



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

En colaboración con



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC

ESTUDIO SOBRE LA OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS P75^{NTR} Y SU PAPEL EN LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR EL ESTRÉS OXIDATIVO

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Eduardo Puerta Baile

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

VALENCIA, JULIO 2018

SUPERVISADO POR:

José Gadea Vacas

PDI en el departamento de
Biotecnología de la Universidad
Politécnica de Valencia (UVP)

DIRIGIDO POR:

Marçal Vilar Cerbero

(IBV-CSIC) Investigador principal en la
unidad de bases moleculares de la
neurodegeneración en el Instituto de
Biomedicina de Valencia (IBV)

ESTUDIO SOBRE LA OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS p75^{NTR} Y SU PAPEL EN LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR EL ESTRÉS OXIDATIVO

RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la proteína transmembrana p75^{NTR}, la cual es un receptor de neurotrofinas, que, entre sus muchas funciones descritas se cree que ejerce un efecto protector en las células en condiciones de estrés oxidativo. Para ello se ha sometido células HEK a condiciones oxidantes mediante la incubación con H₂O₂ y se han revelado los lisados de dichos cultivos por western blot. Así se ha descubierto que p75^{NTR} forma dímeros en condiciones oxidantes, en los cuales parece estar implicada la cisteína C257 mediante la formación de un puente disulfuro. Para evaluar la posible implicación de otra cisteína, la C379, se ha purificado el fragmento intracelular de p75^{NTR} wt y con la cisteína mutada a alanina (C379A) y se ha evaluado su comportamiento en disolución, llegando a la conclusión de que, si bien no es esencial para la formación de dímeros, sí que puede tener una función estabilizándolos. Finalmente se evaluó la función protectora de p75^{NTR} mediante citometría de flujo, observándose que la proteína *per se* no genera ningún efecto protector, pero que en presencia de la neurotrofina NGF y del receptor tirosín quinasa A (TrkA), actúa potenciando el efecto pro-supervivencia de este último.

ABSTRACT

In the present work, a study has been carried out on the transmembrane protein p75^{NTR}, which is a neurotrophin receptor, which, among other functions described, is believed to exert a protective effect on cells under oxidative stress conditions. In order to evaluate that, HEK cells were exposed to oxidizing conditions by incubation with H₂O₂ and the lysates obtained were revealed by western blot. Thus it has been discovered that p75^{NTR} forms dimers under oxidizing conditions, in which C257 cysteine appears to be involved by the formation of a disulfide bound. To evaluate the possible implication of another cysteine, C379, the intracellular fragment of p75^{NTR} wt and with a mutation in this cysteine to alanine (C379A) has been purified and its behavior in solution has been evaluated, reaching the conclusion that, although it is not essential for the formation of the dimer, it can have a function stabilizing them. Finally, the protective function of p75^{NTR} was evaluated through flow cytometry, observing that the protein *per se* does not generate any protective effect, but that in the presence of the neurotrophin NGF and the receptor tyrosine kinase A (TrkA), it acts to enhance the pro-survival effect of TrkA.

PALABRAS CLAVE: Estrés oxidativo, p75^{NTR}, Receptor transmembrana, Agua oxigenada, Neurona, Neurotrofina

KEY WORDS: Oxidative stress, p75^{NTR}, Transmembrane receptor, Hydrogen peroxide, Neuron, Neurotrophin

AUTOR: Eduardo Puerta Baile

CONVOCATORIA: Valencia 2018

DIRECTOR: Marçal Vilar Cervero

TUTOR: José Gadea Vacas

AGRADECIMIENTOS

A Marçal Vilar por darme la oportunidad de participar en su proyecto de investigación y presentar este trabajo y por todo lo que me has enseñado sobre la ciencia.

Al resto de compañeros de laboratorio: Isa, Tomás, Laura, Anas (1 y 2), Raquel, Lucía, Sonia, Alicia... Con vosotros esto ha sido mucho más ameno y divertido. Siempre me habéis sacado un sonrisa en cualquier momento, ya sea contándome vuestras cosas del día a día, ofreciéndome comida, o llevándome de senderismo por las montañas. Y con mención especial a Malu que has sido mi maestra y amiga, llevándome cogidito de la mano en todo este proceso y teniendo infinita paciencia conmigo. No creo que hubiese sobrevivido sin tus bolis, calculadora... que me “prestabas”.

A José Gadea por su ayuda como tutor universitario solucionando todas las dudas que me surgieron.

A mis amigos por esos escasos pero intensos almuerzos entre horas, esas cervezas en el kebab Friends y en general por estar ahí.

A mi familia por preocuparse tanto por mi situación y mi bienestar, me quejo pero os quiero y me hace feliz que os preocupéis por mí.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	LAS NEUROTROFINAS	2
1.2.	EL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS P75 ^{NTR}	3
1.2.1.	Introducción	3
1.2.2.	Estructura	4
1.2.3.	Funciones	5
a.	Muerte y supervivencia celular	5
b.	Plasticidad sináptica	6
c.	Regulación del ciclo celular	7
d.	Actividad en células inmunes y de mantenimiento	7
e.	Funciones fuera del sistema nervioso	8
1.2.4.	Implicaciones en estrés oxidativo	8
2.	OBJETIVOS	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1.	PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	10
3.2.	MARCAJE DE LA ANEXINA V	13
3.3.	ENSAYO DE FPLC.....	13
3.4.	CULTIVOS CELULARES.....	13
3.5.	ENSAYO DE BIOTINILACIÓN.....	14
3.6.	WESTERN BLOT	14
3.7.	ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	15
3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
4.	RESULTADOS	17
4.1.	ESTUDIO DE LA DIMERIZACIÓN DE P75 ^{NTR} EN AMBIENTE OXIDATIVO	17
4.2.	ESTUDIO DEL PAPEL DE LA CISTEINA C379 EN LA DIMERIZACIÓN DEL ICD	21
4.3.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIADA POR P75 ^{NTR} EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO	22
5.	DISCUSIÓN.....	24
6.	CONCLUSIONES	27
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS NEUROTROFINAS

Las neurotrofinas, o factores neurotróficos son una familia de moléculas homodiméricas que se encargan del mantenimiento y supervivencia de las neuronas y ejercen un papel muy importante en el control de la plasticidad sináptica (Vilar & Mira, 2016). En mamíferos existen cuatro neurotrofinas: El factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4 (NT4) (Bothwell, 2014).

NGF fue la primera neurotrofina descubierta, en la década de los 50 por Rita Levi Montalcini y Stanley Cohen, valiéndoles el premio Nobel en Fisiología o Medicina (Cohen, Levi-Montalcini, & Hamburger, 1954; Levi-Montalcini, Meyer, & Hamburger, 1954). Esta neurotrofina se une principalmente a dos receptores de membrana en el cerebro, $p75^{NTR}$ y el receptor tirosín quinasa A (TrkA) (Bartkowska, Turlejski, & Djavadian, 2010). También es capaz de unirse con menor afinidad a un tercer receptor de membrana, el receptor sortilina, en su forma no procesada (proNGF) (Nykjaer et al., 2004) (**Figura 1**). Varios estudios indican que cumple diversas funciones dentro del sistema nervioso como estar implicado en la regulación de la hiperalgesia mediante la regulación positiva de los neurotransmisores peptídicos expresados por neuronas relacionadas con la detección de estímulos potencialmente dolorosos, como regular la arquitectura neuronal promoviendo un aumento en la arborización dendrítica y la longitud en neuronas simpáticas, o su implicación en la muerte neuronal mediada por ceramida al activar la hidrólisis de la esfingomielina mediante unión al $p75^{NTR}$ o la mediada por la unión de proNGF al complejo $p75^{NTR}$ -sortilina (Frade & Barde, 1998; Vilar & Mira, 2016).

BDNF se une principalmente al receptor tirosín quinasa B (TrkB) y $p75^{NTR}$ (Bartkowska et al., 2010), y en su forma no procesada (proBDNF) al receptor sortilina (Teng et al., 2005) (**Figura 1**). Entre las funciones que se cree que realiza se encuentran su efecto regulador en la migración de neuroblastos a lo largo de la corriente migratoria rostral (RMS), su efecto promotor en la neurogénesis hipocámpal y la biosíntesis de colesterol, y su implicación en la regulación de las fases tardías de la diferenciación neuronal, el crecimiento dendrítico y la ramificación y elongación axonal (Numakawa et al., 2010; Vilar & Mira, 2016).

NT3 se une principalmente al receptor tirosín quinasa C (TrkC), aunque también se puede unir a TrkA, TrkB y $p75^{NTR}$ (Bartkowska et al., 2010), y en su forma no procesada (proNT3) al receptor sortilina (Yano, Torkin, Martin, Chao, & Teng, 2009) (**Figura 1**). Diversos estudios indican que

participa en los procesos de aprendizaje y memoria estimulando diferenciación neuronal y supervivencia de neuronas recién nacidas, en la maduración de las neuronas propioceptivas y nociceptivas, o el crecimiento local de axones simpáticos (Lin et al., 2018; Manti, Brown, Perez, & Piedimonte, 2017; Vilar & Mira, 2016).

NT4, al igual que BDNF se une a TrkB y $p75^{NTR}$, y en su forma no procesada (proNT4) al receptor

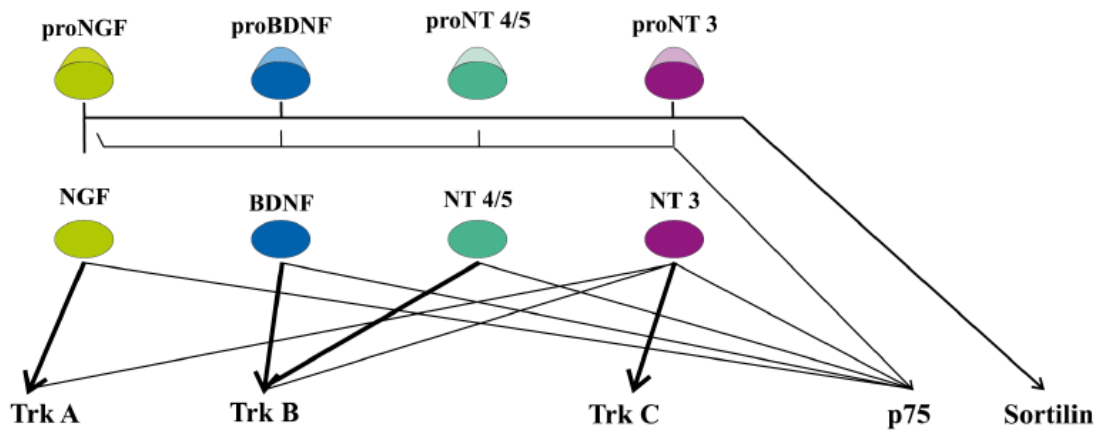


Figura 1. Representación esquemática de la capacidad de interacciones entre las neurotrofinas y proneurotrofinas y sus ligandos específicos. La afinidad entre los componentes de ambos grupos está representada por flechas gruesas (alta afinidad) y flechas delgadas (baja afinidad). Modificada de (Bartkowska et al., 2010)

sortilina (Bartkowska et al., 2010) (**Figura 1**). Entre sus funciones estudiadas se encuentra la promoción del crecimiento y supervivencia de las neuronas sensoriales, y la supervivencia de motoneuronas, y neuronas colinérgicas y dopaminérgicas (Manti et al., 2017).

1.2. EL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS $p75^{NTR}$

1.2.1. INTRODUCCIÓN

El receptor de neurotrofinas $p75^{NTR}$ fue clonado por primera vez en 1986 (Chao et al., 1986; Radeke, Misko, Hsu, Herzenberg, & Shooter, 1987). Es el miembro fundador de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Sin embargo, a pesar de las similitudes estructurales entre $p75^{NTR}$ y el resto de miembros de la familia, se diferencia en múltiples aspectos de ellos como por ejemplo su capacidad para actuar como correceptor de los receptores tirosín quinasa (TRK) (Roux & Barker, 2002), o el hecho de que sus ligandos son moléculas homodiméricas solubles en vez de moléculas triméricas sintetizadas inicialmente como proteínas de membrana que, o bien son procesadas como proteínas solubles (como TNF), o bien permanecen ancladas a la membrana (como TRAIL) (Gruss, 1996).

