



Universidad de
Salamanca

PAPEL DE LA PROTEÍNA BEX-3 EN LA UBIQUITINACIÓN DEL RECEPTOR TrkA

Laura Calvo Enrique

Dirigido por: Dr. Juan Carlos Arévalo Martín

Dr. Manuel Sánchez Malmierca

INDICE

Introducción.....	pág. 3
- neurotrofinas	
- receptores	
- cascada de señalización	
- degradación	
- Bex 3 (NADE)	
Materiales y métodos.....	pág. 8
- cultivos celulares	
- transfección	
- inmunoprecipitación	
- western blot	
- preparación e infección con lentivirus	
- estimulación aguda con NGF tras la infección	
- inmunofluorescencia	
- extracción del RNA	
- RT-PCR	
Resultados.....	pág. 13
- Células 293FT transfectadas	
- DRGs infectados con lentivirus y estimulados con NGF	
- RT-PCR	
Discusión.....	pág. 17
Bibliografía.....	pág. 19

INTRODUCCIÓN:

Neurotrofinas:

Las neurotrofinas son factores neurotróficos. Modulan el proceso de diferenciación, maduración, regeneración y muerte neuronal. Son esenciales para el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados. A pesar de que fueron descubiertas hace más de medio siglo, su estudio no ha cesado ya que se van descubriendo nuevas funciones. Además de las funciones clásicas, las neurotrofinas pueden regular el crecimiento axonal y dendrítico, las conexiones sinápticas, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Arevalo and Wu, 2006). Por ello, en su estudio se implica desde el desarrollo neurobiológico hasta la neurodegeneración y los trastornos psiquiátricos (Shooter, 2001).

La familia de las neurotrofinas, en los mamíferos, está formada por el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *nerve growth factor*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y las neurotrofinas 3 y 4/5 (NT-3 y NT-4/5). Todas ellas son proteínas homodiméricas asociadas no covalentemente; el prototipo es el NGF.

Las neurotrofinas son sintetizadas y liberadas de manera dependiente a la actividad neural. Son inicialmente sintetizadas como precursores o como pre-neurotrofinas. Cada producto génico tiene que sufrir una proteólisis para dar lugar a la proteína madura. La regulación de la actividad se basa en un importante control post-transcripcional que da mayor especificidad a sus acciones (Chao, 2003).

Receptores:

Las neurotrofinas ejercen sus funciones a través de dos tipos de receptores transmembrana: los receptores del tipo tirosina quinasa, llamados Trks (trkA, trkB y trkC) y el receptor llamado p75 (Arevalo and Wu, 2006).

Sin embargo, no todas las neurotrofinas tienen la misma afinidad por todos los receptores. Figura 1. Sorprendentemente, las pro-neurotrofinas tienen mayor afinidad por el receptor p75 (Lee et al., 2001).

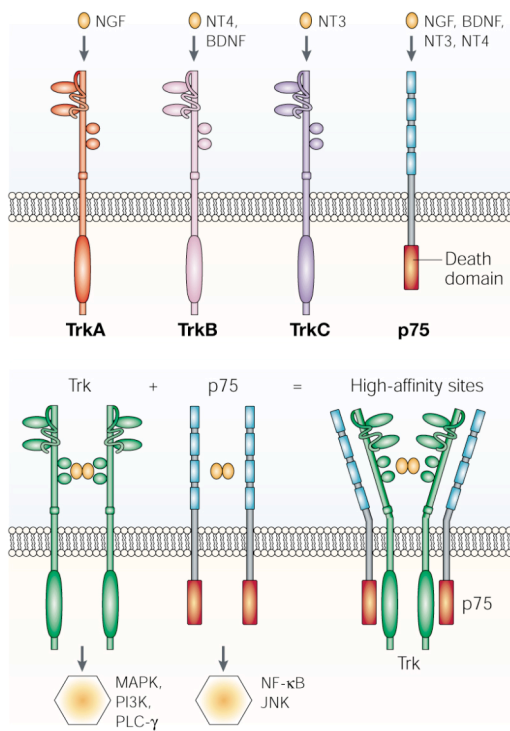


Figura 1: las neurotrofinas se unen de manera selectiva a sus receptores. La co-expresión de ambos aumenta la afinidad (Chao, 2003).

Aunque la presencia de p75 no es necesaria para que las neurotrofinas se unan y activen sus receptores, la co-expresión de p75 y TrkA “permite” un aumento de la unión de NGF a TrkA (Chao, 2003) (Kendall et al, 2003).

Cada receptor Trk tiene un dominio extracelular que consiste en un cluster rico en cisteína, seguido de tres repeticiones ricas en leucina, otro cluster rico en cisteína y dos dominios inmunoglobulina. Cada receptor atraviesa una sola vez la membrana, y termina con un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa.

El receptor p75 pertenece a la superfamilia del receptor TNF- α y estructuralmente se asemeja a otros miembros de esa familia. Se organiza en un dominio extracelular que incluye 4 motivos ricos en cisteína, un único dominio transmembrana y un pequeño dominio globular en su región intracelular, denominado “dominio de muerte celular” (Vilar et al., 2006).

