cultivo durante 15 min. Se analizan también los niveles de Akt total como control de carga. **(B)** Cuantificación mediante el programa ImageJ de las bandas obtenidas en el western blot. Los valores representados en el gráfico de barras son los porcentajes de señal de cada banda respecto a la condición control. Las barras de error representan la desviación estándar de un triplicado.

Para determinar el papel de la nSMasa en la señalización promovida por Hc-TeNT, se trata un cultivo de CGN de 7DIV con 10  $\mu$ M GW4869 durante una hora antes de añadir el Hc-TeNT (10 nM) o el BDNF (50 ng/mL) durante 15 min más. El cultivo de CGNs es privado de suero y potasio durante 1h previa al tratamiento. Se recogen los lisados de las células y se analizan mediante western blot para determinar los niveles de Akt fosforilado en S473 y de Akt total. En la Figura 52A se muestran los niveles detectados de cada proteína después de revelar el western blot, y en la Figura 52B la cuantificación de estas bandas expresada en porcentaje de señal respecto a la condición control sin tratamiento. El tratamiento con Hc-TeNT provoca un aumento de los niveles de pAkt evidentes, aunque no tan pronunciado como en el caso de BDNF, que es utilizado como control positivo de la fosforilación de Akt. Esta activación de Akt producida por Hc-TeNT se ve impedida al pre-tratar las células con el inhibidor. El tratamiento de las células con solamente el GW4869 no produce cambios en los niveles de pAkt. Según este resultado, al igual que en el caso de la fosforilación de Akt por efecto de BDNF, el Hc-TeNT también requiere de la actividad nSMasa para producir la activación de Akt.

## **V. DISCUSIÓN**

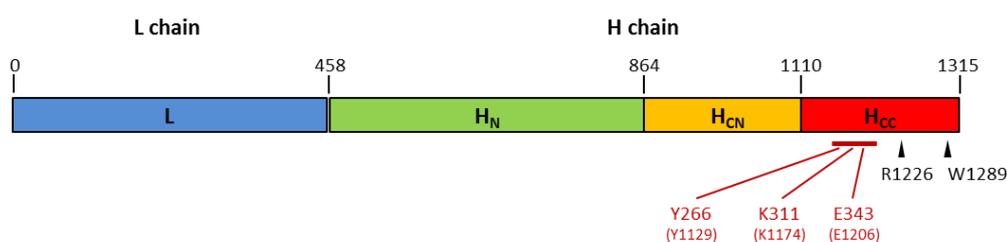


## 1. PAPEL DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkB COMO RECEPTOR PROTEICO DE ALTA AFINIDAD PARA LA TOXINA TETÁNICA

### 1.1. Hc-TeNT es capaz de unirse al dominio extracelular D5 de TrkB *in silico*

El estudio bioinformático de docking molecular revela que la unión de Hc-TeNT a los receptores Trk sería posible *in silico*. Se han obtenido los modelos estructurales de los complejos Hc-TeNT/TrkA, Hc-TeNT/TrkB y Hc-TeNT/TrkC (Figura 26), y se han determinado las interacciones moleculares que podrían darse entre ellos, así como los aminoácidos que estarían implicados en cada caso en las interfaces de unión (Tabla 6). En este estudio se evidencia que no existe homología entre el Hc-TeNT y las neurotrofinas utilizadas en el análisis. Sin embargo sí que se da una analogía estructural en la interfase de unión al receptor, ya que tanto la NT-4/5 como el Hc-TeNT presentan en esta zona un bucle que sobresale de su estructura e interaccionaría con el dominio extracelular D5 de TrkB (Figura 25).

En base a los complejos modelados se ha concluido que TrkB es el receptor que mostraría una mayor afinidad para la TeNT, pudiendo llegar a formarse entre ambas moléculas un total de siete puentes de hidrógeno y cinco puentes salinos. En el modelo propuesto el sitio de unión descrito para TrkB no interfiere con los bolsillos de unión a carbohidratos W y R. Este nuevo sitio de unión está situado en un bucle en la estructura del dominio H<sub>CC</sub>-TeNT, más cercano al dominio H<sub>CN</sub>-TeNT que los dos sitios de unión a gangliósidos (Figura 53). Por lo tanto, en este modelo, el Hc-TeNT podría interaccionar con los dos polisialogangliósidos a la vez que con el receptor TrkB, ya que el nuevo sitio de unión descrito se encuentra a distancia suficiente de los dos bolsillos. De esta manera tanto los polisialogangliósidos como el TrkB tendrían el potencial para unirse a Hc-TeNT simultáneamente propiciando la unión de alta afinidad a las membranas neuronales, en concordancia con lo que postula la teoría del receptor dual (Montecucco, 1986).



**Figura 53. Esquema de la división en dominios de la toxina tetánica.**

El dominio L-TeNT está coloreado en azul, el H<sub>N</sub>-TeNT en verde, el subdominio H<sub>CN</sub>-TeNT en naranja y el H<sub>CC</sub>-TeNT en rojo. En la parte superior están anotados los aminoácidos correspondientes a cada dominio y en la parte inferior se muestran (marcados con una cabeza de flecha) los sitios de unión a polisialogangliósidos, el bolsillo R donde se une una molécula de ácido siálico (alrededor de la R1226), y el bolsillo W donde se une una molécula de lactosa (en torno al W1289). También en la parte inferior están anotados los tres residuos sobre los que se ha llevado a cabo la mutación, entre paréntesis se muestra su numeración dentro de la TeNT entera.

## 1.2. Hc-TeNT es capaz de interactuar con TrkB así como con un péptido derivado de su dominio D5

Los experimentos de dot-blot realizados corroboran el resultado del estudio de modelaje molecular y demuestran que el fragmento recombinante Hc-TeNT es capaz de unirse específicamente a un péptido sintético basado en el dominio extracelular D5 de TrkB (Figura 28). Como ya se ha comentado en la introducción este es el dominio en los receptores Trk encargado de la unión a las neurotrofinas (Wiesmann et al., 2001), lo que parece coincidir con la hipótesis de que el Hc-TeNT estaría actuando sobre la célula mimetizando a los agonistas naturales de estos receptores. Al igual que las neurotrofinas, el fragmento Hc-TeNT puede dimerizar formando puentes disulfuro intermoleculares a través de la C869 (Qazi et al., 2007). La elevada concentración de TeNT en los *lipid rafts* propiciaría la dimerización, y esta resultaría en una mayor interacción con sus receptores gangliósidos y proteicos.

También se corrobora el efecto de Hc-TeNT en la activación del receptor TrkB, demostrando que esta interacción entre ambas moléculas es además funcional (Figura 29). Ya en anteriores trabajos del grupo se había observado que tanto la TeNT entera como el fragmento Hc-TeNT eran capaces de activar y provocar la fosforilación de los receptores Trk en neuronas corticales y en neuronas granulares de cerebelo en cultivo, así como en sinaptosomas de rata (Gil et al., 2000, 2001, 2003; Chaïb-Oukadour et al., 2004). También en estos trabajos se ha descrito que Hc-TeNT activa también varias moléculas involucradas en las vías de señalización Ras-MAPK, PI3K-Akt y PLC $\gamma$ 1-PKC (Herrando-Grabulosa et al., 2013). En este caso se ha querido evaluar la activación de TrkB por parte de Hc-TeNT a través del nivel de fosforilación de las tirosinas del *loop* de activación del receptor. El tratamiento de las neuronas granulares de cerebelo con Hc-TeNT induce la fosforilación de las tirosinas Y705/Y706, aunque de forma más moderada que el BDNF. Si bien este resultado parece corroborar la interacción entre Hc-TeNT y TrkB, también es cierto que el receptor podría estar activándose por otras vías, ya que está descrito que puede sufrir mecanismos de transactivación. Se ha descrito que algunos polisialogangliósidos, y concretamente GM1, pueden causar la activación y fosforilación de los receptores Trk y de ERK en cerebro. Esta transactivación presenta una cinética más lenta que la observada en respuesta al tratamiento con neurotrofinas, ya que alcanza el máximo de fosforilación alrededor de los 20 min en comparación del máximo para las neurotrofinas, que se da en 5 min (Duchemin et al., 2002). Aunque Hc-TeNT no puede unirse a GM1, sí que está ampliamente descrita su interacción con GD1b, GT1b y GQ1b por lo que no se podría descartar la formación de un complejo receptor ternario formado por el Hc-TeNT, el TrkB y alguno de éstos polisialogangliósidos.

Un mecanismo similar de activación de un receptor del tipo tirosina cinasa por parte de otra neurotoxina ha sido descrito recientemente en el caso de BoNT/A. La BoNT/A es capaz de unirse al receptor FGFR3 y provocar su autofosforilación a un nivel semejante al obtenido con FGF2, un agonista natural del receptor (Jacky et al., 2013). Además la internalización de BoNT/A depende del nivel de expresión de FGFR3 en la célula, y tanto agonistas naturales del receptor como péptidos derivados de su secuencia, bloquean la unión e internalización de la toxina. El hecho de que BoNT/A, una neurotoxina con una alta homología estructural a la TeNT, interactúe con un receptor tirosina cinasa, apoya a nuestra hipótesis de TrkB actuando como receptor proteico para la TeNT.

Asimismo se ha demostrado en este trabajo que el Hc-TeNT es internalizado en CGNs en las mismas vesículas endocíticas que TrkB (Figura 30). Alrededor de un 50% del Hc-TeNT endocitado en las células

coincide con el receptor dentro de las vesículas, localizadas por todo el citoplasma y neuritas pero preferentemente concentradas en la zona perinuclear. Estudios realizados anteriormente por otros grupos en cultivos primarios de motoneuronas también se ha demostrado una elevadísima colocalización de Hc-TeNT con TrkB en endosomas de señalización, así como con p75NTR y con sus respectivos agonistas, BDNF y NGF (Lalli and Schiavo, 2002; Deinhardt et al., 2006b). Según ese estudio, alrededor del 95% de las vesículas endocíticas contabilizadas eran positivas para Hc-TeNT, TrkB y p75NTR. Aunque en nuestros resultados este porcentaje pueda parecer menor, no se ha utilizado el mismo tipo neuronal ni el porcentaje ha sido calculado de la misma manera, además existen varias razones que podrían justificar las diferencias. El casi 50% de Hc-TeNT restante que no coincide con TrkB en nuestro experimento podría estar internalizándose mediante un mecanismo de reciclaje de vesículas sinápticas dependiente de actividad, tal y como se ha descrito que sucede también en neuronas corticales e hipocámpales (Matteoli et al., 1996; Yeh et al., 2010). Las CGN requieren de altas concentraciones de potasio en el medio, lo que resulta en unas condiciones de membrana despolarizantes que favorecen la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células y desencadenan la exocitosis de vesículas sinápticas. Por lo tanto es posible que en estas células se vea favorecida la entrada del Hc-TeNT a través de esta vía de reciclaje de vesículas. También podría ser que se hubiese unido a otro receptor de la membrana que permita también su endocitosis. Como ya se ha comentado, este tipo neuronal expresa también los receptores TrkC y p75NTR, y existen varias publicaciones que demuestran la interacción existente entre Hc-TeNT recombinante y p75NTR (Cubí et al., 2013), por lo que podría ser que parte del Hc-TeNT se estuviera internalizando unida a este otro receptor. Además en el análisis de modelaje molecular se ha visto que Hc-TeNT podría formar varias interacciones no covalentes con TrkC, de manera que también este receptor podría estar uniéndose al fragmento.

### **1.3. Hc-TeNT compite con BDNF por la unión a TrkB en membrana y por la internalización en vesículas endocíticas TrkB-positivas**

Los ensayos de unión realizados permiten concluir que el BDNF, un agonista natural de TrkB, es capaz de desplazar la unión del Hc-TeNT a la membrana de las CGNs, lo que indica que ambas moléculas compiten por un mismo sitio de unión a su receptor (Figura 31). Este resultado corrobora lo observado en el análisis *in silico*, que el Hc-TeNT se estaría uniendo a TrkB por el mismo dominio D5 reconocido por las neurotrofinas. Sin embargo en los ensayos de internalización no se observa una disminución del Hc-TeNT endocitada al añadir BDNF (Figura 32B). Aunque pudiera parecer contradictorio, este resultado podría explicarse por el hecho de que gran parte del Hc-TeNT endocitado en las células podría estar entrando por mecanismos de reciclaje de vesículas. De esta manera aunque el BDNF pudiera estar bloqueando una parte del Hc-TeNT endocitado a través del receptor TrkB, la cantidad de Hc-TeNT internalizada por otros mecanismos eclipsaría este efecto. De hecho, la adición de BDNF si provoca una disminución significativa de la colocalización de Hc-TeNT y TrkB en las mismas vesículas endocíticas, por lo que sí parece estar teniendo un efecto de competencia finalmente (Figura 32C). Este resultado se contradice con el observado anteriormente por Roux y colaboradores, que describieron que al co-inyectar intramuscularmente Hc-TeNT y BDNF en ratones se facilitaba la internalización del Hc-TeNT en las NMJ (Roux et al., 2006). También al co-

inyectar NT-4/5 observaban el mismo efecto aunque no tan acentuado. Esta diferencia de comportamiento puede ser debida al hecho de que, aparte de ser diferentes tipos celulares los que se analizan en cada caso, las dosis de BDNF en cada caso son distintas. En las co-inyecciones observaban un efecto potenciador de la internalización de Hc-TeNT en un rango de 2,5 – 100 ng de BDNF, mientras que en nuestro ensayo se añaden aproximadamente 200 ng de BDNF por pozo. Por otro lado también se ha descrito que dosis bajas de BDNF potencian la transmisión sináptica en NMJ en condiciones despolarizantes (Boulanger and Poo, 1999; Shinoda et al., 2014). Al potenciar el BDNF el reciclaje de vesículas sinápticas podría ser que el Hc-TeNT estuviera internalizándose por esta vía, enmascarando un posible efecto competidor del BDNF.