Este receptor se encuentra presente en el sistema nervioso en desarrollo con expresión en neuronas periféricas, dentro de la médula espinal y en todo el cerebro (Patrik Ernfors, Lee, Kucera, & Jaenisch, 1994). Se expresa en muchos tipos de células neuronales como en células madre neurales, astrocitos, precursores de oligodendrocitos, células de Schwann y células de la glia de la glándula olfativa (Cragnolini & Friedman, 2008). Varios tejidos no neurales también expresan el receptor durante alguna etapa del desarrollo, como el riñón y el músculo (P Ernfors et al., 1991; Wheeler & Bothwell, 1992). Después de las etapas de desarrollo solo algunas poblaciones de neuronas retienen la expresión del receptor como las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal o las neuronas sensoriales y motoneuronas de la espina dorsal (Patrik Ernfors, Henschen, Olson, & Persson, 1989; Friedman, Olson, & Persson, 1991).

1.2.2. ESTRUCTURA

P75 debe su nombre a su peso molecular aparente, 75 kDa en humanos, determinado principalmente por las modificaciones postraduccionales del tipo N- y O-glicosilación que sufre en el dominio extracelular (Roux & Barker, 2002). Tras la eliminación de los 28 aminoácidos del péptido señal, se convierte en una proteína de membrana de tipo I de 399 aminoácidos, la cual es capaz de formar homodímeros mediante una cisteína (Cis₂₅₇) ubicada en el segmento transmembrana de la proteína (Vilar et al., 2009).

El dominio extracelular (ECD) contiene cuatro dominios ricos en cisteínas (CRDs) colocados en tándem (**Figura 2**) que contienen 3 puentes disulfuro intracatenarios. Diversos modelos y estudios apuntan a que el CRD3 es el principal responsable de su unión a neurotrofinas (Chapman & Kuntz, 1995; Shamovsky, Weaver, Ross, & Riopelle, 2008). El ECD presenta una sección próxima a la membrana denominada "stalk domain" susceptible de ser O-glicosilada, modificación que condiciona su sublocalización en la membrana en células polarizadas (Yeaman et al., 1997).

Además del ECD, también el dominio intracelular (ICD) también presenta modificaciones postraduccionales como la palmitoilación de la cisteína 279 (Cis₂₇₉) o la fosforilación de sus residuos treonina y serina (Barker, Barbee, Misko, & Shooter, 1994). Todavía no se sabe con exactitud la función de estas modificaciones, pero algunos estudios sugieren que se encuentran relacionadas con la regulación del procesamiento proteolítico de la proteína (Underwood, Reid, May, Bartlett, & Coulson, 2008). Este dominio no posee actividad enzimática intrínseca y su señalización se debe a su unión con otras moléculas como TRAF6 (Khursigara, Orlinick, & Chao, 1999) o Rho-GDI (Yamashita & Tohyama, 2003) al dominio de muerte (DD).

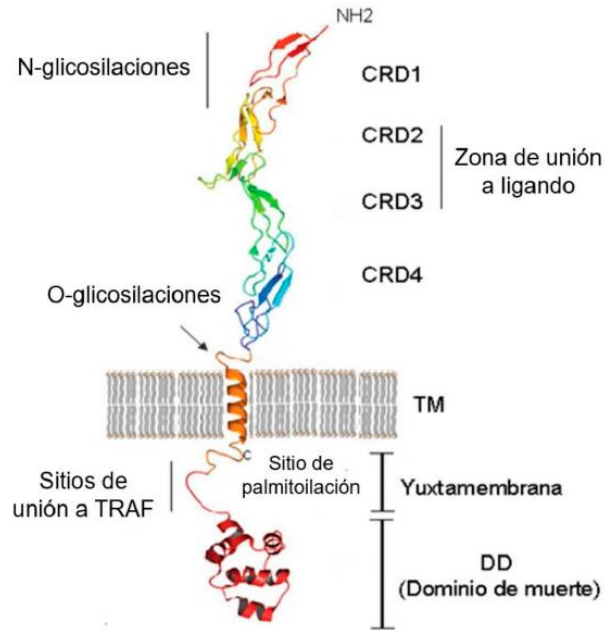


Figura 2. Estructura de la proteína p75^{NTR}. Extraída de (Carpio, 2016)

1.2.3. FUNCIONES

a. Muerte y supervivencia celular

Se ha visto que p75^{NTR} participa en la iniciación de la muerte temprana de neuronas en desarrollo (Huang & Reichardt, 2001), neuronas de la retina (Roberti, Mantelli, Macchi, Massaro-Giordano, & Centofanti, 2014), neuronas simpáticas (Kenchappa et al., 2010) y oligodendrocitos (Beattie et al., 2002). También se ha comprobado que, en colaboración con el receptor sortilina puede mediar la muerte selectiva de las neuronas con conexiones débiles o dañadas después de lesiones en el sistema nervioso o durante el desarrollo, proceso que se llama estrategia neurotrófica (R. B. Meeker & Williams, 2015).

Sin embargo, a pesar de la cantidad de estudios que demuestran su participación en los procesos de apoptosis y muerte neuronal, otros muchos revelan su papel en la protección y recuperación del sistema nervioso. Algunas de las primeras indicaciones de que el receptor puede promover la supervivencia neuronal provinieron del análisis de ratones “Knock out” de p75^{NTR}, que revelaron una pérdida significativa de la inervación sensorial de las extremidades, y una pérdida del 50-75% de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Lewin & Carter, 2014). Posteriormente, y tras muchas más investigaciones se ha comprobado que gran parte de estas funciones promotoras de la supervivencia dependen en gran medida de su interacción con los

receptores Trk. Es capaz de unirse a TrkA formando un complejo heterodimérico que es capaz de unirse a la neurotrofina NGF con alta afinidad, mucho mayor que cualquiera de los receptores de forma separada, aumentando de esta manera las señales promotoras de supervivencia y proliferación de TrkA (Lewin & Carter, 2014). Además también puede regular la selectividad de TrkA para con otras neurotrofinas, como NT-3, cuya unión a Trka es necesaria para promover el crecimiento axonal pero no la supervivencia. Cuando p75^{NTR} se une a TrkA hace que su selectividad para con NGF aumente con respecto a NT-3, promoviendo supervivencia (Lewin & Carter, 2014). Algo parecido ocurre con TrkB que incrementa su selectividad hacia BDNF con respecto a NT-3 y NT-4, lo que promueve señalización promotora de la supervivencia y proliferación (Ferrer, Ballabriga, & Martí, 1998).

Además también puede promover la supervivencia de forma independiente de los receptores Trk. Aunque la mayoría de los mecanismos no están del todo esclarecidos aún, se ha descubierto que una de las rutas de señalización relacionadas involucra al factor nuclear kappa B (NFκB) (Carter et al., 1996), el cual aunque también actúa en el sistema nervioso se caracteriza mejor por su papel en el sistema inmunitario, donde actúa regulando de forma positiva determinadas citocinas y genes pro-supervivencia (Lewin & Carter, 2014). También se ha demostrado que p75^{NTR} controla la estabilidad HIF1a, un factor de transcripción inducido por estrés oxidativo que controla la expresión de una amplia variedad de genes implicados en la protección frente especies de oxígeno reactivas y además promueve la supervivencia celular (Hu, Wang, Chodosh, Keith, & Simon, 2003; Le Moan, Houslay, Christian, Houslay, & Akassoglou, 2011).

b. Plasticidad sináptica

La regulación de la plasticidad neuronal también viene regulada por p75^{NTR}. Se ha visto que juega un papel importante en la disminución de las conexiones sinápticas, proceso conocido con el nombre de “long-term depression” (LTD). Aunque no se comprenden muy bien las causas de este hecho, la expresión de algunos receptores de glutamato en animales “Knock out” para p75^{NTR} ha resultado ser deficiente en comparación con los animales control y, dado que la señalización glutaminérgica es esencial para el desarrollo de la LTD, se podría considerar que éste hecho es la causa que subyace a la deficiencia en la LTD en estos animales. En particular se ha encontrado reducida la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA y las subunidades GluR2 y GluR3 del receptor AMPA (Rosch, Schweigreiter, Bonhoeffer, Barde, & Korte, 2005; Woo et al., 2005).

Se ha sugerido que el ligando responsable de la acción de p75^{NTR} promotora de la LTD es proBDNF. Dado que esta neurotrofina tiene una acción promotora de la llamada “long term

potentiation" (LTP), proceso contrario a la LTD que implica un aumento del número de las conexiones sinápticas, cuando es cortada por la proteasa plasmina, dando lugar a BDNF (Pang et al., 2004); se ha hipotetizado que, en el caso de no ser cortada, podría unirse a p75^{NTR} y promover la LTD (Je et al., 2012).

También se ha propuesto que p75^{NTR} puede regular la plasticidad sináptica mediante la modulación de la morfología dendrítica, habiéndose detectado un aumento en la densidad y complejidad de las espinas dendríticas (Zagrebelsky, 2005), lugar donde se ha comprobado la expresión de p75^{NTR} (Woo et al., 2005). Estos resultados sugieren que el receptor puede ser importante para la regulación de estas estructuras postsinápticas, reduciendo el tamaño y la cantidad de éstas, lo cual está asociado a un aumento en la LTD (Zhou, Homma, & Poo, 2004).

c. Regulación del ciclo celular

Se han descrito distintas proteínas que interaccionan con el ICD de p75^{NTR} y que participan en el ciclo celular. Una de ellas es SC-1, una proteína con un dominio "dedo de zinc", la cual se ha visto que es translocada del citoplasma al núcleo cuando NGF se une a p75^{NTR} en células COS (Chittka & Chao, 1999). En estas células se ha comprobado que SC-1 tiene un efecto bloqueante sobre la proliferación celular mediante la represión de la transcripción de la ciclina E (A. Chittka et al., 2004).

Otras proteínas del ciclo celular que se ha encontrado que interactúan con p75^{NTR} son NRIF1, NRIF2 y NRAGE (Benzel, Barde, & Casademunt, 2001; Salehi et al., 2000). Se ha comprobado que estas proteínas causan apoptosis en neuronas, precursores neurales y células de Schwann, y dado que ambas proteínas promueven la regulación positiva de la proteína supresora tumoral p53, se ha especulado con la posibilidad de que debido a la activación de p75^{NTR}, estas proteínas promuevan la expresión de genes del ciclo celular que a su vez promuevan un aumento de los niveles de p53, provocando la muerte de la célula (Lewin & Carter, 2014).

También se ha visto, más recientemente que Bex1 interacciona con p75^{NTR}. Esta proteína se encuentra implicada en la progresión del ciclo celular, impidiendo que la célula salga de él y se diferencie. Su interacción con p75^{NTR} sugiere que ésta proteína podría actuar regulando la actividad de p75^{NTR} en función de la fase del ciclo celular en la cual la célula esté (Vilar et al., 2006).

d. Actividad en células inmunes y de mantenimiento

Bajo condiciones patológicas se ha observado un incremento de la expresión de p75^{NTR} en macrófagos y microglia (R. Meeker & Williams, 2014). Se ha comprobado que tiene un efecto

supresor sobre la actividad de estas células que está mediado por estrógenos, aunque no se conocen con detalle los mecanismos por los que esto tiene lugar (Nordell, Lewis, Bake, & Sohrabji, 2005). Además se ha visto su expresión en astrocitos (Hutton, DeVellis, & Perez-Polo, 1992). Aunque no se tiene muy claro su papel en estas células, se piensa que actúa regulando su proliferación en lesiones, inhibiéndola mediante el bloqueo del ciclo celular, atenuando de este modo la cicatrización glial (Cragolini & Friedman, 2008).

e. Funciones fuera del sistema nervioso

Además de todas las funciones y papeles que desempeñan las neurotrofinas y sus receptores en el sistema nervioso, también se ha observado su expresión en otras áreas y tejidos fuera de éste. Así pues podemos encontrar a p75^{NTR} llevando a cabo teniendo diferentes funciones como la participación en el desarrollo del sistema circulatorio y (Caporali et al., 2008; Von Schack et al., 2001), en la morfogénesis del riñón (Huber, Hempstead, & Donovan, 1996) o el ciclo de crecimiento de los folículos capilares (Botchkarev, Botchkareva, Peters, & Paus, 2004).

A nivel patológico, p75^{NTR} interviene en la progresión tumoral de los melanomas, actuando como marcador de células madre tumorales (Boiko et al., 2010). También se ha visto su presencia en células mioepiteliales en lesiones benignas y carcinomas *in situ* mientras que su expresión en carcinomas invasivos se encontraba prácticamente ausente, pudiendo ser usado para descartar patologías invasivas o evaluar lesiones esclerosantes complicadas (Popnikolov, Cavone, Schultz, & Garcia, 2005).