Cascada de señalización:

La unión del ligando desencadena la dimerización del receptor que permite la *trans*-autofosforilación y la activación de las cascadas de señalización intracelular. La activación de cada receptor Trk permite activar tres grandes cascadas de señalización: La activación de Ras desencadena la consiguiente activación de las MAP (mitogen-activated protein) kinasas que promueven la diferenciación neuronal, la activación de fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K) y Akt, a través de la activación previa de Ras o Gab1 que terminan promoviendo la supervivencia y el crecimiento neuronal. Finalmente la tercera la cascada comienza con la activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ) que activará con la activación de la protein kinasa C que promoverá la plasticidad sináptica (Figura

2). Las tres cascadas también promueven la transcripción génica (Zampieri and Chao, 2006) (Reichardt, 2006).

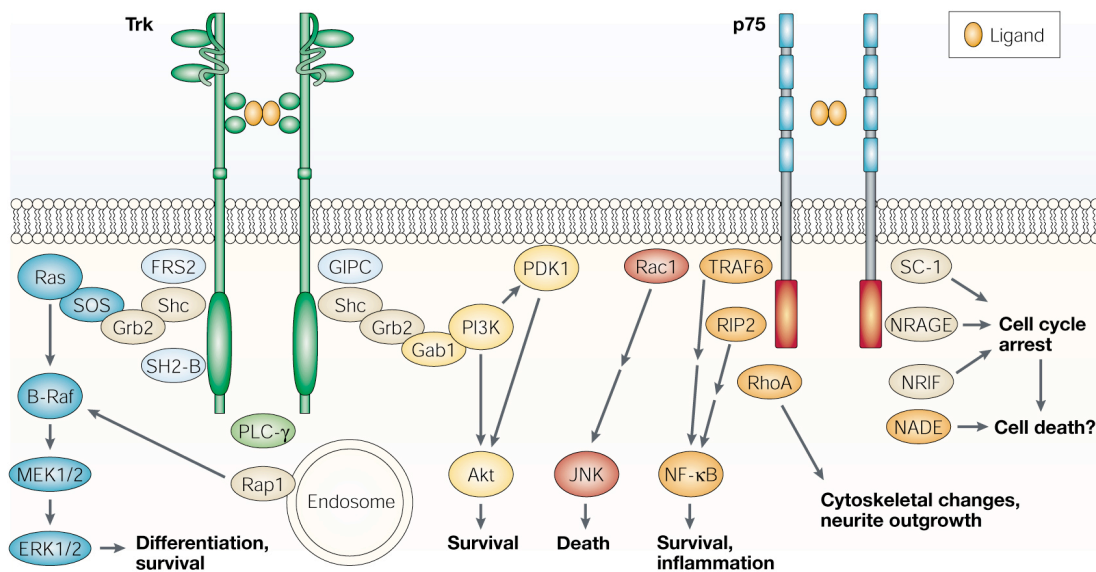


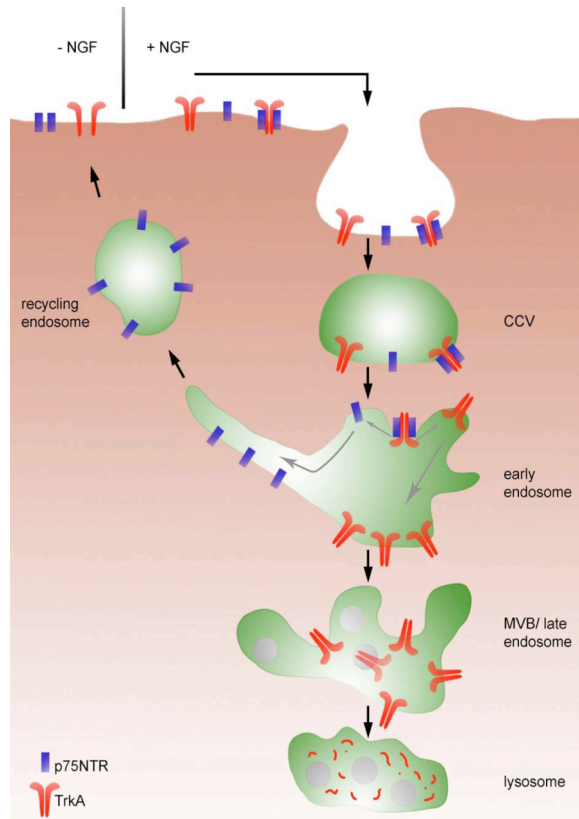
Figura 2: Se pueden observar los dos tipos de receptores para neurotrofinas (Trk y p75) con sus principales cascadas de señalización intracelular. (Chao, 2003).