En el caso de NGF, esta neurotrofina no compite por la unión del Hc-TeNT a la membrana. Aunque las CGNs no expresan TrkA sí que expresan p75<sup>NTR</sup>, al cual puede unirse también NGF. El hecho de que NGF no desplace el Hc-TeNT unido a membrana da a entender que ambas moléculas no se encuentran compitiendo por la unión al p75<sup>NTR</sup>, al menos en las concentraciones ensayadas. En los ensayos de internalización el NGF tampoco cambia los niveles de Hc-TeNT endocitados, aunque sí que provoca un aumento de la colocalización de Hc-TeNT con TrkB en las vesículas. Una posible explicación para este aumento sería que Hc-TeNT pudiera interactuar también con el receptor p75<sup>NTR</sup> y que al tratar con NGF, éste compitiera por el receptor y desplazara el Hc-TeNT, que pasaría a unirse en mayor proporción a TrkB. Otra explicación es que el NGF no es capaz de inducir un aumento de la exocitosis en estas células, tal y como se ha descrito hace BDNF, y por lo tanto la vía de endocitosis por reciclaje de vesículas no esté tan promovida en esta condición. Al entrar menos Hc-TeNT por la vía de reciclaje de vesículas queda más disponible para ser endocitada junto a TrkB. En los experimentos de Roux co-inyectando Hc-TeNT con diferentes factores neurotróficos, el NGF tampoco ejercía ningún efecto sobre la internalización en las NMJ (Roux et al., 2006).

Finalmente altas cantidades del péptido D5 son capaces de desplazar la unión a membrana del Hc-TeNT. El péptido se estaría uniendo a Hc-TeNT en el sitio de unión descrito en el análisis de modelaje, bloqueando así la zona de interacción con TrkB. Sin embargo el péptido no es capaz de bloquear la entrada del Hc-TeNT en las CGNs, ni de provocar una disminución de la cantidad de Hc-TeNT colocalizada en vesículas con TrkB. Por el contrario sí que se aprecia una menor proporción de receptor TrkB colocalizando con Hc-TeNT. Tal vez el efecto en el porcentaje de colocalización Hc/TrkB se vea enmascarado por la cantidad de Hc-TeNT entrando por otras vías. El hecho de que el péptido interfiera en la unión pero no en la internalización resulta un poco contradictorio. Puede ser que la concentración de péptido utilizada no sea la adecuada y se requiera una cantidad mucho mayor para bloquear la internalización. También puede ser que durante la hora de incubación el complejo Hc-TeNT/D5 se disuelva por la presencia de otras neurotrofinas en el medio de cultivo con mayor afinidad por el péptido que el Hc-TeNT. La utilización del péptido D5 como agente bloqueante de la unión e internalización de la TeNT sería muy interesante para aplicar como tratamiento a los infectados por tétanos, como método sustitutorio de la vacuna. Como ya se ha explicado la vacuna del tétanos está compuesta por el toxoide tetánico, es decir la TeNT inactivada tras un tratamiento con formaldehído. El proceso de obtención de la vacuna es peligroso y costoso, por lo cual un péptido sintético podría ser una opción mucho más rentable.

#### **1.4. El fragmento Hc-TeNT inyectado intramuscularmente coincide con TrkB en las uniones neuromusculares y en el soma de las motoneuronas**

Como se ha comentado anteriormente el fragmento Hc-TeNT se transporta siguiendo la misma ruta endocítica retroaxonal que utilizan las neurotrofinas y sus receptores para llegar hasta el soma neuronal. Se ha demostrado que en motoneuronas en cultivo comparte vesículas con los receptores TrkB y p75<sup>NTR</sup>, y que la conversión de la GTPasa Rab5 a Rab7 es un paso clave para la maduración del endosoma y su tráfico intracelular (Lalli and Schiavo, 2002; Deinhardt et al., 2006b). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo inyectando intramuscularmente el fragmento Hc-TeNT en ratones. Observamos como el Hc-TeNT inyectado intramuscularmente colocaliza con el receptor TrkB en la zona presináptica de las uniones neuromusculares, marcada con SV2 (Figura 33). Asimismo colocaliza con p75<sup>NTR</sup> y Rab5 en los terminales presinápticos de las motoneuronas (Figura 34). Estas observaciones se contraponen a los resultados publicados por Roux y colaboradores, en los que tras una inyección de Hc-TeNT en el músculo LAL (levator auris longus) no observan colocalización de Hc-TeNT con TrkB (Roux et al., 2006). En su trabajo exponen que TrkB se encuentra situado en la zona presináptica de la unión y que el Hc-TeNT está adyacente pero no coinciden. Los experimentos de Roux fueron analizados 30 min post-inyección mientras que en nuestro caso los animales fueron sacrificados 24h tras la inyección intramuscular. Es posible que esta diferencia en los tiempos pueda explicar estos resultados opuestos, ya que mientras a los 30 min la mayor parte del Hc-TeNT se encuentra en las NMJ sin haber empezado aun el ascenso por los axones, a las 24h la mayor parte de la neurotoxina ha sido ya transportada hasta el soma.

Analizando el soma de las motoneuronas que inervan el músculo tibial, donde se inyectó el Hc-TeNT, observamos que Hc-TeNT y el receptor TrkB coinciden en un número considerable de vesículas endocíticas (Figura 35). Las vesículas que contienen el Hc-TeNT son de forma redondeada y están distribuidas por todo el citoplasma, especialmente concentradas en la zona perinuclear. Una de las sorpresas fue no encontrar un marcaje más concentrado en las zonas periféricas del cuerpo neuronal, ya que 24h después de la inyección se esperaba encontrar parte del Hc-TeNT en el proceso de transcitosis hacia las motoneuronas inhibitorias. Algunos autores han descrito que a las 2h post-inyección en ratones adultos ya se empiezan a marcar algunas motoneuronas (Miana-Mena et al., 2002). En nuestro experimento el marcaje con Hc-TeNT se observaba restringido a las motoneuronas pero sería necesario utilizar algún otro marcador específico de interneurona para determinar si se ha dado o no el proceso de transcitosis. También podría ser necesario inyectar más cantidad de Hc-TeNT, ya que se produce un efecto de dilución a medida que se transporta retroaxonalmente, y a tiempos más prolongados.

Se ha observado que el Hc-TeNT no colocaliza con NRG1 ni con vAChT en los botones C (Figura 36D). Esto nos indica que Hc-TeNT no se libera de forma post-sináptica en estas estructuras. La NRG1 es un factor trófico expresado en motoneuronas que se une a los receptores ErbBs, pertenecientes a la familia de receptores EGFR con actividad tirosina cinasa. A través de estos receptores induce el crecimiento y la diferenciación de diferentes tipos celulares. En las motoneuronas, la NRG1 actúa como una molécula de señalización retrógrada y es dirigida a los botones C, donde se concentra en la región post-sináptica dentro de una estructura en forma de cisterna adosada a la parte interna de la membrana plasmática (Gallart-Palau et al., 2014). Aunque el proceso de transcitosis ha sido poco

descrito, algunos autores han indicado que la TeNT es capaz de impedir la liberación de glicina en las células de Renshaw, que son un tipo de interneuronas que forman sinapsis inhibitorias locales con las  $\alpha$ -motoneuronas (González-Forero et al., 2005). A su vez las  $\alpha$ -motoneuronas inervan a estas células transmitiéndoles impulsos excitatorios y estimulándolas para que liberen glicina estableciendo así un circuito auto-inhibitorio. Estos contactos excitatorios colinérgicos pueden ser marcados con el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Alvarez et al., 1999), pero en nuestros experimentos no detectamos Hc-TeNT asociada a estos terminales. Por otro lado sí parece que Hc-TeNT y NRG1 colocalizan en algunas vesículas en el soma de la motoneurona, lo que podría indicar que comparten alguna parte de la ruta endocítica.

A pesar de que tradicionalmente el dominio Hc ha sido considerado el único responsable de la unión y transporte retroaxonal de la toxina, algunas observaciones ponen en duda esta cuestión. Experimentos realizados con TeNT entera y con el dominio Hc aislado demuestran que ambas son capaces de unirse a gangliósidos con una afinidad similar y que se internalizan a una velocidad parecida. Sin embargo una vez dentro de las células no se distribuyen en las vesículas de forma idéntica. La TeNT entera se asocia con las neuronas mediante un mecanismo mediado por clatrina e independiente de reciclaje de vesículas sinápticas, mientras que Hc-TeNT puede entrar por mecanismos tanto dependientes como independientes de reciclaje de vesículas, con o sin despolarización (Blum et al., 2014a). Otros estudios demuestran además que, tras ser inyectada periféricamente, la TeNT es capaz de llegar a neuronas no colinérgicas de la medula espinal, mientras que el dominio Hc por separado solo se encuentra en motoneuronas. Estos resultados podrían indicar el dominio Hc aislado pierde eficacia respecto a la toxina entera en transportarse retrógradamente desde las NMJ y en realizar el salto transináptico para llegar a las neuronas del SNC (Ovsepian et al., 2015). Otro estudio que da soporte este nuevo planteamiento indica que una proteína de fusión con los dominios L y H<sub>N</sub> de BoNT y el dominio Hc de TeNT, no es capaz de ser transportada retroaxonalmente. Al reemplazar el dominio Hc de dominio BoNT/A por su homólogo de TeNT, la proteína fusión permanece en los terminales presinápticos e induce una parálisis flácida en ratón (Wang et al., 2012). Según estos estudios, el dominio Hc determinaría la unión a la célula, pero regiones externas a este dominio podrían contribuir al transporte retroaxonal y al destino que alcanza la toxina dentro de la célula. Estas regiones actuarían restringiendo la entrada de la toxina a endocitosis mediada por clatrina vía interacciones con otras proteínas o lípidos de membrana (Blum et al., 2014b).

Con la finalidad de conocer más datos sobre la ruta de transporte que está siendo utilizada por el Hc-TeNT para acceder al SNC, se realizaron otros marcajes en estas motoneuronas. Hc-TeNT no colocaliza con la proteína GM130, que es una proteína componente de las membranas del aparato de Golgi, con lo que se concluye que las vesículas que contienen la TeNT no están asociadas a este orgánulo (Figura 36A). Por lo tanto se descarta que la TeNT siga una ruta endocítica semejante a la utilizada por la toxina colérica o la toxina Shiga, tal y como ya había sido reportado antes (Roux et al., 2005).

También se ha examinado en las muestras si al igual que en las NMJ, en el soma seguían coincidiendo Rab5 y Hc-TeNT (Figura 36B). El hecho de observar una localización conjunta de Hc-TeNT y Rab5 tanto en los terminales neuromusculares como en el citoplasma de las motoneuronas parece indicar que

esta GTPasa está implicada en el proceso de direccionamiento de la neurotoxina dentro de la célula. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por otros grupos en motoneuronas en cultivo, en las cuales también observaban colocalización de Hc-TeNT y Rab5 en vesículas endocíticas (Deinhardt et al., 2006b). Los resultados indican que en algunas de las vesículas sí que colocalizan ambas moléculas pero hay muchas en las que no. Esto indica que a las 24h post-inyección las vesículas que contienen el Hc-TeNT están ya probablemente una etapa de maduración más avanzada, ya que Rab5 es un marcador de endosomas tempranos. Se observa colocalización de Hc-TeNT, Rab 3 y EEA1 en algunas vesículas (Figura 36C). El EEA1 es una proteína de membrana localizada en la cara citosólica de la membrana de los endosomas tempranos. Tiene un papel muy importante en la fusión de vesículas endocíticas durante la endocitosis mediante la interacción con Rab5 y PI(3)P (*phosphatidylinositol 3-phosphate*) presentes en vesículas adyacentes, promoviendo de esta manera la fusión de las vesículas. Se conoce que Hc-TeNT se transporta en endosomas Rab5-positivas por lo cual la presencia de EEA1 en estas vesículas no es de extrañar. Rab3 es una GTPasa involucrada en las últimas etapas de la exocitosis mediada por  $Ca^{2+}$  y en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis (Südhof, 1997). La presencia de este marcador en las vesículas que contienen Hc-TeNT podría indicar que están siendo redirigidas hacia la membrana plasmática para ser liberada en las sinapsis.