1.2.4. IMPLICACIONES EN ESTRÉS OXIDATIVO

Además de las funciones previamente mencionadas anteriormente, se ha observado que p75^{NTR} juega en células un papel protector frente a la muerte mediada por estrés oxidativo, aumentando la viabilidad de éstas mediante un proceso en el que se cree que intervienen tanto el propio receptor como TrkA y la neurotrofina NGF (Wang, Dow, Riopelle, & Ross, 2001). No se conoce con exactitud el mecanismo por el que esta función es llevada a cabo, pero se sospecha que podría estar relacionada con la promoción de la fosforilación de la proteína AKT, una proteína quinasa que se ha visto previamente que interviene en vías de señalización que ejercen un efecto protector en condiciones de estrés oxidativo en neuronas centrales y periféricas (Mi, Rogers, Mirnics, & Schor, 2009).

Para que p75^{NTR} cumpla su función antioxidante es necesario que pase a través de todo un proceso que incluye dimerización, corte proteolítico y liberación del fragmento intracelular (ICD) al citosol, y posterior fosforilación del ICD para su interacción con proteínas del citosol (Tyurina

et al., 2005; Zhang, Mi, & Schor, 2009). Luego todo parece indicar que el ICD tiene la clave del efecto antioxidante de la proteína. El ICD se obtiene mediante el corte de dos proteínas sobre el receptor. Primeramente, la α -secretasa, una metaloproteína que corta $p75^{NTR}$, liberando el dominio extracelular (ECD) y dejando anclado a la membrana el resto de la proteína, lo que se denomina como el fragmento C-terminal (CTF). Este fragmento será posteriormente cortado por la γ -secretasa, una proteasa aspártica embebida en la membrana, lo que provocará la liberación al citosol del dominio intracelular (ICD) (**Figura 3**). Se ha visto que, de hecho mutaciones en la subunidad presenilina-1 de la γ -secretasa que tienen lugar en el Alzheimer familiar, impiden el correcto corte del CTF y la liberación del ICD, pudiendo así explicar la pérdida de neuronas en pacientes de Alzheimer (Zhang et al., 2009). Con todo, a partir de ahí no se conoce con detalle la ruta y mecanismo de actuación que sigue el ICD para generar ese efecto protector frente al estrés oxidativo.

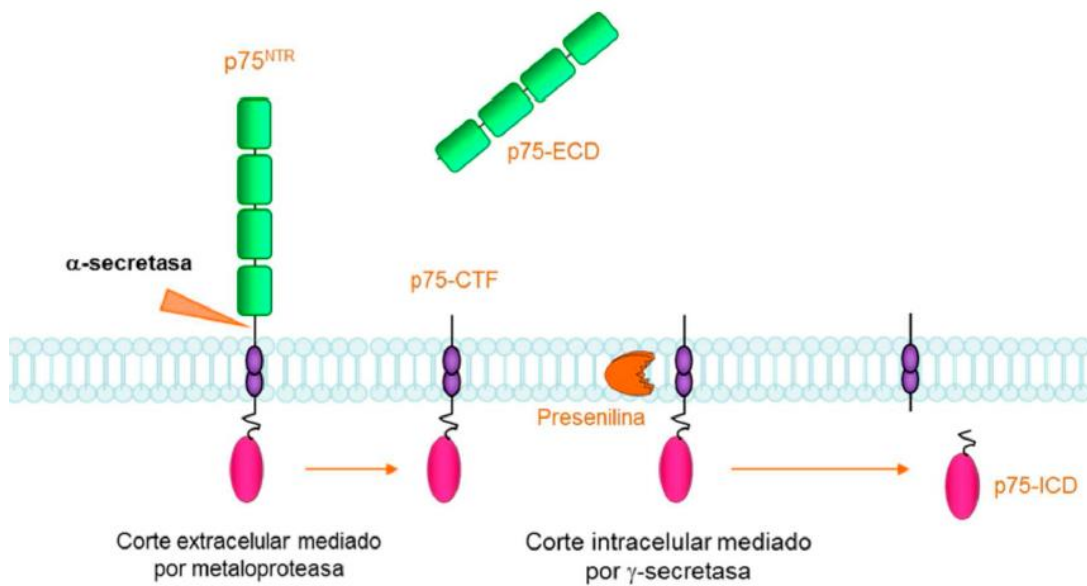


Figura 3. Esquema del corte proteolítico de $p75^{NTR}$ en dos pasos. El primero viene mediado por la α -secretasa que libera el fragmento ECD al medio extracelular, generando el fragmento CTF que permanece anclado a la membrana y que será posteriormente cortado por la γ -secretasa, liberando el ICD al citosol. Imagen extraída de (Carpio, 2016).

2. OBJETIVOS

- Estudiar estructuralmente la reacción de p75^{NTR} en condiciones de estrés oxidativo.
- Estudiar diferencialmente el papel de p75^{NTR} y mutantes en la viabilidad celular.
- Proponer un mecanismo de acción plausible de p75^{NTR} para explicar su efecto protector en condiciones de estrés oxidativo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

Para el proceso de purificación de las proteínas p75^{NTR} ICD wt, p75^{NTR} ICD C379S se utilizó como plásmido pHis8 con resistencia a kanamicina al cual se le había previamente insertado el gen de la proteína, y para la Anexina V se utilizó el plásmido proxHTb con resistencia a ampicilina. Ambos plásmidos poseen una cola de histidinas que facilitará su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

Con estos plásmidos se transformaron *E. coli* BL21 mediante choque térmico y se seleccionaron las bacterias transformadas haciéndolas crecer en una placa de LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml concentración final) o kanamicina (50 µg/ml concentración final). Con las bacterias seleccionadas se preparó un preinóculo haciéndolas crecer a 37 °C con agitación en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/ml concentración final) o kanamicina (50 µg/ml concentración final) durante toda la noche. Después se preparó el inóculo en un medio LB líquido, al cual se le añadieron el preinóculo y los antibióticos y posteriormente, tras comprobar mediante medición de la absorbancia que la densidad óptica del inóculo era de 0,8 (mientras se incubaba en agitación a 37 °C), se adicionó IPTG (1 mM concentración final) con el objetivo de inducir la síntesis de la proteína y se extrajeron muestras a diferentes tiempos, las cuales se sometieron a electroforesis en geles al 15% (p75^{NTR} ICD wt, p75^{NTR} ICD C379S) o al 12% (Anexina V) de acrilamida, se tiñeron durante 30 min en solución de tinción ((Azul Coomassie 0,2%, Metanol 45%, Ac. Acético 10%) y se destiñeron en solución de destinción (Metanol 5%, Ac. Acético 7%), observándose un aumento progresivo del tamaño de las bandas correspondientes a la proteína purificada (22 kD aproximadamente en el caso de p75^{NTR} wt y p75^{NTR} C379S, y 35 kD aproximadamente en el caso de la anexina V) conforme avanza el tiempo hasta un pico de expresión máxima de 3 horas y un posterior decaimiento de la cantidad de proteína fruto de la degradación proteica si se dejaba continuar la inducción durante toda la noche (**Figura 4**). De esta manera se establecieron las 3 horas

como el tiempo elegido para la inducción. Luego de la inducción se centrifugó 15 min a 6500 g para sedimentar las bacterias y se resuspendieron en buffer TNE (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM a pH 7,4), adicionado con cocktail de inhibidores de proteasas 5x y DTT (10 mM concentración final). Se sonicaron durante 20 min a intervalos de 1 segundo y se centrifugaron a 20000 g 30 min. Posteriormente, el sobrenadante se mezcló con *binding* buffer (50 mM fosfato, 100 mM NaCl a pH 7,5) mezclado con un volumen adecuado de resina Ni²⁺-agarosa (Agarose bead technologies) previamente equilibrada en columna mediante la adición de secuencial de un volumen de agua, un volumen de NiCl₂ 0,1 M, dos volúmenes de agua y un volumen de *binding* buffer; y se incubaron durante 2 h en agitación a 4 °C; de esta manera la cola de histidinas se unió a la resina. Después se hizo pasar por una columna cromatográfica Econo-Column™ 1x10 cm (Bio-Rad), seguido de varios volúmenes de *binding* buffer para eliminar aquellos compuestos que no se hayan unido a la columna, hasta que la absorbancia medida a 280 nm sea inferior a 0,03. Luego se hacen pasar varios volúmenes de *stringent wash* buffer (50 mM fosfato, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol a pH 7,5) para eliminar las sustancias que se hayan unido a la resina con poca afinidad, hasta que la absorbancia medida a 280 nm sea inferior a 0,03 Finalmente se eluye la muestra en alícuotas mediante la adición de buffer de elución (50 mM fosfato, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 mM DTT a pH 7,5) que contiene imidazol, el cual tiene más afinidad por el níquel de la resina que la cola de histidinas e irá desplazando a la proteína. El eluido se recogió en alícuotas, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se reservó un pequeño volumen de las alícuotas de la elución, las cuales se sometieron a electroforesis en geles al 15% (p75^{NTR} ICD wt, p75^{NTR} ICD C379S) o al 12% (Anexina V) de acrilamida junto con otras muestras obtenidas a lo largo de los distintos pasos del proceso de purificación (sonicación, centrifugación, paso por la columna, lavado, *stringent wash*), se tiñeron durante 30 min en solución de tinción y se destiñeron en solución de destinción. **(Figura 4)**

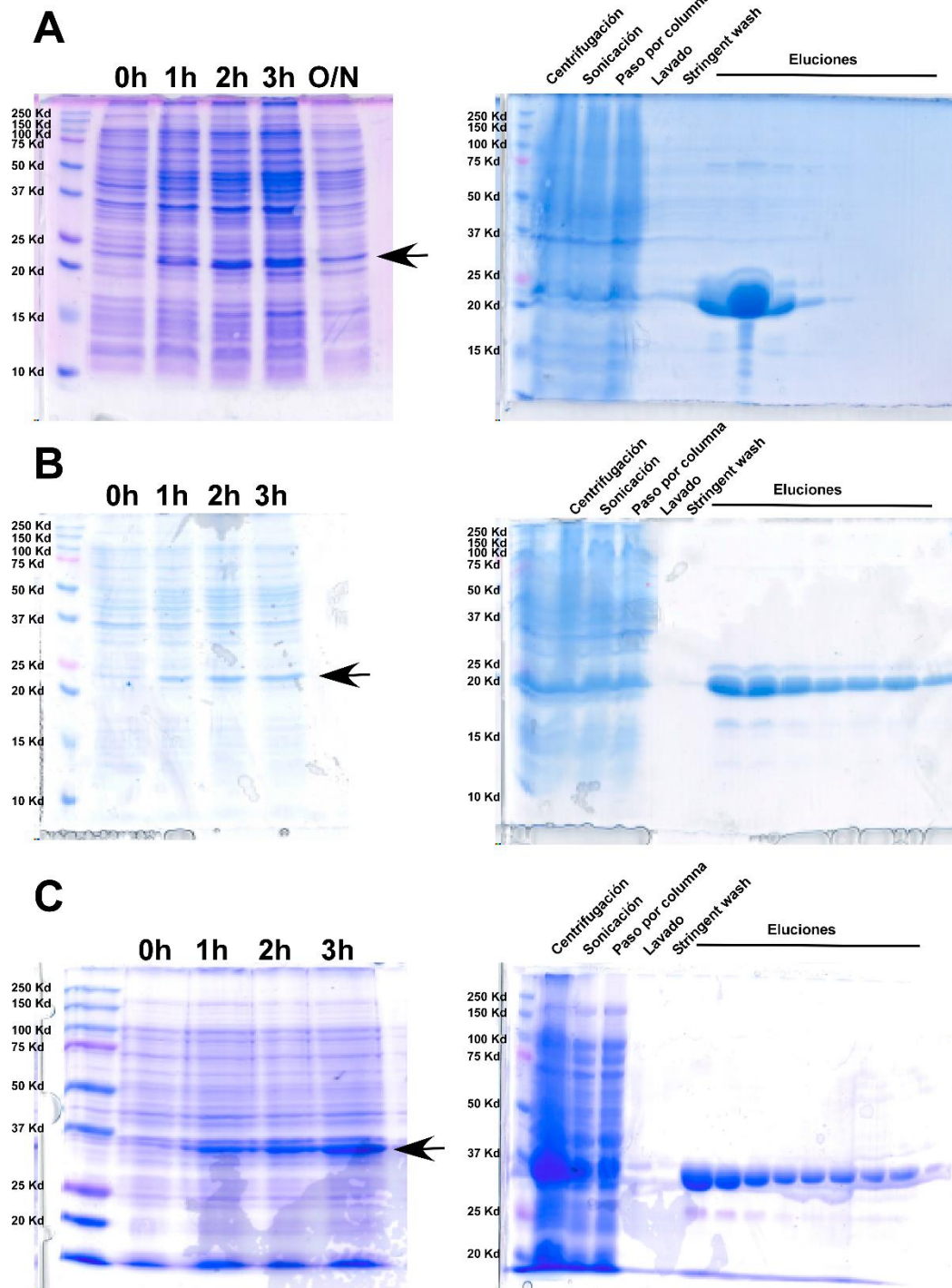


Figura 4. Comprobación de la inducción de la expresión proteica (izquierda) a tiempos 0h, 1h, 2h, 3h y/o toda la noche (O/N); y seguimiento de la purificación en los diferentes pasos de la misma (derecha) de **(A)** p75^{NTR} ICD wt, **(B)** p75^{NTR} ICD C379S y **(C)** Anexina V. Las bandas correspondientes a cada proteína se encuentran marcadas con una flecha. Todas las muestras se han corrido en geles al 15% **(A)** y **(B)** o al 12% **(C)** de acrilamida por electroforesis, se han teñido 30 min en solución de tinción y se han desteñido en solución de destinción.