La señalización mediada por p75 principalmente activa la supervivencia o muerte celular a través de la activación del factor de transcripción NF-κB y de JNK, respectivamente. También modula la actividad de RhoA, lo que provoca cambios en el citoesqueleto. Pero la respuesta de este receptor depende en gran medida de proteínas adaptadoras. Así por ejemplo, la señalización puede implicar parada del ciclo celular (por SC-1 y NRAGE) o muerte celular por apoptosis, si median Bex3 o NRIF. Dependiendo de que molécula efectora se asocie con su dominio intracelular tras la unión del ligando, la respuesta será diferente, lo que refleja la complejidad de la señalización de este receptor, a pesar de la ausencia de actividad enzimática en su dominio intracelular (Arevalo and Wu, 2006) (Kendall et al., 2003).

Degradación:

Cuando el ligando se une al receptor Trk empieza su internalización a través de vesículas recubiertas de clatrina. Una vez internalizadas las vesículas se liberan de la clatrina y se fusionan con vesículas internas para formar los endosomas primarios. Tras la internalización se ha visto que las neurotrofinas también están presentes en los

endosomas (Arevalo and Wu, 2006). En este momento del proceso, los receptores pueden ser reciclados y vuelven a la membrana celular o pueden pasar al endosoma tardío para ser degradados vía proteosómica o lisosómica (Saxena et al., 2005).



La internalización de los receptores sirve para acercar los receptores activados a los diferentes compartimentos celulares, como el núcleo, favoreciendo así la función de la transcripción génica. También sirve para llevar más receptores a la zona de la membrana plasmática donde haya mayor concentración de moléculas efectoras.

La internalización de los receptores tirosina quinasa está regulada por la activación. La unión del ligando al receptor promueve la ubiquitinación de éste y su consiguiente internalización (Arevalo et al., 2006).

Figura 3: esquema del transporte de los receptores en las células. (Saxena et al., 2005)

Se ha visto que p75 suprime la ubiquitinación del receptor TrkA y TrkB, retrasando su internalización y su degradación (Makkerh et al., 2005).

También se ha visto que la presencia de p75 promueve la endocitosis de los receptores Trk a través del reclutamiento de las enzimas E₂ y E₃ ubiquitina ligasas que median la ubiquitinación y el subsiguiente tráfico de los receptores Trk hacia los endosomas (Geetha and Wooten, 2008).

Bex 3 (NADE):

Hacia el año 2000 se descubrió una nueva familia de genes que se expresaban en el cromosoma X del ratón. El gen Bex3 (*Brain Expressed X-gen*) pertenece a esa nueva familia, y codifica una proteína de 124 aminoácidos. Dicha secuencia de aminoácidos

tiene gran homología (92,8%) (Mukai et al., 2000) con la proteína humana HGR74. (Brown and Kay, 1999).

Posteriormente otros grupos determinaron que Bex3, una proteína citosólica de 22kDa, es un ligando específico del receptor p75 y denominaron NADE (*p75 – associated death executor*). La proteína Bex3, en ratones, ratas y humanos tiene dos secuencias consenso, una secuencia señal de exportación nuclear (NES), rica en leucina, y una secuencia para la ubiquitinación (Mukai et al., 2000). La proteína Bex3 de ratas se degrada rápidamente, a través de la vía proteosómica, aunque el dímero (44kDa) es resistente a dicha degradación (Alvarez et al., 2005).

La secuencia NES es necesaria para la asociación de los monómeros de Bex3 y así crear el dímero. La asociación/desasociación de los monómeros puede regular el transporte núcleo-citoplasma de la proteína. Pero la secuencia NES no solamente es necesaria para la exportación al núcleo y para la asociación de los monómeros sino que también es indispensable para la interacción con el receptor p75 y para la apoptosis mediada por Bex3- p75 inducida de manera dependiente de NGF (Mukai et al., 2002).

La co-expresión de Bex3 y p75 desencadena la actividad de las caspasas 2 y 3 y la fragmentación del DNA nuclear en células 293T. Sin embargo, en ausencia del receptor p75, la proteína Bex3 no puede inducir apoptosis por si sola. La unión de la proteína Bex3 con el receptor p75 es dosis dependiente de NGF (Park et al., 2000) (Kendall et al., 2003).

Se propone estudiar el papel de la proteína Bex 3 en la ubiquitinación del receptor TrkA y sus consiguientes consecuencias en el tráfico y la degradación del receptor.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cultivos celulares

Las células 293FT han sido cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino, aminoácidos no esenciales, estreptomicina y penicilina. Las placas han sido previamente tratadas con poly-D-lisina.