Recientemente Terenzio y colaboradores han profundizado un poco más en las etapas del transporte retroaxonal del Hc-TeNT y los receptores de neurotrofinas y han descrito diversas proteínas implicadas en este proceso (Terenzio et al., 2014a, 2014b). En sus trabajos en motoneuronas en cultivo ratifica que Hc-TeNT, TrkB y p75<sup>NTR</sup> comparten el mismo tipo de vesículas endocíticas y además las sitúa en un compartimento endosomal asociado al retrómero. El retrómero es un gran complejo proteico que controla la distribución de las vesículas endocitadas para redirigirlas hacia el aparato de Golgi o hacia la membrana plasmática para procesos de reciclaje. Está compuesto por varias proteínas entre ellas la Vps (*vacuolar protein sorting*) y las SNX (*sorting nexin*). Estas moléculas reconocen el contenido de las vesículas y se unen en su superficie induciendo una curvatura para formar nuevas vesículas que las transportarán hasta sus destinos en la célula. El Hc-TeNT se ha encontrado colocalizado con varios componentes del retrómero como Vps26 y SNX1. Otra de las proteínas que describen que implicada en el tráfico del Hc-TeNT y los receptores de neurotrofinas es BICD1 (*Bicaudal D homolog 1*). Esta proteína se encuentra asociada a microtúbulos y está implicada en el tráfico intracelular y el transporte de vesículas mediado por dineína. Proponen un modelo en el que BICD1 controla el tráfico de los endosomas de señalización, que contienen a los receptores de neurotrofinas activos, hacia rutas de degradación o hacia rutas de reciclaje mediadas por el retrómero. Este papel de BICD1 es importante para modular la amplitud y duración de la respuesta a neurotrofinas. También en este modelo estaría controlando el tráfico de patógenos o toxinas, como el Hc-TeNT, en su ruta hacia el SNC.

Por otro lado, sin estímulo neurotrófico los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> son endocitados por una vía de reciclaje local independiente de clatrina. En cambio, la unión de la neurotrofina y su activación les dirige a la ruta de transporte retroaxonal rápido, dependiente de clatrina, que acaba mayoritariamente en su degradación en el lisosoma (Deinhardt et al., 2007). Aunque los ensayos descritos por Terenzio se llevaron a cabo en ausencia de neurotrofinas exógenas los receptores se encontraban en endosomas de transporte retroaxonal. Esto podría ser debido a que el Hc-TeNT se encontraba activando a los receptores, tal y como hemos descrito en el grupo que es capaz de hacer,

y esto los dirigía a la vía de transporte retroaxonal. Esto respalda con nuestras observaciones de que el fragmento Hc-TeNT actúa mimetizando a las neurotrofinas.

### **1.5. La mutación de los residuos Y266, K311 y E343 del fragmento Hc-TeNT disminuye su afinidad por TrkB**

Los residuos Y266, K311 y E343 de Hc-TeNT demuestran tener un mayor peso en las interacciones establecidas entre TeNT y el dominio D5 de TrkB en nuestro modelo molecular, por lo cual su mutación debería traducirse en una pérdida de afinidad por el receptor. Así se confirma en los resultados obtenidos en el ensayo de dot-blot, en los que el fragmento mutado no consigue unirse al péptido D5 en igual cantidad que el Hc-TeNT (Figura 37). Asimismo la mutación de estos residuos conlleva una reducción de la capacidad de Hc-TeNT para inducir la activación y fosforilación de TrkB (Figura 38), probablemente debido a una pérdida de su afinidad por el dominio D5.

Las mutaciones afectan además a la capacidad del Hc-TeNT para unirse e internalizarse en CGNs (Figuras 39 y 41), seguramente a causa de una menor unión a TrkB. En este modelo celular se expresan polisialogangliósidos en las membranas que retienen cierta cantidad de Hc-TeNT unido, puesto que los sitios de unión a gangliósidos en principio no se ven afectados por las mutaciones. La mutación de estos tres residuos provoca también una menor colocalización del Hc-TeNT con TrkB a nivel de membrana (Figura 40). Por el contrario al analizar la colocalización de las dos moléculas una vez endocitadas, aunque se aprecia un menor porcentaje de coincidencia con TrkB para el fragmento mutado, las diferencias entre ambos fragmentos no es tan notoria como para la unión a membrana (Figura 42). En este experimento de internalización es complicado distinguir entre el Hc-TeNT que ha sido endocitado y el que pueda quedar aún unido a membrana, y esto podría estar enmascarando el resultado. Por otro lado en este experimento se calcula el porcentaje de colocalización sobre el total de marcaje, así que no tiene en cuenta que haya menos marcaje con Hc-A266-311-343 que con Hc-TeNT. Parece ser entonces que pese a la mutación, el Hc-A266-311-343 que consigue internalizarse coincide con TrkB en una proporción similar a la que lo hace el fragmento no mutado.

### **1.6. La mutación de los residuos Y266, K311 y E343 no afecta al transporte retroaxonal de Hc-TeNT *in vivo***

El fragmento Hc-TeNT mutado es capaz de transportarse retrógradamente hasta el soma de las motoneuronas, tras ser inyectado de forma intramuscular, con la misma eficacia que el fragmento *wild type* (Figura 43). A pesar de que los experimentos *in vitro* y en cultivos de CGNs indican una clara pérdida de afinidad por el receptor TrkB, en un modelo *in vivo* las mutaciones no parecen impedir que el fragmento sea transportado retroaxonalmente de forma eficiente. Este resultado en principio contradictorio podría explicarse de varias maneras. Por una parte, aunque con las mutaciones se haya reducido la interacción del fragmento Hc-TeNT con TrkB, no se puede asegurar que se haya eliminado por completo. El ensayo de dot-blot indica que el Hc-TeNT mutado no puede unirse al péptido D5 tan fuertemente como el fragmento *wt*, pero aún puede retener cierta cantidad de fragmento mutado unido, tal y como puede observarse en la Figura 37. Podría ser que los tres residuos substituidos por

alaninas no sean suficientes para romper completamente la interacción con TrkB. Por otro lado no se puede excluir que Hc-TeNT sea capaz de unirse a otros receptores de membrana que compensaran la falta de interacción con TrkB. Las motoneuronas expresan, además de TrkB, los receptores de neurotrofina TrkC y p75<sup>NTR</sup>. Como ya se ha comentado, en estudios en motoneuronas en cultivo, el Hc-TeNT colocaliza en un elevado porcentaje con TrkB y p75<sup>NTR</sup> en las mismas vesículas (Deinhardt et al., 2006b). La interacción existente entre Hc-TeNT y p75<sup>NTR</sup> también ha sido descrita en nuestro grupo (Cubí et al., 2013). Además los residuos mutados son los que más probablemente intervienen en la unión a TrkB, pero con TrkA o TrkC el orden de relevancia puede variar y los residuos mutados pueden no tener tanto peso en esos complejos. Por ejemplo en el caso de TrkC, los residuos E343 y K311 solo establecen interacciones con un residuo del receptor cada uno, mientras que pueden interactuar cada uno de ellos con dos aminoácidos de TrkB. Por lo tanto Hc-A266-311-343 podría estar endocitándose junto a estos otros receptores y llegando al soma neuronal de la misma manera que el fragmento no mutado. El hecho de que en las CGNs las mutaciones si afectan a la cantidad de Hc-TeNT endocitada podría deberse a que no se dé esta compensación por la ratio de expresión entre TrkB y p75<sup>NTR</sup>, o porque puede endocitarse también por una vía de reciclaje de vesículas. Finalmente, otra posible causa de no observar ninguna diferencia en el transporte axonal de Hc-TeNT y Hc-A266-311-343, puede ser las cantidades de proteína utilizadas y el tiempo analizado. Este tipo de experimento requiere de la inyección de una cantidad considerable de Hc-TeNT para obtener suficiente resolución en el trazado retroaxonal, de manera que es posible que aunque se haya disminuido la afinidad por el receptor TrkB, a la concentración de Hc-TeNT utilizada la unión esté saturada. Además las muestras de médula se obtuvieron a las 24h tras la inyección intramuscular, así que aunque el transporte hasta el soma del fragmento mutante fuese más lento, a éste tiempo podría haberse acumulado la misma cantidad que de fragmento no mutado.

### 1.7. Consideraciones sobre el modelo de unión a TrkB propuesto

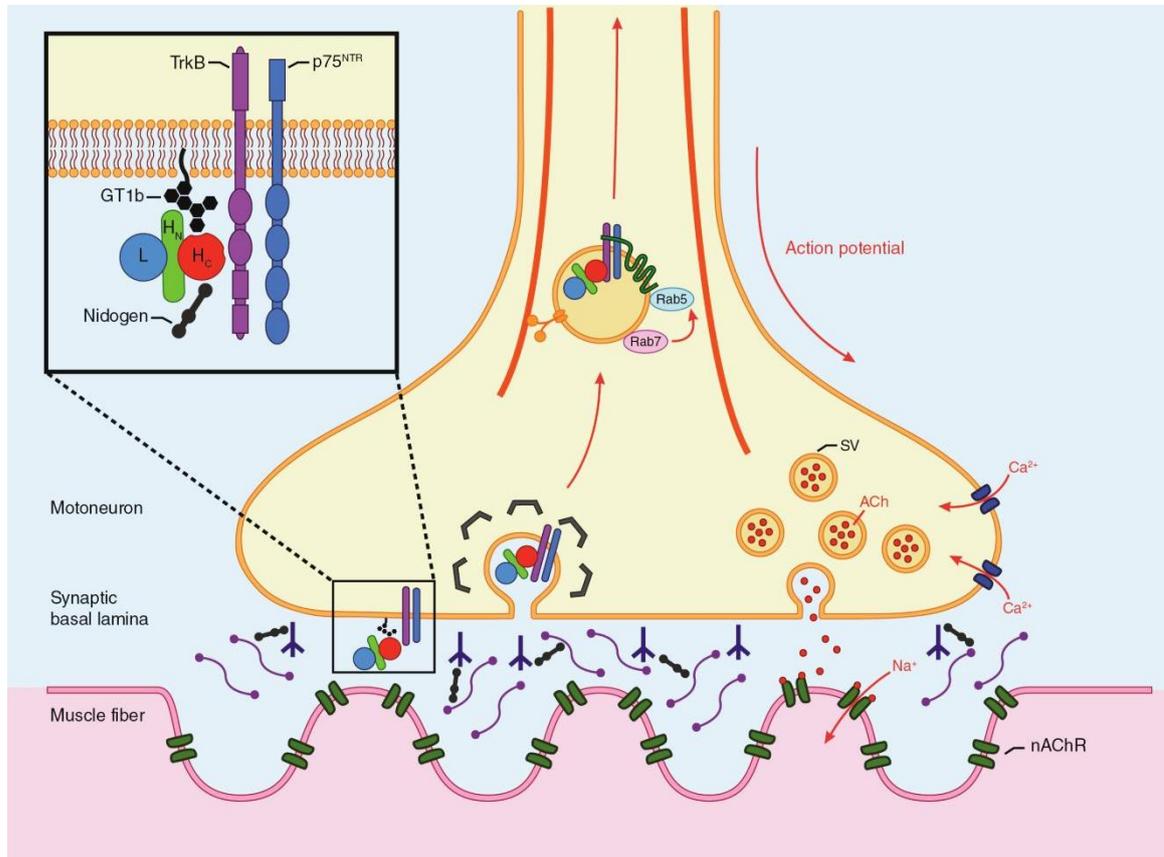
En los últimos años se han propuesto varias proteínas de membrana que podrían actuar como receptores para la TeNT. Por ejemplo se ha demostrado que TeNT se une a una glicoproteína de membrana llamada Thy-1 (Herreros et al., 2000, 2001). Sin embargo, aunque TeNT pueda establecer alguna interacción con esta proteína, es poco probable que tenga alguna relevancia en la captación in vivo, ya que neuronas aisladas de ratones *knockout* para Thy-1 siguen siendo sensibles a la acción de la neurotoxina. Al ser una proteína muy abundante en las membranas es posible que la cadena de oligosacáridos pueda interactuar con TeNT mimetizando a los polisialogangliósidos en sus mismos sitios de unión.

La proteína SV2, presente en las vesículas sinápticas, también ha sido considerada como receptor proteico para la TeNT, aunque no se ha podido demostrar una interacción directa (Yeh et al., 2010). Probablemente esta proteína esté implicada en la captación de la neurotoxina en las interneuronas y otras neuronas del SNC. Es posible que en el limitado espacio intersináptico entre la motoneurona y la interneurona inhibitoria, la cantidad de TeNT acumulada sea suficientemente alta como para utilizar un receptor por el que presente una baja afinidad. De esta manera la TeNT podría entrar en las interneuronas mediante un mecanismo de reciclaje de vesículas sinápticas que la dirigiría a un tipo de vesículas ácidas que permitirían la liberación de la cadena L en el citoplasma de la neurona.