3.2. MARCAJE DE LA ANEXINA V

La anexina es una proteína particularmente útil para experimentos de citometría, ya que se une a la fosfatidil serina cuando esta pasa de estar en la cara citosólica de la membrana celular a estar en la cara externa, proceso que se da en los primeros estadios de la apoptosis. Por lo tanto constituye un buen marcador para detectar la apoptosis temprana (Fadok, Bratton, Frasch, Warner, & Henson, 1998). Sin embargo no emite fluorescencia *per se*, con lo cual para ser detectada por el citómetro ha de ser marcada con una sustancia que sí lo haga. En este trabajo se ha usado el isotiocianato de fluoresceína (FITC) que tiene un pico de excitación máxima a 518 nm en la región verde-azulada del espectro.

Para marcar la anexina primero se dializó la proteína purificada para eliminar el imidazol durante toda la noche en agitación suave a 4 °C frente al buffer de diálisis (100 mM carbonato sódico a pH 9). Posteriormente, en tubos protegidos de la luz se añadió el FITC (1 mg/ml concentración final) en incrementos de 5 µl, agitando después de cada incremento. Luego se dejó 4 h en agitación a 4 °C y finalmente se dializó la anexina marcada para eliminar el exceso de FITC durante toda la noche en agitación suave a 4 °C frente a PBS a pH 7,2.

3.3. ENSAYO DE FPLC

La proteína purificada se pasó por un filtro de 0,22 Å a 13400 g 2 min para eliminar los agregados proteicos. Luego se hizo pasar por una columna cromatográfica de exclusión Superose 6 Increase 10/300 GL (Sigma Aldrich), conectada a un sistema cromatográfico FPLC AKTA (GE Healthcare) en presencia de buffer fosfato (50 mM fosfato, 200 mM NaCl a pH 7,5) a flujo constante 0,5 ml/min, recogiendo en alícuotas los diferentes picos del cromatograma. Posteriormente se pasaron por un gel de electroforesis de acrilamida al 15% con o sin previa incubación en hielo durante 1 h en agua oxigenada (10 mM concentración final), con posterior tinción en solución de tinción (indicada antes) 30 min y desteñida en solución de destinción.

3.4. CULTIVOS CELULARES

Para los cultivos celulares se utilizaron células HEK 293, una línea celular de células embrionaria de riñón humano, ampliamente usada en biología debido a su fácil manejo y alto rendimiento en transfección. Estas células se almacenaron en nitrógeno líquido en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO), un crioprotector. Se descongelaron en placas Petri con medio de cultivo DMEM (Corning) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), un 1% de cocktail de antibióticos penicilina-estreptomina y un 1% de L-glutamina atemperado (DMEM completo) a 37 °C y al día siguiente se les cambió el medio de cultivo para eliminar el DMSO, ya

que puede tener efectos tóxicos. Para su transfección se cultivaron a 37 °C en medio DMEM completo y se utilizó el reactivo polietilenimina (PEI) (1 µg/ml concentración final). 2 h antes de la transfección se cambió el medio a las placas y antes de transfectar se preparó la mezcla de transfección consistente en DMEM sin suero, PEI y 1 µg del plásmido a transfectar. La mezcla se dejó 15 minutos incubando a temperatura ambiente antes de añadirla a la placa de células. Para los distintos experimentos las células se trataron con H₂O₂ a diferentes concentraciones (0,001, 0,01, 0,1, 1 o 10 mM concentración final) y diferentes tiempos (5 min, 2, 3, 4 y 6 h) dependiendo del experimento; y/o también se trataron con NGF 100 µM concentración final.

3.5. ENSAYO DE BIOTINILACIÓN

Aquí se aprovechó la capacidad e la biotina para unirse de forma inespecífica a las proteínas, y a la incapacidad que tiene para pasar por sí misma la membrana plasmática, para dejar marcadas todas las proteínas de la cara extracelular de la membrana. Posteriormente y gracias a la unión de alta afinidad entre la biotina y la estreptavidina, se pueden aislar dichas proteínas del resto.

Para el ensayo de biotinilación se lavaron 3 veces las células con PBS frío, se añadió 100 µl de solución de EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher) 20 mM en PBS, por cada ml de células y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Para quitar el exceso de biotina se lavó tres veces con solución de glicina 100 mM en PBS. Posteriormente se lisaron las células, se centrifugaron a 16000 g 10 min y se recogió el sobrenadante. Entonces se añadió la resina magnética Streptavidin Mag Sepharose™ (GE Healthcare Life Sciences) disuelta en buffer TNE, la cual tiene estreptavidina que se une a la biotina; y se dejó incubando en agitación a 4 °C durante 2 h. Luego se lavó dos veces con buffer TNE en presencia de un imán, de manera que la resina magnética se quedó unida a él y todas las moléculas biotiniladas, se quedaron unidas a la estreptavidina de la resina. Finalmente se resuspendieron en buffer de carga de electroforesis 2x no reductor, se hirvieron a 95 °C 5 min para separar las proteínas de la resina magnética.

3.6. WESTERN BLOT

Todas las muestras celulares fueron tratadas con tampón de lisis en presencia de yodoacetamida 10 mM y centrifugadas 16000 g 10 min, conservándose el sobrenadante, el cual se mezclaría con tampón de carga para electroforesis 4x y se desnaturalizaría a 60 °C 5 min. Luego se cargaron las muestras en geles al 8 o al 15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protram™ 0,2 µm NC (GE Healthcare Life Science) durante 2 h a temperatura ambiente y se bloquearon con leche al 5% en TTBS para el resto durante 45 min. Tras 2 lavados con TTBS de 10 min se incubó toda la noche con el anticuerpo primario rabbit anti-p75 1:10000 (Promega). Posteriormente se lavó 2 veces con TTBS otra vez y se incubó 1 h con el anticuerpo secundario

goat anti rabbit IRDye™ 800CW 1:10000 (Li-Cor Biosciences) y finalmente se lavó 2 veces con TTBS y se obtuvo la señal mediante un detector Odyssey™. En los casos en que se realizó una cuantificación densitométrica de las bandas se utilizó el programa informático Image-Quant (GE Healthcare Life Sciences).

3.7. ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar el estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo se marcaron las células mediante dos fluoróforos distintos para discernir entre dos tipos de muerte. El primero es la anteriormente mencionada anexina V que actúa como marcador de la apoptosis temprana y cuya emisión por parte del FITC con la que está marcada se encuentra en la franja verde-azulada del espectro, mientras que el segundo es el yoduro de propidio que tiene un pico de emisión máxima a 617 nm en la región del rojo en el espectro. El yoduro de propidio (IP) es un agente intercalante que se une al ADN siendo indicador de necrosis, o bien de apoptosis en un estado muy avanzado, ya que necesita entrar en la célula para teñirla y en los primeros estadios de la apoptosis la membrana celular permanece intacta.

Para preparar las muestras para realizar el ensayo de citometría primero se retiró el medio de cultivo, reservándolo en un tubo aparte. Luego se levantaron las células de la placa con tripsina, se mezclaron con el medio y se centrifugaron a 300 g durante 4 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en PBS frío y se volvieron a centrifugar a 300 g 4 min. Se volvió a retirar el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en buffer de unión de anexina V (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ a pH 7,4). Se centrifugó una última vez a 300 g 4 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de células en buffer de unión de anexina V. Luego se envolvieron los tubos en papel de aluminio y se les añadió 1 µl de la anexina purificada y 1 µl de yoduro de propidio, seguido de una posterior incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min. Finalmente con las muestras ya preparadas se procedió a realizar el análisis citométrico en un citómetro BD FACSCanto™ (BD Biosciences), excitando 488 nm y detectando la fluorescencia en los rangos de 564-606 nm (yoduro de propidio) y 515-545 (FITC).

Para la puesta a punto del sistema se utilizaron células HEK 293 sin tratar y, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente se marcaron las células con IP y anexina V (**Figura 5 D**), anexina V solo (**Figura 5 C**), IP solo (**Figura 5 B**), o no se marcaron (**Figura 5 A**). Se pasaron por el citómetro, ajustando los láseres de manera que se consiguiera una óptima división poblacional en 4 cuadrantes: Q1, Q2, Q3 y Q4. En Q1 aparecerán las células que solo darán positivo para IP,

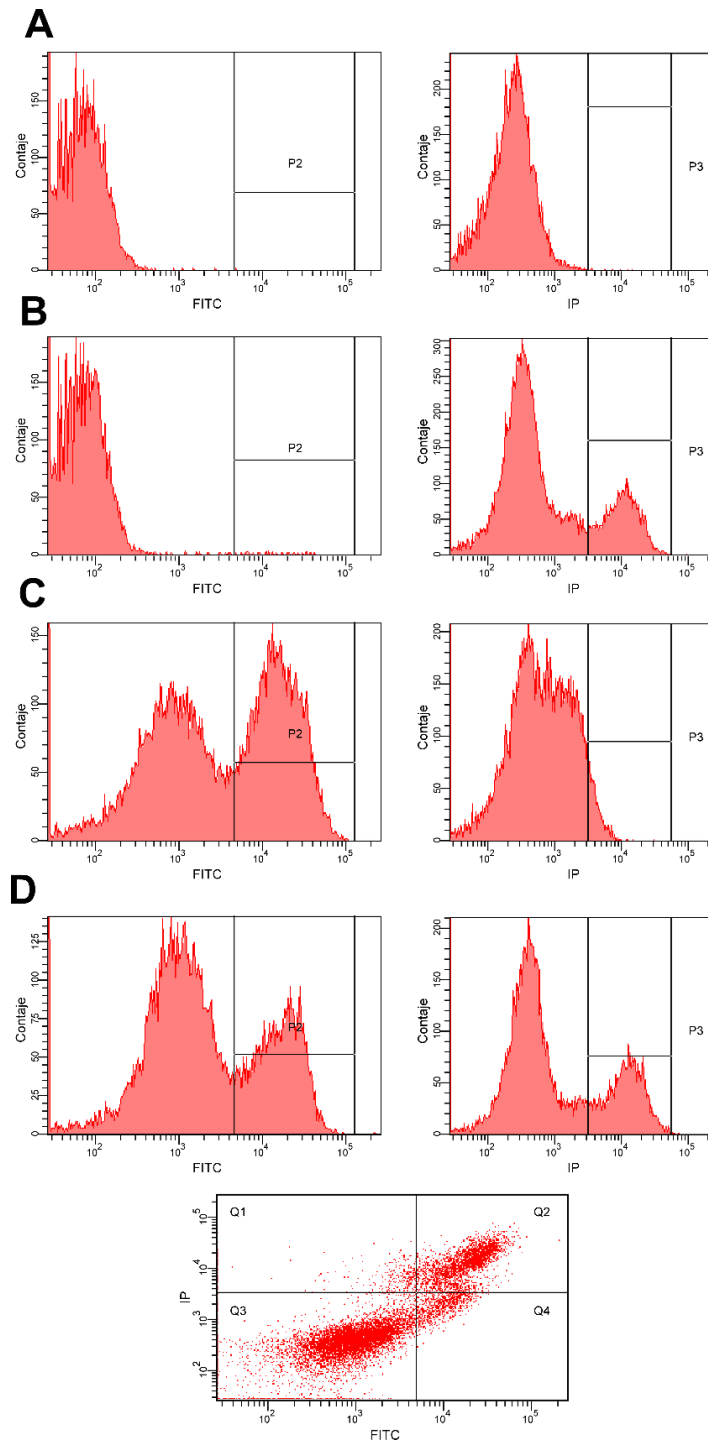


Figura 5. Puesta punto del sistema de citometría de flujo en los que se representan los histogramas poblacionales correspondientes a las poblaciones que dan señal positiva para FITC (izquierda) y IP (derecha) de las células sin marcar **(A)**, marcadas con IP **(B)**, marcadas con anexina V **(C)** y marcadas tanto con IP como con anexina V **(D)**. En los histogramas se representan los picos de anexina V como P2 (suma de las señales obtenidas en Q2 y Q4) y los de IP como P3 (suma de las señales obtenidas en Q1 y Q2). También se representan las poblaciones correspondientes a la muestra de células marcadas con ambos fluoróforos en su distribución en cuatro cuadrantes **(D abajo)**.

en Q2 aquellas que sean positivas tanto para IP como para el FITC de la anexina V, en el Q3

aquellas no den positivo para ninguna y finalmente en Q4 aquellas que den positivo solo para anexina (**Figura 5 D**).

