



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

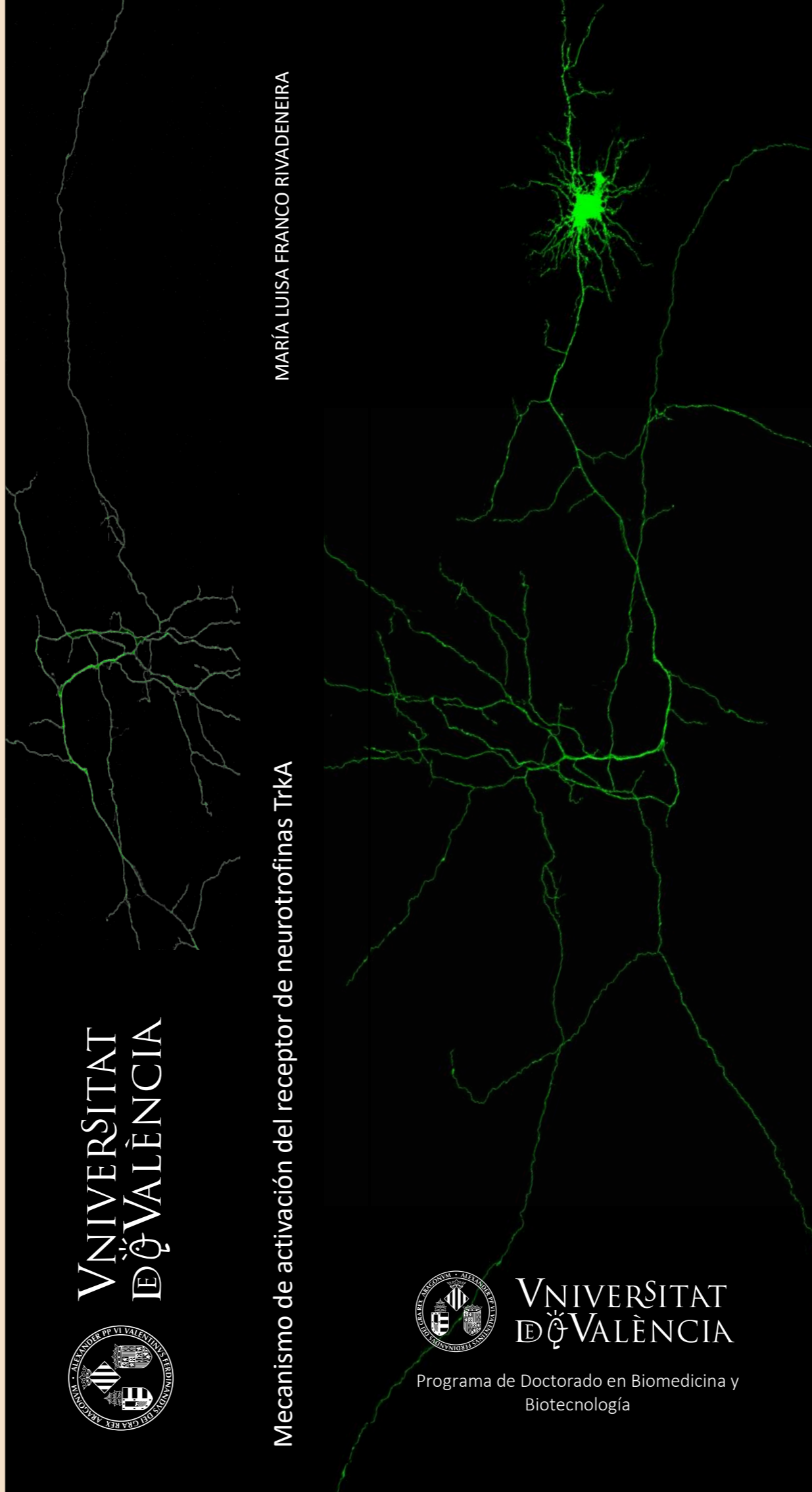


VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biomedicina y
Biotecnología

Mecanismo de activación del receptor de neurotrofinas TrkA

MARÍA LUISA FRANCO RIVADENEIRA



TESIS DOCTORAL

Mecanismo de activación del receptor de neurotrofinas TrkA

MARÍA LUISA FRANCO RIVADENEIRA
Director: Dr. Marçal Vilar Cerveró

Octubre, 2021



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**MECANISMO DE ACTIVACION DEL
RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkA**

Memoria presentada por María Luisa Franco Rivadeneira
para optar al grado de Doctor en Biomedicina y Biotecnología
por la universidad de Valencia

Director de la Tesis
Dr. Marçal Vilar Cerveró

Octubre 2021

Valencia, 2021



La memoria presentada por MARÍA LUISA FRANCO RIVADENEIRA para optar al grado de Doctora por la universidad de Valencia en el Programa de Doctorado de Biomedicina y Biotecnología se ha realizado en la Unidad de Bases Moleculares de la Neurodegeneración del Instituto de Biomedicina de Valencia del CSIC, bajo la dirección del Doctor:

MARÇAL VILAR CERVERÓ, científico titular del CSIC.

Quien **CERTIFICA** que el trabajo contenido en la memoria "**Mecanismo de activación del receptor de neurotrofinas TrkA**" presentado por D^a. María Luisa Franco Rivadeneira ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, director y tutor de la tesis firman el presente certificado en Valencia a 19 de octubre del 2021.

Dr. Marçal Vilar (Director)
Director de la Unidad de Bases Moleculares de la Neurodegeneración
Instituto de Biomedicina de Valencia
e-mail: mvilar@ibv.csic.es

Dr. Manuel Mateo Sánchez del Pino (Tutor)
Profesor Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Valencia
e-mail: manuel.m.sanchez@uv.es

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Marçal, por siempre confiar en mí y darme la oportunidad de crecer en su laboratorio, sobre todo por la complicidad y gran amistad. A Helena por los sabios consejos y el apoyo incondicional que siempre me brindó.

Imposible no mencionar a Laura, Isabel, Lucía y Raquel (mi compañera en la Noria). Agradezco profundamente vuestra amistad, considero que el trabajo sin ustedes no habría tenido el mismo impacto en mi vida. A Paloma por marcar mi vida y mostrarme que las cosas que tienen mayor valor son intangibles.

A mis padres, por siempre confiar que conseguiría las cosas aún sin haberlas empezado. El profundo amor ha hecho que la distancia se acorte.

Y debo mi mayor gratitud a Jesús, mi compañero, por enseñarme que la verdadera felicidad se encuentra al disfrutar de pequeñas cosas, por nunca cortarme las alas y estar dispuesto a hacer sacrificios al acompañarme donde vaya. Sabes cuanto te amo y ojalá comprendieras que para mí todo esto hubiera sido muy difícil sin ti.

Prólogo

Artículos publicados a partir de los resultados obtenidos en la presente tesis (se adjuntan en el anexo II):

Franco, M. L., Garcia-Carpio, I., Comaposada-Baro, R., Escribano - Saiz, J. J., Chavez-Gutierrez, L., and Vilar, M. (2021). TrkA-mediated endocytosis of p75-CTF prevents cholinergic neuron death upon gamma-secretase inhibition. *Life Sci Alliance*, 4(4).

Franco, M. L., Nadezhdin, K. D., Light, T. P., Goncharuk, S. A., Soler - Lopez, A., Ahmed, F., . . . Vilar, M. (2021). Interaction between the transmembrane domains of neurotrophin receptors p75 and TrkA mediates their reciprocal activation. *J Biol Chem*, 297(2), 100926.

Franco, M. L., Nadezhdin, K. D., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., and Vilar, M. (2020). Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. *J Biol Chem*, 295(1), 275-286.

Franco, M. L., Melero, C., Sarasola, E., Acebo, P., Luque, A., Calatayud-Baselga, I., and Vilar, M. (2016). Mutations in TrkA Causing Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis (CIPA) Induce Misfolding, Aggregation, and Mutation-dependent Neurodegeneration by Dysfunction of the Autophagic Flux. *J Biol Chem*, 291(41), 21363-21374.

Resumen

TrkA (*Tropomyosin receptor kinase A*) es una proteína transmembrana, miembro de la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTK) y receptor específico del factor de crecimiento NGF. Se ha determinado que el NGF inicia sus acciones biológicas al unirse al receptor TrkA en la membrana plasmática (Kaplan et al., 1991) promoviendo la supervivencia, crecimiento neuronal y ramificación de una amplia gama de neuronas. Esta señalización se lleva a cabo por procesos coordinados que producen cambios en las moléculas de TrkA mediados por la formación de homodímeros (Jing et al., 1992) con la consiguiente autofosforilación de residuos de tirosina. Sin embargo, a pesar que existen datos de estructura cristalina disponibles de TrkA poco se sabe sobre los detalles de este mecanismo de activación. Se sabe que los eventos de unión a ligando y de fosforilación de tirosinas iniciados por TrkA se ven afectados por la expresión de p75^{NTR} (Berg et al., 1991). La existencia de un amplio patrón de solapamiento en la expresión de TrkA y p75^{NTR} en los distintos tipos neuronales ha llevado a establecer numerosas teorías que sugieren la existencia de un heterocomplejo. Sin embargo, no se conoce la naturaleza de estos sitios de unión ni el tipo de asociación existente entre ambos receptores. En este trabajo hemos intentado profundizar en el mecanismo de activación del receptor TrkA, el rol que desempeña TrkA en neuropatías sensitivas como la enfermedad de CIPA (*Congenital insensitivity to pain with anhidrosis*), así como su interacción con el receptor de neurotrofinas p75^{NTR}. A través de estudios funcionales pudimos determinar que la porción yuxtamembrana del dominio extracelular (eJTM) de TrkA cuenta con una distribución de prolina esenciales para el acoplamiento de NGF y activación de TrkA. Los residuos D406, K410 y K411 de la región eJTM participan en la conformación del dímero activo de TrkA. Se determinó que el dominio TM de TrkA presenta dos motivos de homodimerización, una conformación activa que involucra a los residuos V418 y A428 y una conformación inactiva que involucra el motivo S419xxxG423. La adición de un residuo extra de Leucina en el dominio TM es capaz de promover la activación constitutiva del receptor, sugiriendo que el modelo de rotación-activación forma parte del mecanismo de activación del receptor TrkA. Los residuos G369 y S371 del dominio TrkA-Ig2 de la porción extracelular estabiliza dímeros preformados y promueve una respuesta más rápida de TrkA en presencia de NGF. Al analizar el impacto de mutaciones de TrkA en la enfermedad de CIPA se determinó que las mutaciones TrkA-Δ736, TrkA-L213P y TrkA-C300stop afectan el procesamiento intracelular del receptor e impiden su tránsito a la membrana celular. Las mutaciones de TrkA en la enfermedad de CIPA muestran una toxicidad neuronal variable producto de su distinto grado de agregación. Por otra parte, estudios de coexpresión de TrkA y p75^{NTR} revelaron que la actividad de TrkA modula el corte proteolítico de p75 por α -secretasa y evita la muerte celular mediada por la agregación de p75CTF en un contexto de inhibición de γ -secretasa.

Abreviaturas

| | |
|--------------------------|--|
| aa | Aminoácido |
| Ac | Anticuerpo |
| APS | Persulfato de Amonio |
| BS³ | Bis(sulfosuccinimidil) suberato |
| BSA | Albúmina de suero Bovino |
| CE | Compuesto E |
| CHX | Cicloheximida |
| CRAC | Consenso de aa de reconocimiento de colesterol |
| CTF | Fragmento C-terminal |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle médium</i> |
| DRG | Ganglios raquídeos |
| ECL | Quimioluminiscencia mejorada |
| EDC | Dominio extracelular |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| eJTM | Región yuxtamembrana del dominio extracelular |
| FBS | Suero Fetal Bovino |
| FRET | <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| H | Hora/s |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| HS | suero de caballo |
| ICD | Dominio intracelular |
| min | Minutos |
| NGF | Factor de Crecimiento Nervioso |
| NT-3 | Neurotrofina-3 |
| NT-4 | Neurotrofina-4 |
| P75^{NTR} | Receptor de neurotrofinas p75 |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEI | Polietilenimina |
| PFA | Paraformaldehído |
| PI3K | Fosfoinositol-3-quinasa |
| PMA | Forbol1217 miristato 13-acetato |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| RIP | Proteólisis intramembrana regulada |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Sistema Nervioso Periférico |
| β-MeOH | β-mercaptoetanol |
| TTBS | Tampón tris salino con 10% Tween-20 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina |
| TM | Transmembrana |
| TMD | Dominio transmembrana |
| Trk | <i>Tropomyosin receptor Kinase</i> |
| WB | Western Blot |
| Wt | <i>Wild type</i> |



Índice

ÍNDICE DE CONTENIDO

Prólogo

Resumen

Abreviaturas

Introducción 1

| | |
|---|-----------|
| 1. Neurotrofinas y sus receptores | 1 |
| 1.1. Neurotrofinas | |
| 1.2. Receptores de neurotrofinas | |
| 1.2.1. Familia de receptores Trk | |
| 1.2.1.1. Estructura del receptor TrkA | |
| 1.2.1.2. Isoformas y expresión de TrkA | |
| 1.2.1.3. Funciones y señalización de TrkA | |
| 1.2.1.3.1. Vía de las MAPK | |
| 1.2.1.3.2. Vía del PI3K/AKT | |
| 1.2.1.3.3. Vía de la PLC γ | |
| 1.2.2. Receptor p75 ^{NTR} | |
| 1.2.2.1. Estructura y expresión | |
| 1.2.2.2. Isoformas y procesamiento | |
| 1.2.2.3. Señalización e interacción con co-receptores | |
| 2. Dimerización y activación de TrkA | 15 |
| 3. Interacción entre TrkA y p75^{NTR} | 16 |
| 3.1. Estudios funcionales | |
| 3.2. Influencia sobre la selectividad de ligandos | |
| 3.3. Evidencia de interacciones directas | |
| 3.4. Convergencia de las vías de señalización. | |
| 4. Rol de TrkA en la nocicepción | 20 |
| 4.1. Implicación de TrkA en la enfermedad de CIPA | |

Objetivos 23

Materiales y métodos 27

| | |
|--|-----------|
| 1. Cultivos celulares | 29 |
| 1.1. Condiciones y medios de cultivo | |
| 1.2. Líneas celulares | |
| 1.2.1. HeLa | |
| 1.2.2. HEK293 | |
| 1.2.3. PC12 | |
| 1.2.4. PC12nnr5 | |
| 1.3. Recubrimiento de placas y cristales | |
| 1.3.1. Poli-D-lisina (PDL) | |
| 1.3.2. PDL/laminina | |
| 1.3.3. Colágeno | |
| 2. Cultivos primarios de ratón | 31 |
| 2.1. Neuronas corticales | |
| 2.2. Neuronas de ganglios dorsales | |
| 2.3. Neuronas del prosencéfalo basal | |
| 3. Métodos de transfección | 33 |
| 3.1. Moléculas catiónicas | |
| 3.2. Electroporación | |

| | | |
|-----|---|-----------|
| 4. | Extracción y cuantificación de proteínas | 34 |
| 5. | Análisis por Western Blot | 35 |
| | 5.1. Electroforesis | |
| | 5.2. Transferencia e inmunodetección | |
| | 5.2.1. Quimioluminiscencia (ECL) | |
| | 5.2.2. Fluorescencia (LI-COR Odyssey) | |
| | 5.3. Anticuerpos | |
| 6. | Ensayo de señalización de TrkA | 38 |
| 7. | Ensayo diferenciación de células PC12 y PC12nnr5 | 38 |
| 8. | Ensayo de vida media de proteínas. | 38 |
| 9. | Co-Inmunoprecipitación | 39 |
| | 9.1. Bolas magnéticas Anti-HA | |
| | 9.2. Proteína G agarosa | |
| 10. | Formación de dímeros covalentes por el TM de TrkA | 39 |
| | 10.1. Purificación de membranas celulares | |
| | 10.2. Ensayos de oxidación por yodo | |
| | 10.3. Ensayos de entrecruzamiento | |
| | 10.3.1. Bs3 | |
| | 10.3.2. MTS-2-MTS | |
| 11. | Bacterias competentes | 41 |
| | 11.1. Obtención de Bacterias competentes Xl1-Blue | |
| | 11.1.1. Método CaCl ₂ | |
| | 11.1.2. Método INOUE | |
| | 11.2. Transformación Bacteriana | |
| 12. | Mutagénesis dirigida por PCR | 43 |
| | 12.1. Oligonucleótidos | |
| 13. | Microscopía Confocal | 43 |
| | 13.1. Ensayos de muerte celular | |
| | 13.1.1. Neuronas de corteza | |
| | 13.1.2. Células Hela | |
| | 13.1.3. PC12 y PC12nnr5 | |
| | 13.2. Ensayos de internalización de receptores de membrana | |
| | 13.3. Ensayos de colocalización | |
| 14. | Citometría de Flujo | 46 |
| | 14.1. Expresión e internalización de receptores de membrana | |
| | 14.2. Biotinilación de NGF y ensayos de unión a ligando. | |

Resultados 49

CAPITULO I - Mecanismo de Activación del receptor TrkA

| | | |
|----|---|-----------|
| 1. | La región eJTM es esencial para el acoplamiento de NGF y activación de TrkA | 53 |
| | 1.1. El dominio eJTM es una región intrínsecamente desordenada | |
| | 1.2. La región eJTM es esencial para la correcta activación del receptor TrkA | |
| | 1.3. La región eJTM participa en la unión de TrkA a NGF | |
| | 1.4. La distribución de las prolinas en la región eJTM cumplen un rol en la activación de TrkA | |
| 2. | Los residuos de la región eJTM requieren de una conformación específica para la activación de TrkA | 58 |
| | 2.1. Los residuos K410 y K411 participan en la homodimerización de TrkA por BS ³ | |
| | 2.2. La proximidad de las regiones eJTM fomenta la formación de dímeros covalentes en mutantes de TrkA | |
| | 2.3. La región eJTM tiene una interfaz preferente de dimerización que | |

promueve la activación del receptor

1. **Determinación de la interfaz de dimerización del TM de TrkA** 61
 - 1.1. El residuo V418 forma parte de la interfaz activa de dimerización
 - 1.2. El residuo A428 sirve como eje para la activación de TrkA por NGF
2. **La rotación inducida del dominio TM de TrkA activa constitutivamente el receptor** 66
 - 2.1. NGF activa completamente TrkA en un contexto de sobreexpresión del receptor
 - 2.2. La inserción de leucinas en el dominio TM de TrkA activa constitutivamente el receptor
3. **Interacciones en el dominio Ig2 podrían estabilizar tetrámeros de TrkA en presencia de NGF** 68
 - 3.1. Dímeros preformados de TrkA tienen una respuesta mas intensa a NGF
 - 3.2. Interacciones en el dominio Ig2 podrían mediar la conformación tetramérica de TrkA
 - 3.3. Los residuos Gln369 y Ser371 estabilizan dímeros preformados inactivos que responden mejor a NGF

CAPITULO II - Interacción entre TrkA y p75

1. **Los dominios TM e IC de p75 modulan la respuesta de TrkA a NGF** 73
 - 1.1. P75 mejora la respuesta de TrkA a NGF
 - 1.2. La ausencia del ICD y TMD de p75 merma su capacidad de sensibilizar TrkA a NGF
 - 1.3. El motivo de dimerización A²⁶²xxxG²⁶⁶xxA²⁶⁹ de p75 participa en la formación del heterocomplejo TrkA/p75
 - 1.4. La interfaz de dimerización activa del TM de TrkA participa en la formación del heterocomplejo TrkA/p75
2. **TrkA modula el procesamiento de p75 por α / γ -secretasa** 76
 - 2.1. TrkA modula el corte de p75CTF por TACE/ADAM17
 - 2.2. La actividad basal de TrkA estabiliza el complejo TrkA/p75 y la unión de NGF propicia el corte de p75 por TACE
 - 2.3. La coexpresión de TrkA y p75CTF reduce los niveles de p75ICD
3. **TrkA reduce la muerte celular provocada por la agregación de p75CTF** 80
 - 3.1. La inhibición de γ -secretasa aumenta la dimerización de p75CTF
 - 3.2. Los dímeros covalentes de p75CTF permanecen más tiempo en la membrana celular
 - 3.3. TrkA reduce la muerte celular inducida por la agregación de p75CTF en células HeLa
 - 3.4. TrkA protege las células PC12 de la muerte celular mediada por p75CTF
 - 3.5. La expresión de TrkA en PC12nnr5 rescata las células de la muerte mediada por p75CTF
 - 3.6. La inhibición de α -secretasa promueve la agregación de p75CTF en la membrana celular
 - 3.7. TrkA inhibe la agregación de p75CTF en la membrana celular
 - 3.8. TrkA reduce la señalización de muerte producida por la unión p75CTF-TRAF6
4. **La actividad de TrkA regula la internalización de p75CTF** 87
 - 4.1. TrkA promueve la internalización de p75CTF en presencia de NGF
 - 4.2. TrkA promueve la internalización de dímeros de P75CTF en la membrana celular
 - 4.3. TrkA y p75CTF colocalizan en las vesículas endocíticas mediadas por NGF
 - 4.4. La actividad de TrkA asociada a la ruta PI3K participa en la internalización de p75CTF
 - 4.5. La expresión endógena de TrkA en PC12 promueve la internalización de p75CTF exógeno en presencia de NGF

CAPITULO III Caracterización de mutaciones de TrkA identificadas en la enfermedad de CIPA

1. **Las mutaciones de TrkA identificadas en CIPA inactivan el receptor** 95
2. **Los mutantes de TrkA tienen alterado el tráfico intracelular** 97
 - 2.1. Los mutantes de TrkA no alcanzan la superficie celular
 - 2.2. Los Mutantes de TrkA son retenidos en el RE

| | |
|---|------------|
| 2.2. Los Mutantes de TrkA son retenidos en el RE | |
| 3. Las mutaciones de TrkA alteran el plegamiento del receptor y fomentan su agregación | 101 |
| 4. Los mutantes de TrkA tienen una vida media variable | 102 |
| 4.1. TrkA-L213P tiene una cinética de degradación muy lenta | |
| 4.2. Los mutantes de CIPA usan la autofagia como principal ruta de degradación | |
| 5. La expresión de TrkA-L213P incrementa la formación de vesículas autofágicas | 103 |
| 6. TrkA-Δ736 y TrkA-L213P causan toxicidad celular en PC12nr5 | 105 |
| 7. La expresión de los mutantes de TrkA promueve la distrofia de neuronas corticales | 107 |
| 7.1. La expresión de TrkA-L213P produce la distrofia de neuritas | |
| 7.2. TrkA-L213P promueve la formación de autofagosomas en dendritas y soma de neuronas corticales | |

Discusión 109

CAPITULO I - Mecanismo de Activación del receptor TrkA 111

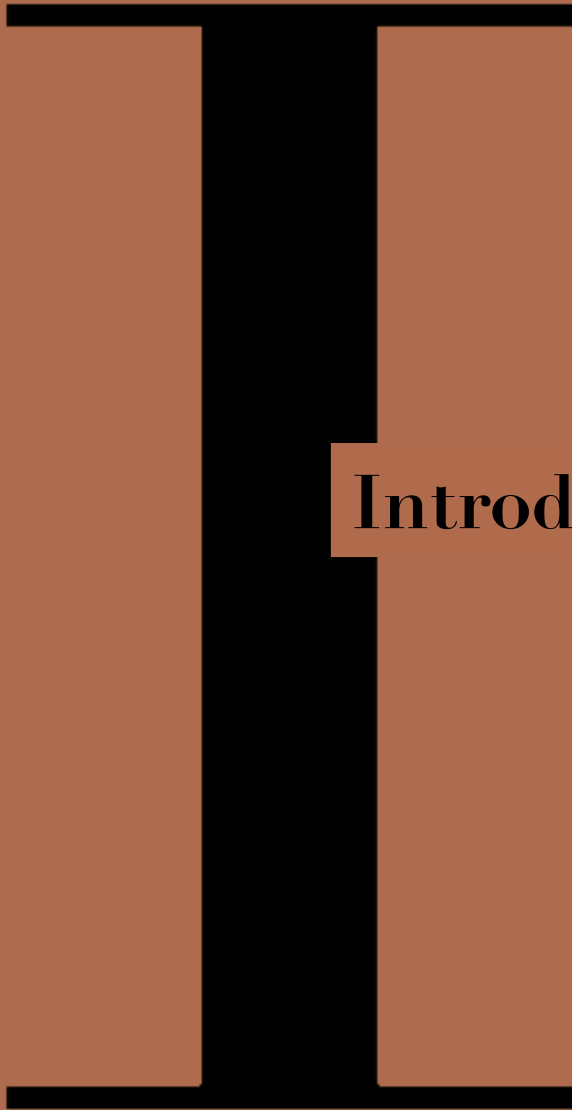
1. TrkA presenta una interfaz de dimerización a través del dominio TM
2. Activación del receptor TrkA por un mecanismo de rotación
3. La región eJTM participa en el acoplamiento de NGF y activación de TrkA
4. TrkA podría formar tetrámeros tras la unión de NGF

CAPITULO II - Interacción entre TrkA y p75 116

1. El dominio TM de TrkA y p75 constituyen el complejo de unión de alta afinidad
2. TrkA modula el procesamiento proteolítico de p75
3. TrkA reduce la muerte celular provocada por agregación de p75CFT

CAPITULO III Caracterización de mutaciones de TrkA identificadas en la enfermedad de CIPA 123

| | |
|--------------|-----|
| Conclusiones | 129 |
| Bibliografía | 133 |
| Anexos | 149 |



Introducción

1. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES

1.1 NEUROTROFINAS

El término neurotrofina se empleó originalmente para referirse de forma colectiva a los miembros de la familia del gen NGF (*nerve growth factor*), el primer factor de crecimiento en ser identificado, descubrimiento de Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen en la década de 1950, quienes observaron como una fracción obtenida del sarcoma de ratón promovía el crecimiento de fibras nerviosas de ganglios procedentes del embrión de pollo, posteriormente consiguieron aislar este factor difusible a partir de la glándula salival de ratón y estudiar su efecto trófico en el desarrollo neuronal simpático y sensorial (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini & Hamburger, 1951). Este descubrimiento les confirió a Cohen y Levi-Montalcini el Nobel en Fisiología o Medicina en 1986. A partir de allí, se marcó un hito en el concepto de factores neurotróficos y se abrió la puerta para la variedad de factores de crecimiento que se descubrieron posteriormente, entre ellos se encuentra el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) que se convirtió en el segundo miembro de la familia de neurotrofinas tras observar su capacidad de favorecer la supervivencia de las células derivadas del sistema nervioso, este factor trófico se consiguió aislar a partir del cerebro de cerdo mostrando una gran similitud con NGF en la distribución de los aminoácidos (Barde et al., 1982) la estrecha relación estructural entre ambos sugirió la existencia de una familia de factores neurotróficos que se descubrieron posteriormente empleando cebadores que amplificaban secuencias conservadas en NGF y BDNF, descubriendo así NT-3 (*Neurotrophin-3*) (Maisonpierre et al., 1990) y NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*) (Hallbook et al., 1991). Todos ellos presentes en mamíferos. Las neurotrofinas constituyen así, una familia de factores neurotróficos esenciales en el desarrollo, supervivencia, diferenciación y mantenimiento de neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Con el tiempo se determinaron las estructuras en alta resolución de cada una de ellas. (Butte et al., 1998; McDonald et al., 1991).

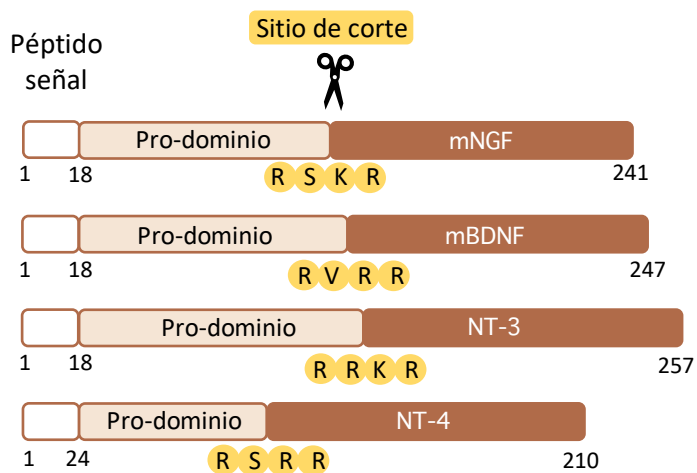


Figura 1. Esquema de la estructura de las neurotrofinas inmaduras. Las pro-neurotrofinas presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, un pro-dominio que tiene un sitio de corte para endoproteasas (residuos amarillos) altamente conservado. La escisión del pro-dominio da lugar a la forma madura de las neurotrofinas. Tanto la pro-neurotrofinas como neurotrofinas maduras pueden desencadenar respuestas biológicas.

Los distintos miembros que forman parte de esta familia muestran una alta homología en la secuencia de aminoácidos (en torno al 50%) así como un alto grado de conservación entre especies, exceptuando NT-4, no identificado en aves (Roux & Barker, 2002), manteniendo todas ellas los tres puentes disulfuro identificados originalmente en NGF. La neurotrofina madura y activa biológicamente se origina a partir de precursores de ~ 30-34 kDa (pro-neurotrofinas) codificados de un único exón (Figura 1). La síntesis proteica de las neurotrofinas se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso donde las pro-neurotrofinas pierden el péptido señal en un proceso proteolítico para posteriormente ser empaquetadas en vesículas secretoras donde serán procesadas nuevamente y perderán el pro-dominio pasando de una longitud de 250 a 120 residuos aproximadamente, constituyendo así las neurotrofinas maduras (~ 13 kDa) (Figura 2) (Seidah et al., 1996; Shooter, 2001). En algunos casos este procesamiento puede ser incompleto, llevando a la secreción extracelular de pro-neurotrofinas, pudiendo ser procesadas posteriormente por la plasmina y metaloproteasas de la matriz (Figura 2). Las neurotrofinas actúan funcionalmente como homodímeros asociados no covalentemente (Bothwell & Shooter, 1977) y son secretados por neuronas de SNC y SNP por la vía secretora constitutiva (NGF, NT-3 y NT-4) y regulada (BDNF) así como por células no neuronales mediante la vía secretora constitutiva (Farhadi et al., 2000; Griesbeck et al., 1999; Hibbert et al., 2003), formando parte de la mayoría de los procesos de funcionalidad y desarrollo, este efecto no se limita únicamente a estadios embrionarios, ya que, se ha descrito que en neuronas de organismos adultos existe un suministro mantenido de neurotrofinas (Whittemore et al., 1986). Dado que los niveles de expresión de las neurotrofinas son del orden subpicomolar (Meakin & Shooter, 1992) el SNC y SNP cuentan con un sistema de alta afinidad para interactuar con estos factores y asegurar su supervivencia durante el desarrollo. Desde luego, los efectos de las neurotrofinas dependen de varios factores, como la concentración, la afinidad, los niveles de expresión de los receptores y la duración e intensidad de las cascadas de señalización.

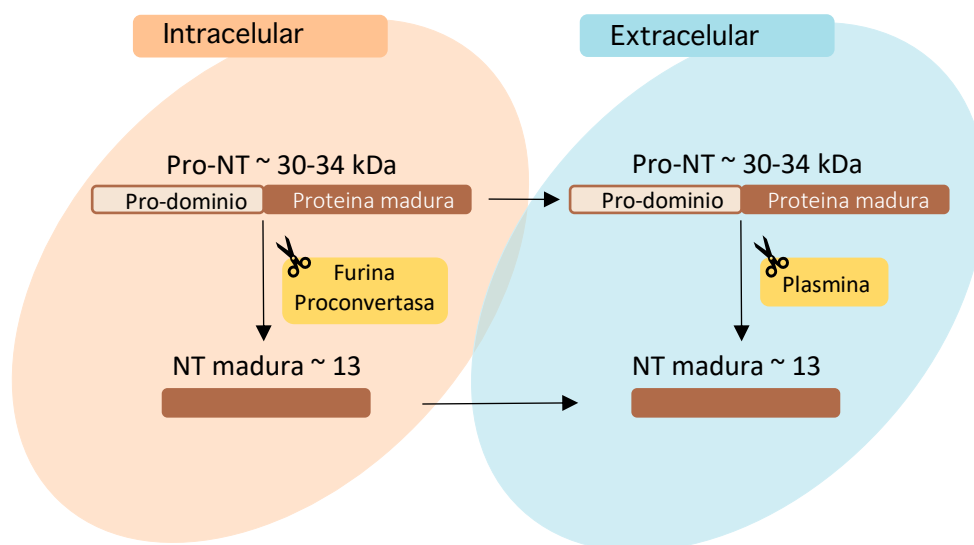


Figura 2. Escisión proteolítica de pro-neurotrofinas a neurotrofinas maduras. Las neurotrofinas (NT) se sintetizan como precursores glicosilados de ~ 30-34 kDa, llamados pro-neurotrofinas, pro-NT. Estas moléculas precursoras se escinden intracelularmente por furina o proconvertasa, y extracelularmente por la acción de plasmina para generar NT maduras.

1.2. RECEPTORES DE NEUROTROFINAS

Las 4 neurotrofinas identificadas en mamíferos ejercen sus efectos tróficos a través de dos tipos de receptores específicos localizados en la superficie celular, por un lado, está la familia de receptores Trk (*Tropomyosin Related Kinase*) constituidos por TrkA, TrkB y TrkC y por otro lado, el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*), siendo estos receptores selectivos con determinadas neurotrofinas. Así NGF se une y activa TrkA de forma exclusiva, NT-3 se une y activa TrkC y NT-4/5 al igual que BDNF se une y activa TrkB (Figura 3) (Arevalo & Wu, 2006). Todas ellas se unen a los receptores Trk como neurotrofinas maduras con una afinidad de 10^{-9} - 10^{-10} M, mientras que p75^{NTR} es capaz de interactuar como único receptor con todas las neurotrofinas tanto es sus estadios maduros como inmaduros (pro-neurotrofinas) con gran afinidad.

A pesar de la diferencia en la especificidad de los receptores Trk por las neurotrofinas, alguna de ellas muestran cierta promiscuidad como NT-3, que no solo es capaz de unirse y activar TrkC, también puede unirse a TrkA y a sus formas alternativas con menor afinidad que NGF, sin embargo, puede activar el receptor provocando una señalización diferente (Clary & Reichardt, 1994). Dependiendo el tipo celular y los receptores que se expresen en él, las neurotrofinas cumplirán funciones biológicas específicas, incluso se ha determinado que, en muchos modelos neuronales, la coexpresión de TrkA con p75^{NTR} aumenta la afinidad de TrkA por NGF a 10^{-11} M y modula la especificidad de los receptores Trk por las neurotrofinas, se sabe por ejemplo que p75^{NTR} inhibe la activación de TrkA por NT-3, pero no por NGF y de forma similar la presencia de p75^{NTR} aumenta de forma clara la especificidad de TrkB por BDNF en comparación con NT-3 y NT-4/5. (Benedetti et al., 1993).

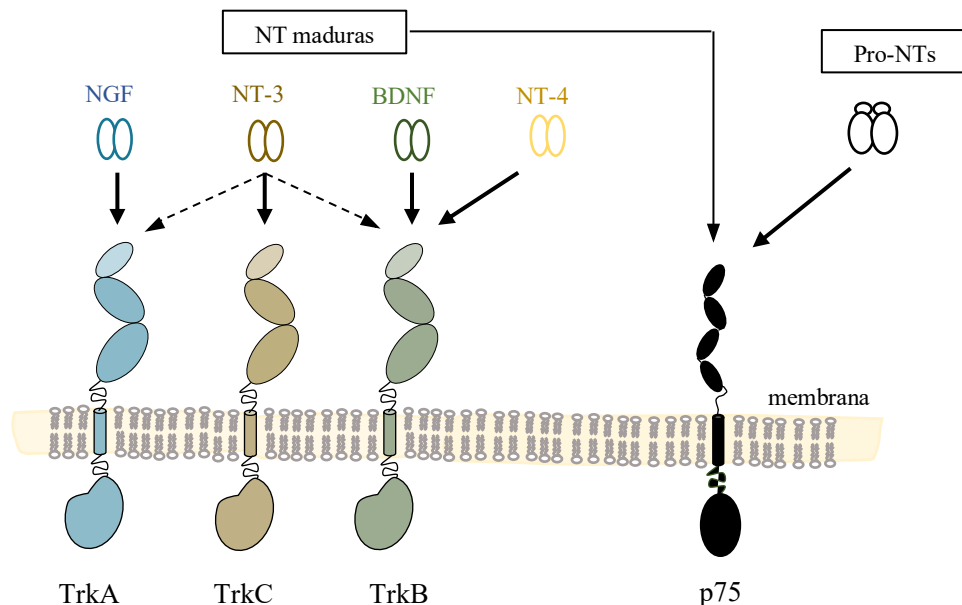


Figura 3. Neurotrofinas y sus receptores. Representación esquemática de la capacidad de interacción de neurotrofinas y proneurotrofinas con los receptores Trk y p75, los ligandos se unen a sus respectivos receptores con gran afinidad (flecha negra continua) como ligandos preferidos y en algunos casos pueden unir segundos ligandos con menor afinidad (flecha negra punteada). Las neurotrofinas y proneurotrofinas señalizan como homodímeros. Los receptores Trk tienen la capacidad de unir las neurotrofinas maduras, mientras que p75 puede unir tanto las neurotrofinas maduras como las proneurotrofinas. El tipo de receptor al que se unen las neurotrofinas determinará las diferentes cascadas de señalización y respuestas biológicas.

1.2.1 Familia de receptores Trk

Los receptores Trk pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTK), su descubrimiento nos remonta a 1986, donde se identificó una oncoproteína quimérica con actividad tirosina quinasa al que se denominó Trk (Martin-Zanca et al., 1986) el cual se clonó 3 años después y ello abrió la puerta para realizar numerosos estudios que culminó clasificándolos como una familia de 3 receptores de neurotrofinas, conocidos actualmente como TrkA, TrkB y TrkC (Lamballe et al., 1991; Martin-Zanca et al., 1989), logrando asociar a TrkA como receptor específico de NGF y responsable de desencadenar la señales mediadas por esta neurotrofina. (Hempstead et al., 1991; Kaplan et al., 1991).

1.2.1.1 Estructura del receptor TrkA

Los receptores Trk son proteínas transmembrana tipo I con una secuencia con alta homología entre ellas, manteniendo regiones estructuradas altamente conservadas en las porciones extracelulares e intracelulares; La porción extracelular se encuentra glicosilada (Figura 4) fomentando así su localización en la membrana plasmática y está constituida por una región con tres motivos ricos en leucina (LRDs) flanqueada por dos regiones ricas en cisteínas (CRDs) correspondiente a los dominios Trk-d1 y Trk-d3, seguidos por dos dominios del tipo inmunoglobulina C2 muy próximos a la región transmembrana que constituyen los dominios Trk-d4 y Trk-d5 (Ig1 e Ig2), siendo este último el responsable del reconocimiento y unión del ligando (Ultsch et al., 1999; Wiesmann et al., 1999). A partir de allí, existen aproximadamente 30 residuos que conectan esta porción extracelular a la región transmembrana (TM), el dominio TM es único y no se encuentra conservado entre los distintos Trk, a nivel citoplasmático cuenta con un dominio con actividad tirosina quinasa que tras la unión al ligando permite la fosforilación en trans de los residuos de tirosina (Figura 4) que les permite reclutar moléculas adaptadoras y efectoras a fin de activar las diferentes rutas de señalización (Patapoutian & Reichardt, 2001). La corta longitud de 15 residuos de la región carboxi-terminal marca una diferencia de los receptores Trk frente a otros receptores tirosina quinasa al igual que lo hace la organización estructural de su dominio extracelular (Chao et al., 1992).

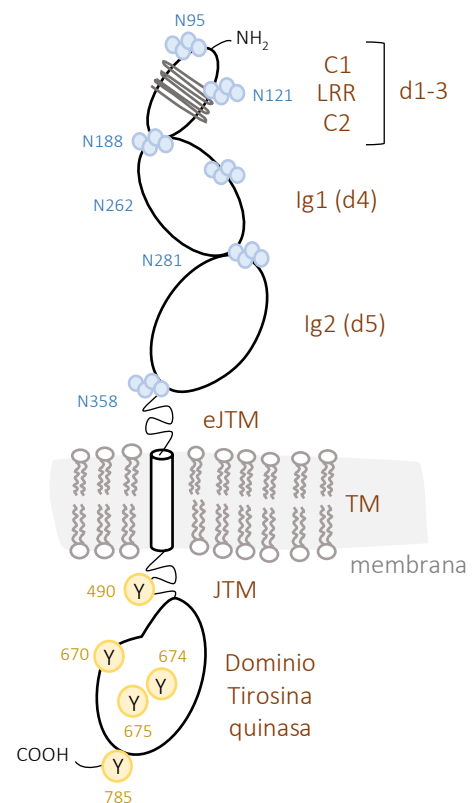


Figura 4. Estructura del receptor TrkA. Esquema representativo de los diferentes dominios que componen el receptor TrkA, se representa la N-glicosilación presente en la porción extracelular (azul), información extraída de Wehrman et al., 2007, se muestra la porción intracelular compuesta por una serie de residuos seguidos del dominio transmembrana que componen la región yuxtamembrana (JTM), seguidos del dominio tirosina quinasa donde se muestran los residuos de tirosina que se fosforilan y participan en la señalización mediada por la unión del ligando.

1.2.1.2 Isoformas y expresión de TrkA

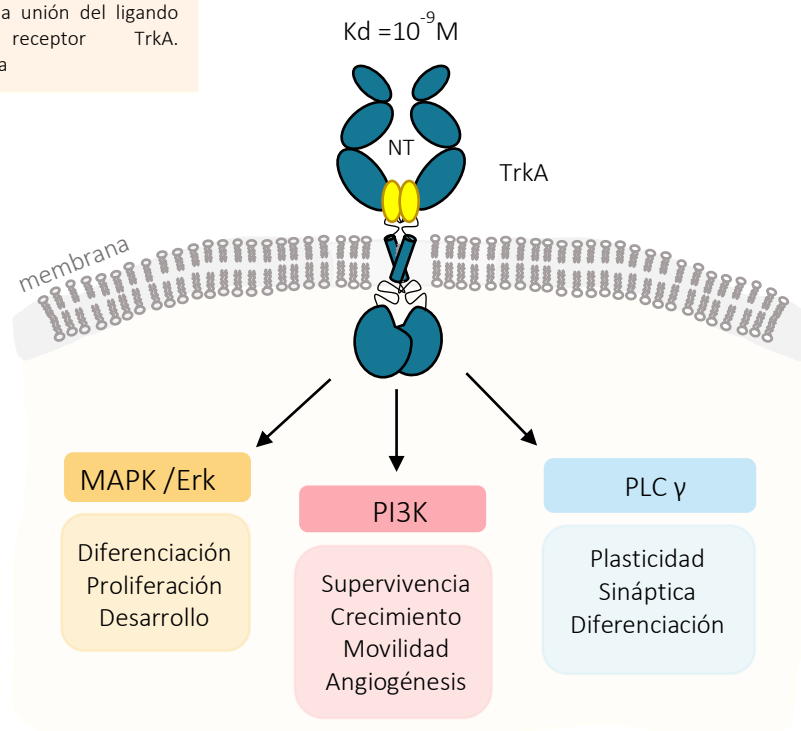
Como consecuencia del procesamiento alternativo de los RNAs mensajeros, los genes Trk tienen la peculiaridad de codificar diferentes receptores (Barbacid, 1994). En el caso de TrkA el *splicing* alternativo del exón 9 da como resultado las isoformas TrkA-I y TrkA-II caracterizadas por la ausencia o presencia de 6 aminoácidos en la región yuxtamembrana extracelular respectivamente, la inserción de estos 6 residuos (VSFSPV) no afecta la especificidad por su ligando NGF, sin embargo, se ha observado que la ausencia de estos residuos en la isoforma TrkA-I reducen la afinidad del receptor por NT-3. La versión más larga de TrkA se ha identificado en unas pocas poblaciones neuronales tanto a nivel el SNC como SNP, predominando su expresión en el SNP, mientras que la isoforma más corta se expresa principalmente en tejidos no neuronales. (Barker et al., 1993; Clary & Reichardt, 1994; Horigome et al., 1993). Dentro del SN el receptor se ha encontrado en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), del trigémino (TG) simpáticas (Martin-Zanca et al., 1990) y neuronas colinérgicas cuyas proyecciones llegan a la corteza e hipocampo; mientras que en tejidos no neuronales se han encontrado en células del sistema inmune y endocrino, también se ha identificado el receptor en pulmones y riñon (Lomen-Hoerth & Shooter, 1995; Tessarollo, 1998). El receptor TrkA se expresa en una densidad inferior que el resto de receptores Trk y su expresión en el sistema nervioso se solapa en gran medida con el de p75^{NTR} (Friedman et al., 1991). Esta coexpresión parece tener un gran impacto a nivel funcional ya que se sabe que los eventos de unión a ligando y de fosforilación de tirosinas iniciados en TrkA se ven afectados por la expresión de p75^{NTR} (Barker & Shooter, 1994; Berg et al., 1991; Verdi et al., 1994).

1.2.1.3 Funciones y señalización de TrkA

El rol del receptor TrkA es muy vasto y ha sido ampliamente documentado, siendo el dominio intracelular el responsable de mediar las señales de unión al ligando, este dominio cuenta con diversos residuos de tirosina que participan fosforilandose y reclutando de forma específica proteínas adaptadoras dando inicio a las cascadas de señalización, 3 de ellas se encuentran dentro del dominio catalítico (Tyr670, Tyr674 y Tyr675) cuya fosforilación sirve como anclaje de las proteínas adaptadoras Grb2 y SH2B, encontramos otras 2 tirosinas fuera del dominio catalítico, la Tyr490 en la región yuxtamembrana y la Tyr785 en la porción c-terminal, con la capacidad de acoplar Shc y fosfolipasa C- γ respectivamente (Stephens et al., 1994). Todas ellas generan vías de señalización que han sido ampliamente estudiadas, dentro de las cuales se encuentra la vía de las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), Vía de la PI3K (*Phosphoinositol 3 Kinase*) y la vía de la PLC γ (Phospholipase C γ) (Figura 4). Estas rutas son las responsables de las funciones características de TrkA como la supervivencia, diferenciación celular, plasticidad sináptica y el crecimiento axonal, de esta manera se ha descrito que la ausencia de TrkA da como resultado la pérdida de conjuntos definidos de células, así como lo hace también la ausencia de su respectivo ligando. (Nikoletopoulou

et al., 2010). TrkA promueve el crecimiento neuronal y ramificación de una amplia gama de neuronas tal cual se identificó por primera vez al describir la función del NGF (Levi-Montalcini, 1987). Aunque la coexpresión de TrkA junto a otros receptores Trk no limita la supervivencia de la célula a la señalización de TrkA, la presencia del receptor ayuda a mejorar y reforzar el crecimiento neuronal y la actividad sináptica. A continuación, se describen las 3 vías de señalización características del TrkA.

Figura 5. Señalización del receptor *trkA*. Esquema de las rutas de señalización y respuestas biológicas mediadas por la unión del ligando NGF al receptor TrkA. NT=neurotrofina



1.2.1.3.1 Vía de las MAPK/Erk

La activación de la vía de las MAPK está relacionada con la regulación de la transcripción de genes implicados en la diferenciación y supervivencia neuronal (Hagag et al., 1986; Szeberenyi et al., 1990) e involucrada en el inicio de eventos transcripcionales ligados a CREB (*cAMP response element binding*) (Mullenbrock et al., 2011). Todo inicia con la fosforilación del residuo Tyr490 (en el caso de TrkA) que permite el acoplamiento de la proteína Shc propiciando el reclutamiento del complejo Grb2/SOS quien a su vez activa Ras, promoviendo la activación secuencial de c-Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y culminando en la activación transitoria de ERK (MAPK) que puede durar de unos 30 a 120 min. Sin embargo, un escenario con proteínas adaptadoras diferentes puede conseguir la activación prolongada de MAPK tras la fosforilación del mismo residuo Tyr490, pero se ha propuesto la participación de la proteína ARMS/Kidins220 (Arevalo et al., 2004) que recluta Crk activando el factor de intercambio de nucleótidos de guanina C3G dando como resultado el inicio de la cascada ERK dependiente de Rap1/Raf consiguiendo su activación prolongada de hasta 7 horas (Arevalo et al., 2006; Marshall, 1995), por otro lado también se ha propuesto la participación de la proteína adaptadora FRS2 (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2*) como responsable de esta activación prolongada de la vía de las MAPK (Kao et al., 2001) (Figura 6).

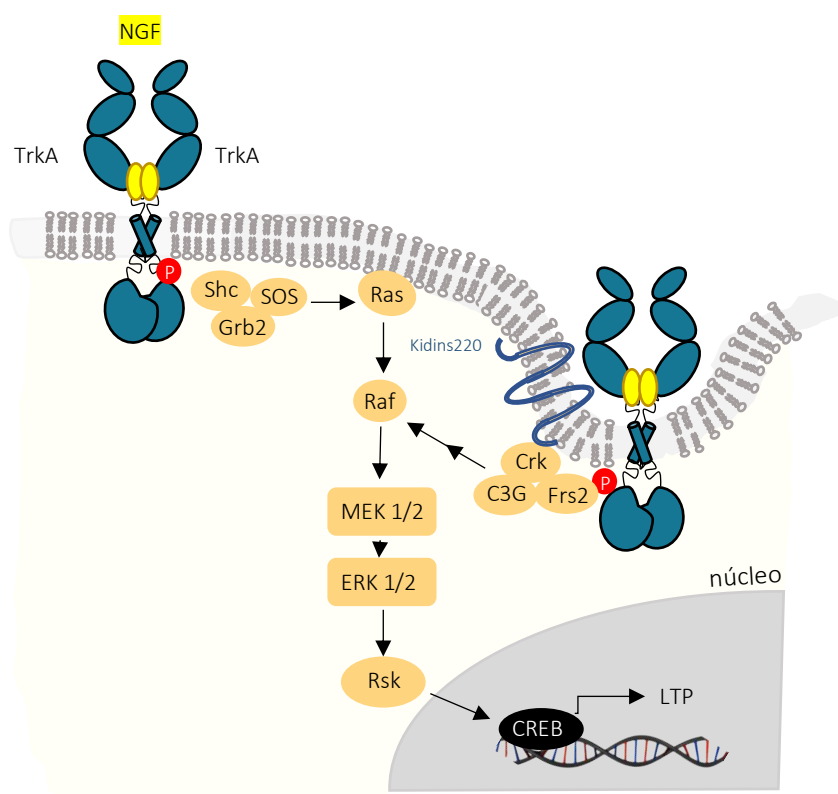


Figura 6. Vía de señalización MAPK/ERK.

1.2.1.3.1 Vía del PI3K/AKT

La activación de esta vía de señalización tiene un impacto favorable sobre la supervivencia celular, la cual se ha demostrado en varias poblaciones neuronales, como las neuronas corticales (Hetman et al., 1999) estriales (Perkinton et al., 2002; Stroppolo et al., 2001) simpáticas (Vaillant et al., 1999) células granulares del cerebelo (Nonomura et al., 1996) y motoneuronas (Soler et al., 1999). Se ha observado también que esta vía juega un papel importante en el crecimiento y la ramificación axonal (Markus et al., 2002). Estos efectos se consiguen gracias a la activación de la serina/treonina quinasa Akt, una de las principales dianas de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (Holgado-Madruga et al., 1997) y será esta quinasa quien module una respuesta u otra. La activación de la vía PI3K a través del receptor TrkA, inicia con la fosforilación del residuo Tyr490 y la unión de Shc que conducirán a la activación de PI3K tras su asociación con Grb2 y Gab1, la subunidad catalítica de PI3K fomenta la generación de fosfoinosítoles fosfatos PIP₂ y PIP₃, cambiando así la composición local de la membrana y favoreciendo su afinidad por determinados sustratos como la quinasa Akt, la cual se trasladará a la membrana y se activará, este hecho da como resultado la fosforilación de la subunidad inhibitoria de NF- κ B fomentando la transcripción de genes implicados en la arborización dendrítica y sinaptogénesis (Boersma et al., 2011) AKT también va a fosforilar e inactivar proteínas implicadas en la muerte celular destacando las proteínas pro-apoptóticas Bad (Datta et al., 1997) caspasa 9 (Cardone et al., 1998) la proteína quinasa GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3- β*) (Hetman et al., 2000) y factores de transcripción como los de la familia forkhead (Kops & Burgering, 1999) evitando así la expresión de genes pro-apoptóticos. (Figura 7).

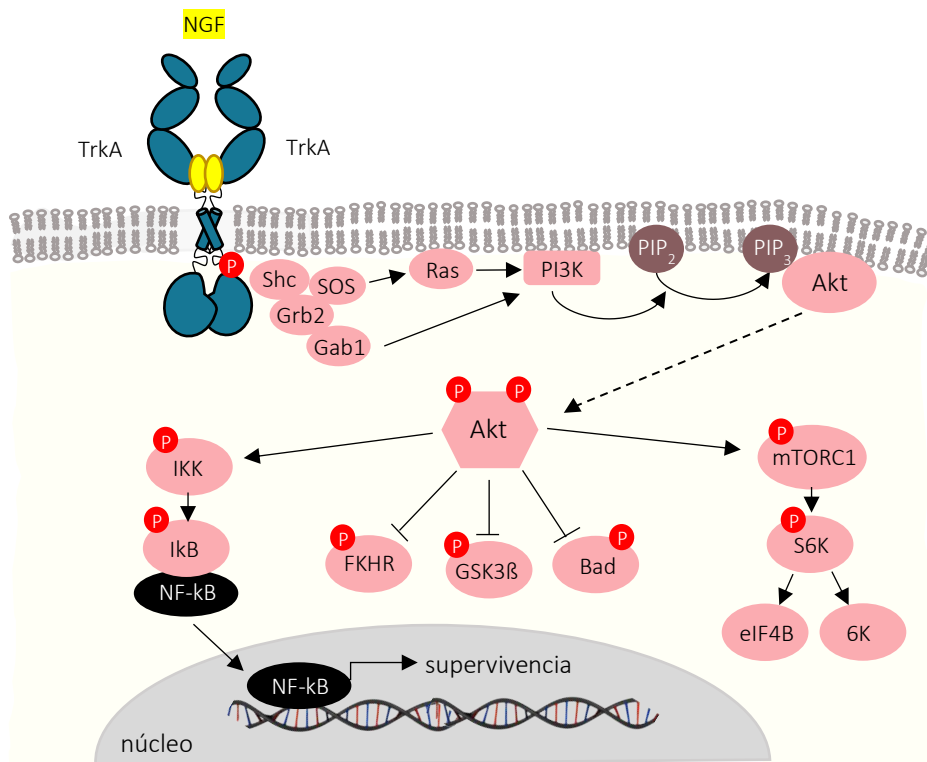


Figura 7. Vía de señalización PI3K/AKT.

1.2.1.3.1 Vía de la PLC γ

La vía de la PLC γ juega un papel crítico en la plasticidad sináptica al modular la liberación de calcio, el calcio está implicado en una multitud de eventos, desde la muerte hasta la transmisión de señales neuronales. También se ha implicado esta ruta en el quimiotropismo del cono de crecimiento (Ming et al., 2001) así como en la hipersensibilidad provocada por NGF (Chuang et al., 2001) y la potenciación a largo plazo de las neuronas del hipocampo que expresan TrkB. La activación de esta vía se inicia tras la unión del dominio SH2 de la PLC γ al residuo fosforilado Tyr785 (Loeb et al., 1994), este acoplamiento conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol (4, 5) bisfosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol tris-fosfato (IP₃). IP₃ provoca una elevación del calcio intracelular, activando enzimas dependientes de calcio, como la calmodulina o quinasas dependientes de calcio/calmodulina y la producción de DAG fomenta la activación de la proteína quinasa C (PKC), implicada en procesos de muerte y diferenciación (Quest et al., 1992) Se sabe que PLC y PKC activan la vía de las MAPK a través de la activación de Raf-1 mediando la extensión de neuritas (Buscher et al., 1995; Troppmair et al., 1992) (Figura 8).

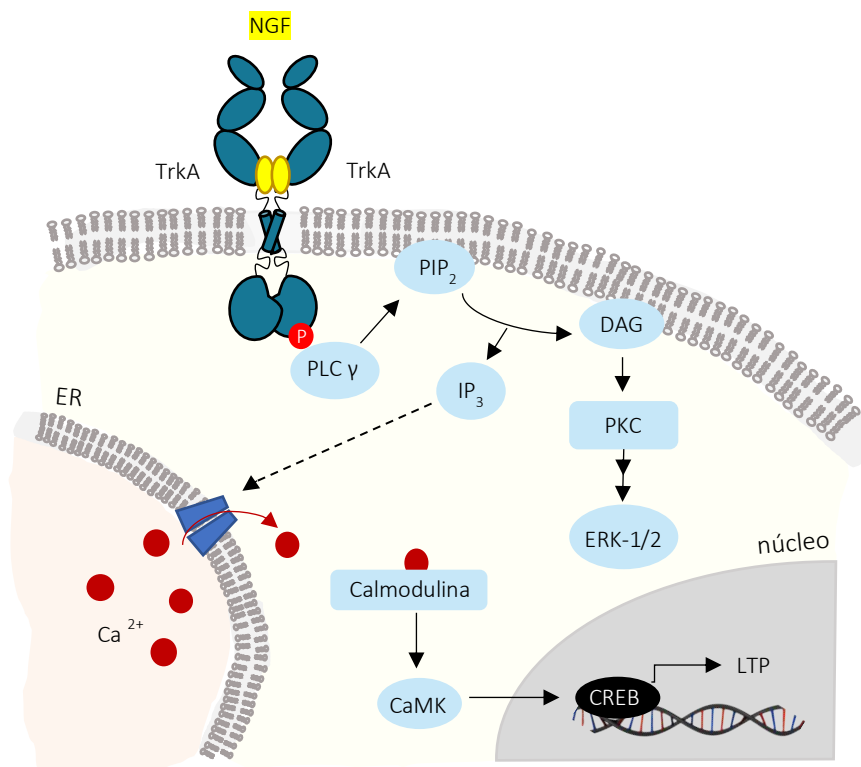


Figura 8. Vía de señalización PLC γ .

1.2.2 Receptor de neurotrofinas p75

1.2.2.1 Estructura y expresión de p75^{NTR}

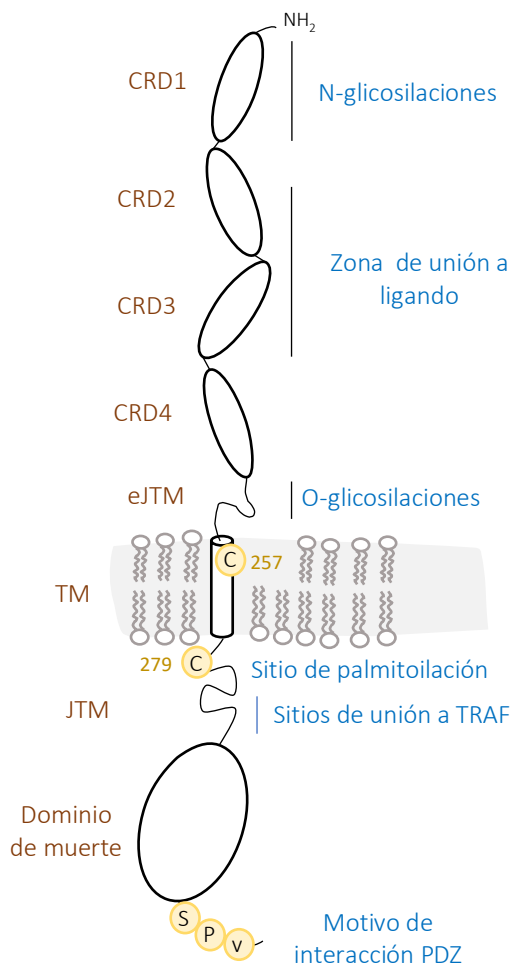


Figura 9. Estructura del receptor p75. Esquema representativo de los diferentes dominios que componen el receptor p75, la porción extracelular contiene cuatro dominios ricos en cisteína (CRD) y múltiples sitios de glicosilación ligados a O y N. El dominio intracelular contiene un sitio de palmitoilación en la cisteína 279, dos sitios potenciales de unión a TRAF, un dominio de muerte de Tipo II, y un motivo de secuencia SPV de unión al dominio PDZ.

El receptor de neurotrofinas p75^{NTR} forma parte de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral (TNFR) y se encuentra bien conservado entre especies de vertebrados, cuenta con una porción extracelular que sufre N- y O-glicosilaciones, con cuatro regiones ricas en cisteínas (CR1-CR4) colocadas en tándem con tres puentes disulfuro intracatenarios aportándole su estructura característica, es esta región la responsable de la interacción con el ligando (Figura 9) (Chapman & Kuntz, 1995; Shamovsky et al., 1999). Cuenta con un único dominio transmembrana que tiene con un residuo de cisteína conservado (Cys257) que le permite formar dímeros covalentes de manera constitutiva (Figura 9) (Vilar et al., 2009) y cuenta con una porción intracelular que también puede sufrir modificaciones post-traduccionales como la palmitoilación de su residuo Cys279 así como la fosforilación de sus residuos de treonina y serina (Barker et al., 1994). Esta región posee un dominio de muerte celular (DD) propio de los miembros pro-apoptóticos de esta familia, identificado originalmente en TNFR1 donde al deletar una región de 80 residuos de la porción C-terminal se observó la anulación de señales citotóxicas asociadas con el receptor (Tartaglia et al., 1993). Los receptores TNFR no poseen actividad enzimática, sin embargo

la activación se lleva a cabo mediante el reclutamiento de proteínas de señalización a esta región intracelular que terminarán por desencadenar la señalización seguida por la acción del factor de transcripción NF- κ B y la proteína JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) (Friedman, 2000).

Como se detalló anteriormente p75^{NTR} puede unir todas las neurotrofinas, la resolución de la estructura cristalina de p75^{NTR} junto con las neurotrofinas arrojó luz sobre la estequiometría de interacción p75:neurotrofina, observando un ratio 2:2 para NT-3, 2:2 para pro-NGF y 1:2 para NGF (Aurikko et al., 2005), siendo este último algo

controvertido puesto que la unión de $p75^{NTR}$ con las neurotrofinas se produce en una región con un alto grado de conservación entre ellas, lo que explica la capacidad de interactuar con todas ellas tanto en sus formas maduras e inmaduras. Estudios posteriores sugirieron que esta interacción es un proceso dinámico que llevaría paulatinamente a una estequiometría 2:2. La unión a estos ligandos diméricos es una característica que aleja a $p75^{NTR}$ de su propia familia TNFR, caracterizada por unir ligandos triméricos, sin embargo, este gran abanico de interacción con las neurotrofinas explica su amplio patrón de expresión a nivel celular, localizándose en numerosas poblaciones neuronales (Chao & Hempstead, 1995) pudiendo encontrarse durante las fases tempranas de la embriogénesis en células derivadas de las tres capas germinales alcanzando niveles máximos de expresión durante el desarrollo que posteriormente disminuyen de forma drástica en la etapa adulta restringiéndose a determinadas poblaciones celulares (Friedman et al., 1991); el SNC se ha podido identificar en motoneuronas de la espina dorsal, el núcleo talámico, la capa molecular externa del cerebelo y células de Purkinje (Roux & Barker, 2002) mientras que en el SNP sólo las neuronas simpáticas, sensoriales y algunas subpoblaciones de neuronas parasimpáticas mantienen la expresión del receptor en la etapa adulta (Schatteman et al., 1988; Schatteman et al., 1993). Dentro de su rango de expresión no neuronal, $p75^{NTR}$ se encuentra incrementada en células mesenquimales de diversos órganos (pulmón, riñón, músculos, retina etc.), células perivasculares y estructuras epiteliales en desarrollo como meninges, glándulas salivales, células perivasculares y folículos pilosos (Roux & Barker, 2002).

1.2.2.2 Isoformas y procesamiento

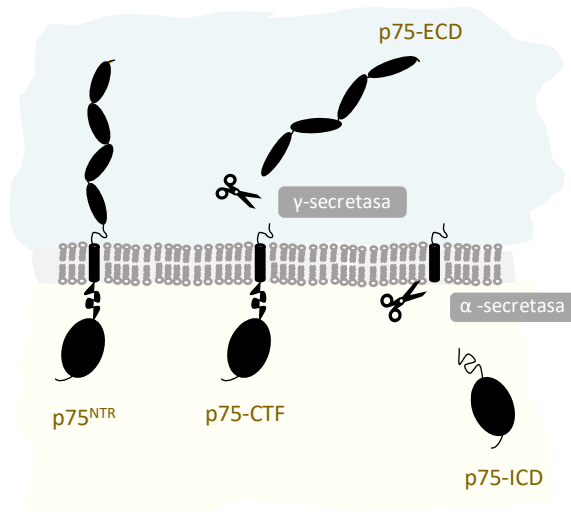


Figura 10. Esquema del corte proteolítico de $p75$. El procesamiento proteolítico transmembrana que sufre $p75$ se da en dos pasos. El primero viene mediado por la α -secretasa que libera el fragmento ECD al medio extracelular, generando el fragmento $p75$ -CTF que permanece anclado a la membrana, que será posteriormente cortado por la γ -secretasa, liberando el fragmento $p75$ -ICD al citosol.

El receptor $p75^{NTR}$ se ve afectado por fenómenos proteolíticos, conocido como RIP (*The regulated intramembrane proteolysis*) (Figura 10); Originalmente se describió este procesamiento en células de Schwann (DiStefano & Johnson, 1988), donde $p75^{NTR}$ es cortado por una α -secretasa, ADAM17/TACE (*ADAM metalloproteinase domain 17/ Tumor necrosis factor- α -converting enzyme*) y por una γ -secretasa generando un fragmento anclado a la membrana y un fragmento intracelular libre respectivamente (Figura 10) (Kanning et al., 2003; Weskamp et al., 2004), la activación de la γ -secretasa requiere el ensamblaje del complejo multiprotéico que incluye presinilina, nicastrina, APh-1 y APh-2 (De

Strooper, 2003). Este proceso puede ser regulado por los niveles de colesterol y palmitoilación. La función biológica de este fenómeno de proteólisis no es del todo conocido, pero diversos estudios han descrito la relevancia del RIP de p75^{NTR} en procesos de supervivencia celular, muerte y crecimiento celular. (Ceni et al., 2010; Kenchappa et al., 2010).

Existe una isoforma truncada de p75^{NTR}, denominada short-p75, producto de fenómenos de *splicing* alternativo, el cual asemeja al fragmento p75-CTF. Se encuentra anclado a la membrana y carece de la porción extracelular, detalle que le impide unir neurotrofinas. Sin embargo, se ha descrito que es capaz de iniciar ciertas vías de señalización. (Lee et al., 1992).

1.2.2.3 Señalización e interacción con co-receptores

Desde su descubrimiento se ha atribuido a p75^{NTR} un complejo y amplio rango de funciones que se ve determinado por su asociación y dimerización con diferentes correceptores así como su activación directa por los distintos ligandos, ello nos lleva a adjudicarle procesos de supervivencia celular (Mahadeo et al., 1994), muerte celular (Arnett et al., 2007), modulador del ciclo celular y diferenciación de células progenitoras (Frade, 2000); todos estos procesos contribuyen en su medida al desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. (Bothwell, 2014; Meeker & Williams, 2015). Para llevar a cabo parte de estos procesos, se requiere la interacción de p75^{NTR} con otras proteínas de membrana (co-receptores) (Figura 11), dentro de los cuales se encuentra La Sortilina, quien formará con p75^{NTR} un complejo afin a las pro-neurotrofinas, desencadenando la activación de vías apoptóticas a través del factor de transcripción JNK-3 y la activación de c-Jun (Lee et al., 2001); Otro co-receptor es Nogo/LINGO-1, la interacción de p75^{NTR} con ambas proteínas es importante para el control del crecimiento neuronal, las proteínas inhibitoras asociadas a mielina como Nogo-66, MAG (myelin associated glycoprotein) y OMgp (Oligodendrocyte myelin glycoprotein) se unen al complejo NogoR/LINGO/ p75^{NTR} y suprimen el crecimiento y la regeneración axonal, modulando la activación de la proteína RhoA, un regulador intracelular del citoesqueleto que al activarse inhibe la elongación axonal (Mi et al., 2004). Finalmente, dentro de los co-receptores que interaccionan con p75^{NTR} se encuentran los receptores Trk, donde p75^{NTR} aumenta la afinidad y especificidad de los receptores Trk por las distintas neurotrofinas, se ha descrito que esta asociación provoca un aumento de la señalización de supervivencia promovida por los Trk; curiosamente, p75^{NTR} puede unir Shc, estimulando su fosforilación y activación de las vías de señalización, regulando de forma importante la señal promovida por los Trk (Arevalo et al., 2006).