Recientemente Bercsenyi y colaboradores han propuesto que el nidógeno podría ser el receptor proteico de la TeNT (Bercsenyi et al., 2014). El nidógeno es una proteína de matriz extracelular que interacciona con otras moléculas como la laminina y las fibras de colágeno. En sus experimentos muestran como ambas moléculas colocalizan tanto en motoneuronas en cultivo como en las NMJ tras una inyección intramuscular de Hc-TeNT en ratón. Además son capaces de bloquear el efecto de la TeNT en ratones mediante la administración de péptidos sintéticos basados en las secuencias del nidógeno que se encontrarían interaccionando con el Hc-TeNT. Según los autores el nidógeno presente en la lámina basal del espacio intersináptico de la NMJ, estaría actuando como concentrador de TeNT en puntos concretos de la membrana para facilitar su unión y endocitosis. En estas zonas de membrana la TeNT donde se encontrarían los polisialogangliósidos y otros receptores relacionados con la matriz extracelular con los que podría interaccionar, como por ejemplo la proteína fosfatasa LAR. Este mecanismo es compartido por diferentes factores de crecimiento, entre ellos las neurotrofinas, ya que se ha descrito que la unión de éstos a diferentes proteínas de la matriz extracelular es crucial para su función biológica y su señalización (Macri et al., 2007; Kanato et al., 2009; Martino et al., 2014). Estos resultados podrían ser compatibles con el modelo propuesto en este trabajo ya que el nidógeno, aunque se internaliza junto al Hc-TeNT, es una proteína extracelular y por lo tanto no puede mediar la endocitosis directamente, necesitaría de algún receptor de membrana. Los autores sugieren que uno de estos receptores podría ser la proteína tirosina fosfatasa LAR (*Leucocyte common Antigen-related Receptor*), cuya interacción con el nidógeno ha sido demostrada (O'Grady et al., 1998; Stryker and Johnson, 2007). Esta fosfatasa se ha descrito que también interacciona con los receptores Trk regulando su señalización (Yang et al., 2005, 2006). Además el nidógeno se estaría uniendo a Hc-TeNT mediante el bolsillo R, de manera que no interferiría en el nuevo sitio de unión a TrkB que proponemos en este trabajo. Por lo tanto parece existir una conexión entre ambos modelos, de forma que el nidógeno se uniría a TeNT por su bolsillo R, concentrándola en las zonas de *lipid rafts* de la membrana presináptica. En estas zonas se uniría mediante el bolsillo W a un polisialogangliósido de la membrana y al ectodominio D5 de TrkB a través del nuevo sitio de unión descrito en este trabajo. Esto también coincidiría con lo descrito por Chen y colaboradores, que concluyen en sus resultados que la unión de alta afinidad de la TeNT requiere que los dos sitios de unión a gangliósidos estén ocupados (Chen et al., 2009). La unión de la TeNT a TrkB estimularía su endocitosis y la formación de los endosomas de señalización donde ambas moléculas serían transportadas hasta el soma de la motoneurona (Figura 54).

En el modelo que proponemos TrkB actuaría como receptor de la TeNT en el SNP, en los terminales de las motoneuronas. No obstante, TrkB no sería el único receptor de TeNT ya que se ha observado que en un modelo de PC12, que no expresa TrkB, el Hc-TeNT puede internalizarse en la célula y activar determinadas vías de señalización. En la segunda parte de este trabajo hemos visto como Hc-TeNT puede promover la actividad nSMasa a través del receptor p75<sup>NTR</sup> (Cubí et al., 2013). Por lo tanto cabe la posibilidad de que, al igual que las neurotrofinas, la TeNT pueda unirse a más de un receptor de neurotrofinas, y presentar diferentes afinidades para cada uno de ellos. También el análisis de modelaje molecular indica posibles interacciones con los dominios D5 de TrkA y TrkC, y la activación de TrkA en respuesta a TeNT ha sido anteriormente descrita por el grupo (Gil et al., 2000). El aprovechamiento de un mecanismo natural bien definido como es el transporte retroaxonal de las neurotrofinas y sus receptores, es algo habitual para muchas toxinas y virus (Salinas et al., 2010). El

adenovirus canino 2 se transporta también en vesículas compartidas con las neurotrofinas y sus receptores. Futuros experimentos serán necesarios para esclarecer estas cuestiones y determinar si el resto de receptores de neurotrofinas pueden unir también el Hc-TeNT.



**Figura 54. Esquema del modelo de unión e internalización propuesto para la toxina tetánica.**

LaTeNT difunde por el tejido hasta llegar a las uniones neuromusculares, donde el nidógeno se une a su dominio Hc-TeNT permitiendo concentrar la neurotoxina en determinadas zonas de la membrana presináptica. En estas zonas de *lipid rafts* la TeNT se une a los polisialogangliósidos y al receptor de neurotrofinas TrkB. Esto desencadena su internalización en la motoneurona a través de un mecanismo dependiente de clatrina. De esta manera se forma el endosoma de señalización que contiene la TeNT, así como a TrkB u otros receptores de neurotrofinas como p75<sup>NTR</sup>. Estas vesículas se incorporan a una ruta de transporte retroaxonal rápido que las conducirá hasta el soma de la motoneurona. Este transporte está propiciado por la acción secuencial de las GTPasas Rab5 y Rab7, y por la acción de la dineína que permite el movimiento de la vesícula por los microtúbulos.

## **2. IMPLICACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR LOS RECEPTORES TRK**

### **2.1. La actividad esfingomielinasa es esencial en el efecto neuroprotector inducido por las neurotrofinas**

En este trabajo demostramos un papel protector de la nSMasa2 en la promoción de la supervivencia celular en respuesta a BDNF en CGNs y en respuesta a NGF en PC12. En CGNs sometidas a un estrés de privación de suero y potasio, la inducción de la viabilidad celular provocada por BDNF, es suprimida al inhibir la actividad nSMasa (Figura 44A). De la misma manera en células PC12 privadas de suero, la acción neuroprotectora del NGF no puede llevarse a cabo si se impide la actividad nSMasa, ya sea mediante un inhibidor de la nSMasa o mediante el silenciamiento de la expresión de la nSMasa2 (Figura 44B y 45). En estas células silenciadas para nSMasa2 el NGF no puede prevenir la apoptosis en respuesta a una privación de suero (Figura 46).

Este resultado podría parecer sorprendente ya que muchos artículos relacionan la actividad nSMasa y la producción de ceramida con una activación de vías de muerte celular y con la inhibición del crecimiento celular (Marchesini et al., 2003). La ceramida, así como las moléculas lipídicas derivadas, pueden causar diferentes efectos en función de la célula donde son expresados. Por ejemplo puede promover la diferenciación en células de neuroblastoma y en CGN, estimula el crecimiento axonal en neuronas hipocámpales, y en motoneuronas puede inducir muerte o supervivencia en función de sus niveles de expresión. Existen evidencias que apuntan a que la apoptosis inducida por privación de suero en PC12 está mediada por ceramida. En estas células la ceramida provoca la desfosforilación e inactivación de Akt (Salinas et al., 2000). En CGNs la privación de suero y potasio conduce a la acumulación de ceramida y a la muerte celular. La ceramida induce también en este modelo la desfosforilación de Akt y de GSK3- $\beta$ , lo cual promueve la apoptosis, probablemente a través de la señalización de JNK (Posse de Chaves, 2006)

### **2.2. Papel de la nSMasa en las vías de señalización activadas por las neurotrofinas**

La nSMasa parece jugar un papel esencial en las vías de señalización activadas por las neurotrofinas para promover la supervivencia celular, por lo que nos propusimos averiguar a qué nivel de estas cascadas actúa. En primer lugar nos centraremos en los resultados obtenidos en CGN, un sistema celular que expresa TrkB y p75<sup>NTR</sup> pero no TrkA. En CGN privadas de suero y potasio, se observa que el tratamiento con BDNF provoca la fosforilación y la consiguiente activación de Akt, ERK-1/2 y p38 (Figura 47). La inhibición de la actividad nSMasa impide la fosforilación de Akt causada en respuesta a BDNF, pero no interfiere en la activación de ERK-1/2 ni de p38. El NGF en el modelo de CGN se encontraría interactuando con p75<sup>NTR</sup>, ya que el receptor TrkA no está expresado. Se observa que el tratamiento de las células con NGF y la consiguiente activación de p75<sup>NTR</sup> no producen un efecto neuroprotector, y tampoco se encuentra fosforilada Akt, ni ERK-1/2, ni p38. Sin embargo sí que se observa un incremento en la actividad nSMasa en respuesta a NGF que no repercute en un incremento de la mortalidad de las células más allá del provocado por el estrés.

En los resultados obtenidos, la nSMasa no parece intervenir en los procesos de activación de p38 ni de ERK-1/2. El tiempo y el nivel de fosforilación de p38 son aspectos determinantes en el destino que sufrirá la célula. Mientras que fosforilaciones prolongadas se asocian a la inducción de la apoptosis, fosforilaciones más moderadas y transitorias se relacionan con la supervivencia en respuesta a factores tróficos (Roulston et al., 1998; Murphy and Blenis, 2006). Éste último parece ser nuestro caso, en el que la adición del BDNF provoca una activación moderada de p38. En el caso de ERK-1/2, aunque la nSMasa no parece interferir en su activación en respuesta a BDNF, sí que parece ejercer una regulación negativa sobre su nivel de fosforilación basal, ya que al suprimir la actividad nSMasa incrementa pERK-1/2. Por lo tanto sobre la vía de ERK-1/2, la nSMasa parece ejercer un efecto contrario al observado para Akt, en el que la actividad esfingomielinasa se requiere para su activación. Por otro lado hemos observado que la activación de Akt es altamente dependiente del nivel de actividad nSMasa basal, ya que la inhibición de la enzima impide su fosforilación. La fosforilación de Akt causada por BDNF en estas células parece ser promovida por los receptores Trk, ya que tratamiento con BDNF no parece promover la actividad nSMasa, pero sí que provoca la fosforilación y activación de TrkB (Figura 48A). Por lo tanto parecería que BDNF se encuentra actuando a través de TrkB y no de p75<sup>NTR</sup> para promover la supervivencia celular.

En PC12, un sistema celular que expresa TrkA y p75<sup>NTR</sup>, el NGF provoca un efecto neuroprotector frente a una privación de suero. Presumiblemente NGF ejerce este efecto a través del receptor TrkA, que se encuentra fosforilado, pero no a través de p75<sup>NTR</sup> ya que no induce la actividad nSMasa (Figura 48B). El silenciamiento de la nSMasa2 en PC12 demuestra que esta enzima es necesaria para mantener unos niveles de fosforilación basal de Akt (Figura 49). Este resultado respalda el observado en CGN, donde la nSMasa es indispensable para la activación de Akt en respuesta a BDNF. Sin embargo el silenciamiento de la nSMasa2 en PC12 no afecta los niveles basales de pERK-1/2. En cambio en las CGN la inhibición de la nSMasa provocaba un aumento de la fosforilación de los niveles basales de ERK-1/2. Estos resultados confirman lo observado en CGN, que el aumento en la supervivencia celular se deriva de la activación de los receptores Trk. Por acción de la neurotrofina, y que este efecto es dependiente de nSMasa2.

El efecto provocado por las neurotrofinas en las células depende de múltiples factores incluyendo la proporción de receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> expresados en la membrana, el estado celular y el balance entre las formas maduras e inmaduras de las neurotrofinas. Las relaciones sinérgicas y antagónicas que se dan entre las vías promovidas por los receptores Trk y por el p75<sup>NTR</sup> son muy complejas. Tradicionalmente se ha considerado el receptor p75<sup>NTR</sup> como un promotor de la muerte neuronal pero esta visión está ya obsoleta. Dependiendo de las proteínas de membrana con las que esté interactuando y si el estímulo viene dado por una neurotrofina o por una pro-neurotrofina, la señal promovida por p75<sup>NTR</sup> puede ser muy dispar.

Existen numerosas publicaciones que describen un efecto inhibitorio de los receptores Trk sobre la señalización mediada por p75<sup>NTR</sup>. Un claro caso en el que se observa esta interacción inhibitoria entre receptores es el bloqueo de la actividad nSMasa inducida por NGF cuando el receptor TrkA está co-expresado. Por el contrario si se impide la activación de TrkA mediante el uso de un inhibidor, se ve aumentada la hidrólisis de esfingomielina (Dobrowsky et al., 1994, 1995). En PC12 la PI3K activada por TrkA regula negativamente la actividad SMasa promovida por p75<sup>NTR</sup>, asociándose con aSMasa en

regiones de membrana relacionadas con caveolas (Bilderback et al., 2001). En células de neuroblastoma la regulación negativa entre TrkA y p75<sup>NTR</sup> está mediada también por PI3K e involucra la activación de PKC (Plo et al., 2004). En nuestro caso también observamos esta inhibición de TrkA sobre p75<sup>NTR</sup>, ya que en el modelo de PC12 el NGF provoca la fosforilación del receptor TrkA mientras que no se observa activación de la actividad nSMasa (Figura 48). Otro ejemplo de estas relaciones inhibitorias es que en sistemas donde están co-expresados p75<sup>NTR</sup> y TrkA, la activación de NF-κB por parte de p75<sup>NTR</sup> es mucho más lenta que en sistemas donde TrkA no está expresado (Mamidipudi and Wooten, 2002). También TrkA media la supervivencia en neuronas del sistema simpático en desarrollo a través de silenciamiento de la señal apoptótica generada por p75<sup>NTR</sup> (Majdan et al., 2001).