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se ha realizado un t-test pareado de dos colas. Los datos se representaron como la media \pm la desviación estándar de la media (SEM), siendo n el número de réplicas utilizadas en cada experimento. Se tomó como significativo un valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA DIMERIZACIÓN DE P75^{NTR} EN AMBIENTE OXIDATIVO

Con objeto de encontrar posibles diferencias en el comportamiento de p75^{NTR} se sometió a las células en cultivo a un agente oxidante, en este caso H₂O₂ a una alta concentración (10 mM) para ser capaz de hacer una comparación diferencial entre las muestras sin tratar y las tratadas con el agente oxidante de forma fácil. Esta concentración excede los niveles fisiológicos habituales en las células pero se ha descrito en la explosión oxidativa durante la fagocitosis mediada por neutrófilos (Hampton, Kettle, & Winterbourn, 1998). Se incubó a las células con el agente oxidante durante 5 min (tiempos mayores demostraron ser letales para las células), y se lisaron para someterlos a electroforesis en condiciones no reductoras (con objeto de ver posibles asociaciones oligoméricas) realizar un western blot frente a la fracción extracelular de p75^{NTR}. La diferencia más notable que se observó al comparar las muestras tratadas y no tratadas con H₂O₂ es la aparición de una banda a alrededor 150 kD (**Figura 6 B**), peso que se correspondería con el dímero de p75^{NTR} (el monómero sale en condiciones reductoras a 75 kD aunque en no reductoras se ha visto que aparece a pesos menores). Se sabe que en condiciones oxidantes, pueden ocurrir de forma fisiológica la formación de puentes disulfuro gracias a los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína (Cys-SH), que en las condiciones reductoras habituales del ambiente citosólico se encuentran libres (Cumming et al., 2004). P75^{NTR} tiene muchas cisteínas en su cadena aminoacídica, pero la mayoría de ellas se encuentran en los dominios CRD del dominio extracelular. En estos dominios, presentes también en otras proteínas las cisteínas se encuentran agrupadas en módulos formando puentes intracatenarios (Banner et al., 1993), con lo cual no pueden formar puentes disulfuro con otras cisteínas. Las únicas cisteínas libres, entonces son 4, una en el dominio transmembrana (C257) y otra 3 en el

dominio intracelular (C279, C379 y C416) (**Figura 6 A**). Para testar su implicación en la formación

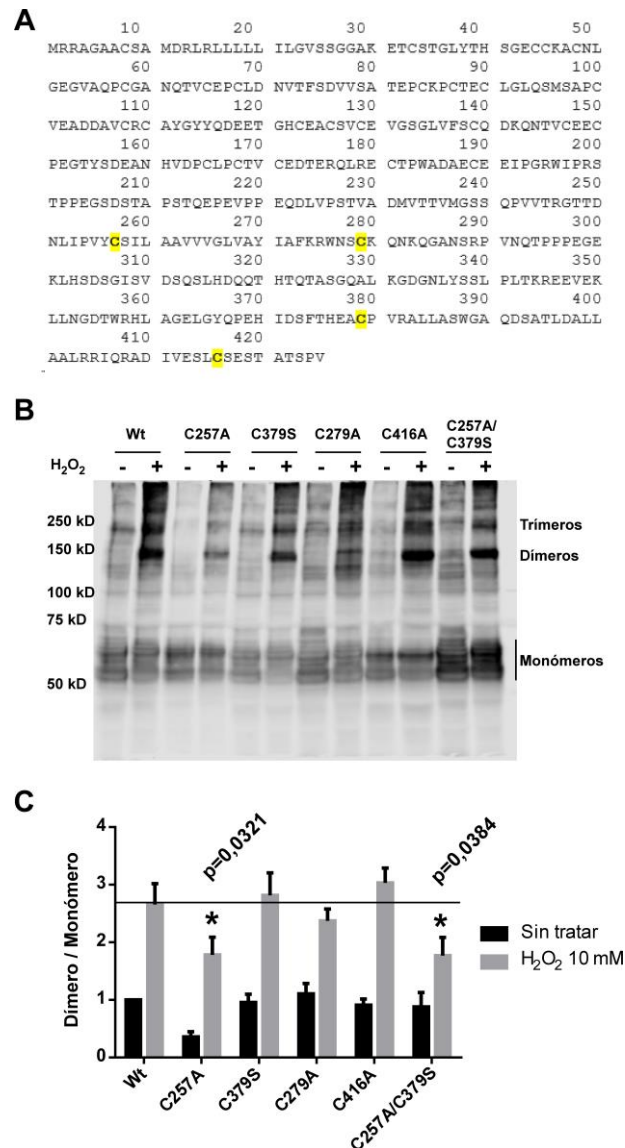


Figura 6. Secuencia aminoacídica de p75^{NTR} (rata) resaltando en amarillo cada una de las 4 cisteínas libres (**A**). Lisados celulares sometidos a electroforesis en un gel al 8% de acrilamida y revelado por western blot contra el dominio extracelular de p75^{NTR} (**B**). Cuantificación de las bandas correspondientes a los dímeros y monómeros expresadas en forma de ratio y normalizadas con respecto a la muestra del wt sin tratar (n=5) (**C**). La estadística se ha hecho mediante un *t*-test de dos colas pareado con respecto al Wt con agua oxigenada.

de dímeros se realizaron mutantes puntuales de dichas cisteínas y se sometieron al mismo tratamiento que el especificado antes para realizar un western blot, cuantificando las bandas del monómero y el dímero y estableciendo una proporción entre ellas (**Figura 6C**)

También se testó un doble mutante sobre las cisteínas C257, la cual se ha descrito como pieza clave para la formación de dímeros en condiciones normales (Vilar et al., 2009) y la cisteína C379, la cual más recientemente se ha propuesto que participa en el proceso de dimerización en condiciones oxidantes (Qu et al., 2013). El análisis de la cuantificación de las bandas mostró que los únicos mutantes que exhibían un comportamiento significativamente distinto al wt fueron el C257A y el doble mutante, mostrando una disminución en la capacidad para formar dímeros. El resto de mutantes, entre los cuales se encontraba sorprendentemente el mutante para C379, no variaron su formación de dímeros con respecto al wt de forma significativa (**Figura 6 C**).

Con objeto de profundizar en el estudio del comportamiento de los dímeros y su relación con el ambiente oxidante en células se procedió a testar su evolución a concentraciones crecientes de agua oxigenada observándose un incremento paralelo en la cantidad de dímero, si bien ese aumento solo es significativamente apreciable en las concentraciones de 1 mM y 10 mM (**Figura 6 A**). Posiblemente esto ocurra porque el efecto del agente oxidante a concentraciones más bajas no es fácilmente apreciable en un western blot. Debido a esto se seleccionó la concentración de 1 mM para evaluar la relación entre la cantidad de dímero y la concentración de agua oxigenada (la concentración de 10 mM a tiempos superiores a 1 h resultó letal para las células, haciéndose imposible la obtención de resultados), obteniéndose un aumento en la cantidad de dímero conforme la concentración del agente oxidante asciende (**Figura 7 B**), con la excepción del último tiempo (6 horas) en que los niveles de dímeros descendieron, posiblemente debido a la abundante muerte celular a tiempos tan avanzados.

Finalmente se investigó acerca de la localización celular de los dímeros. Se sabe que en otros receptores de membrana como la sortilina, la dimerización constituye una señal para bien su internalización en endosomas o su expulsión al medio externo en vesículas extracelulares (Itoh, Mizuno, Aikawa, & Aikawa, 2018). Para comprobar que en p75^{NTR} estos dímeros se encuentran en la membrana se procedió a realizar un tratamiento biotinilador a las células para realizar un western blot contra el ECD de p75^{NTR} de solamente las proteínas de la membrana extracelular, obteniéndose la banda correspondiente al dímero, dando a entender que existe presencia de ellos en la membrana extracelular (**Figura 7 C**).

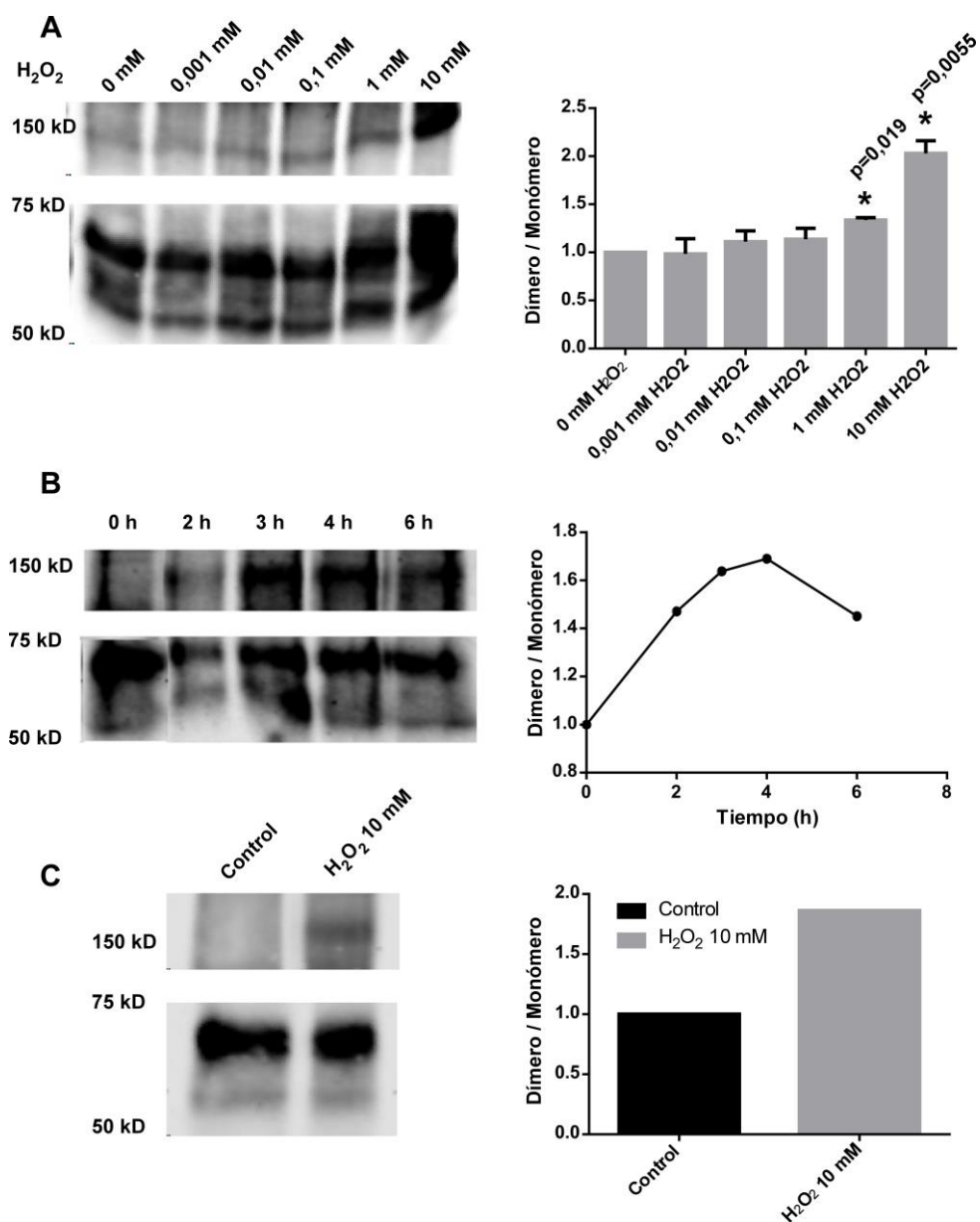


Figura 7. Lisados de cultivos celulares incubados a distintas concentraciones de H₂O₂ (**A**) o a una misma concentración (1 mM) durante diferentes tiempos (n=3) (**B**) o a 10 mM durante 5 min y posteriormente sometidos a un proceso de biotilación (**C**). Seguidamente se hicieron pasar por geles de acrilamida al 8% por electroforesis y se revelaron por western blot contra el dominio extracelular de p75^{NTR} (derecha). Posteriormente se cuantificaron las bandas correspondientes a los dímeros y monómeros, estableciendo un ratio y normalizando con respecto a la muestra sin tratar (**A**) y (**C**) o con respecto a tiempo 0 h (**B**). El análisis estadística se ha hecho mediante un t-test pareado de dos colas frente a la muestra a tiempo 0.