1.2.2.3 Señalización e interacción con co-receptores

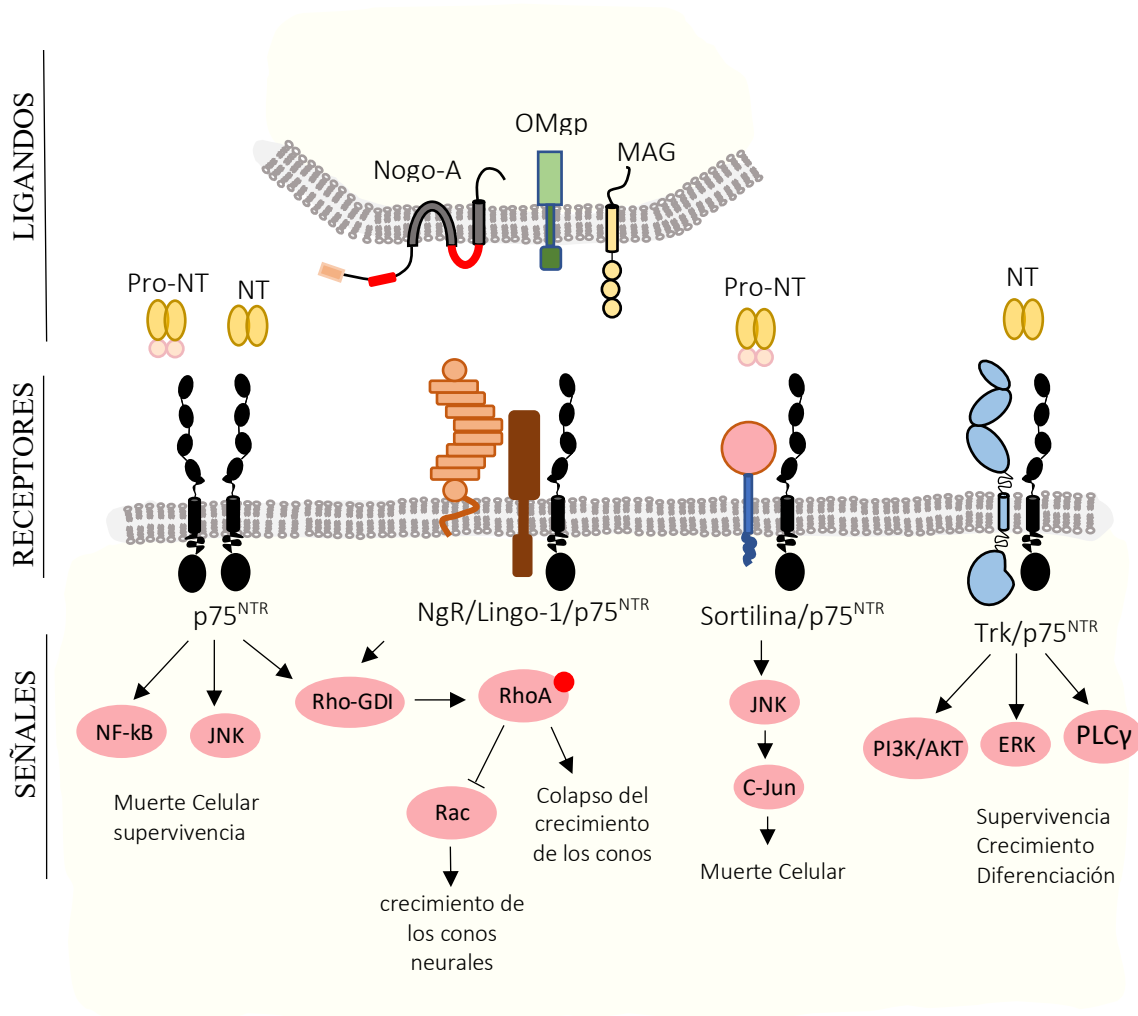


Figura 11. Señalización de p75^{NTR} con co-receptores. p75^{NTR} interactúa con los receptores: sortilina, LINGO-1, NgR y Trk (A, B y C), el resultado de estas interacciones es una variedad de respuestas celulares que incluyen muerte celular, plasticidad sináptica, desarrollo de neuritas y regulación del ciclo celular, se representan las principales rutas que se activan en cada complejo tras la unión de sus respectivos ligandos que se representan en la parte superior de cada complejo. Estas diversas interacciones otorgan al p75^{NTR} la capacidad de desempeñar un papel fundamental en la regulación de numerosos procesos que determinan el destino y las funciones de la célula. MAG: glucoproteína asociada a mielina MAG, OMgp: glucoproteína de mielina oligodendrocitaria, NT: neurotrofinas maduras, pro-NT: pro-neurotrofinas.

Como se describió anteriormente al no poseer actividad catalítica el receptor p75^{NTR} requiere de la asociación de proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Tabla 1) para llevar a cabo la señalización, se ha descrito extensamente que p75^{NTR} activa las vías de NF-κB, Akt y JNK para inducir la apoptosis o para promover la supervivencia y diferenciación celular (Nykjaer et al., 2005; Roux & Barker, 2002).

| PROTEINAS ADAPTADORAS DEL RECEPTOR P75 | | | |
|---|------------------|--|---|
| PROTEINAS ADAPTADORAS | DOMINIO DE UNIÓN | SEÑALIZACIÓN | REFERENCIAS |
| NRIF (<i>Neurotrophin receptor-interacting factor</i>) | JTM / DD | Apoptosis, bloqueo ciclo celular | Casademunt et al., 1999 |
| SC-1 (<i>Schwann cell factor 1</i>) | JTM | Bloqueo ciclo celular | Cittka y Chao , 1999 |
| RhoA (<i>Ras homolog family member A</i>) | DD | Elongación neurítica | Yamashita et al., 1999 |
| FAP-1 (<i>Fas associated phosphatase 1</i>) | SPV | Supervivencia, activación NF-κB | Irie et al., 1999 |
| TRAF4 (<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 4</i>) | JTM | Apoptosis, supervivencia, activación NF-κB | Ye et al., 1999 |
| TRAF6 (<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>) | JTM | Apoptosis, supervivencia, activación NF-κB | Khursigara et al, 1999 Ye et al., 1999 |
| NRAGE (<i>Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog</i>) | JTM | Apoptosis, bloqueo ciclo celular | Salehi et al., 2000 |
| NADE (<i>p75 associated death executor</i>) Bex3 (<i>Brain expressed X-linked 3</i>) | DD | Apoptosis | Mukai et al., 2000 |
| RIP2 (<i>Receptor- interacting protein 2</i>) | DD | Supervivencia, activación NF-κB | Khursigara et al, 2001 |
| IRAK (<i>Interleukin 1 receptor-associated kinase</i>) | DD | Supervivencia, activación NF-κB | Mamidipudi et al., 2002 |
| Bex1 (<i>Brain expressed X-linked 1</i>) | DD | Bloqueo ciclo celular | Vilar et al., 2006 |
| Sall2 (<i>Sal like protein 2</i>) | DD | Bloqueo ciclo celular | Pincheira et al., 2009 |

Tabla 1. Proteínas adaptadoras del receptor p75. Adaptado y actualizado de Roux & Barker, 2002. JTM: dominio yuxtamembrana; DD: dominio de muerte.

2. DIMERIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE TRKA

La resolución de la estructura cristalina TrkA/NGF permitió determinar que el receptor TrkA era capaz de unir su ligando a través del dominio TrkA-d5 (Ig2). (Wiesmann et al., 1999) mostrando un dímero de TrkA unido a su respectivo homodímero de NGF, siguiendo así el modelo de activación actualmente aceptado en el que NGF induce la dimerización de TrkA con la consiguiente trans-fosforilación del dominio quinasa (Endres et al., 2014). Sin embargo, los verdaderos mecanismos moleculares de activación de TrkA aún no se conocen, lo que ha llevado a establecer diversos modelos de activación del receptor y de la conformación de sus dímeros (Mischel et al., 2002; Shen & Maruyama, 2011)

A pesar de ello, con el tiempo se han adjudicado roles importantes a determinadas regiones en la activación del receptor TrkA, como lo es la región Ig 2 que evita la activación espontánea del receptor en ausencia de ligando. (Arevalo et al., 2000; Zaccaro et al., 2001) y se sugiere la existencia de contactos entre el dominio TM para el mantenimiento y estabilización de los homodímeros del receptor (Ahmed & Hristova, 2018). Estudios previos sugieren que la región intracelular requiere una orientación específica de los dominios quinasa del dímero que se podría establecer por un reordenamiento a lo largo del receptor mediado por su ligando. (Bocharov et al., 2010; Fleishman et al., 2002), ello realza la importancia de la región extracelular, incluyendo la región yuxtamembrana que forma parte de ella para la transducción de señales como se propone en algunos receptores tirosina quinasa (Chavent et al., 2014). Curiosamente, estudios recientes han demostrado la importancia de la región yuxtamembrana extracelular en la formación de dímeros de TrkB, así como su implicación en la activación del receptor (Shen et al., 2019). Desde luego se trata de un mecanismo de activación complejo. Aunque se haya determinado que cada neurotrofina se une a su respectivo Trk de la misma forma (Patapoutian & Reichardt, 2001). Dentro del mismo sistema, NT-3, que también activa TrkA ha mostrado una gran capacidad para mantener la activación de TrkA a largo plazo. Sin embargo, NT-3 es menos eficaz en conseguir la activación aguda de TrkA y aunque NT-3 y NGF activen el receptor, NT-3 no puede sustituir al NGF para ayudar en la internalización del receptor y fomentar la señalización retrógrada para promover la supervivencia del axón distal (Kuruvilla et al., 2004) ya que, a diferencia del NGF, el complejo NT-3/TrkA se disocia al pH ácido de los endosomas y no puede mantener la activación sostenida del receptor internalizado para transmitir señales al soma celular (Harrington et al., 2011) más aún, durante el desarrollo de las neuronas simpáticas, la unión de TrkA a NT-3 media la extensión inicial del axón hacia el tejido diana y un cambio en los ligandos de NT-3 a NGF media luego la ramificación terminal y la inervación sináptica una vez que se alcanza la diana. (Kuruvilla et al., 2004), lo que demuestra que los receptores de TrkA pueden responder de manera diferente, dependiendo del estímulo proporcionado, mostrando una vez más la complejidad del sistema. Por otro lado, se ha hipotetizado que los ligandos que conducen a resultados biológicos diferentes podrían estabilizar de forma diferencial dímeros de receptores tirosina quinasa como se observó con EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) (Freed

et al., 2017; Zinkle & Mohammadi, 2018), tras esta hipótesis, estudios recientes han observado diferencias en la estabilidad de los dímeros de TrkA unidos a NGF y unidos NT3 en la membrana plasmática a pH neutro (Ahmed et al., 2021).

Actualmente se asume que la dimerización de TrkA ocurre únicamente como consecuencia de su interacción con el ligando. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de dímeros preformados en ausencia de NGF, donde estudios recientes sugieren que TrkA se encuentra como un dímero preformado inactivo establecido por contactos entre ambos receptores Trk (Marchetti et al., 2013; Mischel et al., 2002; Shen & Maruyama, 2011). Se han establecido así modelos de transición donde los receptores podrían interactuar por contactos laterales formando dímeros inactivos que se podrían estabilizar tras la unión con su ligando, promoviendo un cambio conformacional con la consiguiente activación del receptor (Ahmed & Hristova, 2018). Todos estos estudios centran su atención en la naturaleza del receptor en la membrana plasmática, describiéndose monómeros, dímeros e incluso estructuras más complejas que podrían ser tetrámeros u oligómeros en ausencia de NGF y en un porcentaje menor (Marchetti et al., 2013; Maruyama, 2014). La idea de la necesidad de un cambio conformacional del receptor TrkA para su activación explicaría la posición adoptada por el dominio tirosina quinasa tras resolverse la estructura cristalina, el cual corresponde a la de un dímero inactivo, cuya reorientación mediada por el ligando daría lugar a la fosforilación de los residuos de tirosina (Artim et al., 2012; Bertrand et al., 2012).

3. INTERACCIÓN ENTRE TrkA Y p75^{NTR}

Como se mencionó anteriormente NGF puede unirse a dos receptores de membrana, el receptor p75^{NTR} y el receptor TrkA. p75^{NTR} se identificó en un inicio como un receptor de baja afinidad, por la afinidad nanomolar que presentaba por el ligando y el receptor TrkA se identificó originalmente como un receptor de alta afinidad (Jing et al., 1992). Sin embargo, estudios cinéticos posteriores mostraron que ambos receptores pueden unir de forma independiente NGF con una K_D de afinidad similar y relativamente baja, entre 10^{-9} y 10^{-10} M, (Mahadeo et al., 1994) resaltando que la coexpresión de receptor p75^{NTR} con TrkA tiene un impacto positivo sobre la afinidad de TrkA por su ligando NGF, alcanzando una K_D 10^{-11} M (Esposito et al., 2001; Hempstead et al., 1991) y mejorando su tasa de asociación 25 veces, aumentando así sus propiedades de unión y mejorando su respuesta al ligando. Este descubrimiento planteó la posible interacción entre ambos receptores con la consiguiente formación de un complejo de unión de alta afinidad (Bothwell, 1995; Wehrman et al., 2007). A partir de ahí se establecieron teorías que pudieran explicar el comportamiento de TrkA en presencia de p75^{NTR}, dentro de ellas se planteó la formación de un complejo heteromérico entre p75^{NTR} y un dímero de TrkA, donde se generen cambios alostéricos que incrementen la unión de NGF a TrkA de forma independiente de su unión a p75^{NTR} (Hasegawa et al., 2004; Huber & Chao, 1995). Se planteó también que la coexpresión de p75^{NTR} genera un incremento local de la concentración de NGF, favoreciendo así la unión de NGF a TrkA (Wehrman et al., 2007). Teniendo en cuenta las tasas tan rápidas de asociación y disociación que tiene p75^{NTR} se

propuso una unión secuencial del ligando, una primera unión de NGF a p75^{NTR} quien luego liberará el ligando para pasárselo a TrkA (Barker, 2009). De forma general p75^{NTR} consigue aumentar las señales de crecimiento y supervivencia mediadas por TrkA (Bibel et al., 1999).

2.1. ESTUDIOS FUNCIONALES

La relación TrkA/p75 ha sido ampliamente documentada y la evidencia de una variedad de sistemas ha sugerido que cooperan en la transducción de señales de NGF (Yano & Chao, 2000). Estudios funcionales iniciales sobre la habilidad de las células progenitoras neuronales para experimentar diferenciación neuronal mediada por la activación de TrkA, mostró que las células que coexpresaban TrkA y p75^{NTR} dejaban de dividirse mostrando un aumento dramático en la fosforilación de TrkA adquiriendo así una morfología neuronal madura de manera más rápida y eficiente que las células progenitoras que expresaban únicamente TrkA (Verdi et al., 1994). Se determinó que una versión mutante de NGF capaz de unirse y activar a TrkA pero incapaz de unirse a p75^{NTR}, por debajo del rango nanomolar era de 3 a 4 veces menos eficaz que el NGF salvaje para apoyar la supervivencia de las neuronas sensoriales en desarrollo (Ryden et al., 1997) brindándole así un rol activo a p75^{NTR} dentro del complejo de unión del alta afinidad. Se describió como anticuerpos contra p75^{NTR} redujeron la fosforilación de TrkA mediada por NGF en células PC12 y en neuronas primarias (Roux & Barker, 2002) y ensayos sobre la supervivencia de neuronas simpáticas embrionarias y postnatales revelaron que el efecto potenciador de p75^{NTR} sobre TrkA estaba presente de una forma muy evidente en estadios de desarrollo donde los niveles de TrkA y p75^{NTR} eran similares (Horton et al., 1997). Ello explica porque en ratones deficientes (KO) en p75^{NTR} se requiere una mayor concentración de NGF para conseguir la supervivencia neuronal (Lee et al., 1994). Cabe destacar que los patrones de expresión de ambos receptores se solapan ampliamente y en algunos casos como las neuronas de los ganglios dorsales (DRGNs), TrkA se expresa únicamente con p75^{NTR} (Rifkin et al., 2000). Por lo tanto, como fisiológicamente p75^{NTR} y TrkA coexisten en varios niveles de expresión y durante diferentes etapas del desarrollo neuronal (Barrett & Bartlett, 1994; Wyatt & Davies, 1993) la diferente proporción de p75^{NTR} a TrkA se vinculó a la decisión entre la supervivencia y la muerte de neuronas que responden a NGF.

2.2. INFLUENCIA SOBRE LA SELECTIVIDAD DE LIGANDOS

Se ha informado que la presencia de p75^{NTR} no solo modula la afinidad de los receptores Trk, también es capaz de modular la selectividad de los receptores por las neurotrofinas, en el caso de TrkA, se ha observado que la expresión de p75^{NTR} reduce considerablemente la activación de TrkA por NT-3, neurotrofina por la cual TrkA tiene menor afinidad en comparación con NGF, de tal forma que la coexpresión de ambos receptores fomenta la activación de TrkA única y exclusivamente por NGF (Arevalo & Wu, 2006; Reichardt, 2006) Estudios previos revelaron que la reducción de los niveles de p75 en las células PC12 mejora la capacidad de respuesta de TrkA a NT-3 dando lugar al crecimiento de

neuritas (Benedetti et al., 1993). El impacto fisiológico que tiene esta característica de $p75^{NTR}$ al coexpresarse con TrkA es crucial en ciertos procesos biológicos, como el crecimiento del axón simpático y la posterior invasión del tejido diana, donde se requiere una señalización inicial de TrkA mediada por NT-3 que fomente la elongación del axón hasta la diana, donde se produce un cambio de afinidad de NT-3 a NGF mediada por la expresión de $p75^{NTR}$ (Figura 12), estudios recientes han descrito que en las neuronas simpáticas, la activación de TrkA dependiente de NGF conduce a la activación de Arf6 que promueve el tráfico de $p75^{NTR}$ desde las reservas vesiculares intracelulares hasta la superficie celular, mientras que la activación de TrkA por NT-3 no lo hace (Hickman et al., 2018). Siguiendo esta misma línea, la expresión de $p75^{NTR}$ provoca una reducción de la sensibilidad de los axones a NT-3, permitiendo así una sensibilidad exclusiva de los axones por NGF para fomentar la ramificación terminal. (Kuruvilla et al., 2004).

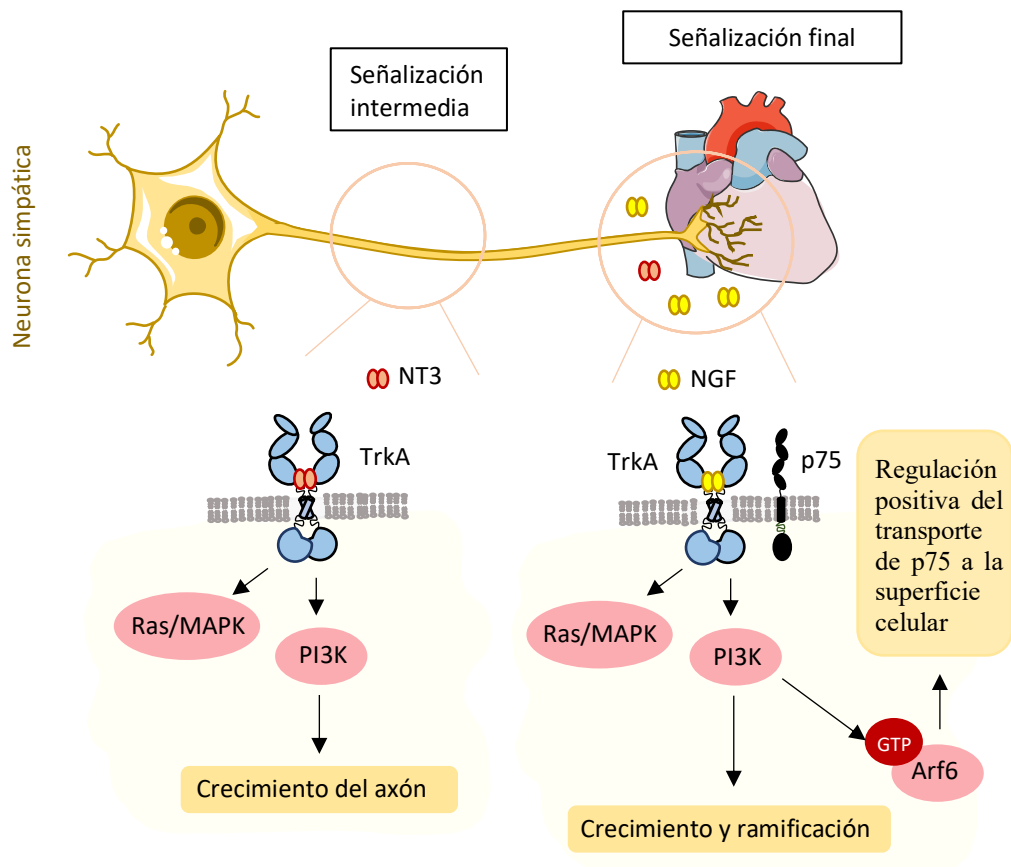


Figura 12. Señalización de TrkA en el proceso de Inervación del tejido diana por neuronas simpáticas. Durante el crecimiento axonal las neuronas simpáticas responden a NT3 mediante su unión a TrkA, en ausencia de $p75^{NTR}$. La unión de TrkA a NT-3 media la extensión inicial del axón hacia el tejido diana y una vez que el axón alcanza el objetivo se percibe un incremento local de NGF secretado por los propios tejido diana, iniciando la activación de PI3K, que estimula la unión de GTP de Arf6, iniciando así el transporte de $p75^{NTR}$ desde las vesículas internas a la superficie celular; La presencia de $p75^{NTR}$ es crucial para la selectividad de NGF y NT3 por TrkA, de forma que el receptor deja de responder a NT3, promoviendo la ramificación terminal y la invasión mediada por la unión TrkA/NGF, cambio que provoca que las neuronas simpáticas se vuelven dependientes de NGF para sobrevivir.

2.3. EVIDENCIAS DE INTERACCIONES DIRECTAS

Aunque el efecto de p75^{NTR} sobre el receptor TrkA está muy bien documentado, el mecanismo por el cual ocurre no se ha podido determinar a partir del análisis de los datos de estructura cristalina disponibles (Wehrman et al., 2007). Se han utilizado diversas técnicas a fin de arrojar luz sobre el tipo de asociación que existe entre ambos receptores. Estudios iniciales de difusión lateral de receptores p75^{NTR} marcados en la membrana celular, mostraron que p75^{NTR} es muy móvil en ausencia de TrkA y se inmoviliza en células que expresan TrkA endógeno. Se observó también que la introducción de TrkA en células que carecen de TrkA endógeno inmovilizó p75^{NTR} en ausencia de NGF (Wolf et al., 1995). Sugiriendo entonces, una asociación física entre ambos. Las técnicas de co-inmunoprecipitación son un indicador de la interacción entre ambas proteínas (Huber & Chao, 1995; Jung et al., 2003), mediante esta técnica se demostró que la actividad de los receptores Trk puede ser necesaria para la formación del complejo (Bibel et al., 1999). Se proporcionó evidencia de que estas interacciones receptor-receptor están reguladas por la proporción de expresión de TrkA y p75^{NTR} e involucra los dominios transmembrana e intracelular de ambos receptores (Esposito et al., 2001; Sykes et al., 2012). Se observó que el fragmento C-terminal que compone la porción intracelular de p75^{NTR}, producto de la proteólisis intramembrana del receptor (RIP), mejoraba la unión de NGF a TrkA en neuronas (Matusica et al., 2013), incluso se ha sugerido, mediante ensayos de FRET, que esta asociación tiene lugar en la superficie celular y antes de la estimulación con NGF, observando estos resultados en células COS-7 y cultivos primarios de neuronas del hipocampo (Iacaruso et al., 2011), abriendo así, otro debate sobre la naturaleza del complejo en ausencia de ligando. Como detalle adicional, *in vitro*, se ha descrito que la activación de TrkA por NGF promueve el corte de p75^{NTR} por α -secretasa (ADAM17) (Ceni et al., 2010; Urra et al., 2007), sugiriendo que la fosforilación por MAPK puede regular la función proteolítica de las secretasas de membrana independiente de la unión del ligando a p75^{NTR} (Diaz-Rodriguez et al., 2002). La estrecha relación entre TrkA y ADAM17 ha planteado la posibilidad de que ADAM 17 sea una parte integral del complejo TrkA/ p75^{NTR}, similar a la asociación de ADAM10 con el complejo del receptor efrinas/Eph (Janes et al., 2005). De hecho, se ha descrito que el p75-CTF puede formar un complejo con TrkA (Jung et al., 2003), reforzando la idea de la estrecha relación física entre ambos.

2.4. CONVERGENCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Algunos trabajos sugieren que TrkA y p75^{NTR} probablemente se comunican a través de la convergencia de vías de señalización aguas abajo y de moléculas adaptadoras compartidas (Wehrman et al., 2007). Si bien la señalización de TrkA está involucrada en la supervivencia y la diferenciación, p75^{NTR} puede mediar rutas de muerte celular, crecimiento axonal, supervivencia y diferenciación celular, esto depende de los ligandos y factores asociados al receptor. Diversos trabajos muestran que la activación de Trk modula la señalización de p75^{NTR}, de tal forma que las señalizaciones pueden ser excluyentes bajo el mismo ligando. Así, en células que expresan ambos receptores las

señales pro-supervivencia mediadas por Trk prevalecen sobre las señales pro-apoptóticas mediadas por p75^{NTR} (Underwood et al., 2008; Yoon et al., 1998). Característica que se ha observado en neuronas simpáticas y oligodendrocitos (Majdan et al., 2001). Se ha descrito que cuando se activa el receptor TrkA hay una reducción en los incrementos de p53 y fosfo-JNK mediados por p75^{NTR}. Aunque los mecanismos que permiten que Trk suprima la señalización pro-apoptótica de p75^{NTR} no están del todo esclarecidos, algunos trabajos apuntan a que TrkA podría bloquear la producción de ceramida dependiente de p75^{NTR}, a través de una ruta que involucraría a PI3K (Bilderback et al., 2001) porque estos efectos de hidrólisis de esfingomielina y acumulación de ceramida intracelular solo se observan en células que carecen de expresión de TrkA (Culmsee et al., 2002; Dobrowsky et al., 1994), por otro lado hay estudios que señalan que la presencia de p75^{NTR} mejora la fosforilación de Shc (isoformas 46 y 52 kDa) durante la activación de TrkA por NGF, más no lo hace con otros sustratos (Epa et al., 2004). Aunque estos resultados atribuyen una asociación física entre p75^{NTR} y Shc observada por co-inmunoprecipitación, no excluye la existencia de un complejo de unión de alta afinidad. Para añadir más complejidad al sistema, se sabe que el fragmento C-terminal de p75^{NTR}, producto del proceso proteolítico que sufre, tiene la capacidad de señalar de forma independiente (Kanning et al., 2003; Skeldal et al., 2012) e interactuar con TrkA (Jung et al., 2003), involucrándolo en procesos de supervivencia celular, muerte y crecimiento celular.

4. ROL DE TrkA EN LA NOCICEPCIÓN

En línea con lo descrito anteriormente, una correcta señalización del receptor TrkA permitirá la formación y mantenimiento de varios tipos de neuronas que son esenciales para mediar la comunicación recíproca entre el cerebro y el resto del cuerpo (Huehne et al., 2008; Indo, 2012), por ejemplo, las neuronas aferentes primarias con fibras delgadas, un grupo de neuronas dependientes de NGF reciben estimulación relacionada con la temperatura y el estrés mecánico (Indo, 2012). Curiosamente, estudios han mostrado que estas fibras aferentes también transmiten un sentido del interior del cuerpo. Por otro lado, las neuronas posganglionares simpáticas autónomas que regulan los procesos de inflamación, sudoración, dolor y prurito también están reguladas por NGF (Indo, 2012). El NGF no es solo un factor trófico, también funciona como una de las moléculas clave para mediar el dolor inflamatorio y el dolor neuropático en el sistema nervioso periférico (Chuang et al., 2001). Las enfermedades que afecten la codificación de TrkA o provoquen pérdida de función del receptor, alteran el crecimiento de axones, provocan defectos en el desarrollo de las neuronas sensoriales y fomentan la neurogénesis resultando en una falta completa de fibras nerviosas amielínicas y células pequeñas en los ganglios de la raíz dorsal y la piel (Figura 13) (Bonkowsky et al., 2003). En ratones que carecen del gen NTRK1, que codifica para el receptor TrkA se observaron neuropatías sensoriales y simpáticas graves, la mayoría murió al mes de nacer, se describió una pérdida extensa de células neuronales en los ganglios de la raíz dorsal, simpática y trigémino, así como una disminución en las proyecciones colinérgicas del prosencéfalo basal hacia el hipocampo y la corteza. (Smeyne et al., 1994).

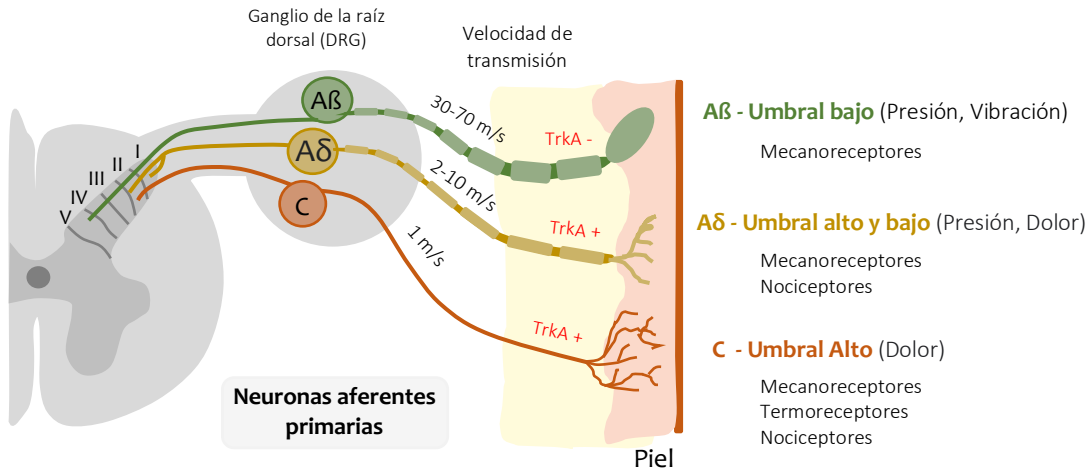


Figura 13. Sensibilización periférica mediada por neuronas aferentes primarias. Esquema de la terminación de los tipos de fibras nociceptoras en la piel, fibras C y fibras A (β y δ), se estima que un $\sim 30\%$ de las fibras nerviosas sensoriales de la piel son positivas para el receptor TrkA, predominando su expresión en las fibras C ($\sim 20\%$), fibras delgadas amielínicas responsables del dolor mecánico, calor y estímulos químicos y también presente en las fibras A δ ($\sim 10\%$), fibras delgadas finamente mielinizadas responsables del dolor mecánico y estímulos térmicos molestos y ausente en las fibras A β , fibras densamente mielinizadas responsables de responder a estímulos mecánicos no nocivos

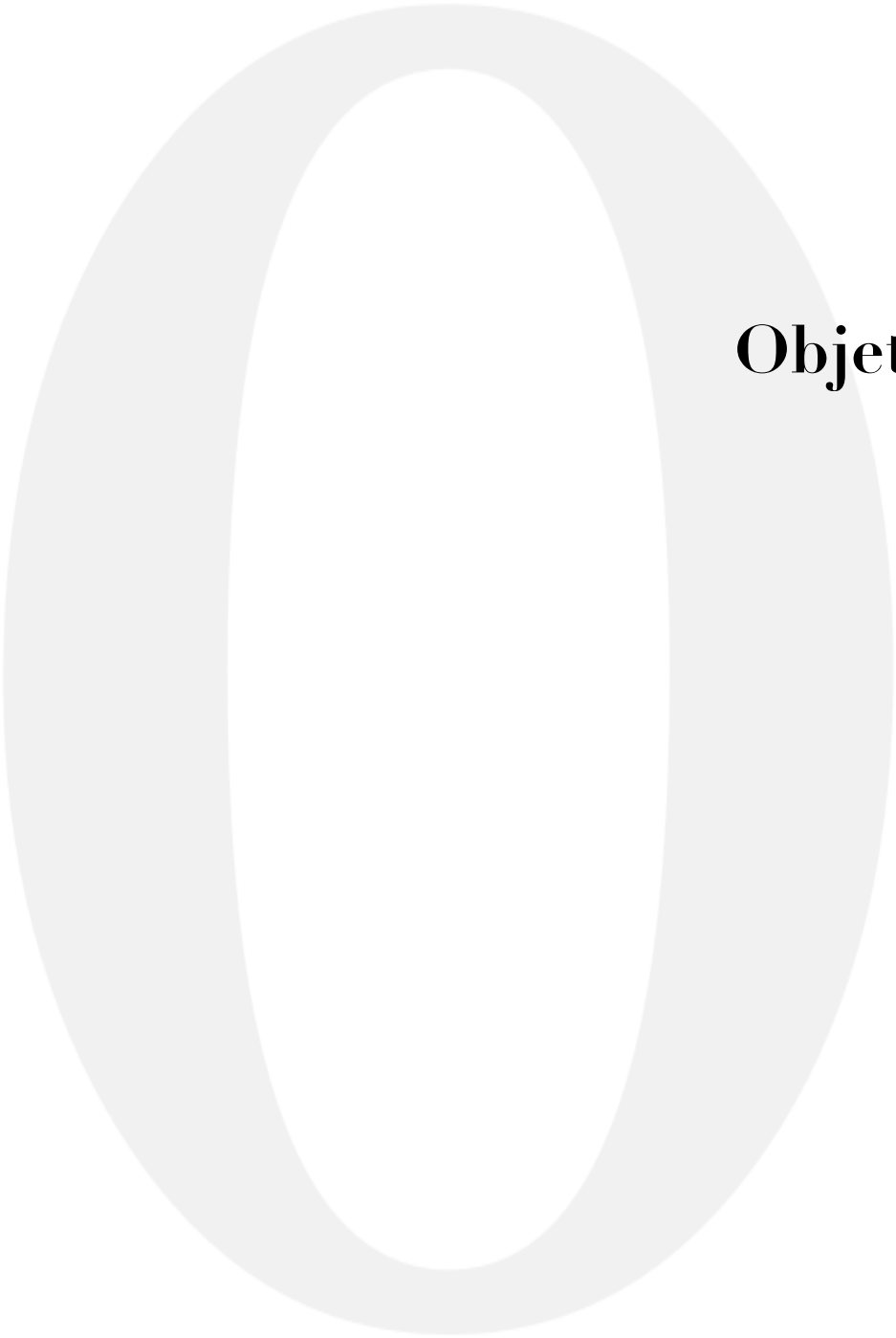
4.1. IMPLICACIÓN DE TrkA EN LA ENFERMEDAD DE CIPA

La insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA), también conocida como neuropatía hereditaria sensorial y autónoma tipo IV (HSAN-IV), es un trastorno autosómico recesivo raro (Indo, 2010) con una incidencia de aproximadamente 1 / 125.000.000 (Amin et al., 2017; Daneshjou et al., 2012). Se describió por primera vez en 1932, en 1983 se dio el nombre de neuropatía hereditaria sensorial y autónoma a aquellas enfermedades asociadas con la analgesia (Dyck et al., 1983). No fue hasta el año 1996 que se descubrió e identificó por primera vez el gen NTRK1 como responsable de la enfermedad (Indo et al., 1996). Se han reportado más de 500 mutaciones funcionales asociadas con TrkA según *Genome Aggregation Database* (<http://gnomad.broadinstitute.org>), de las cuales más de 100 se han asociado con la enfermedad de CIPA, pudiendo causar no solo un mal funcionamiento del receptor, también una alteración de la homeostásis protéica afectando las células donde se expresan (Wang et al., 2018). La alteración funcional del receptor se encuentra detrás del fenotipo de la enfermedad, caracterizada por una pérdida sensorial profunda que afecta la percepción del dolor, la temperatura, provoca ausencia de sudoración (anhidrosis) y discapacidad intelectual. (Indo, 2010).

Como consecuencia de las mutaciones sobre el receptor TrkA, los pacientes con CIPA carecen de fibras aferentes primarias A δ y C, razón por la cual son incapaces de responder a los cambios en la condición fisiológica de todos los tejidos del cuerpo, mostrando insensibilidad a los estímulos dolorosos tanto superficiales como profundo, afectando incluso la percepción del dolor visceral (Shorer et al., 2001; Yagev et al., 1999). La ausencia de las neuronas simpáticas autónomas de las glándulas sudoríparas explica la

anhidrosis, característica que aumenta la susceptibilidad a episodios febriles recurrentes (Indo, 2002, 2018). Los pacientes con CIPA también carecen de neuronas posganglionares simpáticas y también carecen de inervación simpática de varios tejidos diana y, por lo tanto, presentan defectos en la regulación simpática. Razón por la cual, no pueden mantener adecuadamente una variedad de procesos neuronales, incluidos los relacionados con las respuestas autonómicas, neuroendocrinas y conductuales en el cuerpo. Características que en su conjunto conducen a la automutilación, fracturas múltiples y deformidades articulares. (Indo, 2010).

La mayoría de personas con CIPA tienen diversos grados de discapacidad intelectual y muestran comportamientos emocionales alterados de moderados a graves (Indo, 2002, 2018). En niños se ha descrito además problemas de aprendizaje y un trastorno por déficit de atención e hiperactividad severo. Estos problemas sugieren defectos o ausencia de poblaciones neuronales dependientes de NGF.(Smeyne et al., 1994). Sin embargo, mutaciones particulares del receptor TrkA se han asociado a fenotipos relativamente leves como la P768L que se asocia con una sensibilidad al dolor parcialmente conservada, mientras que las mutaciones G513A y P762L se han identificado en pacientes sin déficit intelectual o conductas de automutilación (Jung et al., 2003; Ohto et al., 2004). Todo ello resalta la crucial importancia del correcto funcionamiento del receptor TrkA dentro del SNC y SNP.



Objetivos

Objetivos

En el presente trabajo se abordaron tres objetivos principales:

1. Estudiar el mecanismo de activación de TrkA

- 1.1. Determinar la relevancia de la región eJTM y su participación en la unión de NGF y activación de TrkA.
- 1.2. Analizar la implicación del dominio TM de TrkA en la activación del receptor y los residuos involucrados en la dimerización del receptor.

2. Estudiar la interacción entre TrkA y p75^{NTR}

- 2.1. Estudiar la relevancia del dominio TM de TrkA en la formación del heterocomplejo TrkA/P75.
- 2.2. Estudiar el impacto de TrkA en el procesamiento proteolítico de p75 en ausencia y presencia de NGF.

3. Estudiar la implicación del receptor TrkA en la enfermedad de CIPA

- 3.1. Caracterizar tres mutaciones de TrkA identificadas en pacientes españoles con la enfermedad de CIPA.



Materiales y
métodos

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Condiciones y medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las células se utilizó una incubadora a una temperatura de 37°C con un 95% de humedad y un 5% de CO₂. Se emplearon las mismas condiciones para los cultivos primarios procedentes de tejidos aislados de ratón.

- 1.1.1. **Medio de cultivo DMEM completo:** se utilizó *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Corning) conteniendo 4.5 g/L de glucosa, se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) previamente descomplementado a 56° C durante 30 min, 2 mM de L-glutamina (Lonza) y 100U/mL de penicilina/estreptomicina (Hyclone).
- 1.1.2. **Medio de cultivo de la línea de células PC12 y PC12nnr5:** se utilizó el medio de cultivo DMEM completo al cual se le añadió un 5% de suero de caballo (HS, Gibco).
- 1.1.3. **Medio de cultivo de neuronas de corteza:** se utilizó el medio plus Neurobasal (NB, Gibco) suplementado con 0.2% de B-27 (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Lonza) y 25 U/mL de penicilina/estreptomicina (Hyclone).
- 1.1.4. **Medio de cultivo de neuronas del Prosencéfalo Basal (BF):** se utilizó el medio Neurobasal Plus (NB, Gibco) suplementado con B-27 (Gibco), 2mM de L-glutamina (Lonza) y 25 U/mL de penicilina/estreptomicina (Hyclone). Tras 24 h se reemplaza el medio por medio de cultivo fresco que contiene de forma adicional 2 mM de arabinofuranósido de citosina (Ara-C, SIGMA).
- 1.1.5. **Medio de cultivo de neuronas de los ganglios dorsales (DRG):** Se utilizó el medio de cultivo DMEM con 25 U/mL de penicilina/estreptomicina. Al medio se le añadió 50 ng/mL de NGF (Alomone labs) para fomentar la supervivencia y diferenciación de las neuronas.

1.2 Líneas celulares

1.2.1. HeLa

La línea HeLa son células provenientes de un adenocarcinoma cervical humano cuyo nombre se debe a la paciente de la cual fueron aisladas, *Henrietta Lacks* (Scherer et al., 1953). Estas se caracterizan por su rápida y agresiva proliferación, la cual está mediada por una actividad telomerasa exacerbada durante el proceso de división celular, producto de mutaciones genómicas, evitando así la senescencia y fomentando la división perpetua de las células, estas mutaciones fueron adquiridas por el virus del papiloma humano (VPH), la causa mayoritaria de los cánceres cervicales (Villa, 1997). En este trabajo se empleó la línea Hela para la caracterización de los receptores de membrana p75

y TrkA y sus vías de señalización, al carecer esta línea celular la expresión endógena de estos receptores, así como en ensayos de inmunocitoquímica y citometría de flujo. Para expandir las células, éstas se levantaron con 2,5mg/mL de tripsina, se sometieron a centrifugaciones de 900 rpm durante 5min y se utilizó medio de cultivo DMEM completo para su mantenimiento.

1.1.1. HEK293

La línea celular HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) se estableció a partir de un cultivo primario de células embrionarias de riñón humano, el cual se transformó con DNA de adenovirus humano tipo 5 (Graham et al., 1977). Los genes adenovirales expresados en esta línea permitía a las células producir niveles altos de proteínas recombinantes. Además de la alta eficiencia de transfección es una línea ideal para sobreexpresar proteínas de interés. Al igual que la línea celular Hela para expandir el cultivo, se empleó 2,5mg/mL de tripsina para levantarlas, se sometieron a centrifugaciones de 900 rpm durante 5min y se utilizó medio de cultivo DMEM completo para su mantenimiento.

1.1.2. PC12

Las células PC12 son una línea celular derivada de un feocromocitoma de médula suprarrenal de rata, por su origen embriológico se le atribuyen las características de células neuroblásticas pudiendo adquirir fácilmente un fenotipo neuronal como respuesta al estímulo del factor de crecimiento nervioso, NGF (Greene & Tischler, 1976), esto hace que las células PC12 sean útiles como un sistema modelo para la diferenciación neuronal y la neurosecreción por su capacidad de secretar neurotransmisores en pequeñas vesículas. Se caracterizan por su pequeño tamaño y rápida proliferación, su baja adherencia facilita su manipulación. Esta línea celular mantiene una expresión endógena de p75 y de TrkA (Hempstead et al., 1991).

1.1.3. PC12nnr5

Las células PC12nnr5 son una línea derivada de las PC12. Por mutagénesis de etilmetanosulfonato se generaron variantes de PC12 que no respondían a NGF (Greenberg et al., 1986) una de esas variantes, el clon 5, no expresaba TrkA (Loeb et al., 1991) la cual se denominó PC12nnr5. Son un modelo ideal para el estudio de este receptor de neurotrofinas; Mediante la introducción de un receptor de TrkA se puede restaurar la capacidad de respuesta al NGF que lo hace indistinguible de la célula parental. Al ser una línea derivada de las PC12 guarda el resto de características propias de la línea, excepto aquellas que están directamente relacionadas con la actividad catalítica del receptor, como lo es la diferenciación.

1.2. Recubrimiento de placas y cristales

Los revestimientos se realizan con el objetivo de favorecer la adherencia de las células ya sea a los cubreobjetos o a las placas de cultivo directamente, permitiéndonos manipularlas y realizar los lavados necesarios sin perderlas.

1.2.2 **Poli-D-Lisina** (PDL, Sigma) se realizó un *coating* rápido para las líneas HeLa y HEK, preparando una solución madre de 500 µg/ml de PDL en H₂O destilada estéril, a partir de la cual se obtuvieron las diferentes concentraciones de trabajo: 5 µg/ml de PDL para las placas de cultivo y 10 µg/mL de PDL para los cubreobjetos. Los pocillos se cubren con la solución y las placas se incuban a temperatura ambiente un mínimo de 30 min. Finalmente se retiró el PDL y los pocillos se lavaron exhaustivamente con PBS y se dejaron secar en campana antes de su uso.

1.2.1. **PDL/laminina**, se realizó este coating para fomentar la adherencia de células neuronales procedentes de tejidos aislados de ratón, para ello se cubrieron los pocillos con PDL (100 µg/mL) durante toda la noche, tras realizar varios lavados para quitar el excedente de PDL se añade laminina (5 µg/mL) durante 2h a 37° C. Posteriormente se realizan varios lavados con PBS (3-5 veces) y se dejaron secar. Las placas se pueden conservar durante 2 semana a -20° C para un uso posterior.

1.2.2. **Colágeno** (*Rat tail collagen*, Sigma) se utilizó para fomentar la adherencia y por consiguiente mejorar la diferenciación de las PC12 en presencia de NGF. Se cubren los pocillos con la solución de colágeno (10,5 µg/mL) durante 2h a 37° C o durante toda la noche a temperatura de ambiente, una vez seca la placa se podrá usar inmediatamente o conservar a 4° C durante 1 semana.

2. CULTIVOS PRIMARIOS DE RATÓN

2.1. Cultivo primario de neuronas corticales (CN)

Para obtener este cultivo se diseccionaron cortezas de 3 embriones de ratón de 16-17 días, estas se colocaron en placas Petri que contenía la solución balanceada de Hanks (HBSS, Sigma), tras retirar las meninges y estructuras no corticales, se realizaron cortes pequeños de la corteza y se incubaron con 1 ml tripsina al 2,5 mg/mL y 0,5 ml de 300U/ml de DNasaI durante 10 min. a 37°C agitando cada 5 min., posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadió 0,5 ml de BSA al 4% y 1 ml de NB/B-27 y se procedió a disgregar el tejido utilizando puntas estériles de diferente calibre, se centrifugaron las células a 200 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5ml de BSA al 0,2%, La suspensión se pasó a través de un filtro de nylon de 40 µm y se procedió a contar las células en la cámara de Neubauer para sembrar 250.000 células/pocillo (2x10⁵células/cm³) en placas de 24 pocillos previamente recubiertas con PDL/laminina.

3.2. Cultivo primario de neuronas de ganglios dorsales (DRG)

Para realizar la disección de los ganglios dorsales se utilizaron embriones de ratón de 16-17 días. Se retiraron todos los órganos blandos anteriores y se retiró grasa y músculo de la parte posterior para aislar la columna vertebral, la cual se colocó en una placa Petri. Se cortó la columna vertebral exponiendo la médula espinal con mucho cuidado para localizar los ganglios raquídeos, los cuales se retiraron usando pinzas anguladas y se colocaron en placas estériles de cultivo que contenían HBSS, dependiendo del experimento a realizar se sometieron los ganglios a una disección mecánica de la misma forma que se disgregó la corteza o se colocaron 2-3 ganglios directamente en una placa de 24 pocillos previo coating de PDL y se cubrieron con 500 μ l del medio de cultivo correspondiente.

3.3. Cultivo primario de neuronas del prosencéfalo basal (BF)

Para realizar el cultivo primario del BF se utilizaron 3 embriones de ratón de 16-17 días, se aisló el cerebro y se retiraron los bulbos olfatorios para localizar el prosencéfalo basal mediante un pequeño corte en la fisura longitudinal de la parte frontal, se diseccionaron y se colocaron en una placa de Petri que contenía la solución balanceada de Hanks (HBSS), se cortó el BF en trozos pequeños y se realizó la digestión y disgregación mecánica similar al usado para aislar las neuronas de corteza, una vez disgregadas, las células se resuspendieron en 5ml de BSA al 0,2% la suspensión se pasó a través de un filtro de nylon de 40 μ m y se procedió a contar las células para sembrar 250.000 células/pocillo (2×10^5 células/cm³) en placas de 24 pocillos previo coating PDL/laminina, tras 24 h se añadió 500 μ l de medio fresco que contenía 2 μ M de Ara-C, un agente citostático que impide la proliferación de las células no neuronales.

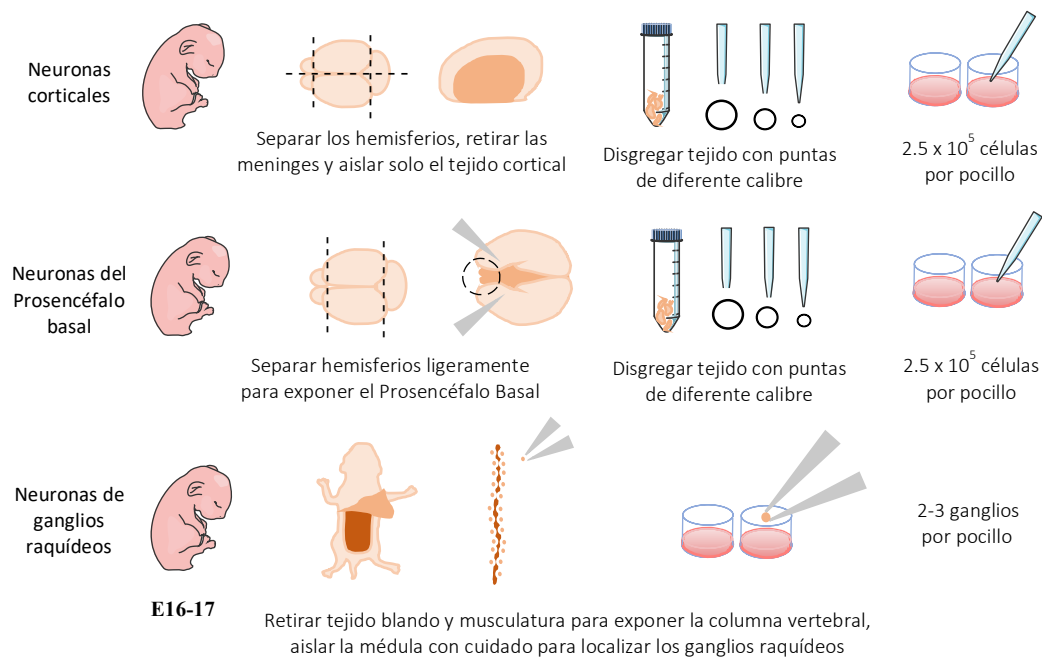


Figura 1. Esquema de los cultivos primarios de neuronas obtenidos de tejidos aislados de ratón. Para todos ellos se emplearon ratones cepa CD1 en un estado embrionario de 16-17 días.

3. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

Las técnicas de transfección permiten el ingreso de material génico foráneo dentro de una célula eucariota, Esto permite que se pueda estudiar la localización subcelular o el efecto de la expresión de una proteína en un contexto de interés, evaluar la interacción proteína-proteína, así como la producción de organismos transgénicos.

3.1. Moléculas catiónicas

3.1.1. **Polietilenimina (PEI, 1mg/mL)** es un método de transfección que se consigue mediante la formación de polímeros sintéticos insolubles que ejercen un papel protector del ADN una vez que este ingresa a la célula. Se empleó este método para transfectar las células HeLa y HEK293, las cuales se sembraron el día anterior a una confluencia del 70 - 80%. Las células utilizan como medio de cultivo DMEM completo, el cual se cambió 2 h antes de la transfección por medio fresco. La mezcla se dejó incubar durante 15-20 min antes de ser añadida a la placa gota a gota.

| | MEZCLA | | |
|------------------|----------|---------|------|
| | DMEM SF* | ADN | PEI |
| Placa 100 mm | 100µl | 1-5µg | 10µl |
| Placa 6 pocillos | 30µl | 0,5-1µg | 3µl |

*DMEM libre de suero

Tabla 1. Cantidades empleadas para la transfección celular mediante PEI en placas de 100 y 60 mm.

3.1.2. **DNA Transfection Reagent** (Bimake.com) es un método de transfección comercial que se basa en la formación de lipocomplejos que se adherirán a la membrana celular mediante interacciones electrostáticas o endocitosis. Se utilizó para transfectar tanto las PC12 como las PC12nnr5 ya que conseguíamos mejorar la eficiencia de transfección en comparación del PEI. Tras juntar los tubos 1 y 2 (Tabla 2) la mezcla se dejó incubar durante 15-20 min. antes de ser añadida a los pocillos gota a gota. No es necesario reemplazar el medio antes de la transfección.

| | TUBO 1 | | TUBO 2 | |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|
| | OPTIMEM | ADN | OPTIMEN | REAGENT |
| placa 12 pocillos | 50µl | 1-2µg | 50µl | 2µl |
| placa 24 pocillos | 25µl | 0,5-1µg | 25µl | 1µl |

Tabla 2. Cantidades empleadas para la transfección celular empleando el DNA transfection Reagent en placas de 12 y 24 pocillos.

3.2. Electroporación

Es una técnica mediante la cual el ADN pasa a través de los poros temporales que se forman en la membrana celular. Para ello se utilizó el dispositivo AMAXA™ 4D-NUCLEOFECTOR™ un electroporador que da un pulso eléctrico que eleva el potencial eléctrico de la membrana celular, moviendo así las moléculas a través del campo eléctrico hacia la célula. Se empleó esta técnica para la transfección del cultivo primario de neuronas corticales, para ello se utilizaron unas cubetas en forma de tiras (strips) que contenían lo dispuesto en el *Amaxa P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit*. (Tabla3)

CUBETA

| | |
|---------------------|---|
| 5 x 10 ⁵ | Células ADN Solución P3 suplemento |
| 0,5-1ug | |
| 16,4μl | |
| 3,6μl | |
| Programa AMAXA | |
| DC100 | |

Tabla 3. Cantidades empleadas por cubeta para la transfección celular mediante AMAXA 4D-NUCLEOFECTOR. Cargando hasta un volumen final del 20 μl.

4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de las células ya sea en suspensión o fijas, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS frío. Posteriormente se añadió el tampón de lisis que contenía TNE (Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) con 1% de Tritón X-100 (Sigma), 2mM de Na₃VO₄ (Sigma), 1mM de NAF (Sigma), 1 mM de PMSF y 1X de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). Se recogió el lisado en un eppendorf y se incubaron las muestras en frío durante 5 min, tiempo tras el cual se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min para eliminar los restos celulares y aislar así el sobrenadante donde se encontrarán las proteínas solubles. Se apartó la fracción soluble y se cuantificaron las proteínas.

4.2. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad), el cual consiste en cuantificar la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a la proteína de la muestra, esta coloración se compara con la coloración dada por una curva patrón hecha con concentraciones conocidas de una proteína estándar (BSA). Para utilizar el Bradford se realizó una dilución 1/5 en H₂O, se utilizaron 200μl de la dilución por cada muestra. La lectura se hizo en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 595nm.

5. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Es una técnica ampliamente utilizada, descrita por primera vez por (Towbin et al., 1979) que permite la detección de proteínas dentro de una muestra compleja, las cuales son separadas, transferidas a una membrana y enfrentadas a un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de nuestra proteína de interés.

5.1. Electroforesis (SDS-PAGE)

Las proteínas del extracto se separaron mediante electroforesis, para ello, a las muestras obtenidas se les añade tampón de carga (Tabla 4) que contiene SDS confiriéndole de forma proporcional a la masa, una carga negativa a cada proteína, permitiendo que migren hacia el polo positivo en función de su tamaño. Las muestras se hirvieron durante 5 min a 95° C para desnaturalizarlas

Para la separación de las proteínas se prepararon geles de acrilamida, bis-acrilamida 37:1 (Sigma) al 6%, 8%, 12% o 16%, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar. Se cargaron las muestras (25-80 µg) en los pocillos del gel y se rellenaron las cubetas con tampón de electroforesis [250mM Tris Base (Panreac) pH de 8,3; 1,92 M Glicina (Sigma) y SDS al 1%].

5.2. Transferencia e inmunodetección

| TAMPÓN CARGA 4X | |
|--------------------|--------|
| Tris-HCL | 240mM |
| Glicerol | 40% |
| SDS | 8% |
| Azul de Bromofenol | 0,004% |
| pH | 6,8 |
| β-MeOH | 5% |

Tabla 4. Composición del Tampón de carga

Las proteínas que se encontraban en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA85, 0,45 µm, Whatman), mediante una electroforesis utilizando tampón de transferencia (25 mM Tris-Base, 192 mM Glicina y 20% de Metanol). La transferencia se realizó a 100 V durante 2h. Finalizada la transferencia las membranas se tiñeron con rojo Ponceau S (Sigma) a fin de confirmar la presencia y correcta transferencia de las proteínas.

Las membranas se bloquearon durante 1h en solución de bloqueo, BSA al 5% para los ensayos realizados con TrkA y con leche al 5% para los ensayos realizados con p75, ambos disueltos en T-TBS (20 mM Tris-HCL, pH 7,6, 136 mM NaCL y 1% de Tween-20). Tras el bloqueo las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de interés (Tabla 5) a 4°C durante toda la noche. Se retiró el excedente del anticuerpo mediante 4 lavados de 15 min. A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios respectivos durante 1 h en agitación a temperatura de ambiente, tiempo tras el cual se retiró el anticuerpo y se hicieron 4 lavados de 15 min para finalmente revelar las membranas a través de 2 métodos (dependiendo de los anticuerpos secundarios empleados):

- 5.2.1. **Quimioluminiscencia (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*)** empleado tras el uso de anticuerpos secundarios conjugados con HRP, la señal se detectó mediante la exposición a películas autorradiográficas de baja sensibilidad (Agfa Curix RP2 Plus). La cuantificación de estas bandas se hizo utilizando el programa informático Image-Quant (GE Healthcare Life Sciences).
- 5.2.2. **Fluorescencia (detector LI-COR Odyssey)** empleado tras el uso de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. La detección está basada en el uso de un laser de infrarrojos, tiene alta sensibilidad y produce una fluorescencia de fondo muy baja, lo que permite la detección de cantidades muy bajas de proteína, ideal en la detección de niveles endógenos de proteína. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa informático ImageStudioLite (LI-COR).

5.3. Anticuerpos

| ANTICUERPOS PRIMARIOS | | | |
|--------------------------|--------|----------|---------------------------|
| NOMBRE | ORIGEN | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
| Anti-TrkA | Conejo | 1:4000 | Millipore Corporation |
| P-TrkA (Tyr490) | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| P-TrkA (Tyr674/675) | Conejo | 1:4000 | Cell Signaling Technology |
| P-TrkA (Tyr751) | Conejo | 1:1000 | Invitrogen |
| P-Akt (Ser473) | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| Akt | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| P-SAPK/JNK | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| SAPK/JNK | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| Anti-Flag M2 | Ratón | 1:10 000 | Sigma-Aldrich |
| c-Myc (9E10) | Ratón | 1:10 000 | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-HA | Ratón | 1:1000 | Sigma-Aldrich |
| PDI (C81H6) | Conejo | | Cell Signaling Technology |
| Cleaved Caspase-3 (D175) | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| Anti β -Actin | Ratón | 1:1000 | Sigma-Aldrich |
| P-p38 MAPK | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| p38 | Conejo | 1:1000 | Cell Signaling Technology |
| Anti-Human p75 pAb | Conejo | 1:10 000 | Promega |
| Anti-p75NTR | Conejo | 1:2000 | Millipore Corporation |

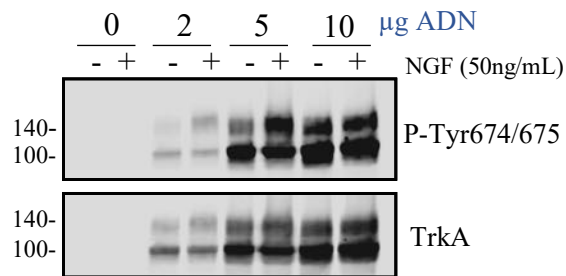
| ANTICUERPOS SECUNDARIOS WESTERN BLOT | | |
|--------------------------------------|----------|------------------------|
| NOMBRE | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) | 1:10 000 | Jackson ImmunoResearch |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) | 1:10 000 | Jackson ImmunoResearch |
| IRDye 800CW anti-Rabbit | 1:15 000 | LI-COR Biosciences |
| IRDye 680LT anti-Mouse | 1:15 000 | LI-COR Biosciences |
| IRDye 680LT Streptavidin | 1:20 000 | LI-COR Biosciences |
| 790 anti-high chain | 1:40 000 | LI-COR Biosciences |

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la inmunodetección por western Blot.

6. ENSAYOS DE SEÑALIZACIÓN DE TrkA

Para poner a punto los ensayos de señalización del receptor de NGF, testamos la expresión del receptor TrkA en las células HeLa y la fosforilación del mismo en ausencia y presencia de NGF (Figura 2). Se determinó la transfección de 2 µg de DNA ideal para los estudios de expresión y señalización del receptor al obtener una actividad basal nula por sobreexpresión en ausencia de NGF.

Figura 2. Expresión y fosforilación del receptor TrkA en HeLa tras la transfección de 0, 2, 5 y 10 µg de ADN por 10^7 células. Se aprecia una banda inferior aproximadamente a 110KD, correspondiente a receptor inmaduro con una localización intracelular y una banda superior a 140 KD correspondiente al receptor glicosilado expresado en la membrana plasmática



Para los ensayos de señalización se transfectaron las células HeLa con el receptor TrkA (2µg ADN) así como las mutaciones respectivas de éste receptor, 48 h después de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por DMEM sin suero y se incubaron las células a 37°C durante 2 h, en este punto se realizaron 2 ensayos según el interés: una estimulación de las células con 50 ng/mL de NGF durante 0, 5 y 15 min a 37° C y un segundo ensayo en el cual se estimularon las células con concentraciones crecientes de NGF (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL) durante 7 min a 37° C, Cumplido el tiempo de incubación en ambos ensayos se procedió a lavar las células con PBS frío para retirar el excedente de DMEM y se añadieron 100 µl de tampón de lisis por pocillo, se recogieron las células en un eppendorf de 1,5 mL. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 min, tiempo tras el cual se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se analizó por Western Blot. Se emplearon anticuerpos frente a las tirosinas fosforiladas del receptor. En la mayoría de los experimentos, los sobrenadantes se analizaron inmediatamente tras su extracción y en casos particulares se conservaron a -80 para su posterior uso.

7. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PC12 y PC12nr5

Para el ensayo de diferenciación se realizó un revestimiento de colágeno en placas de 12 pocillos cubriendo los pocillos con 500 µl toda la noche. Posteriormente se sembraron las células a una confluencia del 50-70%, las cuales se transfectaron, en este caso, las células PC12nr5 con 1 µg de ADN utilizando el reactivo DNA transfection reagent (Bimake.com). 48 h después de la transfección, las células se estimularon añadiendo 50 ng/mL de NGF (Alomone labs) disuelto en DMEM que contenía 1% de Penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina y 1% de HS. Se incubaron las células a 37°C y se realizaron fotos a campo claro a lo largo de 3 días. Una vez obtenidas las fotos se cuantificaron las prolongaciones de las células haciendo uso del programa ImageJ.

8. DETERMINACIÓN DE VIDA MEDIA DE PROTEÍNAS

Se transfectaron las células HeLa con las respectivas construcciones de TrkA o p75 a estudiar y se sembraron en placas de 12 pocillos, 48 horas después de la transfección se añadió 5 µg/mL de cicloheximida a cada pocillo y se lisaron las células a diferentes tiempos (0, 3, 5 y 9 h) añadiendo tampón de lisis e incubando la placa en frío durante 5 min, se recogió el lisado en un eppendorf y se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 10 min. Se cuantificaron las muestras y se analizó la proteína TrkA total en los diferentes puntos utilizando el anticuerpo extracelular de TrkA (millipore) por Western Blot.

9. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo transfectando las células HeLa en placas p100 con las construcciones de nuestro interés (HA-p75, HA-p75CTF, HA-TrkA, TRAF6-Flag y Myc-TrkA) posteriormente se lisaron con 400 µl del tampón de lisis, se incubaron las muestras en hielo 5 min y se aisló el sobrenadante mediante una centrifugación de 10 min a 13.000 rpm. Se apartaron 30 µl de sobrenadante para corroborar la expresión de proteína total en la muestra y el resto de sobrenadante se trató de la siguiente forma:

9.1. Bolas magnéticas Anti-HA.

Se añadieron con 5 µl de bolitas magnéticas por muestra, que previamente se lavaron dos veces con 500 µl de TNE utilizando un soporte magnético y se incubaron en rotación a 4° C durante toda la noche. Tras la incubación se aislaron las bolitas mediante el soporte magnético y se lavaron 3 veces con 500 µl de TNE 0,1% Tritón X-100.

9.2. Proteína G agarosa

(*Protein G Agarose resin 4 Rapid Run*). Se incubaron las muestras con 2 µg de anticuerpo primario (anti-Flag M2) en rotación a 4° C toda la noche. Tras la incubación se añadieron 15 µl de resina G agarosa por muestra, que previamente se lavaron con 500 µl de TNE mediante centrifugaciones suaves (2.800 x g 1 min) y se incubaron 2h a 4°C en rotación. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con 500 µl de TNE 0,1% Tritón X-100 mediante centrifugaciones. Finalmente, las bolitas se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X, se añadieron 2 µl de β-mercaptoetanol y se hirvieron a 95° C durante 5 min para ser analizadas por SDS-PAGE.

10. FORMACIÓN DE DÍMEROS COVALENTES POR EL TM DE TrkA

10.1. Purificación de membranas celulares

Se transfectaron las células HeLa con los mutantes de cisteína del transmembrana de TrkA, 48 h después las células se levantaron de forma mecánica con 1 ml de tampón de homogenización frío (250 mM sacarosa, 1mM EDTA, 10 mM Tris-

HCL a pH 7,1 inhibidores de proteasas). Se produjo la ruptura de las membranas celulares mediante sonicaciones realizadas en frío en dos intervalos de tiempo de 30s a 500W y una frecuencia de 40MHz. Se retiraron los restos celulares de las membranas mediante una centrifugación a 500 g durante 10 min a 4°C, para aislar las membranas del sobrenadante se realizaron 2 ultracentrifugaciones a 100.000 g a 4° C durante 1 h en una ultracentrífuga Beckman empleando tubos de policarbonato (Beckman Coulter ref. 362305). Tras la primera centrifugación se desechó el sobrenadante y se resuspendió la fracción insoluble (membranas) en 1ml de tampón de homogenización por sonicación (30, 30 s) y se realizó la segunda ultracentrifugación. Las membranas finalmente fueron resuspendidas en 300 µl de tampón de homogenización y se congelaron a -20°C para su posterior uso.

10.2. Oxidación por yodo

Se diseñaron varias construcciones de TrkA donde se reemplazaron residuos puntuales del dominio transmembrana por residuos de cisteína, la profundidad de estos residuos en la membrana reduce considerablemente la formación de los puentes disulfuro, por ello utilizamos el I₂ como un agente oxidante a fin de favorecer la formación de este enlace (Schwem & Fillingame, 2006). Para ello se transfectaron las células HeLa y se asilaron las membranas según el protocolo expuesto anteriormente. Las membranas se dividieron en 4 tubos eppendorf con 50 µl cada uno, se incubaron dos de los tubos con 10 ng/mL de NGF y los otros dos en ausencia de NGF a 37°C durante 10 min (Figura 2). Se preparó inmediatamente una solución de 2.5mM de I₂ en etanol absoluto y esta se añadió a un tubo de cada grupo tras la incubación hasta una concentración final de 250 µM de I₂ durante 30 segundos a temperatura de ambiente. La reacción se detuvo añadiendo una solución fresca de tiosulfato sódico a una concentración final de 60 mM. Se añadió tampón de carga a todas las muestras y se hirvieron durante 5 min a 95°C para ser analizadas mediante SDS-PAGE no reductor.

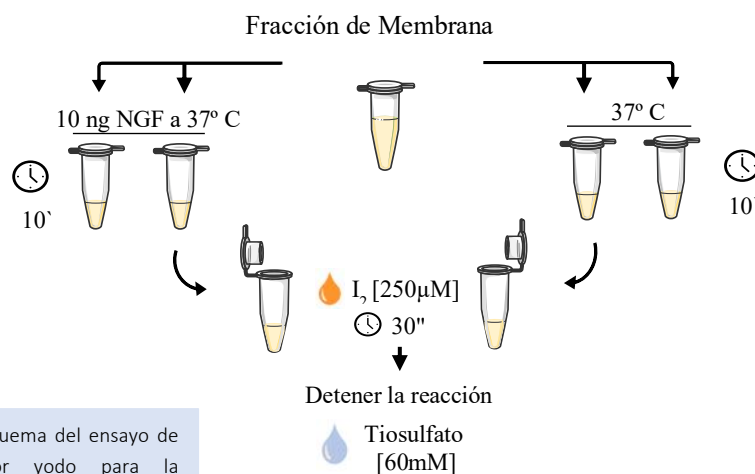


Figura 3. Esquema del ensayo de oxidación por yodo para la formación de dímeros covalentes mediados por el dominio transmembrana del receptor TrkA

10.3. Ensayos de entrecruzamiento

10.3.1. **BS³** (bis-sulfosuccinimidil suberate)

El BS³ es un entrecruzador de la cadena lateral de aminas de los residuos de lisina, uniendo ambas moléculas mediante un enlace covalente. Se realizaron ensayos de entrecruzamiento con las construcciones de TrkA y p75CTF a fin de estabilizar la conformación de las proteínas. Para ello se transfectaron las células HeLa con 5 µg de ADN en placas Falcon p100, después de 48 h se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células 3 veces con PBS frío, para los ensayos de dimerización del TrkA las células se incubaron previamente con NGF durante 30 min a 4°C, ya posteriormente se incubaron con 1mM de BS³ (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de BS³ fue neutralizado con 15 mM de Tris, pH 7,5 en agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis. Se cuantificaron y procesaron las muestras para ser analizadas por Western Blot, la inmunodetección se hizo con los anticuerpos correspondientes.

10.3.2. **MTS-2-MTS** (1,2-Ethanedithiol Dimethanesulfonate)

El MTS es un entrecruzador de residuos de cisteína, se empleó esta técnica para mantener estables los homodímeros formados por las construcciones de TrkA con mutaciones puntuales de cisteína en el dominio transmembrana. Para ello se transfectaron las células HeLa y tras 48 horas se retiró el medio y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS frío. Se incubaron las células con 10 ng de NGF durante 30 min a 4° C en agitación. Se retiró el NGF y se incubaron las células con 1mM de MTS (Santa Cruz Biotechnology) durante 10 min a temperatura de ambiente. Tras la incubación se lisaron las células y se procesaron las muestras para ser analizadas por western Blot, se utilizó el anticuerpo primario anti-TrkA (dilución 1:4000, Millipore) frente a la región extracelular de la proteína.

11. **OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES**

11.1. Obtención de bacterias competentes XL1-Blue

Las bacterias competentes XL1-Blue se prepararon en el laboratorio, para ello se estiraron las bacterias en placas de LB Agar y se incubaron a 37° C toda la noche, una vez obtenidas las colonias, en este punto, se realizaron dos protocolos para lograr la competencia de las bacterias, en ambos casos se obtuvo una competencia superior a 10⁻⁷ufc/µg ADN.

11.1.1. **Método de CaCl₂** , Se picó una colonia y se inoculó en 5 ml de LB y se incubaron durante 2-3 h a 37° C en agitación orbital (300rpm), luego se transfirió 1ml de cultivo a 200 ml de LB y se incubaron nuevamente a 37° C en agitación (300rpm) hasta alcanzar una OD ≈ 0,6, a 600 mm. Las bacterias

se mantuvieron en hielo 15 min y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron suavemente en 15 ml de 0,1 M de CaCl₂ estéril. Se repitió la centrifugación anterior y finalmente las bacterias se resuspendieron en 4 ml de 0,1M de CaCl₂/ 15% de glicerol. Se incubaron en hielo toda la noche y se hicieron alícuotas de 50 y 100 µl que se guardaron a -80° C.