Las neuronas primarias de los ganglios dorsales o DRGs (*Dorsal Root Ganglions*) se han obtenido a partir de embriones (E.15.5) de ratas. Las ratas fueron sacrificadas mediante asfixia con CO₂. Se obtienen los embriones del útero en una placa de 10 cm con L-15 (Gibco®). Se corta la cabeza y la cola de los embriones. Se quita la parte ventral y se deja la parte dorsal "limpia". Se pasa la médula ósea con los ganglios dorsales adosados a una placa de 6cm con medio L-15. Los ganglios se separan de la médula uno por uno. Se recogen en 3mL de medio L-15 y se añade 300µL de tripsina al 2,5% (Gibco®). Se incuban 45 minutos a 37°C para disgregar las células. Posteriormente se centrifugan 4 minutos a 9°C a 700rpm y se resuspenden las células en medio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco®) suplementado con glucosa a una concentración final de 4g/L, suero bovino fetal a una concentración final del 10% y 2mM glutamina y con NGF (50ng/mL). Se plaquean en placas previamente tratadas con poly-D-lisina al 0,1% y seguidamente con matrigel (BD Biosciences®). Al día siguiente las células se mantienen cultivadas en medio neurobasal (Gibco®) suplementado con B27, glucosa a una concentración final de 4g/L, 2mM glutamina, con penicilina y estreptomicina, 5-FU y NGF a una concentración de 25ng/mL.

- Transfección

La transfección se realizó en células 293FT (1x10⁶ células en placas de 6cm) con 5µg de DNA total, usando el método del fosfato cálcico en el mismo medio del cultivo. Las células son transfectadas con pcDNA TrkA (1µg), con pEGFP C3 (en cantidades variables desde 1µg hasta 4µg) y con pEGFP-Bex3 (en cantidades variables desde 0,5µg hasta 4µg). Se cambia el medio a las 24 horas de la transfección, se emplea el medio de cultivo de las células 293FT.

En algunos experimentos tras el cambio de medio se añaden inhibidores del proteosoma y de los lisosomas: cloroquina (50mM) y MG-132 (10mM).

- **Inmunoprecipitación**

Las células transfectadas son lisadas en 500µL de un tampón de lisis que contiene 20mM Tris, pH 8.0, 137mM NaCl, 1% Nonidet P-40 y 25µL de aprotinina, 25µL de leupeptina, 25µL vanadato, 25µL de 0,1M PMSF, 25µL de β-glicerofosfato y 25µL 1M NaF). Se mantienen 40 minutos en hielo y con agitación. Los lisados son centrifugados a 12000rpm durante 15min a 4°C. Luego TrkA se inmunoprecipita a partir de los lisados con 15 µL de C-14 agarosa o con 1,5µL α-203 y 20 µL de proteína A/G sepharosa. Las bolitas son lavadas 6 veces con tampón de lisis. Las muestras son hervidas 7 minutos a 100°C y posteriormente guardadas a -20°C hasta su utilización.

- **Western blot**

Las proteínas son separadas en un gel de poliacrilamida. Se transfieren a una membrana de PVDF que será donde llevemos a cabo la inmunodetección. Se bloquea durante 20 minutos con 2% de BSA en TBST (100mM Tris pH=8.0; 1,5M NaC; 10 mM EDTA; twenn-20 al 0,1%). Se incuba con los anticuerpos durante toda la noche, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBST. Se bloquea con 3% de leche en polvo en TBST. Se incuba el anticuerpo secundario durante 40 minutos en oscuridad. Se lava 3 veces, 10 minutos con TBST y se deja 1 minuto en la solución de revelado.

Los anticuerpos usados han sido: pAkt (1:1000, Cell signaling Technology®), Trk A C-14 (1:400, Santa Cruz Biotechnology®), GFP, Ubiquitina P₄D₁ (1:400, Santa cruz Biotechnology®), pTrk (1:1000, Cell signaling Technology®), pMAPK(1:2000, Cell signaling Technology®), MAPK(1:1000, Cell signaling technology®), β-tubulina III (1:5000, Sigma®)

- **Preparación e infección con lentivirus**

Los lentivirus han sido creados transfectando células 293FT (3x10⁶ células en placas de 10cm) con el método del fosfato cálcico empleando 9µg de DNA, 6µg de psPAX2 y

5µg de pMD.2G. Tres días después se ha recogido el medio, se ha centrifugado 10 minutos a 3750rpm a temperatura ambiente. Se ha filtrado a través de filtros de 45 micras.

Se infectaron DRGs con lentivirus sh-RNA pLVTHM (como control) y con lentivirus sh-RNA Bex3.

- **Estimulación aguda con NGF tras la infección con lentivirus**

La estimulación aguda con NGF en neuronas de DRGs se realiza a tiempos de 1 hora, 30 minutos, 15 minutos y 5 minutos, con una concentración de NGF de 50ng/mL. Las neuronas fueron deprivadas de NGF al menos 24horas antes y mantenidas en medio neurobasal suplementado con Z-VAD-FMK (20mM) como antiapoptótico.

Tras la estimulación aguda las células son recogidas con 70µL de tampón Laemli y analizadas mediante Western Blot en un gel de poliacrilamida.