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA CISTEINA C379 EN LA DIMERIZACIÓN DEL ICD

Los westerns blots de los mutantes de las cisteínas, como se ha indicado, parecen indicar que para la formación de dímeros la única cisteína requerida es la C257, a pesar de los estudios que proponen a C379 como pieza clave para la dimerización en ambiente oxidativo (Qu et al., 2013). Sin embargo una posible explicación que se le puede dar a esta aparente contradicción de resultados es que mientras que la única cisteína requerida para la formación del dímero aparentemente es la C257, la C379 podría ser capaz de estabilizar el dímero. Dado que se ha visto que la dimerización de p75^{NTR} aumenta el rendimiento del corte mediado por la γ -secretasa (Sykes et al., 2012) y el efecto protector frente al estrés oxidativo está relacionado por su corte (Zhang et al., 2009), esta cisteína podría contribuir al efecto protector de la proteína favoreciendo el corte. Para comprobar su aportación a la dimerización se purificó el ICD de p75^{NTR} wt y mutante para la cisteína C379 y se hizo pasar por una columna cromatográfica para eliminar el imidazol usado en la purificación que podría interferir en el experimento y el DTT que es un agente reductor y por tanto interferiría en la formación de puentes disulfuro (**Figura 8 A**). Tras la incubación con agua oxigenada se sometieron a electroforesis las muestras y se tiñeron. Sorprendentemente se vieron dos bandas próximas entre sí, una a 22 kD que se corresponde con la banda obtenida en la purificación correspondiente al monómero, y otra a 16 kD aproximadamente que podría deberse a un plegamiento incorrecto de parte de la proteína como resultado de la congelación/descongelación de la muestra previa al experimento. También se observó que mientras que el mutante no varió su patrón de bandas en presencia del agente oxidante, el wt bajó la altura de su banda de 22 kD, posiblemente fruto de algún plegamiento debido a la formación de puentes disulfuro intracatenarios (el ICD de p75^{NTR} tiene 3 cisteínas libres), también se aprecia una débil banda a 40 kD aproximadamente que podría ser el dímero. La aparentemente poca presencia de dímero podría deberse a que gran parte de la proteína ha podido formar agregados proteicos fruto del fuerte ambiente oxidante y la gran flexibilidad que

le otorga el hecho de ser solo una fracción de la proteína y estar en disolución en lugar de en la membrana, agregados que no habrían podido entrar en el gel (**Figura 8 B**).

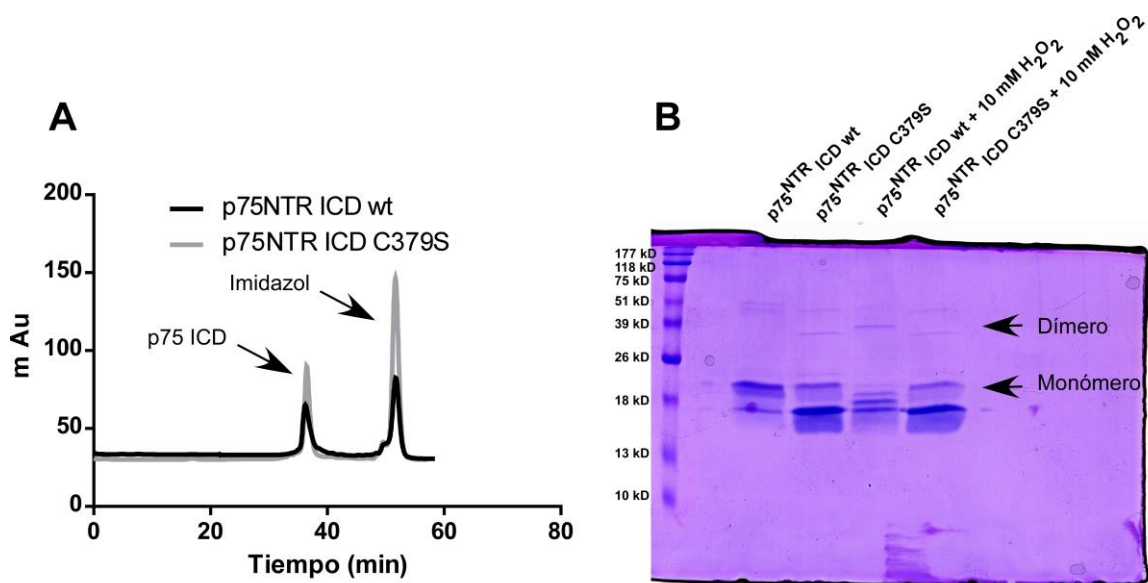


Figura 8. Elución por cromatografía de exclusión de la proteína purificada a 0,5 ml/min (**A**). Electroforesis en gel de acrilamida al 15% de los picos de proteínas del cromatograma con/sin previa incubación en hielo con H₂O₂ a 10 mM (concentración final) durante 1 hora. El gel fue luego teñido durante 30 min en

4.3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIADA POR P75^{NTR} EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Con objeto de estudiar directamente la implicación de los dímeros observados y las cisteínas en el papel protector de p75^{NTR} en ambientes oxidativos se realizaron experimentos de citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células en apoptosis. Para este experimento solo se utilizaron la proteína wt y el único mutante que hasta ahora había conseguido reducir de manera significativa la formación de dímeros, el C257A. Los resultados muestran un aumento de células en apoptosis en las muestras incubadas con H₂O₂ con respecto a las muestras sin tratar, pero no solo no parece haber diferencias entre el wt y el mutante, sino que tampoco las hay con la muestra transfectada con el vector vacío (**Figura 9**). Resultados similares se han obtenido anteriormente por otros grupos con la proteína wt (Wang et al., 2001), demostrándose p75^{NTR} ser insuficiente para lograr un descenso en el porcentaje de células apoptóticas y necesitando la presencia del receptor TrkA y la neurotrofina NGF. Con motivo de comprobar esto y comparar la proteína wt con los mutantes se ha cotransfectado las células con TrkA (además de con las distintas versiones de p75^{NTR}) e incubado con NGF 0,1 mM durante la incubación con el agente oxidante. Para este experimento no solo se han usado wt y C257A, sino que también se ha utilizado el mutante de la cisteína 379, para comprobar si, aunque no es esencial para la

formación de dímeros, su presunto papel estabilizándolos contribuye a la acción protectora de p75^{NTR}. También se ha utilizado el mutante T248C, el cual tiene una cisteína más y se ha observado que genera dímeros constitutivos que resultan tóxicos para la célula (Vilar et al., 2009), actuando como control positivo de muerte. Los resultados muestran, esta vez sí un descenso en el porcentaje de células apoptóticas en la proteína wt con respecto al resto de mutantes, tanto en la muestra tratada como en la sin tratar. Curiosamente la única excepción a esto es la muestra sin tratar del T248C, contradiciendo lo observado en la literatura. También resulta evidente la poca diferencia que hay de porcentaje de células en apoptosis entre las muestras tratadas y no tratadas para cada condición, de hecho en la muestra con el vector vacío y en la del mutante C379A (ambas sin tratar hay más porcentaje de muerte que en las tratadas). Esto puede deberse al efecto pro-supervivencia de TrkA, y que p75^{NTR} wt reduzca el porcentaje de células apoptóticas, podría deberse a que potencia la actividad de TrkA (**Figura 10**).

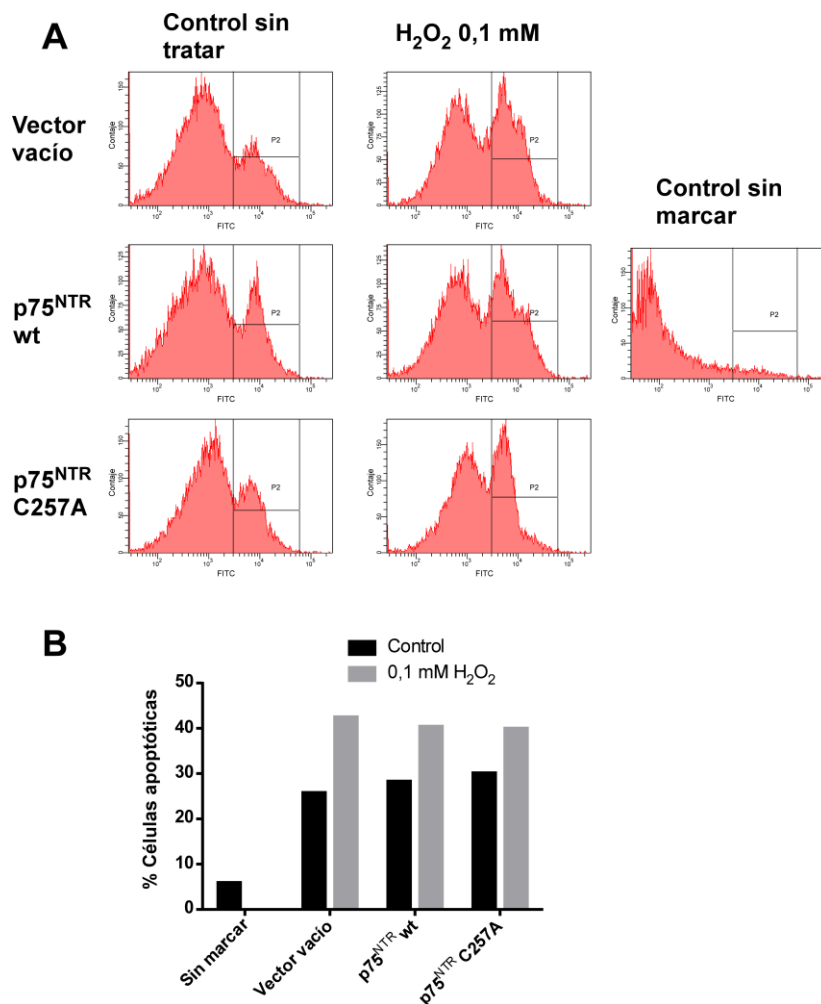


Figura 9. Representación de los histogramas poblacionales correspondientes a la señal medida del FITC en las muestras celulares incubadas o no con H₂O₂ 0,1 mM 6 h y pasadas por el citómetro (**A**). Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas (P2) obtenido por el citómetro (**B**).