11.1.2. **Método INOUE**, el protocolo fue adaptado de Green & Sambrook, 2020. Se picó una colonia y se inoculó en 3 ml de LB y se incubaron a 37° C a 80 rpm durante toda la noche. Se transfirió 1 ml del cultivo a 250 ml de LB y se incubaron toda la noche a 18° C a 80 rpm, a primera hora de la mañana se midió la densidad óptica hasta alcanzar una OD ≈ 0,45 a 600 nm. Inmediatamente se incubaron las bacterias en hielo 10 min y se centrifugaron a 2.500 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron suavemente en 20 ml de tampón INOUE frío (5 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl y 10 mM PIPES). Se repitió la centrifugación anterior y las bacterias se resuspendieron en 7 ml de INOUE frío, finalmente se incubaron en hielo durante 1 h y se hicieron alícuotas de 50 y 100 µl sobre hielo seco y se guardaron a -80° C.

11.2. Transformación bacteriana

La transformación se empleó para la expresión de nuevas construcciones y la amplificación de plásmidos. Para ello se utilizaron alícuotas de 50 µl de bacterias competentes, las cuales se descongelaron en hielo y se incubaron con 50 ng de ADN en hielo durante 30 min. Tras la incubación se dio un choque térmico a 42° C durante 45 segundos, inmediatamente después se incubó en hielo durante 5 min. Se añadieron 500 µl de medio SOC bajo llama y se incubaron las bacterias en agitación orbital a 500 rpm durante 1 h para su recuperación. Posteriormente las bacterias se sembraron en placas de LB Agar, preparadas con el antibiótico correspondiente, ya sea ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml), una vez sembradas las bacterias, las placas se incubaron a 37° C durante 16 horas.

12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR

Esta técnica nos permite introducir cambios puntuales en una secuencia de ADN mediante una PCR generando así alteraciones de bases que podrían afectar la funcionalidad de una proteína. La mayor parte de los mutantes de TrkA y p75 se obtuvieron por este método, para ello, en primer lugar, determinamos cual es la posición de la secuencia que nos interesa alterar, localizado el codón a continuación diseñamos dos cebadores por cada mutación (Tabla 6). Se realizó una PCR (Figura 3) utilizando la polimerasa *NZY Proof DNA* (NZYTech) el programa tuvo una duración de 3h 29 min. Se empleó 50 ng de ADN por cada reacción.

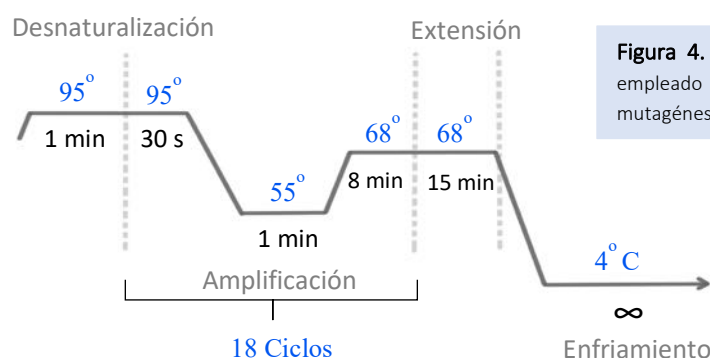


Figura 4. Programa de PCR empleado para realizar la mutagénesis.

Tras la PCR se realizó una digestión del ADN molde con la enzima DpnI (NZYTech) la cual reconoce las regiones metiladas eliminando así el ADN parental. La digestión se realizó a 37° C durante 2 h. Para comprobar que finalmente hemos conseguido la mutación deseada, realizamos una transformación bacteriana con 5 µl del producto de PCR en 100 µl de bacterias XL1-Blue, se picaron las colonias que crecieron en las placas de LB Agar, se inocularon individualmente en 5 ml de LB y se incubaron en agitación 37° C a 180 rpm durante toda la noche, al siguiente día se procedió a la extracción de ADN mediante el kit *NZYMiniprep* (NZYTech) y comprobamos la presencia de la mutación utilizando el servicio de secuenciación del IBV.

12.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se diseñaron para elaborar las construcciones que se emplearon en esta tesis se encuentran en la sección de anexos.

13. MICROSCOPIA CONFOCAL

Se hicieron ensayos de inmunocitoquímica empleando células HeLa, HEK 293, PC12 y PC12nnr5 para el estudio de los receptores de membrana, colocalización de estos con otras estructuras o proteínas, para estudiar la muerte celular y procesos de internalización. Se empleó en todos los casos un tampón de bloqueo (0,1 M PB, 3 % FBS), dependiendo o no el interés por permeabilizar la membrana, se añadió 0,1 % de Tritón X-100 al tampón de bloqueo, esta incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente y es previa al

uso de los anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios empleados fueron específicos frente a las estructuras o proteínas de interés (Tabla 7), se utilizaron en diluciones de 0,1 M PB aconsejadas por las casas comerciales. Se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos para los láser de 561 nm (rojo) y 488 nm (verde), los cuales se incubaron durante 1h en total oscuridad. En todos los casos se realizó una tinción del núcleo con DAPI durante 10 min. Finalmente se montaron los cristales en un portaobjetos utilizando 3 μ l de Mowiol con la ayuda de unas pinzas de disección anguladas. Todas las imágenes se tomaron en un Microscopio Confocal Espectral Leica SP8 usando el objetivo de magnificación 60X (aceite).

ANTICUERPOS PRIMARIOS INMUNOFLUORESENCIA

| NOMBRE | ORIGEN | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|--------------------------|--------|----------|---------------------------|
| Anti-HA | Ratón | 1:100 | Sigma-Aldrich |
| PDI (C81H6) | Conejo | 1:100 | Cell Signaling Technology |
| Anti-Calnexin C5C9 | Conejo | 1:500 | Cell Signaling Technology |
| Anti- giantin | Conejo | 1:1 000 | Abcam |
| Cleaved Caspase-3 (D175) | Conejo | 1:1 000 | Cell Signaling Technology |
| Anti-TrkA | Conejo | 1:100 | Millipore |
| Anti-Human p75 pAb | Conejo | 1:100 | Promega |
| Anti-p75 NGF receptor | Conejo | 1:200 | Abcam |

ANTICUERPOS SECUNDARIOS INMUNOFLUORESENCIA

| NOMBRE | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|-----------------------------|----------|------------------------|
| Alexa Fluor 555 anti-Mouse | 1:1 000 | Invitrogen |
| Alexa Fluor 488 anti-Mouse | 1:1 000 | Invitrogen |
| Alexa Fluor 488 anti-Rabbit | 1:1 000 | Invitrogen |
| Donkey Cy3 anti-Rabbit | 1: 500 | Jackson ImmunoResearch |

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en las técnicas de Inmuncitoquímica.

13.1. Ensayo de muerte celular

Decidimos determinar el impacto que tendría la inhibición de la enzima γ -secretasa sobre la viabilidad de las células que expresaban el receptor de neurotrofinas p75, al saber que esta enzima está directamente involucrada en el corte proteolítico de este receptor. Para los ensayos de muerte celular, se emplearon cultivos primarios de neuronas de corteza y

células HeLa ambas se transfectaron con p75, también se emplearon PC12 y PC12nnr5 para un estudio endógeno. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos que contenían cristales a los cuales se les había realizado el recubrimiento respectivo. Se incubaron las células con 10 μ M de Compuesto E (Millipore), un inhibidor de la γ -secretasa, paralelamente se incubaron pocillos control con el mismo volumen de DMSO, que fue utilizado como vehículo del reactivo. La incubación se hizo a 37° C durante toda la noche. Transcurrido ese periodo se fijaron las células con PFA al 4% y se procedió a realizar la inmunocitoquímica:

- 13.1.1. **Muerte en Cultivo primario de neuronas de corteza:** se transfectaron las células con p75 y GFP (2:1), para la inmunocitoquímica se empleó el anticuerpo primario *Cleaved Caspase-3* junto con el secundario anti-conejo Cy3 (rojo) y se cuantificaron las células GFP/caspasa-3 activa positivas al microscopio Confocal.
- 13.1.2. **Muerte en células HeLa:** se transfectaron las células con p75CTF y GFP (2:1), para la inmunocitoquímica se empleó el anticuerpo primario *cleaved Caspase-3* junto con el secundario anti-conejo Cy3 (rojo) y se cuantificaron las células GFP/caspasa-3 activa positivas al microscopio Confocal.
- 13.1.3. **Muerte en células PC12 y PC12nnr5:** para el ensayo de muerte las células se fijaron a lo largo de 3 días, al expresar p75 de forma endógena, sólo se realizó la inmunocitoquímica con el anticuerpo primario *Cleaved Caspase-3* junto con el secundario anti-conejo Cy3 (rojo). Se cuantificaron las células Caspasa-3 activa positivas al microscopio Confocal.

13.2. Ensayos de internalización de receptores de membrana

Se transfectaron las células HEK 293 con las construcciones de interés (HA-p75, HA-p75CTF, HA-p75CTF-257A, HA-TrkA y Myc-TrkA). Las células se sembraron en cristales a los cuales se les realizó un revestimiento previo de PDL. 48 horas después de la transfección se retiró el medio de cultivo y se cubrieron las células con 30 μ l de anticuerpo primario anti-HA 12CA5 (1:100) en PBS frío y se incubó la placa a 4° C durante 1 h. Se retiró el anticuerpo primario y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS. Para iniciar el ensayo de internalización se incubaron las células con 50 ng/mL de NGF a 37° C disuelto en DMEM. Las células se fijaron con PFA al 4% a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 min. Para determinar la internalización mediante inmunofluorescencia, las células se incubaron con el tampón de bloqueo sin Tritón X-100 durante 1h y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 555 durante 1h, esto permitió marcar los receptores que se encontraban solo en la superficie celular, posteriormente se incubaron las mismas células con tampón bloqueo con 1 % de Tritón X-100 para permeabilizarlas y se hizo una incubación final con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 durante 1h en oscuridad, esto permitió que se marcaran los receptores que estuvieron una vez en la membrana y se internalizaron. Los niveles de

expresión del receptor de determinaron midiendo la intensidad media de florescencia del receptor en ambos colores.

13.3. Ensayos de colocalización

Se transfectaron las células con las proteínas de interés o se fijaron directamente con PFA al 4 % para un análisis endógeno de colocalización. Tras fijar las células, éstas se incubaron con tampón bloqueo con 0,1 % de Triton X-100. Posteriormente se incubaron las células con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas a estudiar durante 1 h. Tras 3 lavados con 0.1M PB. Se incubaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 (verde) y Alexa 555 (rojo) durante 1 h en oscuridad. Se tiñeron los núcleos con DAPI y las imágenes se captaron en el microscopio Confocal Leica.

14. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar los ensayos de citometría de flujo se utilizó el citómetro FACSCantoI # 1903, la adquisición y el análisis se datos se hicieron mediante el software DiVa8.

14.1. Expresión e internalización de receptores de membrana

Para la detección de las proteínas de membrana mediante citometría de flujo, se transfectaron las células HeLa con las proteínas de interés (HA-p75, HA-p75CTF, HA-p75CTF-257A, HA-TrkA y Myc-TrkA), 48 h tras la transfección las células se levantaron, se contaron en la cámara de Neubauer y se colocaron 10^6 células en un tubo falcon de 15 ml, las células se resuspendieron en 200 μ l de anticuerpo primario anti-HA (1:100, disuelto en PBS), las células se incubaron en suspensión a 4° C durante 30 min, con agitaciones breves cada 10 min durante la incubación. Tras la incubación se hicieron 3 lavados con PBS frio mediante centrifugaciones de 5 min a 800 rpm. Se realizó una segunda incubación con 100 μ l de anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (1:100, disuelto en PBS) a 4° C durante 30 min en oscuridad. Finalmente se lavaron las células 2 veces con PBS frio y se resuspendieron en 3 ml de PBS. La suspensión celular se pasó a tubos de citometría y se mantuvieron en hielo para ser analizadas mediante el Citómetro.

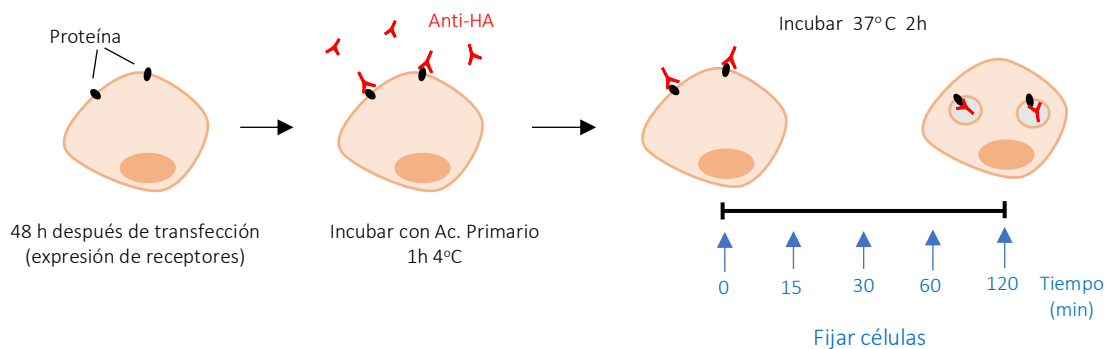


Figura 5. Esquema del marcate de los receptores de membrana para el estudio de internalización.

14.2. Biotinilación de NGF y ensayos de unión a ligando

A fin de determinar la cinética de unión del receptor TrkA por su ligando, se planteó en el laboratorio la biotinilación del NGF (Alomone) utilizando el producto *NHS-Biotin* (Thermo Scientific), para luego ser enfrentado al anticuerpo streptavidina Cy2 conjugado con un fluoróforo que nos permitiría detectarlo por citometría de flujo. La biotinilación del NGF se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Una vez obtenido se testó mediante técnicas de western blot y ensayos de diferenciación en células PC12, posteriormente se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C .

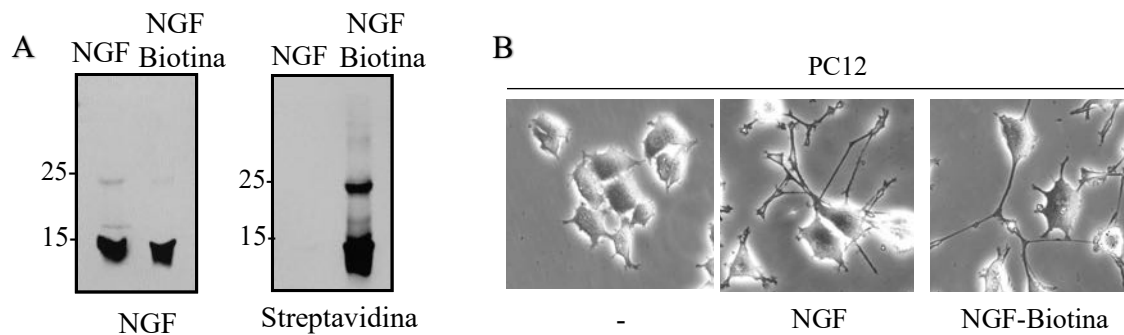
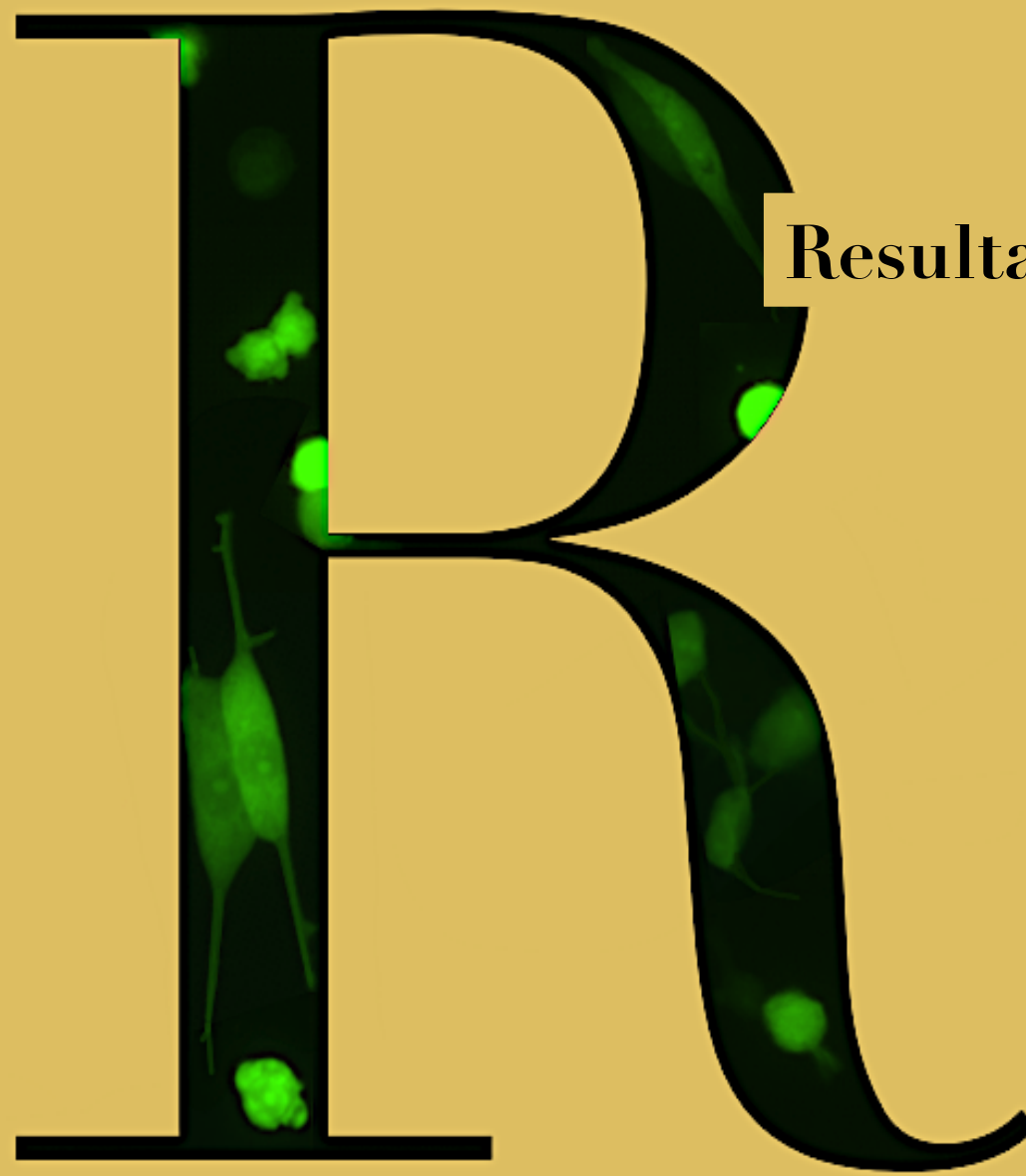


Figura 6. **A**, Western Blot mostrando la correcta biotinilación del NGF. **B**, Imagen a campo claro de la diferenciación de células PC12 estimuladas con NGF-Biotina durante 42 h (50 ng/mL).

Una vez obtenido el NGF-Biotina y testado, se procedió a transfectar las células HeLa en placas p100 con las construcciones TrkAwt, ΔeJTM y P/G. Se prepararon 5 tubos cónicos de 15 ml por cada placa, se procedió a levantar las células, se contaron y se colocaron 5×10^5 células por tubo. Las células de cada construcción se incubaron con concentraciones crecientes de NGF-Biotina (0, 1, 10, 100, 500, 1000 ng/mL) a 4°C durante 15 min. Se retiró el exceso de NGF-Biotina realizando dos lavados con PBS frío mediante centrifugaciones de 5 min a 800 rpm, posteriormente se resuspendieron las células en 200 μl del anticuerpo secundario estreptavidina Cy2 (1:500, disuelto en PBS) y se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS frío para retirar el exceso de anticuerpo y finalmente se resuspendieron las células en 3 ml de PBS frío, la suspensión celular se pasó a tubos de citometría y se conservaron las muestras en hielo para ser analizadas por el citómetro, donde se utilizó el láser de Argón, 488 nm (verde) para todas las muestras.

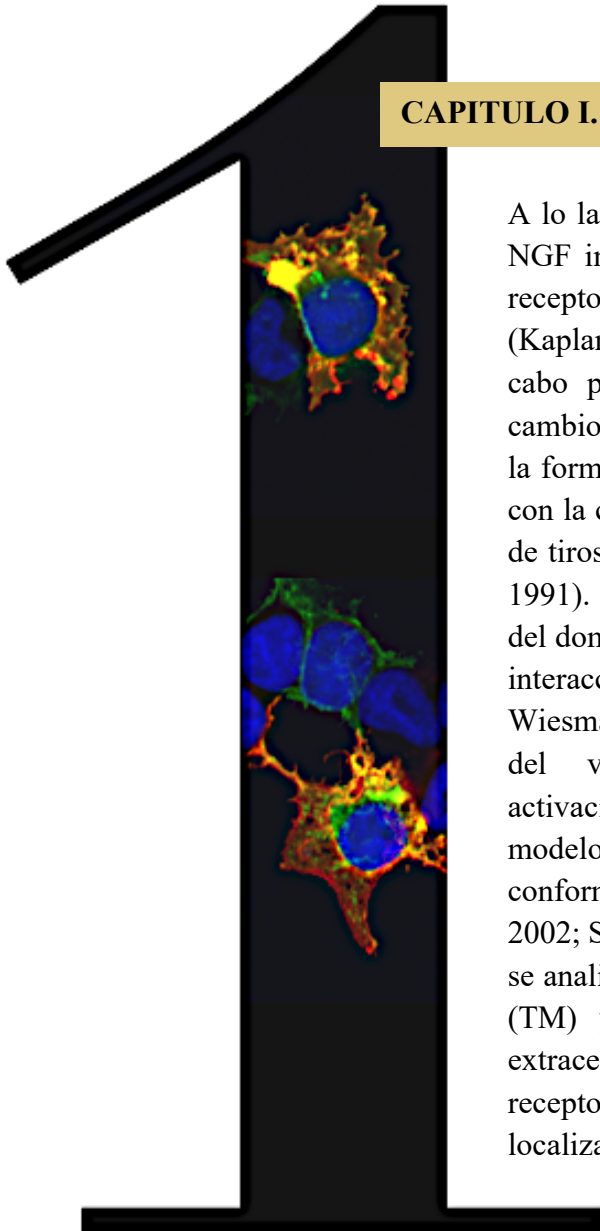
R



Resultados

CAPITULO I. Mecanismo de Activación del receptor TrkA

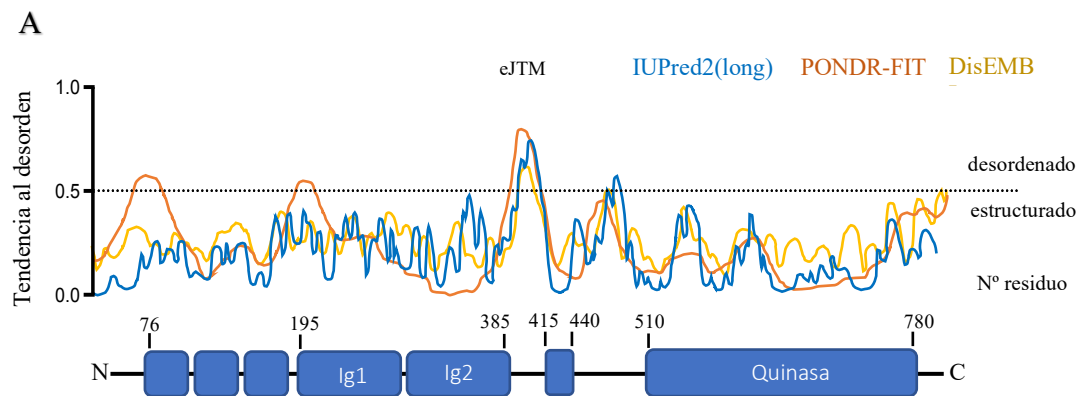
A lo largo de los años se ha determinado que el NGF inicia sus acciones biológicas al unirse al receptor TrkA en la membrana plasmática (Kaplan et al., 1991). Esta señalización se lleva a cabo por procesos coordinados que producen cambios en las moléculas de TrkA mediados por la formación de homodímeros (Jing et al., 1992) con la consiguiente autofosforilación de residuos de tirosina (Bocharov et al., 2010; Kaplan et al., 1991). A pesar que la caracterización estructural del dominio extracelular ha permitido conocer su interacción con el ligando (Wehrman et al., 2007; Wiesmann et al., 1999). se sabe muy poco acerca del verdadero mecanismo molecular de activación, lo que ha llevado a establecer diversos modelos de activación del receptor y de la conformación de sus dímeros (Mischel et al., 2002; Shen & Maruyama, 2011). En este capítulo se analizará el papel del dominio transmembrana (TM) y región yuxtamembrana del dominio extracelular (eJTM) en la dimerización del receptor y se estudiarán los residuos implicados localizados en estos dominios.



1. LA REGIÓN eJTM ES ESENCIAL PARA EL ACOPLAMIENTO DE NGF Y LA ACTIVACIÓN DE TrkA

1.1. El dominio eJTM es una región intrínsecamente desordenada

Estudios previos sugieren que la región intracelular requiere una orientación específica de los dominios quinasa del dímero que se podría establecer por un reordenamiento del receptor mediado por su ligando. (Fleishman et al., 2002); (Bocharov et al., 2010) Sugiriendo que en este reordenamiento estén implicados los dominios JTM del dominio extracelular y TM. Centramos así nuestra atención en la región eJTM, compuesta por unos 30 residuos, localizados entre el dominio Ig2 y el TM. La secuencia de residuos en esta región se caracteriza por numerosos residuos de prolina altamente conservadas a lo largo de las especies. Decidimos hacer una predicción de estructura in silico, el cual nos predice las regiones intrínsecamente desordenadas de una proteína, proporcionándonos una puntuación entre 0 y 1 para cada residuo a lo largo de toda la proteína (Figura R1-1A). Un valor superior a 0,5 nos indicaría que el aminoácido se encuentra en una región estructurada, mientras que un valor inferior a 0,5 nos indica que se encuentra en una zona desprovista de estructura. Aunque los predictores alcanzan una precisión del 80-90% siempre será necesario el uso de otras técnicas para corroborar ciertos modelos. Tras la comparativa de 4 software distintos observamos que la región eJTM era considerada por todas una región altamente desordenada, superando valores de 0,6 a diferencia de pequeños segmentos en otros dominios (Figura R1-C).



B Secuencia eJTM

| | | | | |
|-------|--------------|---------------|----------|-----|
| hTrkA | FNPEDPIPVSFS | PVDTN-STSGD | PVEKKDET | 414 |
| rTrkA | FNPEDPIPVSFS | PVDTN-STSRD | PVEKKDET | 417 |
| mTrkA | FNPEDPIPVSFS | PVDGN-STSRD | PVEKKDET | 417 |
| cTrkA | FSPEEPIPVS | ISPLGTRNSSLEG | PVETADEH | 394 |
| | * * * | * | * | |

C ANÁLISIS PREDICTIVO DE ORDEN EN TRKA

| MÉTODO | REGIÓN | RESIDUOS | Valor medio |
|-------------|--------|----------|-------------|
| IUPred2 | eJTM | 393-411 | 0,6508 |
| PONDR-FIT | LRR | 41-76 | 0,5765 |
| | eJTM | 384-414 | 0,6745 |
| DisEMBL | eJTM | 398-412 | 0,6060 |
| | JTM | 476-484 | 0,5690 |
| DisPROT-VL2 | eJTM | 386-407 | 0,6724 |

Figura R1-1. Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas en TrkA. **A**, El panel muestra la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas basadas en el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína TrkA, los cálculos fueron realizados usando los programas IUPred2 (azul), PONDR-Fit (naranja) y DisEMBL (amarillo). Valores superiores de 0.5 indicaría desorden, en la parte inferior se muestran la distribución de los residuos en los dominios de la proteína analizada. **B**, Secuencia conservada de aminoácidos de la región eJTM alineada con la misma región en otras especies, se resaltan las prolina altamente conservadas (rojo). **C**, Comparación del análisis predictivo de regiones desordenadas en TrkA con los predictores IUPred2, PONDR-FIT, DisEMBL y DisPROT-VL2, se muestra el valor medio de los segmentos con tendencia al desorden.

1.2. La región eJTM es importante para la correcta activación del receptor TrkA

Al resolverse la estructura cristalina del dominio extracelular de TrkA unido a NGF, se determinó la interacción del dominio Ig2 con el ligando, todo ello sin la presencia de la región eJTM, razón por la cual nos interesa saber si la integridad de esta región es esencial para la activación del receptor por NGF y aunque el alto número de prolinas podría fomentar esa falta de estructura y poca flexibilidad en esta región, también nos interesa determinar cuan importantes son estas características. Para ello, decidimos dos aproximaciones i) deletar de la estructura los 30 residuos pertenecientes a este segmento (TrkA- Δ eJTM) o ii) incrementar la flexibilidad de la región mutando las 5 prolinas conservadas por residuos de glicina (TrkA-5P/5G) (Figura R1-2A). Ambas construcciones se obtuvieron mediante técnicas de PCR. Para el análisis se transfectaron las células HeLa y se realizaron ensayos de citometría de flujo e inmunocitoquímica a fin de determinar los niveles de expresión en la superficie celular. Los resultados nos mostraron que independientemente de la mutación ambas proteínas conseguían anclarse en la membrana y alcanzaban niveles de expresión similares a TrkA-wt. (Figura R1-2B)

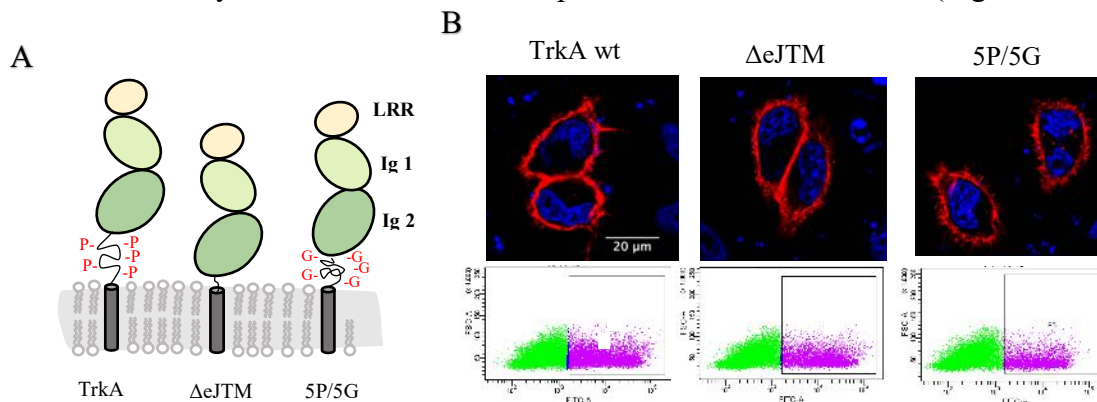


Figura R1-2. Análisis de la expresión de los mutantes TrkA- Δ eJTM y TrkA5P/5G en la superficie celular. **A**, Esquema de las construcciones TrkA- Δ eJTM y TrkA5P/5G obtenidas por mutagénesis dirigida por PCR. **B**, Imágenes del microscopio confocal de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas donde se observa la expresión de receptores en la superficie celular (rojo) y el núcleo celular (azul); en los paneles inferiores se muestra el ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de receptores en la superficie celular (morado), cuantificación expresada en porcentaje respecto al wt=100%, se analizó un total de 50 000 eventos por muestra.

Posteriormente se realizaron ensayos para estudiar la actividad del receptor expresando las construcciones en células HeLa transfectadas con 2 μ g de DNA. Tras 48 h las células se estimularon con NGF durante 0, 5 y 15 min y se analizó la fosforilación del receptor por western blot. La inmunodetección se hizo con el anticuerpo frente a P-Tyr674/675. Se observó la ausencia total de fosforilación en el mutante Δ eJTM y una reducción significativa de la actividad en el mutante 5P/5G (Figura R1-3A); esta ausencia de actividad en el mutante Δ eJTM también se vio reflejada en la falta de diferenciación de las células PC12nr5 transfectadas con dichas construcciones e incubadas con 10 ng/ml NGF durante 2 días (Figura R1-3B). Se lisaron las células para analizar por western blot la fosforilación del residuo Tyr490. La fosforilación de este residuo está directamente relacionado con la diferenciación celular (Figura R1-3B). Los resultados mostraron la ausencia de fosforilación en la Tyr490 del receptor Δ eJTM, confirmándonos así la nula actividad del mutante Δ eJTM. A diferencia del mutante Δ eJTM, el mutante 5P/5G mostro

una diferenciación celular reducida, así como una baja fosforilación de la Tyr490 en las células PC12nnr5 en comparación con el TrkA-wt y también mostró una baja respuesta a concentraciones crecientes de NGF (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) (figura R1-3).

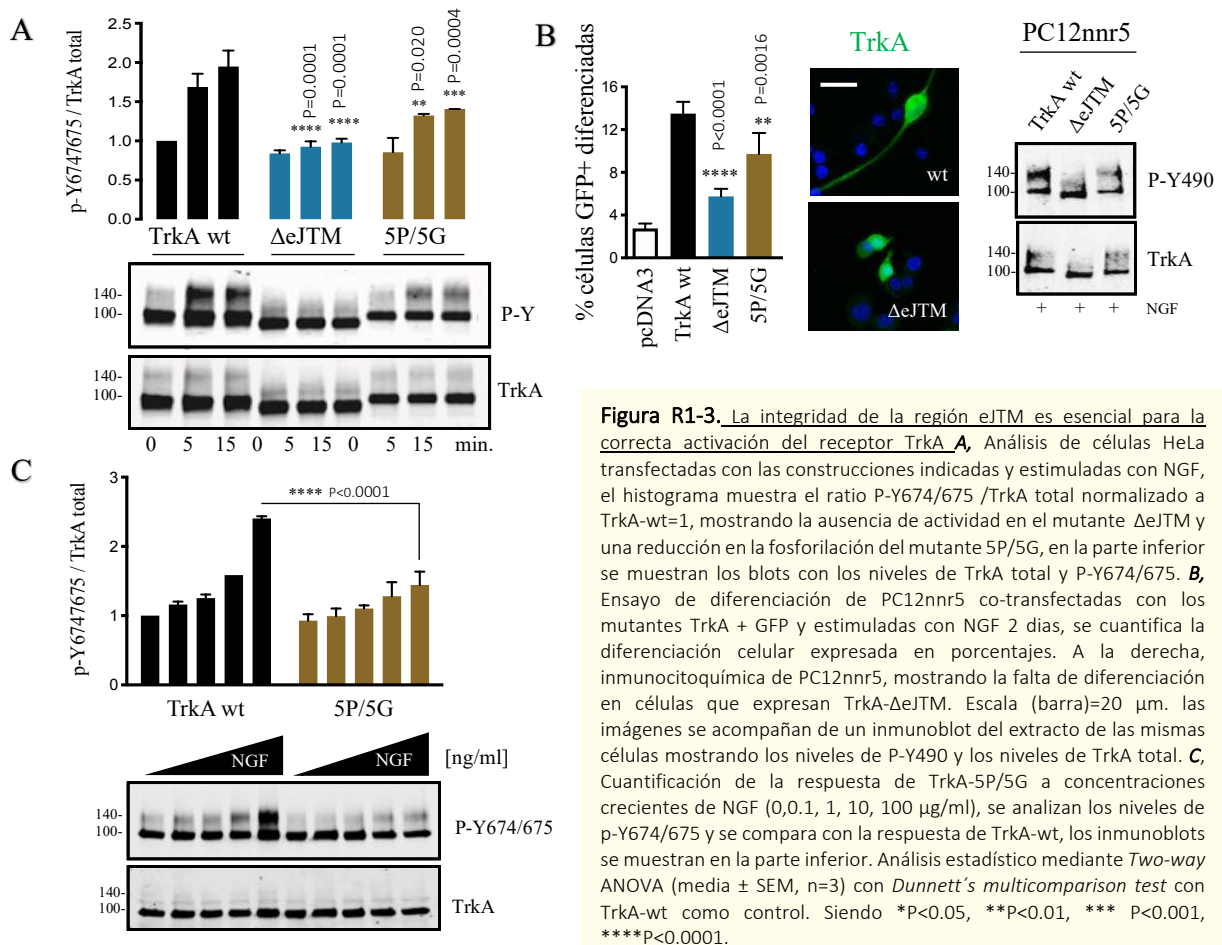


Figura R1-3. La integridad de la región eJTM es esencial para la correcta activación del receptor TrkA. **A**, Análisis de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas y estimuladas con NGF, el histograma muestra el ratio P-Y674/675 / TrkA total normalizado a TrkA-wt=1, mostrando la ausencia de actividad en el mutante ΔeJTM y una reducción en la fosforilación del mutante 5P/5G, en la parte inferior se muestran los blots con los niveles de TrkA total y P-Y674/675. **B**, Ensayo de diferenciación de PC12nnr5 co-transfectadas con los mutantes TrkA + GFP y estimuladas con NGF 2 días, se cuantifica la diferenciación celular expresada en porcentajes. A la derecha, inmunocitoquímica de PC12nnr5, mostrando la falta de diferenciación en células que expresan TrkA-ΔeJTM. Escala (barra)=20 μm. las imágenes se acompañan de un inmunoblot del extracto de las mismas células mostrando los niveles de P-Y490 y los niveles de TrkA total. **C**, Cuantificación de la respuesta de TrkA-5P/5G a concentraciones crecientes de NGF (0,0.1, 1, 10, 100 μg/ml), se analizan los niveles de p-Y674/675 y se compara con la respuesta de TrkA-wt, los inmunoblots se muestran en la parte inferior. Análisis estadístico mediante *Two-way ANOVA* (media ± SEM, n=3) con *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001.

1.3. La región eJTM participa en la unión de TrkA a NGF

Seguidamente estudiamos la capacidad de unión a ligando que tenían las construcciones y para ello realizamos un ensayo de citometría de flujo utilizando un NGF marcado con biotina (NGF-biotina). Se transfectaron células HEK293 con las construcciones diseñadas y se incubaron las células con diferentes concentraciones de NGF-biotina: 0, 0.1, 10, 100, 500, 1000 ng/mL a 4° C durante 15 min, finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado estreptavidina Cy2 y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el mutante ΔeJTM era incapaz de unir NGF, mientras que el mutante 5P/5G tenía menos afinidad por el NGF a diferencia de TrkA-wt (Figura R1-4). El conjunto de los datos obtenidos con el mutante ΔeJTM nos sugieren que estos 30 residuos podrían estar brindando la distancia necesaria entre el dominio Ig2 y TM para el correcto acoplamiento de NGF. La delección de la región eJTM anula la capacidad de unión de TrkA por su ligando con la consecuente falta de actividad. Los datos obtenidos con el mutante 5P/5G revelan la importancia del grado de flexibilidad que necesita tener esta región. Las prolina parecen fomentar el correcto acoplamiento del NGF.

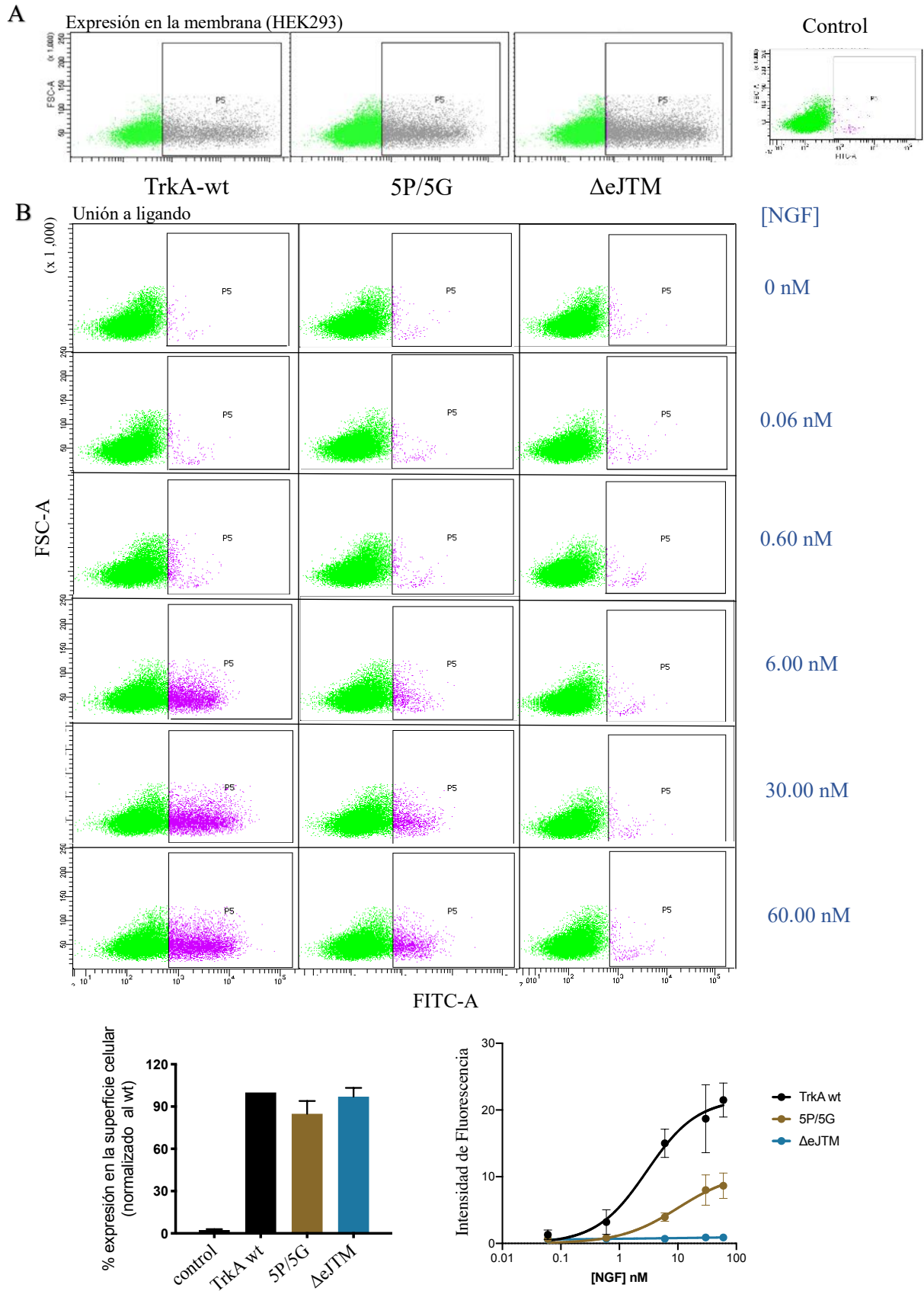


Figura R1-4. La región eJTM participa en la unión de TrkA a NGF **A**, Ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de los mutantes de TrkA en la membrana plasmática de células Hek293 (gris), se analizó un total de 50 000 eventos, la cuantificación respectiva se muestra en el histograma inferior. **B**, Análisis por citometría de flujo de la unión TrkA/NGF-biotina en células Hek293 transfectadas con las construcciones respectivas, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de NGF-biotina, se analizaron un total de 50 000 eventos por construcción, la cuantificación se muestra en el gráfico inferior, donde se ve la ausencia de unión de TrkA-ΔeJTM a NGF-biotina y la baja afinidad de TrkA 5P/5G por NGF-biotina.

1.4. La distribución de las prolinas en la región eJTM cumplen un rol en la activación de TrkA

Tras obtener estos resultados, observamos la distribución que tenían las prolinas localizadas en la región eJTM, con la finalidad de brindarnos más información sobre la importancia que tenían respecto a su conservación y localización y reforzar los datos obtenidos sobre su implicación en el correcto acoplamiento y activación del receptor. Curiosamente 3 de ellas, P387, P390 y P392 se encontraban inmediatamente después del dominio Ig2, las cuales decidimos mutar a glicinas (TrkA-3P/3G) por su cercanía al dominio de unión a ligando y posible contacto con el NGF, seguidas por otras dos algo más alejadas, la P397 y P407 que decidimos mutar en otra construcción (TrkA-2P/2G). Se estudiaron los niveles de expresión en la membrana al igual que las construcciones anteriores y se realizaron ensayos de respuesta a concentraciones crecientes de NGF cuantificando la fosforilación del residuo Tyr674/675 y finalmente se realizaron ensayos de unión a ligando por citometría de flujo empleando el NGF-biotina (Figura R1-5) Los resultados mostraron que el mutante 3P/3G no afecta la actividad, y que las prolinas siguientes P397 y P407, que están conservadas, son capaces de continuar con el cambio conformacional y activación del receptor; ello explicaría porque el NGF es incapaz de fomentar la correcta fosforilación del mutante 2P/2G, ya que esa flexibilidad en la porción final podría impedir una correcta organización de los dominios siguientes (Figura R1-5B).

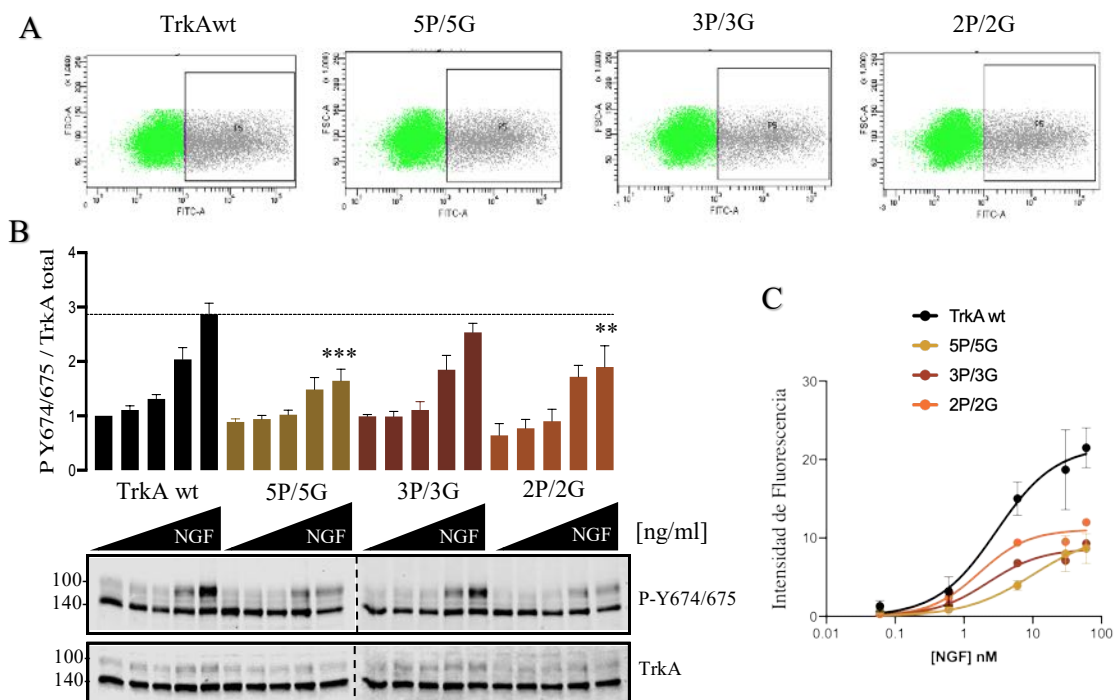


Figura R1-5. La distribución de las prolinas en la región eJTM promueven la activación de TrkA tras el acoplamiento de NGF. **A**, Ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de los mutantes de TrkA en la membrana plasmática de células Hek293 (gris), se analizó un total de 50 000 eventos. **B**, Cuantificación de la respuesta de TrkA-5P/5G, TrkA 3P/3G y TrkA 2P/2G a concentraciones crecientes de NGF (0,0.1, 1, 10, 100 μ g/ml), se analizan los niveles de p-Y674/675 y se compara con TrkA-wt, los inmunoblots se muestran en la parte inferior donde se observan los niveles de P-Y674/675 y TrkA total. **C**, Cuantificación del ensayo de unión TrkA/NGF-biotina por citometría de flujo en células Hek293 transfectadas con las construcciones respectivas, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de NGF-biotina. Análisis estadístico mediante two-way ANOVA (media \pm SEM, n=2) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2. LOS RESIDUOS DE LA REGION eJTM REQUIEREN DE UNA CONFORMACIÓN ESPECÍFICA PARA LA ACTIVACIÓN DE TrkA

2.1. Los residuos K410 y K411 participan en la homodimerización de TrkA por BS³

Los resultados obtenidos hasta el momento le dan gran relevancia a la integridad de la región eJTM y brindan información sobre la existencia de una posible reorganización del eJTM que conduce a la correcta activación del receptor. Como parte de la búsqueda de dicha conformación específica en esta región, quisimos primero ser capaces de detectar la formación de dímeros de TrkA por western Blot mediante el uso de Bs3, un entrecruzador químico de aminos libres presentes en la cadena lateral de los residuos de lisinas. Para fomentar la formación de dímeros de TrkA las células se incubaron 30 min con NGF. En vista que el BS3 no es permeable a la membrana celular, la reacción se llevaría a cabo en la región extracelular, donde gracias a la estructura del dominio extracelular de TrkA unido a NGF pudimos tener una idea de la posición de las lisinas que permitirían este entrecruzamiento (figura R1-6A). Localizamos de esta forma los residuos K410 y K411. Aunque estos residuos no se encuentran en la estructura resuelta por pertenecer a la región eJTM formarían parte de la porción extracelular y podrían estar a una distancia necesaria para el BS3. Para testarlo mutamos ambos residuos de lisina por arginina (TrkA-KK/RR) transfectamos las células y analizamos el extracto por western blot, donde observamos que el mutante KK/RR no formó dímeros con el Bs3 (Figura R1-6C). Paralelamente decidimos utilizar el mutante 5P/5G, el cual tuvo un escaso entrecruzamiento, provocado posiblemente por la pobre unión a ligando y la mala orientación de las lisinas. Todos estos datos sugieren que el NGF fomenta la proximidad de las regiones eJTM al conformarse el homodímero de TrkA.

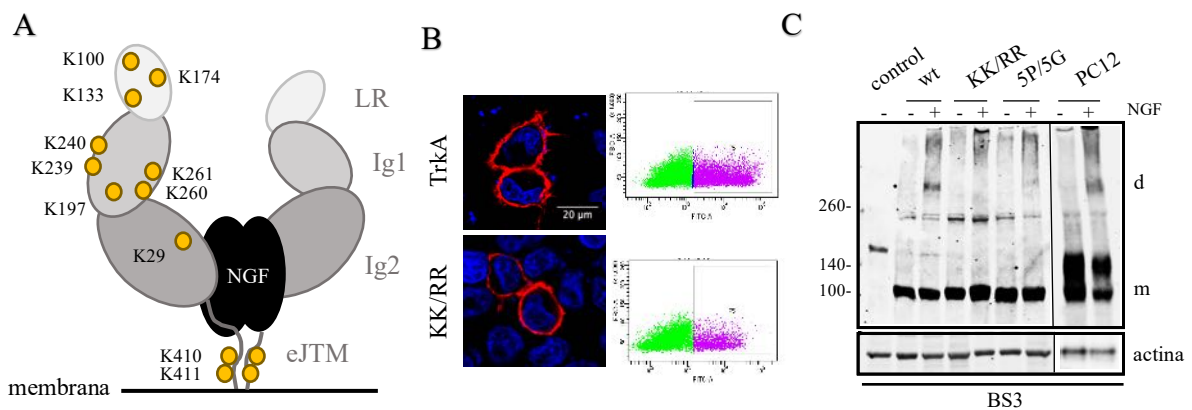
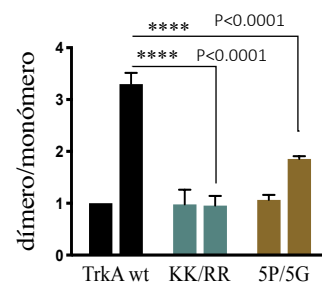
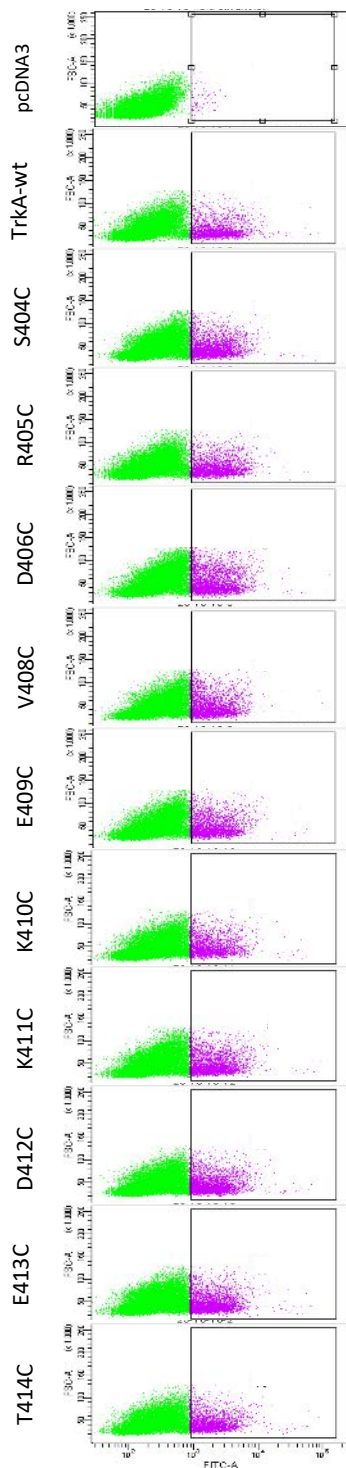


Figura R1-6. La formación de homodímeros de TrkA por BS3 se establece por los residuos K410 y K411 en presencia de NGF **A**, Esquema de la distribución de los residuos de lisina en la porción extracelular del receptor TrkA, mostrando las Lys410 y Lys411 en la porción eJTM **B**, Inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas donde se observa la expresión de receptores en la membrana celular (rojo) y el núcleo celular (azul); a la derecha el ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de receptores en la superficie celular (morado). **C**, Western blot del análisis de los extractos de HeLa transfectadas con las construcciones de TrkA e incubadas en presencia o ausencia de NGF, todas ellas incubadas con BS3, se utilizaron las células PC12 como control de la formación de dímeros endógenos de TrkA. Se observa la presencia de monómeros (m) y dímeros (d) de TrkA. En el histograma inferior se muestra la cuantificación de las bandas. Análisis estadístico mediante *two-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.



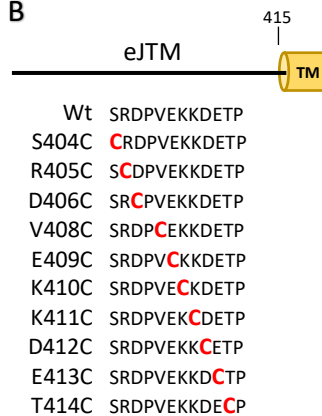
2.2. La proximidad de las regiones eJTM fomenta la formación de dímeros covalentes en mutantes de TrkA

A



A fin de imitar la conformación del dímero activo, decidimos forzar la interacción entre las regiones eJTM reemplazando los 10 últimos residuos de la región eJTM por cisteínas. Las construcciones se obtuvieron por mutagénesis dirigida por PCR. Se testaron los niveles de expresión en la membrana de células HeLa por citometría de flujo e inmunocitoquímica. Se observaron que todas las construcciones tenían niveles de expresión en la membrana similares a TrkA-wt (Figura R1-7A). Posteriormente se transfectaron las células HeLa y las muestras se analizaron por SDS-PAGE no reductor para cuantificar la formación de dímeros covalentes en ausencia de NGF. Los resultados mostraron la formación de dímeros en todos los residuos, los cuales aumentaban mientras más nos acercábamos al dominio TM. Siendo los residuos K411 y D412 los que formaban más dímeros (Figura R1-7C). Para los estudios de actividad, empleamos las células HeLa y PC12 nnr5. Se transfectaron placas p100 de células HeLa que luego se incubaron en ausencia y presencia de NGF. Los lisados se analizaron por western blot y se cuantificó la fosforilación del residuo Try674/675 de TrkA (Figura R1-8A,B).

B



C

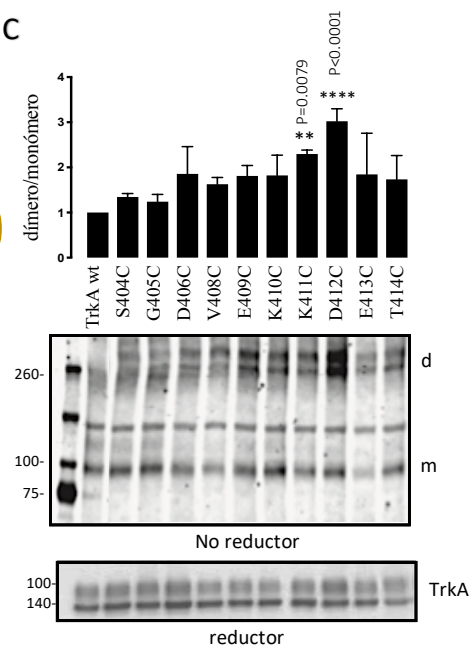
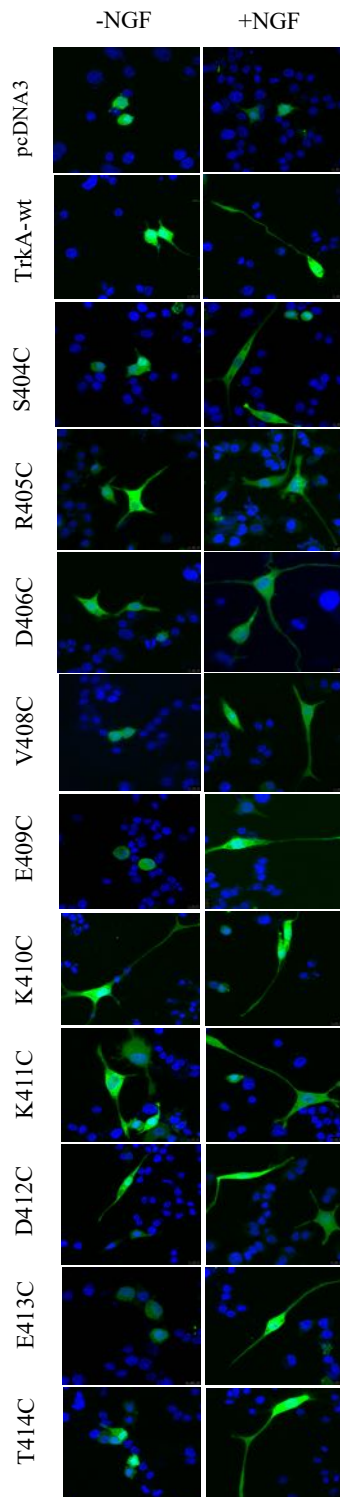


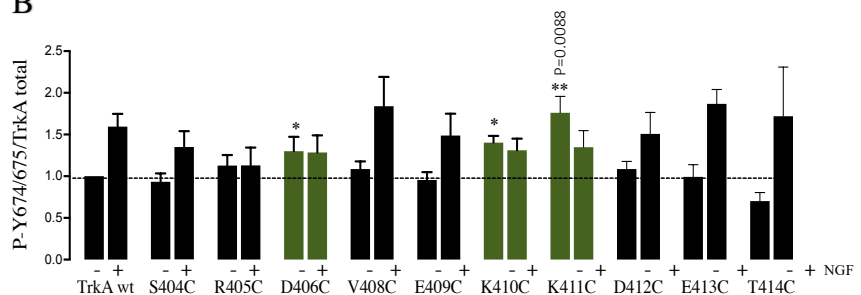
Figura R1-7. La proximidad de las regiones eJTM fomenta la formación de dímeros covalentes en los mutantes de TrkA. **A**, Ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de receptores en la superficie celular (morado) se normaliza a TrkA-wt =100% **B**, Secuencia alineada de la región eJTM de las mutaciones introducidas para la obtención de los mutantes de TrkA. **C**, Cuantificación de la formación de dímeros covalentes de cisteína en los diversos mutantes de TrkA en células HeLa, en el histograma se expresan los valores del ratio dímero (d)/monómero (m) normalizado al TrkA-wt=1 y debajo se visualizan los dímeros y monómeros por análisis de western blot no reductor así como los niveles de TrkA total en condiciones reductoras. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, n=2) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

2.3 La región eJTM tiene una interfaz preferente de dimerización que promueve la activación del receptor

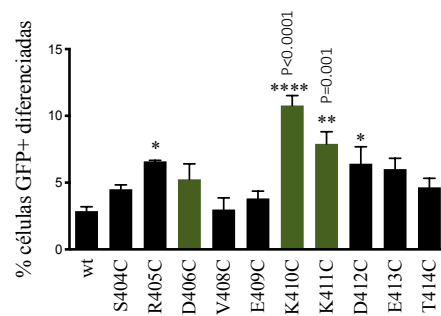


Los ensayos de actividad en células PC12nnr5 transfectadas con las construcciones de cisteína e incubadas en ausencia y presencia de NGF durante 48h (Figura R1-8A) revelaron que los mutantes D406C, K410C y K411C no solo fomentan la activación constitutiva del receptor en ausencia de ligando (Figura R1-8B), también son capaces de promover la diferenciación de las células PC12nnr5 en ausencia de NGF. Los mutantes K410C y K411C también mostraron mayores niveles de fosforilación de la Tyr490 en ausencia de ligando. Curiosamente, en presencia de NGF todas las construcciones alcanzaban niveles de diferenciación similares a TrkA-wt. El conjunto de datos nos muestra que las regiones eJTM necesitan adoptar una conformación ideal para constituir dímeros activos, esta aproximación y reorganización de las regiones eJTM podría estar mediada por el acoplamiento de NGF.

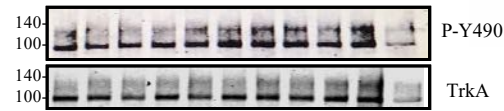
B



C



D



E

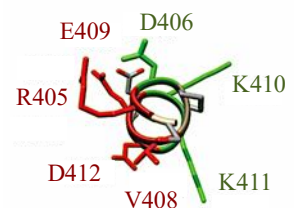


Figura R1-8. La región eJTM muestra una interfaz preferente de dimerización que promueve la activación del receptor **A**, Diferenciación de células PC12nnr5 transfectadas con las construcciones indicadas e incubadas en ausencia y presencia de NGF 48 h **B**, Cuantificación de la activación de TrkA en células HeLa transfectadas e incubadas en ausencia y presencia de NGF, se expresan los valores del ratio PY674/675 / TrkA total, se muestra en verde los residuos que mostraron mayor actividad en ausencia de ligando. Análisis estadístico, *Two-way ANOVA* (media \pm SEM, $n=3$) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. **C**, Cuantificación en ausencia de NGF de la diferenciación de PC12nnr5 transfectadas. **D**, Western blot de lisado de células PC12nnr5 del ensayo C para el análisis de la fosforilación del residuo Tyr490. **E**, modelo de la localización espacial de los residuos de la región eJTM. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, $n=2$) aplicando *Bonferroni's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

3. DETERMINACIÓN DE LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DEL TM DE TrkA

Estudios previos sugieren que los dímeros de Trk se estabilizan a través de contactos entre los dominios transmembrana (Ahmed & Hristova, 2018), nuestros datos sugieren que esos contactos entre los dominios transmembrana pueden estar mediados por la región eJTM tras la unión de NGF. Con el consecuente impacto sobre la organización de los dominios siguientes. Con el objetivo de determinar la implicación que tiene el dominio transmembrana en la dimerización del receptor TrkA, decidimos realizar mutaciones individuales de los 10 primeros residuos del dominio TM de TrkA y reemplazarlos por cisteínas con el objetivo de fomentar esa dimerización al formarse un enlace covalente si los residuos se encuentran lo suficientemente próximos. La presencia de dímeros en determinados residuos podría mostrarnos alguna interfaz preferente de dimerización (Figura R1-9A). Los mutantes TrkA-TM se obtuvieron por mutagénesis dirigida por PCR, posteriormente se transfectaron las células HeLa con todas las construcciones y se sembraron en placas p100 y placas de 24 pocillos para realizar ensayos de citometría de flujo (Figura R1-9B) e inmunocitoquímica (Figura R1-9C) respectivamente, con el objetivo de cuantificar los niveles de expresión de los receptores mutantes en la superficie celular respecto a TrkA-wt. Los resultados mostraron que independientemente de la mutación todas las proteínas tenían un procesamiento normal y alcanzaban niveles de expresión similares al wt.

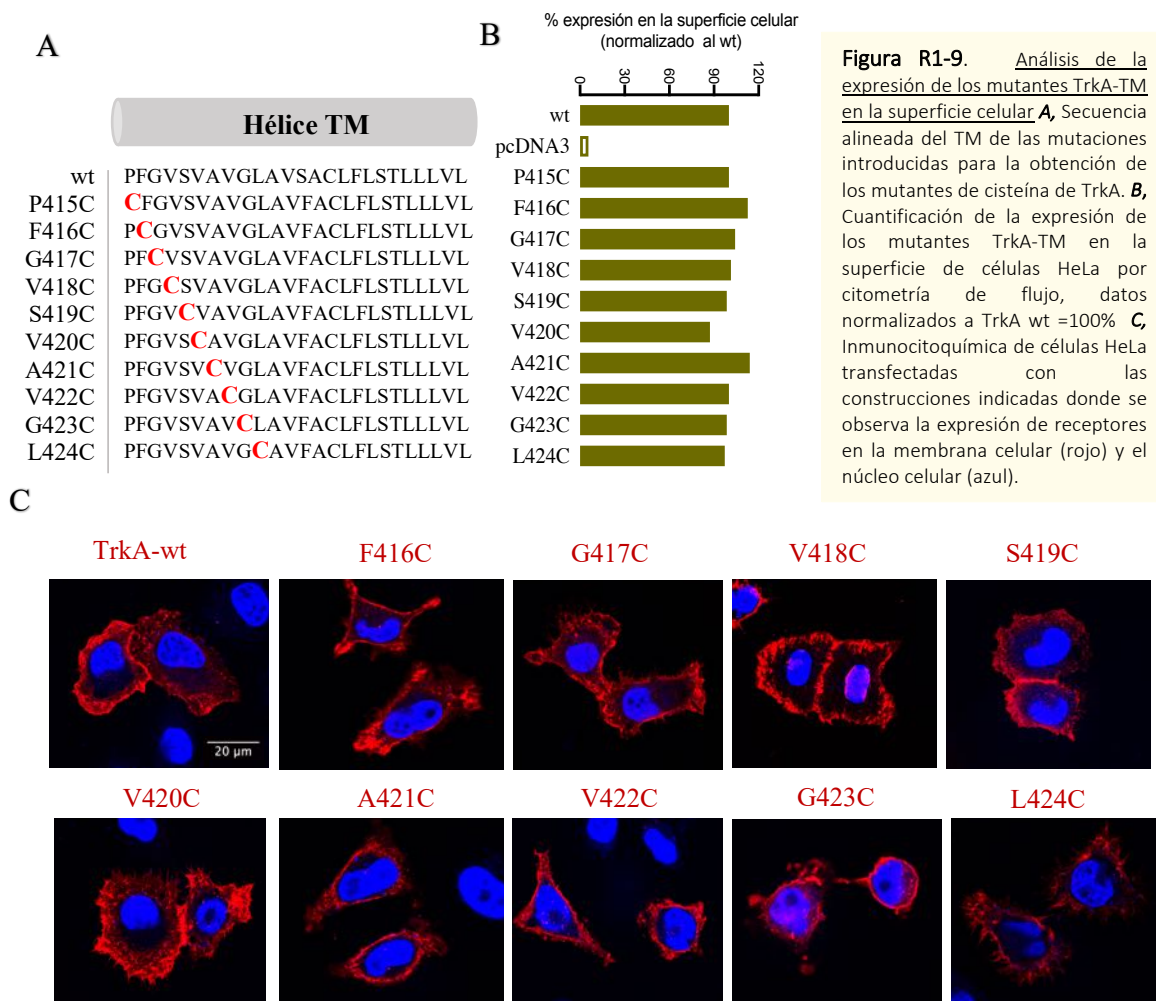


Figura R1-9. Análisis de la expresión de los mutantes TrkA-TM en la superficie celular **A**, Secuencia alineada del TM de las mutaciones introducidas para la obtención de los mutantes de cisteína de TrkA. **B**, Cuantificación de la expresión de los mutantes TrkA-TM en la superficie de células HeLa por citometría de flujo, datos normalizados a TrkA wt =100% **C**, Inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas donde se observa la expresión de receptores en la membrana celular (rojo) y el núcleo celular (azul).

Seguidamente se transfectaron las células HeLa con todas las construcciones TrkA-TM y se cuantificó la formación de dímeros en ausencia y presencia de ligando a fin de determinar una posible interfaz de dimerización que fomente la activación del receptor. Para ello, tras la transfección de las células en placas p100, se realizó una purificación de membranas por ultracentrifugaciones. Finalmente, las membranas se resuspendieron en tampón de homogenización mediante sonicación y se incubaron en presencia y ausencia de ligando durante 10 min. e inmediatamente se trataron con I₂ durante 30", el cual empleamos como agente oxidante para fomentar la formación del enlace covalente de los residuos del dominio transmembrana que se encontraban más profundos. Los lisados celulares se analizaron por western Blot y para la inmunodetección se utilizó el anticuerpo anti-TrkA y se cuantificó la formación del dímeros. Se observó que las glicinas introducidas en las posiciones 417 y 418 favorecieron el entrecruzamiento. (Figura R1-10A).