En la dirección opuesta a las observaciones anteriores, el receptor p75<sup>NTR</sup> puede causar también un efecto inhibitorio en la señalización promovida por TrkB. Por ejemplo, al unirse el pro-NGF al p75<sup>NTR</sup>, éste inhibe la fosforilación de Akt mediante la activación de la fosfatasa PTEN (Song et al., 2010). En otros trabajos el receptor p75<sup>NTR</sup> presenta además un efecto negativo en la activación de TrkB en respuesta a BDNF y NT-4/5, que sin embargo no afecta a la activación de ERK-1/2 provocada por las neurotrofinas (Vesa et al., 2000). Estos resultados también apuntan a una activación diferencial de las vías de señalización por parte de los distintos receptores Trk, cada uno de ellos operando a través de unas proteínas adaptadoras concretas, a pesar del hecho de que todos los receptores Trk comparten una alta homología en la secuencia y la estructura del dominio intracelular.

En otras ocasiones los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> interactúan de forma sinérgica. La señalización de TrkA y TrkB es facilitada por p75<sup>NTR</sup> a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, el receptor p75<sup>NTR</sup> es capaz de provocar la fosforilación de Akt de forma independiente de TrkA, en un proceso en el que interviene la PI3K. Además la expresión de p75<sup>NTR</sup> incrementa la supervivencia en células expuestas a un estrés por privación de suero (Roux et al., 2001). Por otra parte, se ha observado en células PC12 y en CGNs, que TrkA y TrkB provocan la activación de la proteasa de membrana ADAM17 a través de la fosforilación por parte de MEK. La proteasa una vez activa, proteoliza el receptor p75<sup>NTR</sup> produciendo la liberación de su dominio intracelular ICD en el citosol (Kommaddi et al., 2011). Este circuito de retroalimentación es requerido para sostener la señalización de supervivencia mediada por las neurotrofinas. El fragmento ICD de p75<sup>NTR</sup> se acumula en el citosol y modula la actividad de Akt a través de la inhibición de PTEN, así como también es capaz de activar a ERK-1/2 (Ceni et al., 2010). Además la disminución de esfingomielina en la membrana plasmática o el enriquecimiento de la membrana con ceramida, podrían aumentar el procesamiento de p75<sup>NTR</sup> por parte de ADAM17, tal y como se ha demostrado que pasa en el caso del receptor de la interleucina-6, otro sustrato de esta proteasa (Matthews et al., 2003). De acuerdo con estos resultados, un modelo en el cual la activación de ADAM17 por parte de la nSMasa contribuyera a la activación de Akt encajaría con los resultados presentados en este trabajo, donde BDNF provoca una fosforilación de Akt dependiente nSMasa en CGN (Figura 47). Aunque en nuestros datos observamos como el tratamiento con BDNF de las CGN, o con NGF en PC12, no estimula la actividad nSMasa en condiciones basales, pero podría ser que en condiciones de estrés celular sí la activaran.

Se ha descrito además, que p75<sup>NTR</sup> aumenta la señalización pro-supervivencia de forma independiente de los receptores Trk. La unión de ligando a p75<sup>NTR</sup> es capaz de activar la vía Ras/ERK a

través de la fosforilación de las tirosinas Y337 y Y366, situadas en su dominio de muerte (DD), que reclutan las mismas proteínas adaptadoras que los receptores Trk para activar a Ras (Blöchl et al., 2004). Todos estos datos sugieren que, aunque no observemos activación de la nSMasa en respuesta a BDNF en las CGN, no se puede descartar que la neurotrofina no esté actuando a través de p75<sup>NTR</sup> en nuestro modelo. La ratio entre los diferentes receptores de neurotrofinas y los niveles de expresión son importantes en el efecto que desencadenan las neurotrofinas. Teniendo esto en cuenta podría ser que en nuestro modelo, p75<sup>NTR</sup> estuviera siendo activado por las neurotrofinas, pero por la cantidad de receptor expresado, en vez de activarse las vías apoptóticas, dependientes de nSMasa, se estén activando las de supervivencia. El p75<sup>NTR</sup> podría también estar actuando como complejo dimérico junto con TrkB.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de discutir los resultados obtenidos es la rápida conversión que puede sufrir la ceramida producida por la nSMasa en otras moléculas lipídicas que pueden tener efectos totalmente opuestos. Este proceso, que se ha bautizado como reóstato de los esfingolípidos, se basa en que el balance entre los niveles de ceramida y de esfingosina-1-fosfato (S1P) determina el destino de la célula. La ceramida puede ser degradada a esfingosina por acción de la ceramidasa, y esta esfingosina puede a su vez transformarse en S1P a través de la esfingosina cinasa (SphK). Mientras que altos niveles de ceramida han sido siempre asociados a un incremento de las vías de muerte celular, el S1P tiene un papel crucial en la supervivencia celular, la migración y la respuesta inflamatoria. Puede actuar sobre distintas dianas intracelulares o a través de sus receptores S1PR en la membrana, después de pasar de la cara interna a la cara externa de la membrana (Hannun and Obeid, 2008; Van Brocklyn and Williams, 2012). Se ha demostrado que S1P es capaz de activar a PI3K, Akt y NF- $\kappa$ B, y prevenir así la señal apoptótica iniciada por TNF- $\alpha$  (Osawa et al., 2001; Xia et al., 2002). En PC12 el tratamiento con NGF tiene un efecto neuroprotector mediante la activación la enzima SphK y la formación de S1P a través de TrkA. La acumulación de S1P protege a las células de la apoptosis inducida por la privación de suero o por la ceramida. Esto indica que NGF actúa como un regulador del balance entre ceramida y S1P en PC12 (Edsall et al., 1997).

Finalmente también se debe mencionar que la ceramida producida por la nSMasa, a parte de los efectos que pueda tener sobre distintas proteínas involucradas en la señalización, puede provocar una reorganización de la membrana plasmática. Tratamientos prolongados con C2-ceramida en PC12 inducen la dimerización y fosforilación de TrkA en ausencia de NGF (MacPhee and Barker, 1999). Se cree que este efecto es debido a que un aumento en los niveles de ceramida puede provocar cambios en la configuración de la membrana plasmática mediante la creación de plataformas de ceramida. Estas plataformas se forman a causa de la poca afinidad que tiene la ceramida por el colesterol, lo que lleva a estas zonas de membrana a segregarse de los *lipid rafts* (Blöchl and Blöchl, 2007). Esto facilita el agrupamiento de las proteínas como el TrkA en las zonas de *lipid rafts*, y a causa de la alta concentración de receptor en la zona se produce una activación independiente de ligando. Además estas plataformas de ceramida pueden inducir la formación de invaginaciones en la membrana, lo cual facilita la formación de poros y de vesículas.

### 2.3. El efecto de supervivencia celular inducido por Hc-TeNT es dependiente de actividad esfingomielinasa

Resultados previos publicados por nuestro grupo demuestran un efecto neuroprotector del Hc-TeNT en diferentes tipos celulares sometidos a diversos tipos de estrés. En CGN se ha observado como el Hc-TeNT protege a las células frente a un estímulo apoptótico como es la privación de suero y potasio. PI3K y MAPK intervienen en este efecto de supervivencia celular, ya su inhibición revierte la acción del Hc-TeNT. Además se observa una inducción de la fosforilación de varias cascadas en respuesta a Hc-TeNT, que incluyen ERK-1/2, p90rsk (*p90 ribosomal S6 kinase*) y CREB (*cAMP-response-element-binding protein*) (Chaïb-Oukadour et al., 2004). También en un modelo de inducción de la apoptosis con MPP<sup>+</sup> en CGN se ha demostrado que Hc-TeNT ejerce un efecto pro-supervivencia. Hc-TeNT es capaz de promover la fosforilación de BAD en este modelo, impidiendo así su función pro-apoptótica. Además induce la actividad de NF-κB permitiendo la transcripción de genes relacionados con la supervivencia (Chaïb-Oukadour et al., 2009). En este trabajo demostramos que el Hc-TeNT protege a las células frente a un estrés oxidativo de una forma independiente de nSMasa. Al inhibir la nSMasa se incapacita la acción neuroprotectora del Hc-TeNT en células PC12 sometidas a un estrés de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 50). También en un modelo de CGN expuestas a estrés oxidativo el Hc-TeNT requiere de la actividad esfingomielinasa, ya que el silenciamiento específico de nSMasa2 anula su efecto pro-supervivencia (Figura 51). Al igual que en los resultados publicados anteriormente por el grupo, en este caso el Hc-TeNT está actuando también a través de la activación de Akt. Esta fosforilación de Akt es dependiente de nSMasa, y a inhibirla se encuentra una reducción en los niveles de pAkt.

Estos resultados coinciden con los comentados en el apartado anterior, en células sometidas a estrés y tratadas con neurotrofinas. Se confirma la intervención de la nSMasa en la activación de Akt y en la inducción de la supervivencia celular en respuesta a neurotrofinas y a Hc-TeNT. Nuestro grupo ha demostrado que la incubación de células CGN y de PC12 con Hc-TeNT provoca un incremento de la ratio ceramida/esfingomielina. Además este efecto viene acompañado de un aumento de la actividad esfingomielinasa, que es revertido al pre-tratar las células con GW4869, un inhibidor específico de la nSMasa (Cubí et al., 2013). La inducción de la nSMasa producida por Hc-TeNT en CGN es similar a la que provoca el NGF. Sin embargo el NGF no es capaz de inducir una respuesta de supervivencia en estas células. Por el contrario BDNF sí que promueve la supervivencia en este modelo celular pero no produce una activación de nSMasa. Al igual que en los experimentos anteriores con neurotrofinas es difícil atribuir el efecto del Hc-TeNT a su interacción con un tipo de receptor concreto. Las vías de señalización pro-supervivencia pueden ser activadas tanto por receptores Trk como por p75<sup>NTR</sup>, y la ceramida producida por la nSMasa puede convertirse rápidamente en S1P u otras moléculas lipídicas.

Por otro lado la activación de la actividad esfingomielinasa, y el consiguiente aumento de ceramida en la membrana, en la es una característica descrita para varios patógenos y virus. Como ya se ha comentado, la ceramida puede agruparse en determinadas zonas de la membrana produciendo curvaturas e induciendo la formación de invaginaciones, poros y vesículas. Diversas cepas de rinovirus inducen la formación de plataformas de ceramida en la membrana y la interacción con éstas inicia diversas cascadas de transducción dependientes de PI3K (Bentley et al., 2007). Otro ejemplo es el de *Neisseria gonorrhoeae*, que también induce la actividad SMasa del huésped para formar plataformas

de ceramida esenciales para su internalización en la célula. Establece interacciones con los receptores CEACAM (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule*) situados en estos dominios de membrana que desencadenan la activación de la GTPasa Rac y de JNK (Hauck et al., 1998, 2000). En nuestro modelo, la inducción de la actividad nSMasa por parte de Hc-TeNT, promueve la formación de plataformas de ceramida en la membrana plasmática. Sin embargo estas estructuras no parecen interferir en el proceso de internalización del Hc-TeNT puesto que la inhibición de la nSMasa no afecta a la cantidad de fragmento endocitado (Cubí et al., 2013).



## **VI. CONCLUSIONES**



1. El dominio Hc-TeNT es capaz de acoplarse teóricamente al dominio extracelular D5 de TrkB en un modelo tridimensional *in silico*, formando interacciones no covalentes entre los residuos situados en la interfaz de unión. El sitio de unión para TrkB no coincide con los sitios de unión a polisialogangliósidos.
2. El péptido sintético D5 es capaz de unirse *in vitro* al fragmento Hc-TeNT, y además bloquea su unión a membrana en neuronas granulares de cerebelo.
3. El fragmento Hc-TeNT interactúa con el receptor TrkB en neuronas granulares de cerebelo, ya que induce la fosforilación de las tirosinas del *loop* de activación y coincide con el receptor una vez endocitado en las células. Además Hc-TeNT compete con BDNF, un agonista natural de TrkB, por la unión a la membrana plasmática, y la presencia de BDNF desplaza el Hc-TeNT de las vesículas endocíticas positivas para TrkB. Por el contrario NGF no es capaz de producir este desplazamiento en la unión ni en la internalización.
4. El fragmento Hc-TeNT inyectado intramuscularmente en ratones localiza conjuntamente con el receptor TrkB tanto en las membranas presinápticas de las uniones neuromusculares como en las vesículas endocíticas presentes en el soma de las motoneuronas.
5. La mutación de los residuos Y266, K311 y E343 del fragmento Hc-TeNT provoca una pérdida de interacción entre éste y TrkB, se disminuye la fosforilación producida en el receptor así como su unión al péptido D5. De igual manera se detecta una menor cantidad de Hc-TeNT mutado unido a la membrana plasmática e internalizado. Por el contrario las mutaciones no impiden que el fragmento Hc-TeNT sea transportado retroaxonalmente *in vivo*.
6. La actividad nSMasa es indispensable para que se produzca el efecto neuroprotector ejercido por BDNF en neuronas granulares de cerebelo, y por NGF en PC12, sometidas a estrés apoptótico.
7. Una actividad basal de nSMasa es necesaria para la fosforilación de Akt inducida por BDNF en neuronas granulares de cerebelo sometidas a estrés apoptótico. Asimismo la nSMasa está implicada en la fosforilación basal de Akt en PC12.
8. El fragmento Hc-TeNT induce la supervivencia celular y la fosforilación de Akt en células sometidas a estrés oxidativo de forma dependiente de nSMasa, puesto que la inhibición o silenciamiento de ésta anula estos efectos.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Aguilera J, Lopez L a, Yavin E (1990) Tetanus toxin-induced protein kinase C activation and elevated serotonin levels in the perinatal rat brain. *FEBS Lett* 263:61–65.
- Airola M V., Hannun Y a. (2013) Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 57–76.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes a B, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7:261–269.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- Alvarez FJ, Dewey DE, McMillin P, Fyffe RE (1999) Distribution of cholinergic contacts on Renshaw cells in the rat spinal cord: a light microscopic study. *J Physiol* 515.3:787–797.
- Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez a, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings B a (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272:31515–31524.
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28:3689–3696.
- Arévalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao M V. (2006) Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 281:1001–1007.
- Arévalo JC, Yano H, Teng KK, Chao M V (2004) A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J* 23:2358–2368.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265–277.
- Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261–3270.
- Bakry N, Kamata Y, Sorensen R, Simpson LL (1991) Tetanus toxin and neuronal membranes: the relationship between binding and toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 258:613–619.
- Baldwin MR, Barbieri JT (2009) Association of botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes. *Toxicon* 54:570–574.
- Banfield MJ, Naylor RL, Robertson AGS, Allen SJ, Dawbarn D, Brady RL (2001) Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: The crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* 9:1191–1199.
- Barker PA, Barbee G, Misko TP, Shooter EM (1994) The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J Biol Chem* 269:30645–30650.