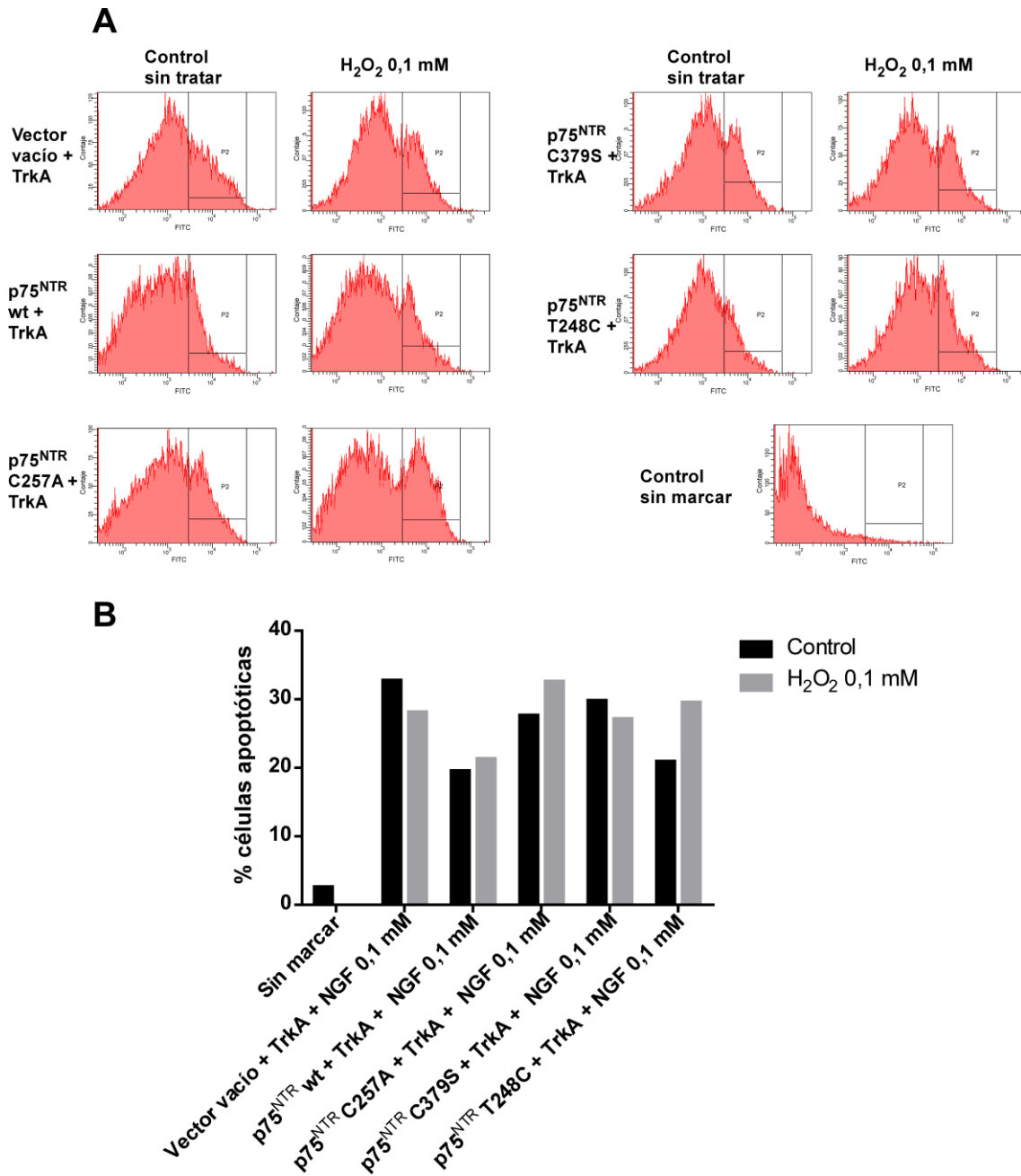


Figura 10. Representación de los histogramas poblacionales correspondientes a la señal medida del FITC en las muestras celulares incubadas con NGF 0,1 mM y/o con H₂O₂ 0,1 mM 6 h y pasadas por el citómetro (A). Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas (P2) obtenido por el citómetro (B).

5. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo es un factor que condiciona la supervivencia de las células, puede llevarlas a la muerte y se ha visto su implicación en enfermedades neurodegenerativas (Chen, Guo, & Kong, 2012). Estudios previos a este trabajo encontraron que el receptor de neurotrofinas p75^{NTR}

poseía la capacidad de proteger a las células de este efecto (Wang et al., 2001). De esta manera en el presente trabajo se pretende profundizar en el mecanismo que subyace a esta capacidad protectora.

El primer efecto que se vio en este trabajo que ocurría en presencia de un ambiente oxidante, fue la aparición de unos dímeros de p75^{NTR}, no presentes en las muestras control (**Figura 6 B**). Se ha visto que la formación de estos dímeros aumenta de manera progresiva conforme la concentración del agente oxidante aumenta (**Figura 7 A**) y conforme aumenta el tiempo de incubación con él (**Figura 7 B**), hasta llegar a un punto en que desciende como consecuencia de la elevada muerte celular. También se comprobó que estos dímeros se localizan en la membrana (**Figura 7 C**), a diferencia de otros receptores como la sortilina, cuya dimerización implica una internalización del receptor para su reciclaje o su expulsión al medio extracelular en vesículas (Itoh et al., 2018).

Debido a que se ha descrito que en condiciones oxidantes los grupos sulfhidrilos de las cisteínas libres pueden formar puentes disulfuro (Cumming et al., 2004), se decidió testar anomalías en la formación de dímeros en mutantes de cada una de las 4 cisteínas libres de p75^{NTR}: C257, C279, C379 y C416. La única de ellas que mutada supuso una disminución significativa en la cantidad de dímeros fue la cisteína transmembrana C257 (**Figura 6 B**) que ya había sido descrita como fundamental en el proceso de formación de dímeros transmembrana (Vilar et al., 2009). Luego por lo que parece, el resto de cisteínas no participan de manera esencial en la formación de dímeros. Esto es de alguna manera sorprendente, pues trabajos anteriores apoyaban la idea de que la cisteína C379 tenía posibles implicaciones en la formación de dímeros en condiciones oxidantes. Aun así, la explicación que se le puede dar a este suceso es que si bien no resulta indispensable en el proceso de formación de los dímeros, puede participar en la estabilización de estos. Se ha comprobado que el rendimiento del corte mediado por la γ -secretasa en p75^{NTR} aumenta al dimerizar el receptor (Sykes et al., 2012) y existen evidencias de que el efecto protector de p75^{NTR} depende en gran medida del corte y la liberación al medio intracelular del ICD (Zhang et al., 2009). Por lo tanto estabilizar el dímero podría incrementar el rendimiento de todo este proceso. Comparando las versiones wt y mutantes para esta cisteína (C379S) del ICD de p75^{NTR} que se purificaron y sometieron a estrés oxidativo, se puede observar que la presencia del agua oxidativa no afecta en la más mínimo al mutante, mientras que el wt ve como su banda del monómero aparece a menores pesos en el gel, como resultado de puentes disulfuro intracatenarios con otra de las 2 cisteínas libres restantes (C279 y C416) del ICD que podrían darle a la proteína una conformación más compacta. Este fenómeno no tendría sentido que existiera, si tenemos en cuenta los estudios que apoyan su participación en la formación de

dímero, ya que formando un puente disulfuro intracatenario dejaría de estar libre para ayudar a la proteína a dimerizar, pero podría deberse a que al ser solo una fracción de la proteína y estar libre en disolución y no anclada en la membrana, tiene más libertad conformacional, siendo este un resultado artefactual. También se apreció la formación de una débil banda que se corresponde con el peso de un dímero de ICD y que solo aparece con agua oxigenada. Que sea tan débil podría deberse a que gran parte de la proteína ha formado agregados proteicos debido al ambiente oxidante y a esta libertad conformacional de la proteína en disolución de la que se ha hablado, agregados que podrían no haber entrado en el gel. En el mutante también se aprecian unas débiles bandas cercanas al peso del dímero, pero éstas aparecen tanto en la muestra sin tratar como en la tratada con el agente oxidante, luego es más probable que se trate de algún agregado fruto del proceso de congelación/ descongelación que sufrieron las muestras para ser almacenadas antes del experimento **(Figura 8 B)**.

Finalmente se llevó a cabo un estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Primeramente se testó el papel de p75^{NTR} solo en la disminución de la muerte celular en condiciones estresantes y se comparó con el mutante C257, que era el único que afectó de manera significativa a la cantidad de dímero formado **(Figura 9)**. Los resultados mostraron que p75^{NTR} solo no tiene ningún efecto apreciable en la protección frente a la muerte mediada por estrés, ya que no hubo diferencias en el porcentaje de células apoptóticas entre las células transfectadas con el vector vacío, con la proteína wt y con la proteína con la mutación C257A. Como ya se había descrito que p75^{NTR} podría necesitar para realizar su función protectora, la presencia del receptor TrkA y la neurotrofina NGF (Wang et al., 2001). Por ello se volvió a testar la viabilidad celular, esta vez con muestras no solo transfectadas con p75^{NTR}, sino también con TrkA, y además incubadas con NGF **(Figura 10)**. En las muestras se vio una bajada en el porcentaje de células apoptóticas en la muestra transfectada con la proteína wt. Tanto el mutante C257A como el mutante C379S presentaron unos niveles de muerte similares al control sin p75^{NTR}, revelando que de alguna manera estas cisteínas participan en la función protectora de p75^{NTR}. En general la diferencia de muerte en cada condición en cada muestra cuando se trata con agua oxigenada y cuando no, es muy pequeña. Unido esto al hecho de que solo se ve una bajada de muerte en el p75^{NTR} wt, podría indicar que el verdadero efector del efecto pro-supervivencia es TrkA y la participación de p75^{NTR} se limita a potenciar este efecto, no en vano TrkA ya se ha descrito como agente promotor de la supervivencia en presencia de NGF (Ulrich et al., 1998). Se ha visto que este efecto mediado por TrkA es dependiente de la proteína quinasa AKT (Ulrich et al., 1998). Como también se ha visto que el corte proteolítico de p75^{NTR} y la

liberación del ICD al medio intracelular tiene un efecto promotor en la activación de AKT (Forsyth et al., 2014).

De esta manera, el mecanismo propuesto en este trabajo de actuación de p75^{NTR} en la protección frente al estrés oxidativo sería el siguiente (**Figura 11**): El monómero de p75^{NTR} (1), en presencia de un agente oxidante forma dímeros mediante un enlace disulfuro entre las cisteínas C275 de los monómeros (2). Una vez formado el dímero, este se estabiliza mediante otro puente disulfuro, esta vez entre las cisteínas C379 de los monómeros (3). Con el dímero estabilizado, éste resulta cortado secuencialmente por la α y la γ -secretasa, aumentándose el rendimiento del corte de ésta última gracias a la estabilización del dímero (4). El ICD liberado al medio intracelular interactúa con TrkA (5), potenciando su interacción con AKT y, por tanto su señal pro-supervivencia (6).

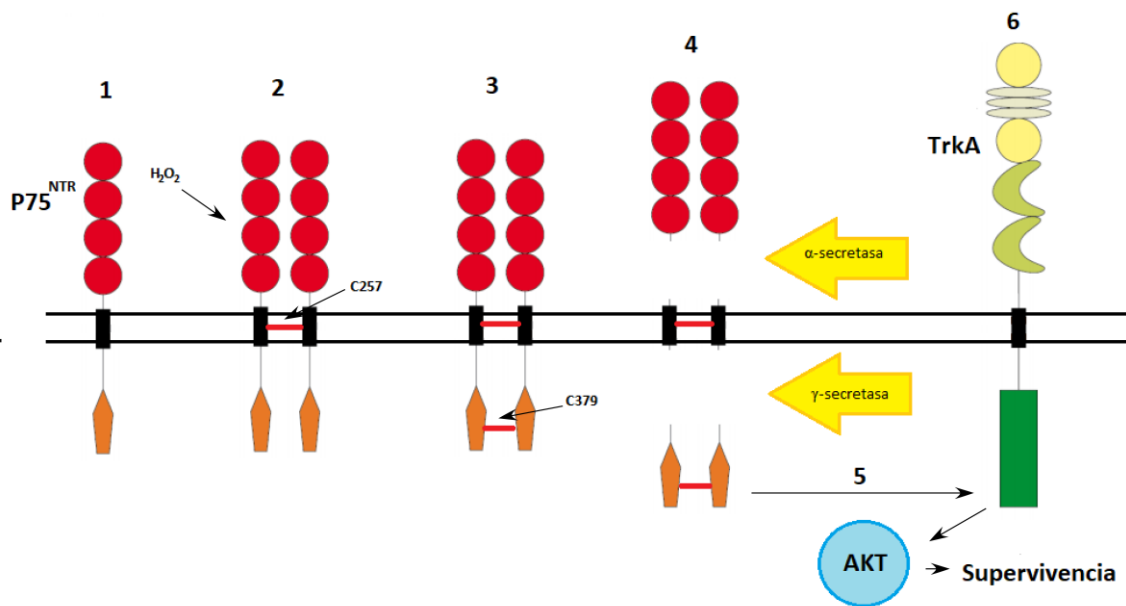


Figura 11. Esquema del mecanismo propuesto de actuación de p75^{NTR} de promoción de la actividad de TrkA en condiciones de estrés oxidativo

6. CONCLUSIONES

Tras realizar este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En condiciones oxidantes p75^{NTR} forma dímeros localizados en la membrana, cuya cantidad aumenta cuanto mayor es la concentración del agente oxidante o el tiempo el cual están expuestos a él.