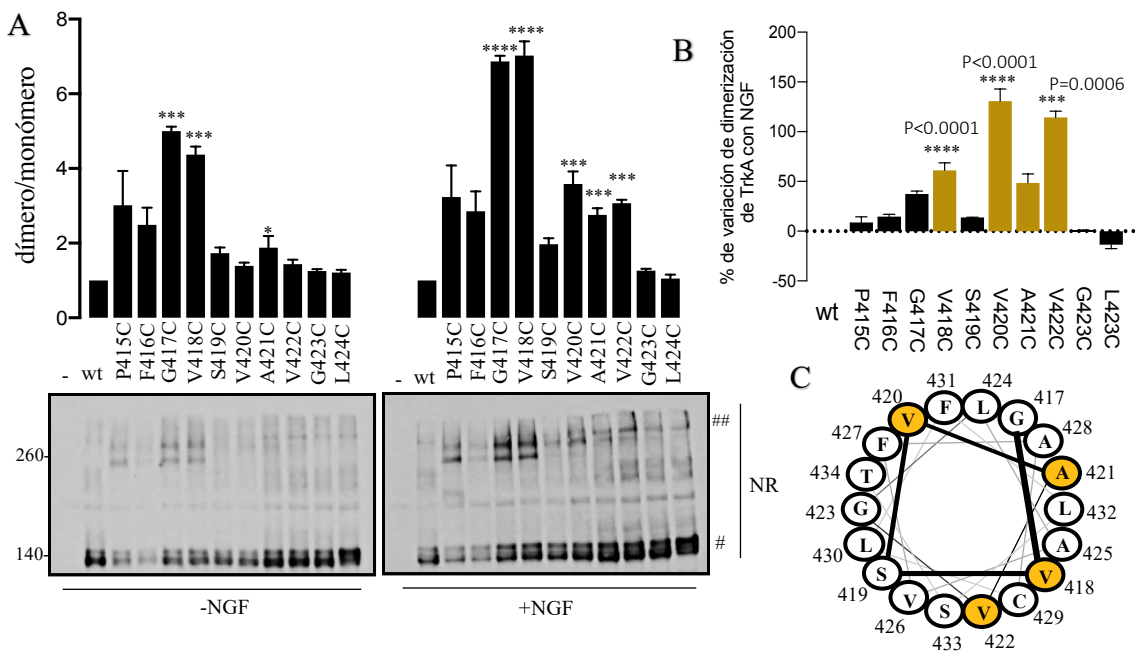


Figura R1-10. Determinación de dímeros covalentes de TrkA mediado por residuos del dominio TM utilizando en I₂. **A**, análisis de los extractos de membrana de HeLa transfectadas con los mutantes TrkA-TM, en parte inferior se muestra el western blot donde se observan monómeros (#) y la formación de dímeros covalentes (##) en ausencia y presencia de NGF, en la parte superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001. **B**, Histograma que muestra el cambio porcentual del ratio dímero/monómero de las mutaciones de TrkA con NGF frente a sus respectivos controles sin NGF. **C**, representación esquemática de la posición de los residuos en la hélice TM, se resalta en amarillo aquellos residuos que forman dímeros en presencia de NGF.

3.1. El residuo V418 forma parte de la interfaz activa de dimerización

Para determinar si alguno de esos dímeros formaba parte de la interfaz activa del receptor, decidimos estudiar si alguna de estas mutaciones era capaz de fomentar la activación de TrkA en ausencia de ligando, para ello empleamos las células PC12nr5, una activación independiente de ligando provocaría la diferenciación en estas células, diferenciación que se sabe está directamente relacionada con la actividad de este receptor (Loeb et al., 1991). Las PC12nr5 se transfectaron con las construcciones TrkA-TM y se sembraron en placas

de 12 pocillos donde se incubaron durante 48h, tiempo tras el cual se fijaron y se cuantificó la diferenciación, paralelamente se lisaron células HeLa transfectadas con los mutantes para analizar la actividad del receptor estudiando la fosforilación del residuo Y674/675, los resultados mostraron que solo el mutante V418C inducía una respuesta independiente de ligando fomentando un significativa diferenciación celular (Figura R1-11A) actividad que también se relacionó con un incremento en la fosforilación del receptor en ausencia de NGF, mostrándonos que este residuo formaría parte de la interfaz activa de dimerización.

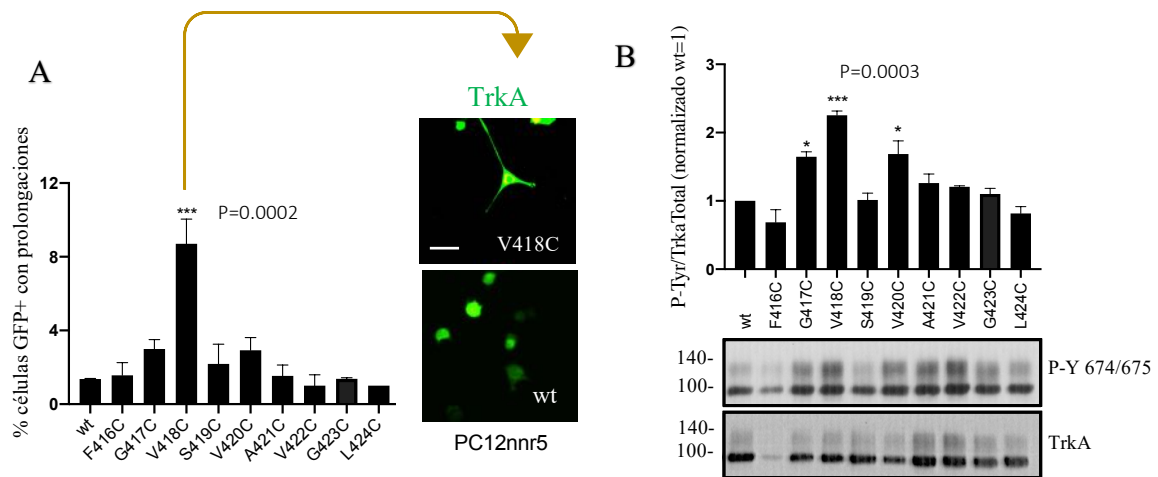


Figura R1-11. Residuo V418 como parte de la interfaz activa de dimerización **A**, Células PC12nr5 co-transfectadas con las mutaciones de TrkA y GFP, se cuantificó el número de células diferenciadas en ausencia de ligando (n=3, experimentos independientes). A la derecha imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia mostrando las células PC12nr5 diferenciadas (flecha) 48h post-transfección, se compara TrkA wt y TrkA V418C. Escala (barra)=20 μ m **B**, Western Blot del extracto de células HeLa transfectadas con las construcciones de TrkA indicadas, se lisaron las células 48h post-transfección en ausencia de ligando, se realizó la inmunodetección con el anticuerpo p-Y 674/675, la densitometría se muestra en el histograma inferior, valores normalizados al wt. Análisis estadístico, *one-way* ANOVA (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001.

Tras los resultados obtenidos en los ensayos con I₂, decidimos utilizar un entrecruzador de cisteínas que sea permeable a la membrana, sin necesidad de preocuparnos por el ambiente que dificulte la formación de puentes disulfuro; empleamos el MTS-2-MTS, un entrecruzador de cisteínas de 5.2 Å, para ello se transfectaron las células HeLa con las respectivas construcciones de TrkA-TM, se incubaron sin y con NGF durante 30 min y posteriormente se trataron 10 min. con el reactivo MTS, tiempo tras el cual se lisaron las células y los extractos se analizaron por western blot, empleando el anticuerpo anti-TrkA. En ausencia de NGF se nos revela una visible interfaz de dimerización que sigue el motivo S₄₁₉XXXG₄₂₃, ausente en el ensayo previo de I₂ que realizamos, el cual podría haberse visto desfavorecido por la distancia para la formación de un enlace covalente directo por cisteínas (Figura R1-12A). De ser así, esto podría mostrar el papel de este motivo de dimerización en la formación de posibles dímeros preformados inactivos, de los cuales ya se planteó la existencia tiempo atrás (Marchetti et al., 2013; Mischel et al., 2002). Aunque estos dímeros parecen predominar, aún se observa la formación de dímeros con los residuos que identificamos en el ensayo de I₂ como lo es la V418C, los cuales aparecen y aumentan de forma significativa en presencia de ligando (Figura R1-12A).

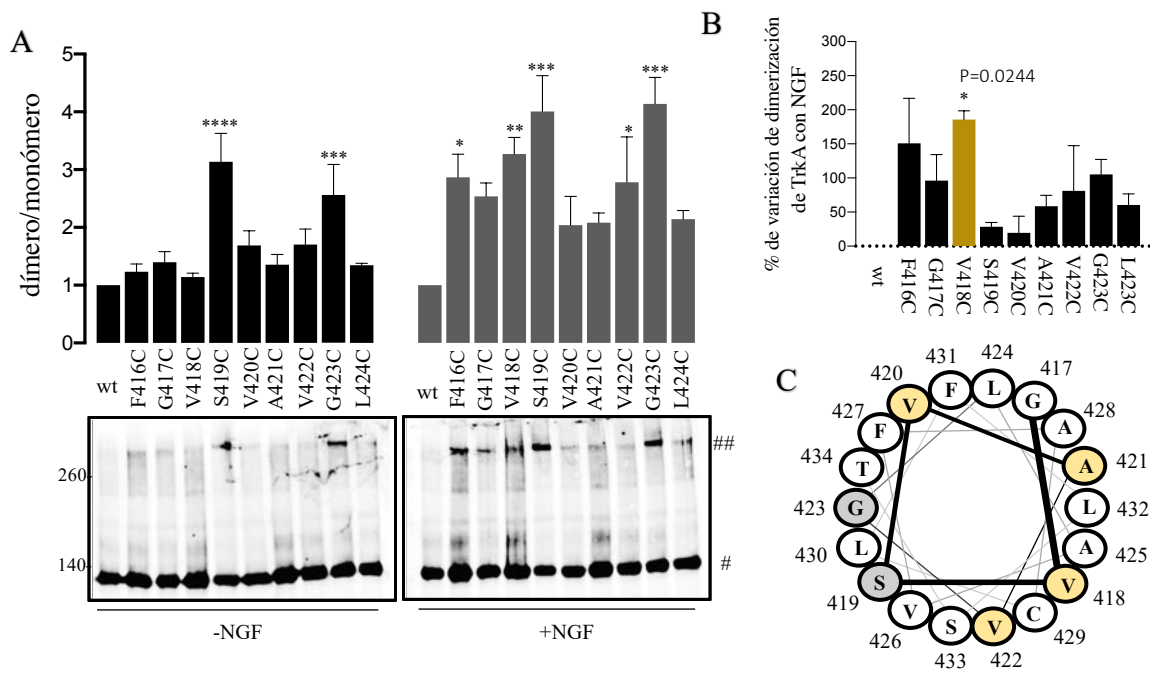


Figura R1-12. Determinación de dímeros covalentes de TrkA mediado por residuos del dominio TM utilizando el MTS-2-MTS. **A**, análisis de los extractos de HeLa transfectadas con los mutantes TrkA-TM, tratados con MTS-2-MTS, en la parte inferior se muestra el western blot donde se observan monómeros (#) y la formación de dímeros (##) en ausencia y presencia de NGF, en la parte superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de cuatro experimentos independientes. ****, $p < 0,0001$; ***, $p = 0,0004$; **, $p = 0,0063$; *, $p = 0,04$. **B**, Histograma que muestra el cambio porcentual del ratio dímtero/monómero de las mutaciones de cisteína de TrkA con NGF frente a sus respectivos controles sin NGF. **C**, representación esquemática de la posición de los residuos en la hélice TM, se resalta en gris aquellos residuos que forman dímeros en ausencia de NGF con MTS y en amarillo los dímeros observados en el ensayo con I_2 . Análisis estadístico, one-way ANOVA (media \pm SEM, $n = 3$) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

3.2. El residuo A428 sirve como eje para la activación de TrkA por NGF

Continuando con la búsqueda de la interfaz del dímtero activo decidimos reemplazar los residuos pequeños como alanina, glicina y serina localizados a lo largo del TM por un residuo voluminoso como isoleucina, el objetivo de reemplazar un residuo pequeño que podría formar parte de la interfaz activa del receptor por un residuo mas grande podría tener un impacto funcional negativo en la activación del receptor, el cual decidimos estudiar mediante ensayos de actividad en presencia de NGF y estudios de diferenciación en PC12nr5. En primer lugar, decidimos determinar si las proteínas tenían un procesamiento normal y conseguían anclarse en la membrana independientemente de la mutación, mediante ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal observamos que todas ellas se encontraban en la superficie celular y alcanzaban niveles de expresión similares a TrkA-wt (Figura R1-13A). Para estudiar el impacto de las mutaciones en la actividad del receptor transfectamos las células HeLa con las construcciones y después de 48h las estimulamos con 10 ng/ml de NGF a tiempos de 0, 5 y 15 min, tras lisar las células se analizaron los extractos por western blot donde observamos una reducción significativa de la actividad en el mutante A428I, siendo esta mutación también la responsable de la baja actividad del triple mutante 3A/3I. Se obtuvo la misma respuesta en los ensayos de diferenciación, donde se observó una reducción de la actividad del receptor, reflejada en la escasa diferenciación de las PC12nr5 en presencia de NGF. Todos estos datos sacan a la luz la importancia de la integridad del residuo A428I como eje para promover la activación del receptor en presencia de ligando.

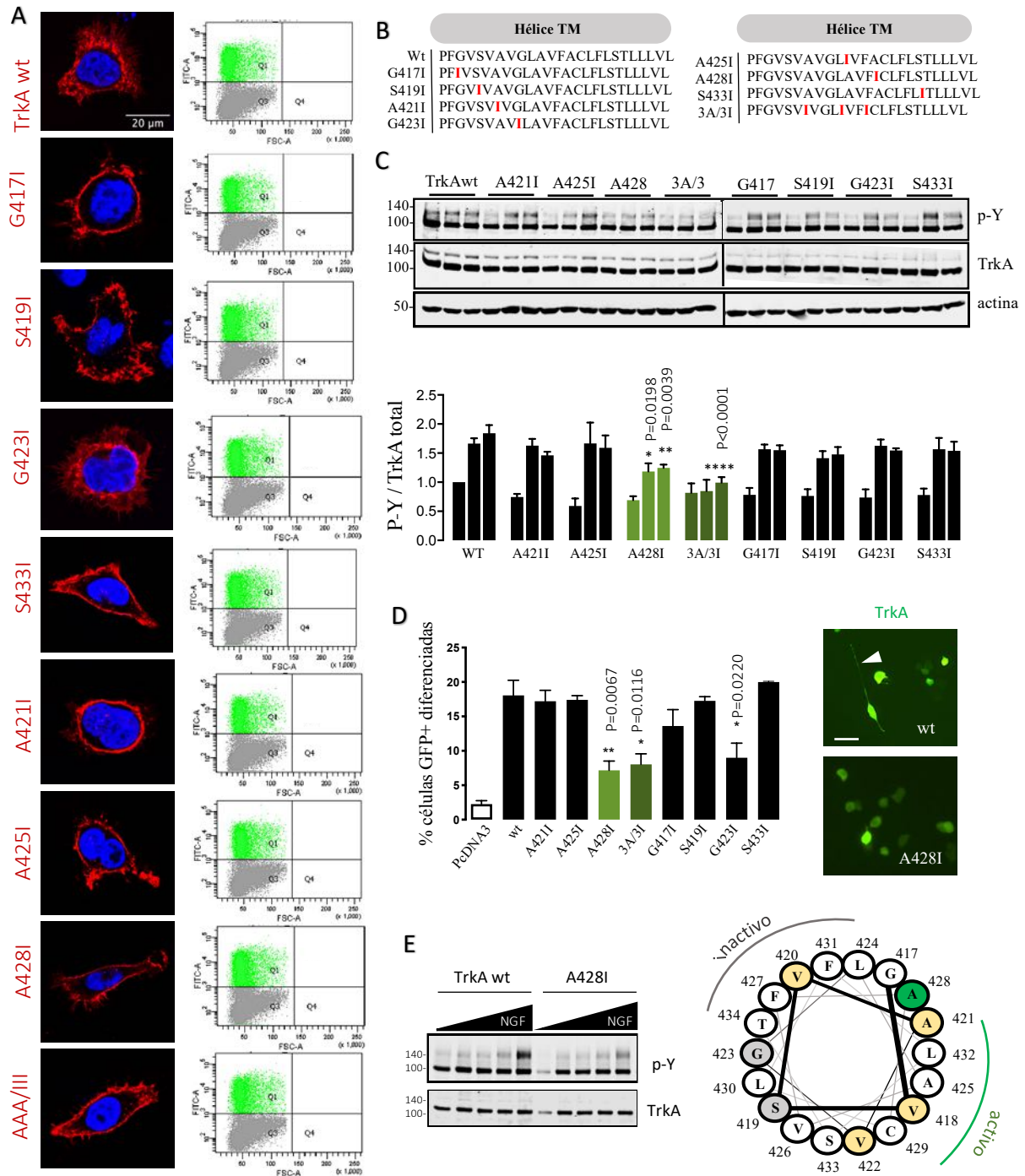


Figura R1-13. La integridad del residuo A428 para la correcta activación de TrkA por NGF **A**, inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas de TrkA, se observa la señal del receptor en la superficie celular (rojo), se empleó el anticuerpo anti-HA para su detección; a la derecha ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de los mutantes de TrkA en la membrana plasmática, se analizó un total de 50 000 eventos. **B**, Secuencia alineada del TM de las construcciones de TrkA obtenidas reemplazando los residuos de alanina, serina y glicina por isoleucina. **C**, Western blot de células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas, estimuladas con 10 ng/ml de NGF durante 0, 5 y 15 min. La fosforilación del receptor se determinó utilizando el anticuerpo p-Y674/675, en el blot inferior se muestran los niveles de TrkA total. La cuantificación se determinó calculando el ratio p-Y/total normalizado al wt t=0 (histograma inferior) Análisis estadístico, *two-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001. **D**, porcentaje de células PC12nr5 transfectadas y diferenciadas tras 48h con 10 ng de NGF. A la derecha imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia mostrando las prolongaciones características de las PC12nr5 diferenciadas (flecha), se compara TrkA-wt y TrkA-A428I. Escala (barra)=20 μ m. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Bonferroni's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001. **E**, Western Blot de células HeLa transfectadas con TrkA-wt y TrkA-A428I incubadas con concentraciones crecientes de NGF (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL NGF) durante 5 min. Se analiza la fosforilación del residuo Y674/675. Se observa la baja respuesta del mutante a concentraciones saturantes de ligando. A la derecha, representación esquemática de la hélice transmembrana de TrkA mostrando los residuos relevantes del ensayo con I₂ (amarillo), MTS (gris) y el residuo A428I (verde).

4. LA ROTACIÓN INDUCIDA DEL DOMINIO TM DE TRKA ACTIVA CONSTITUTIVAMENTE EL RECEPTOR

4.1. NGF fomenta la activación completa de TrkA en un contexto de sobreexpresión del receptor

Ensayos de señalización de TrkA en ausencia y presencia de NGF mostraron que la sobreexpresión del receptor puede provocar una activación independiente de ligando (Maruyama, 2014). Curiosamente, la presencia de NGF en un contexto de sobreexpresión de TrkA fomenta la activación completa del receptor. Estos resultados revelan la importancia del acoplamiento y el cambio conformacional mediado por NGF. (Figura R1-14).

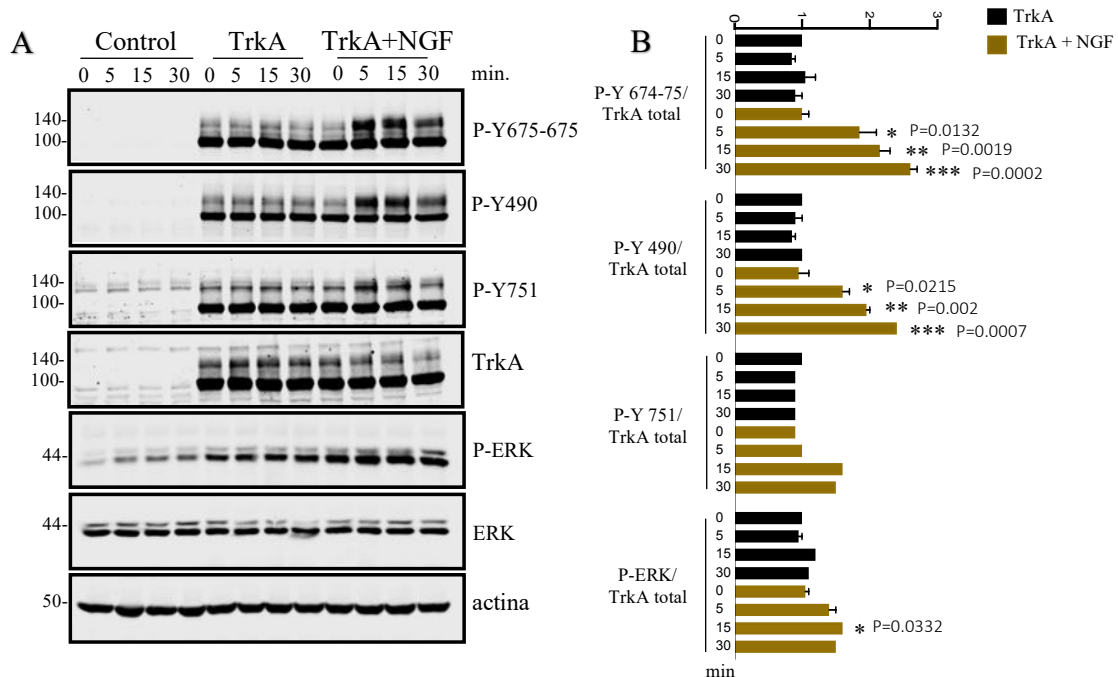


Figura R1-14. El NGF fomenta la activación completa de TrkA en un contexto de sobreexpresión del receptor **A**, Western Blot de células HeLa transfectadas con 5µg de TrkA, estimuladas con 10 ng/ml de NGF durante 0,5,15 y 30 min. Se muestra un aumento en la actividad de TrkA producida por el ligando, se emplearon los anticuerpos indicados frente a las tirosinas fosforiladas del dominio quinasa así como P-ERK, se muestran los niveles de TrkA total, ERK y actina **B**, Cuantificación de las bandas observadas en panel A, se muestran los ratios de la señal de fosforilación de TrkA frente a sus respectivos totales, normalizados a su correspondiente TrkA wt. Las barras de error vienen de la réplica de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico, two-way ANOVA (media ± SEM, n=3) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

4.2. La inserción de leucinas en el dominio TM de TrkA activa constitutivamente el receptor

Este cambio conformacional provocado por el NGF podría derivar en una rotación del dominio transmembrana utilizando el residuo V428 como eje permitiéndonos pasar de una interfaz a otra fomentando la correcta orientación del dominio quinasa para su fosforilación. A fin de corroborar que una rotación del TM influye verdaderamente sobre la actividad del receptor, decidimos introducir un número creciente de hasta 4 residuos de leucinas en el TM del receptor TrkA (TrkA-ins) y analizar su actividad en ausencia de NGF. Las construcciones TrkA-ins se obtuvieron por mutagénesis dirigida por PCR y al

igual que en ensayos anteriores se analizaron los niveles de proteína de los mutantes en la superficie de células HeLa en comparación con el TrkA-wt (Figura R1-15A). Tras observar que los niveles en la membrana eran adecuados se procedió a realizar los ensayos de actividad de TrkA. Para ello se transfectaron las células HeLa con las 4 construcciones TrkA-ins, tras 48h se lisaron las células con tampón de lisis y los extractos se analizaron por western blot (Figura R1-15B). Observamos que la inserción TrkA-ins1L produce un aumento significativo de la actividad del receptor, lo cual se corroboró con los ensayos de diferenciación en PC12nnr5 (Figura R1-15D). Estos datos sugieren que la inserción de un residuo de leucina es capaz de provocar la rotación del dominio intracelular unos 100° suficiente como para orientar correctamente los dominios quinasa.

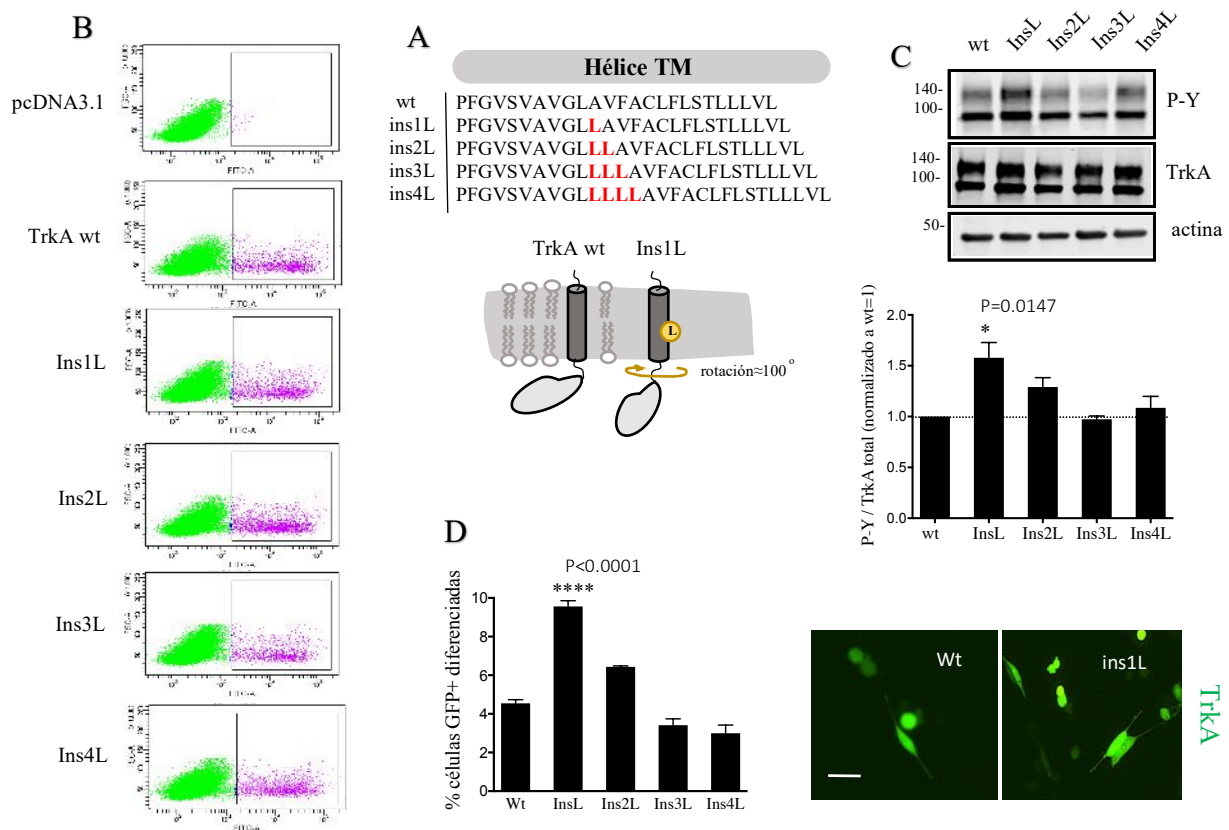


Figura R1-15. La inserción de leucinas en el dominio TM de TrkA activa constitutivamente el receptor **A**, Secuencia alineada de aminoácidos del dominio TM de las construcciones TrkA-ins, mostrando la localización de las inserciones de residuos de leucina, en parte inferior se aprecia un esquema representando la rotación TM que supone la inserción de un residuo de Leucina **B**, Ensayo de citometría de flujo para el análisis de la expresión de los mutantes TrkA-ins en la superficie celular, se muestra en morado las células que expresan el receptor en la superficie celular, se analizó un total de 50 000 eventos. **C**, Western Blot de células HeLa transfectadas con los mutantes TrkA-ins e incubadas en ausencia de NGF, se analizó la fosforilación del residuo Y674/675. Se observó un aumento de la actividad del receptor al expresar TrkA-ins1L. Se muestran los niveles de TrkA totales así como los niveles de actina, **D**, Cuantificación de la diferenciación de las células PC12nnr5 transfectadas, valores expresados en porcentajes normalizados al wt=100%. A la derecha se muestran las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia donde se aprecia la diferenciación de las PC12nnr5 mediada por la actividad de TrkA-ins1L en ausencia de ligando. Escala (barra)=20 μ m. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001

5. INTERACCIONES EN EL DOMINIO Ig2 PODRÍAN ESTABILIZAR TETRÁMEROS DE TrkA EN PRESENCIA DE NGF

5.1. Dímeros preformados de TrkA responden de forma más rápida e intensa a NGF

El cambio conformacional que fomenta la rotación del TM de TrkA nos permitiría pasar de una constitución dimérica inactiva a activa, ello reforzaría la teoría de la existencia de dímeros preformados inactivos (Mischel et al., 2002; Shen & Maruyama, 2011). Aunque parte de las interacciones entre dímeros estarían estableciéndose por residuos TM que hemos estudiado a lo largo de este capítulo, también se ha descrito que NGF fomenta la formación de tetrámeros y oligómeros de TrkA. Por esa razón, consideramos que interacciones fuera del TMD podrían estabilizar estos complejos y presumimos que la presencia de dímeros inactivos podrían tener un rol favorecedor en la formación de tetrámeros. A fin de corroborar esta teoría, decidimos estudiar el impacto que tiene la presencia de dímeros inactivos en la respuesta del receptor a NGF. Decidimos hacer un ensayo de diferenciación en las células PC12nnr5, las cuales se transfectaron con mutantes de TrkA pertenecientes a la interfaz inactiva (V408C) y activa (D406C, K411C) de la región eJTM y estudiamos el impacto que tuvo el NGF en la actividad de estos dímeros preformados. Para ello cuantificamos la longitud de las prolongaciones de las células diferenciadas a las 7 y 24 h. (Figura R1-16).

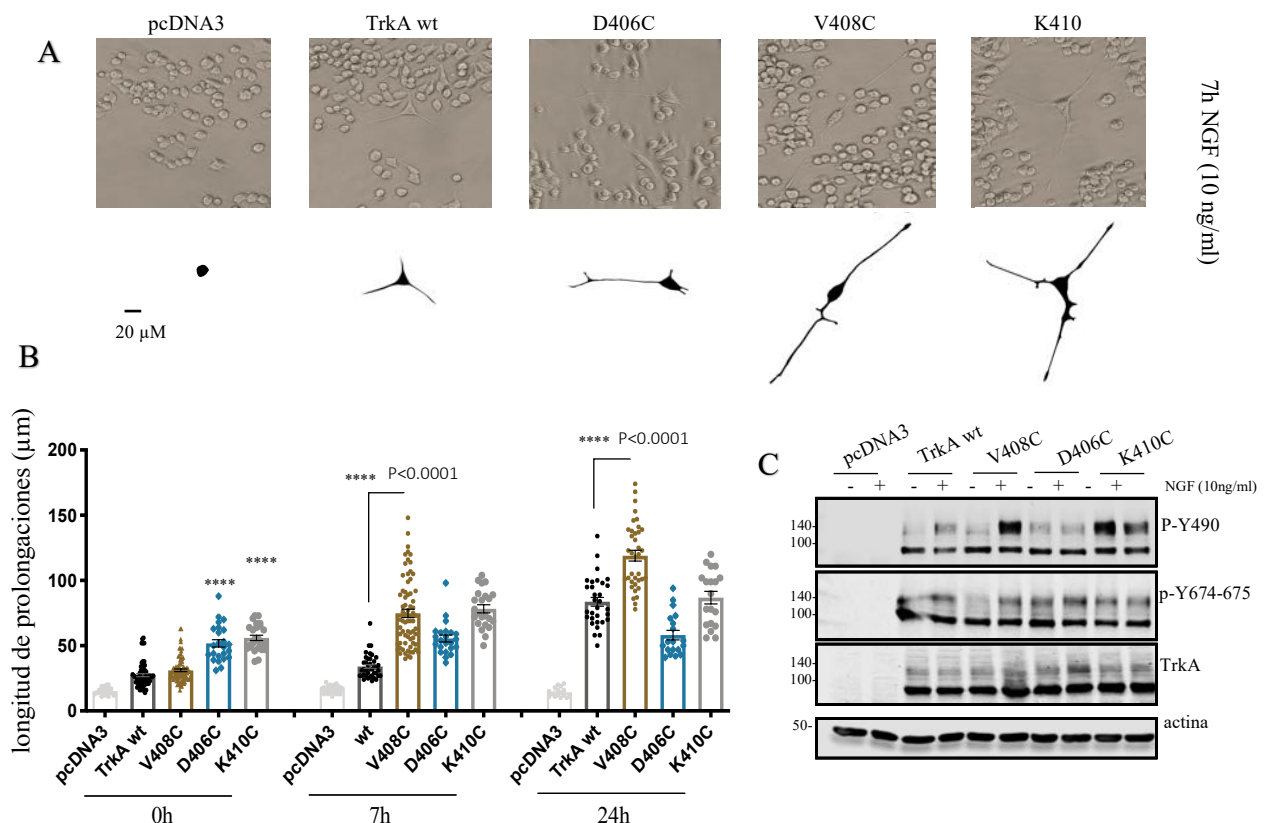


Figura R1-16. Dímeros preformados inactivos de TrkA tiene una respuesta mayor tras la unión de NGF. **A**, Ensayo de diferenciación de PC12nnr5. Imágenes representativas a campo claro de PC12nnr5 diferenciadas, acompañadas de la silueta en negro obtenidas con el programa imageJ. **B**, Cuantificación de la longitud (µm) de las prolongaciones de células PC12nnr5 transfectadas con las construcciones indicadas e incubadas 7 y 24 horas con NGF (10 ng/ml). **C**, Análisis de los extractos de PC12nnr5 por western blot para el estudio de actividad, se muestran los niveles de fosofirilación de los residuos Tyr490 y Tyr674/675 en ausencia y presencia de NGF, así como los niveles de TrkA total y actina. Análisis estadístico, two-way ANOVA aplicando Tukey's multicomparison test. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. Se cuantificaron una media de 50 células por condición.

Los resultados mostraron que el mutante V408C fomenta una diferenciación celular más rápida que TrkA-wt a las 7h , mientras que los mutantes D406C y K410C, que ya inducían la diferenciación en ausencia de ligando por encontrarse en la conformación activa del receptor, no promovieron un crecimiento mayor de las prolongaciones, alcanzando medidas similares a las de TrkA-wt a las 24h. Paralelamente se lisaron las células para estudiar la fosforilación del residuo Tyr490, donde observamos una mayor fosforilación en el mutante V408C con la estimulación de NGF. Estos resultados sugieren que los dímeros preformados inactivos fomentan una respuesta del receptor más rápida y fuerte tras la unión a NGF, la cual, presumimos, podría estar mediada por su facilidad para formar tetrameros (Figura R1-16).

5.2. Interacciones no covalentes en el dominio Ig2 median la conformación tetramérica de TrkA

Analizando la estructura cristalina del dominio extracelular de TrkA unido a NGF, se nos mostró una nueva interfaz de dimerización en la porción extracelular del dímero que le permitiría interactuar con otro dímero de TrkA/NGF, encontrándonos así con tetrameros de TrkA; esta interacción se llevaría a cabo por la formación de puentes de hidrógeno mediados por los residuos Q369 y S371 de la lámina β de cada dominio de inmunoglobulina 2. De ser así, pondríamos encontrarnos en dos contextos tras la unión de NGF: i) dímeros preformados inactivos con capacidad de rotar para unir NGF y establecerse como dímeros activos, ii) dímeros de conformación activa ligados a NGF capaces de constituir tetrameros con capacidad de formar complejos aún más numerosos como ya se ha planteado en estudios recientes, donde sugieren que el NGF estabiliza el dímero y fomenta la formación de oligómeros de TrkA (Ahmed & Hristova, 2018; Marchetti et al., 2013)

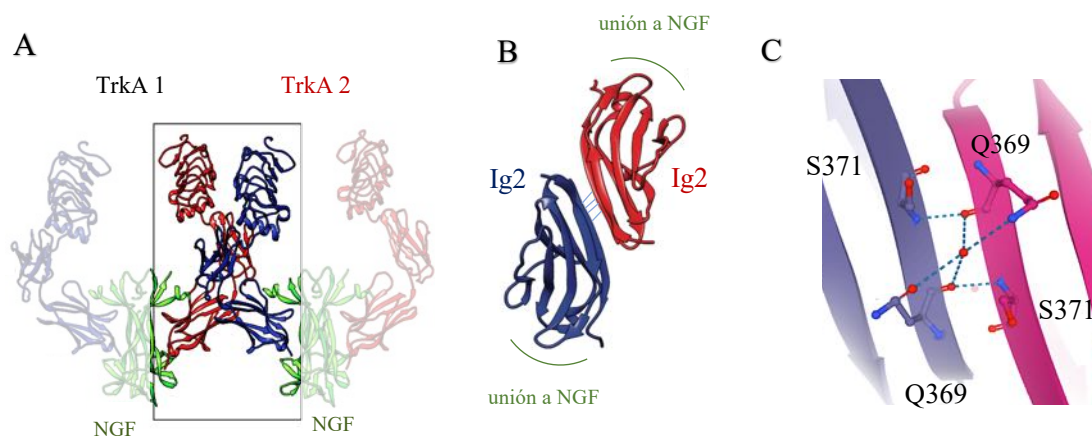


Figura R1-17. Conformación del tetramero de TrkA mediado por interacciones no covalentes en el dominio Ig2 **A**, Estructura cristalina del complejo TrkA/NGF (Protein Data Bank: 2IFG) formando un tetramero. **B**, Estructura y posición de dos dominios de Ig 2 aislados de la imagen A, mostrando los extremos de unión a NGF y en la porción central la formación de enlaces no covalentes. **C**, Representación de las hojas β de dos dominios de Ig2 mostrando la posición de los residuos Gln369 y Ser371 y los enlaces de hidrógeno que establecen entre ellos.

5.3. Los residuos Q369 y S371 estabilizan dímeros preformados inactivos que responden mejor a NGF

Para determinar si esta respuesta inmediata viene dada por la formación de tetrámeros establecidos por contactos entre los dominios Ig2, decidimos reemplazar los residuos Q369 y S371 por cisteínas, forzando así la formación de dímeros por el dominio Ig2. Las construcciones se obtuvieron mediante técnicas de PCR y corroboramos la formación de estos dímeros transfectando células HeLa y analizando los extractos por western blot en condiciones no reductoras (Figura R1-18B). Posteriormente se transfectaron las células HeLa y tras la incubación con NGF se cuantificó la longitud de las prolongaciones a las 7 y 24h. En ausencia de NGF observamos como ambos mutantes tenían una actividad basal más reducida que TrkA-wt, determinando así que estábamos frente a dímeros inactivos; en presencia de ligando ambos fomentaban un crecimiento ligeramente mayor de las prolongaciones en las células diferenciadas, haciéndose aún más visible a las 24h. Estos datos sugieren que en ausencia de NGF los residuos Q369 y S371 se encuentran cerca para establecer interacciones entre los dominios Ig2 de TrkA. Las interacciones entre dominios Ig2 estabilizan una conformación de dímeros inactivos. Los dímeros inactivos establecidos por los dominios Ig2 podrían formar tetrámeros u oligómeros al acoplarse NGF entre ellos sin alterar dicha interacción, produciendo una respuesta más rápida e intensa del receptor

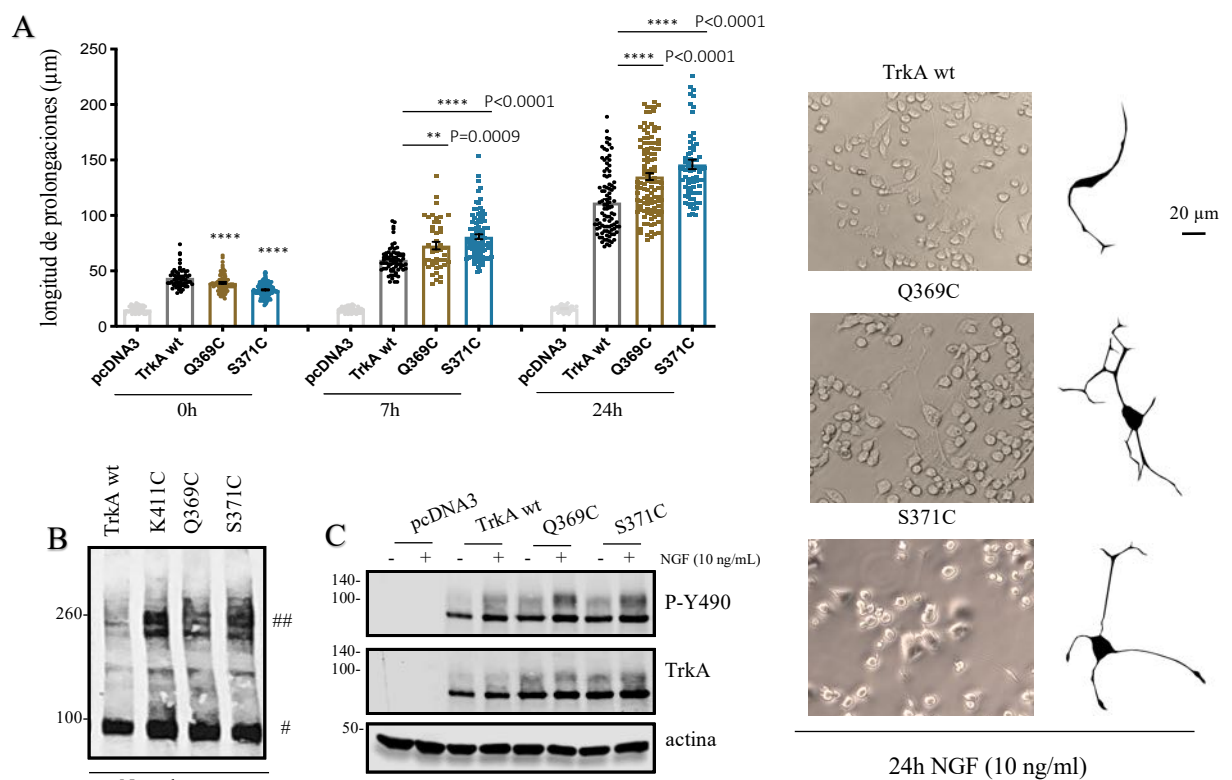


Figura R1-18. Interacciones entre los residuos Gln369 y Ser371 del dominio Ig2 estabilizan dímeros preformados inactivos que responden más rápido a NGF. **A**, Ensayo de diferenciación de PC12nnr5, histograma de la cuantificación de la longitud de las prolongaciones en células PC12nnr5 transfectadas con las construcciones indicadas, a la derecha imágenes representativas a campo claro de PC12nnr5 diferenciadas, acompañadas de la silueta en negro obtenidas con el programa imageJ. Análisis estadístico, *two-way* ANOVA aplicando *Tukey's multicomparison test*. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Se cuantificaron una media de 50 células por condición. **B**, SDS-PAGE no reductor para la detección de dímeros (##) con los mutantes Q369C y S371C, se empleó la construcción K411C como control positivo. **C**, Análisis de los extractos de PC12nnr5 por western blot para el estudio de actividad, se muestran los niveles de fosforilación del residuo Tyr490 en ausencia y presencia de NGF, así como los niveles de TrkA total y actina.



CAPITULO II. Interacción entre TrkA y p75

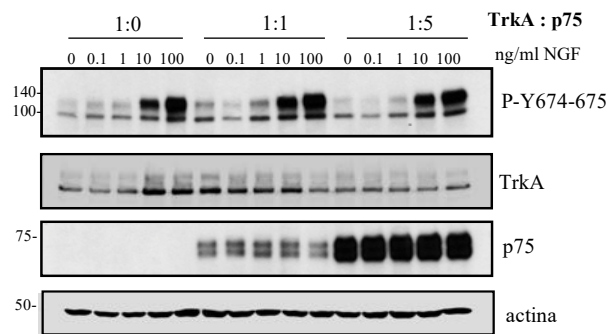
Varias líneas de investigación sugieren una interacción funcional entre el receptor TrkA y p75 en la transmisión de señales biológicas desencadenadas por NGF. Se sabe que los eventos de unión a ligando y de fosforilación de tirosinas iniciados por TrkA se ven afectados por la expresión de p75 (Barker & Shooter, 1994; Berg et al., 1991; Verdi et al., 1994). Aunque los dominios EC, TM e IC de p75 se han implicado en la formación del complejo TrkA/p75 (Bibel et al., 1999; Chang et al., 2004) solo los dominios TM e IC parecen mostrar una participación en la formación de este complejo (Esposito et al., 2001; Matusica et al., 2013; Sykes et al., 2012). Sin embargo, la naturaleza de estos sitios de unión y la formación de un heterocomplejo por una asociación física directa queda aún por aclarar. En este capítulo identificaremos el heterodímero TrkA/p75 mediante estudios funcionales y estudiaremos cómo la expresión de TrkA regula el procesamiento proteolítico de p75, así como la internalización del mismo.

1. LOS DOMINIOS TM E IC DE p75 MODULAN LA RESPUESTA DE TrkA A NGF

1.1. P75 mejora la respuesta de TrkA a NGF

Uno de los efectos que tiene p75 sobre TrkA es aumentar su afinidad por NGF. Estudios cinéticos previos mostraron que cada receptor se une a NGF con una K_D de afinidad relativamente baja entre 10^{-9} y 10^{-10} M (Mahadeo et al., 1994). Aunque p75 muestra tasas muy rápidas de asociación y disociación con NGF, el receptor TrkA tiene tasas de asociación y disociación mucho más lentas. Cuando los receptores TrkA se coexpresan con p75, la tasa de asociación se acelera 25 veces, aumentando sus propiedades de unión y mejorando su respuesta al ligando. Esto lo pudimos demostrar al cotransfectar las células HeLa con TrkA y p75, donde observamos que TrkA respondía mejor a concentraciones más bajas de NGF con un ratio de transfección 1:1.

Figura R2-1. P75 mejora la respuesta de TrkA a NGF. Análisis por western blot del extracto de células HeLa co-transfectadas con TrkA y p75 a diferentes ratios de concentración en μg e incubadas a concentraciones crecientes de NGF, se muestran los niveles de P-Try674-675, TrkA total, p75 y actina.



1.2. La ausencia del ICD y TMD de p75 merma su capacidad de sensibilizar TrkA a NGF

Decidimos estudiar la actividad de TrkA en presencia de mutantes de p75 que carecían de diferentes regiones como el dominio intracelular ($p75\Delta\text{ICD}$), extracelular ($p75\Delta\text{ECD}$), yuxtamembrana ($p75\Delta\text{JTM}$), dominio de muerte ($p75\Delta\text{DD}$) y TM ($p75\text{TNFR}$, donde se reemplazó el TM por el del receptor del factor de necrosis tumoral). Se cotransfectaron las células HeLa y posteriormente se estimularon con NGF durante 5 min y se analizó la fosforilación del residuo Try674/675 de TrkA.

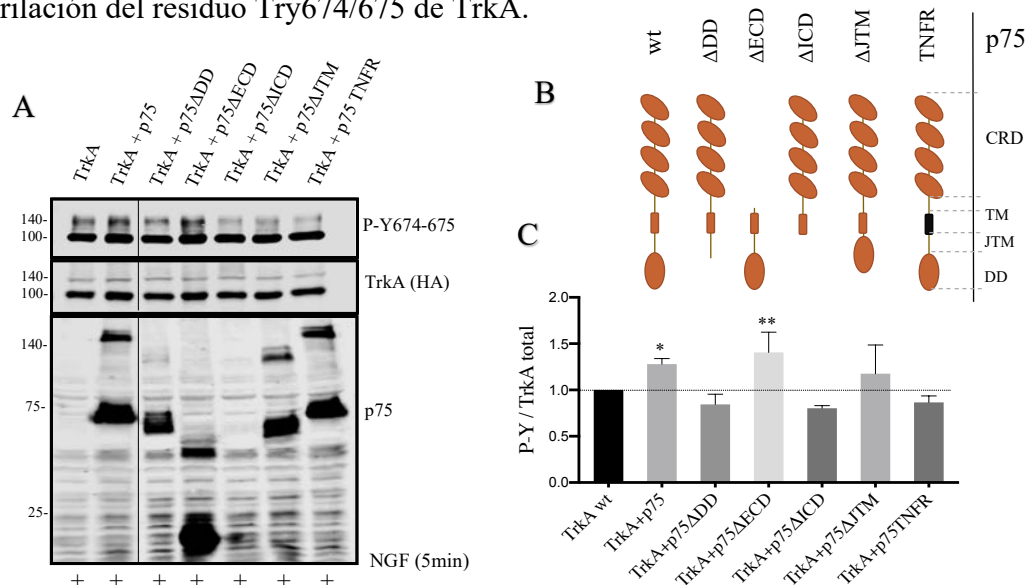


Figura R2-2. La ausencia de la región IC y TM de p75 merma su capacidad de sensibilizar TrkA a NGF **A**, Western Blot de células HeLa transfectadas con TrkA y los mutantes de p75 e incubadas con NGF durante 5 min. Se muestra la fosforilación del residuo Try674-675 de TrkA, en los paneles inferiores se muestran los niveles de TrkA total y p75 **B**, Esquema de las construcciones de p75 diseñadas en el laboratorio por mutagénesis dirigida por PCR **C**, Histograma donde se muestra la cuantificación del panel A, réplica de 3 experimentos independientes donde se revela la importancia del dominio intracelular y transmembrana de p75 para aumentar la respuesta de TrkA a NGF. Análisis estadístico, *one-way* ANOVA (media \pm SEM, $n=2$) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

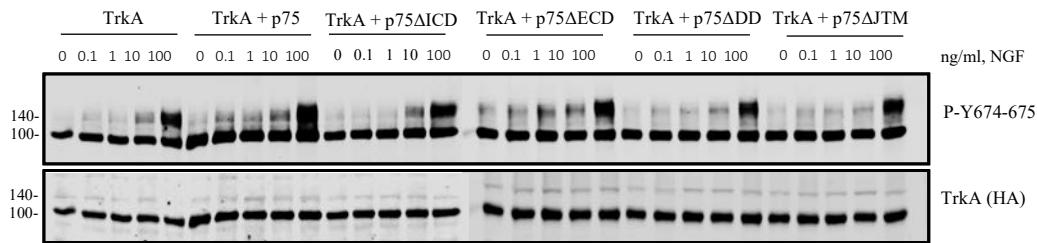


Figura R2-3. La ausencia de la región IC y TM de p75 merma su capacidad de sensibilizar TrkA a NGF **A**, Western Blot de células HeLa co-transfectadas con TrkA y las construcciones de p75 e incubadas a concentraciones crecientes de NGF (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml NGF) durante 5 min. Se analiza la fosforilación del residuo Tyr674/675 de TrkA. Se observa que las construcciones de p75ΔICD, p75ΔDD y p75ΔITM son incapaces de mejorar la respuesta de TrkA a ligando, característica propia de p75 wt. En el panel inferior de muestran los niveles de TrkA total.

Posteriormente se analizó la respuesta de TrkA a concentraciones crecientes de NGF (Figura R2-3). Los resultados en su conjunto, mostraron que cuando prescindimos de la región extracelular de p75, TrkA aún responde de forma sensible a concentraciones bajas de NGF, característica que le otorga la coexpresión con p75. Sin embargo, cuando se deletan regiones del dominio IC de p75 y cuando se reemplaza la región TM del mismo, TrkA parece perder esas propiedades. Eso nos indica que la región TM de p75 podría participar en la formación del complejo TrkA/p75 aún en ausencia del dominio extracelular, como ya se había sugerido en estudios previos (Esposito et al., 2001; Jung et al., 2003).

1.3. El motivo de dimerización $A^{262}\text{-xxxG}^{266}\text{-xxA}^{269}$ de p75 participa en la formación del heterocomplejo TrkA/p75

Tras los resultados obtenidos anteriormente decidimos examinar la interacción entre el dominio TM de ambos receptores. Estudios de RMN, realizados por nuestro colaborador, el Dr. Arseniev, permitieron establecer tridimensionalmente dos interfaces de dimerización del TM de p75 para la formación de homodímeros: el motivo $C^{257}\text{-xxxA}^{261}\text{-xxxV}^{265}$ establecido de forma espontánea gracias a la cisteína y el motivo $A^{262}\text{-xxxG}^{266}\text{-xxA}^{269}$ presente cuando se suprime el enlace covalente por la C^{257} (Nadezhdin et al., 2016). Decidimos utilizar mutantes de ambas interfaces de dimerización de p75 donde se reemplazaron estos residuos por aminoácidos voluminosos como isoleucina y se analizó la respuesta de TrkA a concentraciones crecientes de NGF (Figura R2-4). Los resultados mostraron que el mutante A262I y el triple mutante AGA/III no mejoraron la respuesta de TrkA a NGF a diferencia del mutante A261I, sugiriéndonos que el motivo de dimerización $A^{262}\text{-xxxG}^{266}\text{-xxA}^{269}$ de p75 podría ser importante en la formación del heterocomplejo TrkA/p75.

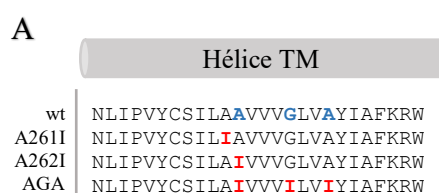
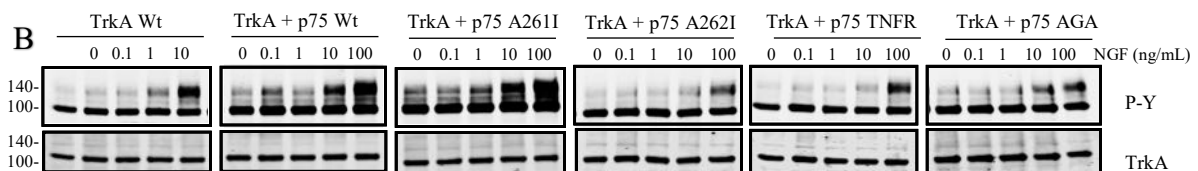


Figura R2-4. El motivo de dimerización $A^{262}\text{-xxxG}^{266}\text{-xxA}^{269}$ de p75 participa mejorando la respuesta de TrkA a NGF **A**, Secuencia alineada del TM de p75 mostrando las construcciones de p75 obtenidas por mutagénesis dirigida por PCR. **B**, Western Blot de células HeLa co-transfectadas con TrkA y las construcciones de p75 e incubadas a concentraciones crecientes de NGF (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml NGF) durante 5 min. Se analiza la fosforilación del residuo Tyr674/675 (P-Y) de TrkA. Se observa que las construcciones de p75-A262I, p75-TNFR y p75-AGA son incapaces de mejorar la respuesta de TrkA a ligando, característica que le otorga p75 wt.

1.4. La interfaz de dimerización activa del TM de TrkA participa en la formación del heterocomplejo TrkA/p75

En el capítulo anterior, identificamos algunos residuos del TM de TrkA que forman parte de la interfaz activa de dimerización del receptor. Nos preguntamos si una interacción mediada por el TM entre TrkA y p75 podría alterar esta interfaz conocida de TrkA. Para ello, transfectamos las células HeLa con p75, TrkA-V418C (residuo que pertenece a la interfaz activa de dimerización) y TrkA-G423C (residuo que pertenece a la interfaz inactiva). Se analizaron las muestras por western blot y se cuantificó la formación de dímeros covalentes de TrkA. La presencia de p75 redujo de forma significativa la formación de dímeros de TrkA-V418C mas no de TrkA-G423C (figura R2-5C), sugiriéndonos la existencia de una asociación física entre ambos receptores a través de la interfaz activa del TM de TrkA.

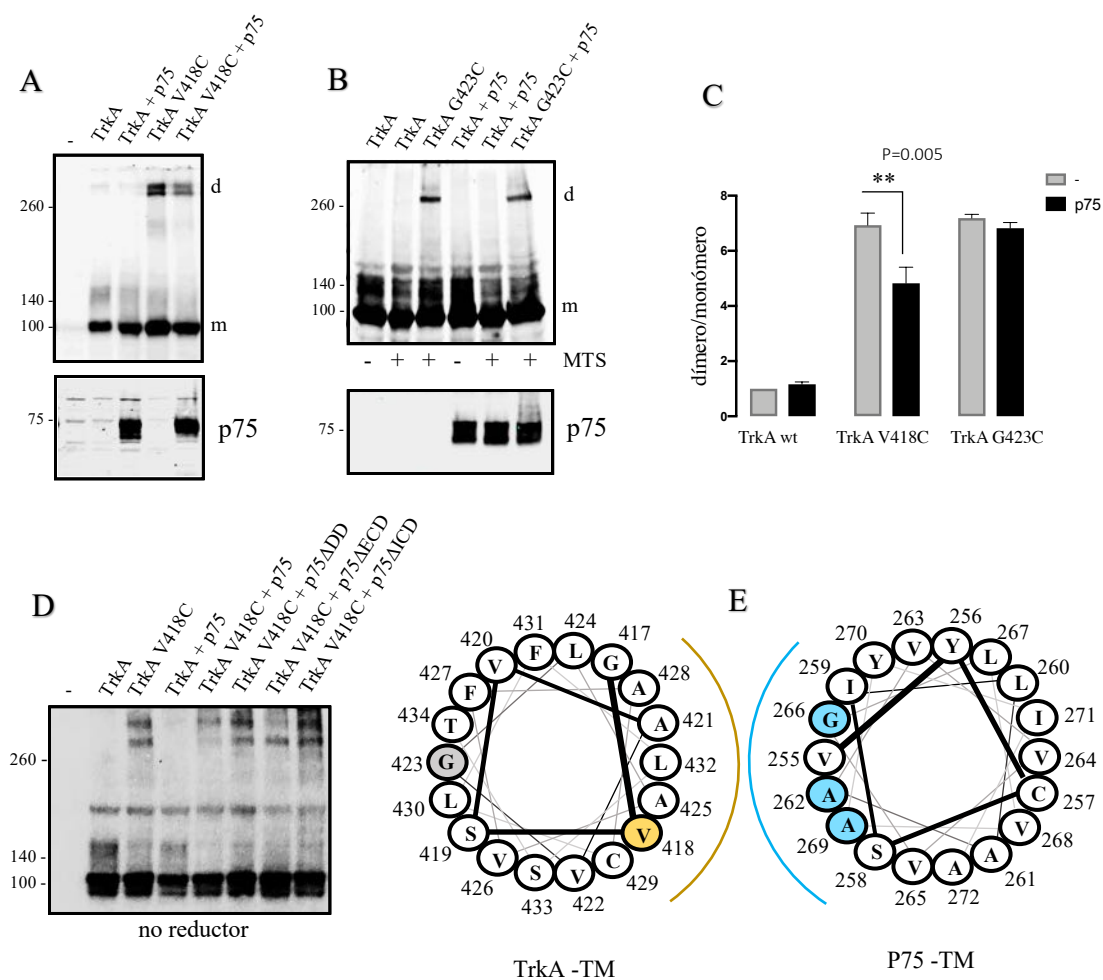
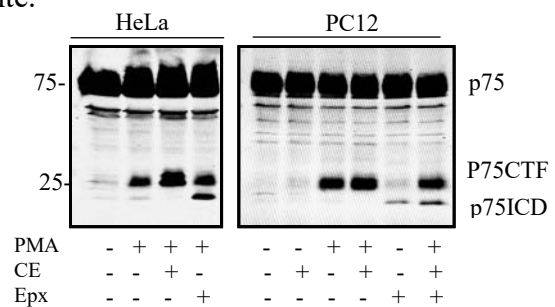


Figura R2-5. La interfaz de dimerización activa de TrkA participa en la formación del heterocomplejo TrkA/p75 **A**, Western blot de células HeLa transfectadas con el mutante TrkA-V418C, residuo perteneciente a la interfaz activa de dimerización de TrkA, se analizó la formación de dímeros en ausencia y presencia de p75. **B**, Western blot de células HeLa transfectadas con el mutante TrkA-G423C, residuo perteneciente a la interfaz inactiva de TrkA, se analizó la formación de dímeros en ausencia y presencia de p75 empleando MTS-2-MTS. **C**, Histograma donde se cuantifica el ratio dímerno/monómero generado al coexpresar TrkA-V418C y TrkA-G423C en ausencia y presencia de p75, mostrándonos que p75 altera la interfaz de dimerización activa de TrkA, sugiriéndonos la existencia de una posible asociación física. **D**, Western blot de células HeLa transfectadas con TrkA-V418C y los diferentes mutantes de p75, se analizó el impacto de las construcciones de p75 en la formación de dímeros de TrkA dejando en evidencia la relevancia de la región TM e intracelular de p75 para la posible formación del heterocomplejo TrkA/p75. **E**, representación esquemática de la hélice transmembrana de TrkA y p75 mostrando la interfaz de interacción en ambos dominios resaltando los residuos implicados, V⁴¹⁸ para TrkA y A²⁶²G²⁶⁶A²⁶⁹ para p75. Análisis estadístico, *one-way* ANOVA (media ± SEM, n=2) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

2. TrkA MODULA EL PROCESAMIENTO DE p75 POR ALPHA Y GAMMA SECRETASA

Se sabe que el receptor p75 al igual que otras proteínas como APP o Notch, sufre un procesamiento proteolítico denominado RIP (*regulated intramembrane proteolysis*), el cual implica un primer corte por la α -secretasa TACE/ADAM17, generando un fragmento C-terminal (p75-CTF) anclado a la membrana, convirtiéndose éste en el sustrato de γ -secretasa que realizará el segundo corte dentro del dominio transmembrana liberando el fragmento intracelular al citosol (p75-ICD). Debido a la estrecha relación que se establece entre ambos receptores TrkA y p75, sabiendo que TrkA no es un sustrato de γ -secretasa, decidimos analizar la influencia que tiene el receptor TrkA sobre el corte de p75 al ser coexpresados en un contexto celular. Para ello utilizamos células HeLa para la expresión exógena de los receptores y la línea PC12 como modelo de expresión endógena. A lo largo del estudio realizamos tratamientos con PMA (forbol-12 miristato-13-acetato) como estimulante del corte del dominio extracelular de p75 por TACE (Kanning et al., 2003); compuesto E, un inhibidor de la γ -secretasa fomentando la acumulación del p75-CTF y epoxomicina como inhibidor del proteosoma para acumular p75-ICD ya que es un fragmento muy inestable y se degrada rápidamente.

Figura R2-6. Procesamiento proteolítico de p75 en células HeLa transfectadas y PC12 **A**, Análisis por western blot del extracto de células HeLa transfectadas con p75 y células PC12 como modelo de expresión endógena de p75. Las células se incubaron con epoxomicina y compuesto E durante 90 min, seguido de 40 min. con PMA. Se muestran los niveles de p75 así como la formación de p75CTF y acumulación de p75ICD.



2.1. TrkA modula el corte de p75CTF por TACE/ADAM17

Decidimos estudiar la influencia de TrkA sobre el corte de p75 por la α -secretasa en presencia y ausencia de NGF, para ello empleamos las líneas PC12 y PC12nnr5, estas últimas carentes de TrkA. Ambas líneas se incubaron con CE + NGF durante 0, 12, 24, 48 y 36 horas. Las muestras se analizaron por western blot donde observamos la acumulación de p75CTF únicamente en las células PC12, que expresan endógenamente TrkA. Al realizar la inmunoprecipitación de p75 en el cultivo primario de neuronas del prosencéfalo basal, las cuales también coexpresan ambos receptores, donde se acumuló p75CTF en presencia de CE y NGF mientras que, en los astrocitos, que solo expresan p75 no observamos una variación en los niveles de p75CTF tras la incubación con NGF y CE 1h.

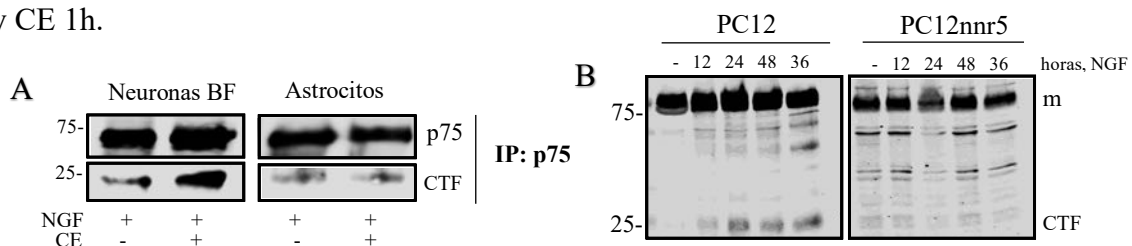


Figura R2-7. TrkA modula el corte de p75CTF por TACE **A**, Inmunoprecipitación de p75 del extracto de cultivos primarios de neuronas del prosencéfalo basal y astrocitos aislados de ratón tratadas con NGF (50ng/ml) y compuesto E durante 1h, se observa la acumulación de p75CTF en neuronas del prosencéfalo basal que expresan de forma endógena ambos receptores a diferencia de los astrocitos que expresan únicamente p75. **B**, Western Blot de células PC12 y PC12nnr5 incubadas con NGF (50ng/ml) a diferentes horas, se observan los monómeros de p75 (m) y la acumulación de p75CTF, los resultados revelan la implicación de TrkA en la modulación del corte de p75 por TACE en presencia de NGF.

Estos resultados nos sugieren que en células que coexpresan ambos receptores, p75 es más susceptible al corte por α -secretasa en presencia de NGF. Para saber si la actividad de TrkA estaba favoreciendo este corte, decidimos mutar el residuo K538 en TrkA, generando así un receptor con una actividad tirosina quinasa nula (TrkA-DN). Posteriormente se transfectaron las células HeLa con ambos receptores y se incubaron con NGF y compuesto E durante 2 horas. Las muestras se analizaron por western blot y se cuantificaron los niveles de p75CTF (Figura R2-8A). Los resultados mostraron que la activación de TrkA por NGF promueve el corte de p75 por la α -secretasa, reforzando lo que ya se había descrito en investigaciones previas (Ceni et al., 2010; Urra et al., 2007). Curiosamente observamos que en ausencia de NGF, TrkA parece proteger de alguna forma el primer corte basal que sufre p75. Una asociación física entre ambos podría explicar que el sitio de corte sea menos accesible para la α -secretasa y quede expuesto al activarse TrkA. Al saber que el dominio TM podría mediar esta asociación, decidimos cotransfectar TrkA con mutantes del motivo A²⁶²xxxG²⁶⁶xxA²⁶⁹ de p75 y analizar los niveles de p75CTF que se obtuvieron en presencia y ausencia de NGF. Los resultados mostraron que, al alterar esta interfaz, la actividad de TrkA no tuvo ningún efecto sobre la generación de p75CTF, indicándonos que podríamos haber desestabilizado el complejo TrkA/p75.

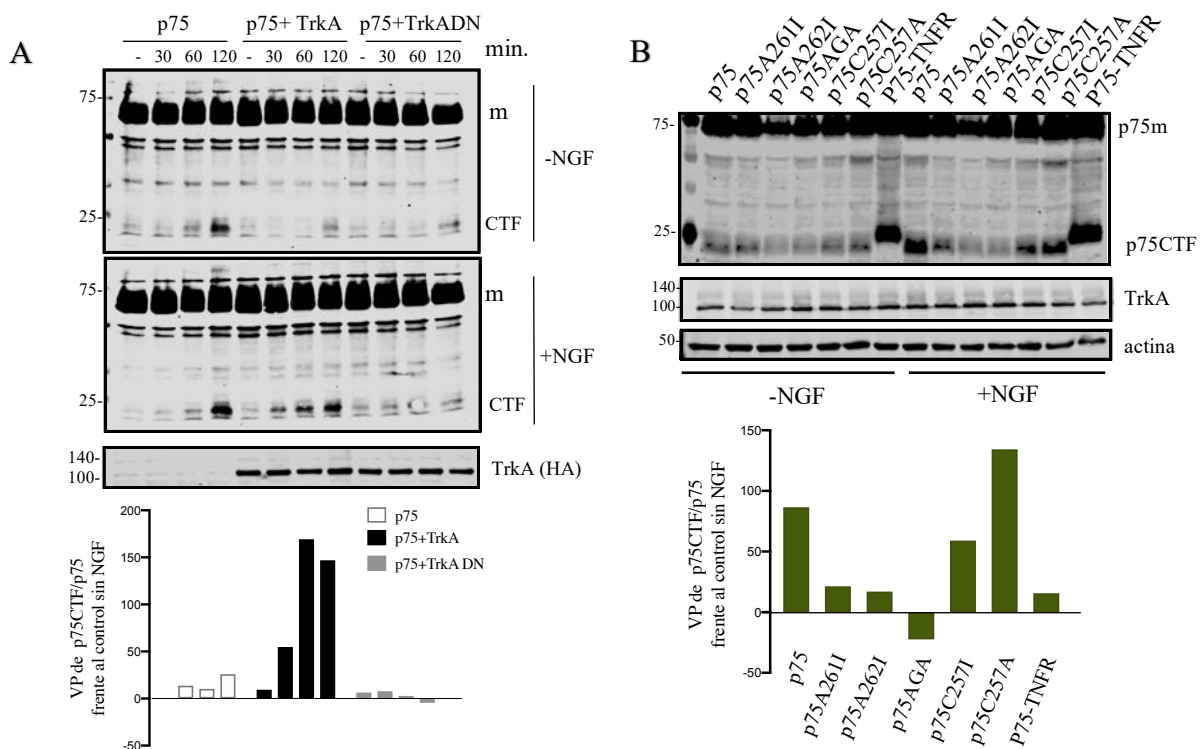


Figura R2-8. TrkA modula el corte de p75CTF por TACE **A**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75, TrkA-wt y TrkA-DN, se observan los monómeros de p75 (m) así como los niveles de p75CTF generados en ausencia y presencia de NGF y CE. En el histograma inferior se refleja la variación porcentual del ratio p75CTF/p75 frente a sus respectivos controles sin NGF. **B**, Western Blot de células HeLa transfectadas con TrkA y los respectivos mutantes del TM-p75, se analizó la formación de p75CTF en ausencia y presencia de NGF (50 ng/ml) y CE durante 1h. En el histograma inferior se muestra la variación porcentual del ratio p75CTF/p75 frente a sus respectivos controles sin NGF. **C**, Generación de p75CTF en células PC12 incubadas en ausencia y presencia de NGF y CE, a la derecha se muestra la cuantificación correspondiente donde se aprecia la acumulación de p75CTF a 30 min de tratamiento con NGF.