- Barker PA, Lomen-Hoerth C, Gensch EM, Meakin SO, Glass DJ, Shooter EM (1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* 268:15150–15157.
- Barrett GL (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 61:205–229.
- Benn SC, Ay I, Bastia E, Chian RJ, Celia S a., Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH, Francis JW (2005) Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. *J Neurochem* 95:1118–1131.
- Benoit RM, Frey D, Hilbert M, Kevenaer JT, Wieser MM, Stirnimann CU, McMillan D, Ceska T, Lebon F, Jaussi R, Steinmetz MO, Schertler GFX, Hoogenraad CC, Capitani G, Kammerer R a (2014) Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A. *Nature* 505:108–111.
- Benson M a., Fus Z, Kims JJP, Baldwin MR (2011) Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins. *J Biol Chem* 286:34015–34022.
- Bentley JK, Newcomb DC, Goldsmith AM, Jia Y, Sajjan US, Hershenson MB (2007) Rhinovirus activates interleukin-8 expression via a Src/p110beta phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human airway epithelial cells. *J Virol* 81:1186–1194.
- Bercsenyi K, Schmiege N, Bryson JB, Wallace M, Caccin P, Golding M, Zanotti G, Greensmith L, Nischt R, Schiavo G (2014) Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus. *Science* (80- ) 346:1118–1123.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
- Bertrand T, Kothe M, Liu J, Dupuy A, Rak A, Berne PF, Davis S, Gladysheva T, Valtre C, Crenne JY, Mathieu M (2012) The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition. *J Mol Biol* 423:439–453.
- Bibel M, Barde Y (2000) Neurotrophins : key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919–2937.
- Biffo S, Offenhäuser N, Carter BD, Barde YA (1995) Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121:2461–2470.
- Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT (2001) Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75NTR-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 76:1540–1551.
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20523–20528.
- Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister a., Link E, Sudhof TC, Jahn R, Niemann H (1994) Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* 269:1617–1620.

- Binz T, Rummel A (2009) Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J Neurochem* 109:1584–1595.
- Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R (1993) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 12:4821–4828.
- Blöchl a., Blöchl R (2007) A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* 102:289–305.
- Blöchl A, Blumenstein L, Ahmadian MR (2004) Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 20:2321–2335.
- Blum FC, Chen C, Kroken AR, Barbieri JT (2012) Tetanus toxin and botulinum toxin utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system. *Infect Immun* 80:1662–1669.
- Blum FC, Przedpelski A, Tepp WH, Johnson E a., Barbieri JT (2014a) Entry of a recombinant, full-length, atoxic tetanus neurotoxin into Neuro-2a cells. *Infect Immun* 82:873–881.
- Blum FC, Tepp WH, Johnson E a, Barbieri JT (2014b) Multiple domains of tetanus toxin direct entry into primary neurons. *Traffic* 2:1057–1065.
- Bohnert S, Schiavo G (2005) Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation. *J Biol Chem* 280:42336–42344.
- Boulanger LM, Poo MM (1999) Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 2:346–351.
- Brandoli C, Sanna a, De Bernardi M a, Follesa P, Brooker G, Mocchetti I (1998) Brain-derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:7953–7961.
- Breidenbach M a., Brunger AT (2005) 2.3 A Crystal Structure of Tetanus Neurotoxin Light Chain. *Biochemistry* 44:7450–7457.
- Brunet a., Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297–305.
- Brunger AT, Rummel A (2009) Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicon* 54:550–560.
- Bucci C, Alifano P, Cogli L (2014) The Role of Rab Proteins in Neuronal Cells and in the Trafficking of Neurotrophin Receptors. *Membranes (Basel)* 4:642–677.
- Burns JR, Baldwin MR (2014) Tetanus neurotoxin utilizes two sequential membrane interactions for channel formation. *J Biol Chem* 289:22450–22458.
- Cabot JB, Mennone A, Bogan N, Carroll J, Evinger C, Erichsen JT (1991) Retrograde, trans-synaptic and transneuronal transport of fragment C of tetanus toxin by sympathetic preganglionic neurons. *Neuroscience* 40:805–823.

- Calvo AC, Moreno-Igoa M, Mancuso R, Manzano R, Oliván S, Muñoz MJ, Penas C, Zaragoza P, Navarro X, Osta R (2011) Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule. *Orphanet J Rare Dis* 6:10.
- Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R (2012) Fragment C of tetanus toxin: New insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci* 13:6883–6901.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde Y-A (1996) Selective Activation of NF-kappa B by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor p75. *Science* (80- ) 272:542–545.
- Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade M, Dechant G, Barde Y (1999) The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75 NTR and participates in programmed cell death. *J Biol Chem* 274:6050–6061.
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194:209–221.
- Ceni C, Kommaddi RP, Thomas R, Vereker E, Liu X, McPherson PS, Ritter B, Barker P a (2010) The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci* 123:2299–2307.
- Chaïb-Oukadour I, Gil C, Aguilera J (2004) The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem* 90:1227–1236.
- Chaïb-Oukadour I, Gil C, Rodríguez-Alvarez J, Ortega A, Aguilera J (2009) Tetanus toxin HC fragment reduces neuronal MPP+ toxicity. *Mol Cell Neurosci* 41:297–303.
- Chao M V (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309.
- Chapman BS, Kuntz ID (1995) Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci* 4:1696–1707.
- Chen C, Baldwin MR, Barbieri JT (2008) Molecular basis for tetanus toxin coreceptor interactions. *Biochemistry* 47:7179–7186.
- Chen C, Fu Z, Kim JJP, Barbieri JT, Baldwin MR (2009) Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *J Biol Chem* 284:26569–26577.
- Chian RJ, Li J, Ay I, Celia S a., Kashi BB, Tamrazian E, Matthews JC, Bronson RT, Rossomando A, Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH, Francis JW (2009) IGF-1:Tetanus toxin fragment C fusion protein improves delivery of IGF-1 to spinal cord but fails to prolong survival of ALS mice. *Brain Res* 1287:1–19.
- Chittka A, Chao M V (1999) Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10705–10710.

- Ciriza J, Moreno-Igoa M, Calvo AC, Yague G, Palacio J, Miana-Mena FJ, Muñoz MJ, Zaragoza P, Brûlet P, Osta R (2008) A genetic fusion GDNF-C fragment of tetanus toxin prolongs survival in a symptomatic mouse ALS model. *Restor Neurol Neurosci* 26:459–465.
- Clarke CJ, Guthrie JM, Hannun YA (2008) Regulation of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) by tumor necrosis factor-alpha involves protein kinase C-delta in lung epithelial cells. *Mol Pharmacol* 74:1022–1032.
- Clarke CJ, Truong TG, Hannun Y a. (2007) Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 282:1384–1396.
- Conway MCP, Whittal RM, Baldwin M a., Burlingame a. L, Balhorn R (2006) Electrospray Mass Spectrometry of NeuAc Oligomers Associated with the C Fragment of the Tetanus Toxin. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:967–976.
- Courtney MJ, Akerman KE, Coffey ET (1997) Neurotrophins protect cultured cerebellar granule neurons against the early phase of cell death by a two-component mechanism. *J Neurosci* 17:4201–4211.
- Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403–417.
- Cubí R, Candalija A, Ortega A, Gil C, Aguilera J (2013) Tetanus Toxin Hc Fragment Induces the Formation of Ceramide Platforms and Protects Neuronal Cells against Oxidative Stress. *PLoS One* 8 (6).
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 272:10957–10967.
- D’Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10989–10993.
- Datta SR, Dudek H, Xu T, Masters S, Haian F, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91:231–241.
- Dechant G, Biffo S, Okazawa H, Kolbeck R, Pottgiesser J, Barde Y a (1993) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* 119:545–558.
- Deinhardt K, Berninghausen O, Willison HJ, Hopkins CR, Schiavo G (2006a) Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin 1. *J Cell Biol* 174:459–471.
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G (2006b) Rab5 and Rab7 Control Endocytic Sorting along the Axonal Retrograde Transport Pathway. *Neuron* 52:293–305.

- DiStefano PS, Chelsea DM, Schick CM, McKelvy JF (1993) Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 13:2405–2414.
- DiStefano PS, Clagett-Dame M, Chelsea DM, Loy R (1991) Developmental regulation of human truncated nerve growth factor receptor. *Ann Neurol* 29:13–20.
- Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun Y a. (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis: Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 270:22135–22142.
- Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao M V, Hannun YA (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265:1596–1599.
- Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, Chapman ER (2008) Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell* 19:5226–5237.
- Dong M, Richards D a., Goodnough MC, Tepp WH, Johnson E a., Chapman ER (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* 162:1293–1303.
- Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson E a, Janz R, Chapman ER (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312:592–596.
- Duchemin AM, Ren Q, Mo L, Neff NH, Hadjiconstantinou M (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* 81:696–707.
- Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjiconstantinou M (2008) GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: Involvement of Trk receptors. *J Neurochem* 104:1466–1477.
- Dumas M, Schwab ME, Baumann R, Thoenen H (1979) Retrograde transport of tetanus toxin through a chain of two neurons. *Brain Res* 165:354–357.
- Edsall LC, Pirianov GG, Spiegel S (1997) Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 17:6952–6960.
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996) Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16:3123–3129.
- Eisell U, Jarausch W, Goretzki K, Henschen A, Engels J, Weller U, Hudel M, Habermann E, Niemann H (1986) Tetanus toxin: primary structure, expression en *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *Embo J* 5:2495–2502.
- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* 275:8889–8894.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao M V., 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.

- Esteban PF, Yoon HY, Becker J, Dorsey SG, Caprari P, Palko ME, Coppola V, Saragovi HU, Randazzo PA, Tessarollo L (2006) A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J Cell Biol* 173:291–299.
- Evinger C, Erichsen JT (1986) Transsynaptic retrograde transport of fragment C of tetanus toxin demonstrated by immunohistochemical localization. *Brain Res* 380:383–388.
- Ewers H, Helenius A (2011) Lipid-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1–14.
- Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, Parry CM (2000) Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:292–301.
- Figueiredo DM, Hallewell RA, Chen LL, Fairweather NF, Dougan G, Savitt JM, Parks DA, Fishman PS (1997) Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol* 145:546–554.
- Filosto S, Ashfaq M, Chung S, Fry W, Goldkorn T (2012) Neutral sphingomyelinase 2 activity and protein stability are modulated by phosphorylation of five conserved serines. *J Biol Chem* 287:514–522.
- Filosto S, Fry W, Knowlton A a., Goldkorn T (2010) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J Biol Chem* 285:10213–10222.
- Fischer A, Montal M (2007) Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol Chem* 282:29604–29611.
- Fishman PS, Carrigan DR (1987) Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin. *Brain Res* 406:275–279.
- Fishman PS, Parks D a., Bowen T, Matthews CC (2009) Localized tetanus in immunized mice. *Neurotoxicology* 30:697–701.
- Fotinou C, Emsley P, Black I, Ando H, Ishida H, Kiso M, Sinha K a., Fairweather NF, Isaacs NW (2001) The Crystal Structure of Tetanus Toxin Hc Fragment Complexed with a Synthetic GT1b Analogue Suggests Cross-linking between Ganglioside Receptors and the Toxin. *J Biol Chem* 276:32274–32281.
- Francis JW, Bastia E, Matthews CC, Parks D a., Schwarzschild M a., Brown RH, Fishman PS (2004a) Tetanus toxin fragment C as a vector to enhance delivery of proteins to the CNS. *Brain Res* 1011:7–13.
- Francis JW, Figueiredo D, VanderSpek JC, Ayala LM, Kim YS, Remington MP, Young PJ, Lorson CL, Ikebe S, Fishman PS, Brown RH (2004b) A survival motor neuron:tetanus toxin fragment C fusion protein for the targeted delivery of SMN protein to neurons. *Brain Res* 995:84–96.
- Friedman WJ, Greene LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253:131–142.
- Fu Z, Chen C, Barbieri JT, Kim JJP, Baldwin MR (2009) Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry* 48:5631–5641.