- Estos dímeros se formarían mediante puentes disulfuro en la cisteína transmembrana C257 y se estabilizarían mediante otra cisteína presente en el dominio intracelular, la C379.
- P75^{NTR} no consigue por si solo disminuir la muerte celular mediada por estrés oxidativo, pero en presencia de NGF y TrkA sí lo consigue, presuntamente potenciando la acción pro-supervivencia de este último.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Banner, D. W., Darcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., ... Lesslauer, W. (1993). Crystal Structure of the Soluble Human 55 kd TNF Receptor- Human TNF-beta Complex - Implications for TNF Receptor Activation. *Cell*, *73*, 431–445. [http://doi.org/0092-8674\(93\)90132-A](http://doi.org/0092-8674(93)90132-A) [pii]
- Barker, P. A., Barbee, G., Misko, T. P., & Shooter, E. M. (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(48), 30645–30650.
- Bartkowska, K., Turlejski, K., & Djavadian, R. L. (2010). Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *70*, 454–467. <http://doi.org/7049> [pii]
- Beattie, M. S., Harrington, A. W., Lee, R., Kim, J. Y., Boyce, S. L., Longo, F. M., ... Yoon, S. O. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, *36*(3), 375–386. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01005-X](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01005-X)
- Benzel, I., Barde, Y. A., & Casademunt, E. (2001). Strain-specific complementation between NRIF1 and NRIF2, two zinc finger proteins sharing structural and biochemical properties. *Gene*, *281*(1–2), 19–30. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00730-2](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00730-2)
- Boiko, A. D., Razorenova, O. V., Van De Rijn, M., Swetter, S. M., Johnson, D. L., Ly, D. P., ... Weissman, I. L. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, *466*(7302), 133–137. <http://doi.org/10.1038/nature09161>
- Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Peters, E. M. J., & Paus, R. (2004). Epithelial growth control by neurotrophins: Leads and lessons from the hair follicle. In *Progress in Brain Research* (Vol. 146, pp. 493–513). [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46031-7](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46031-7)
- Bothwell, M. (2014). NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *220*, 3–15. http://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_1

- Caporali, A., Pani, E., Horrevoets, A. J. G., Kraenkel, N., Oikawa, A., Sala-Newby, G. B., ... Emanuelli, C. (2008). Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: Implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circulation Research*, 103(2). <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177386>
- Carpio, I. A. G. (2016). *Caracterización del dominio transmembrana del receptor de neurotrofinas p75 y su papel en la dimerización, localización subcelular, procesamiento y señalización*. Universidad Complutense de Madrid.
- Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P. A., & Barde, Y. A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 272(5261), 542–545. <http://doi.org/10.1126/science.272.5261.542>
- Chao, M. V., Bothwell, M. A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A. A., Buck, C. R., & Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4749), 518–21. <http://doi.org/10.1126/science.3008331>
- Chapman, B. S., & Kuntz, I. D. (1995). Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Science*, 4(9), 1696–1707. <http://doi.org/10.1002/pro.5560040905>
- Chen, X., Guo, C., & Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 7(5), 376–385. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009>
- Chittka, a, & Chao, M. V. (1999). Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10705–10. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10705>
- Chittka, A., Arevalo, J. C., Rodriguez-Guzman, M., Pérez, P., Chao, M. V., & Sendtner, M. (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *Journal of Cell Biology*, 164(7), 985–996. <http://doi.org/10.1083/jcb.200301106>
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Sarcom As 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(10), 1014–1018. <http://doi.org/10.1073/pnas.40.10.1014>

- Cragolini, A. B., & Friedman, W. J. (2008). The function of p75NTR in glia. *Trends in Neurosciences*. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.005>
- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., & Schubert, D. (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(21), 21749–58. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312267200>
- Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L., & Persson, H. (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*, *2*(6), 1605–1613. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90049-4](http://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90049-4)
- Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., & Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, *77*(4), 503–512. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90213-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90213-5)
- Ernfors, P., Wetmore, C., Eriksson-Nilsson, M., Bygdeman, M., Strömberg, I., Olson, L., & Persson, H. (1991). The nerve growth factor receptor gene is expressed in both neuronal and non-neuronal tissues in the human fetus. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *9*(1), 57–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849697>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400404>
- Ferrer, I., Ballabriga, J., & Martí, E. (1998). BDNF Up-Regulates TrkB Protein and Prevents the Death of CA1 Neurons Following Transient Forebrain Ischemia. *Brain Pathology*, *261*, 253–261.
- Forsyth, P. A., Krishna, N., Lawn, S., Valadez, J. G., Qu, X., Fenstermacher, D. A., ... Kenchappa, R. S. (2014). p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and γ -secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(12), 8067–8085. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.513762>
- Frade, J. M., & Barde, Y. a. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays*, *20*(2), 137–45. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199802\)20:2<137::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<137::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q)

- Friedman, W. J., Olson, L., & Persson, H. (1991). Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res*, 63(1–2), 43–51. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1665108
- Gruss, H. J. (1996). Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 26(3), 143–59. <http://doi.org/10.1007/BF02592977>
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007–17. <http://doi.org/10.1084/jem.112.6.1005>
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9361–74. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Neural Regeneration Research*, 24, 677–736. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huber, L. J., Hempstead, B., & Donovan, M. J. (1996). Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Human Fetal Kidney. *Developmental Biology*, 179(2), 369–381. <http://doi.org/10.1006/dbio.1996.0268>
- Hutton, L. A., DeVellis, J., & Perez-Polo, J. R. (1992). Expression of p75NGFR trkA, and trkB mRNA in rat C6 glioma and type I astrocyte cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 32(3), 375–383. <http://doi.org/10.1002/jnr.490320309>
- Itoh, S., Mizuno, K., Aikawa, M., & Aikawa, E. (2018). Dimerization of sortilin regulates its trafficking to extracellular vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 293(12), 4532–4544. <http://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000732>
- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), 15924–15929. <http://doi.org/10.1073/pnas.1207767109>

- Kenchappa, R. S., Tep, C., Korade, Z., Urra, S., Bronfman, F. C., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2010). p75 Neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme/ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20358–20368. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.082834>
- Khursigara, G., Orkinick, J. R., & Chao, M. V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2597–2600. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2597>
- Le Moan, N., Houslay, D. M., Christian, F., Houslay, M. D., & Akassoglou, K. (2011). Oxygen-dependent cleavage of the p75 neurotrophin receptor triggers stabilization of HIF-1 α . *Molecular Cell*, 44(3), 476–490. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.033>
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H., & Hamburger, V. (1954). In Vitro Experiments on the Effects of Mouse Sarcomas 180 and 37 on the Spinal and Sympathetic Ganglia of the Chick Embryo. *Cancer Research*, 14(1), 49–57.
- Lewin, G. R., & Carter, B. D. (2014). *Neurotrophic Factors. Handbook of experimental pharmacology*. Springer. http://doi.org/10.1007/978-1-62703-272-8_10
- Lin, Y.-M. J., Hsin, I.-L., Sun, H. S., Lin, S., Lai, Y.-L., Chen, H.-Y., ... Wu, H.-M. (2018). NTF3 Is a Novel Target Gene of the Transcription Factor POU3F2 and Is Required for Neuronal Differentiation. *Molecular Neurobiology*. <http://doi.org/10.1007/s12035-018-0995-y>
- Manti, S., Brown, P., Perez, M. K., & Piedimonte, G. (2017). *The Role of Neurotrophins in Inflammation and Allergy. Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.010>
- Meeker, R. B., & Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: At the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 721–725. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.156967>
- Meeker, R., & Williams, K. (2014). Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 9(5), 615–28. <http://doi.org/10.1007/s11481-014-9566-9>
- Mi, Z., Rogers, D. A., Mirnics, Z. K., & Schor, N. F. (2009). P75NTR-dependent modulation of cellular handling of reactive oxygen species. *Journal of Neurochemistry*, 110(1), 295–306.

<http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06137.x>

- Nordell, V. L., Lewis, D. K., Bake, S., & Sohrabji, F. (2005). The neurotrophin receptor p75NTR mediates early anti-inflammatory effects of estrogen in the forebrain of young adult rats. *BMC Neuroscience*, 6. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-6-58>
- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., & Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and Histopathology*. <http://doi.org/10.14670/HH-25.237>
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., ... Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 427(6977), 843–848. <http://doi.org/10.1038/nature02319>
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., ... Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695), 487–491. <http://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Popnikolov, N. K., Cavone, S. M., Schultz, P. M., & Garcia, F. U. (2005). Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18(12), 1535–1541. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800487>
- Qu, Q., Chen, J., Wang, Y., Gui, W., Wang, L., Fan, Z., & Jiang, T. (2013). Structural Characterization of the Self-Association of the Death Domain of p75NTR. *PLoS ONE*, 8(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0057839>
- Radeke, M. J. M. J., Misko, T. P. T. P. T. P., Hsu, C., Herzenberg, L. A., & Shooter, E. M. (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/325593a0>
- Roberti, G., Mantelli, F., Macchi, I., Massaro-Giordano, M., & Centofanti, M. (2014). Nerve growth factor modulation of retinal ganglion cell physiology. *Journal of Cellular Physiology*, 229(9), 1130–1133. <http://doi.org/10.1002/jcp.24573>
- Rosch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.-A., & Korte, M. (2005). The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(20), 7362–7367. <http://doi.org/10.1073/pnas.0502460102>
- Roux, P. P., & Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin

- receptor. *Progress in Neurobiology*. [http://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00016-3](http://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00016-3)
- Salehi, A. H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., ... Barker, P. A. (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*, 27(2), 279–288. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00036-2](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00036-2)
- Shamovsky, I. L., Weaver, D. F., Ross, G. M., & Riopelle, R. J. (2008). The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: A comprehensive molecular modeling study. *Protein Science*, 8(11), 2223–2233. <http://doi.org/10.1110/ps.8.11.2223>
- Sykes, A. M., Palstra, N., Abankwa, D., Hill, J. M., Skeldal, S., Matusica, D., ... Coulson, E. J. (2012). The effects of transmembrane sequence and dimerization on cleavage of the p75 neurotrophin receptor by γ -secretase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43810–43824. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.382903>
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., ... Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(22), 5455–63. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- Tyurina, Y. Y., Nylander, K. D., Mirnics, Z. K., Portugal, C., Yan, C., Zaccaro, C., ... Schor, N. F. (2005). The intracellular domain of p75NTR as a determinant of cellular reducing potential and response to oxidant stress. *Aging Cell*, 4(4), 187–196. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00160.x>
- Ulrich, E., Duwel, A., Kauffmann-Zeh, A., Gilbert, C., Lyon, D., Rudkin, B., ... Martin-Zanca, D. (1998). Specific TrkA survival signals interfere with different apoptotic pathways. *Oncogene*, 16(7), 825–832. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1201842>
- Underwood, C. K., Reid, K., May, L. M., Bartlett, P. F., & Coulson, E. J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75NTR regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by γ -secretase. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37(2), 346–358. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.10.005>
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R. S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., ... Ibáñez, C. F. (2009). Activation of the p75 Neurotrophin Receptor through Conformational Rearrangement of Disulphide-Linked Receptor Dimers. *Neuron*, 62(1), 72–83.

<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.020>

- Vilar, M., & Mira, H. (2016). Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: Expected and unexpected roles. *Frontiers in Neuroscience*. <http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00026>
- Vilar, M., Murillo-Carretero, M., Mira, H., Magnusson, K., Besset, V., & Ibáñez, C. F. (2006). Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO Journal*, *25*(6), 1219–1230. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601017>
- Von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M., & Dechant, G. (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nature Neuroscience*, *4*(10), 977–978. <http://doi.org/10.1038/nn730>
- Wang, W., Dow, K. E., Riopelle, R. J., & Ross, G. M. (2001). The common neurotrophin receptor p75NTR enhances the ability of PC12 cells to resist oxidative stress by a trkA-dependent mechanism. *Neurotoxicity Research*, *3*(5), 485–499. <http://doi.org/10.1007/BF03033205>
- Wheeler, E. F., & Bothwell, M. (1992). Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(3), 930–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312139>
- Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., ... Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1069–1077. <http://doi.org/10.1038/nn1510>
- Yamashita, T., & Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature Neuroscience*. <http://doi.org/10.1038/nn1045>
- Yano, H., Torkin, R., Martin, L. A., Chao, M. V., & Teng, K. K. (2009). Proneurotrophin-3 Is a Neuronal Apoptotic Ligand: Evidence for Retrograde-Directed Cell Killing. *Journal of Neuroscience*, *29*(47), 14790–14802. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2059-09.2009>
- Yeaman, C., Le Gall, A. H., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., & Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *Journal of Cell Biology*, *139*(4), 929–940. <http://doi.org/10.1083/jcb.139.4.929>

- Zagrebelsky, M. (2005). The p75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(43), 9989–9999. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2492-05.2005>
- Zhang, T., Mi, Z., & Schor, N. F. (2009). Role of tyrosine phosphorylation in the antioxidant effects of the p75 neurotrophin receptor. *Oxid Med Cell Longev*, 2(October), 238–246. <http://doi.org/9745> [pii]\n10.4161/oxim.2.4.9745
- Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44 VN-r(5), 749–757. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>