2.3. La actividad basal de TrkA estabiliza el complejo TrkA/p75 y el acoplamiento de NGF propicia el corte de p75 por TACE

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la activación de TrkA por NGF puede exponer a p75 a un corte más accesible por la α -secretasa y que el TM podría estar propiciando una asociación directa entre ambos receptores. De ser así, nos preguntamos que regiones de TrkA podrían estar involucradas en estabilizar el complejo protegiendo a p75 del corte de α -secretasa hasta la llegada de NGF. Se diseñaron construcciones de TrkA carentes de diversas regiones tanto extracelular como intracelular (Figura R2-9A). Posteriormente estas se transfectaron en células HeLa junto a p75 y se incubaron con CE y NGF durante 2h. Mediante un análisis de western blot pudimos cuantificar los niveles de p75CTF que se formaron en cada caso. Los resultados nos mostraron que los mutantes TrkA Δ ECD y TrkA Δ Ig inhibían significativamente más el corte basal de p75 por α -secretasa en comparación con TrkA-wt, inhibición que nos sugiere que se establece una interacción. Esta inhibición continúa aún en presencia de NGF, quizá por la incapacidad que tienen ambos mutantes de unir el ligando, indicándonos que la porción extracelular de TrkA no participa en la formación del complejo y en la necesidad de un cambio conformacional. Por otro lado, los mutantes que carecían de actividad como TrkA-DN, Δ eJTM, Δ KD, no alteraron los niveles de p75CTF, los cuales eran similares al expresar p75 solo. El conjunto de datos nos sugiere que la integridad de la región TM e IC de TrkA es responsable de mantener el complejo TrkA/p75 y que el receptor TrkA es capaz de propiciar el corte de p75 por α -secretasa al acoplar NGF y activarse.

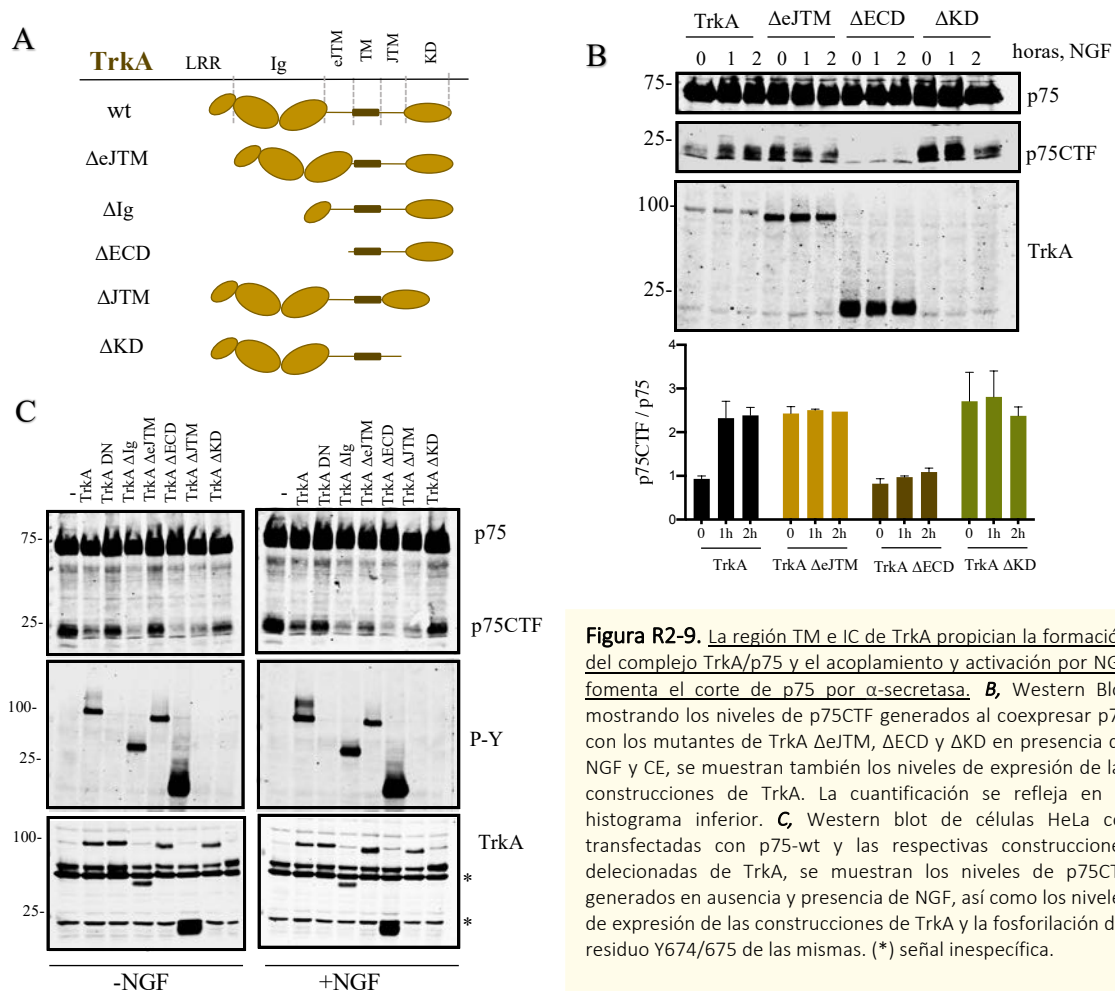


Figura R2-9. La región TM e IC de TrkA propician la formación del complejo TrkA/p75 y el acoplamiento y activación por NGF fomenta el corte de p75 por α -secretasa. **B**, Western Blot mostrando los niveles de p75CTF generados al coexpresar p75 con los mutantes de TrkA Δ eJTM, Δ ECD y Δ KD en presencia de NGF y CE, se muestran también los niveles de expresión de las construcciones de TrkA. La cuantificación se refleja en el histograma inferior. **C**, Western blot de células HeLa co-transfectadas con p75-wt y las respectivas construcciones delecionadas de TrkA, se muestran los niveles de p75CTF generados en ausencia y presencia de NGF, así como los niveles de expresión de las construcciones de TrkA y la fosforilación del residuo Y674/675 de las mismas. (*) señal inespecífica.

2.4. La coexpresión de TrkA y p75CTF reduce los niveles de p75ICD

Para estudiar el efecto de TrkA sobre el corte de p75 por γ -secretasa se realizaron dos ensayos. I) Se expresó el receptor p75 en células HeLa y se analizamos los niveles de p75ICD que se generaron tras incubación con epoxomicina durante 1, 3, 6 y 12 horas. II) Se expresó directamente el fragmento de p75CTF en células HeLa, a fin de quitarnos la variable de la modulación de TrkA en la producción de p75CTF y se analizaron los niveles de p75ICD. Los datos mostraron que la presencia de TrkA reduce significativamente los niveles de p75CTF (Figura R2-10B) así como el ratio p75ICD/p75CTF. El uso de TrkA-DN (TrkA sin actividad tirosina quinasa) reveló que la actividad del receptor está involucrada en el procesamiento de p75 por γ -secretasa. Estudios previos han descrito que el sitio de corte de la enzima γ -secretasa en la región TM de p75 se da en la secuencia AVV/VG (Jung et al., 2003; Kanning et al., 2003). La secuencia AVV/VG se encuentra dentro del motivo de dimerización A²⁶²xxxG²⁶⁶xxA²⁶⁹ de p75. Es posible que la interacción TM entre ambos receptores a través de dicha interfaz dificulte el reconocimiento de la γ -secretasa. Finalmente se cotransfectaron las construcciones delecionadas de TrkA junto con p75CTF (Figura R2-10C) y se analizaron los niveles de p75ICD. Observamos nuevamente que la región TM e IC de TrkA son importantes para establecer un posible contacto con p75CTF reduciendo la generación de p75ICD.

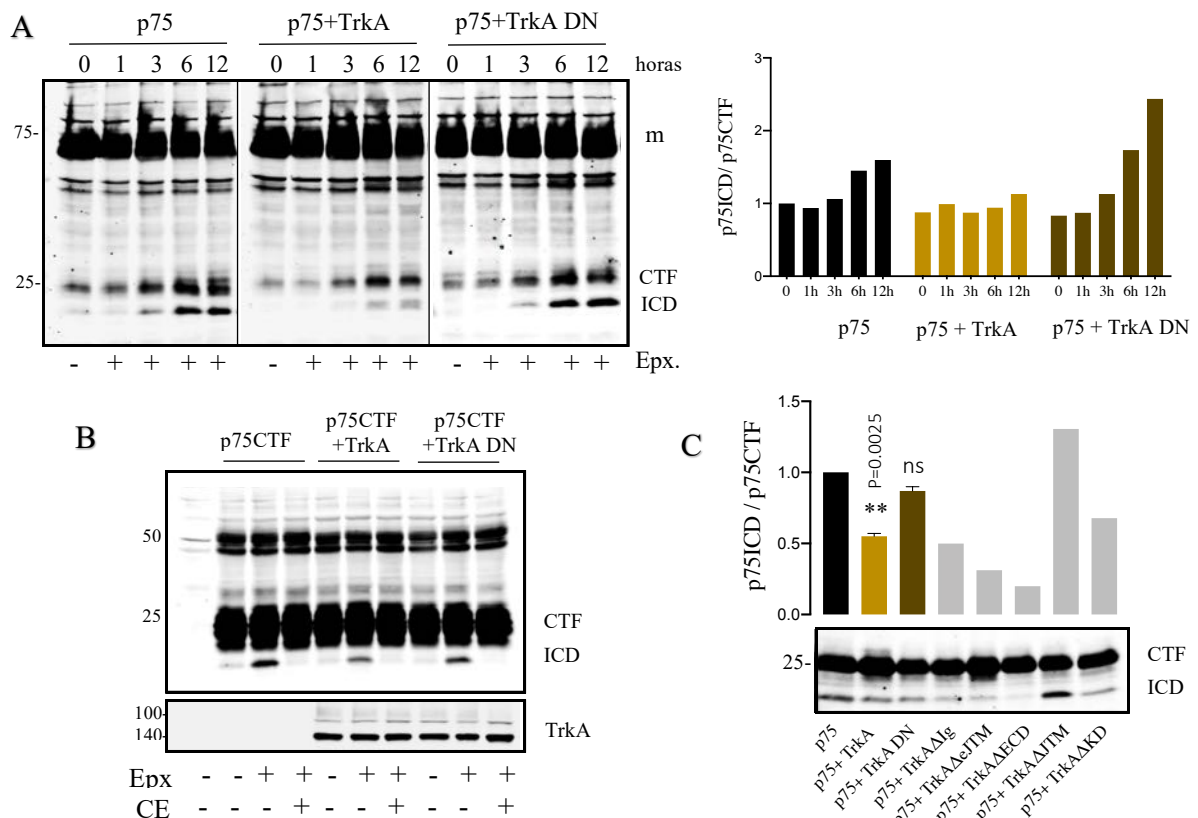


Figura R2-10. La interacción TrkA/p75CTF reduce los niveles de p75ICD en ausencia de NGF. **A**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75wt, TrkAwt y TrkA-DN, se observan los monómeros de p75 (m) así como los niveles de p75CTF y p75ICD generados tras la incubación con epoxomicina en ausencia y presencia de NGF durante 0, 30, 60 y 120 min. A la derecha se muestra la respectiva cuantificación y se representa el ratio p75ICD/p75CTF de cada condición. **B**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF, TrkA-wt y TrkA-DN. Se observan los niveles de p75CTF y p75ICD generados tras la incubación con epoxomicina y compuesto E 1h, donde la actividad de TrkA parece modular el corte de p75CTF por la γ secretasa. **C**, Histograma donde se representa el ratio p75ICD/p75CTF en células HeLa transfectadas con p75CTF y las respectivas construcciones de TrkA. Análisis estadístico, *one-way* ANOVA (media \pm SEM, n=2) aplicando *Dunnnett's* *multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

3. TrkA REDUCE LA MUERTE CELULAR PROVOCADA POR LA AGREGACIÓN DE p75CTF

3.1. La inhibición de γ -secretasa aumenta la dimerización de p75CTF

Se sabe que cuando el dominio intracelular de p75 se libera de la membrana por acción de la γ -secretasa, sufre una degradación inmediata por el proteosoma (Kanning et al., 2003). Por ello la inhibición de la γ -secretasa rescata el fragmento de p75CTF de la degradación. Al transfectar las células HeLa con p75CTF e incubarlas con CE y analizarlas por SDS-PAGE no reductor observamos un incremento en la formación de dímeros con el paso de las horas (Figura R2-11A). Se sabe que el receptor p75 forma dímeros covalentes a través del residuo Cys257 presente en el TM (Nadezhdin et al., 2016; Vilar et al., 2009). Posteriormente buscamos la existencia de estos dímeros de p75CTF en un contexto endógeno, para ello, aislamos ganglios raquídeos de ratones en estadio E16-E17 e incubamos las células con CE 24h y analizamos los extractos por western blot. Observamos que estos dímeros se pueden formar con niveles endógenos de p75 (Figura R2-11A). Decidimos determinar si la dimerización covalente de p75CTF tiene algún papel sobre la muerte celular (Kanning et al., 2003). Estudios previos sugieren que la señalización de muerte neuronal mediada por p75 ocurre después del procesamiento por α -secretasa y aumenta con la inhibición de la γ -secretasa (Underwood et al., 2008). Por ello, decidimos transfectar neuronas corticales con p75, p75CTF y p75CTF-C257A e incubarlas respectivamente en presencia y ausencia de CE durante 24h. Se cuantificó la muerte celular mediante una inmunocitoquímica detectando las células positivas para caspasa-3 activa (Figura R2-11D). Observamos que la sobreexpresión de todas las construcciones de p75 inducían de forma variable un incremento de la muerte neuronal, resaltando la diferencia existente entre la muerte producida por p75CTF y p75CTF-C257A en presencia de CE, sugiriéndonos que la formación de dímeros de CTF exacerba la muerte neuronal.

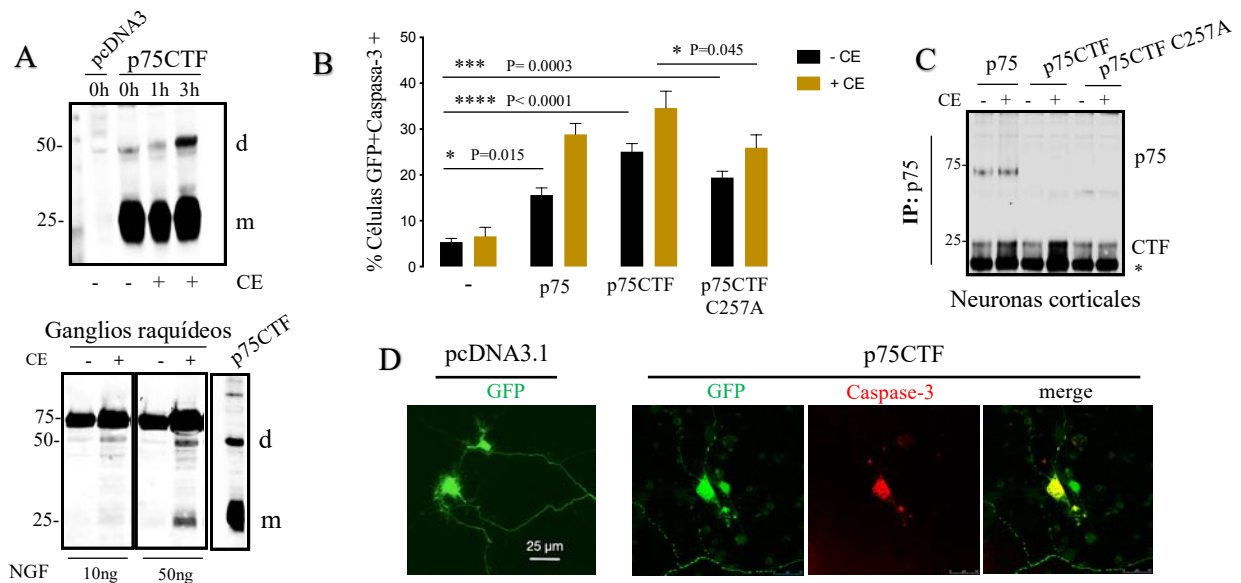


Figura R2-11. La inhibición de γ -secretasa aumenta la dimerización de p75CTF **A**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF, se observa la formación gradual de dímeros de p75CTF tras la incubación con compuesto E. En el panel inferior se muestra el inmunoblot del extracto de ganglios raquídeos aislados de tejido de ratón donde se observa la formación endógena de dímeros de p75CTF en presencia de compuesto E y NGF **B**, Cuantificación de la muerte celular en el cultivo primario de neuronas de corteza transfectadas con GFP + p75, GFP+p75CTF y GFP+p75CTFC257A, las neuronas se incubaron 24h con compuesto E, se cuantificaron las células GFP positivas/caspasa-3 activa positivas. **C**, Inmunoprecipitación de p75 del extracto de las muestras analizadas en el panel B. **D**, Inmunocitoquímica de neuronas de corteza transfectadas con GFP+p75CTF donde se observan neuronas GFP positivas (verde)/caspasa-3 activa positivas(rojo). Análisis estadístico, two-way ANOVA (media \pm SEM, n=3) aplicando Tukey's multicomparison test. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3.2. Los dímeros covalentes de p75CTF permanecen más tiempo en la membrana celular

La ligera diferencia en los niveles de muerte celular producidos por p75CTF y p75CTF-C257A se debe a la capacidad de formar dímeros covalentes. Por ello, decidimos analizar la vida media, degradación e internalización de ambos fragmentos buscando condiciones que puedan favorecer la agregación y la muerte celular. Los ensayos de vida media se realizaron transfectando las células HeLa con p75CTF y p75CTF-C257A e incubándolas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, y analizando el remanente de proteína a las 0, 1, 3, 5, y 9 horas. Se observó que p75CTF es más estable que p75CTF-C257A (Figura R2-12A). En un ensayo posterior se inhibieron diferentes rutas de degradación durante 9 h donde se determinó que la inhibición de la γ -secretasa por Compuesto E y semagacestat evita la degradación de ambos fragmentos y la epoxomicina fomenta la acumulación de p75ICD (Figura R2-12B, C), indicándonos que el corte por γ -secretasa forma parte del proceso de degradación del receptor que finalizará en el proteosoma. Sin embargo, la inhibición de la γ -secretasa no acumulaba los mismos niveles de proteína para p75CTF y p75CTF-C257A, sugiriéndonos que la capacidad de formar dímeros covalentes hace los fragmentos de p75CTF más estables y resistentes a la degradación.

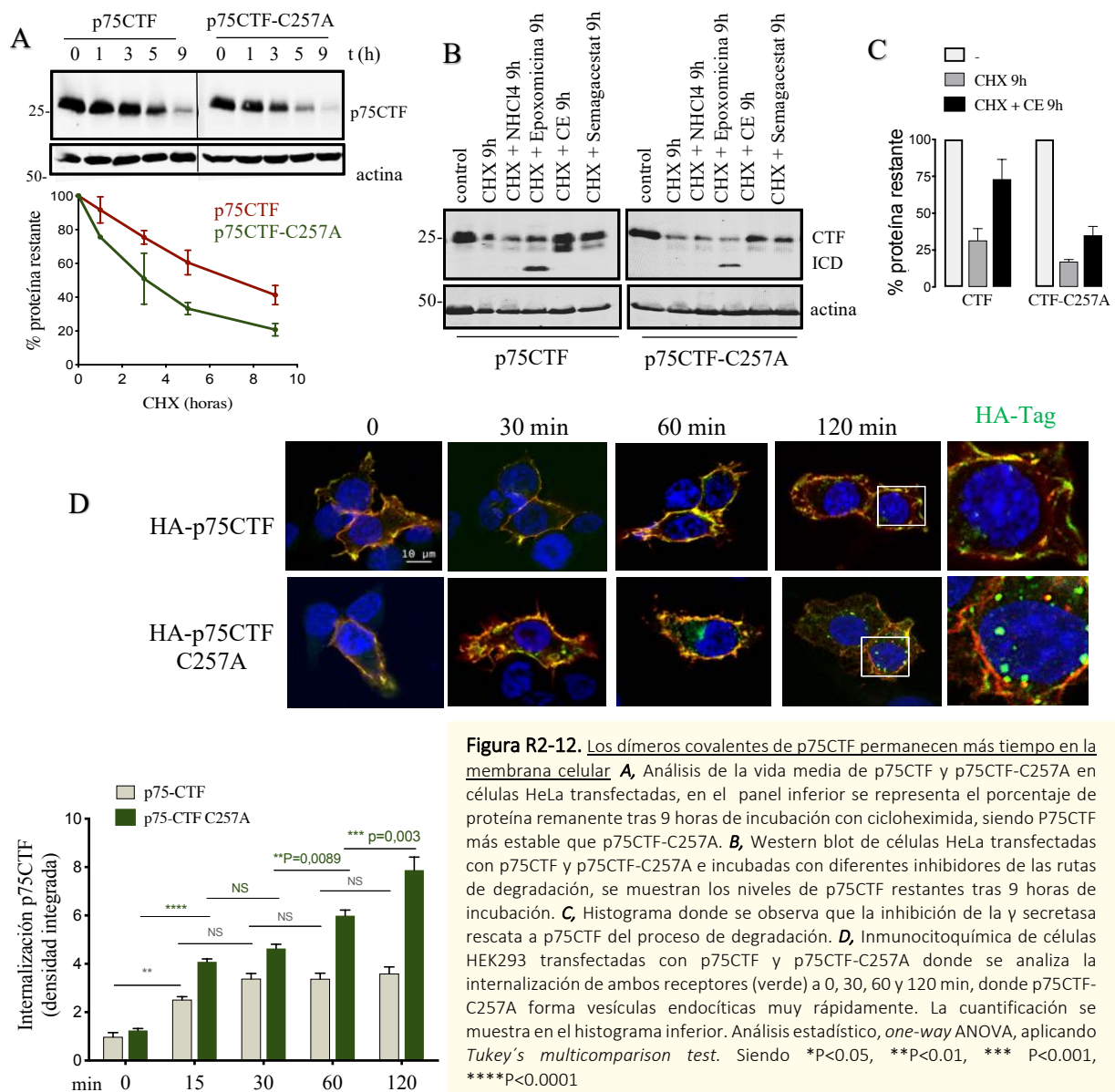
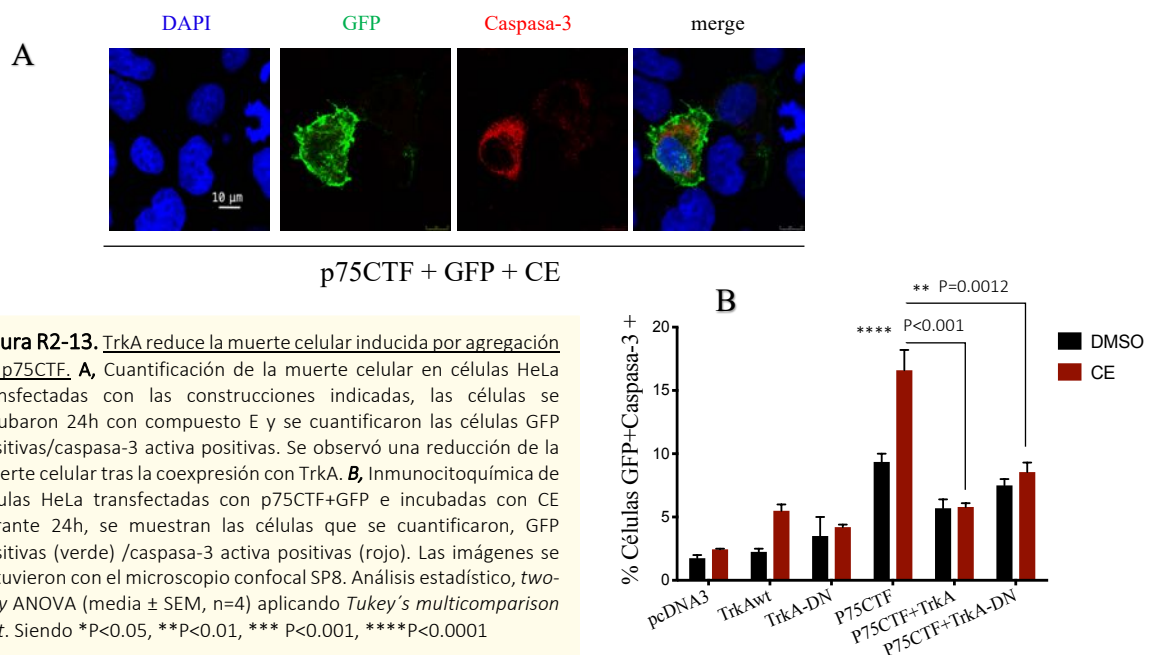


Figura R2-12. Los dímeros covalentes de p75CTF permanecen más tiempo en la membrana celular **A**, Análisis de la vida media de p75CTF y p75CTF-C257A en células HeLa transfectadas, en el panel inferior se representa el porcentaje de proteína remanente tras 9 horas de incubación con cicloheximida, siendo p75CTF más estable que p75CTF-C257A. **B**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF y p75CTF-C257A e incubadas con diferentes inhibidores de las rutas de degradación, se muestran los niveles de p75CTF restantes tras 9 horas de incubación. **C**, Histograma donde se observa que la inhibición de la γ secretasa rescata a p75CTF del proceso de degradación. **D**, Inmunocitoquímica de células HEK293 transfectadas con p75CTF y p75CTF-C257A donde se analiza la internalización de ambos receptores (verde) a 0, 30, 60 y 120 min, donde p75CTF-C257A forma vesículas endocíticas muy rápidamente. La cuantificación se muestra en el histograma inferior. Análisis estadístico, *one-way ANOVA*, aplicando *Tukey's multicomparison test*. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

En los ensayos de internalización se emplearon células HEK293 y se siguió la internalización del receptor p75CTF y p75CTFC257A por inmunofluorescencia (verde) en presencia de NGF a lo largo de 2h. La cuantificación mostró que el receptor p75CTF-C257A se internaliza rápidamente a diferencia de p75CTF, sugiriendo que la formación de dímeros covalentes estabiliza el receptor conservándolo mas tiempo en la superficie celular (Figura R2-12D).

3.3. TrkA reduce la muerte inducida por la agregación de p75CTF en células HeLa

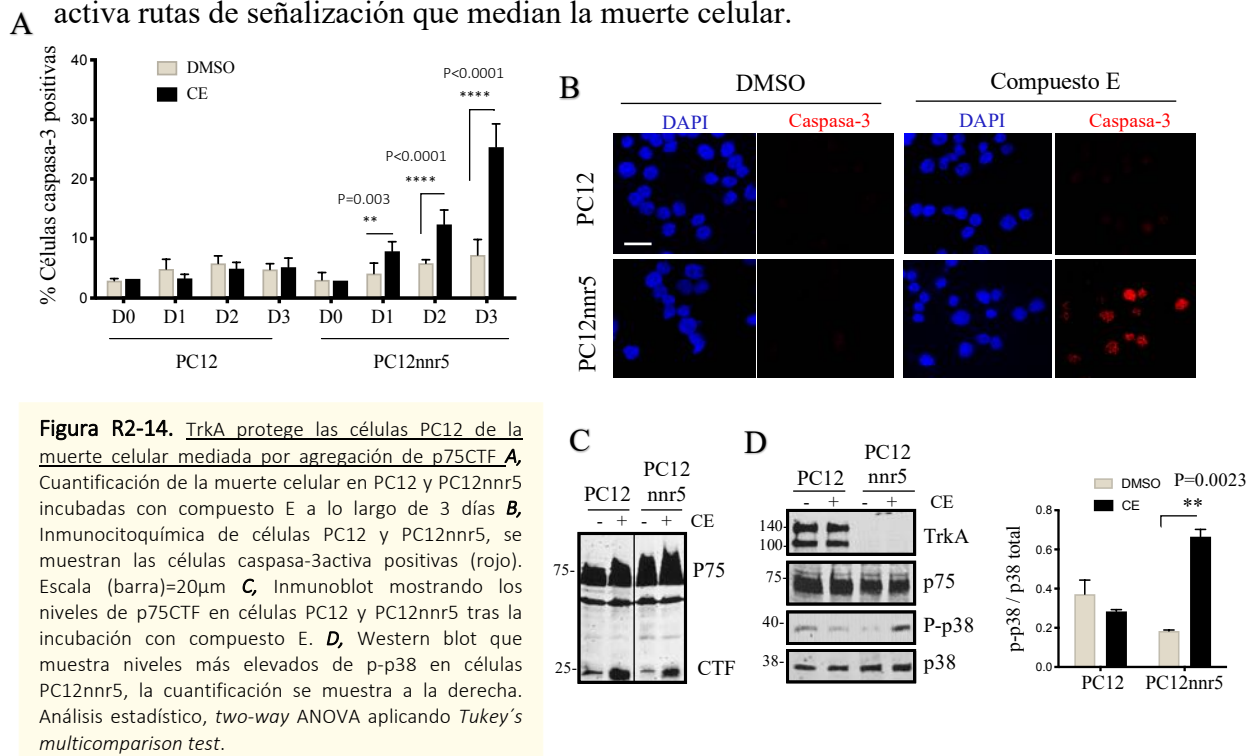
Estudios previos ya sugerían que la actividad de TrkA podría bloquear algunos mecanismos de muerte celular neuronal mediados por p75 (Underwood et al., 2008). Por ello decidimos estudiar la influencia del receptor TrkA en la muerte celular mediada por la dimerización y agregación de p75CTF. Se transfectaron las células HeLa con TrkA, p75CTF y TrkA-DN, posteriormente se incubaron con CE durante 24h y se analizó la muerte celular por inmunocitoquímica, cuantificando las células caspasa-3 activa positivas. Los resultados mostraron que la coexpresión de TrkA reducía de forma significativa la muerte celular producida por la agregación de p75CTF, donde la actividad tirosina quinasa parece aportar una protección adicional frente a la muerte celular.



3.4. TrkA protege las células PC12 de la muerte celular mediada por p75CTF

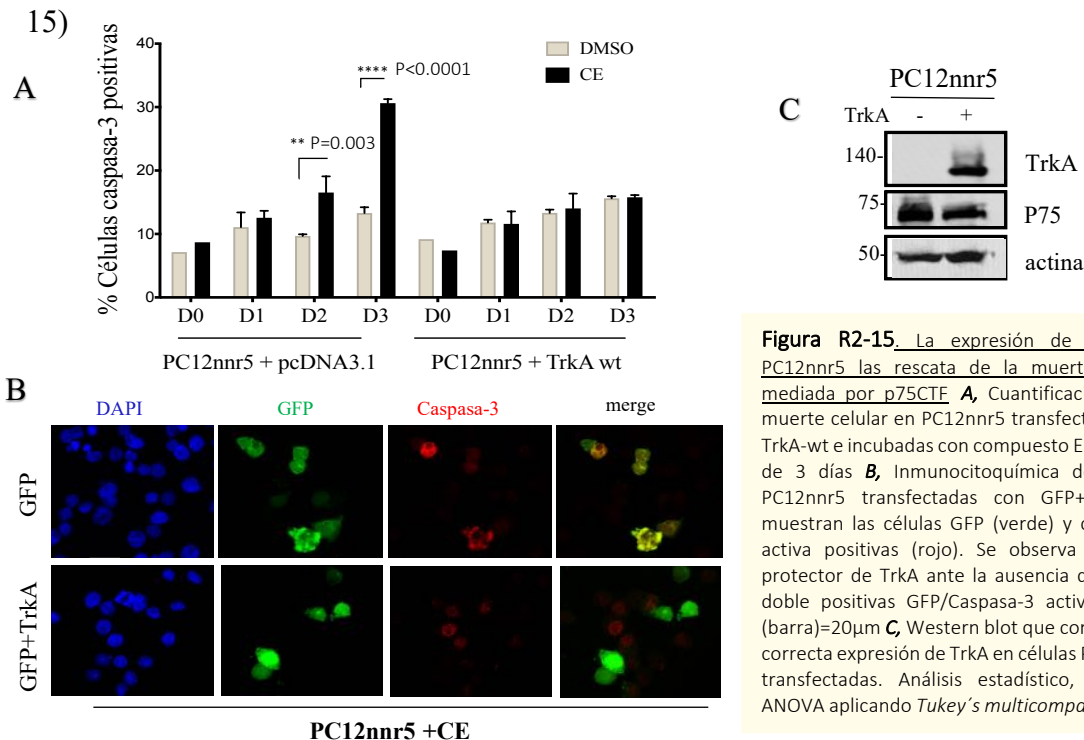
Posteriormente decidimos hacer el estudio de muerte celular en un contexto de expresión endógena de ambos receptores como ocurre en las células PC12, a fin de corroborar el papel protector que tiene TrkA frente a la muerte celular por agregación de p75CTF. Para ello, incubamos las células PC12 y PC12nr5 (que no expresan TrkA) con CE durante 3 días para promover la acumulación de p75CTF. Las células se fijaron a día 1, día 2 y día 3, seguidamente se realizó una inmunocitoquímica para la detección de caspasa-3 activa. Los resultados mostraron que las células PC12nr5 tenían un porcentaje más elevado de células caspasa-3 activa positivas respecto a las PC12 (Figura R2-14). Tras un análisis

por western blot del extracto de las células PC12nr5 observamos niveles más elevados de fosforilación de p38 en presencia de CE (Figura R2-14D), ruta involucrada en la muerte celular mediada por p75. El conjunto de datos nos muestra que TrkA cumple un rol protector en las PC12 en presencia de CE, mientras que su ausencia en PC12nr5 activa rutas de señalización que median la muerte celular.



3.5. TrkA rescata las células PC12nr5 de la muerte mediada por agregación de p75CTF

Para confirmar que TrkA cumple un rol protector frente a la muerte celular por CE, decidimos transfectar las PC12nr5 con TrkA y tras repetir el ensayo de muerte celular bajo las mismas condiciones, observamos que la expresión de TrkA en las PC12nr5 rescataba a las células de la muerte mediada por la inhibición de γ -secretasa. (Figura R2-15)



3.6. La inhibición de γ -secretasa promueve la agregación de p75CTF en la membrana celular

Al saber que la acumulación de p75CTF puede influir negativamente en la supervivencia celular y la formación de homodímeros parece exacerbar esta muerte, decidimos determinar la capacidad de agregación que tiene p75CTF sobre la membrana plasmática. Para ello, transfectamos las células HeLa con p75CTF y tratamos las células con BS3, un entrecruzador de aminas libres presentes en la cadena lateral de los residuos de lisina, que es impermeable a la membrana celular. Las muestras se analizaron por western blot y se identificaron monómeros, dímeros y oligómeros de p75CTF (Figura R2-16A). Posteriormente decidimos analizar la capacidad de agregación de p75CTF partiendo de p75-wt, donde fomentamos la generación de CTF incubando las células con PMA 90 min a 37° C y tratándolas posteriormente con BS3. El análisis por western blot nos mostró que el p75CTF generado por la actividad endógena de α -secretasa también fue capaz de dimerizar y oligomerizar (Figura R2-16B)

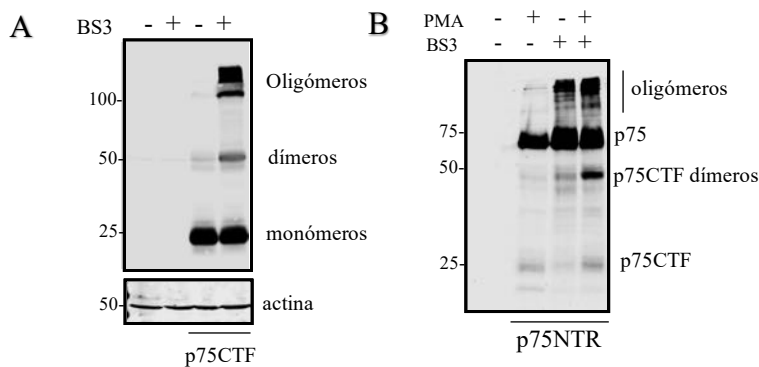


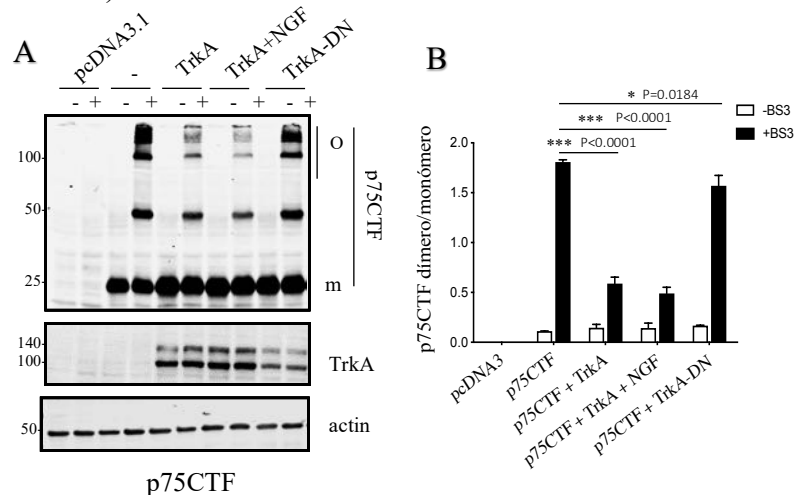
Figura R2-16. La inhibición de α -secretasa promueve la agregación de p75CTF en la membrana celular

A, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF donde se observa la formación de dímeros y oligómeros tras la incubación con BS3 **B**, western blot de células HeLa transfectadas con p75, se observa la formación de p75CTF tras el uso de PMA y la formación de dímeros y oligómeros de p75CTF tras la incubación con BS3

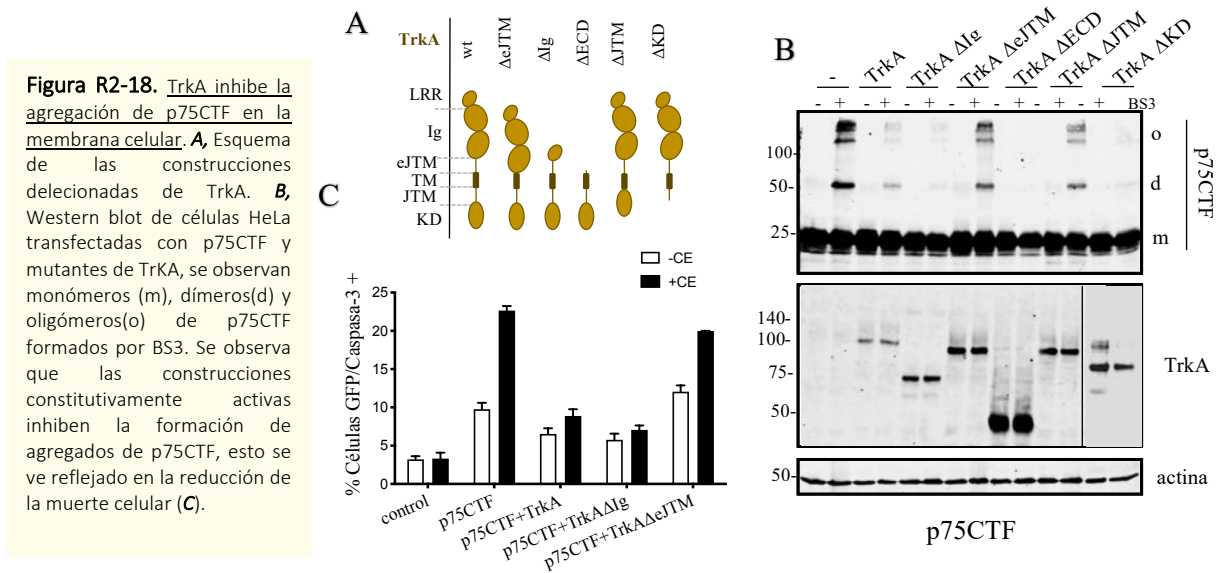
3.7. TrkA inhibe la agregación de p75CTF en la membrana celular

Tras observar la formación de dímeros y oligómeros de p75CTF nos preguntamos si la coexpresión de TrkA tendría algún impacto sobre la formación de estos agregados. Por eso realizamos los ensayos de BS3 en células HeLa co-transfectadas con p75CTF y TrkA (Figura R2-17A). Cuantificamos los niveles de agregados que se formaron y los resultados mostraron que TrkA reduce de forma significativa el ratio dímero/monómero de p75CTF y tras emplear la construcción TrkA-DN, se nos reveló que la actividad tirosina quinasa de TrkA parece jugar un papel muy importante en la reducción de estos agregados de p75CTF (Figura R2-17).

Figura R2-17. TrkA inhibe la agregación de p75CTF en la membrana celular. **A**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF y TrkA se observan los monómeros (m), dímeros (d) y oligómeros (o) de p75CTF formados por BS3, en los paneles inferiores se muestran los niveles de TrkA y actina. **B**, histograma representando el ratio p75CTF dímero/monómero donde se observa el impacto de TrkA en reducción del ratio p75 dímero/monómero. Análisis estadístico, two-way ANOVA (media \pm SEM, n=3) aplicando Tukey's multicomparison test.



Posteriormente se analizó la formación de agregados de p75CTF en presencia de diferentes construcciones de TrkA que tenían delecionadas diferentes regiones a lo largo de la proteína (Figura R2-18A). Las células transfectadas se trataron con BS3 y las muestras se analizaron por western blot. Aquellas construcciones que eran constitutivamente activas como TrkA Δ Ig o TrkA Δ ECD (Arevalo et al., 2000) fueron capaces de bloquear completamente la agregación de p75CTF, mientras que las construcciones que inactivaban el receptor como TrkA Δ eJTM y TrkA Δ JTM no conseguían reducir la formación de agregados de p75CTF, reafirmando que la actividad del receptor es esencial para modular la oligomerización de p75CTF (Figura R2-18). En los ensayos de muerte observamos una correlación existente entre la formación del dímeros de p75CTF y aumento del porcentaje de muerte celular, así como el aumento de la supervivencia celular por una reducción en la agregación de p75CTF tras la coexpresión con TrkA (Figura R2-18B).



3.8. TrkA reduce la señalización de muerte producida por la unión p75CTF-TRAF6

Los resultados anteriores nos muestran que la oligomerización de p75CTF en la membrana celular desencadena los eventos de muerte celular. Decidimos determinar que rutas de señalización podrían estar involucradas en este mecanismo de muerte. Para ello, se cuantificaron los niveles de p-JNK y p-38 en células HeLa transfectadas con p75 y TrkA. Las células se incubaron con el inhibidor de γ -secretasa (CE) durante 24h y los extractos se analizaron por western blot (Figura R2-19A,B). Paralelamente se cuantificó la muerte celular por inmunocitoquímica bajo las mismas condiciones. Observamos que p75CTF activaba las rutas de JNK y p38 en presencia de CE, mientras que la coexpresión de TrkA conseguía inhibir esta fosforilación (Figura R2-19B). Esto se reflejaba en el aumento de la supervivencia celular producida por la expresión de TrkA en los ensayos de muerte celular. Se sabe que el mecanismo de muerte inducido por p75 está mediado por su capacidad de reclutar TRAF6. En experimentos anteriores sugeríamos que la capacidad de dimerizar de p75CTF de forma covalente exacerba la muerte celular en comparación con el mutante p75CTF-C257A. Para determinar si los agregados de

p75CTF tienen la capacidad de unir TRAF6 realizamos una co-inmunoprecipitación empleando células HEK293 transfectadas con p75CTF y p75CTF-C257A y TRAF6. Realizamos primero la precipitación de TRAF6 y posteriormente la inmunodetección de p75. Las muestras se trataron por SDS-PAGE no reductor. Los resultados nos mostraron que la unión de TRAF6 a p75CTF es específica de dímeros covalentes, ya que no observamos unión con el mutante p75CTF-C257A ni con monómeros de p75CTF (Figura R2-19C,D). En una inmunoprecipitación posterior donde empleamos TrkA observamos que la coexpresión de TrkA con P75CTF reduce la interacción p75CTF/TRAF6 lo que explica la inhibición de las rutas de señalización de muerte JNK y p38 en presencia de TrkA (Figura R2-19D). Para confirmar que la muerte celular esta mediada únicamente por esta ruta de señalización, diseñamos una construcción de p75CTF retirando el dominio de muerte (p75CTF-P341*) pero manteniendo la región JTM de unión a TRAF6. Realizamos ensayos de BS3 y de muerte celular donde observamos la formación de agregados (Figura R2-19E), así como un incremento de la muerte celular en presencia de CE (Figura R2-19F), confirmándonos que los eventos de muerte celular se producen por la unión p75CTF/TRAF6.

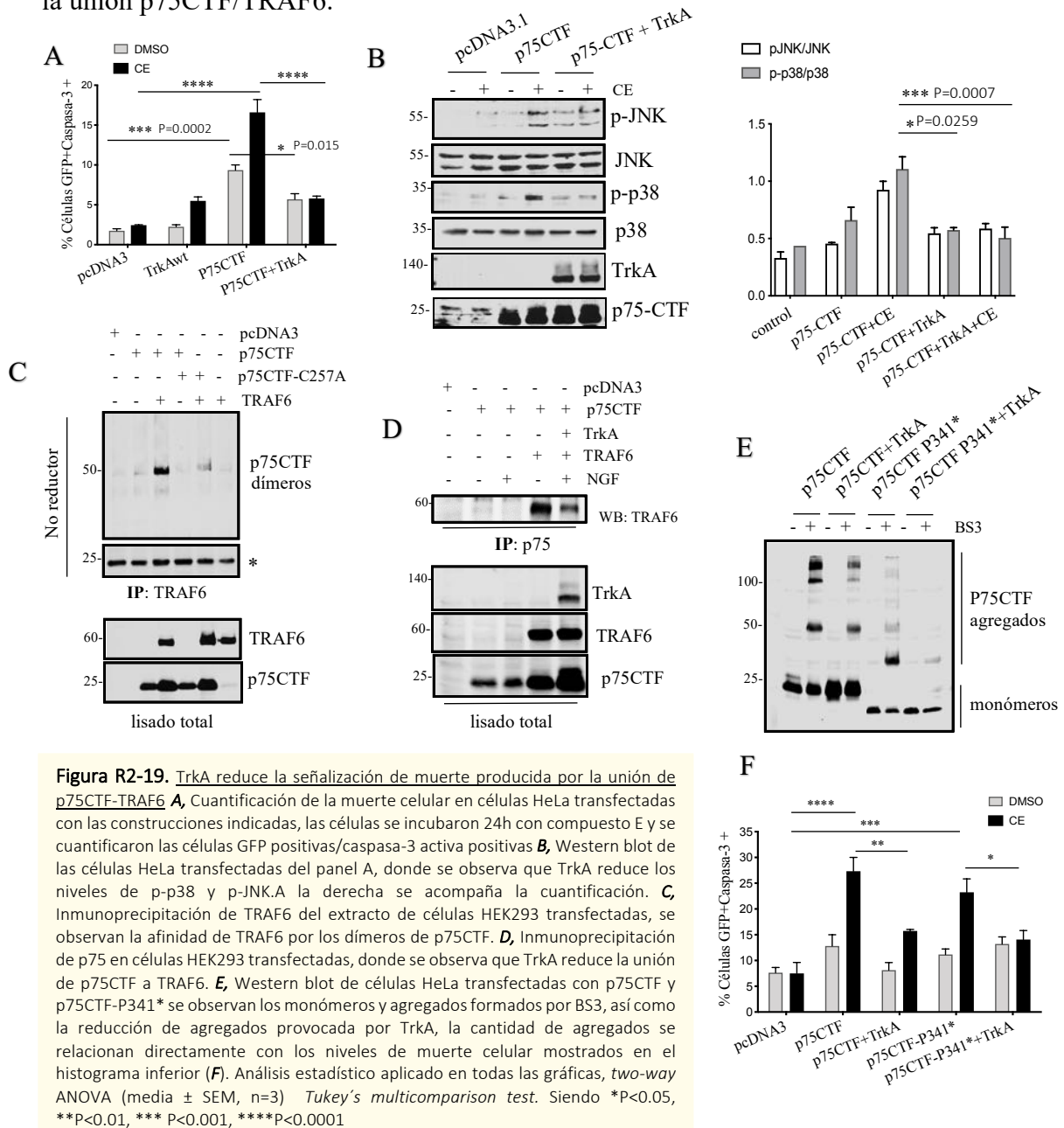


Figura R2-19. TrkA reduce la señalización de muerte producida por la unión de p75CTF-TRAF6 **A**, Cuantificación de la muerte celular en células HeLa transfectadas con las construcciones indicadas, las células se incubaron 24h con compuesto E y se cuantificaron las células GFP positivas/caspasa-3 activa positivas **B**, Western blot de las células HeLa transfectadas del panel A, donde se observa que TrkA reduce los niveles de p-p38 y p-JNK. A la derecha se acompaña la cuantificación. **C**, Inmunoprecipitación de TRAF6 del extracto de células HEK293 transfectadas, se observan la afinidad de TRAF6 por los dímeros de p75CTF. **D**, Inmunoprecipitación de p75 en células HEK293 transfectadas, donde se observa que TrkA reduce la unión de p75CTF a TRAF6. **E**, Western blot de células HeLa transfectadas con p75CTF y p75CTF-P341* se observan los monómeros y agregados formados por BS3, así como la reducción de agregados provocada por TrkA, la cantidad de agregados se relacionan directamente con los niveles de muerte celular mostrados en el histograma inferior (**F**). Análisis estadístico aplicado en todas las gráficas, two-way ANOVA (media \pm SEM, n=3) Tukey's *multicomparison test*. Siendo *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

4. LA ACTIVIDAD DE TrkA REGULA LA INTERNALIZACIÓN DE p75CTF

4.1. TrkA promueve la internalización de p75CTF en presencia de NGF

P75CTF tiene la característica de mediar la muerte gracias a la capacidad que tienen los dímeros covalentes de reclutar TRAF6. Esta muerte se lleva a cabo desde la membrana celular, por eso, decidimos estudiar la estabilidad de p75CTF en la superficie celular en presencia de TrkA. Realizamos ensayos de internalización empleando células HEK293, que se transfectaron con p75CTF y p75CTF+TrkA. Las células se incubaron durante 1h a 4°C con el anticuerpo correspondiente para seguir la internalización de p75CTF a 37°C durante 2h en presencia y ausencia de NGF (Figura R2-20). Paralelamente se empleó TrkA como control positivo de internalización en células HEK293 transfectadas y se siguió la internalización del receptor TrkA en presencia de NGF. Los resultados nos mostraron que la internalización de p75CTF en presencia de TrkA es dependiente de ligando, ello nos sugiere que la internalización de p75CTF esta muy ligada a la activación del receptor TrkA.

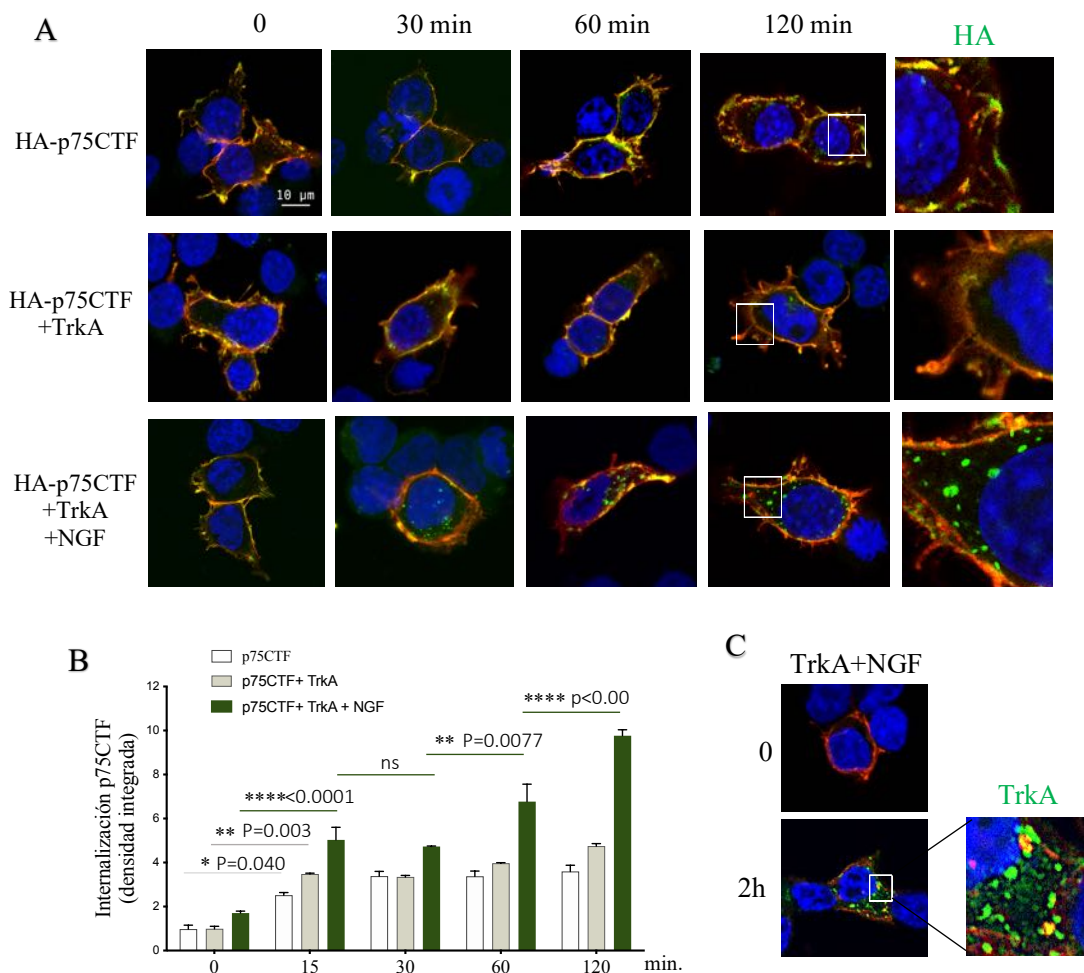


Figura R2-20. TrkA promueve la internalización de p75CTF en presencia de NGF **A**, Inmunocitoquímica de células HEK293 transfectadas donde se observa el proceso de internalización de p75CTF (verde) tras la coexpresión con TrkA en presencia y ausencia de NGF, la internalización de p75CTF en presencia de TrkA es dependiente de ligando. **B**, Cuantificación de la internalización de p75CTF en presencia de TrkA, se midió la densidad integrada dada por la señal de la proteína p75CTF en el citoplasma, las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal SP8. **C**, Internalización de TrkA (verde) en presencia de NGF durante 2h, ensayo realizado paralelamente como control positivo de internalización. Análisis estadístico, two-way ANOVA. Tukey's multicomparison test. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. se cuantificaron 50-60 células por condición.

4.2. TrkA promueve la internalización de dímeros de p75CTF presentes en la membrana celular

Continuando con el estudio de la estabilidad de p75CTF en la superficie celular en presencia de TrkA, realizamos ensayos de citometría de flujo empleando células HEK293 transfectadas con p75CTF y TrkA. Las células se incubaron en presencia y ausencia de NGF durante 1h, se lavaron 3 veces con PBS frío y se marcaron los receptores de membrana p75CTF incubando las células con el anticuerpo específico durante 1h a 4°C. Se empleó el anticuerpo secundario Alexa 488 (verde) para identificar las células positivas por el citómetro y se midió el porcentaje de señal media FitC-A. Los resultados mostraron una reducción del 30% de la señal FitC-A en células que coexpresan p75CTF/TrkA incubadas con NGF durante 1h respecto a aquellas incubadas 1h sin NGF (Figura R2-21A). Dado que la señal corresponde a los receptores presentes en la superficie celular, esta reducción de señal estaría ligada a la internalización de P75CTF. A fin de reforzar estos resultados decidimos realizar un marcaje de proteínas de la superficie con biotina para, posteriormente, precipitar todas las proteínas marcadas mediante la unión a una resina de streptavidina y cuantificar los niveles de p75CTF en la superficie celular por SDS-PAGE no reductor. Observamos que los dímeros de p75CTF predominan en la membrana celular sobre los monómeros y que en presencia de NGF y TrkA los niveles de p75CTF en la membrana se redujeron considerablemente (Figura R2-21), sugiriéndonos que estos escasos niveles de P75CTF se corresponden con la internalización del receptor.

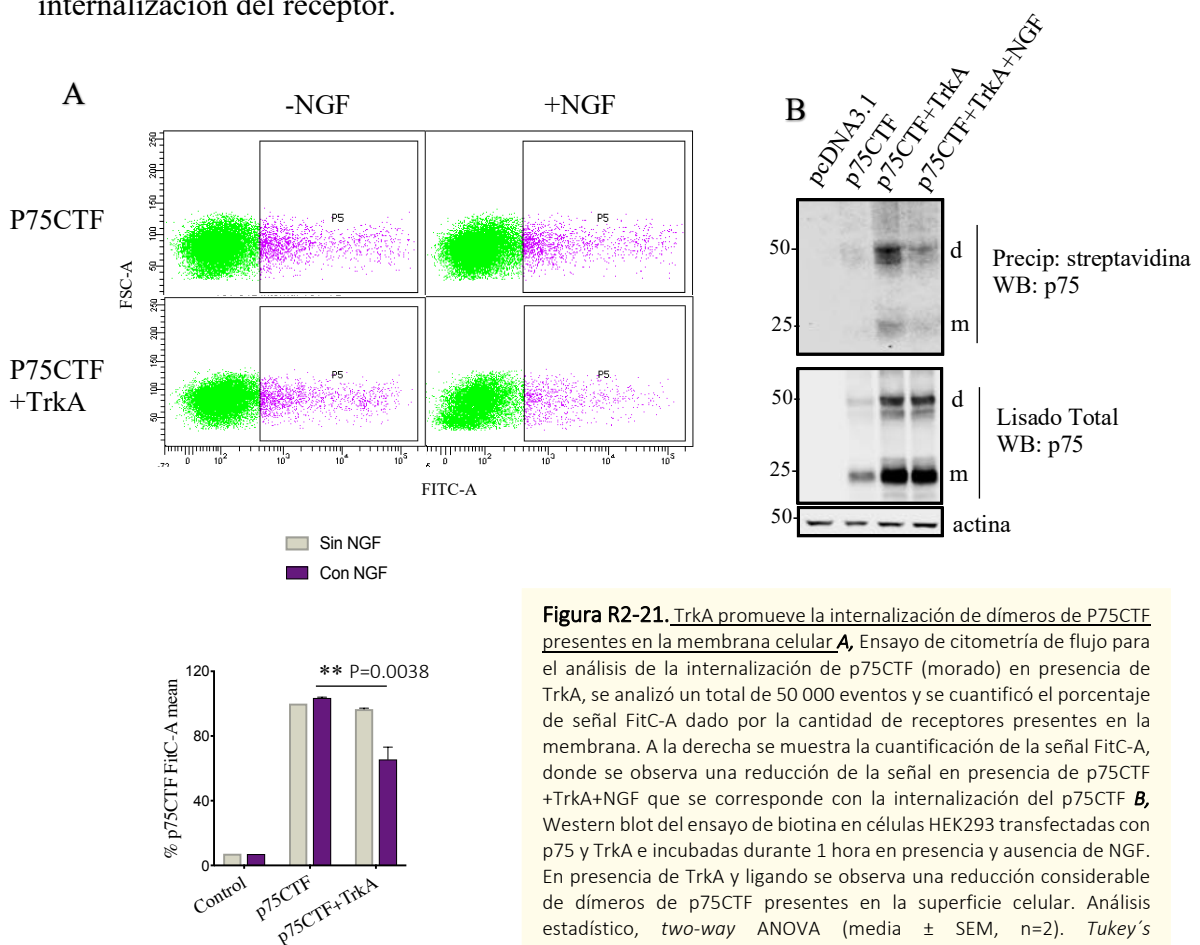


Figura R2-21. TrkA promueve la internalización de dímeros de P75CTF presentes en la membrana celular **A**, Ensayo de citometría de flujo para el análisis de la internalización de p75CTF (morado) en presencia de TrkA, se analizó un total de 50 000 eventos y se cuantificó el porcentaje de señal FitC-A dado por la cantidad de receptores presentes en la membrana. A la derecha se muestra la cuantificación de la señal FitC-A, donde se observa una reducción de la señal en presencia de p75CTF+TrkA+NGF que se corresponde con la internalización del p75CTF **B**, Western blot del ensayo de biotina en células HEK293 transfectadas con p75 y TrkA e incubadas durante 1 hora en presencia y ausencia de NGF. En presencia de TrkA y ligando se observa una reducción considerable de dímeros de p75CTF presentes en la superficie celular. Análisis estadístico, two-way ANOVA (media \pm SEM, n=2). Tukey's multicomparison test. Siendo *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ****P<0.0001.

4.3. TrkA y p75CTF colocalizan en las vesículas endocíticas mediadas por NGF

En un ensayo posterior, mediante inmunocitoquímica decidimos determinar si las vesículas de internalización mediadas por ligando contenían ambos receptores, Para ello cotransfectamos las células HEK293 con Myc-TrkA y HA-p75CTF. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo primario HA (1:100) y anti-TrkA (1:100, millipore) diluidos en PBS durante 1h a 4°C . Se lavaron las células 3 veces con PBS frio y se incubaron con 50 ng de NGF en DMEM a 37°C durante 0, 30 y 60 min, fijando las células respectivamente. Para seguir las vesículas de internalización se realizó la inmunocitoquímica empleando los anticuerpos secundarios Alexa anti-mouse 555 (rojo) para detectar p75 y Alexa anti-rabbit 488 (verde) para detectar TrkA. Se tomaron las fotos en el microscopio Confocal SP8, donde observamos la formación de vesículas a partir de 30 min de incubación con NGF y éstas eran positivas tanto para p75CTF como para TrkA (flecha blanca) (Figura R2-22), indicándonos que las vesículas contenían ambos receptores.

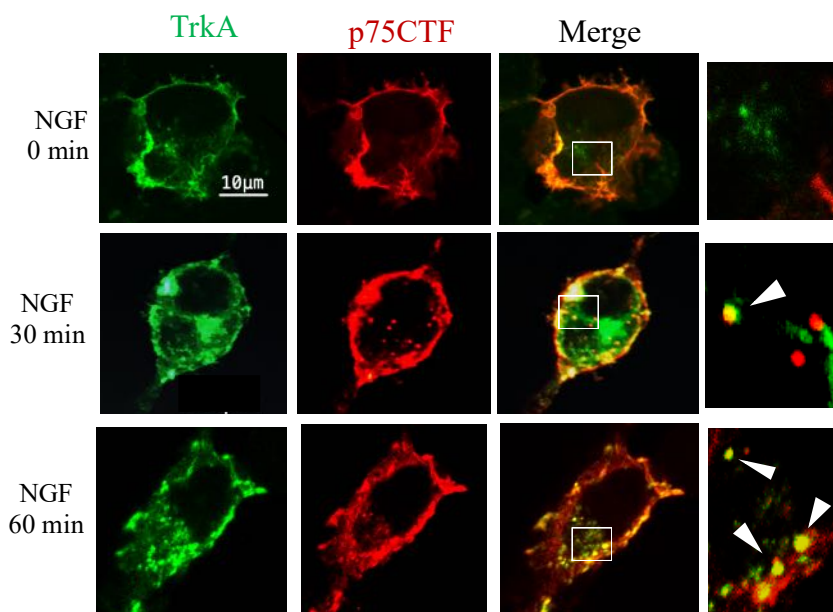
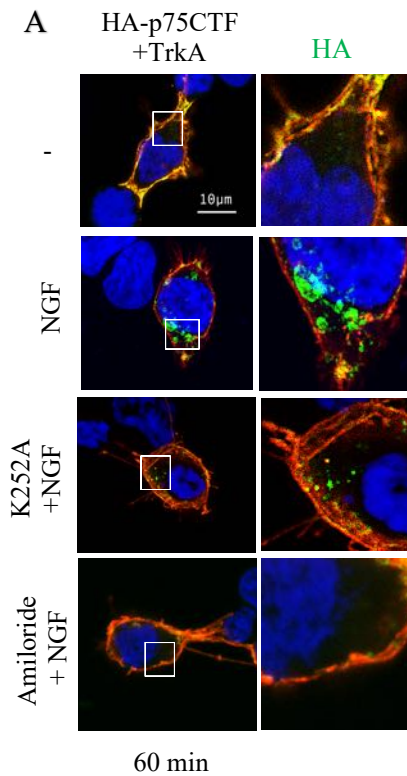


Figura R2-22. TrkA y p75 colocalizan en las vesículas endocíticas mediadas por NGF. Inmunocitoquímica de células HEK293 cotransfectadas con p75CTF (rojo) y TrkA (verde) donde se observa el proceso de internalización de ambos receptores en presencia de 50ng de NGF tras 0, 30 y 60 min. Se observa la colocalización de ambas proteínas en las vesículas endocíticas indicadas en color amarillo (flecha).

4.4. La actividad de TrkA asociada a la ruta PI3K participa en la internalización de p75CTF

A fin de determinar que la actividad de TrkA es la que modula la internalización de p75CTF, decidimos realizar un ensayo de internalización en células HEK293 cotransfectadas con p75CTF y TrkA utilizando el reactivo K252A, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de Trk, y el reactivo amiloride, un inhibidor de la macropinocitosis, proceso endocítico que se ha descrito en células PC12 y se encuentra ligado a la coexpresión p75/TrkA. Ambos reactivos se incubaron durante 1h a 4°C y posteriormente se incubaron con NGF durante 60 min., tiempo tras el cual se fijaron y se realizó la inmunocitoquímica donde seguimos las vesículas p75CTF positivas que se internalizaron (verde). Los resultados mostraron que la internalización de p75CTF era dependiente de la actividad tirosina quinasa de TrkA (Figura R2-23A). Esta internalización explicaría la escasa formación de agregados de p75CTF en la superficie celular que observamos en el ensayo de biotina en presencia de TrkA. A fin de ahondar



en el rol que cumple la actividad tirosina quinasa TrkA en esta internalización, se diseñaron 3 construcciones de TrkA donde se mutaron diferentes residuos de tirosina (Tyr490, Tyr751 y Tyr785) que al fosforilarse reclutan proteínas que forman parte de la cascada de señalización del receptor. Los ensayos de agregación y muerte con estos mutantes de TrkA revelaron que la integridad de los residuos Tyr490 y Tyr785 es esencial para que TrkA puede reducir la formación de agregados de p75CTF y por consiguiente aumentar la supervivencia celular (Figura R2-23B). Tanto la Tyr490 como la Tyr785 se encuentran fuera del dominio quinasa y están asociadas a las rutas de PI3K/AKT y PLC γ respectivamente (Obermeier et al., 1994) y median sus rutas de señalización por el recambio de fosfatidilinositol. Curiosamente, PI3K cataliza la producción de PIP3 por fosforilación del PIP2, el cual participa en la remodelación de actina en los sitios donde se forman las estructuras macropinocíticas (Tall et al., 2000). Esta ruta

de señalización de PI3K involucra así la internalización de TrkA por NGF, que le permite mediar funciones de supervivencia celular (York et al., 2000). El conjunto de resultados revela que la actividad de TrkA asociada a la ruta PI3K es esencial para modular la internalización de p75CTF en presencia de NGF reduciendo la formación de agregados en la superficie celular y fomentando así la supervivencia celular.

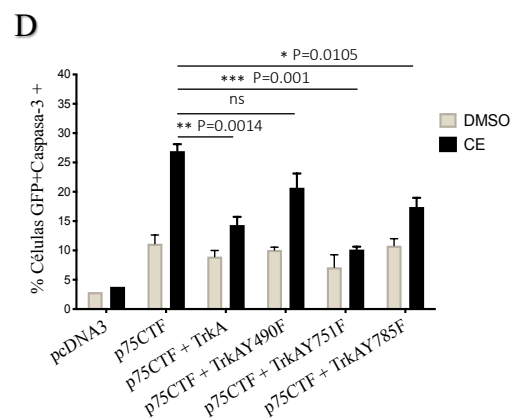
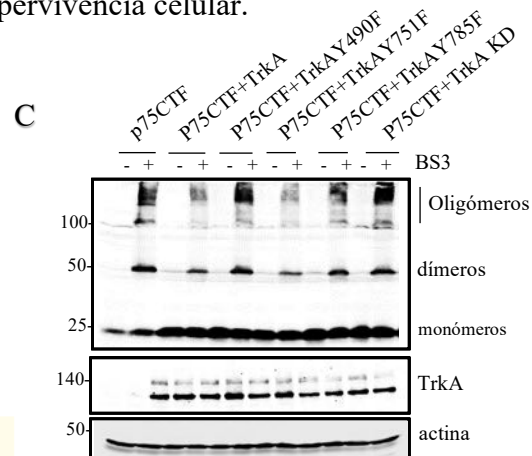
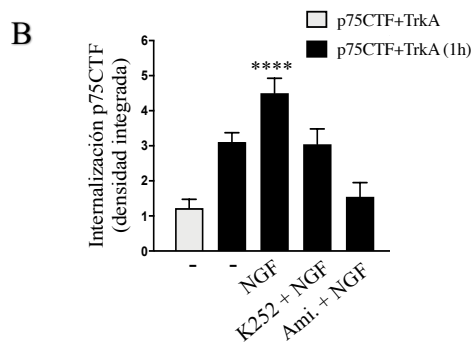


Figura R2-23. La actividad de TrkA asociada a la ruta PI3K es esencial para la internalización de p75CTF. **A**, Inmunocitoquímica de células HEK293 co-transfectadas con p75CTF y TrkA e incubadas con el inhibidor K252 y amiloride, las imágenes muestran el proceso de internalización de p75CTF (verde) en presencia de 50ng de NGF durante 60 min. Tanto la inhibición de la actividad de TrkA como la inhibición de la macropinocitosis bloquean la internalización de p75CTF en presencia de TrkA y ligando. La cuantificación se refleja en el histograma inferior. **B**, Cuantificación del panel A. Análisis estadístico, *one-way ANOVA Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. **C**, Inmunoblot donde se observa el efecto de los mutantes tirosina quinasa de TrkA sobre la formación de agregados de p75CTF. Los mutantes TrkA-Y490F y TrkA-Y785F han perdido la capacidad de inhibir la formación de agregados de p75CTF. **D**, Cuantificación de la muerte celular producida por p75CTF en presencia de los mutantes tirosina quinasa de TrkA. Análisis estadístico, *two-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3). *Tukey's multicomparison test*. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

4.5. La expresión endógena de TrkA en PC12 promueve la internalización de p75CTF exógeno en presencia de NGF

Decidimos analizar el comportamiento de p75CTF en un contexto de expresión endógena de TrkA. Para ello, empleamos la línea PC12 y PC12nnr5, ambas líneas se transfectaron con p75CTF y se analizó la internalización del receptor (verde) en presencia y ausencia de NGF mediante inmunocitoquímica (Figura R2-24). Estos ensayos reforzaron los resultados obtenidos anteriormente sobre la presencia de TrkA para modular la internalización de p75CTF ya que esta internalización no se observó en las PC12nnr5 por carecer de TrkA, mostrándonos que una sobreexpresión de p75CTF en la superficie celular no es suficiente para estimular la internalización. Niveles endógenos de TrkA son suficientes para promover la internalización del receptor, revelando la gran capacidad que tiene TrkA para modular esta vía.