- **Inmunofluorescencia**

Las células de corteza e hipocampo que estaban creciendo en cubres, son fijadas con paraformaldehido al 4% y 20% de sacarosa, durante 5 minutos. Se lavan durante 2 minutos con PBS. Luego se dejan 10 minutos con NH₄Cl 1M en PBS. Se vuelve a lavar con PBS durante 2 minutos. Se bloquea durante 20 minutos con 10% de suero bovino fetal, 2% de seroalbúmina bovina y 0,1% de tween-20 en PBS. Se permeabiliza con 0,1% de Tritón X-100. Se incuban durante toda la noche con el anticuerpo primario. Se lava nuevamente con PBS con agitación durante 20 minutos. Se incuba durante 40 minutos con el anticuerpo secundario, en oscuridad. Los núcleos se visualizan con PBS-Hoecht (1:10000). Se vuelve a lavar 40 minutos con PBS en oscuridad y con agitación. Los cubres se montan con α -fading.

Se emplean como anticuerpos primarios: Trk E7 (Zymed®) a 2µg/mL, Bex3 705 a 3µg/mL y Bex3 711 a 3µg/mL. Como anticuerpos secundarios se emplean: Alexa 488 (1:500) y Alexa 568 (1:500).

- **Extracción del RNA**

Se añaden 300µL de trizol (Invitrogen®) a las células de hipocampo y a las neuronas de DRGs que están en cultivos monocapa. Se incuban las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Añadir 100µL de cloroformo. Mezclar bien y centrifugar a 13000rpm 5 minutos. Transferir la fase acuosa a un eppendorf nuevo. Añadir 300µL de isopropanol para precipitar el RNA. Incubar las muestras 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 11000rpm durante 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de RNA con 500µL de etanol al 75%. Mezclar bien y centrifugar a 11000rpm durante 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y secar brevemente el pellet de RNA y disolvemos en 25µL de agua sin RNAsas.

- **RT-PCR**

El cDNA se obtiene a partir de 3µL del RNA previamente extraído con el trizol, 1µL de random primers (Promega®) y 1µL de agua sin nucleasas. Se calienta durante 5 minutos a 70°C para desnaturalizar el RNA. Posteriormente se añade: 4µL de buffer de reacción 5X (Promega®), 2µL de MgCl₂ (Promega®), 1µL de dNTPs Mix (0,5mM cada dNTP) (Promega®), 20 unidades de RNAsin Ribonucleasa Inhibitor (Promega®), 6,5µL de agua sin nucleasas y 1µL de Transcriptasa inversa (Promega®). Se deja durante 5 minutos a 25°C. Luego a 42°C durante una hora. Una vez obtenida la primera banda de cDNA, las siguientes reacciones de PCR se realizan de la siguiente manera: 3µL de cDNA, 2µL de Buffer 10X, 1,8µL de MgCl₂, 0,2µL de Taq polimerasa, 1µL de primer forward Bex3-g78-STOP (5'-GGCGGCCGCTCTGAGTCG ACCTG-3') y 1µL de primer backward Bex3-EcoR1 (5'-ATATAGAATTCATTAGAGAGCTCCCCCAT AAG-3') y 11µL de agua sin nucleasas. Como control se usa la β-actina. Los oligos empleados son: actina forward (5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3') y el actina backward (5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3').

El programa de la PCR empleado ha sido: 94°C durante 15'' para la desnaturalización, 50°C durante 30'' para el anillamiento, 68°C durante 30'' para la elongación. Se hacen 30 ciclos de amplificación.

El ADN amplificado se tiñe con bromuro de etidio al 0,02% y se corre en un gel de agarosa del 2% a 90V durante 15 minutos. Se observa el ADN teñido con un transiluminador.

RESULTADOS

- Células 293FT transfectadas con pcDNA TrkA, pEGFP C3 y pEGFP-Bex3.

El objetivo de transfectar las células con estos plásmidos, era observar la posible interacción entre el receptor y la proteína Bex3. Al añadir diferentes concentraciones de plásmido pEGFP-Bex3, se podía observar si dicha interacción era dosis-dependiente. Al dejar las transfecciones durante distintos tiempos, se podía observar lo que iba provocando una posible interacción. Los inhibidores fueron añadidos para observar el efecto que tenía lugar si se bloqueara la degradación del receptor TrkA.

Hay cinco grupos de células 293 FT transfectadas. El primer grupo fue transfectado con pcDNA TrkA (1µg) y con pEGFP C3 (4µg). El segundo grupo fue transfectado con pEGFP C3 (1µg) y con pEGFP-Bex3 (4µg). El tercer grupo fue transfectado con pcDNA TrkA (1µg), pEGFP-Bex3 (0,5µg) y con pEGFP C3 (3,5µg). El cuarto grupo fue transfectado con pcDNA TrkA (1µg), pEGFP-Bex3 (2µg) y con pEGFP C3 (2µg). El cinco y último grupo fue transfectado con pcDNA TrkA (1µg) y con pEGFP-Bex3 (4µg).

Se hicieron tres tipos de experimentos: se lisaron las células a las 24 horas después de la transfección, a las 48h de la transfección y a las 48h de la transfección pero tras una adicción previa, durante 6 horas, de inhibidores del proteosoma y de los lisosomas. A partir de los lisados, se inmunoprecipitó TrkA. Se analizaron los lisados y las inmunoprecipitaciones mediante western blot.