- Gallart-Palau X, Tarabal O, Casanovas A, Sábado J, Correa FJ, Hereu M, Piedrafita L, Calderó J, Esquerda JE (2014) Neuregulin-1 is concentrated in the postsynaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to  $\alpha$ -motoneurons and altered during motoneuron diseases. *FASEB J* 28:3618–3632.
- Galli C, Meucci O, Scorziello a, Werge TM, Calissano P, Schettini G (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15:1172–1179.
- Galli T, Zahraoui a, Vaidyanathan V V, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998) A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9:1437–1448.
- Galloux M, Vitrac H, Montagner C, Raffestin S, Popoff MR, Chenal A, Forge V, Gillet D (2008) Membrane interaction of botulinum neurotoxin A translocation (T) domain: The belt region is a regulatory loop for membrane interaction. *J Biol Chem* 283:27668–27676.
- Gentry JJ, Rutkoski NJ, Burke TL, Carter BD (2004) A Functional Interaction between the p75 Neurotrophin Receptor Interacting Factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* 279:16646–16656.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J (2003) C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J* 373:613–620.
- Gil C, Chaib-oukadour I, Blasi J, Aguilera J (2001) HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem J* 103:97–103.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Pelliccioni P, Aguilera J (2000) Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCgamma-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett* 481:177–182.
- Gil C, Ruiz-Meana M, Alava M, Yavin E, Aguilera J (1998) Tetanus toxin enhances protein kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J Neurochem* 70:1636–1643.
- Gill DM (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46:86–94.
- Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358:414–417.
- Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39–71.
- González-Forero D, Morcuende S, Alvarez FJ, De La Cruz RR, Pastor Á M (2005) Transynaptic effects of tetanus neurotoxin in the oculomotor system. *Brain* 128:2175–2188.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424–2428.

- Grumelli C, Verderio C, Pozzi D, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M (2005) Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. *Neurotoxicology* 26:761–767.
- Guertin D a., Sabatini DM (2007) Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12:9–22.
- Haapasalo A, Koponen E, Hoppe E, Wong G, Castrén E (2001) Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1352–1358.
- Habig WH, Bigalke H, Bergey GK, Neale EA, Hardegree MC, Nelson PG (1986) Tetanus toxin in dissociated spinal cord cultures: long-term characterization of form and action. *J Neurochem* 47:930–937.
- Halpern JL, Loftus A (1993) Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J Biol Chem* 268:11188–11192.
- Hannun Y a, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139–150.
- Hassel B (2013) Tetanus: Pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins (Basel)* 5:73–83.
- Hauck CR, Grassmé H, Bock J, Jendrossek V, Ferlinz K, Meyer TF, Gulbins E (2000) Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett* 478:260–266.
- Hauck CR, Meyer TF, Lang F, Gulbins E (1998) CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J* 17:443–454.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.
- Herrando-Grabulosa M (2012) Acció del fragment carboxil terminal de la toxina tetànica sobre les lesions traumàtiques i no traumàtiques que afecten les motoneurons espinals.
- Herrando-Grabulosa M, Casas C, Aguilera J (2013) The C-terminal domain of tetanus toxin protects motoneurons against acute excitotoxic damage on spinal cord organotypic cultures. *J Neurochem* 124:36–44.
- Herreros J, Lalli G, Montecucco C, Schiavo G (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem* 74:1941–1950.
- Herreros J, Ng T, Schiavo G (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 12:2947–2960.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3b in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20:2567–2574.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610–638.

- Hoofst RW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1996) Errors in protein structures. *Nature* 381:272.
- Horres CR, Hannun Y a. (2012) The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochem Res* 37:1137–1149.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642.
- 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.
- Inserte J, Najib A, Pelliccioni P, Gil C, Aguilera J (1999) Inhibition by tetanus toxin of sodium-dependent, high-affinity [3H]5- hydroxytryptamine uptake in rat synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 57:111–120.
- Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett* 460:191–198.
- Jacky BPS, Garay PE, Dupuy J, Nelson JB, Cai B, Molina Y, Wang J, Steward LE, Broide RS, Francis J, Aoki KR, Stevens RC, Fernández-Salas E (2013) Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A). *PLoS Pathog* 9.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631–643.
- Janshoff A, Steinem C, Sieber M, El Bayâ A, Schmidt MA, Galla HJ (1997) Quartz crystal microbalance investigation of the interaction of bacterial toxins with ganglioside containing solid supported membranes. *Eur Biophys J* 26:261–270.
- Jayaraman S, Eswaramoorthy S, Kumaran D, Swaminathan S (2005) Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin. *Proteins Struct Funct Genet* 61:288–295.
- Johnston L, Mawas F, Tierney R, Qazi O, Fairweather N, Sesardic D (2009) Transcutaneous delivery of tetanus toxin Hc fragment induces superior tetanus toxin neutralizing antibody response compared to tetanus toxoid. *Hum Vaccin* 5:230–236.
- Jongeneel C V., Bouvier J, Bairoch a. (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett* 242:211–214.
- Kaether C, Skehel P, Dotti CG (2000) Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 11:1213–1224.
- Kanato Y, Ono S, Kitajima K, Sato C (2009) Complex formation of a brain-derived neurotrophic factor and glycosaminoglycans. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2735–2741.
- Kao SC, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the Mechanisms Regulating the Differential Activation of the MAPK Cascade by Epidermal Growth Factor and Nerve Growth Factor in PC12 Cells. *J Biol Chem* 276:18169–18177.

- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao M V, Parada LF (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252:554–558.
- Kenchappa RS, Tep C, Korade Z, Urrea S, Bronfman FC, Yoon SO, Carter BD (2010) P75 Neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem* 285:20358–20368.
- Kenchappa RS, Zampieri N, Chao M V., Barker P a., Teng HK, Hempstead BL, Carter BD (2006) Ligand-Dependent Cleavage of the P75 Neurotrophin Receptor Is Necessary for NRIF Nuclear Translocation and Apoptosis in Sympathetic Neurons. *Neuron* 50:219–232.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao M V (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 21:5854–5863.
- Khursigara G, Orlinick JR, Chao M V. (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274:2597–2600.
- Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016725.
- Kitamura M, Igimi S, Furukawa K, Furukawa K (2005) Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxins. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1741:1–3.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66:395–403.
- Knapp M, Segelke B, Rupp B (1998) The 1.61 Angstrom Structure of the Tetanus Toxin Ganglioside Binding Region: Solved by MAD and Mir Phase Combination. In: *Am.Cryst.Assoc., Abstr.Papers (Annual Meeting)*, pp 25,90.
- Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker P a (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J* 25:2061–2070.
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao M V (2001) An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21:176–185.
- Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, Nishiki T, Mochida S (1998) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. *Microb Pathog* 25:91–99.
- Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds a, Clevenger C V, Reed JC (1998) TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 152:1549–1561.

- Krieger E, Koraimann G, Vriend G (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins Struct Funct Genet* 47:393–402.
- Kriegelstein K, Henschen a, Weller U, Habermann E (1990) Arrangement of disulfide bridges and positions of sulfhydryl groups in tetanus toxin. *Eur J Biochem* 188:39–45.
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32–43.
- Lacy DB, Stevens RC (1999) Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 291:1091–1104.
- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schiavo G (2003a) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 11:431–437.
- Lalli G, Gschmeissner S, Schiavo G (2003b) Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *J Cell Sci* 116:4639–4650.
- Lalli G, Herreros J, Osborne SL, Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G (1999) Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J Cell Sci* 112.1:2715–2724.
- Lalli G, Schiavo G (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol* 156:233–239.
- Lam K-H, Yao G, Jin R (2015) Diverse binding modes, same goal: The receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. *Prog Biophys Mol Biol*:1–7.
- Lamballe F, Tapley P, Barbacid M (1993) trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J* 12:3083–3094.
- Langford GM (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3:859–865.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Larsen KE, Benn SC, Ay I, Chian RJ, Celia S a., Remington MP, Bejarano M, Liu M, Ross J, Carmillo P, Sah D, Phillips K a., Sulzer D, Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH, Francis JW (2006) A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Res* 1120:1–12.
- Lazarovici P, Yanai P, Yavin E (1987) Molecular interactions between micellar polysialogangliosides and affinity-purified tetanotoxins in aqueous solution. *J Biol Chem* 262:2645–2651.
- Lazarovici P, Yavin E (1986) Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor component. *Biochemistry* 25:7047–7054.
- Lee FS, Kim a. H, Khursigara G, Chao M V. (2001) The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 11:281–286.

- Lee FS, Rajagopal R, Chao M V (2002) Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:11–17.
- Lencer WI, Tsai B (2003) The intracellular voyage of cholera toxin: Going retro. *Trends Biochem Sci* 28:639–645.
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10235–10239.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez CF (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16:4999–5005.
- Ligorio M a., Akmentin W, Gallery F, Cabot JB (2000) Ultrastructural localization of the binding fragment of tetanus toxin in putative gamma-aminobutyric acidergic terminals in the intermediolateral cell column: A potential basis for sympathetic dysfunction in generalized tetanus. *J Comp Neurol* 419:471–484.
- Lou X, Yano H, Lee F, Chao M V, Farquhar MG (2001) GIPC and GAIP form a complex with TrkA: a putative link between G protein and receptor tyrosine kinase pathways. *Mol Biol Cell* 12:615–627.
- Louch H, Buczko ES, Woody M, Venable RM, Vann WF (2002) Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin. *Biochemistry* 41:13644–13652.
- MacPhee I, Barker P a. (1999) Extended ceramide exposure activates the trkA receptor by increasing receptor homodimer formation. *J Neurochem* 72:1423–1430.
- Macri L, Silverstein D, Clark R a F (2007) Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1366–1381.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao M V., Hempstead BL (1994) High Affinity Nerve Growth Factor Binding Displays a Faster Rate of Association Than p140trk Binding: Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 269:6884–6891.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580:2011–2014.
- Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD (2001) TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *J Cell Biol* 155:1275–1285.
- Mamidipudi V, Wooten MW (2002) Dual role for p75NTR signaling in survival and cell death: Can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 68:373–384.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129:1261–1274.
- Marchesini N, Luberto C, Hannun YA (2003) Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 278:13775–13783.

- Marini AM, Rabin SJ, Lipsky RH, Mocchetti I (1998) Activity-dependent Release of Brain-derived Neurotrophic Factor Underlies the Neuroprotective Effect of N-Methyl- D -aspartate. *J Biol Chem* 273:29394–29399.
- Marinissen MJ, Chiariello M, Pallante M, Gutkind JS (1999) A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol* 19:4289–4301.
- Maroto R, Perez-Polo JR (1997) BCL-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *J Neurochem* 69:514–523.
- Martino MM, Briquez PS, Güç E, Tortelli F, Kilarski WW, Metzger S, Rice JJ, Kuhn GA, Müller R, Swartz MA, Hubbell JA (2014) Growth Factors Engineered for Super-Affinity to the Extracellular Matrix Enhance Tissue Healing. *Science* (80- ) 343:885–889.
- Matteoli M, Verderio C, Rossetto O, Iezzi N, Coco S, Schiavo G, Montecucco C (1996) Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13310–13315.
- Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S (2003) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829–38839.
- Matusica D, Coulson EJ (2014) Local versus long-range neurotrophin receptor signalling: Endosomes are not just carriers for axonal transport. *Semin Cell Dev Biol* 31:57–63.
- McDonald NQ, Chao M V. (1995) Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem* 270:19669–19672.
- Meckler RL, Baron R, McLachlan EM (1990) Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience* 36:823–829.
- Mendieta L, Venegas B, Moreno N, Patricio A, Martínez I, Aguilera J, Limón ID (2009) The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP+-lesions. *Neurosci Res* 65:98–106.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7:221–228.
- Miana-Mena FJ, Muñoz MJ, Roux S, Ciriza J, Zaragoza P, Brûlet P, Osta R (2004) A non-viral vector for targeting gene therapy to motoneurons in the CNS. *Neurodegener Dis* 1:101–108.
- Miana-Mena FJ, Roux S, Benichou J-C, Osta R, Brûlet P (2002) Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3234–3239.
- Middlemas DS, Lindberg R a, Hunter T (1991) TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 11:143–153.

- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121–137.
- Montal M (2010) Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* 79:591–617.
- Montecucco C (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci* 11:314–317.
- Montecucco C, Schiavo G (1994) Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* 13:1–8.
- Moreno-Igoa M, Calvo AC, Penas C, Manzano R, Oliván S, Muñoz MJ, Mancuso R, Zaragoza P, Aguilera J, Navarro X, Osta Pinzolas R (2010) Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J Mol Med* 88:297–308.
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275:17566–17570.
- Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31:268–275.
- Mutoh T, Tokuda A, Inokuchi JI, Kuriyama M (1998) Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 273:26001–26007.
- Najib A, Pelliccioni P, Gil C, Aguilera J (2000) Serotonin transporter phosphorylation modulated by tetanus toxin. *FEBS Lett* 486:136–142.
- Nakamura N (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* 112:255–264.
- Nakata T, Terada S, Hirokawa N (1998) Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol* 140:659–674.
- Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S (1994) Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 269:10498–10503.
- Nishiki TI, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S (1996) The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett* 378:253–257.
- Nonomura T, Kubo T, Oka T, Shimoke K, Yamada M, Enokido Y, Hatanaka H (1996) Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Dev Brain Res* 97:42–50.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75NTR - Live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15:49–57.