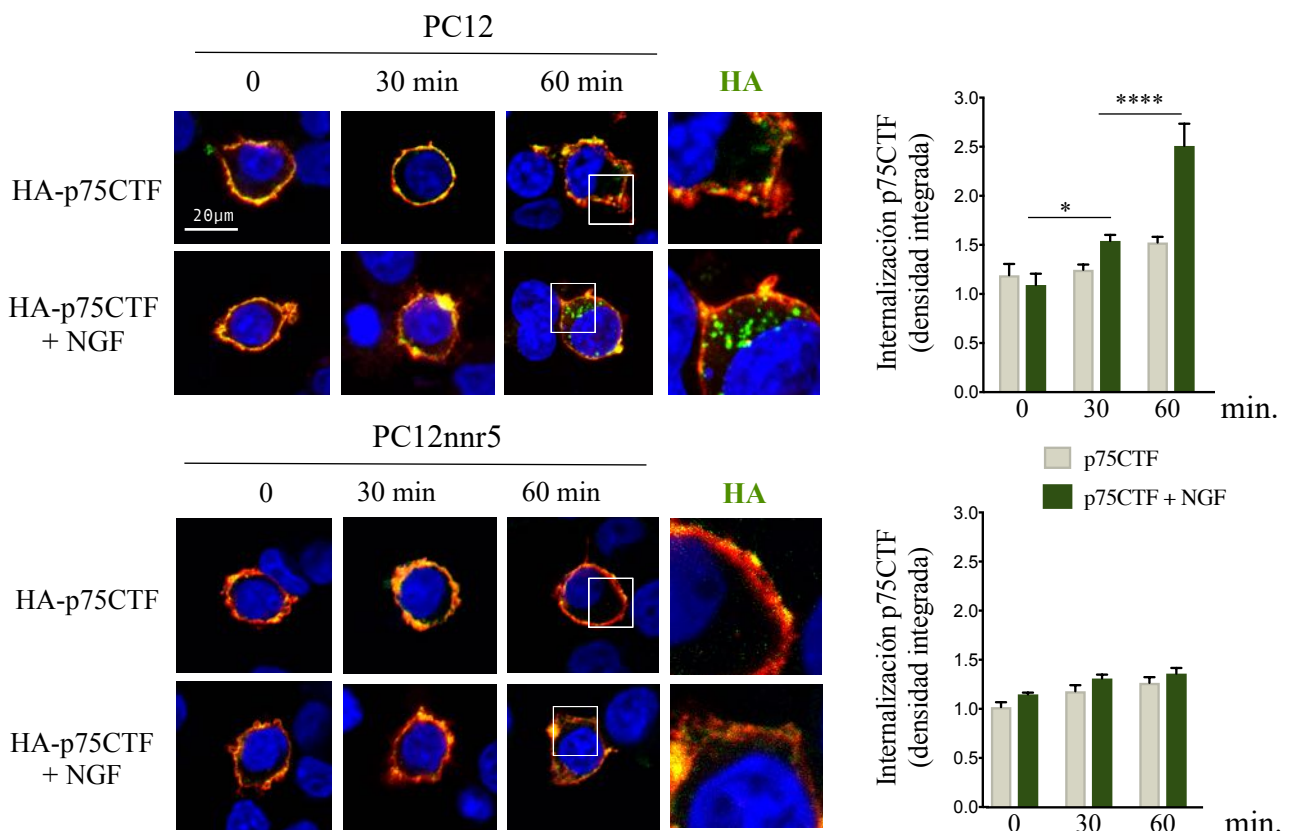
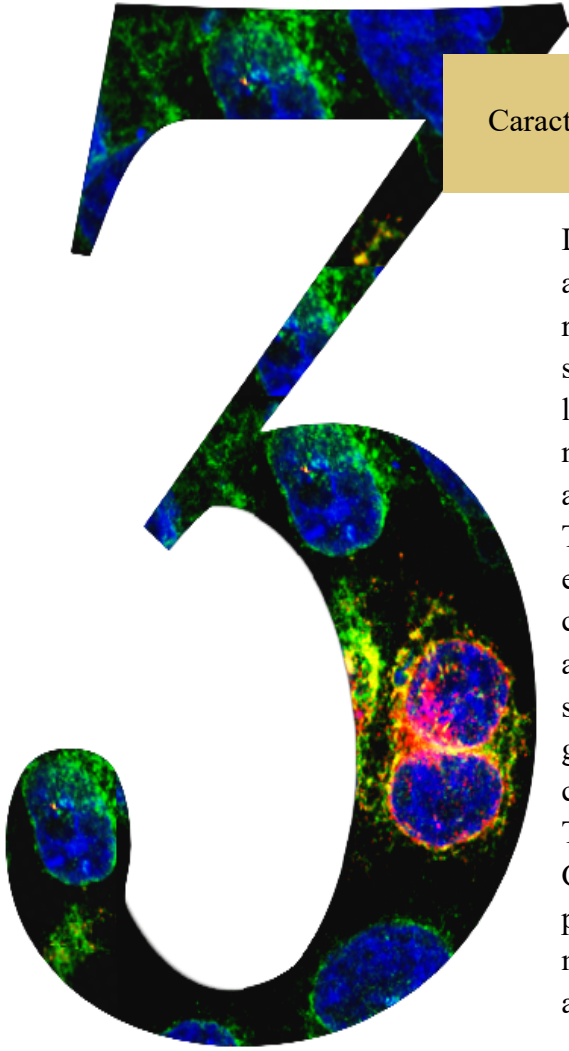


Figura R2-24. La expresión endógena de TrkA en PC12 promueve la internalización de p75CTF exógeno en presencia de NGF. Inmunocitoquímica de células PC12 y PC12nnr5 transfectadas con p75CTF donde se observa el proceso de internalización de p75CTF (verde) en presencia y ausencia de 50 ng/ml de NGF durante 0, 30 y 60 min. Las células PC12 en presencia de NGF son capaces de promover la internalización de p75CTF a diferencia de las células PC12nnr5, que carecen de TrkA endógeno. A la derecha de cada panel se representa la internalización de p75CTF en PC12 y PC12nnr5 respectivamente, donde se cuantificó la densidad integrada dada por la señal de la proteína p75CTF en el citoplasma (verde), las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal SP8. Análisis estadístico, two-way ANOVA. Tukey's multicomparison test. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Se cuantificaron 20-30 células por condición.



CAPITULO III

Caracterización de mutaciones de TrkA identificadas en la enfermedad de CIPA

La insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA) es un trastorno autosómico recesivo poco común (Indo, 2002). Se sabe que la señalización de TrkA por NGF es necesaria para la formación y la diferenciación de neuronas nociceptivas durante el desarrollo (Marmigere et al., 2006). Por ello, mutaciones inactivantes de TrkA estarían detrás de la sintomatología de la enfermedad (Indo et al., 2001; Indo et al., 1996), caracterizada principalmente por la insensibilidad a estímulos nocivos, así como la ausencia de sudoración por falta de inervación de las glándulas sudoríparas (Indo, 2010). En este capítulo caracterizaremos tres mutaciones de TrkA identificadas en niños diagnosticados con CIPA y localizadas en diferentes dominios de la proteína; determinaremos el impacto de estas mutaciones sobre la funcionalidad del receptor, así como su repercusión a nivel celular.

1. LAS MUTACIONES DE TrkA IDENTIFICADAS EN CIPA INACTIVAN EL RECEPTOR

Las mutaciones descritas en este capítulo se identificaron en niños diagnosticados con CIPA mostrando entre ellos un índice de déficit intelectual variable. Decidimos caracterizar 3 de ellas, las cuales denominamos TrkA- Δ 736, TrkA-L213P y TrkA-C300stop, representando así los distintos tipos de mutaciones encontradas en esta enfermedad, deleciones, sin sentido y formas truncadas respectivamente, así como una diferente localización a lo largo del receptor.

TrkA Δ 736(c.2206-2>G) es una deleción que elimina 7 residuos del dominio quinasa de TrkA descrita en una niña en el norte de España sin evidencias de déficit intelectual (Sarasola et al., 2011). La mutación TrkA L213P (c.637T>C) es una mutación sin sentido en el dominio extracelular, la patología se describe con un leve déficit intelectual y TrkA C300stop (c.899_900GC>AA) es una mutación que trunca la proteína a nivel del dominio Ig2, identificada en un joven de 17 años y su hermana de 8 años mostrando ambos homocigosis en el gen NTRK, en una detección precoz de la enfermedad no se detectaron signos de déficit intelectual. Las 3 mutaciones se replicaron por mutagénesis dirigida por PCR añadiendo la etiqueta HA en su extremo N-terminal para facilitar su detección.

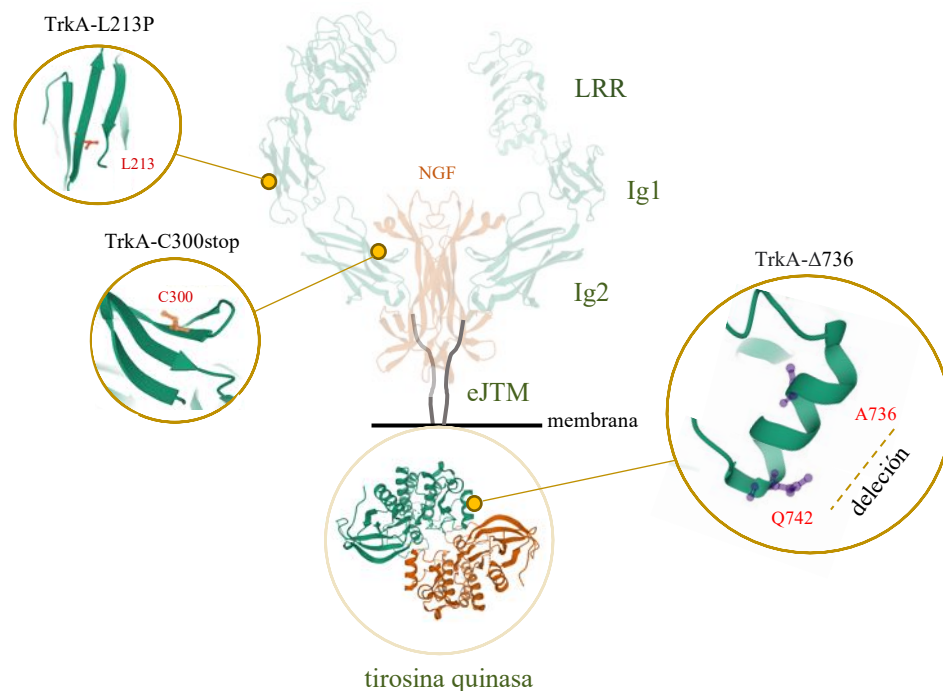


Figura R3-1. Mutaciones de TrkA identificadas en CIPA y caracterizadas en este capítulo. Esquema de la localización de los residuos en el receptor TrkA afectados por mutaciones en la enfermedad de CIPA. Se muestra la estructura cristalina del complejo TrkA/NGF (banco de datos de proteínas : 2IFG) y la estructura del dominio tirosina quinasa del homodímero activo de TrkA. (banco de datos de proteínas: 6IQN)

A fin de determinar el impacto de estas mutaciones sobre la actividad del receptor TrkA decidimos transfectar las células HeLa con las mutaciones descritas. Posteriormente se

sembraron en placas de 12 pocillos para ser estimuladas con 50 ng de NFG durante 0, 5 y 15 min a 37° C. Tras la incubación, las células se lisaron y los extractos se analizaron por western blot. La inmunodetección se realizó frente a las tirosinas fosforiladas Tyr 490 y Tyr 674/675 y frente a TrkA total, identificando las dos bandas características del receptor, una inferior aproximadamente a 110KDa, correspondiente a receptor inmaduro con una localización intracelular cuya activación se corresponde con una dimerización espontánea, y una banda superior a 140 KDa correspondiente al receptor glicosilado expresado en la membrana plasmática, cuya fosforilación si es dependiente de su unión al ligando como se observa en TrkA-wt (Figura 2A). Sin embargo, tanto TrkA- Δ 736 como TrkA-L213P carecen de la banda superior evidenciando posibles defectos en el proceso de maduración y/o tráfico hacia la membrana, impidiendo la activación del receptor como respuesta a NGF. El mutante TrkA-C300stop no mostró fosforilación alguna al carecer del dominio quinasa. Paralelamente se analizaron los niveles de p-ERK y p-AKT como parte de la cascada de señalización de TrkA en presencia de NGF, evidenciando la ausencia de señalización por parte de los mutantes. (Figura R3-2B)

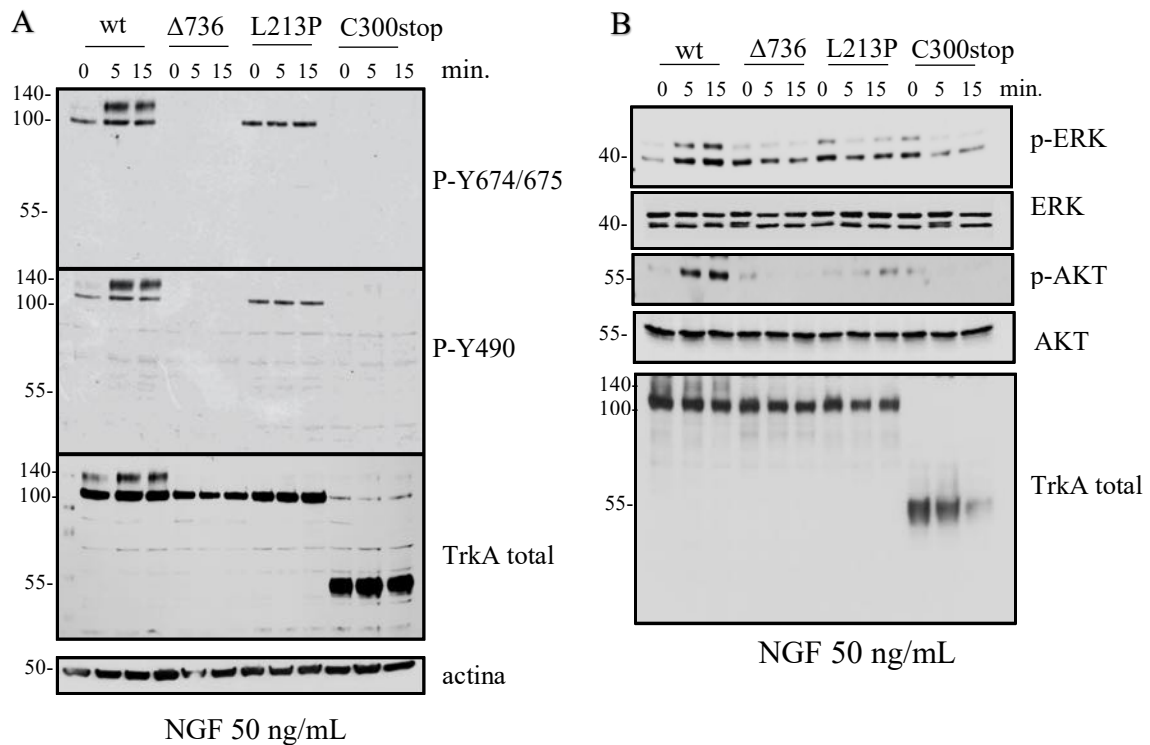


Figura R3-2. Las mutaciones de TrkA identificadas en CIPA inactivan el receptor. **A**, Western blot del extracto de células HeLa transfectadas con los mutantes de TrkA indicados e incubadas con 50ng/mL de NGF durante 0, 5 y 15 min se muestran los niveles de p-Tyr490, P-Tyr674-675, TrkA total y actina revelando la ausencia de actividad por parte de los mutantes. **B**, Western blot del extracto de células tratadas de forma similar a las mostradas en el panel A, se muestran los niveles del P-ERK, ERK, P-JNK, JNK y TrkA total.

Posteriormente, se transfectaron las células PC12nr5 con los mutantes encontrados en CIPA. Esta línea celular carece de TrkA siendo ideal para estudiar la actividad de receptores TrkA exógenos promoviendo la diferenciación celular con NGF. 24h tras la transfección las células se incubaron con 50ng de NGF a 37°C durante 72h y posteriormente se fijaron con PFA 4%. Se cuantificó la diferenciación celular observando

la formación de prolongaciones semejantes a las dendritas de las neuronas mediante el microscopio confocal. Los mutantes de TrkA mostraron una nula o escasa diferenciación celular en presencia de ligando (Figura R3-3), corroborando así la inactividad del receptor.

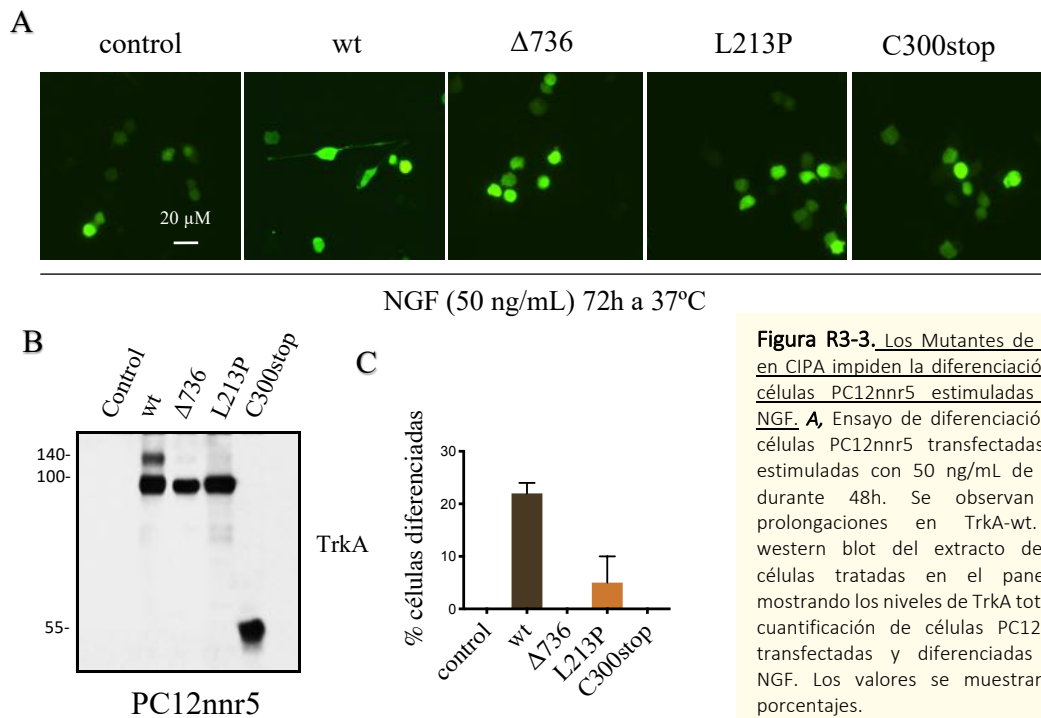


Figura R3-3. Los Mutantes de TrkA en CIPA impiden la diferenciación de células PC12nnr5 estimuladas con NGF. **A**, Ensayo de diferenciación de células PC12nnr5 transfectadas y estimuladas con 50 ng/mL de NGF durante 48h. Se observan las prolongaciones en TrkA-wt. **B**, western blot del extracto de las células tratadas en el panel A mostrando los niveles de TrkA total. **C**, cuantificación de células PC12nnr5 transfectadas y diferenciadas con NGF. Los valores se muestran en porcentajes.

2. LOS MUTANTES DE TrkA TIENEN ALTERADO EL TRÁFICO INTRACELULAR

Los inmunoblots mostrados anteriormente nos sugiere que los mutantes TrkA $\Delta 736$ y TrkA L213P podrían tener defectos en su proceso de maduración al no observar la banda madura (140 KDa), la cual nos indica que la proteína ha alcanzado la membrana celular. Por ello decidimos analizar la expresión de los receptores en la superficie celular, así como su tráfico intracelular.

2.1 Los mutantes de TrkA no alcanzan la superficie celular

Para identificar los receptores que alcanzan la superficie celular se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en células HeLa, las cuales se cotransfectaron con las mutaciones de TrkA y un plásmido que codificaba la proteína fusión GFP-ras como marcador de la membrana plasmática. Las células se fijaron e incubaron con el anticuerpo anti-HA disuelto en un tampón sin Tritón X-100 para marcar solo las proteínas de la superficie y con 0.1% de Tritón X-100 para permeabilizar la membrana y marcar las proteínas localizadas en el interior como un control de expresión. Los resultados nos mostraron que todas las construcciones se expresaban correctamente (Figura R3-4), sin embargo, los

mutantes no alcanzaban la superficie celular, mostrándose únicamente en el interior de las células.

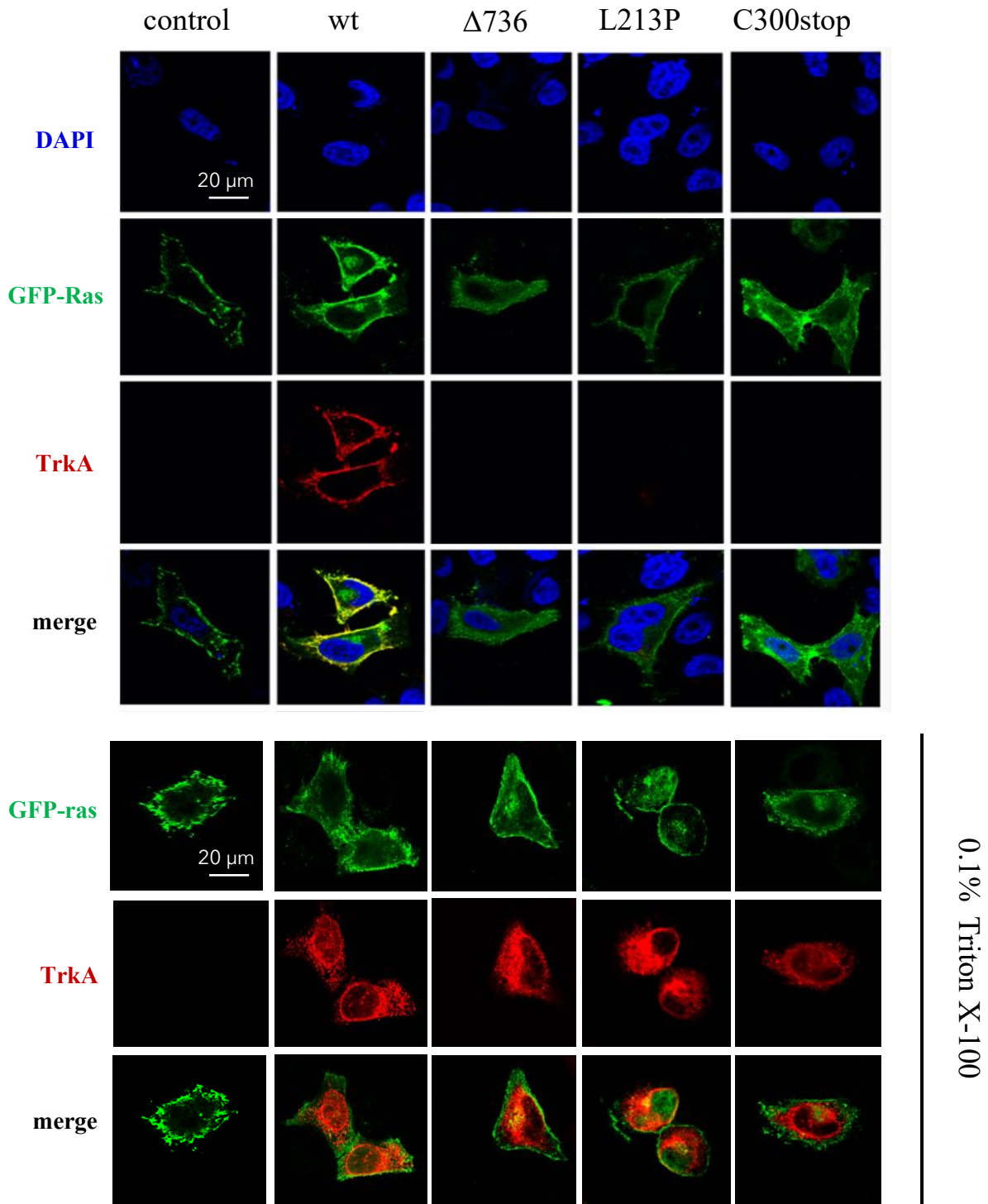
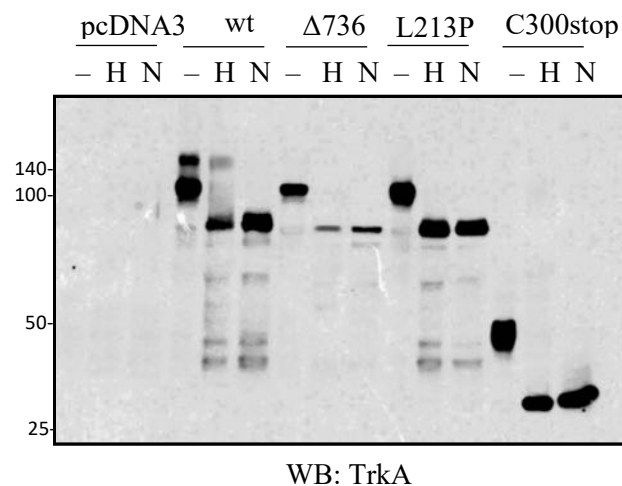


Figura R3-4. Los Mutantes de TrkA en CIPA mantienen una localización intracelular al no alcanzar la superficie celular. Inmunocitoquímica de células HeLa co-transfectadas con los mutantes de TrkA (rojo) y GFP-Ras (verde), las células se analizaron en ausencia y presencia de 0.1% de Tritón X-100, se observa la ausencia de TrkA TrkA- $\Delta 736$, TrkA-L213P y TrkA-C300stop en la membrana celular y su localización intracelular. Se empleó DAPI (azul) como marcador nuclear.

2.2. Los mutantes de TrkA son retenidos en el RE

La ausencia de los receptores en la membrana celular podría evidenciar algún fallo en su proceso de maduración. Sabiendo que la mayoría de receptores de membrana sufre una adición de grupos glucosídicos a los residuos de asparagina en el RE y continúa sus modificaciones en el aparato de Golgi antes de alcanzar la membrana, decidimos determinar si las proteínas realizaban este tránsito de forma correcta. Para ello, transfectamos células HeLa con los mutantes. Tras 24h, las células se lisaron y los extractos se incubaron con endoglicosidasa-H (Endo-H), hidrolizando así los enlaces N-acetilglucosamina con asparagina, y paralelamente, se incubaron con N-glicosidasa eliminando todos los azúcares complejos ligados a asparagina. Los resultados mostraron que todos los mutantes sufrían una desglicosilación completa tras la incubación con Endo-H al igual que la banda de 110KDa de TrkA-wt correspondiente al receptor inmaduro (Figura R3-5); únicamente TrkA-wt conservaba la banda de 140KDa que se reducía completamente tras la incubación con N-glicosidasa. El conjunto de estos resultados parecía indicar que los 3 mutantes de TrkA no transitaban más allá de RE.

Figura R3-5. Los mutantes de TrkA son retenidos en el RE. western blot del extracto de células HeLa transfectadas con TrkA-wt y los mutantes de TrkA identificados en CIPA. Las células se incubaron con tampón (-), endoglicosidasa-H (H) y N-glicosidasa (N). Se observan los niveles de TrkA Total y la variación de la migración de los receptores posterior al tratamiento, evidenciando la presencia de azúcares complejos únicamente en TrkA-wt



Para reforzar los resultados obtenidos anteriormente, estudiamos mediante ensayos de inmunocitoquímica, la localización intracelular de los receptores empleando los anticuerpos anti-calnexina y anti-giantin, ambos marcadores de proteínas transmembrana del RE y Golgi respectivamente y también con anti-HA para marcar TrkA-wt y los mutantes de TrkA. Se cuantificó la colocalización de TrkA con calnexina y giantin utilizando el coeficiente de Pearson, donde observamos una colocalización significativa de los mutantes de CIPA con calnexina y una baja colocalización con giantin (Figura R3-6). La fragmentación del Golgi dificultó el análisis de colocalización de TrkA-wt con giantin, provocada por la autoactivación del receptor, característica que ya se había descrito anteriormente (Schecterson et al., 2010). El conjunto de los resultados nos mostró que los mutantes de CIPA son retenidos en el RE tras su síntesis, razón por la cual no alcanzan la membrana celular.

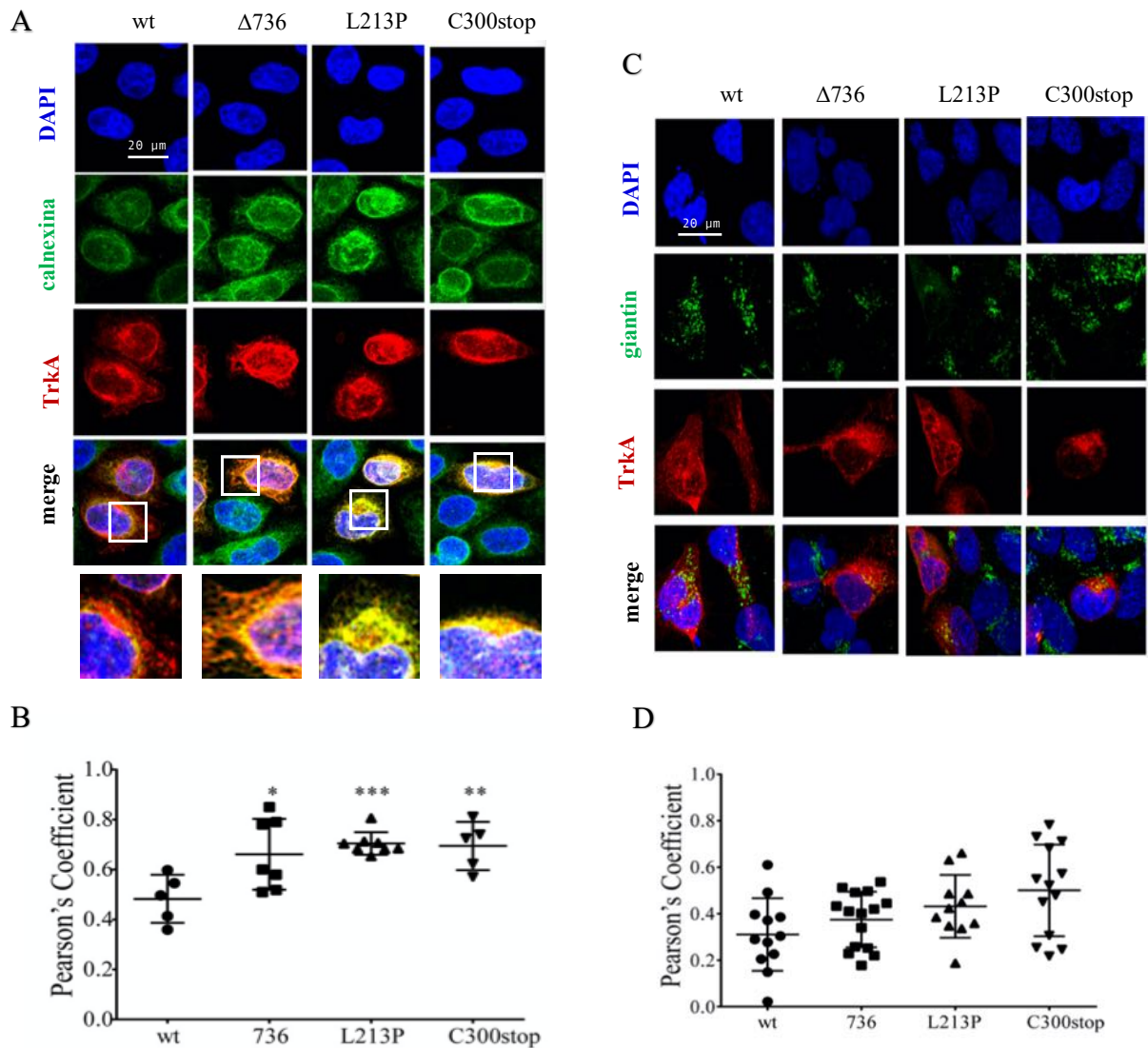


Figura R3-6. Los Mutantes de TrkA son retenidos en el RE. **A**, Inmuncitoquímica para determinar la co-localización de los mutantes de TrkA (rojo) con calnexina (verde), utilizado como marcador del RE en células HeLa co-transfectadas. Se empleó DAPI (azul) como marcador nuclear. **B**, Histograma mostrando la co-localización observada en el panel A mediante el Coeficiente de Pearson. **C**, Inmuncitoquímica para determinar la co-localización de los mutantes de TrkA (rojo) con Giantin (verde), utilizado como marcador del Aparato de Golgi en células HeLa co-transfectadas. Se empleó DAPI (azul) como marcador nuclear. **D**, Histograma mostrando la co-localización observada en el panel A mediante el Coeficiente de Pearson. Análisis estadístico, *t* test. Datos comparados con TrkA-wt. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3. LAS MUTACIONES DE TrkA ALTERAN EL PLEGAMIENTO DEL RECEPTOR Y FOMENTAN SU AGREGACIÓN

Se sabe que el estado de plegamiento de una proteína es monitoreado por diversos sistemas de control de calidad en el RE, las cuales evitan la salida de aquellas proteínas que no han adquirido su conformación nativa, siendo retenidas (Hammond & Helenius, 1994) Sabiendo que muchas mutaciones son responsables del mal plegamiento de proteínas, decidimos realizar un ensayo de sensibilidad a la tripsina de los mutantes de CIPA para estudiar su estado de plegamiento, donde la tripsina accederá fácilmente y cortará la proteína si tiene regiones desplegadas. Para ello se incubó el extracto de células HeLa transfectadas con TrkA y los mutantes con concentraciones crecientes de tripsina (0, 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 4°C durante 10 min. Posteriormente se añadió tampón de carga 2X SDS-PAGE para detener la reacción y analizar las muestras por western blot. Los resultados nos mostraron que todos los mutantes sufrían una digestión diferente a TrkA-wt, revelando así su accesibilidad a la digestión de tripsina por su mal plegamiento. (Figura R3-7A)

Esta retención en el RE por un plegamiento incorrecto de las proteínas mutadas podría generar agregados tóxicos con un impacto negativo sobre las células. Para saber si este mal plegamiento promovía la formación de agregados insolubles de los mutantes de CIPA analizamos el sobrenadante y pellet del extracto sin tratar de los lisados anteriores por wester blot, empleando el mismo volumen de tampón de carga SDS-PAGE con 1.25% de β -mercaptoetanol. Los resultados mostraron que a diferencia de TrkA- Δ 736 y TrkA-C300stop, el mutante TrkA-L213P se encuentra en el pellet, evidenciando su capacidad de formar agregados insolubles (Figura R3-7B,C) y sugiriendo que esta mutación provoca un cambio estructural significativo en el receptor fomentando su agregación.

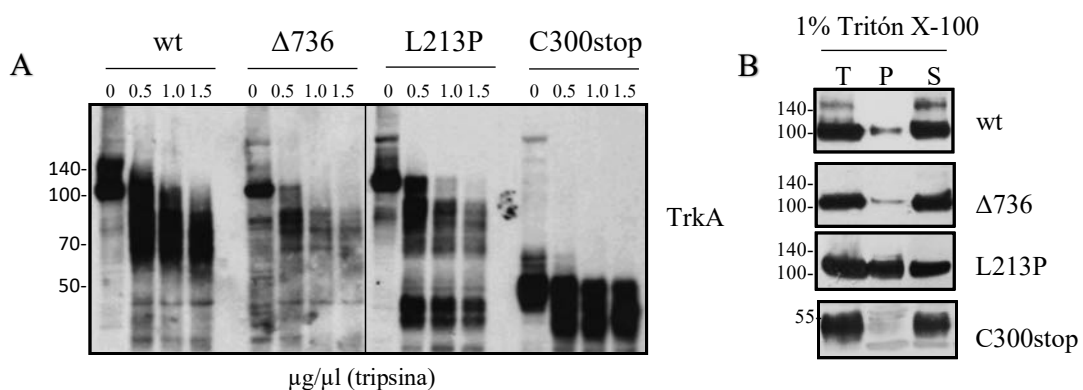


Figura R3-7. Las mutaciones de TrkA alteran el plegamiento del receptor y fomentan su agregación. **A**, Digestión con tripsina de células HeLa transfectadas e incubadas a diferentes concentraciones durante 10 min. Se observa en los mutantes de TrkA patrones de digestión diferentes a TrkA-wt. **B**, western blot para determinar la solubilidad de las proteínas en 1% de Tritón X-100. Las células transfectadas se lisaron y se analizó el total (T), pellet (P) y sobrenadante (S). Se observó la formación de agregados insolubles en TrkA-L213P. **C**, Cuantificación del panel B, se representa el ratio pellet/pellet total. Análisis estadístico, one-way ANOVA (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

4. LOS MUTANTES DE TrkA TIENEN UNA VIDA MEDIA VARIABLE

La retención y acumulación excesiva de proteínas mal plegadas en el RE activa diversos mecanismos en un proceso denominado (UPR) (*unfolded protein response*) llevando a la síntesis de más chaperonas y a la activación de la maquinaria de degradación. Por ello, decidimos estudiar la vida media de los mutantes y sus rutas de degradación.

4.1. TrkA-L213P tiene una cinética de degradación muy lenta

Se emplearon células HeLa transfectadas con las construcciones y se incubaron con cicloheximida (5 μ g/ml) para inhibir la síntesis proteica y analizar la proteína remanente a lo largo de 0, 1, 4 y 9 h, analizando los extractos por western blot. Observamos que el mutante TrkA-C300stop se degrada rápidamente comparado con TrkA-wt evidenciando su inestabilidad (Figura R3-8), mientras que el mutante TrkA-L213P tiene una cinética de degradación muy lenta, observando niveles altos de proteína a las 9h. Esta característica podría explicarse por la tendencia de la proteína a agregar. Finalmente, TrkA- Δ 736 mostró una velocidad de degradación similar a TrkA-wt (Figura R3-8).

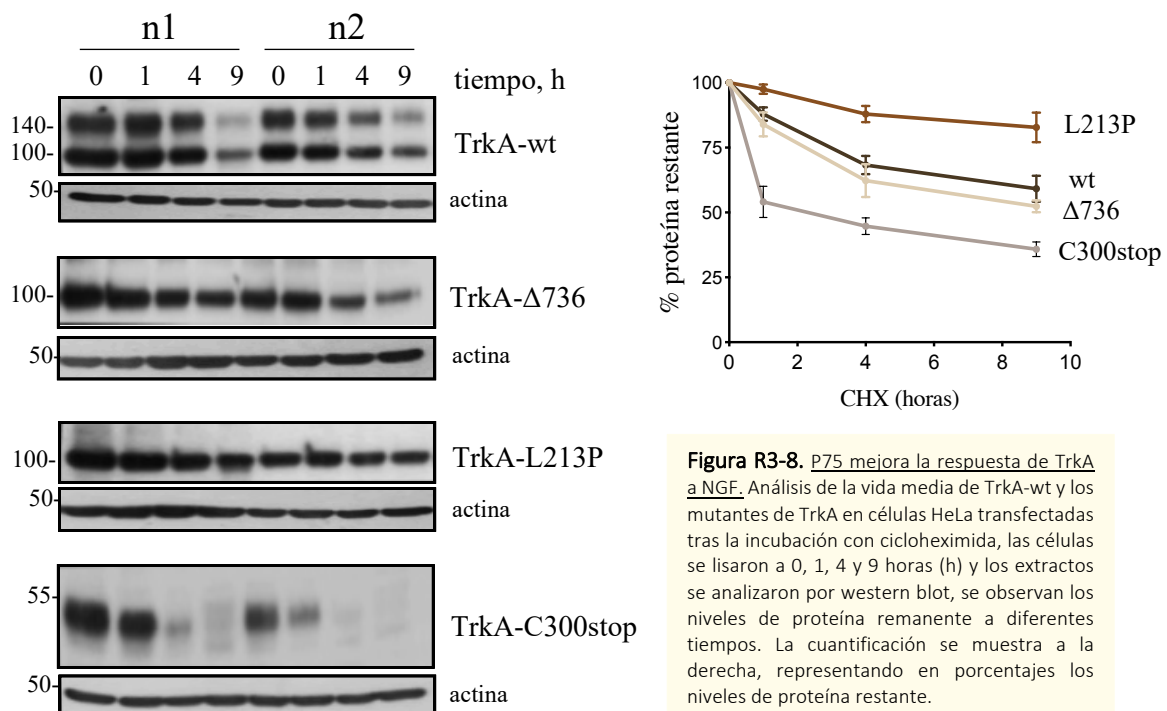


Figura R3-8. P75 mejora la respuesta de TrkA a NGF. Análisis de la vida media de TrkA-wt y los mutantes de TrkA en células HeLa transfectadas tras la incubación con cicloheximida, las células se lisaron a 0, 1, 4 y 9 horas (h) y los extractos se analizaron por western blot, se observan los niveles de proteína remanente a diferentes tiempos. La cuantificación se muestra a la derecha, representando en porcentajes los niveles de proteína restante.

4.2. Los mutantes de CIPA usan la autofagia como principal ruta de degradación

Para estudiar las rutas de degradación de los mutantes de TrkA empleamos epoxomicina como inhibidor del proteosoma, wortmanina como inhibidor de la autofagia, compuesto E que inhibe la γ -secretasa y rapamicina como inductor de la autofagia (Figura R3-9). Las células que expresaban las construcciones se incubaron con cicloheximida y los inhibidores respectivos durante 9h, tiempo tras el cual las células se lisaron y los extractos

se analizaron por western blot. Se cuantificó la proteína remanente tras el uso de los inhibidores. Todas las construcciones recuperaron los niveles iniciales de proteína tras la inhibición de la autofagia, indicándonos que esta es su principal ruta de degradación (Figura R3-9). Por otro lado, únicamente TrkA-L213P mostró una ligera recuperación frente a epoxomicina sugiriéndonos que una pequeña parte de los receptores sintetizados son degradados por el proteosoma. Este proceso podría estar ligado a ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) como respuesta al mal plegamiento y agregación de la proteína (Merulla et al., 2013; Vembar & Brodsky, 2008).

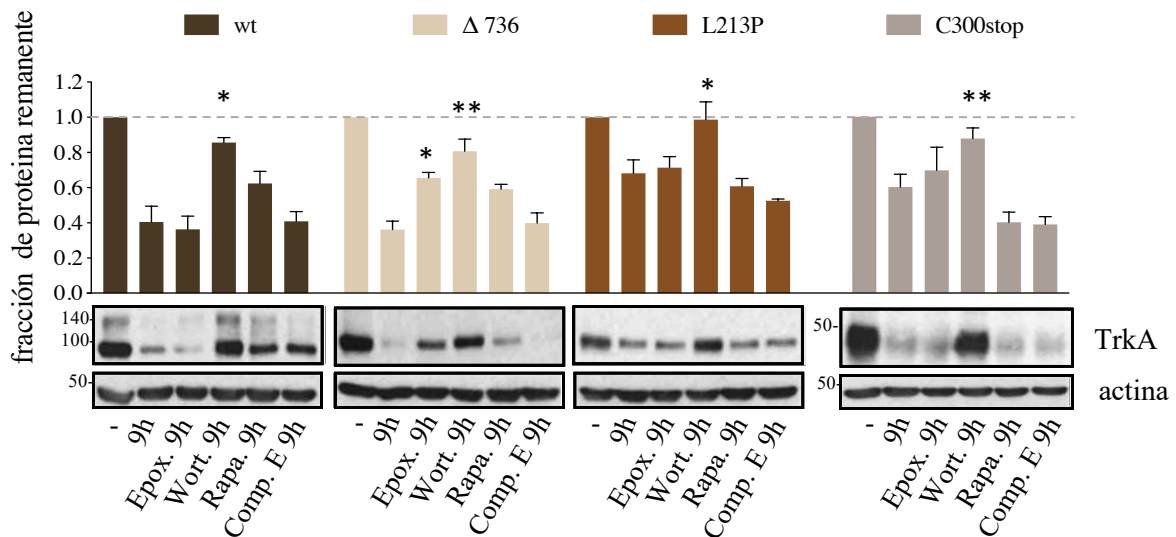


Figura R3-9. Los mutantes de CIPA usan la autofagia como principal ruta de degradación. Western blot del extracto de células HeLa transfectadas con TrkA-wt y los mutantes identificados en CIPA, se muestran los niveles de TrkA total remanente tras 9h de incubación con cicloheximida y los diferentes inhibidores de rutas de degradación: epoxomicina (Epox) wortmanina (Wort) rapamicina (Rapa) y compuesto E. (comp E). Los niveles de proteína se cuantificaron y se muestran sobre cada grupo. Se observa como la Wortmanina recupera niveles iniciales de proteína. Análisis estadístico, *t test*. Datos comparados con TrkA-wt. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

5. LA EXPRESIÓN DE TrkA-L213P INCREMENTA LA FORMACIÓN DE VESÍCULAS AUTOFÁGICAS

Tras identificar la autofagia como principal ruta de degradación decidimos estudiar la formación de vesículas autofágicas en células HeLa cotransfectadas con los mutantes y con LC3-GFP, una fusión que nos permitiría identificar los autofagosomas al ser LC3 una proteína que se recluta en ellas. Las células se fijaron y se analizaron en el microscopio de fluorescencia donde se observaron y cuantificaron las vesículas autofágicas en color verde. Los resultados mostraron que únicamente el mutante TrkA-L213P tuvo un número significativamente alto de vesículas autofágicas respecto a TrkA-wt (Figura R3-10). Curiosamente no solo eran mayor en número, algunas eran de mayor tamaño. Para saber si este acúmulo de autofagosomas se producía por un incremento en la síntesis o un bloqueo de la fusión con lisosomas, coexpresamos TrkA-L213P y LC3-GFP e incubamos las células durante 6h a 37° C con wortmanina, un inhibidor de las formación de autofagosomas y bafilomicina, un inhibidor de la fusión entre autofagosoma y lisosoma. Tras la cuantificación se determinó que wortmanina reducía de forma significativa el

número de autofagosomas, mientras que bafilomicina fomentaba su acumulación (Figura R3-11). Eso evidencia que la degradación de los autofagosomas se lleva a cabo correctamente tras fusionarse con los lisosomas pero existe un aumento significativo en la formación de autofagosomas que resulta en un acúmulo de vesículas en el interior de las células alterando el equilibrio entre la síntesis y degradación.

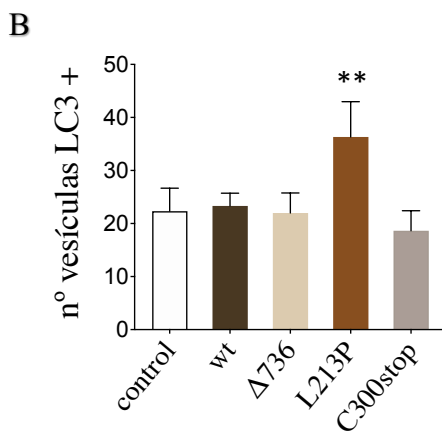
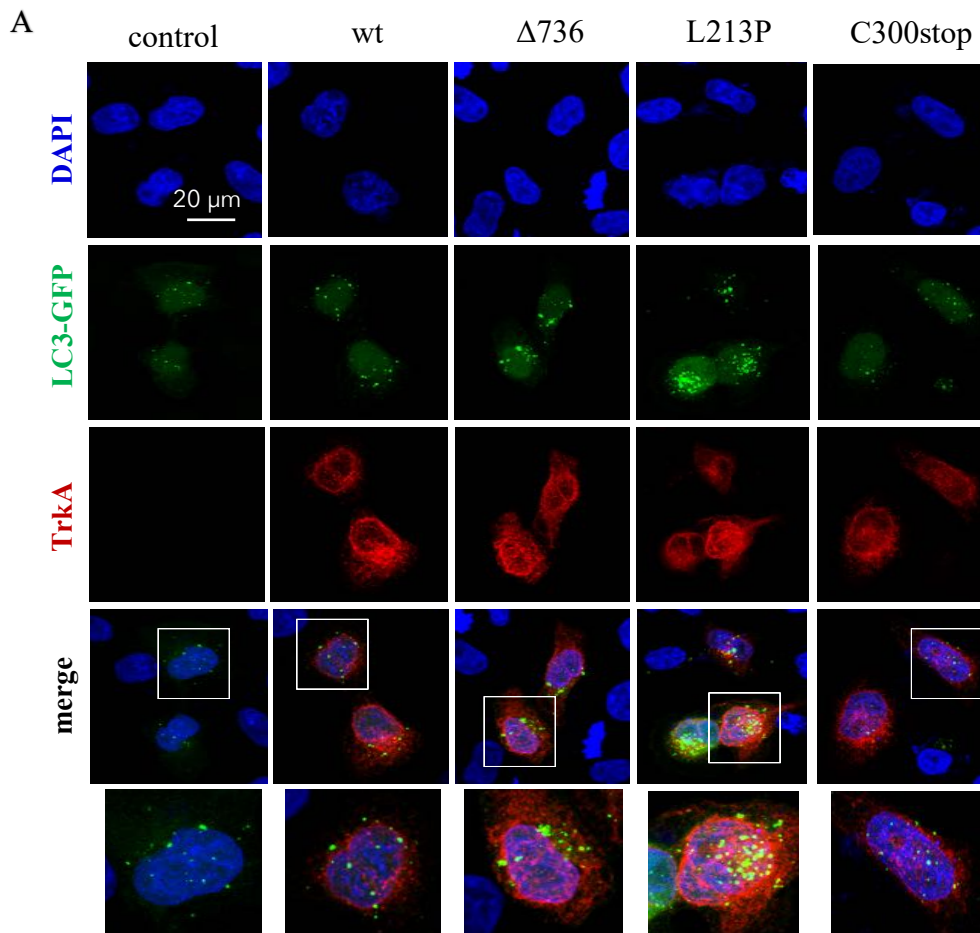
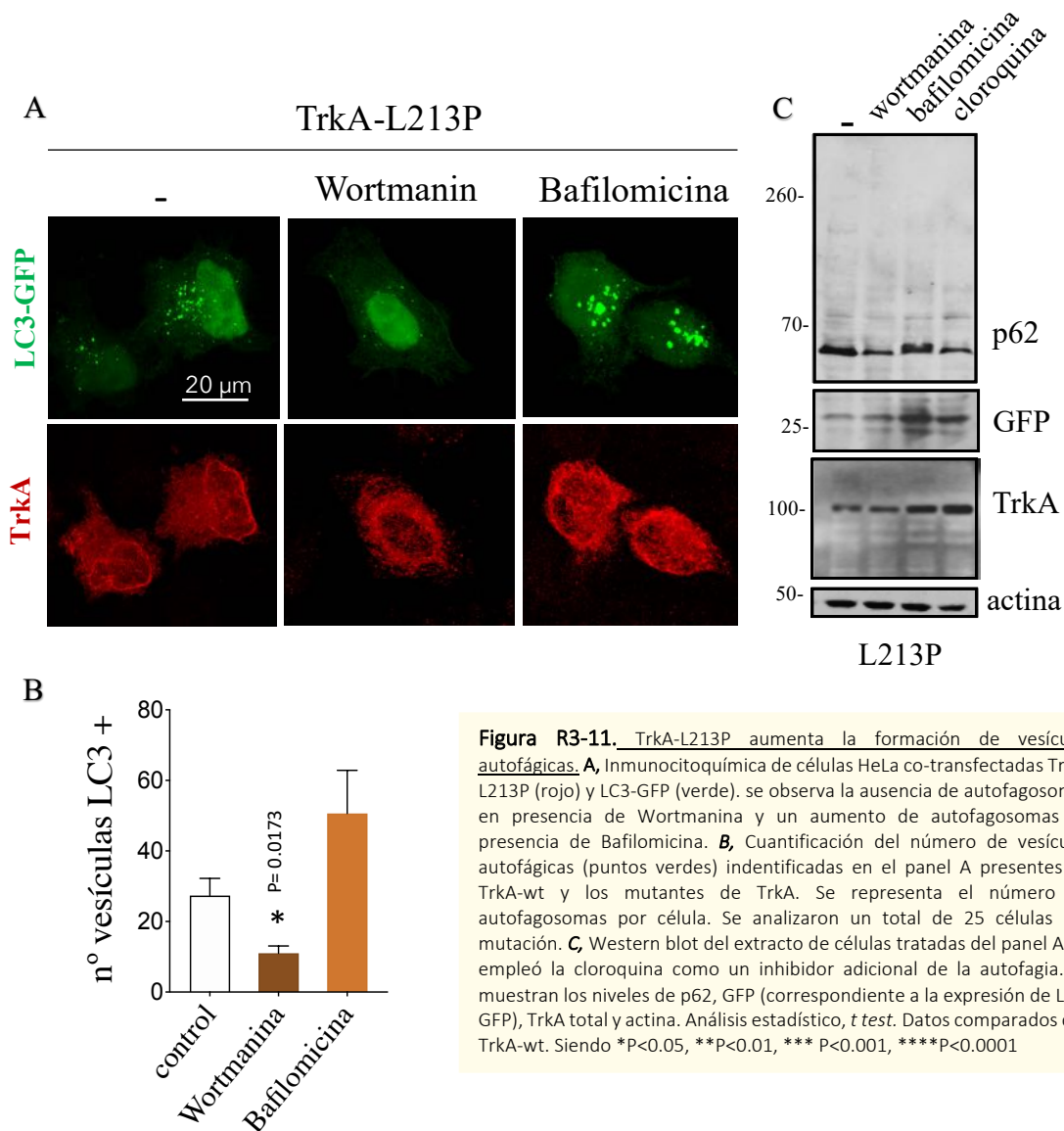


Figura R3-10. TrkA-L213P aumenta la formación de vesículas autofágicas. **A**, Inmunocitoquímica de células HeLa co-transfectadas con los mutantes de TrkA (rojo) y LC3-GFP (verde), utilizado como un marcador de autofagia. Se empleó DAPI (azul) como marcador nuclear. **B**, Cuantificación del número de vesículas autofágicas (puntos verdes) presentes en TrkA-wt y los mutantes de TrkA. Se representa el número de autofagosomas por célula. TrkA-L213P contiene un número significativamente mayor de autofagosomas por célula. Se analizaron un total de 25 células por mutación. Análisis estadístico, *one-way ANOVA* (media \pm SEM, n=3) aplicando *Dunnnett's multicomparison test* con TrkA-wt como control. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$



6. TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P CAUSAN TOXICIDAD CELULAR EN PC12nr5

El siguiente paso fue determinar el impacto que tenían la expresión de estas construcciones sobre la viabilidad celular, para lo cual se cuantificó la muerte celular en PC12nr5 transfectadas con los mutantes y paralelamente se incubaron células en presencia de 2 μ g/ml de Tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación, afectando directamente la función del RE y aumentando el estrés celular. La muerte celular se analizó por citometría de flujo incubando las células con anexina V-FITC durante 20 min en oscuridad y añadiendo yoduro de propidio min antes de la cuantificación para identificar las células apoptóticas y necróticas respectivamente. Los resultados mostraron que los mutantes TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P aumentan de forma significativa la muerte celular, la cual se ve exacerbada en presencia de Tunicamicina (Figura R3-12A). Se cuantificaron también el número de vesículas autofágicas donde TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P nuevamente mostraron valores elevados respecto a TrkA-wt, y se analizaron los niveles de p-p38 del extracto de células tratadas con Tunicamicina, donde nuevamente

TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P mostraron niveles mas altos que TrkA-wt (Figura R3-12D). Todo ello en su conjunto revela la correlación existente entre el incremento de vesículas autofágicas y la muerte celular, así como la vulnerabilidad a la muerte de las células que expresan TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P a diferencia de TrkA-C300stop cuyo comportamiento fue muy similar a TrkA-wt.

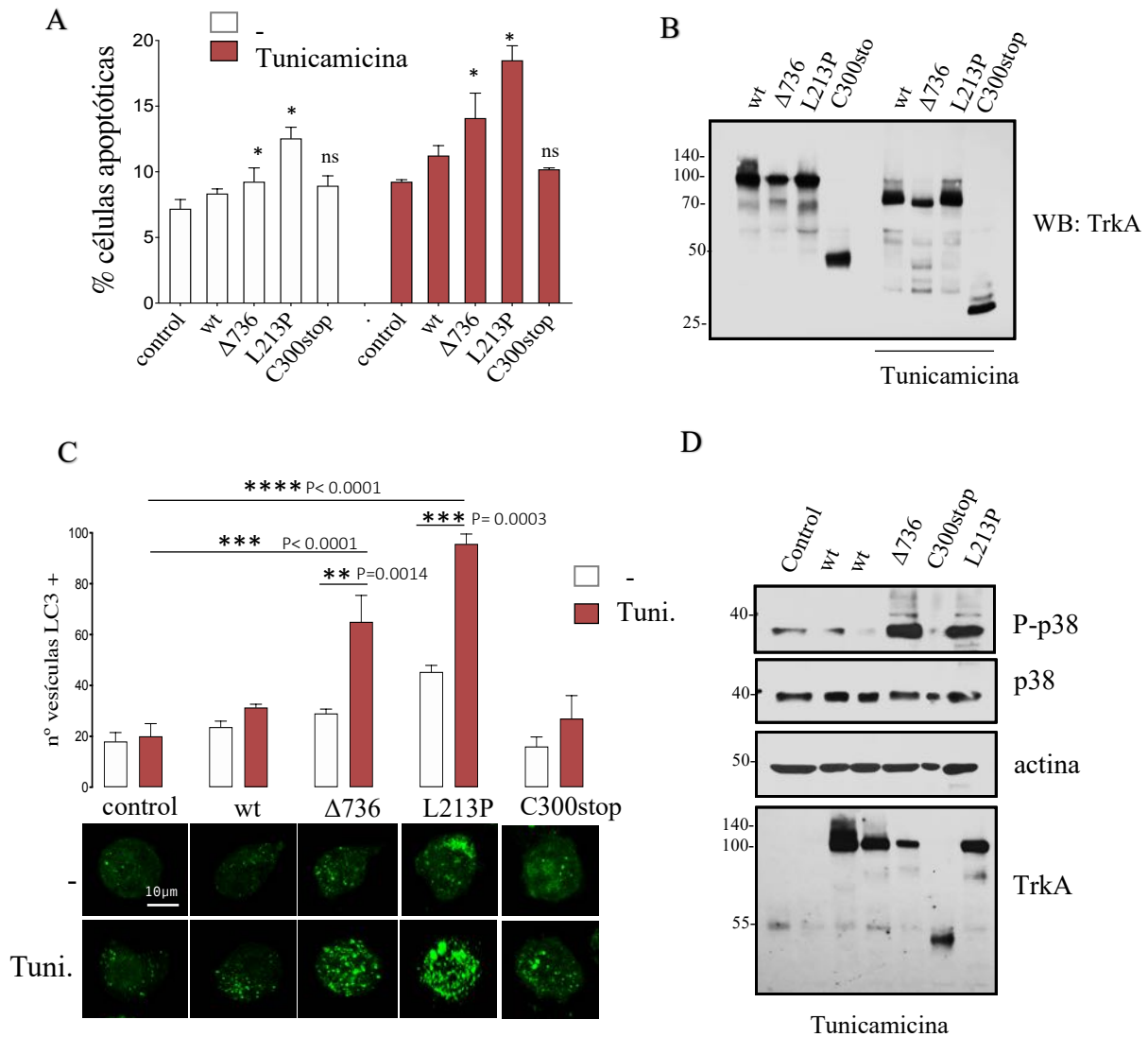


Figura R3-12. TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P causan toxicidad celular en pc12nr5 **A**, ensayo de muerte celular de PC12nr5 transfectadas con TrkA-wt y los mutantes de TrkA identificados en CIPA en ausencia y presencia de Tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación de proteínas. Las células se analizaron por citometría de flujo mediante anexinaV/ioduro de propidio. Se representa el porcentaje de células apoptóticas. Análisis estadístico, *t test*. Datos comparados con TrkA-wt. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ *, ns, no significativo. **B**, Western blot mostrando el efecto sobre la migración de vesículas autofágicas (puntos verdes) presentes en TrkA-wt y los mutantes de TrkA tras el tratamiento con Tunicamicina. **C**, Cuantificación del número de vesículas autofágicas (puntos verdes) presentes en TrkA-wt y los mutantes de TrkA tras el tratamiento con Tunicamicina. Se representa el número de autofagosomas por célula. Se analizaron un total de 10 células por mutación. **D**, Western blot de células HeLa transfectadas mostrando los niveles de P-p38, p38, actina y TrkA total. Se observan niveles elevados de p-p38 en TrkA- Δ 736 y TrkAL213P respecto a TrkA-wt. Análisis estadístico, *two-way ANOVA* (media \pm SEM, $n=3$) aplicando *Tukey's multicomparison test*. Siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

7. LA EXPRESIÓN DE LOS MUTANTES DE TrkA PROMUEVE LA DISTROFIA DE NEURONAS CORTICALES

Tras saber que las mutaciones de TrkA en la enfermedad de CIPA son capaces de alterar el flujo autofágico natural de una célula, decidimos estudiar el impacto que tendría esta característica en las neuronas corticales, sabiendo que el mecanismo de la autofagia es la principal vía reguladora de las neuronas para mantener la homeostasis celular.

7.1. La expresión de TrkA-L213P produce la distrofia de neuritas

Procedimos a aislar neuronas corticales de embriones de ratón. Una vez establecido el cultivo primario, las neuronas se cotransfectaron con las mutaciones de CIPA y GFP, y tras 48h, se fijaron y se analizaron en el microscopio confocal. Observamos que la expresión del receptor TrkA-L213P provoca una fragmentación de las dendritas como indicio de un proceso neurodegenerativo (Figura R3-13). En TrkA- Δ 736 también se observó fragmentación, aunque en menor grado. Sin embargo, el mutante TrkA-C300* no manifestó esta característica, mostrando una apariencia similar a TrkA-wt.

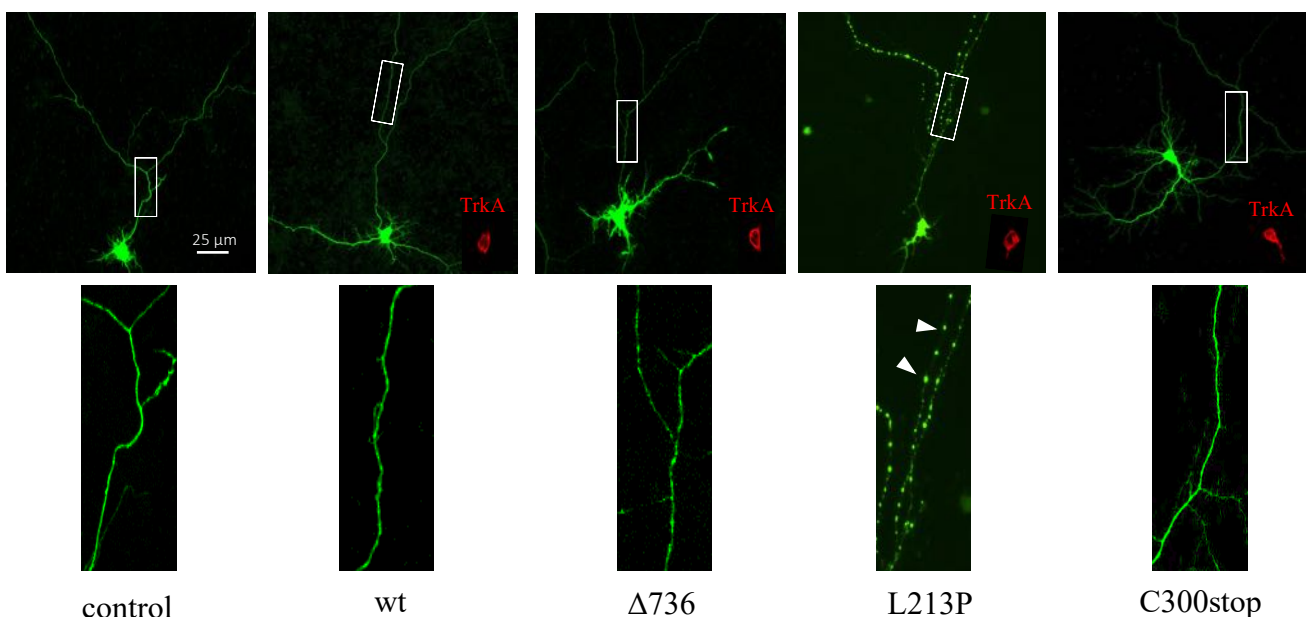
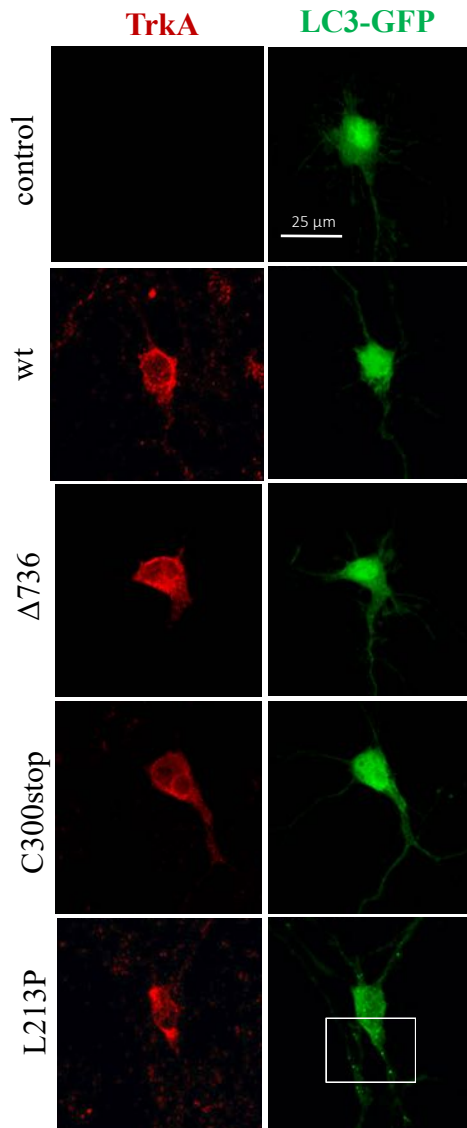


Figura R3-13. La expresión de TrkA-L213P promueve la distrofia de neuronas corticales. Imágenes obtenidas del microscopio confocal del cultivo primario de neuronas corticales co-transfectadas con TrkA-wt, los mutantes de TrkA (rojo) y GFP (verde). Se muestra un imagen representativa de cada transfección y una ampliificación de las regiones señaladas (recuadro blanco). El engrosamiento de las neuritas (flecha blanca) indica el inicio de un proceso degenerativo. TrkA-L213P muestra gran cantidad de neuritas distróficas y TrkA- Δ 736 presenta pequeñas regiones engrosadas. El cultivo primario se obtuvo de extracto de corteza de embriones de ratón E16-17.



7.2. TrkA-L213P promueve la formación de autofagosomas en dendritas y soma de neuronas corticales

Para identificar la formación de autofagosomas dentro de las neuronas corticales, se transflectaron las células con las mutaciones de TrkA y LC3-GFP. Tras 48h las células se fijaron y se observaron al microscopio confocal donde identificamos las vesículas autofágicas de color verde tanto en el soma como dendritas de las neuronas que expresaban TrkA-L213P, manifestando un flujo autofágico alterado que podría llevar a la neurona a degenerar, reforzando así los resultados obtenidos anteriormente.

Figura R3-14. TrkA-L213P promueve la formación de autofagosomas en dendritas y soma de neuronas corticales
 Inmunocitoquímica de neuronas corticales co-transfectadas con TrkA-L213P (rojo) y LC3-GFP (verde). se muestra de forma ampliada la región del soma y parte de las neuritas. Se observa la presencia de vesículas autofágicas (flechas blancas) en el soma y neuritas de neuronas que expresan TrkA-L213P. El cultivo primario se obtuvo de extracto de corteza de embriones de ratón E16-17.

D

Discusión

MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR TRKA

TrkA presenta una interfaz de dimerización a través del dominio TM

A día de hoy se conocen los mecanismos de señalización del receptor TrkA y se han estudiado ampliamente los efectos de su actividad a nivel celular. Sin embargo, aún existe mucha incertidumbre sobre qué ocurre con el receptor a nivel molecular para conseguir activarse. Aunque de forma general. Se cree que los RTK se activan por una dimerización inducida por la unión del ligando (Maruyama, 2014). Actualmente, varios estudios apoyan un punto de vista diferente, como se ha demostrado con el receptor EGFR. EGFR se encuentra formando dímeros inactivos sobre la superficie celular en ausencia de ligando (Clayton et al., 2005; Moriki et al., 2001). La formación de dímeros inactivos posibilita de activación del receptor por un mecanismo de rotación. (Biarc et al., 2011; Maruyama, 2014). Se requieren más investigaciones para determinar si este modelo podría aplicarse a otros RTK. En este capítulo hemos podido revelar el importante papel que tienen el dominio TM y eJTM en la formación de dímeros de TrkA en estadios activos e inactivos del receptor. Mediante ensayos de mutagénesis y entrecruzamiento de residuos de cisteína con I₂ molecular identificamos la interfaz activa del TM de TrkA, resaltando los residuos V418 y A428. La integridad de ambos residuos es esencial para la activación del receptor por NGF. Curiosamente, la expresión del mutante TM V418C en células PC12nr5 fue el único que promovió una diferenciación celular significativa en ausencia de ligando. Sin embargo, por ensayos de western blot identificamos la participación de más de un residuo TM en la formación de dímeros en ausencia de NGF (Figura R1-10). Consideramos que en los ensayos de diferenciación, una vez transfectadas las células, los residuos de cisteína más embebidos en la membrana tienen dificultad de formar el enlace covalente. Mientras que el tratamiento de membranas purificadas con I₂ molecular favorece la formación del enlace covalente. Por otro lado, el reemplazo de residuos pequeños de Ala, Gly y Ser por isoleucinas en el TM nos permitió identificar el residuo A428. El residuo A428 podría actuar como un eje en un mecanismo de rotación-activación. La activación del receptor se ve seriamente afectada al introducir el residuo de Isoleucina en A428 (Figura R1-13). De existir un mecanismo de rotación-activación, tendría lugar la transición de una interfaz dimérica inactiva a una activa. Estos resultados reforzarían el planteamiento hecho por otros autores, quienes sugieren la necesidad de un reordenamiento o cambios en dominios superiores de Trk para orientar correctamente el dominio tirosina quinasa para su fosforilación. (Bocharov et al., 2010; Fleishman et al., 2002). Por otro lado, mediante el uso del entrecruzador de cisteínas MTS-2-MTS en ausencia de NGF pudimos identificar una visible interfaz de dimerización inactiva que sigue el motivo S₄₁₉XXXS₄₂₃ ubicado en la cara opuesta de los residuos TM identificados como la interfaz activa (Figura R1-12A). Curiosamente, los residuos S419 y G423 no se identificaron en el ensayo previo de I₂ que realizamos anteriormente. Presumimos que la distancia entre los residuos de cisteína podría haber desfavorecido la formación de un enlace covalente directo. Sin embargo, en presencia de

NGF observamos la formación de nuevos dímeros, entre ellos el V418 (Figura R1-12), Estos resultados sugieren la existencia de un equilibrio monómero-dímero. Postulamos la existencia de dímeros preformados que se estabilizan tras la unión a NGF y establecen una nueva interfaz de dimerización por el TM. Estudios previos de marcaje y difusión de receptores TrkA ya han descrito poblaciones de monómeros (~ 70%) y dímeros u oligómeros (~ 20%) sobre la superficie celular en ausencia de NGF (Marchetti et al., 2013). Además, se han establecido modelos de transición de activación en RTK, mediante ensayos de FRET donde se apoya el modelo de un receptor Trk propenso a formar dímeros inactivos, que se estabilizarían tras la unión del ligando (Ahmed & Hristova, 2018). Nuestros resultados no excluyen la teoría de la dimerización inducida por ligando que se ha establecido para la familia Trk (Jing et al., 1992).