En las inmunoprecipitaciones obtenidas a las 24 horas de la transfección, se observa que a mayor expresión de GFP-Bex3, el receptor trkA está más ubiquitinado. También se observa que la proteína GFP-Bex3 aparece precipitada incluso en ausencia de trkA, pero en presencia del receptor la cantidad de proteína GFP-Bex 3 que aparece es mucho mayor, lo que puede hacer suponer una posible interacción (Figura 4A).

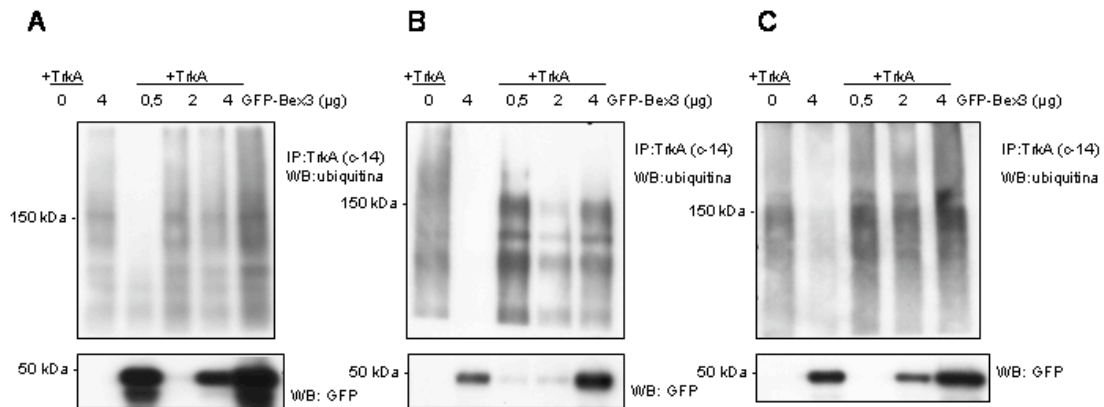


Figura 4: A. Se puede ver las inmunoprecipitaciones de las 5 muestras transfectadas, incubadas con anticuerpo contra ubiquitina, y contra GFP a las 24 horas de la transfección. B. Se observan las 5 muestras con los mismos anticuerpos a las 48 horas de la transfección. C. Se observan las muestras tras las 48 horas de la transfección pero con una adición previa de 6 horas de inhibidores del proteosoma y del lisosoma. Comparando los tres datos se observan diferencias en el nivel de ubiquitinación del receptor, así como la cantidad de GFP-Bex3 que ha precipitado junto con TrkA.

A las 48 horas tras la transfección, en las inmunoprecipitaciones se observa que a mayor cantidad de GFP-Bex3, el receptor trkA está menos ubiquitinado. Los resultados de la inmunoprecipitación con respecto a la precipitación de GFP-Bex3 junto con trkA son similares a los resultados obtenidos tras las 24 horas de la transfección, es decir, con presencia del receptor hay más cantidad de proteína GFP-Bex3 que precipita con respecto a la cantidad que precipita en ausencia del receptor (Figura 4B).

A las 48 horas de la transfección pero con la presencia de los inhibidores, en la inmunoprecipitación, se observa que la cantidad de receptor ubiquitinado es mayor en función de la mayor presencia de GFP-Bex3. Con respecto a la unión entre GFP-Bex3 y el receptor a la hora de precipitar conjuntamente parece que es mayor que en los experimentos anteriores (Figura 4C).

- **DRGs infectados con lentivirus sh-RNA Bex3 y posteriormente estimulados de manera aguda con NGF.**

Una vez observada la interacción entre el receptor TrkA y la proteína Bex3 y el aumento de ubiquitinación del receptor en presencia de dicha proteína, se hicieron experimentos sobre cultivos neuronales primarios de DRGs. La primera manera de intentar ver que provoca la proteína Bex3 sobre los receptores TrkA que se expresan en

los DRGs fue comparar dos cultivos, donde en uno se exprese de manera endógena la proteína y en otro intentar eliminar la expresión de la proteína con lentivirus.