- O'Grady P, Thai TC, Saito H (1998) The Laminin–Nidogen Complex is a Ligand for a Specific Splice Isoform of the Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase LAR. *141:1–10*.
- Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner D a., Naiki T, Nozawa Y, Nakashima S, Moriwaki H (2001) TNF- $\alpha$ -Induced Sphingosine 1-Phosphate Inhibits Apoptosis Through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Human Hepatocytes. *J Immunol 167:173–180*.
- Ovsepian S V., Bodeker M, O'Leary VB, Lawrence GW, Oliver Dolly J (2015) Internalization and retrograde axonal trafficking of tetanus toxin in motor neurons and trans-synaptic propagation at central synapses exceed those of its C-terminal-binding fragments. *Brain Struct Funct 220(3):1839*.
- Patapoutian a., Reichardt LF (2001) Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol 11:272–280*.
- Pedretti A, Villa L, Vistoli G (2004) VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des 18:167–173*.
- Pelliccioni P, Gil C, Najib a, Sarri E, Picatoste F, Aguilera J (2001) Tetanus toxin modulates serotonin transport in rat-brain neuronal cultures. *J Mol Neurosci 17:303–310*.
- Peng L, Tepp WH, Johnson E a., Dong M (2011) Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog 7*.
- Personius KE, Parker SD (2013) TrkB expression at the neuromuscular junction is reduced during aging. *Muscle and Nerve 47:532–538*.
- Pfeffer SR (2012) Rab GTPase localization and Rab cascades in Golgi transport. *Biochem Soc Trans 40:1373–1377*.
- Pierce EJ, Davison MD, Parton RG, Habig WH, Critchley DR (1986) Characterization of tetanus toxin binding to rat brain membranes. Evidence for a high-affinity proteinase-sensitive receptor. *Biochem J 236:845–852*.
- Plo I, Bono F, Bezombes C, Alam a, Bruno a, Laurent G (2004) Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res 77:465–474*.
- Posse de Chaves EI (2006) Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta - Biomembr 1758:1995–2015*.
- Qazi O, Bolgiano B, Crane D, Svergun DI, Konarev P V., Yao ZP, Robinson C V., Brown K a., Fairweather N (2007) The HC Fragment of Tetanus Toxin forms Stable, Concentration-dependent Dimers via an Intermolecular Disulphide Bond. *J Mol Biol 365:123–134*.
- Qazi O, Sesardic D, Tierney R, Söderbäck Z, Crane D, Bolgiano B, Fairweather N (2006) Reduction of the ganglioside binding activity of the tetanus toxin H C fragment destroys immunogenicity: Implications for development of novel tetanus vaccines. *Infect Immun 74:4884–4891*.

- 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.
- Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I (2002) Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem* 277:49466–49472.
- Rao KN, Kumaran D, Binz T, Swaminathan S (2005) Structural analysis of the catalytic domain of tetanus neurotoxin. *Toxicon* 45:929–939.
- Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL (2000) Oxidative stress and Ca<sup>2+</sup> influx upregulate calpain and induce apoptosis in. *Synthesis (Stuttg)*:326–334.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545–1564.
- Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, Caleo M (2011) Evidence for Anterograde Transport and Transcytosis of Botulinum Neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci* 31:15650–15659.
- Restani L, Giribaldi F, Manich M, Bercsenyi K, Menendez G, Rossetto O, Caleo M, Schiavo G (2012a) Botulinum Neurotoxins A and E Undergo Retrograde Axonal Transport in Primary Motor Neurons. *PLoS Pathog* 8.
- Restani L, Novelli E, Bottari D, Leone P, Barone I, Galli-Resta L, Strettoi E, Caleo M (2012b) Botulinum Neurotoxin A Impairs Neurotransmission Following Retrograde Transynaptic Transport. *Traffic* 13:1083–1089.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122:735–749.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487–492.
- Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Götz R, Barde YA (1992) Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 11:917–922.
- Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426:74–78.
- Roskoski R (2012) ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66:105–143.
- Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Tonello F, Bortoletto N, Stevens RC, Montecucco C (2001) Active-site mutagenesis of tetanus neurotoxin implicates TYR-375 and GLU-271 in metalloproteolytic activity. *Toxicon* 39:1151–1159.
- Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C (2013) Tetanus neurotoxin. *Toxicon* 66:59–63.

- Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 273:10232–10239.
- Roux PP, Barker P a. (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203–233.
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker P a. (2001) The p75 Neurotrophin Receptor Activates Akt (Protein Kinase B) through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway. *J Biol Chem* 276:23097–23104.
- Roux S, Colasante C, Saint Cloment C, Barbier J, Curie T, Girard E, Molgó J, Brûlet P (2005) Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci* 30:79–89.
- Roux S, Saint Cloment C, Curie T, Girard E, Mena FJM, Barbier J, Osta R, Molgó J, Brûlet P (2006) Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 24:1546–1554.
- Rummel A (2013) Double receptor anchorage of botulinum neurotoxins accounts for their exquisite neurospecificity. *Curr Top Microbiol Immunol* 364:61–90.
- Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, Binz T (2003) Two carbohydrate binding sites in the HCC-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol* 326:835–847.
- Rummel A, Häfner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, Jahn R, Beermann S, Karnath T, Bigalke H, Binz T (2009) Botulinum neurotoxins C, e and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J Neurochem* 110:1942–1954.
- Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T (2004) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* 279:30865–30870.
- Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47:383–392.
- Saheki Y, De Camilli P (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005645.
- Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA (2000) NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27:279–288.
- Salinas M, López-Valdaliso R, Martín D, Alvarez a, Cuadrado a (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* 15:156–169.
- Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ (2010) A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol* 8:645–655.

- Sandvig K, Skotland T, Van Deurs B, Klokke TI (2013) Retrograde transport of protein toxins through the Golgi apparatus. *Histochem Cell Biol* 140:317–326.
- Sarbassov DD, Guertin D a, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80:717–766.
- Schiavo G, Papini E, Genna G, Montecucco C (1990) An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. *Infect Immun* 58:4136–4141.
- Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C (1992) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J* 11:3577–3583.
- Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, De Laureto PP, DasGupta BR, Benfenati F, Montecucco C (1993a) Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem* 268:23784–23787.
- Schiavo G, Santucci a, Dasgupta BR, Mehta PP, Jontes J, Benfenati F, Wilson MC, Montecucco C (1993b) Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett* 335:99–103.
- Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C (1995) Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 270:10566–10570.
- Schiavo G, Shone CC, Rossetto O, Alexander FCG, Montecucco C (1993c) Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem* 268:11516–11519.
- Schmieg N, Menendez G, Schiavo G, Terenzio M (2014) Signalling endosomes in axonal transport: Travel updates on the molecular highway. *Semin Cell Dev Biol* 27:32–43.
- Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2014) Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 94:461–518.
- Schwab ME, Suda K, Thoenen H (1979) Selective retrograde and transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J Cell Biol* 82:798–810.
- Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF (1999) The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci* 8:2223–2233.
- Shamseddine A a., Airola M V., Hannun Y a. (2015) Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv Biol Regul* 57:24–41.

- Shinoda Y, Ahmed S, Ramachandran B, Bharat V, Brockelt D, Altas B, Dean C (2014) BDNF enhances spontaneous and activity-dependent neurotransmitter release at excitatory terminals but not at inhibitory terminals in hippocampal neurons. *Front Synaptic Neurosci* 6:1–12.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39.
- Simpson LL (1986) Botulinum Toxin and Tetanus Toxin. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 26:427–453.
- Sinha K, Box M, Lalli G, Schiavo G, Schneider H, Groves M, Siligardi G, Fairweather N (2000) Analysis of mutants of tetanus toxin H(C) fragment: Ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol* 37:1041–1051.
- Skaper SD (2008) The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:46–62.
- Skaper SD (2012) Neurotrophic Factors. In: *Methods in Molecular Biology*, pp 213–222.
- Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ (2011) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling? *BioEssays* 33:614–625.
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ (2010) ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* 30:15608–15615.
- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901–913.
- Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65:895–903.
- Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65:885–893.
- Stiess M, Bradke F (2010) Neuronal polarization: The cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol* 71:430–444.
- Stoeckel K, Schwab M, Thoenen H (1975) Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res* 99:1–16.
- Stoilov P, Castren E, Stamm S (2002) Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1054–1065.
- Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde Y a, Dechant G (1996) A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 15:3332–3337.

- Stryker E, Johnson KG (2007) LAR, liprin alpha and the regulation of active zone morphogenesis. *J Cell Sci* 120:3723–3728.
- Südhof TC (1997) Function of Rab3 GDP-GTP exchange. *Neuron* 18:519–522.
- Südhof TC (2002) Synaptotagmins: Why so many? *J Biol Chem* 277:7629–7632.
- Südhof TC (2013) Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80:675–690.
- Swaminathan S, Eswaramoorthy S (2000) Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. *Nat Struct Biol* 7:693–699.
- Taniuchi M, Johnson Jr. EM, Roach PJ, Lawrence Jr. JC (1986) Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *JBiolChem* 261:13342–13349.
- Terenzio M, Golding M, Russell MRG, Wicher KB, Rosewell I, Spencer-Dene B, Ish-Horowicz D, Schiavo G (2014a) Bicaudal-D1 regulates the intracellular sorting and signalling of neurotrophin receptors. *EMBO J* 33:1–17.
- Terenzio M, Golding M, Schiavo G (2014b) siRNA screen of ES cell-derived motor neurons identifies novel regulators of tetanus toxin and neurotrophin receptor trafficking. *Front Cell Neurosci* 8:140.
- Toivonen JM, Oliván S, Osta R (2010) Tetanus toxin c-fragment: The courier and the cure? *Toxins (Basel)* 2:2622–2644.
- Tomàs J, Santafé MM, Garcia N, Lanuza M a., Tomàs M, Besalduch N, Obis T, Priego M, Hurtado E (2014) Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *J Neurosci Res* 92:543–554.
- Tsui-Pierchala BA, Milbrandt J, Johnson EM (2002) NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron* 33:261–273.
- Tuffereau C, Bénéjean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A (1998) Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J* 17:7250–7259.
- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos a M (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* 290:149–159.
- Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, Furey WF, Schmidt JJ, Sax M (1997) Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol* 4:788–792.
- Underwood CK, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1664–1668.

- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG (1995) An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 14:2795–2805.
- Van Brocklyn JR, Williams JB (2012) The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 163:26–36.
- Vesa J, Kruttgen a., Shooter EM (2000) p75 Reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *J Biol Chem* 275:24414–24420.
- Vriend G (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8:52–56, 29.
- Wang J, Zurawski TH, Meng J, Lawrence GW, Aoki KR, Wheeler L, Dolly JO (2012) Novel chimeras of botulinum and tetanus neurotoxins yield insights into their distinct sites of neuroparalysis. *FASEB J* 26:5035–5048.
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA (2001) Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4:981–988.
- Wiesmann C, de Vos a M, Vos a M De (2001) Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 58:748–759.
- Williamson LC, Bateman KE, Clifford JCM, Neale E a. (1999) Neuronal sensitivity to tetanus toxin requires gangliosides. *J Biol Chem* 274:25173–25180.
- Windisch JM, Marksteiner R, Lang ME, Auer B, Schneider R (1995) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry* 34:11256–11263.
- Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA (2010) Mammalian neutral sphingomyelinases: Regulation and roles in cell signaling responses. *NeuroMolecular Med* 12:320–330.
- Xia P, Wang L, Moretti PAB, Albanese N, Chai F, Pitson SM, D'Andrea RJ, Gamble JR, Vadas MA (2002) Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem* 277:7996–8003.
- Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F, Roques B, Fykse EM, Südhof TC, Jahn R, Niemann H (1994) Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinal neurotoxins and tetanus toxin. *J Biol Chem* 269:12764–12772.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585–593.
- Yan H, Chao M V. (1991) Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem* 266:12099–12104.
- Yang T, Massa SM, Longo FM (2006) LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways. *J Neurobiol* 66:1420–1436.

- Yang T, Yin W, Derevyanny VD, Moore L a., Longo FM (2005) Identification of an ectodomain within the LAR protein tyrosine phosphatase receptor that binds homophilically and activates signalling pathways promoting neurite outgrowth. *Eur J Neurosci* 22:2159–2170.
- Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H (1999a) The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* 4:321–330.
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JLL, Leo E, Zapata J, Hauser C a., Reed JC, Bredesen DE (1999b) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274:30202–30208.
- Yeh FL, Dong M, Yao J, Tepp WH, Lin G, Johnson E a., Chapman ER (2010) SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathog* 6.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao M V (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18:3273–3281.
- Yuan X, Jin M, Xu X, Song Y, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38–45.
- 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.
- Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11–18.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107–117.
- Zhang X, Huang J, McNaughton PA (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24:4211–4223.
- Zupan AA, Osborne PA, Smith CE, Siegel NR, Leimgruber RM, Johnson Jr. EM (1989) Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 264:11714–11720.