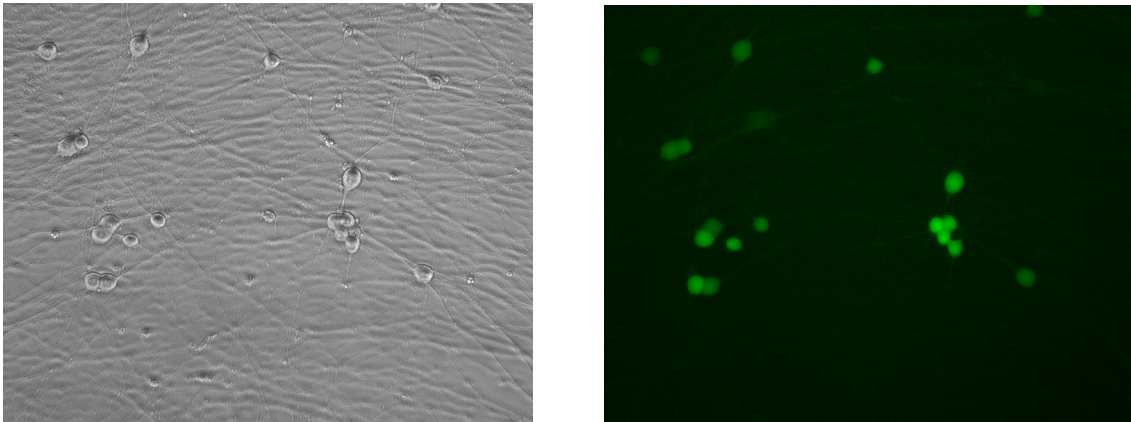


Figura 5: a la izquierda se ven DRGs en cultivo primario, a la derecha se ven los mismos DRGs que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) lo que prueba que están infectados con lentivirus sh-RNA Bex3.

Se infectaron los DRGs con lentivirus sh-RNA pLVTHM como control y con lentivirus sh-RNA Bex3. Los virus estuvieron presentes en el medio dónde crecían las células durante 8 días, con este tiempo prácticamente la totalidad de las células estaban infectadas, expresando la proteína GFP.

- **RT-PCR**

Se hizo la RT-PCR a partir de las muestras de los DRGs infectadas con lentivirus, para comprobar que en el grupo tratado con el sh-RNA contra el RNA mensajero que transcribe la proteína Bex3, dicho RNA mensajero desaparecía y la proteína no se expresa.

Observamos que efectivamente en el grupo control aparece una banda de 200 pb de corresponde a Bex3 y que en el grupo tratado con el RNA de interferencia contra Bex3 dicha banda no aparece. Lo cual confirmaría el hecho de que el RNA de interferencia estaría eliminando la expresión de la proteína y daría validez a los datos observados en los western (Figura 7).

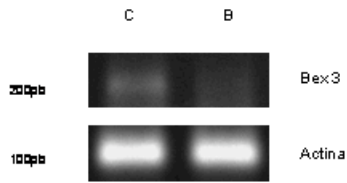


Figura 7: PCR. C muestras de DRGs tratados con lentivirus Sh-RNA pLVTHM como control. B muestras de DRGs tratados con lentivirus sh-RNA Bex 3.

Tras la estimulación con NGF a diferentes tiempos (5', 15', 30' y 1h), se observa que en los grupos en los que la proteína Bex 3 fue suprimida, la expresión de TrkA está disminuida con respecto a los grupos donde se expresa Bex 3 (grupo control). Para comprobar que era debido a la presencia/ausencia de la proteína, realizamos un control de carga, analizando la expresión de tubulina. La carga es similar en todos los grupos.

A pesar de la diferencia de expresión del receptor, también se ve que en el grupo sin la proteína Bex 3, el receptor está menos fosforilado. Lo mismo sucede con la activación de MAPK, donde parece que en el grupo sin Bex 3 se reduce la activación. (Figura 6).

También se observa que en los grupos tratados con sh-RNA Bex 3, el receptor TrkA tiene un mayor peso molecular, por una posible modificación. Este aumento se ve más claramente cuanto más largo ha sido el tratamiento con NGF.

También se observa que en los grupos tratados con sh-RNA Bex 3, el receptor TrkA tiene un mayor peso molecular, por una posible modificación. Este aumento se ve más claramente cuanto más largo ha sido el tratamiento con NGF.

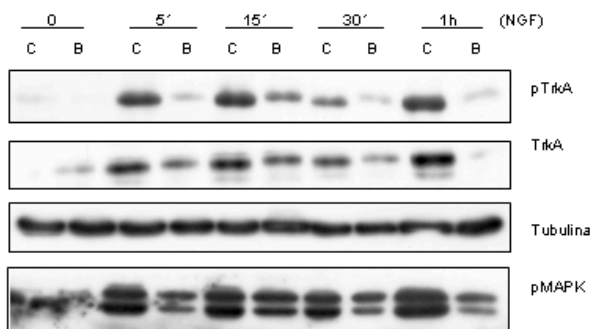


Figura 6: Se observa el grupo de neuronas tratadas con lentivirus sh-RNA pLVTHM (C) y el grupo de neuronas tratadas con lentivirus sh-RNA Bex 3 (B), con el tratamiento a distintos tiempos de NGF.

DISCUSIÓN

Los resultados tras la transfección a las 24 horas y a las 48 horas, a primera vista, parecerían contradictorios. A las 24 horas habría más receptor ubiquitinado en presencia de la proteína GFP-Bex3 y a las 48 horas habría menos receptor ubiquitinado. Pero obviamente tendría sentido, a medida que el receptor va siendo ubiquitinado, este debería comenzar a ser degradado, ya que la ubiquitina unida al receptor (a las 24 horas) desencadenaría el inicio del proceso de degradación.

En las inmunoprecipitaciones se observa que la proteína GFP-Bex 3 aparece incluso sin presencia de TrkA pero en presencia del receptor la cantidad de proteína GFP-Bex 3 que aparece es mucho mayor, lo que indicaría una posible interacción entre el receptor y la proteína Bex3, a pesar de la posible existencia de una interacción inespecífica entre GFP-Bex3 y C-14 agarosa que fue empleada para la precipitación del receptor.

Con la presencia de inhibidores del proteosoma y de los lisosomas, parece que la cantidad de receptor ubiquitinado ha aumentado con respecto a las mismas condiciones en ausencia de inhibidores. Este resultado sería coherente, ya que si se inhibe la vía degradativa del receptor, éste debería aparecer en mayor cantidad. Con respecto a la interacción entre el receptor y la proteína Bex3, cuando se inmunoprecipita el receptor, los datos de este tercer experimento sugieren que tal vez la proteína Bex3 interaccione más con el receptor cuando éste está ubiquitinado.

Los resultados obtenidos en las neuronas de DRGs parecen indicar que la proteína Bex3 tiene una importancia considerable en la activación del receptor TrkA, ya que la presencia de la proteína parece favorecer la activación del receptor TrkA a través de la fosforilación del receptor, ya que el receptor está más fosforilado en presencia que en ausencia de Bex 3. Y lo mismo sucede con la consiguiente activación de MAPK, sin Bex 3, está reducida. Se puede pensar que la proteína Bex 3 está favoreciendo que el receptor realice sus funciones, evitando de alguna manera su degradación. El aumento de peso molecular del receptor en ausencia de la proteína Bex hace pensar que el receptor está modificado de alguna manera, posiblemente con residuos de ubiquitina.

Actualmente se están haciendo experimentos con neuronas de DRGs infectadas con lentivirus que sobre expresan la proteína Bex 3 para observar su efecto. También se va a

comenzar a estudiar el papel que puede tener la proteína Bex 3 en el tráfico de los receptores.

El estudio del papel de la ubiquitinación del receptor TrkA, debe ser estudiado, ya que hasta el momento los datos bibliográficos son contradictorios. Makkerh et al. sugieren que la co-expresión del receptor p75 junto con TrkA regularía de manera negativa la ubiquitinación de TrkA, mientras que Geetha et al. sugieren que existe una regulación positiva. El proceso de ubiquitinación del receptor no está claro. La influencia que podría tener la proteína Bex 3 sobre la ubiquitinación del receptor TrkA, nos podría ayudar a comprender mejor el tráfico y la degradación del receptor, así como sus funciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, E., W. Zhou, S.E. Witta, and C.R. Freed. 2005. Characterization of the Bex gene family in humans, mice, and rats. *Gene*. 357:18-28.
- Arevalo, J.C., J. Waite, R. Rajagopal, M. Beyna, Z.Y. Chen, F.S. Lee, and M.V. Chao. 2006. Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron*. 50:549-59.
- Arevalo, J.C., and S.H. Wu. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*. 63:1523-37.
- Brown, A.L., and G.F. Kay. 1999. Bex1, a gene with increased expression in parthenogenetic embryos, is a member of a novel gene family on the mouse X chromosome. *Hum Mol Genet*. 8:611-9.
- Chao, M.V. 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev Neurosci*. 4:299-309.
- Geetha, T., and M.W. Wooten. 2008. TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic*. 9:1146-56.
- Kendall, S.E., M.C. Ryczko, M. Mehan, and J.M. Verdi. 2003. Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res*. 144:151-8.
- Lee, R., P. Kermani, K.K. Teng, and B.L. Hempstead. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 294:1945-8.
- Makkerh, J.P., C. Ceni, D.S. Auld, F. Vaillancourt, G. Dorval, and P.A. Barker. 2005. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep*. 6:936-41.
- Mukai, J., T. Hachiya, S. Shoji-Hoshino, M. Kimura, D. Nadano, P. Suvanto, T. Hanaoka, Y. Li, S. Irie, L. Greene, and T. Sato. 2000. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem*. 275:17566-17570.
- Mukai, J., S. Shoji, M.T. Kimura, S. Okubo, H. Sano, P. Suvanto, Y. Li, S. Irie, and T.A. Sato. 2002. Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 277:13973-82.
- Park, J., J. Lee, T. Sato, and J. Koh. 2000. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neuroscience*. 20:9096-9103.
- Reichardt, L.F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361:1545-64.

- Saxena, S., C.L. Howe, J.M. Cosgaya, P. Steiner, H. Hirling, J.R. Chan, J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci.* 28:571-87.
- Shooter, E.M. 2001. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci.* 24:601-29.
- Vilar, M., M. Murillo-Carretero, H. Mira, K. Magnusson, V. Besset, and C.F. Ibanez. 2006. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *Embo J.* 25:1219-30.
- Zampieri, N., and M.V. Chao. 2006. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem Soc Trans.* 34:607-11.