Activación del receptor TrkA por un mecanismo de rotación

El conjunto de resultados obtenidos nos invitó a pensar que los homodímeros inactivos de TrkA podrían activarse por un mecanismo de rotación que les permitiera pasar de una interfaz a otra. Estudios previos han demostrado que la rotación de la interfaz del dímero TM puede conducir a oscilaciones en la actividad quinasa, sugiriendo que el dominio tirosina quinasa es capaz de detectar la estructura de un dímero TM (Bell et al., 2000). Bajo esta premisa, procuramos inducir una rotación en el TM mediante la inserción de residuos de leucina y analizamos la actividad del receptor en ausencia de ligando. Nuestros resultados mostraron que la inserción de un único residuo de leucina en el TM de TrkA activó el receptor en ausencia de ligando (Figura R1-15), sugiriéndonos que una rotación de ~100° fue suficiente para conseguir la transfosforilación del dominio quinasa. Curiosamente, la inserción de dos, tres y cuatro leucinas más, no tuvo un impacto similar sobre la activación del receptor. A pesar que las inserciones de leucina se hicieron antes del residuo V418, a fin de no afectar la interfaz activa del TM identificada en nuestros ensayos, no descartamos que estemos frente a un efecto de activación producto de alterar dicha interfaz. Estudios previos han demostrado que mutaciones en los dominios RTK TM no solo pueden estabilizar los dímeros RTK de longitud completa en la membrana plasmática (He & Hristova, 2008) también pueden cambiar el segmento TM incluido en la membrana (Han et al., 2006), así como afectar la regulación hacia abajo, (Bonaventure et al., 2007; Monsonigo-Ornan et al., 2002). A pesar que la inserción de leucinas pueda comprometer la señalización del receptor, no descartamos que TrkA pueda seguir el modelo de rotación-activación que se planteó para algunos RTK (Maruyama, 2015).

Por otro lado, comprendemos que en los ensayos de transfección celular podríamos estar enfrentándonos a niveles de sobreexpresión celular y por ende promover la activación del receptor en ausencia de ligando (Maruyama, 2014). De hecho, ensayos de sobreexpresión del receptor TrkA nos mostraron que esta condición fomenta la transfosforilación del dominio quinasa independientemente del ligando. Curiosamente, en el mismo contexto de sobreexpresión, la presencia de NGF incrementó aún más la activación del receptor (figura R1-14). Esto sugiere la existencia de reordenamientos estructurales o cambios ligados a la unión de NGF que se propagan a lo largo del receptor propiciando su máxima

activación, como ya se planteó en otros RTK (Bocharov et al., 2013; Fleishman et al., 2002). Esto evidencia que la dimerización del receptor es necesaria, pero no suficiente para la activación.

La región eJTM participa en el acoplamiento de NGF y activación de TrkA

Los datos revelados anteriormente nos hicieron prestar atención a la región eJTM por encontrarse a continuación del dominio Ig2 (dominio de unión a NGF), pudiendo ser una de las primeras regiones en verse afectadas estructuralmente por la unión del ligando. A pesar que la resolución de la estructura cristalina del receptor unido al ligando no nos proporciona información referente a esta zona, nuestros datos revelan que se trata de una región intrínsecamente desordenada (Figura R1-1). De hecho, estudios anteriores sugieren que existe una conexión endeble e intrincada entre los dominios EC y TM de RTK (Macdonald-Obermann & Pike, 2009) donde la delección de esta región anula la actividad del receptor por su incapacidad de unir NGF (Figura R1-3B). Así mismo, revelamos la importancia de la integridad de las prolinas distribuidas a lo largo de la región eJTM, donde el mutante TrkA-5P/5G saca a la luz la importancia del grado de flexibilidad que necesita tener esta región para fomentar el correcto acoplamiento de NGF. Aunque los ensayos de citometría mostraron una reducción en la afinidad de TrkA-5P/5G por NGF, no se han estudiado las tasas de asociación y disociación. (Figura R1-4). Un análisis más detallado nos reveló que las prolinas P397 y P407 podrían estar involucradas directamente en la reorganización de los dominios siguientes por encontrarse más cerca al dominio transmembrana. Nuestros resultados no excluyen la existencia de otros residuos cercanos que puedan contribuir en el acoplamiento, ya que en presencia de NGF las células transfectadas PC12nnr5 muestran una escasa pero evidente diferenciación (Figura R1-3B). Mediante el diseño de mutantes de cisteína en posiciones específicas de esta región eJTM se forzó la formación de dímeros de TrkA y consiguió activar el receptor en ausencia de NGF. Nuestros resultados revelaron que los residuos D406, K410 y K411 están involucrados en la formación de dímeros activos, característica que se reflejó en la significativa diferenciación de las células PC12nnr5 transfectadas y en el aumento de los niveles de P-Y490 (Figura R1-8D). El empleo del entrecruzador de lisinas BS3 nos permitió corroborar la participación directa de los residuos K410 y K411 en la formación homodímeros de TrkA en presencia de NGF. Curiosamente, con BS3 el mutante TrkA-5P/5G mostró escasos niveles de dímeros con NGF (Figura R1-6C), provocado posiblemente por una mala orientación de las lisinas debido a la flexibilidad otorgada por las glicinas. En contraposición de la visión alternativa donde los cambios estructurales inducidos por ligandos no se pueden propagar a lo largo de las RTK porque los residuos que enlazan los diferentes dominios no están estructurados (Bocharov et al., 2017), nuestros resultados evidencian que la región eJTM sí necesita adoptar una conformación especial para constituir dímeros activos tras el acoplamiento de NGF, lo que fomentará la aproximación y reorganización de las regiones eJTM.

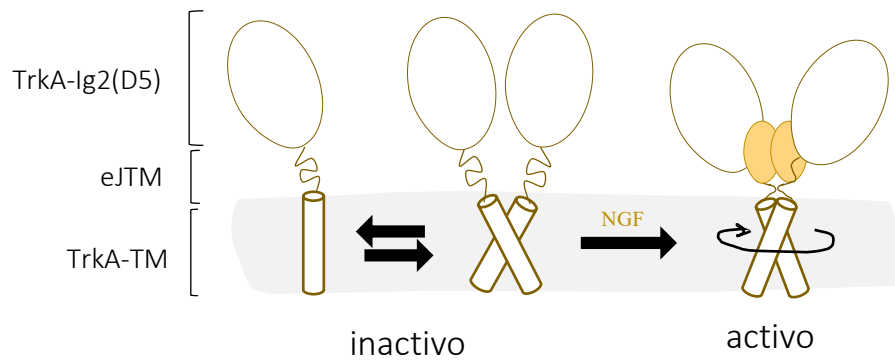


Figura D1. Esquema representativo de la activación del receptor TrkA tras la unión de NGF

TrkA podría formar tetrámeros tras la unión de NGF

Aunque nuestros datos son compatibles tanto con la existencia de dímeros preformados inactivos, como con la dimerización inducida por ligando. Nuestros estudios revelan que el receptor también podría constituir tetrámeros tras la unión de NGF. De hecho, presumimos que la conformación de dímeros inactivos podría ser el paso previo a la constitución de estos tetrámeros y estructuras más complejas. Nos centramos en dilucidar la base estructural de la formación de tetrámeros u oligómeros y su efecto sobre la señalización del receptor. Identificamos el dominio Ig2 como la posible zona de interacción entre homodímeros, involucrando los residuos Q369 y S371 (Figura R1-16). Investigaciones previas ya han involucrado residuos del dominio extracelular como responsables de estabilizar multímeros en RTK. Curiosamente, estos residuos identificados en TrkA-Ig2 se encuentran en la zona opuesta a la región de interacción del ligando. Esta observación nos invita a pensar que, simplemente, se trata de dímeros preformados Ig2 inactivos con la capacidad de rotar para unir NGF y constituir dímeros activos. Sin embargo, algunos autores proponen que NGF no solo estabiliza el dímero, también fomenta la formación de oligómeros de TrkA (Ahmed & Hristova, 2018; Marchetti et al., 2013). De ser así, NGF podría fomentar la oligomerización de TrkA de dos formas: i) al constituir dímeros activos (a partir de monómeros) que puedan interactuar entre sí mediante su respectivo dominio Ig2; ii) que el acoplamiento de NGF aproxime dímeros preformados Ig2 inactivos, constituyendo tetrámeros sin alterar la interacción Ig2. Nuestros resultados revelaron que la formación de dímeros inactivos mediados por la región Ig2 utilizando el mutante Q369C y S371C fue capaz de fomentar una respuesta/señalización más intensa de TrkA tras la unión de NGF respecto a TrkA-wt. En células PC12nnr5, el mutante Q369C y S371C también promovió una diferenciación más rápida y se observaron prolongaciones de mayor longitud en comparación con TrkA-wt (Figura R1-18). De la misma forma, se emplearon mutantes de TrkA pertenecientes a la interfaz activa (V408C) e inactiva (D406C, K410C) de la región eJTM. Tras analizar el impacto que tuvo NGF sobre la actividad de estos dímeros preformados, observamos que el mutante V408C mostró una mayor y más rápida diferenciación, mientras que los mutantes D406C y K410C, que ya inducían la diferenciación en ausencia de ligando por encontrarse en la conformación activa no

promovieron un crecimiento mayor de las prolongaciones, alcanzando medidas similares a las de TrkA-wt (Figura R1-17). Nuestros datos revelan que la presencia de dímeros inactivos podrían facilitar la formación de tetrámeros con un impacto potenciador sobre la respuesta del receptor a NGF. Esta teoría podría respaldarse por el trabajo de otros autores, quienes concluyen que una respuesta rápida de RTK puede resultar de las fracciones de dímeros preformados presentes (Martin-Fernandez et al., 2002; Sako et al., 2000). Aunque observamos un impacto positivo sobre la actividad del receptor, debemos tener en cuenta que la oligomerización de los RTK también puede verse afectada por las disposiciones del citoesqueleto (Low-Nam et al., 2011) y las características de los lípidos de la membrana (Coskun et al., 2011), por lo cual resultaría interesante estudiar la formación de dímeros u oligómeros de TrkA teniendo en cuenta estas variables. A pesar de ello, consideramos que estos resultados en conjunto, proporcionan nuevos conocimientos sobre el posible modelo de activación de TrkA.

INTERACCIÓN ENTRE TrkA y p75

El dominio TM de TrkA y p75 participan en la formación del complejo de alta afinidad

Desde que se planteó la existencia de un heterocomplejo TrkA/p75, poco se sabe varias décadas después. Aunque existe mucha discrepancia sobre el tipo de asociación entre ambos receptores, es bien sabido que todos los eventos de unión al ligando y fosforilación de tirosinas iniciados por TrkA se ven afectados por la expresión de p75 (Barker & Shooter, 1994; Berg et al., 1991; Verdi et al., 1994), así como se ve afectada la especificidad de los receptores Trk por las neurotrofinas (Mischel et al., 2001). Además, numerosos trabajos involucran los dominios TM e IC de p75 como los responsables de este efecto sobre el receptor TrkA (Esposito et al., 2001; Matusica et al., 2013; Sykes et al., 2012). Nuestros resultados arrojan luz sobre los residuos del dominio TM que podrían estar involucrados en esta interacción y mostramos que la ausencia de la región TM e IC en p75 merma la capacidad que tiene p75 de sensibilizar TrkA a NGF (Figura R2-2). Estudios previos de RMN establecieron dos interfaces de homodimerización del TM de p75, el motivo $C^{257}xxxA^{261}xxxV^{265}$ que se da de forma espontánea a través del residuo C257 y el motivo $A^{262}xxxG^{266}xxA^{269}$ (p75-AGA) presente cuando se suprime el enlace covalente por C257 (Nadezhdin et al., 2016). Este conocimiento nos permitió diseñar mutaciones puntuales en ambos motivos de dimerización y determinar que el motivo de dimerización no covalente p75-AGA podría estar implicado en la formación del heterocomplejo TrkA/p75. La alteración de esta interfaz en p75 anula la capacidad de TrkA para responder a bajas concentraciones de NGF (Figura R2-4). El mutante p75-A262I tuvo el mismo impacto negativo que el triple mutante p75-AGA/III sobre la respuesta de TrkA a NGF, mientras que el mutante p75-A261I, el cual pertenece a la interfaz de dimerización covalente de p75, mantuvo la sensibilidad de TrkA a NGF. Aunque estos datos indican que existe una asociación mediada por el TM de ambos receptores, nos deja la incertidumbre sobre la estequiometría de esta interacción, ya que la participación de la interfaz p75-AGA en la formación del heterocomplejo hace posible la intervención tanto de un monómero de p75 como de un dímero covalente de p75-C257. Nuestros resultados también involucran directamente el TM del TrkA en su heterodimerización con p75. En el capítulo anterior identificamos algunos residuos que forman parte de la interfaz activa e inactiva del dominio TM del receptor TrkA. Esto nos permitió estudiar la dimerización de TrkA en presencia de p75. Mediante ensayos de crosslinking pudimos observar que la coexpresión de p75 redujo significativamente la formación de dímeros TrkA-V418C. El residuo V418 pertenece a la interfaz de dimerización activa del TM de TrkA, mientras que la coexpresión de p75 junto con TrkA-G423, residuo ubicado en la cara opuesta del residuo V418, parece no tener ningún efecto sobre la formación de dímeros de TrkA (Figura R2-5). Aunque los resultados nos invitan a concluir que el receptor p75 es capaz de interactuar a través de la interfaz activa del TM de TrkA, comprendemos que se requieren más estudios y el uso de técnicas diferentes

que nos permitan ampliar el panorama, así como identificar los residuos de las distintas interfaces de dimerización TM involucrados en la constitución del heterocomplejo. Al igual que ocurre con p75, estos resultados no nos permiten determinar con certeza si la participación de TrkA involucra homodímeros o monómeros de TrkA. Sin embargo, sí hemos observado que la presencia de p75 parece tener un efecto en la formación de dímeros covalentes de TrkA. Hipotetizamos que p75 podría fomentar la constitución o estabilización de dímeros preformados de TrkA en ausencia de ligando, y que esto podría explicar el peculiar efecto que tiene p75 sobre la respuesta de TrkA a NGF. Dentro de esta teoría también tendría cabida el mecanismo de rotación-activación de TrkA por NGF planteado anteriormente. Aunque estos resultados son preliminares, buscamos hacer menos pedregoso el camino que nos lleve a conocer la constitución del llamado complejo de unión de alta afinidad.

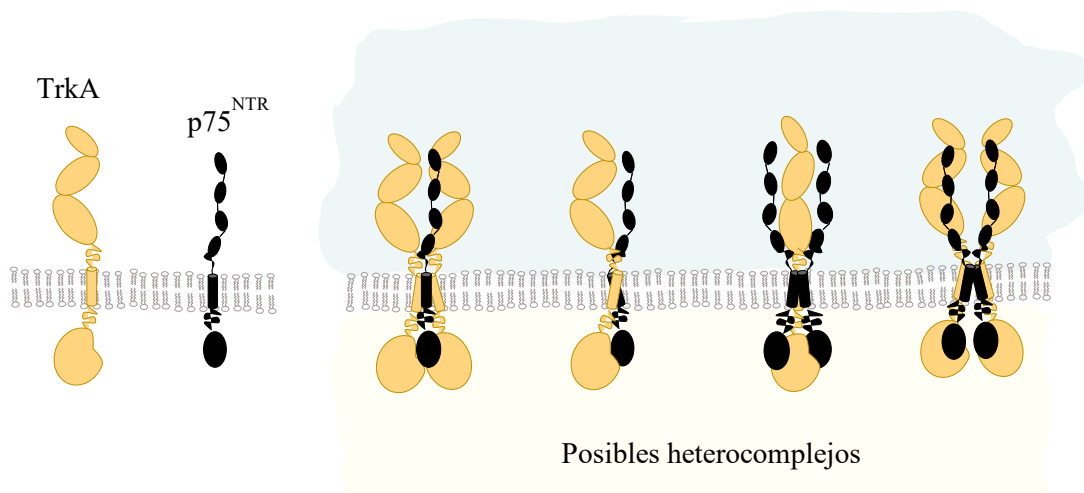


Figura D2. Esquema de los posibles heterocomplejos formados entre TrkA y p75

TrkA modula el procesamiento proteolítico de p75

Sin lugar a dudas, el fenómeno proteolítico conocido como RIP ha sido uno de los procesos asociados a p75 más estudiados, el cual afecta también a una gran variedad de receptores (Fortini, 2002). Aunque su basto estudio ha permitido asociar este proceso con algunas funciones de p75 (Kenchappa et al., 2010), los mecanismos moleculares que gobiernan RIP aún no se conocen a detalle. Sin embargo, se ha descrito que dentro de los receptores de la familia Trk que parecen modular el corte de p75, es TrkA quien tiene un impacto importante sobre el corte o la regulación de α -secretasa (Kanning et al., 2003). Así mismo, se ha descrito que p75-ICD podría ejercer un papel en la proliferación y supervivencia celular en células PC12 (Kommaddi et al., 2011), poniendo en evidencia el papel regulador que podría tener TrkA en el procesamiento de p75. Bajo esta premisa y la estrecha relación que parece existir entre ambos receptores, decidimos analizar bajo diferentes condiciones el efecto de TrkA sobre el procesamiento proteolítico de p75. Nuestros resultados revelaron que en un contexto endógeno, TrkA es capaz de modular el corte de p75 por α -secretasa en presencia de NGF. Observamos que las neuronas del

prosencefalo basal que coexpresan ambos receptores mostraron un incremento de p75CTF en presencia de NGF y CE (inhibidor de la γ -secretasa) a diferencia de los astrocitos que expresan únicamente p75, cuyos niveles de p75CTF no mostraron ninguna variación (Figura R2-7). De forma similar, la incubación de células PC12 y PC12nnr5 en presencia de NGF y CE promovió la acumulación de p75CTF únicamente en células PC12 con el tiempo, evidenciando que en ausencia de TrkA, los ligandos de p75 por si solos parecen no tener un impacto importante sobre el corte de receptor (Kanning et al., 2003). Estudios previos han revelado que en células que coexpresan tanto TrkA como p75, el receptor p75 es más susceptible al corte por α -secretasa en presencia de NGF (Ceni et al., 2010; Urra et al., 2007). Tras preguntarnos si la actividad de TrkA era la única responsable de la regulación proteolítica de p75, empleamos un mutante inactivo de TrkA (TrkA-K538A), el cual transfectamos junto a p75. Los resultados mostraron que efectivamente la ausencia de actividad en el receptor TrkA priva a p75 de ser cortado por α -secretasa en presencia de NGF, y refuerza los resultados observados anteriormente, donde, en células que expresaban únicamente p75 la presencia de NGF no tuvo ningún impacto sobre los niveles de p75CTF. Presumimos que el p75CTF que observamos en ausencia de NGF podría ser producto del corte basal que sufre p75 por la α -secretasa. Curiosamente, en ausencia de ligando estos niveles basales de p75CTF se reducen considerablemente en presencia de TrkA (Figura R2-8). La explicación podría encontrarse detrás de la asociación física que parece existir entre ambos receptores, donde la presencia de TrkA provoque que el sitio de corte de p75 sea menos accesible para la α -secretasa y quede expuesto al activarse TrkA por NGF. Tras analizar los niveles de p75CTF en mutantes del motivo de dimerización A²⁶²xxxG²⁶⁶xxA²⁶⁹ de p75, observamos que la presencia de TrkA y NGF no promovió el corte de p75 en estos mutantes (Figura R2-8). Es probable que con el uso de estas mutaciones provocáramos la desestabilización del heterocomplejo TrkA/p75, y por ende el corte de p75 no quedara a expensas de la actividad de TrkA. Al emplear mutantes delecionados de TrkA y cuantificar los niveles de p75CTF generados en presencia y ausencia de NGF (Figura R2-9), los resultados obtenidos nos aportaron dos datos relevantes; i) que la integridad de la región TM e IC de TrkA es esencial para su interacción con p75, donde la actividad basal de TrkA parece jugar un papel muy importante en la estabilización del heterocomplejo; ii) Tanto la actividad tirosina quinasa de TrkA, como el cambio conformacional producto del acoplamiento de NGF parece estar detrás del corte de p75 por α -secretasa. Presumimos que el cambio conformacional de TrkA expone a p75 al corte de α -secretasa y la posterior fosforilación de TrkA podría modular la actuación de la α -secretasa. De hecho, se ha sugerido que la fosforilación por MAPK puede regular la función proteolítica de las secretasas de membrana independiente de la unión del ligando a p75^{NTR} (Diaz-Rodriguez et al., 2002). Incluso la estrecha relación entre TrkA y ADAM17 ha planteado la posibilidad de que ADAM 17 sea una parte integral del complejo TrkA/ p75^{NTR}, similar a la asociación de ADAM10 con el complejo del receptor efrinas/Eph (Janes et al., 2005).

Llegados a este punto, decidimos analizar el impacto de TrkA sobre la generación de p75ICD, producto del segundo corte proteolítico que sufre p75 como consecuencia de la actividad de la γ -secretasa. Se cuantificaron los niveles de p75ICD producidos tras la

coexpresión de TrkA y TrkA-DN junto a p75 en ausencia de NGF. Nuestros resultados revelaron que TrkA reducía el ratio p75CTF/p75ICD, mientras que TrkA-DN no tuvo ningún impacto sobre los niveles de p75ICD (Figura R2-10), revelando que la actividad de TrkA también puede modular el corte de p75 por γ -secretasa. A fin de intentar ser más pulcros con nuestros resultados, decidimos transfectar las células directamente con el fragmento p75CTF, con el fin de quitarnos la variable de la actividad basal α -secretasa y obtener una expresión uniforme del receptor p75CTF. Tras analizar los niveles de p75ICD producidos en presencia de epoxomicina y CE, corroboramos que efectivamente TrkA generaba menos p75ICD (Figura R2-10). Una explicación plausible para este hecho es la asociación física que existiría entre ambos receptores a través del dominio TM, ya que estudios previos han descrito el motivo AxxxG entre las Val₂₆₄ y Val₂₆₅ de la región TM de p75 como el sitio de acción de γ -secretasa (Jung et al., 2003; Kanning et al., 2003), por lo tanto una interacción del receptor TrkA a través de la interfaz de dimerización AGA del TM de p75 bloquearía el sitio de corte, dificultando el reconocimiento por γ -secretasa.

TrkA reduce la muerte celular provocada por agregación de p75CTF

El rol que cumplen los fragmentos de p75 producto de RIP ha sido ampliamente discutido. La producción de p75CTF y p75ICD no deja de estar ligada a la actividad de las secretasas, que también regulan otras proteínas. Fallos en la actividad de las secretasas pueda desencadenar un desequilibrio protéico y una alteración en la escisión de sus sustratos como ocurre con la proteína precursora amiloide (APP) en la enfermedad de alzheimer. Sin duda, un enfoque terapéutico dirigido a modular la actividad de la γ -secretasa para reducir la generación de péptidos tóxicos puede afectar directamente el proceso de escisión que sufre p75. Así lo han revelado nuestros resultados, donde la inhibición de la γ -secretasa aumenta los niveles de p75CTF y ello promueve la formación de oligómeros de p75CTF que fomentan la toxicidad celular. Aislando ganglios raquídeos de ratones en estadio E16-E17 e incubándolos con CE, pudimos determinar que es factible la formación de dímeros de p75CTF con niveles endógenos de p75 (Figura R2-11A). Determinamos también que la inhibición de la γ -secretasa tiene un efecto pro-apoptótico sobre las neuronas corticales que expresan p75 (Figura R2-11A), al igual que lo hace la sobreexpresión de p75CTF. Esto se ve reforzado por estudios previos que sugieren que la señalización de muerte neuronal mediada por p75 ocurre después del procesamiento por α -secretasa y aumenta con la inhibición de la γ -secretasa (Underwood et al., 2008). Curiosamente, la expresión del mutante p75CTF-C257A dentro del mismo contexto neuronal redujo significativamente la muerte celular, revelando que el residuo Cys257, responsable de la formación de dímeros covalentes en p75 (Vilar et al., 2009), juega un rol potenciador en la agregación del receptor. Mediante ensayos de vida media e inhibición de las rutas de degradación, observamos diferencias en los porcentajes de proteína remanente entre p75CTF y p75CTF-C257A tras 9h de incubación con cicloheximida y CE, sugiriéndonos que los fragmentos de p75CTF son más estables y resistentes a la degradación (Figura R2-12B). Esto explica porque en los ensayos de internalización p75CTF permanece más tiempo en la superficie celular mientras que

p75CTF-C257A se internaliza rápidamente (Figura R2-12D). Presumimos que al ser p75CTF más resistente a la degradación y permanecer más tiempo en la membrana cuenta con estos dos factores que van a potenciar su agregación. Si a esto le sumamos la inhibición de γ -secretasa, tenemos el cóctel perfecto para promover la formación de dímeros y oligómeros de p75CTF en la superficie celular, los cuales pudimos identificar mediante ensayos de entrecruzamiento químico. (Figura R2-16).

Debido a la relación tan estrecha que existe entre el receptor p75 y TrkA y al amplio solapamiento de sus patrones de expresión (Rifkin et al., 2000), nos preguntamos si TrkA podría tener algún impacto sobre el efecto pro-apoptótico de la agregación de p75CTF. En ensayos iniciales observamos que la coexpresión de TrkA reducía de forma significativa la muerte celular en presencia y ausencia de CE. Curiosamente redujo ambos porcentajes hasta igualarlos (Figura R2-13A) revelando el efecto modulador que podría tener TrkA sobre la agregación de p75CTF o en el bloqueo de algunos mecanismos de muerte mediados por p75 (Underwood et al., 2008). Tras el uso de células PC12 y PC12nnr5 pudimos corroborar el efecto protector de TrkA frente a la muerte celular por agregación de p75CTF en un contexto endógeno, donde las células PC12nnr5, que carecen de TrkA, mostraron un incremento significativo de muerte celular y la activación de p38 en presencia de CE a diferencia de las células PC12 (Figura R2-14). Si realmente se trata de un efecto ligado a la expresión de TrkA, era de esperar que la transfección de células PC12nnr5 con el receptor TrkA anule la vulnerabilidad de las células a la muerte en presencia de CE (Figura R2-15). Nuestros datos de entrecruzamiento químico nos permiten atribuir esta característica de TrkA a la capacidad que tiene de reducir significativamente la formación de agregados de p75CTF sobre la superficie celular (Figura R2-17). Los datos de muerte en células HeLa revelaron que la muerte celular está ligada a los niveles de agregados de p75CTF presentes. Curiosamente la actividad de TrkA es capaz de potenciar este efecto inhibitor sobre la agregación de p75CTF (Figura R2-18). Este se vio reflejado en el bloqueo casi absoluto de la agregación de p75CTF tras el uso de mutantes de TrkA constitutivamente activos, así como el aumento de la agregación de p75CTF tras el uso de construcciones inactivantes de TrkA. Analizando estos datos, cabe la posibilidad de que también pueda existir una convergencia en las vías de señalización. Investigaciones previas han identificado las rutas de señalización que median la muerte celular estimuladas por p75 (Geetha et al., 2005; Yeiser et al., 2004), identificamos la activación de las rutas de JNK y p38 en presencia de CE. Curiosamente la presencia de TrkA inhibió la fosforilación de ambos sustratos (Figura R2-19B). Debido a que ya se ha asociado con anterioridad el incremento de la muerte celular con la unión de TRAF6 a dímeros covalentes de p75 (Vilar et al., 2009). Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación pudimos determinar que la unión de TRAF6 a p75CTF es específica de dímeros covalentes, ya que no observamos unión con el mutante p75CTF-C257A ni con monómeros de p75CTF (Figura R2-19C). Siguiendo en la misma línea, TrkA fue capaz de reducir la interacción p75CTF/TRAF6. Esto explica porque la expresión de TrkA provoca la inhibición de las rutas de señalización de muerte JNK y p38 en presencia de TrkA. TRAF6 no es la única proteína adaptadora capaz de mediar eventos de muerte, por ello diseñamos una construcción de p75CTF carente del dominio de muerte, pero

conservando las secuencias del yuxtamembrana que se han asociado a la unión a TRAF6 (Khursigara et al., 1999). Esta construcción al igual que p75CTF-wt fue capaz de agregar y promover la muerte celular (Figura R2-19E). Ensayos de internalización de p75CTF en presencia de TrkA nos permitieron comprender mejor el efecto inhibitorio que tiene TrkA sobre la formación de agregados, donde la internalización de p75CTF se produce únicamente en presencia de TrkA y NGF (Figura R2-20). Por ello observamos que la inhibición de la actividad de TrkA con K252A bloquea la internalización de p75CTF en presencia de NGF (Figura R2-23A). La actividad de TrkA por lo tanto, es crucial para regular los niveles de p75CTF en la superficie celular. La expresión endógena de TrkA en PC12 promovió la internalización de p75CTF exógeno en presencia de NGF (Figura R2-24), mientras que esto no ocurrió en PC12nnr5. Aunque las células PC12 y PC12nnr5 expresan endógenamente p75, este detalle no alteró la diferencia de internalización de p75CTF en presencia y ausencia de TrkA. Tras analizar por citometría de flujo los receptores p75CTF marcados en la superficie celular, observamos una reducción del 30% de la señal FitC-A en presencia de TrkA y NGF (Figura R2-21A), de la misma forma, mediante ensayos de Biotina marcamos y precipitamos las proteínas de superficie y observamos una reducción significativa (~ 30%) de los niveles de p75CTF en presencia de TrkA y NGF. Curiosamente, en la superficie celular tanto en ausencia como presencia de TrkA los dímeros de p75CTF parecen predominar respecto a los monómeros (Figura R2-21B). Esta diferencia podría radicar en la cinética de degradación que siguen ambos. En ensayos iniciales de internalización en ausencia de TrkA ya describimos que p75CTF es más estable y permanece más tiempo en la superficie celular, mientras que p75CTF-C257A, por su condición de monómero se internaliza rápidamente. Aunque en presencia de TrkA y ausencia de NGF no existe internalización de p75CTF no descartamos que TrkA pueda interactuar físicamente con los dímeros p75CTF presentes y retenerlos en la membrana en ausencia de NGF. Tampoco descartamos la posibilidad de que la actividad de TrkA genere las condiciones necesarias en la membrana plasmática para producir la internalización de p75CTF sin la necesidad de una asociación física entre ambos. Lo que sí es seguro es que los receptores TrkA y p75CTF parecen colocalizar en las vesículas endocíticas mediadas por NGF (Figura R2-22).

Analizando las vías de señalización de TrkA, PI3K cataliza la producción de PIP3 por fosforilación del PIP2, el cual participa en la remodelación de actina en los sitios donde se forman los volantes macropinocíticos (Tall et al., 2000). Mutaciones puntuales de los residuos Tyr490 y Try785 de TrkA podrían alterar la internalización del receptor, ya que la fosforilación de ambos residuos median rutas de señalización por el recambio de fosfatidilinositol (Obermeier et al., 1994). Esta característica podría explicar porque los mutantes TrkA-Y490F y TrkA-Y785F son incapaces de inhibir la agregación de p75CTF en la membrana celular. La inhibición de la vía PI3K podría impedir que se modulara la internalización de p75CTF promoviendo su agregación en la superficie celular. (Figura R2-23B). Aunque la participación de TrkA en este proceso aún queda por esclarecer, algo que sí es seguro, es que la presencia y activación de TrkA reduce significativamente la agregación de p75CTF en la superficie celular, así como la asociación p75CTF/TRAF6. Por ello, enfatizamos que en un contexto celular en el cual se exprese p75 y exista un

fallo que provoque la inactividad de γ -secretasa, la presencia de TrkA puede ser crucial para la supervivencia celular.

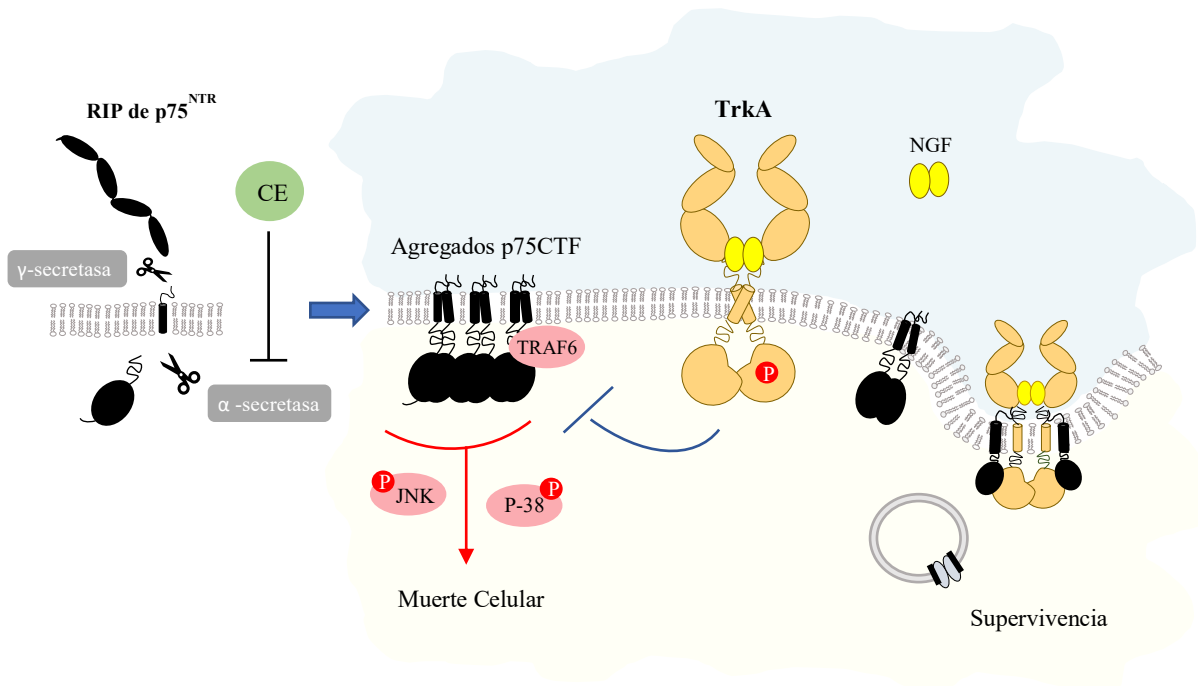


Figura D3. TrkA reduce la muerte celular por agregación de p75CTF

CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE TrkA IDENTIFICADAS EN LA ENFERMEDAD DE CIPA

Como detallamos en la introducción de esta tesis, no hay lugar a dudas acerca de la relevancia del receptor TrkA en los procesos de nocicepción, de allí su implicación en la enfermedad de CIPA, donde se ve principalmente afectada la sensibilización periférica y visceral, dando como resultado la anulación del umbral del dolor. Aunque la enfermedad tiene una incidencia muy baja (1/125.000.000), en la actualidad ya se han asociado más de 100 mutaciones puntuales de TrkA con la enfermedad de CIPA. En este trabajo decidimos enfocarnos en caracterizar 2 mutaciones ya documentadas, TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P, y una mutación nueva, TrkA-C300stop (Figura R3-1). Analizamos el procesamiento y expresión de los receptores mutados en la superficie celular, así como sus rutas de degradación. Nuestros resultados mostraron que el mutante TrkA-L213P induce el plegamiento incorrecto de TrkA, provocando su agregación y retención en el RE, donde observamos una significativa colocalización con calnexina (Figura R3-6). Esta retención explica por qué en los ensayos de localización en la superficie celular este mutante estaba ausente (Figura R3-4). Sabiendo que muchas mutaciones son responsables del mal plegamiento de proteínas, mediante ensayos de Tritón X-100 fuimos capaces de detectar la presencia de agregados insolubles de TrkA-L213P (Figura R3). Esta agregación podría ser la responsable de que el receptor TrkA-L213P presente una cinética de degradación significativamente más lenta que TrkA-wt (Figura R3-7). Curiosamente, con la mutación TrkA C300stop ocurre todo lo contrario ya que muestra una cinética de degradación mucho más rápida que TrkA-wt (Figura R3-8). Teniendo en cuenta que TrkA-C300stop tiene una retención en el RE relativamente inferior a TrkAL213P, se esperaría que no agregue de una forma tan exacerbada y forme agregados solubles que puedan eliminarse rápidamente por autofagia (Figura R3-7B). Con respecto a TrkA- Δ 736 se observó un comportamiento intermedio entre TrkAL213P y TrkA-C300stop, resaltando que al igual que ambos, TrkA- Δ 736 también manifestó una retención en el RE que le impedía alcanzar la superficie celular (Figura R3-4). Esta alteración del tráfico intracelular que comparten las 3 mutaciones explica porque en los ensayos de actividad no observamos la fosforilación del receptor ni la diferenciación de las células PC12nnr5 transfectadas con dichos mutantes e incubadas con NGF.

Los resultados también nos revelaron que los 3 mutantes de TrkA utilizan la autofagia como principal ruta de degradación (Figura R3-9). Curiosamente, únicamente TrkA-L213P mostró una ligera recuperación frente a epoxomicina, sugiriendo que una pequeña parte de los receptores sintetizados son degradados por el proteosoma. Presumimos que este proceso podría estar ligado a ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) como respuesta al mal plegamiento y agregación de la proteína (Merulla et al., 2013; Vembar & Brodsky, 2008). Tras analizar la cantidad de autofagosomas, observamos que el mutante TrkA-L213P fue quien mostró mayor número de vesículas (Figura R3-10). El uso de wortmanina y bafilomicina nos permitió determinar que este

gran número de vesículas presentes en TrkA-L213P eran producto de un desequilibrio entre la síntesis y degradación de las mismas, donde una degradación regulada y una síntesis desmesurada de autofagosomas resulta en el acúmulo de vesículas en el interior de las células (Figura R3-11). Es razonable pensar que el mal plegamiento y excesiva agregación de TrkA-L213P son los responsables de la activación exacerbada de la autofagia, con el objetivo único de restablecer la homeostasis celular. Curiosamente, en datos no mostrados, observamos que la sobreexpresión de TrkA-wt también es capaz de aumentar el flujo autofágico. A pesar que estudios anteriores han relacionado directamente la actividad del receptor con una mayor autofagia y muerte celular (Dadakhujiev et al., 2009; Hansen et al., 2007), nosotros observamos este resultado en ausencia de ligando. Una explicación plausible de este hecho sería la estrecha relación que existe entre el receptor TrkA y los receptores de autofagia como p62/sequestosoma1 (Shaid et al., 2013), donde una sobreexpresión del receptor fomente la formación de autofagosomas como parte de su proceso de degradación (Wooten et al., 2008). Sin embargo, usar pequeñas cantidades de TrkA durante las transfecciones nos ha permitido desenmascarar las diferencias existentes entre las distintas construcciones. Desde luego sería muy interesante abordar estos resultados en un contexto de expresión endógeno de mutantes.

Nuestros datos revelan que la alteración del flujo autofágico presente en los mutantes de CIPA promueve la toxicidad celular en PC12nnr5. Observamos una correlación existente entre el incremento de vesículas autofágicas y la muerte celular (Figura R3-1C). La expresión de TrkA- Δ 736 y TrkA-L213P puede exacerbar la muerte celular en situaciones de estrés. Mientras que, la expresión de TrkA-C300stop no tiene ningún impacto sobre la viabilidad celular (Figura R3-1B) debido a su escasa agregación y rápida degradación. Sabiendo que el mecanismo de la autofagia es la principal vía reguladora de las neuronas, decidimos extrapolar nuestros resultados a un contexto neuronal. Donde observamos que la expresión de los mutantes de TrkA en neuronas corticales fue capaz de promover la toxicidad y neurodegeneración que se reflejó en los diferentes grados de distrofia de neuritas (Figura R3-13). Ensayos más detallados y específicos nos permitieron observar la presencia de vesículas autofágicas en el soma y dendritas de neuronas que expresaban únicamente el mutante TrkA-L213P, quien, como era de esperarse, manifestó una mayor distrofia de neuritas a diferencia de TrkA- Δ 736 y TrkA-C300stop (Figura R3-14). Nuestros resultados nos llevan a presumir que esta neurotoxicidad es producto del mal plegamiento, agregación y alteración del flujo autofágico, por ello, observamos tanta variabilidad entre ellas. Todos estos datos se refuerzan con la premisa de que la agregación de proteínas sí está relacionada con afecciones neurodegenerativas (Doyle et al., 2011). Llegados a este punto, resaltamos los diversos grados de discapacidad intelectual (Indo, 2002, 2018) y los problemas de aprendizaje y trastornos por déficit de atención e hiperactividad severo presente en los pacientes diagnosticados con CIPA. Nuestros resultados podrían explicar esta gran variabilidad intelectual y cognitiva, ya que mutaciones puntuales en el receptor de TrkA podrían afectar poblaciones neuronales dependientes de NGF presentes en el SNC (Smeyne et al., 1994). Curiosamente, según la historia clínica de los pacientes con las mutaciones descritas en este capítulo, el paciente

con la variante TrkA-L213P fue diagnosticado con problemas del habla indicativos de un déficit intelectual, coincidiendo con nuestros resultados, al ser la mutación que promueve mayor agregación y toxicidad, mientras que el paciente con la mutación TrkA-C300stop según su historia clínica no muestra ningún problema cognitivo ni intelectual (Bonkowsky et al., 2003). En el caso del paciente con la mutación TrkA- Δ 736, no se tienen datos relacionados con sus capacidades cognitivas, sin embargo, siguiendo nuestra línea de datos podríamos estar frente a una leve discapacidad intelectual expresando un fenotipo que se encuentre entre TrkA-wt y TrkA-L213P. Para concluir, resaltamos que dependiendo del tipo de mutación de TrkA presente, se inducirá una mayor o menor toxicidad celular. Esto puede afectar tanto a neuronas del SNC como del SNP. Con este conocimiento previo y un estudio más detallado de futuras mutaciones de TrkA identificadas en CIPA, se podría explicar en detalle el fenotipo variable mostrado en los pacientes, así como entender el grado de implicación del receptor en el progreso de la enfermedad.



Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El dominio TM de TrkA presenta dos modos de homodimerización, una conformación activa que involucra los residuos V418 y A428 y una conformación inactiva que involucra el motivo S419xxxG423.
2. La región eJTM de TrkA se encuentra desprovista de estructura y cuenta con una distribución de prolinas esenciales para el acoplamiento de NGF y activación de TrkA. La delección de esta región anula la unión de TrkA a NGF impidiendo la activación del receptor.
3. La región eJTM tiene una interfaz preferente de dimerización que promueve la activación del receptor e involucra los residuos D406, K410 y K411. Los residuos K410 y K411 participan en la homodimerización de TrkA por BS3
4. La adición de un residuo extra de leucina en el dominio TM de TrkA fomenta la activación constitutiva del receptor y promueve la diferenciación de células PC12nnr5 en ausencia de ligando, sugiriendo el modelo de rotación-activación como parte del mecanismo de activación del receptor TrkA.
5. Los residuos G369 y S371 del dominio TrkA-Ig2 podrían estabilizar dímeros preformados inactivos que responden mejor a NGF, constituyendo así, tetrámeros de TrkA.
6. El motivo de dimerización A262xxxG266xxA269 del TM de p75 podría participar en la formación del heterocomplejo TrkA/p75
7. La activación de TrkA por NGF fomenta el corte de p75 por α -secretasa, mientras que la coexpresión de TrkA y p75CTF inhibe la generación de p75ICD por γ -secretasa.
8. Los eventos de muerte celular producto de la inhibición de γ -secretasa están mediados por la agregación de p75CTF en la superficie celular, cuya interacción con TRAF6 fomenta la activación de vías pro-apoptóticas marcadas por JNK y p38. La presencia y activación de TrkA reduce significativamente la agregación de p75CTF en la superficie celular, así como su asociación con TRAF6.
9. Las mutaciones TrkA- Δ 736, TrkA-L213P y TrkA-C300stop presentes en la enfermedad de CIPA son no funcionales a pesar que no todas afectan la actividad tirosina quinasa.
10. Las mutaciones TrkA- Δ 736, TrkA-L213P y TrkA-C300stop se localizan en diferentes dominios de TrkA afectando su maduración y localización en la membrana plasmática, quedando retenidas en el RE producto del mal plegamiento.
11. La variabilidad en la vida media y toxicidad celular que manifiestan las mutaciones TrkA- Δ 736, TrkA-L213P y TrkA-C300stop es producto de su distinto grado de agregación.
12. La expresión del mutante TrkA-L213P promueve la formación de autofagosomas en dendritas y soma de neuronas corticales provocando la distrofia de neuritas y muerte neuronal.

B

Bibliografía

- Ahmed, F., & Hristova, K. (2018). Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: effects of their cognate ligands. *Biochem J*, 475(22), 3669-3685. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180637>
- Ahmed, F., Zapata-Mercado, E., Rahman, S., & Hristova, K. (2021). The Biased Ligands NGF and NT-3 Differentially Stabilize Trk-A Dimers. *Biophys J*, 120(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.11.2262>
- Amin, S., Forrester, N., Norman, A., Lux, A., & Vijayakumar, K. (2017). Novel 9 amino acid in-frame deletion in the NTRK1 tyrosine kinase domain in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Clin Genet*, 92(5), 559-560. <https://doi.org/10.1111/cge.13064>
- Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. L., Chao, M. V., Martin-Zanca, D., & Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol*, 20(16), 5908-5916. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5908-5916.2000>
- Arevalo, J. C., Pereira, D. B., Yano, H., Teng, K. K., & Chao, M. V. (2006). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 281(2), 1001-1007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504163200>
- Arevalo, J. C., & Wu, S. H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*, 63(13), 1523-1537. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6010-1>
- Arevalo, J. C., Yano, H., Teng, K. K., & Chao, M. V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J*, 23(12), 2358-2368. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600253>
- Arnett, M. G., Ryals, J. M., & Wright, D. E. (2007). Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain Res*, 1183, 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.051>
- Artim, S. C., Mendrola, J. M., & Lemmon, M. A. (2012). Assessing the range of kinase autoinhibition mechanisms in the insulin receptor family. *Biochem J*, 448(2), 213-220. <https://doi.org/10.1042/BJ20121365>
- Aurikko, J. P., Ruotolo, B. T., Grossmann, J. G., Moncrieffe, M. C., Stephens, E., Leppanen, V. M., . . . Blundell, T. L. (2005). Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem*, 280(39), 33453-33460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503189200>
- Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 25(11), 1386-1403. <https://doi.org/10.1002/neu.480251107>
- Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1(5), 549-553.
- Barker, P. A. (2009). A p75(NTR) pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron*, 62(1), 3-5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.005>
- 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. *J Biol Chem*, 269(48), 30645-30650.
- Barker, P. A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E. M., Meakin, S. O., Glass, D. J., & Shooter, E. M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem*, 268(20), 15150-15157.
- Barker, P. A., & Shooter, E. M. (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron*, 13(1), 203-215. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90470-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90470-7)

- Barrett, G. L., & Bartlett, P. F. (1994). The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(14), 6501-6505. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6501>
- Bell, C. A., Tynan, J. A., Hart, K. C., Meyer, A. N., Robertson, S. C., & Donoghue, D. J. (2000). Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell*, *11*(10), 3589-3599. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.10.3589>
- Benedetti, M., Levi, A., & Chao, M. V. (1993). Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(16), 7859-7863. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7859>
- Berg, M. M., Sternberg, D. W., Hempstead, B. L., & Chao, M. V. (1991). The low-affinity p75 nerve growth factor (NGF) receptor mediates NGF-induced tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(16), 7106-7110. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7106>
- Bertrand, T., Kothe, M., Liu, J., Dupuy, A., Rak, A., Berne, P. F., . . . Mathieu, M. (2012). The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition. *J Mol Biol*, *423*(3), 439-453. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.002>
- Biarç, J., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L., & Bradshaw, R. A. (2011). Receptor tyrosine kinase signaling--a proteomic perspective. *Adv Enzyme Regul*, *51*(1), 293-305. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.10.005>
- Bibel, M., Hoppe, E., & Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J*, *18*(3), 616-622. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>
- Bilderback, T. R., Gazula, V. R., & Dobrowsky, R. T. (2001). Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem*, *76*(5), 1540-1551. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00171.x>
- Bocharov, E. V., Lesovoy, D. M., Goncharuk, S. A., Goncharuk, M. V., Hristova, K., & Arseniev, A. S. (2013). Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: implications for signaling and human pathologies. *Structure*, *21*(11), 2087-2093. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.026>
- Bocharov, E. V., Mayzel, M. L., Volynsky, P. E., Mineev, K. S., Tkach, E. N., Ermolyuk, Y. S., . . . Arseniev, A. S. (2010). Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys J*, *98*(5), 881-889. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.008>
- Bocharov, E. V., Sharonov, G. V., Bocharova, O. V., & Pavlov, K. V. (2017). Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, *1859*(9 Pt A), 1417-1429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.025>
- Boersma, M. C., Dresselhaus, E. C., De Biase, L. M., Mihalas, A. B., Bergles, D. E., & Meffert, M. K. (2011). A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *J Neurosci*, *31*(14), 5414-5425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2456-10.2011>
- Bonaventure, J., Horne, W. C., & Baron, R. (2007). The localization of FGFR3 mutations causing thanatophoric dysplasia type I differentially affects phosphorylation, processing and ubiquitylation of the receptor. *FEBS J*, *274*(12), 3078-3093. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05835.x>

- Bonkowsky, J. L., Johnson, J., Carey, J. C., Smith, A. G., & Swoboda, K. J. (2003). An infant with primary tooth loss and palmar hyperkeratosis: a novel mutation in the NTRK1 gene causing congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Pediatrics*, *112*(3 Pt 1), e237-241. <https://doi.org/10.1542/peds.112.3.e237>
- Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, *18*, 223-253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.001255>
- Bothwell, M. (2014). NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol*, *220*, 3-15. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_1
- Bothwell, M. A., & Shooter, E. M. (1977). Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem*, *252*(23), 8532-8536.
- Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Reimann, T., & Baccarini, M. (1995). Ras-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. *Mol Cell Biol*, *15*(1), 466-475. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.1.466>
- Butte, M. J., Hwang, P. K., Mobley, W. C., & Fletterick, R. J. (1998). Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry*, *37*(48), 16846-16852. <https://doi.org/10.1021/bi981254o>
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., . . . Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, *282*(5392), 1318-1321. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1318>
- Ceni, C., Kommaddi, R. P., Thomas, R., Vereker, E., Liu, X., McPherson, P. S., . . . Barker, P. A. (2010). The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci*, *123*(Pt 13), 2299-2307. <https://doi.org/10.1242/jcs.062612>
- Chang, M. S., Arevalo, J. C., & Chao, M. V. (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res*, *78*(2), 186-192. <https://doi.org/10.1002/jnr.20262>
- Chao, M. V., Battleman, D. S., & Benedetti, M. (1992). Receptors for nerve growth factor. *Int Rev Cytol*, *137B*, 169-180. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62604-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62604-2)
- Chao, M. V., & Hempstead, B. L. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*, *18*(7), 321-326.
- Chapman, B. S., & Kuntz, I. D. (1995). Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci*, *4*(9), 1696-1707. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040905>
- Chavent, M., Chetwynd, A. P., Stansfeld, P. J., & Sansom, M. S. (2014). Dimerization of the EphA1 receptor tyrosine kinase transmembrane domain: Insights into the mechanism of receptor activation. *Biochemistry*, *53*(42), 6641-6652. <https://doi.org/10.1021/bi500800x>
- Chuang, Y. C., Fraser, M. O., Yu, Y., Chancellor, M. B., de Groat, W. C., & Yoshimura, N. (2001). The role of bladder afferent pathways in bladder hyperactivity induced by the intravesical administration of nerve growth factor. *J Urol*, *165*(3), 975-979.
- Clary, D. O., & Reichardt, L. F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(23), 11133-11137. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11133>
- Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., . . . Burgess, A. W. (2005). Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A

- multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem*, 280(34), 30392-30399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504770200>
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40(10), 1014-1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.10.1014>
- Coskun, U., Grzybek, M., Drechsel, D., & Simons, K. (2011). Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9044-9048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105666108>
- Culmsee, C., Gerling, N., Lehmann, M., Nikolova-Karakashian, M., Prehn, J. H., Mattson, M. P., & Kriegstein, J. (2002). Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience*, 115(4), 1089-1108. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00539-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00539-0)
- Dadakhujiev, S., Jung, E. J., Noh, H. S., Hah, Y. S., Kim, C. J., & Kim, D. R. (2009). Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death. *Autophagy*, 5(1), 103-105. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7276>
- Daneshjou, K., Jafari, H., & Raeskarami, S. R. (2012). Congenital Insensitivity to Pain and Anhydrosis (CIPA) Syndrome; A Report of 4 Cases. *Iran J Pediatr*, 22(3), 412-416.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80405-5)
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, 38(1), 9-12. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00205-8)
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., & Pandiella, A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*, 13(6), 2031-2044. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0561>
- DiStefano, P. S., & Johnson, E. M., Jr. (1988). Identification of a truncated form of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(1), 270-274. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.270>
- Dobrowsky, R. T., Werner, M. H., Castellino, A. M., Chao, M. V., & Hannun, Y. A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science*, 265(5178), 1596-1599. <https://doi.org/10.1126/science.8079174>
- Doyle, K. M., Kennedy, D., Gorman, A. M., Gupta, S., Healy, S. J., & Samali, A. (2011). Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med*, 15(10), 2025-2039. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01374.x>
- Dyck, P. J., Ott, J., Moore, S. B., Swanson, C. J., & Lambert, E. H. (1983). Linkage evidence for genetic heterogeneity among kinships with hereditary motor and sensory neuropathy, type I. *Mayo Clin Proc*, 58(7), 430-435.
- Endres, N. F., Barros, T., Cantor, A. J., & Kuriyan, J. (2014). Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem Sci*, 39(10), 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.08.001>

- Epa, W. R., Markovska, K., & Barrett, G. L. (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem*, *89*(2), 344-353. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02344.x>
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R., & Hempstead, B. L. (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*, *276*(35), 32687-32695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011674200>
- Farhadi, H. F., Mowla, S. J., Petrecca, K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2000). Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, *20*(11), 4059-4068.
- Fleishman, S. J., Schlessinger, J., & Ben-Tal, N. (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(25), 15937-15940. <https://doi.org/10.1073/pnas.252640799>
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(9), 673-684. <https://doi.org/10.1038/nrm910>
- Frade, J. M. (2000). NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci*, *23*(12), 591-592. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01704-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01704-5)
- Freed, D. M., Bessman, N. J., Kiyatkin, A., Salazar-Cavazos, E., Byrne, P. O., Moore, J. O., . . . Lemmon, M. A. (2017). EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. *Cell*, *171*(3), 683-695 e618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017>
- Friedman, W. J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*, *20*(17), 6340-6346.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90065-q](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90065-q)
- Geetha, T., Kenchappa, R. S., Wooten, M. W., & Carter, B. D. (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J*, *24*(22), 3859-3868. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600845>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, *36*(1), 59-74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent Escherichia coli: "Ultracompetent" Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, *2020*(6), 101196. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101196>
- Greenberg, M. E., Hermanowski, A. L., & Ziff, E. B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol*, *6*(4), 1050-1057. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.4.1050-1057.1986>
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*(7), 2424-2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>
- Griesbeck, O., Canossa, M., Campana, G., Gartner, A., Hoener, M. C., Nawa, H., . . . Thoenen, H. (1999). Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in

- activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech*, 45(4-5), 262-275. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19990515/01\)45:4/5<262::AID-JEMT10>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<262::AID-JEMT10>3.0.CO;2-K)
- Hagag, N., Halegoua, S., & Viola, M. (1986). Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature*, 319(6055), 680-682. <https://doi.org/10.1038/319680a0>
- Hallbook, F., Ibanez, C. F., & Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*, 6(5), 845-858. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90180-8)
- Hammond, C., & Helenius, A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 126(1), 41-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.1.41>
- Han, X., Mihailescu, M., & Hristova, K. (2006). Neutron diffraction studies of fluid bilayers with transmembrane proteins: structural consequences of the achondroplasia mutation. *Biophys J*, 91(10), 3736-3747. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092247>
- Hansen, K., Wagner, B., Hamel, W., Schweizer, M., Haag, F., Westphal, M., & Lamszus, K. (2007). Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J Neurochem*, 103(1), 259-275. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04753.x>
- Harrington, A. W., St Hillaire, C., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Philippidou, P., Halegoua, S., & Ginty, D. D. (2011). Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell*, 146(3), 421-434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.008>
- Hasegawa, Y., Yamagishi, S., Fujitani, M., & Yamashita, T. (2004). p75 neurotrophin receptor signaling in the nervous system. *Biotechnol Annu Rev*, 10, 123-149. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(04\)10005-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(04)10005-7)
- He, L., & Hristova, K. (2008). Pathogenic activation of receptor tyrosine kinases in mammalian membranes. *J Mol Biol*, 384(5), 1130-1142. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.036>
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., & Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678-683. <https://doi.org/10.1038/350678a0>
- Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D., & Xia, Z. (2000). Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*, 20(7), 2567-2574.
- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J. E., & Xia, Z. (1999). Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 274(32), 22569-22580. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22569>
- Hibbert, A. P., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2003). Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*, 278(48), 48129-48136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300961200>
- Hickman, F. E., Stanley, E. M., & Carter, B. D. (2018). Neurotrophin Responsiveness of Sympathetic Neurons Is Regulated by Rapid Mobilization of the p75 Receptor to the Cell Surface through TrkA Activation of Arf6. *J Neurosci*, 38(24), 5606-5619. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0788-16.2018>

- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emllet, D. R., Dieterich, R., & Wong, A. J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(23), 12419-12424. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12419>
- Horigome, K., Pryor, J. C., Bullock, E. D., & Johnson, E. M., Jr. (1993). Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem*, *268*(20), 14881-14887.
- Horton, A., Laramée, G., Wyatt, S., Shih, A., Winslow, J., & Davies, A. M. (1997). NGF binding to p75 enhances the sensitivity of sensory and sympathetic neurons to NGF at different stages of development. *Mol Cell Neurosci*, *10*(3-4), 162-172. <https://doi.org/10.1006/mcne.1997.0650>
- Huber, L. J., & Chao, M. V. (1995). Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Dev Biol*, *167*(1), 227-238. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1019>
- Huehne, K., Zweier, C., Raab, K., Odent, S., Bonnaure-Mallet, M., Sixou, J. L., . . . Rautenstrauss, B. (2008). Novel missense, insertion and deletion mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (NTRK1) associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Neuromuscul Disord*, *18*(2), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.10.005>
- Iacarusso, M. F., Galli, S., Marti, M., Villalta, J. I., Estrin, D. A., Jares-Erijman, E. A., & Pietrasanta, L. I. (2011). Structural model for p75(NTR)-TrkA intracellular domain interaction: a combined FRET and bioinformatics study. *J Mol Biol*, *414*(5), 681-698. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.022>
- Indo, Y. (2002). Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin Auton Res*, *12 Suppl 1*, 120-32. <https://doi.org/10.1007/s102860200016>
- Indo, Y. (2010). Nerve growth factor, pain, itch and inflammation: lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Expert Rev Neurother*, *10*(11), 1707-1724. <https://doi.org/10.1586/ern.10.154>
- Indo, Y. (2012). Nerve growth factor and the physiology of pain: lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Clin Genet*, *82*(4), 341-350. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01943.x>
- Indo, Y. (2018). NGF-dependent neurons and neurobiology of emotions and feelings: Lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Neurosci Biobehav Rev*, *87*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.013>
- Indo, Y., Mardy, S., Miura, Y., Moosa, A., Ismail, E. A., Toscano, E., . . . Matsuda, I. (2001). Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): novel mutations of the TRKA (NTRK1) gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant TRKA and PKLR genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency. *Hum Mutat*, *18*(4), 308-318. <https://doi.org/10.1002/humu.1192>
- Indo, Y., Tsuruta, M., Hayashida, Y., Karim, M. A., Ohta, K., Kawano, T., . . . Matsuda, I. (1996). Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat Genet*, *13*(4), 485-488. <https://doi.org/10.1038/ng0896-485>
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., . . . Nikolov, D. B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, *123*(2), 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.014>

- Jing, S., Tapley, P., & Barbacid, M. (1992). Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron*, 9(6), 1067-1079. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90066-m](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90066-m)
- Jung, K. M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., . . . Kim, T. W. (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem*, 278(43), 42161-42169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306028200>
- Kanning, K. C., Hudson, M., Amieux, P. S., Wiley, J. C., Bothwell, M., & Schecterson, L. C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci*, 23(13), 5425-5436.
- Kao, S., Jaiswal, R. K., Kolch, W., & Landreth, G. E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem*, 276(21), 18169-18177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008870200>
- Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., & Parada, L. F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252(5005), 554-558. <https://doi.org/10.1126/science.1850549>
- 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-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem*, 285(26), 20358-20368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082834>
- Khursigara, G., Orlinick, J. R., & Chao, M. V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem*, 274(5), 2597-2600. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2597>
- Kommaddi, R. P., Thomas, R., Ceni, C., Daigneault, K., & Barker, P. A. (2011). Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J*, 25(6), 2061-2070. <https://doi.org/10.1096/fj.10-173740>
- Kops, G. J., & Burgering, B. M. (1999). Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med (Berl)*, 77(9), 656-665. <https://doi.org/10.1007/s001099900050>
- Kuruvilla, R., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Lonze, B. E., Valdez, G., Ye, H., & Ginty, D. D. (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell*, 118(2), 243-255. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.021>
- Lamballe, F., Klein, R., & Barbacid, M. (1991). The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Princess Takamatsu Symp*, 22, 153-170.
- Lee, K. F., Davies, A. M., & Jaenisch, R. (1994). p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*, 120(4), 1027-1033.
- Lee, K. F., Li, E., Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, 69(5), 737-749. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90286-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90286-1)
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945-1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J*, 6(5), 1145-1154.

- Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*, *116*(2), 321-361. <https://doi.org/10.1002/jez.1401160206>
- Loeb, D. M., Maragos, J., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., Parada, L. F., & Greene, L. A. (1991). The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell*, *66*(5), 961-966. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90441-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90441-z)
- Loeb, D. M., Stephens, R. M., Copeland, T., Kaplan, D. R., & Greene, L. A. (1994). A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J Biol Chem*, *269*(12), 8901-8910.
- Lomen-Hoerth, C., & Shooter, E. M. (1995). Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J Neurochem*, *64*(4), 1780-1789. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64041780.x>
- Low-Nam, S. T., Lidke, K. A., Cutler, P. J., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M., Wilson, B. S., & Lidke, D. S. (2011). ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(11), 1244-1249. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2135>
- Macdonald-Obermann, J. L., & Pike, L. J. (2009). The intracellular juxtamembrane domain of the epidermal growth factor (EGF) receptor is responsible for the allosteric regulation of EGF binding. *J Biol Chem*, *284*(20), 13570-13576. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001487>
- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M. V., & Hempstead, B. L. (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem*, *269*(9), 6884-6891.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., . . . Yancopoulos, G. D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, *5*(4), 501-509.
- Majdan, M., Walsh, G. S., Aloyz, R., & Miller, F. D. (2001). TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *J Cell Biol*, *155*(7), 1275-1285. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110017>
- Marchetti, L., Callegari, A., Luin, S., Signore, G., Viegi, A., Beltram, F., & Cattaneo, A. (2013). Ligand signature in the membrane dynamics of single TrkA receptor molecules. *J Cell Sci*, *126*(Pt 19), 4445-4456. <https://doi.org/10.1242/jcs.129916>
- Markus, A., Patel, T. D., & Snider, W. D. (2002). Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol*, *12*(5), 523-531. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(02\)00372-0](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00372-0)
- Marmigere, F., Montelius, A., Wegner, M., Groner, Y., Reichardt, L. F., & Ernfors, P. (2006). The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci*, *9*(2), 180-187. <https://doi.org/10.1038/nn1631>
- Marshall, M. (1995). Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol Reprod Dev*, *42*(4), 493-499. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420418>
- Martin-Fernandez, M., Clarke, D. T., Tobin, M. J., Jones, S. V., & Jones, G. R. (2002). Preformed oligomeric epidermal growth factor receptors undergo an ectodomain

- structure change during signaling. *Biophys J*, 82(5), 2415-2427. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75585-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75585-9)
- Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L. K., & Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 2, 983-992. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.112>
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., & Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol*, 9(1), 24-33. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.1.24-33.1989>
- Maruyama, I. N. (2014). Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells*, 3(2), 304-330. <https://doi.org/10.3390/cells3020304>
- Maruyama, I. N. (2015). Activation of transmembrane cell-surface receptors via a common mechanism? The "rotation model". *Bioessays*, 37(9), 959-967. <https://doi.org/10.1002/bies.201500041>
- Matusica, D., Skeldal, S., Sykes, A. M., Palstra, N., Sharma, A., & Coulson, E. J. (2013). An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *J Biol Chem*, 288(16), 11144-11154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436469>
- McDonald, N. Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., & Blundell, T. L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*, 354(6352), 411-414. <https://doi.org/10.1038/354411a0>
- Meakin, S. O., & Shooter, E. M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*, 15(9), 323-331. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90047-c](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90047-c)
- Meeker, R. B., & Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res*, 10(5), 721-725. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156967>
- Merulla, J., Fasana, E., Solda, T., & Molinari, M. (2013). Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Traffic*, 14(7), 767-777. <https://doi.org/10.1111/tra.12068>
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., . . . Pepinsky, R. B. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7(3), 221-228. <https://doi.org/10.1038/nn1188>
- Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H., & Poo, M. (2001). Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron*, 29(2), 441-452. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00217-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00217-3)
- Mischel, P. S., Smith, S. G., Vining, E. R., Valletta, J. S., Mobley, W. C., & Reichardt, L. F. (2001). The extracellular domain of p75NTR is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA. *J Biol Chem*, 276(14), 11294-11301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005132200>
- Mischel, P. S., Umbach, J. A., Eskandari, S., Smith, S. G., Gundersen, C. B., & Zampighi, G. A. (2002). Nerve growth factor signals via preexisting TrkA receptor oligomers. *Biophys J*, 83(2), 968-976. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75222-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75222-3)
- Monsonigo-Ornan, E., Adar, R., Rom, E., & Yayon, A. (2002). FGF receptors ubiquitylation: dependence on tyrosine kinase activity and role in downregulation. *FEBS Lett*, 528(1-3), 83-89. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03255-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03255-6)
- Moriki, T., Maruyama, H., & Maruyama, I. N. (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol*, 311(5), 1011-1026. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4923>

- Mullenbrock, S., Shah, J., & Cooper, G. M. (2011). Global expression analysis identified a preferentially nerve growth factor-induced transcriptional program regulated by sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AP-1 protein activation during PC12 cell differentiation. *J Biol Chem*, 286(52), 45131-45145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274076>
- Nadezhdin, K. D., Garcia-Carpio, I., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., & Vilar, M. (2016). Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization. *J Biol Chem*, 291(23), 12346-12357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.723585>
- Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J. M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., . . . Barde, Y. A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature*, 467(7311), 59-63. <https://doi.org/10.1038/nature09336>
- Nonomura, T., Kubo, T., Oka, T., Shimoke, K., Yamada, M., Enokido, Y., & Hatanaka, H. (1996). Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 97(1), 42-50. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00130-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00130-7)
- Nykjaer, A., Willnow, T. E., & Petersen, C. M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.004>
- Obermeier, A., Bradshaw, R. A., Sedorf, K., Choidas, A., Schlessinger, J., & Ullrich, A. (1994). Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J*, 13(7), 1585-1590.
- Ohto, T., Iwasaki, N., Fujiwara, J., Ohkoshi, N., Kimura, S., Kawade, K., . . . Matsui, A. (2004). The evaluation of autonomic nervous function in a patient with hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV with novel mutations of the TRKA gene. *Neuropediatrics*, 35(5), 274-278. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821254>
- Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3), 272-280. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00208-7)
- Perkinton, M. S., Ip, J. K., Wood, G. L., Crossthwaite, A. J., & Williams, R. J. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J Neurochem*, 80(2), 239-254. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00699.x>
- Quest, A. F., Bloomenthal, J., Bardes, E. S., & Bell, R. M. (1992). The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J Biol Chem*, 267(14), 10193-10197.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1545-1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Rifkin, J. T., Todd, V. J., Anderson, L. W., & Lefcort, F. (2000). Dynamic expression of neurotrophin receptors during sensory neuron genesis and differentiation. *Dev Biol*, 227(2), 465-480. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9841>
- Roux, P. P., & Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 67(3), 203-233. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00016-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00016-3)
- Ryden, M., Hempstead, B., & Ibanez, C. F. (1997). Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 272(26), 16322-16328. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16322>

- Sako, Y., Minoghchi, S., & Yanagida, T. (2000). Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol*, 2(3), 168-172. <https://doi.org/10.1038/35004044>
- Sarasola, E., Rodriguez, J. A., Garrote, E., Aristegui, J., & Garcia-Barcina, M. J. (2011). A short in-frame deletion in NTRK1 tyrosine kinase domain caused by a novel splice site mutation in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *BMC Med Genet*, 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-86>
- Schatteman, G. C., Gibbs, L., Lanahan, A. A., Claude, P., & Bothwell, M. (1988). Expression of NGF receptor in the developing and adult primate central nervous system. *J Neurosci*, 8(3), 860-873.
- Schatteman, G. C., Langer, T., Lanahan, A. A., & Bothwell, M. A. (1993). Distribution of the 75-kD low-affinity nerve growth factor receptor in the primate peripheral nervous system. *Somatosens Mot Res*, 10(4), 415-432. <https://doi.org/10.3109/08990229309028847>
- Schecterson, L. C., Hudson, M. P., Ko, M., Philippidou, P., Akmentin, W., Wiley, J., . . . Bothwell, M. (2010). Trk activation in the secretory pathway promotes Golgi fragmentation. *Mol Cell Neurosci*, 43(4), 403-413. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.01.007>
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, 97(5), 695-710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>
- Schwem, B. E., & Fillingame, R. H. (2006). Cross-linking between helices within subunit a of Escherichia coli ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle. *J Biol Chem*, 281(49), 37861-37867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607453200>
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., . . . Murphy, R. A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J*, 314 (Pt 3), 951-960. <https://doi.org/10.1042/bj3140951>
- Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., & Dikic, I. (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 20(1), 21-30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>
- Shamovsky, I. L., Ross, G. M., Riopelle, R. J., & Weaver, D. F. (1999). The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci*, 8(11), 2223-2233. <https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2223>
- Shen, J., & Maruyama, I. N. (2011). Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS Lett*, 585(2), 295-299. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.031>
- Shen, J., Sun, D., Shao, J., Chen, Y., Pang, K., Guo, W., & Lu, B. (2019). Extracellular Juxtamembrane Motif Critical for TrkB Preformed Dimer and Activation. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080932>
- Shooter, E. M. (2001). Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci*, 24, 601-629. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.601>
- Shorer, Z., Moses, S. W., Hershkovitz, E., Pinsk, V., & Levy, J. (2001). Neurophysiologic studies in congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Pediatr Neurol*, 25(5), 397-400. [https://doi.org/10.1016/s0887-8994\(01\)00347-2](https://doi.org/10.1016/s0887-8994(01)00347-2)
- Skeldal, S., Sykes, A. M., Glerup, S., Matusica, D., Palstra, N., Autio, H., . . . Coulson, E. J. (2012). Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain

- in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis. *J Biol Chem*, 287(52), 43798-43809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374710>
- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., . . . Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, 368(6468), 246-249. <https://doi.org/10.1038/368246a0>
- Soler, R. M., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, J. R., & Comella, J. X. (1999). Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci*, 19(21), 9160-9169.
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C., & Hawkins, P. T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell*, 77(1), 83-93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90237-2)
- Stroppolo, A., Guinea, B., Tian, C., Sommer, J., & Ehrlich, M. E. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced DARPP-32 expression in medium size spiny neurons in vitro. *J Neurochem*, 79(5), 1027-1032. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00651.x>
- 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 gamma-secretase. *J Biol Chem*, 287(52), 43810-43824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382903>
- Szeberenyi, J., Cai, H., & Cooper, G. M. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol*, 10(10), 5324-5332. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5324-5332.1990>
- Tall, E. G., Spector, I., Pentyala, S. N., Bitter, I., & Rebecchi, M. J. (2000). Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr Biol*, 10(12), 743-746. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00541-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00541-8)
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74(5), 845-853. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90464-2)
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9(2), 125-137. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(98)00003-3)
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Troppmair, J., Bruder, J. T., App, H., Cai, H., Liptak, L., Szeberenyi, J., . . . Rapp, U. R. (1992). Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene*, 7(9), 1867-1873.
- Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., . . . de Vos, A. M. (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol*, 290(1), 149-159. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2816>
- Underwood, C. K., Reid, K., May, L. M., Bartlett, P. F., & Coulson, E. J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci*, 37(2), 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.10.005>

- Urra, S., Escudero, C. A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., . . . Bronfman, F. C. (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem*, 282(10), 7606-7615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610458200>
- Vaillant, A. R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (1999). Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol*, 146(5), 955-966. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.955>
- Vembar, S. S., & Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12), 944-957. <https://doi.org/10.1038/nrm2546>
- Verdi, J. M., Ip, N., Yancopoulos, G. D., & Anderson, D. J. (1994). Expression of trk in MAH cells lacking the p75 low-affinity nerve growth factor receptor is sufficient to permit nerve growth factor-induced differentiation to postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), 3949-3953. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3949>
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R. S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., . . . Ibanez, C. F. (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, 62(1), 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.020>
- Villa, L. L. (1997). Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*, 71, 321-341. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60102-5](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60102-5)
- Wang, W. B., Cao, Y. J., Lyu, S. S., Zuo, R. T., Zhang, Z. L., & Kang, Q. L. (2018). Identification of a novel mutation of the NTRK1 gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA). *Gene*, 679, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.009>
- Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., & Garcia, K. C. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*, 53(1), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.034>
- Weskamp, G., Schlondorff, J., Lum, L., Becherer, J. D., Kim, T. W., Saftig, P., . . . Blobel, C. P. (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem*, 279(6), 4241-4249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307974200>
- Whittemore, S. R., Ebendal, T., Larkfors, L., Olson, L., Seiger, A., Stromberg, I., & Persson, H. (1986). Development and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(3), 817-821. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.3.817>
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H., & de Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*, 401(6749), 184-188. <https://doi.org/10.1038/43705>
- Wolf, D. E., McKinnon, C. A., Daou, M. C., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., & Ross, A. H. (1995). Interaction with TrkA immobilizes gp75 in the high affinity nerve growth factor receptor complex. *J Biol Chem*, 270(5), 2133-2138. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2133>
- Wooten, M. W., Geetha, T., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Peng, J., Cox, N., . . . Moscat, J. (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, 283(11), 6783-6789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709496200>

- Wyatt, S., & Davies, A. M. (1993). Regulation of expression of mRNAs encoding the nerve growth factor receptors p75 and trkA in developing sensory neurons. *Development*, *119*(3), 635-648.
- Yagev, R., Levy, J., Shorer, Z., & Lifshitz, T. (1999). Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: ocular and systemic manifestations. *Am J Ophthalmol*, *127*(3), 322-326. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(98\)00370-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(98)00370-5)
- Yano, H., & Chao, M. V. (2000). Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv*, *74*(2-3), 253-260. [https://doi.org/10.1016/s0031-6865\(99\)00036-9](https://doi.org/10.1016/s0031-6865(99)00036-9)
- Yeiser, E. C., Rutkoski, N. J., Naito, A., Inoue, J., & Carter, B. D. (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6^{-/-} mice. *J Neurosci*, *24*(46), 10521-10529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1390-04.2004>
- Yoon, S. O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., & Chao, M. V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*, *18*(9), 3273-3281.
- York, R. D., Molliver, D. C., Grewal, S. S., Stenberg, P. E., McCleskey, E. W., & Stork, P. J. (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol*, *20*(21), 8069-8083. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.21.8069-8083.2000>
- Zaccaro, M. C., Ivanisevic, L., Perez, P., Meakin, S. O., & Saragovi, H. U. (2001). p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem*, *276*(33), 31023-31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104630200>
- Zinkle, A., & Mohammadi, M. (2018). A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination. *F1000Res*, *7*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14143.1>



Anexo I

1. Oligonucleótidos empleados para obtención de las construcciones utilizadas en este trabajo

| Mutaciones puntuales en TrkA | | |
|------------------------------|-----|--|
| NOMBRE | | SECUENCIA 5'----- 3' |
| HA-TrkA-C300stop | Fw | CAGCATCACTGGTAAATTCCTTCTCTGTG |
| | Rev | CACAGAGAAGGGAATTTACCAGTGATGCTG |
| HA-TrkA-L213P | Fw | GGGGGATGACGTTTTTCCGCAGTGCCAGGTGGAGG |
| | Rev | CCTCCACCTGGCACTGCGGAAAAACGTCATCCCCC |
| HA-TrkA-KK/RR | Fw | AGAGACCCAGTGGAGCGGGCGGACGAAACACCTTTTGGGG |
| | Rev | CCCCAAAAGGTGTTTCGTCCCGCCGCTCCACTGGGTCTCT |
| HA-TrkA IDR PPP/GGG | Fw | CCTTTTGAGTTCAACGGTGAGGACGGCATCGGTGTCTCCTTCTCGCCA |
| | Rev | TGGCGAGAAGGAGACACCGATGCCGTCTCACCCTGAACTCAAAGG |
| HA-TrkA IDR P297G | Fw | GTCTCCTTCTCGGGCGTGGACACTAAC |
| | Rev | GTTAGTGTCCACGCCCGAGAAGGAGAC |
| HA-TrkA IDR P307G | Fw | ACATCAAGAGACGGCGTGGAGAAGAAG |
| | Rev | CTTCTTCTCCACGCCGTCTCTTGATGT |
| HA-TrkA IDR P282G | Fw | TTTATGGACAACGGTTTTGAGTTCAAC |
| | Rev | GTTGAACTCAAACCGTTGTCCATAAA |
| HA-TrkAIns4L | Fw | GTGGGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGTCTCCGCCGCCCTC |
| | Rev | GAGGGCGCGGAGACGGCCAGCAGCAGCAGCAGGCCCCAC |
| HA-TrkA-F416C | Fw | GACGAAACACCTTGTGGGGTCTCTGTGGCT |
| | Rev | AGCCACAGAGACCCCAAGGTGTTTCGTC |
| HA-TrkA-G417C | Fw | GAAACACCTTTTGTGTCTCTGTGGCTGTG |
| | Rev | CACAGCCACAGAGACACAAAAGGTGTTTC |

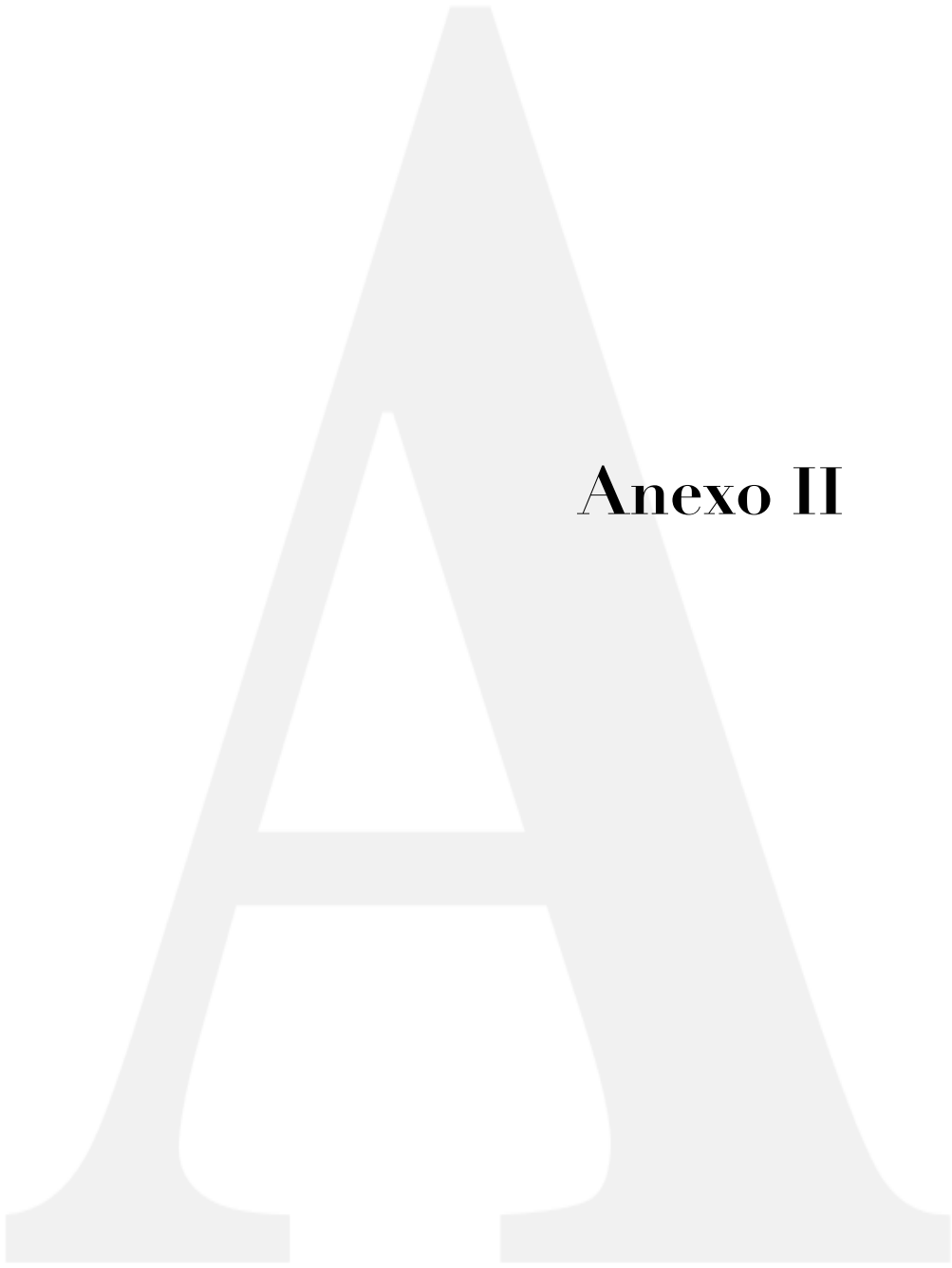
| Deleciones en TrkA | | |
|---------------------|-----|-------------------------------------|
| NOMBRE | | SECUENCIA 5'----- 3' |
| HA-TrkA IDR eco | Fw | CGCGTGAATTCAAAAGGGTGTCCATAAAG |
| | Rev | CACGTGAATTCACACCTTTTGGGGTCTCT |
| HA-TrkAecoJTM | Fw | CGCGTGAATTCGTTGAGCACTAGGAGGAG |
| | Rev | CACGCGAATTCATCATTCTCAAGTGGGAG |
| HA-TrkAecoKD | Fw | CGCGTGAATTCGATGTCCTGGCGCTTGAT |
| | Rev | CACGTGAATTCCTGCAGGCCTTGGCACAG |
| HA-TrkA JTM ecoR1 | Fw | CTCCTAGTGTCTCGAATTCCTGTGGACAGAGGAGC |
| | Rev | GCTCCTCTGTCCACAGAATTCGAGCACTAGGAG |
| HA-TrkA JTM ecoRI-2 | Fw | ATCAAGCGCCAGGAATTCATTCTCAAGTGGGAG |
| | Rev | CTCCCACTTGAGAATGAATTCCTGGCGCTTGAT |
| HA-TrkA 32aaECORI | Fw | GACAACCCTTTTGAATTCACCCTGAGGAC |
| | Rev | GTCCTCAGGGTTGAATTCAAAAGGGTTGTC |
| HA-TrkA 32aaECORI 2 | Fw | AAGAAGGACGAATTCCTTTTGGGGTC |
| | Rev | GACCCCAAAGGGAATTCGTCTCTCTT |
| HA-TrkA-P415C | Fw | AAGGACGAAACATGTTTTGGGGTCTCTGTG |
| | Rev | CACAGAGACCCCAAACATGTTTCGTCTCTT |

Mutantes de cisteína de TrkA

| NOMBRE | | SECUENCIA 5'----- 3' |
|---------------|---|----------------------------------|
| HA-TrKA-V408C | F | TCAAGAGACCCATGTGAGAAGAAGGAC |
| | R | GTCCTTCTTCTCACATGGGTCTCTTGA |
| HA-TrKA-E409C | F | AGAGACCCAGTGTGTAAGAAGGACGAA |
| | R | TTCGTCCTTCTTACACACTGGGTCTCT |
| HA-TrKA-K410C | F | GACCCAGTGGAGTGTGTAAGGACGAAACACCT |
| | R | AGGTGTTTCGTCCTTACACTCCACTGGGTC |
| HA-TrKA-K411C | F | CCAGTGGAGAAGTGTGACGAAACACCTTTT |
| | R | AAAAGGTGTTTCGTCACACTTCTCCACTGG |
| HA-TrKA-D412C | F | GTGGAGAAGAAGTGCGAAACACCTTTTGGG |
| | R | CCCAAAAGGTGTTTCGCACCTTCTTCTCCAC |
| HA-TrKA-E413C | F | GAGAAGAAGGACTGTACACCTTTTGGGGTCT |
| | R | GACCCAAAAGGTGTACAGTCCTTCTTCTCTC |
| HA-TrKA-T414C | F | AAGAAGGACGAATGTCCTTTTGGGGTCTCT |
| | R | AGAGACCCCAAAAGGACATTCGTCCTTCTT |
| HA-TrKA-P415C | F | AAGGACGAAACATGTTTGGGGTCTCTGTG |
| | R | CACAGAGACCCCAAAACATGTTTCGTCCTT |
| HA-TrKA-F416C | F | GACGAAACACCTTGTGGGGTCTCTGTGGCT |
| | R | AGCCACAGAGACCCACAAGGTGTTTCGTC |
| HA-TrKA-G417C | F | GAAACACCTTTTGTGTCTCTGTGGCTGTG |
| | R | CACAGCCACAGAGACACAAAAGGTGTTTC |
| HA-TrKA-V418C | F | ACACCTTTTGGGTGCTCTGTGGCTGTGGGC |
| | R | GCCACAGCCACAGAGACCCCAAAAGGTGT |
| HA-TrKA-S419C | F | CCTTTTGGGGTCTGTGTGGCTGTGGCCTG |
| | R | CAGGCCACAGCCACACAGACCCCAAAAGG |
| HA-TrKA-V420C | F | TTTGGGGTCTCTGTGTGTGGCCTGGCC |
| | R | GGCCAGGCCACAGCACAAGAGACCCCAAA |
| HA-TrKA-A421C | F | GGGGTCTCTGTGTGTGTGGCCTGGCCGTC |
| | R | GACGGCCAGGCCACACACACAGAGACCC |
| HA-TrKA-V422C | F | GTCTCTGTGGCTTGTGGCCTGGCCGTCTCC |
| | R | GGAGACGGCCAGGCCACAAGCCACAGAGAC |
| HA-TrKA-G423C | F | TCTGTGGCTGTGTGCCTGGCCGTCTCCGCC |
| | R | GGCGGAGACGGCCAGGCACACAGCCACAGA |
| HA-TrKA-L424C | F | GTGGCTGTGGGCTGTGCCGTCTCCGCCGCC |
| | R | GGCGGCGGAGACGGCACAGCCACAGCCAC |
| HA-TrKA-A425C | F | GCTGTGGCCTGTGCGTCTCCGCCGCC |
| | R | GGCGGCGGAGACGCACAGGCCACAGC |
| HA-TrKA-V426C | F | GTGGCCTGGCCTGCTCCGCCGCCCTC |
| | R | GAGGGCGGCGGAGCAGGCCAGGCCAC |

Mutantes de cisteína de TrkA

| NOMBRE | | SECUENCIA 5'----- 3' |
|---------------|---|---------------------------------|
| HA-TrKA-V408C | F | TCAAGAGACCCATGTGAGAAGAAGGAC |
| | R | GTCCTTCTTCTCACATGGGTCTCTTGA |
| HA-TrKA-E409C | F | AGAGACCCAGTGTGTAAGAAGGACGAA |
| | R | TTCGTCCTTCTTACACACTGGGTCTCT |
| HA-TrKA-K410C | F | GACCCAGTGGAGTGTAAAGGACGAAACACCT |
| | R | AGGTGTTTTCGTCCTTACACTCCACTGGGTC |
| HA-TrKA-K411C | F | CCAGTGGAGAAGTGTGACGAAACACCTTTT |
| | R | AAAAGGTGTTTTCGTCACACTTCTCCACTGG |
| HA-TrKA-D412C | F | GTGGAGAAGAAGTGCGAAACACCTTTTGGG |
| | R | CCCAAAGGTGTTTTCGCACTTCTTCTCCAC |
| HA-TrKA-E413C | F | GAGAAGAAGGACTGTACACCTTTTGGGGTC |
| | R | GACCCCAAAGGTGTACAGTCCTTCTTCTC |
| HA-TrKA-T414C | F | AAGAAGGACGAATGTCCTTTTGGGGTCTCT |
| | R | AGAGACCCCAAAAGGACATTCGTCCTTCTT |
| HA-TrKA-P415C | F | AAGGACGAAACATGTTTTGGGGTCTCTGTG |
| | R | CACAGAGACCCCAAACATGTTTCGTCCTT |
| HA-TrKA-F416C | F | GACGAAACACCTTGTGGGGTCTCTGTGGCT |
| | R | AGCCACAGAGACCCACAAGGTGTTTCGTC |
| HA-TrKA-G417C | F | GAAACACCTTTTGTGTCTCTGTGGCTGTG |
| | R | CACAGCCACAGAGACACAAAAGGTGTTTC |
| HA-TrKA-V418C | F | ACACCTTTTGGGTGCTCTGTGGCTGTGGGC |
| | R | GCCACAGCCACAGAGCACCCAAAAGGTGT |
| HA-TrKA-S419C | F | CCTTTTGGGGTCTGTGTGGCTGTGGGCCTG |
| | R | CAGGCCACAGCCACACAGACCCCAAAGG |



Anexo II

Índice de figuras que he elaborado en las publicaciones realizadas dentro del periodo de doctorado.

1. [TrkA-mediated endocytosis of p75-CTF prevents cholinergic neuron death upon gamma-secretase inhibition. 2021 Life Sci Alliance, 4\(4\).](#)
 - 1.1 **FIGURA 1F,G,H,I.** γ -secretase inhibition drives to p75CTF dimerization and cell death.
 - 1.2 **FIGURA 2.** Cysteine-257 increases p75CTF internalization and turnover.
 - 1.3 **FIGURA 4.** TrkA reduces p75-CTF-induced cell death.
 - 1.4 **FIGURA 5.** p75-CTF oligomerization at the plasma membrane induces cell death.
 - 1.5 **FIGURA 6.** p75-CTF recruits TRFA6 to activate JNK and p38 signaling cascades.



2. [Interaction between the transmembrane domains of neurotrophin receptors p75 and TrkA mediates their reciprocal activation. 2021. J Biol Chem, 297\(2\), 100926.](#)
 - 2.3. **FIGURA 5.** TrkA activation is modulated by p75-TMD

3. [Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. 2019. J Biol Chem, 295\(1\), 275-286.](#)
 - 3.1. **FIGURA 2.** Functional identification of the active dimer interface in the TRKA-TMD.
 - 3.2. **FIGURA 3.** Lys⁴¹⁰ and Lys⁴¹¹ of eJTM are cross-linked with BS3 upon NGF binding.
 - 3.3. **FIGURA 4.** A preferred dimer interface in the TRKA juxtamembrane region.
 - 3.4. **FIGURA 5.** Rotation of the TRKA-TMD as a mechanism of TRKA activation by NGF.

4. [Causing Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis \(CIPA\) Induce Misfolding, Aggregation, and Mutation-dependent Neurodegeneration by Dysfunction of the Autophagic Flux. J Biol Chem, 291\(41\), 21363-21374.](#)
 - 4.1. **FIGURA 2.** Inactivation of the signaling and neurite differentiation mediated by TrkA mutations
 - 4.2. **FIGURA 3.** TrkA CIPA mutants have impaired traffic to the plasma membrane.
 - 4.3. **FIGURA 4.** TrkA CIPA mutants are retained in the ER.
 - 4.4. **FIGURA 5.** TrkA CIPA mutations induce protein misfolding and aggregation.
 - 4.5. **FIGURA 6.** TrkA constructs have different degradation kinetics and differential sensitivity to proteasome and lysosome inhibitors.
 - 4.6. **FIGURA 7.** TrkA CIPA mutants induce the autophagic flux.
 - 4.7. **FIGURA 8.** Cell toxicity of TrkA CIPA mutations in PC12nnr5 cells.
 - 4.8. **FIGURA 9.** Presence of AVs and dystrophic neurites in L213P-transfected embryonic cortical neurons.



TrkA-mediated endocytosis of p75-CTF prevents cholinergic neuron death upon γ -secretase inhibition

María Luisa Franco^{1,*}, Irmina García-Carpio^{1,*}, Raquel Comaposada-Baró¹ , Juan J Escribano-Saiz¹,
Lucía Chávez-Gutiérrez², Marçal Vilar¹ 

γ -secretase inhibitors (GSI) were developed to reduce the generation of A β peptide to find new Alzheimer's disease treatments. Clinical trials on Alzheimer's disease patients, however, showed several side effects that worsened the cognitive symptoms of the treated patients. The observed side effects were partially attributed to Notch signaling. However, the effect on other γ -secretase substrates, such as the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) has not been studied in detail. p75^{NTR} is highly expressed in the basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) during all life. Here, we show that GSI treatment induces the oligomerization of p75CTF leading to the cell death of BFCNs, and that this event is dependent on TrkA activity. The oligomerization of p75CTF requires an intact cholesterol recognition sequence (CRAC) and the constitutive binding of TRAF6, which activates the JNK and p38 pathways. Remarkably, TrkA rescues from cell death by a mechanism involving the endocytosis of p75CTF. These results suggest that the inhibition of γ -secretase activity in aged patients, where the expression of TrkA in the BFCNs is already reduced, could accelerate cholinergic dysfunction and promote neurodegeneration.

DOI [10.26508/lsa.202000844](https://doi.org/10.26508/lsa.202000844) | Received 8 July 2020 | Revised 11 January 2021 | Accepted 11 January 2021 | Published online 3 February 2021

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by cognitive deficits and is one of the most commonly diagnosed types of dementia. Amyloid plaques are one of the neuropathological hallmarks of AD and are comprised of misfolded A β peptides. A β peptides are generated by sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by the β - and the γ -secretases. Mutations in the γ -secretase and APP cause autosomal dominant, early onset AD (De Strooper & Chávez Gutiérrez, 2015). Owing to its involvement in the production of A β production and close link to AD pathogenesis, γ -secretases have been considered to be one of the most promising targets as AD

therapeutics. The development of γ -secretase inhibitors (GSIs) was in fact an area holding great expectations. GSIs were used in clinical trials to reduce the production of A β in AD patients. The GSI semagacestat (LY450139) Phase 3 clinical trial (Hopkins, 2010) was stopped because of adverse effects (such as increased risk of skin cancer) and a worsening of memory in the GSI treated group (Doody et al, 2013). The main reason of such failure likely relies on the fact that γ -secretases do not only process APP but also cleave many other type 1 transmembrane proteins (De Strooper & Chávez Gutiérrez, 2015), and thus, the concomitant GSI-mediated inhibition of the cleavage of other substrates of γ -secretase likely caused the observed undesirable consequences. The inhibition of the cleavage of Notch received great attention (Olsauskas-Kuprys et al, 2013; De Strooper, 2014); however, the impact that semagacestat could have had on other γ -secretase substrates is unclear. Although essential during development, Notch function in the adult central nervous system (CNS) is highly restricted to the population of neural stem cells and probably other substrates could better explain the worsening of the cognitive function seen in the clinical trial. One of the physiologically relevant substrates of γ -secretase in the brain is the p75 neurotrophin receptor. The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) is a member of the TNF receptor superfamily (Ibáñez & Simi, 2012; Bothwell, 2014), and it is best known by its role in programmed neuronal death during development or in response to injury in the adult brain (Ibáñez & Simi, 2012). It also regulates axonal growth and synaptic plasticity, as well as cell proliferation, migration, and survival (Kraemer et al, 2014; Vilar, 2017). These functions can be elicited by the association of p75^{NTR} with different ligands and co-receptors leading to the activation of various signaling pathways (Roux & Barker, 2002). Importantly, p75^{NTR} is highly expressed in the basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) during all stages of their development, a neuronal population well known for their involvement of complex cognitive tasks via their innervation to the cortex and hippocampus.

p75^{NTR} undergoes regulated intramembrane proteolysis (RIP) (Kanning et al, 2003; Jung et al, 2003), a two-step process that

¹Molecular Basis of Neurodegeneration Unit, Institute of Biomedicine of València (IBV-CSIC), València, Spain ²Vlaams Instituut voor Biotechnologie Katholieke Universiteit (VIB-KU) Leuven Center for Brain and Disease, Leuven, Belgium

Correspondence: mvilar@ibv.csic.es

Irmina García-Carpio's present address is Division of Developmental Immunology, Biocenter, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

*María Luisa Franco and Irmina García-Carpio contributed equally to this work

involves the sequential cleavage of p75^{NTR} by the α - and γ -secretases (Fig 1A). The α -secretase activity is mediated by TACE/ADAM-17, a member of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) family (Weskamp et al, 2004; Bronfman, 2007) and generates a C-terminal membrane-anchored fragment (p75-CTF). In vivo p75^{NTR} shedding was described for the first time in Schwann cells after axotomy (DiStefano & Johnson, 1988). In vitro, p75^{NTR} shedding is induced by protein kinase C activators, such as phorbol esters (Kanning et al, 2003), or by the activation of TrkA (Urta et al, 2007; Ceni et al, 2010). The p75-CTF is further processed by the γ -secretase that cleaves the transmembrane domain between Val264 and Val265 to release a soluble intracellular fragment (ICD) (Jung et al, 2003; Kanning et al, 2003). Moreover, overexpression of p75^{NTR} CTF in a form that cannot be processed by γ -secretase has been proven to promote cell death in neurons, indicating that p75^{NTR} CTF processing and clearance from the membrane relies on γ -secretase activity (Coulson et al, 2008). Of note, covalent p75^{NTR} dimerization, through the evolutionary conserved transmembrane cysteine residue, present in its transmembrane domain (Vilar et al, 2009b; Nadezhdin et al, 2016), is required for the induction of cell death upon stimulation by pro-neurotrophins in vitro and in vivo (Vilar et al, 2009b; Tanaka et al, 2016).

Here, we found that γ -secretase activity processes p75-CTF only in monomeric status, suggesting that the dimerization/oligomerization of p75-CTF represents a mechanism that regulates its clearance from the membrane. Interestingly, we show that the inhibition of γ -secretase increases the levels of p75-CTF and promotes the formation of p75-CTF oligomers which in turn leads to exacerbated toxicity. Finally, we demonstrate that the activation of TrkA abolishes p75-CTF oligomerization and protects from cell death by promoting the endocytosis of p75-CTF. In conclusion, our results reveal a novel mechanism underlying the RIP of p75, where the oligomerization of the receptor (substrate) and its subcellular location protects it from γ -secretase-mediated processing and exacerbates its deadly function.

Results

p75-CTF disulfide dimerization contributes to cell death

RIP of p75^{NTR} is required for signaling. Endogenously, generation of CTF correlates with rapid p75^{NTR}-mediated apoptosis upon injury conditions (Coulson et al, 2000; Sothibundhu et al, 2008). To determine the contribution of different protein degradation pathways to the turnover of p75^{NTR} upon RIP, we took advantage of a truncated p75^{NTR} construct that mimics the endogenously generated CTF (p75-CTF) and performed cycloheximide chase experiments in HeLa cells (Fig 1B). Consistently with previous reports (Kanning et al, 2003), proteasomal inhibition with epoxomicin caused an accumulation of p75-ICD, the later was abolished by treatment with GSIs compound E (CE, Fig 1B) or semagacestat, SG (Fig S1A). Interestingly, the treatment with autophagy (wortmannin, W) (Fig 1B) and lysosomal inhibitors (NH₄Cl) (Fig S1A) did not affect p75-CTF turnover or p75-ICD stability in HeLa cells (Fig 1C). Our results were recapitulated in the endogenous p75^{NTR} from PC12 cells (Fig S1B) thus supporting the conclusion that p75-CTF processing and clearance from the membrane relies on γ -secretase activity.

Next, we turned our attention to the p75-CTF activity. The mechanism underlying p75-CTF toxicity and its role in cell death

induction is not fully understood. p75^{NTR} dimerization through the Cys²⁵⁷ has been described as an essential process for p75^{NTR}-mediated cell death in response to neural insults (Vilar et al, 2009b; Tanaka et al, 2016). Here, we assessed p75^{NTR}-CTF dimerization in conditions that elevate its steady-state levels. First, we evaluated the contribution of Cys²⁵⁷ in the formation of these dimers and in p75^{NTR} CTF processing by γ -secretase. HeLa cells were transfected to express the p75-CTF fragment or a mutated version unable to form disulfide covalent bonds (p75-CTF-C257A). Cultures were then incubated overnight in the presence of the GSI CE to induce CTF accumulation (lanes indicated as 16 h in Fig 1D and E). Given that substrate recognition and processing by γ -secretase takes place in the intramembranous space, we assessed γ -secretase function in total membrane fractions. This is an alternative and well-validated cell-free system for the study of γ -secretase activity (Chávez-Gutiérrez et al, 2008). Overnight inhibition of γ -secretase activity prevented CTF degradation and resulted in the accumulation of p75-CTF dimers of the wt fragment but not of the C257A mutant (lanes 3, 4 and 7, 8 in Fig 1D and E). This indicates that p75-CTF dimerizes through the transmembrane Cys²⁵⁷ and furthermore, it does it in a concentration-dependent manner. Isolated membranes from untreated or inhibitor-treated cells were incubated at 37°C for 1 h in absence or presence of CE (indicated as -/+ in Fig 1D and E, respectively) and analyzed under nonreducing conditions by Western Blot. Incubation of non-GSI treated membrane fractions at 37°C showed that endogenous γ -secretase was able to process both wt and C257A p75-CTF substrates in similar extents. Remarkably, p75-CTF accumulation after 16 h of GSI/CE treatment promoted dimer formation, but the elevation in the γ -secretase substrate did not lead to an increase in the generation of p75-ICD, suggesting that the p75^{NTR} CTF dimers are not contributing to the generation of p75-ICD (Fig 1D, lanes 1 and 3).

Next, we analyzed P2 mice isolated dorsal root ganglia (DRG) neurons that express endogenous levels of p75^{NTR}, treated for 24 h with the GSI CE. Nonreducing SDS-PAGE Western blotting showed that, upon γ -secretase inhibition, the endogenously produced p75^{NTR} CTF accumulates as monomers and dimers (Fig 1F). This demonstrates that p75^{NTR} CTF dimers are formed from endogenous levels in neurons undergoing γ -secretase inhibition.

We next transfected mouse cortical neurons, which do not express significant levels of p75^{NTR} in cell culture, with different p75^{NTR} constructs to analyze apoptosis induction by caspase-3 cleavage (Fig 1G and H). Overexpression of p75^{NTR} constructs (p75^{NTR} full length or CTF, Fig 1I) induced a significant increase in cell death in the presence of CE. Of note, this cell death correlates with CTF accumulation upon CE treatment, as it is shown by immunoprecipitation of the different p75^{NTR} constructs transfected (Fig 1I). This supports the idea that the p75-CTF by itself is sufficient to mediate apoptosis. The significant increment in cell death observed in p75-CTF-wt overexpressing neurons relative to the mutant, suggests a partial, but significant, contribution of the cysteine residue to the p75-CTF-mediated toxicity.

p75-CTF disulfide dimers decrease protein turnover

To further understand the role of the Cys²⁵⁷ in p75-CTF-mediated cell death upon γ -secretase inhibition, we analyzed the stability of p75-CTF-C257A in a cycloheximide chase experiment (Fig 2A). Cycloheximide blocks protein synthesis in eukaryotic cells and

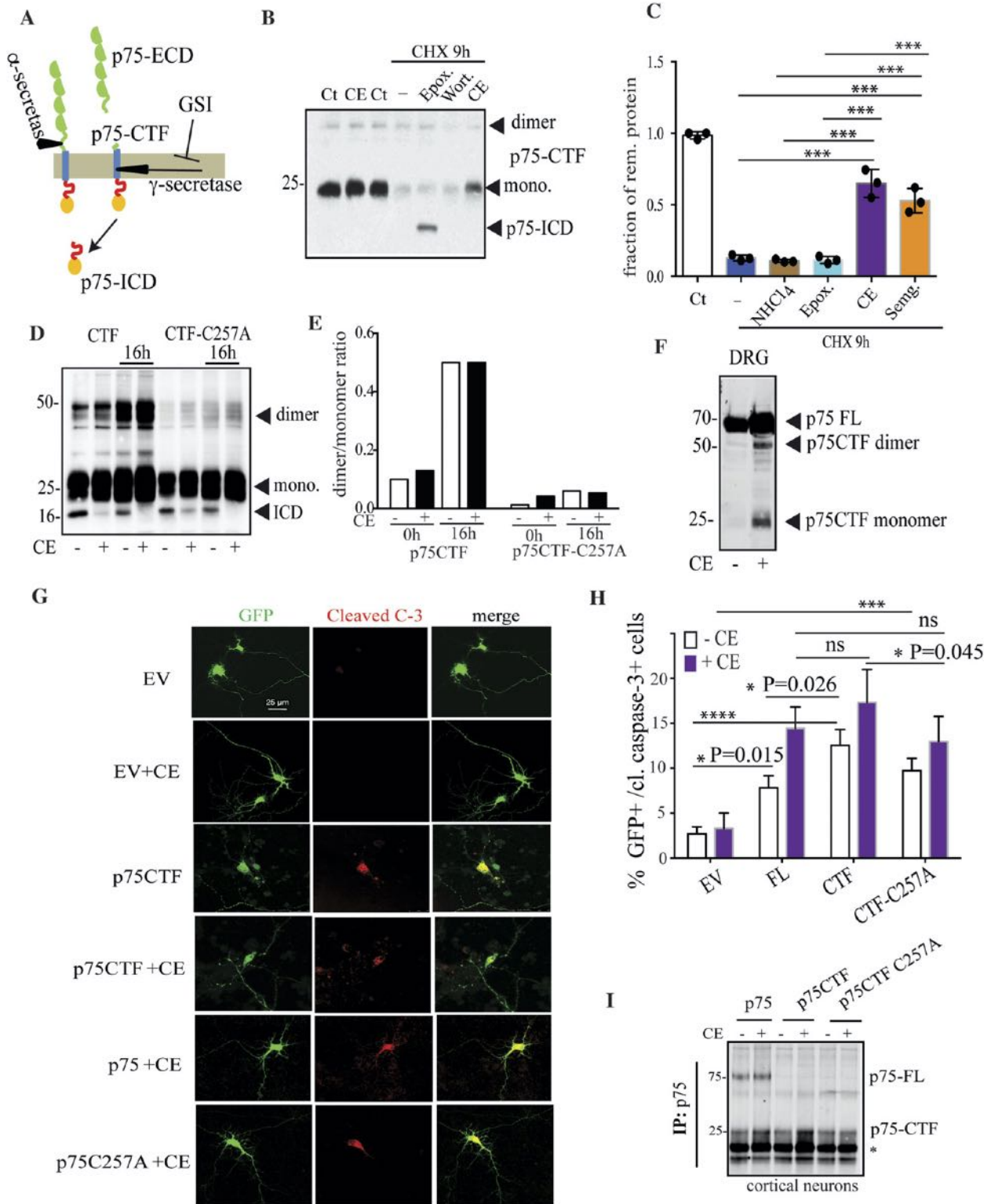


Figure 1. γ -secretase inhibition drives to p75CTF dimerization and cell death.

(A) Schematic overview of p75 regulated intramembrane proteolysis by α - and γ -secretases. (B, C) Expression levels of p75-CTF in HeLa cells transiently transfected with HA-p75-CTF and incubated with cycloheximide (5 μ g/ml) for 9 h in the absence or presence of inhibitors of different protein degradation pathways (see text). Western blotting and densitometric analysis of p75-CTF remaining protein indicate that its turnover is mostly mediated by γ -secretase activity and not by lysosomal or proteasomal degradation. To determine the specific activity for the different inhibitors, p75-CTF levels were normalized with respect to transfected untreated cells (Ct). (D) de novo p75-ICD generation from purified total membranes prepared from HeLa cells transfected with the indicated constructs and detected with p75^{NTR} antibody. Transfected

accordingly enables to estimate the protein half-life. Quantification of the turnover rates showed that wt p75-CTF presents a significant higher half-life than the mutant p75-CTF-C257A, and this difference increases in the presence of the GSI (two-way ANOVA analysis; time factor $F(3, 6) = 970.9$ $P < 0.0001$; mutant factor $F(3, 6) = 59.22$, $P < 0.0001$; both factors $F(9, 18) = 60.1$ $P < 0.0001$) (Fig 2B). Interestingly, the analysis of cycloheximide chase experiments under nonreducing conditions revealed that p75-CTF dimers were resistant to degradation over time and suggested that their formation decreases protein turnover (Fig 2C).

TrkA promotes p75CTF internalization in a ligand-dependent manner

It has been shown that p75-CTF is internalized and cleaved by γ -secretase in endosomes (Urrea et al, 2007). Therefore, we wondered whether the covalent dimer formation played a role in its internalization and turnover. To address this point, HEK293 cells were transfected with different HA-tagged p75-CTF constructs and incubated at 37°C for 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min for different time points (Fig 2D). Analysis of p75-CTF location by immunofluorescence showed a significant faster constitutive internalization of p75-CTF-C257A proteins compared with p75-CTF (two-way ANOVA analysis; time factor $F(5, 10) = 335.3$ $P < 0.0001$; mutant factor $F(3, 6) = 46.91$, $P = 0.0001$; both factors $F(11, 74) = 15.30$ $P < 0.0001$) (Fig 2E).

In several neuronal cell types p75^{NTR} is co-expressed with one member of the Trk family. TrkA is usually co-expressed with p75^{NTR} in sympathetic and DRG neurons as well as in the PC12 cell line. To study the role of TrkA in p75CTF internalization, we transfected HEK293 with TrkA and p75-CTF or TrkA and p75-CTF-C257A and quantify the internalization of the CTF after NGF stimulation. Quantification of Fig 2D shows that in the presence of TrkA, the wt p75-CTF is more rapidly internalized upon stimulation with NGF, relative to the p75-CTF alone (no TrkA) or to TrkA but no NGF stimulation (Fig 2E). The mutant p75-CTF-C257A is internalized more slowly in the presence of TrkA than in its absence (Fig 2D and E). Inhibition of TrkA activity with the Trk-specific inhibitor K-252a or with amiloride, a specific inhibitor of macropinocytosis, inhibits p75CTF internalization (Fig 2F). To further prove the role of TrkA in p75CTF internalization, we co-transfected HA-p75-CTF and TrkA in 293T cells and measured the percentage of cells expressing surface p75CTF before and after incubation with NGF. Flow cytometry analysis of HA-positive cells, showed a decrease in cells presenting p75CTF at the surface upon co-expression with TrkA, in a ligand-

dependent manner (Fig S2A and B). These results indicate that the internalization of p75CTF is promoted by NGF-mediated activation of TrkA, and not just by TrkA expression.

To further support that TrkA is able to mediate the internalization of p75CTF we transfected PC12 (expressing endogenous TrkA levels) and PC12nnr5 cells (that do not express TrkA) with the HA-tagged wt p75CTF construct. We then quantified wt p75CTF internalization upon NGF stimulation. As shown in Fig 2G and H, NGF triggered p75CTF internalized in the PC12 cells line after 60 min, but the treatment did not cause p75CTF internalization in the PC12nnr5 cell line in the same time frame.

Altogether, these results indicate that the NGF-mediated activation of TrkA promotes p75CTF internalization in a ligand-dependent manner.

p75-CTF dimers are not cleaved by γ -secretase

Our initial findings suggested that endogenous γ -secretase was not processing naturally occurring covalent dimers of p75-CTF (Fig 1D). To further analyze these findings, we benefit from an in vitro approach, where the purified substrate and enzyme are used. Given that γ -secretase substrate recognition and cleavage takes place in the intra-membranous space, we generated different constructs containing the p75^{NTR} transmembrane domain and juxtamembrane region, fused to a C-terminus triple FLAG tag sequence that facilitate its purification and detection, C101-p75-wt-3xFlag (Fig 3A). These constructs are reminiscent to the C99 construct generated by the β -secretase activity from APP, C99-APP-3xFlag (Chávez-Gutiérrez et al, 2008). Western blot analyses of the purified wt and C257A mutant peptides showed that C101-p75-wt, but not C101-p75-C257A, form DTT-sensitive disulfide dimers (Fig 3B).

We then analyzed the γ -secretase-mediated processing of the wild-type and mutant C101 fragments by co-incubating them with purified γ -secretase complex (Chávez-Gutiérrez et al, 2012). Monitoring of the γ -secretase cleavage was followed by quantification of the c-terminal fragment product (Δ ICD-3xFLAG) levels. As γ -secretase activity positive control, we followed the endoproteolytic cleavage of C99-APP-x3FLAG (Fig 3C). The presence of the GSI X (a transition state-analogue) inhibited the generation of the Δ ICD-3xFLAG, demonstrating the specificity of the proteolytic reactions. Remarkably, the dimeric C101-p75-wt substrate, but not the monomeric C101-p75 and C101-p75-C257A, was resistant to γ -secretase cleavage. Furthermore, whereas DTT treatment of the mutant C257A C101-p75 substrate did not affect γ -secretase activity, the

cells were first incubated overnight (16 h) in the presence or absence of CE (10 μ M) to induce CTF accumulation. Overnight γ -secretase inhibition unequivocally drives to p75-CTF dimerization in a concentration-dependent manner. Total membranes from these cells were purified and incubated for 1 h at 37°C in the presence or absence of CE (indicated as +/- in the figure). Membrane lysates analyzed under nonreducing conditions show specific p75-ICD generation by endogenous γ -secretase in both wt and mutant C257A p75-CTF. (E) Quantification of the Western blot showing the ratio dimer/monomer of p75CTF in the different conditions (n = 1). (F) Dorsal root ganglia from P2 mice were isolated and incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence of CE (10 μ M). Lysate analysis under no reducing conditions demonstrates p75CTF endogenous dimerization. (G) Representative microscopy images show caspase-3 cleavage immunostaining of isolated mice cortical neurons transiently overexpressing control GFP or p75-CTF and GFP after 48-h incubation at 37°C with CE (10 μ M). (H) Apoptotic cell death was determined for the expression of the different p75^{NTR} constructs as the percentage of GFP caspase-3-cleaved positive cells in the presence or absence of CE. Cell death in transfected cortical neurons shows a small but significant reduction in the p75-CTF-C257A mutant with respect to the wt. (I) Western blot of the p75-specific antibody immunoprecipitated lysates from transfected cortical neurons with the indicated constructs. * Immunoglobulin light chain. The data are shown as mean \pm SD, N = 3 independent experiments. Per experiment, all GFP+ neurons per well were counted. In total, more than 50 transfected neurons were quantified per condition. (C, G) t test (C) and two-way ANOVA followed by Tukey's post-test (G) were used to determine the statistical significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Source data are available for this figure.

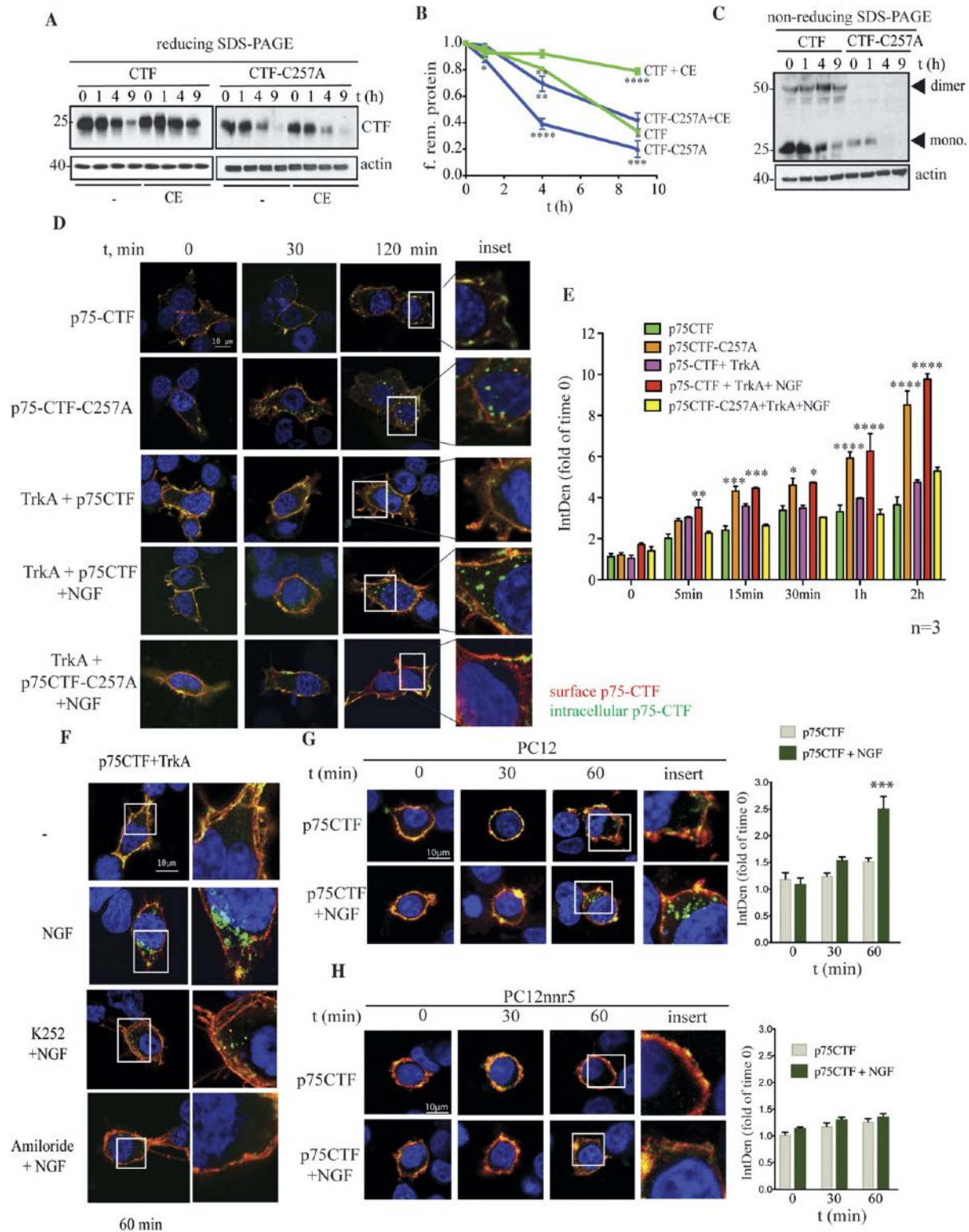


Figure 2. Cysteine-257 increases p75CTF internalization and turnover.

(A) Representative SDS-PAGE/Western blot from cycloheximide chase analysis of HeLa cells transiently expressing wt or mutant p75-CTF, in the absence or presence of CE (10 μ M). (B) Quantification of the effect of p75 Cys257 substitution in γ -secretase processivity of CTF. p75-CTF remaining protein was calculated with respect to untreated cells (0 h) to determine its processing over time. (C) Mutation of Cys at position 257 decreases p75-CTF stability. Nonreducing SDS and Western blotting analysis of cycloheximide chase experiment in transfected HeLa cells reveal that p75-CTF dimers are resistant to degradation over time. Arrowheads indicate p75-CTF monomers' and dimers' position. (D) Representative confocal images of kinetic internalization experiments in HEK293 cells expressing wt or mutant HA-p75-CTF constructs in the

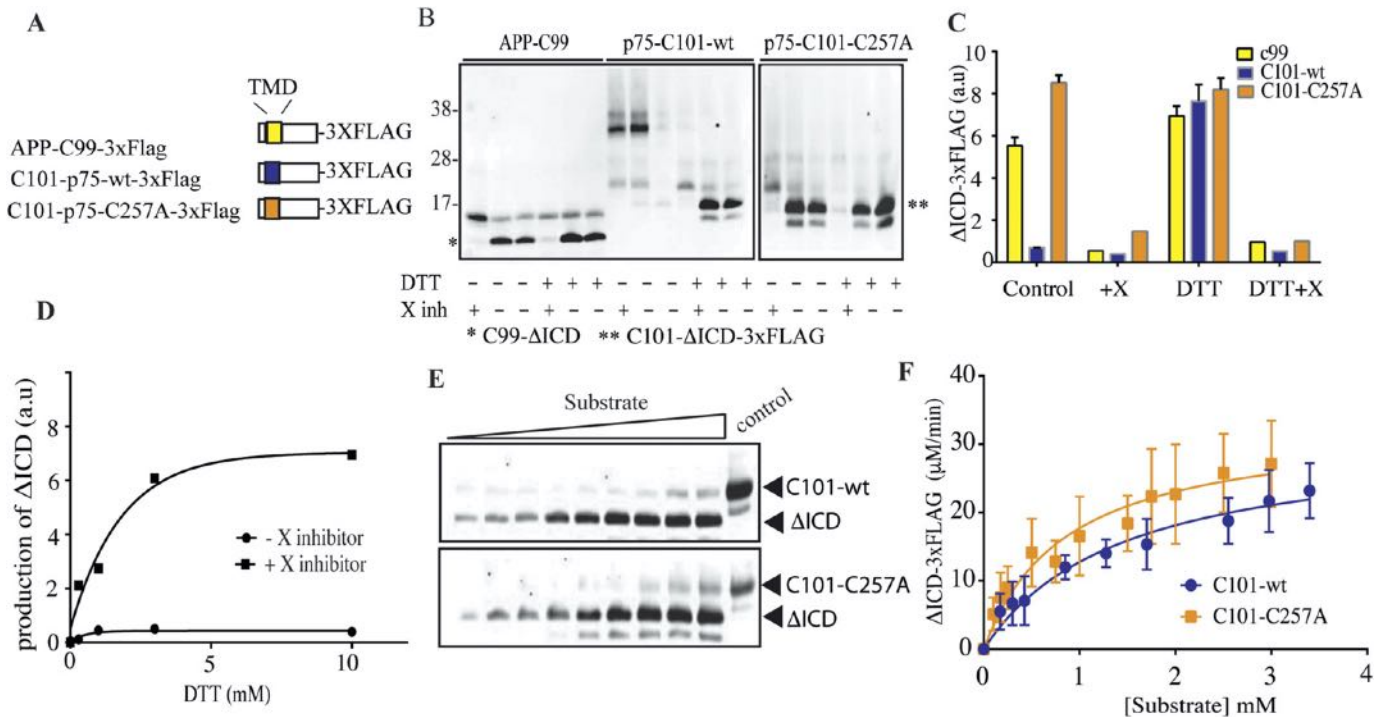


Figure 3. p75 disulfide dimers are not processed by γ -secretase.

(A, B) Schematic representation of the purified constructs (B). In vitro activity assays with purified human γ -secretase and APP-C99, p75-C101-wt, and p75-C101-C257A substrates incubated for 1 h in the presence or not of DTT reducing agent (20 mM) and γ -secretase inhibitor X (10 μ M). (*) and (**) indicate C99- Δ ICD and C101- Δ ICD-3xFLAG product bands, respectively. (C) Total Δ ICD-3xFLAG product levels analyzed by quantitative Western immunoblot reveal that only reduced p75-C101-wt substrates are processed by γ -secretase. (D) In vitro activity assays using purified human γ -secretase and p75-C101-wt over a DTT gradient. Notice that increasing DTT concentrations favor C101-wt processing. (E) Western blot of de novo Δ ICD-3xFLAG generated from C101-wt and C101-C257A at 37°C upon incubation with the purified γ -secretase. (F) Δ ICD-3xFLAG product generation was fit with a Michaelis-Menten model. Processing of C101 substrates into Δ ICD (mean \pm SEM) fit with Michaelis-Menten model (fit \pm 95% CI) indicates similar values for C101-wt and C257A monomeric substrates. Kinetic parameters were obtained using the GraphPad Prism 6 software and are shown in Table 1. Bars represent the standard errors.

γ -secretase endoproteolytic cleavage of C101-p75-wt was increased in a DTT-concentration dependent manner, indicating that the reduction in the disulfide bond is necessary for γ -secretase endoproteolytic cleavage (Fig 3D).

To evaluate the catalytic efficiency of γ -secretase under equal kinetic conditions, we performed in vitro activity assays at 1 μ M substrate concentration for C101-p75 and C101-p75-C257A previously DTT reduced substrates. Under these reduction conditions, the kinetic parameters of C101-p75-wt and C101-p75-C257A exhibit similar values, suggesting that in monomeric state, both wt and C257A mutant are equally processed by γ -secretase (Fig 3E and F and Table 1).

Altogether, our data indicate that covalent disulfide-linked p75-CTF dimers are resistant to γ -secretase processing, this feature results in the increased accumulation of dimeric forms and concomitant exacerbated induction of cell death.

TrkA reduces p75-CTF-induced cell death

Studies with sensory and motor neurons have shown that during normal aging, there is a progressive increase in p75^{NTR} expression that is accompanied by a parallel decrease in TrkA levels (Bergman et al, 1999; Johnson et al, 1999). The lowering in TrkA expression during aging, when considering the role of TrkA in mediating p75CTF internalization showed above, may be physiologically relevant in the neuronal death mediated by p75-CTF. To explore the role that TrkA plays in the prevention of p75-mediated cell death, we took advantage of PC12 cells and their variant PC12nnr5. These cells closely resemble sympathetic ganglion neurons but, as mentioned above, whereas PC12 cells express physiological levels of p75 and TrkA, the mutant PC12nnr5 variant does not express TrkA (Loeb et al, 1991). Cell treatment with the GSI CE for 72 h caused an increase in the percentage of PC12nnr5 apoptotic cells, as shown by caspase-3

absence or presence of TrkA plus NGF. Transfected cells were treated with NGF (50 ng) for the indicated times and immunostained for cell surface (Alexa 555) and intracellular (Alexa 488) p75-CTF. Higher magnification is shown at the 120-min time point. (E) Quantitative analysis of the confocal images of panel (D) shows a higher internalization of p75-CTF C257A mutant respect the wt. (F) Inhibition of p75-CTF internalization in the presence of the Trk inhibitor K-252a or the macropinocytosis inhibitor amiloride in HEK293 cells. (G, H) Representative confocal images of kinetic internalization experiments in PC12 and PC12nnr5 cells expressing wt or mutant HA-p75-CTF constructs in the absence or presence NGF. All the data are represented as mean \pm SEM, N = 3. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test were used to determine the statistical significance, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Table 1. Kinetic parameters of p75-CTF and p75-CTF-C257A cleavage.

| | P75-CTF | P75-CTF-C257A |
|--------------------------|--------------|---------------|
| Vmax (pM/min) | 31.26 ± 3.97 | 33.03 ± 4.22 |
| KM (mM) | 1.449 ± 0.43 | 0.864 ± 0.30 |
| 95% Confidence intervals | | |
| Vmax | 23.09–39.43 | 24.42–41.64 |
| KM | 0.5563–2.342 | 0.2566–1.473 |

cleavage immunofluorescence (Fig 4A and B). In contrast, PC12 cells did not exhibit any significant increase in cell death upon inhibition of γ -secretase. In these cell lines, p75^{NTR} processing is physiologically regulated by RIP and accordingly, γ -secretase inhibition with CE induced p75CTF accumulation (Fig 4C). Interestingly, incubation with CE induced the formation of p75 oligomers that were cross-linked with the membrane impermeable cross-linker BS3, in PC12nnr5 but not in PC12 cells (Fig 4C). We also observed that apoptosis is accompanied by a significant increase in phosphorylated p38 levels in PC12nnr5 cells, an increment that is not seen in PC12 cells (Fig 4D and E).

We note that PC12 and PC12nnr5 cells are not necessarily the same cell line and other hidden mutations, further than the lack of TrkA, could affect the results. Therefore, we performed a rescue experiment by transiently re-expressing TrkA in PC12-nnr5 cells (Fig 4F and G). PC12-nnr5 cells were transfected either with TrkA+GFP or with just GFP as a control (Fig 4G) and subjected to GSI CE treatment for 72 h. Consistently with our previous results, γ -secretase inhibition significantly increased the percentage of cleaved caspase-3/GFP positive cells in the control PC12nnr5 cells (Fig 4H). However, TrkA re-expression rescued the cells from p75-mediated cell death upon γ -secretase inhibition (Fig 4H).

TrkA activation disrupts p75-CTF oligomerization at specific plasma membrane domains

To explore the mechanism of p75CTF-mediated cell death and its inhibition by TrkA, we determined the oligomerization state of p75CTF at the plasma membrane. In vivo studies using the membrane-impermeable cross-linker BS3 showed that p75-CTF-transfected HeLa cells present dimers (ca 50 kD), tetramers (100 kD), and oligomers (>200 kD) in their plasma membrane, indicating cross-linking events between the lateral association of monomers and dimers (Fig 5A). To rule out that isolated p75-CTF overexpression may induce the formation of aberrant oligomers, HeLa cells were transfected with full-length p75^{NTR} (p75-FL) and stimulated with PMA to induce the CTF generation. BS3 cross-linking experiments in these cells mimicked the results of p75-CTF overexpression (Fig 5B), indicating that oligomers formation at the plasma membrane also takes place when the p75-CTF levels are controlled by the endogenous α -secretase.

To evaluate TrkA contribution to p75-CTF oligomerization and toxicity, we quantified the p75-CTF oligomerization degree in HeLa cells co-transfected with TrkA. Enhanced stabilization of p75-CTF membrane oligomers by BS3 cross-linking in vivo showed that co-expression with TrkA significantly depleted p75-CTF dimers and

multimers (two-way ANOVA analysis; construct factor $F(3, 6) = 772 P < 0.0001$; BS3 treatment factor $F(1, 2) = 954, P = 0.0001$; both factors $F(3, 6) = 138 P < 0.0001$) (Fig 5C and D).

Protein oligomerization in membranes can be regulated by many factors, being one of them the membrane lipid composition. In this regard, several studies implicate cholesterol as a major player in protein oligomerization (Paladino et al, 2004; Ishitsuka & Kobayashi, 2007). Interestingly, p75-CTF has been localized to cholesterol-rich regions at the plasma membrane (Underwood et al, 2008), where γ -secretase activity concentrate (Matsumura et al, 2014). We identified a putative cholesterol recognition/interaction amino acid consensus sequence (CRAC) of the form (L/V)-X₁₋₅-(Y)-X₁₋₅-(K/R) in the trans-membrane domain of p75^{NTR} (Fig 5E). Of note, the tyrosine residue of CRAC motifs plays a key role in the interaction of cholesterol with different proteins (Fantini & Barrantes, 2013). Thus, we mutated the CRAC motif of p75^{NTR} (to generate a mutant p75CTF (AxxAxxA)) to address its relevance on p75-CTF oligomerization (Fig 5E and F). The analyses showed that CRAC motif mutation in p75-CTF disrupts oligomer formation in the plasma membrane as showed by BS3 cross-linking experiments (Fig 5F).

As cholesterol-rich domains are locations where receptor endocytosis takes place and taking into account that TrkA reduces oligomer formation and mediates p75CTF internalization (Fig 2), we asked which pathways could be induced by TrkA to favor p75CTF internalization. It has been shown that phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) may play an important role in receptor internalization (Jost et al, 1998; Brown, 2015). We first wondered if modulation of the total levels of PIP₂ plays any role in p75CTF oligomerization and internalization. Indeed, co-expression of p75CTF with synaptojanin, a PIP₂ phosphatase, reduced p75CTF oligomerization (Fig 5F) and increased p75CTF internalization (Fig 5S3A and B). As the activation of TrkA by NGF regulates the levels of PIP₂ by the activation of the PI3K and PLC γ pathways (Soltoff et al, 1992), we further study the disruption of p75-CTF oligomerization by the use of different TrkA mutants (Fig 5G and H). Mutant TrkA receptors lacking the whole extracellular domain (TrkA- Δ ECD) or just the immunoglobulin domains (TrkA- Δ Ig), have been reported to render a constitutively active TrkA receptor (Arevalo et al, 2000), whereas on the other hand, deletion of the extracellular or intracellular juxtamembrane regions (TrkA- Δ eJTM or TrkA- Δ JTM, respectively), inactivate TrkA response to NGF. Co-expression of p75-CTF and TrkA mutants showed that constitutive activation of TrkA completely disrupted p75-CTF oligomerization. Notably, co-expression with inactive TrkA constructs (TrkA- Δ eJTM or TrkA- Δ JTM) did not affect p75-CTF multimerization (Fig 5H).

In agreement with these results, overexpression of the wt TrkA, that activates the kinase activity of TrkA (Fig 5I), or the constitutively active TrkA- Δ Ig construct (Fig 5I) abrogated p75-CTF-mediated cell death upon γ -secretase inhibition (Figs 5J and S4), whereas the inactive TrkA- Δ eJTM form (Fig 5I) failed to rescue the apoptotic phenotype in these cells (two-way ANOVA analysis; construct factor $F(5, 10) = 79 P < 0.0001$; CE treatment factor $F(1, 2) = 100, P = 0.0098$; both factors $F(5, 10) = 53 P < 0.0001$) (Figs 5J and S4). Interestingly, the CRAC domain is needed for the p75-CTF-mediated cell death (Fig 5J). In conclusion, TrkA activation by NGF reduces the levels of p75CTF oligomers at the plasma membrane, promotes p75CTF endocytosis, and inhibits cell death.

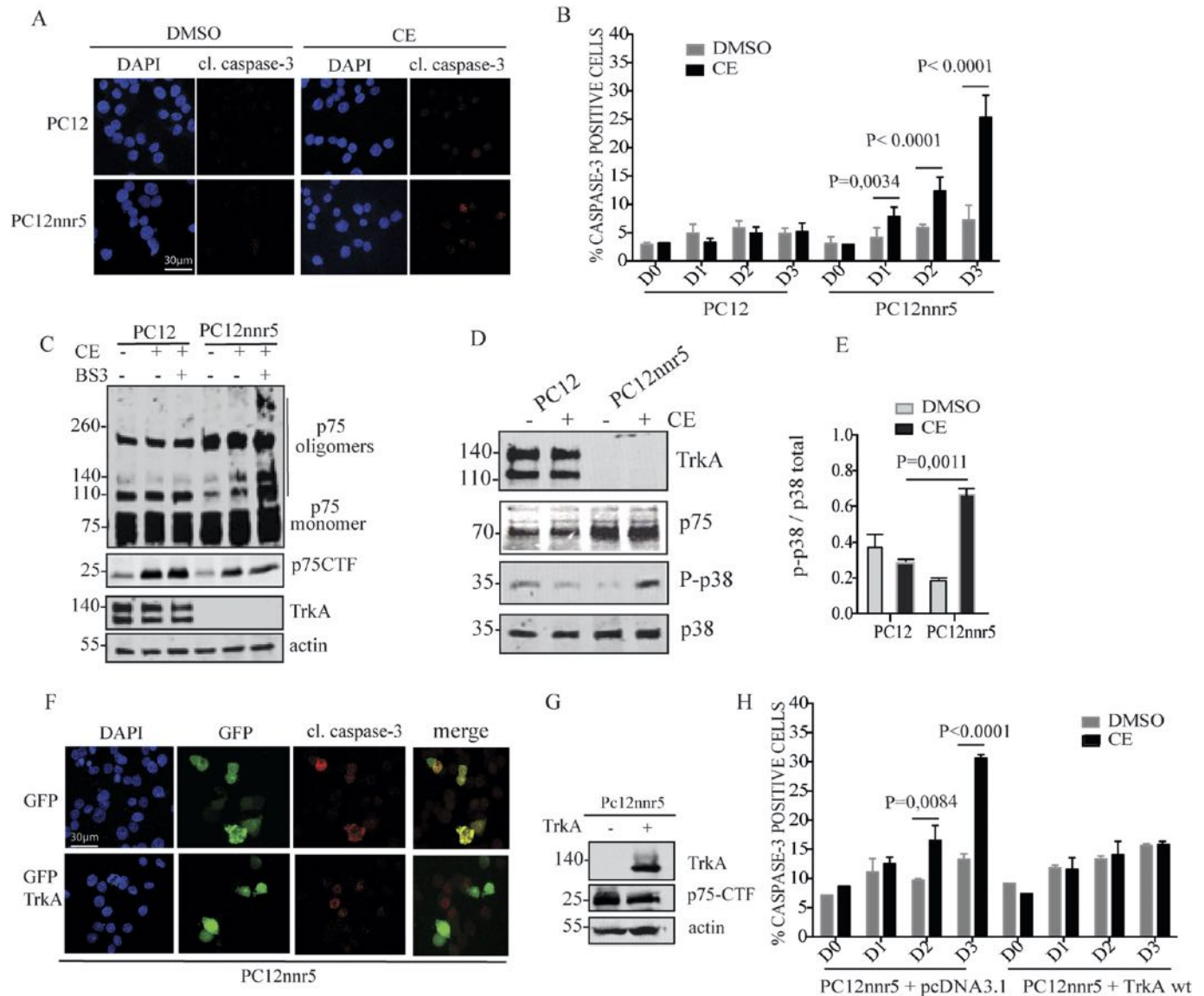


Figure 4. TrkA reduces p75-CTF-induced cell death.

(A) Confocal representative images of PC12 and PC12nnr5 cells incubated with CE (10 μ M) over time and immunostained for DAPI (nuclei, blue) and cleaved caspase-3 (red). (B) Cell death quantification is represented as the percentage of cleaved caspase-3-positive PC12 cells incubated in presence or absence of CE for 1, 2, and 3 d. (C) Western blot of the lysates from the indicated cell lines treated with BS3 and CE. The levels of endogenous p75CTF and TrkA levels in PC12 and PC12nnr5 cells upon γ -secretase inhibition are shown. (D) γ -secretase inhibition induces p38 activation in PC12nnr5 cells. Representative SDS-PAGE/Western blot show endogenous levels of TrkA, p75^{NTR} and P-p38 in PC12 and PC12nnr5 cells upon CE treatment for 72 h. (E) Densitometric analysis of the respective Western blot bands shows an increase in the ratio of P-p38/p38 signal after γ -secretase inhibition with CE in PC12nnr5 cells. (F) TrkA re-expression in PC12nnr5 cells rescues from cell death. PC12nnr5 cells transfected with either TrkA + GFP or with GFP + backbone vector (pcDNA3.1) were treated as previously described. Confocal images show DAPI and cleaved caspase-3 staining in cells incubated with CE for 3 d. (G) Re-expression levels of TrkA in transfected PC12nnr5 cells were confirmed by Western blot analysis. (H) Apoptotic cell death was quantified over time as described above. Cell death observed after CE treatment for 72 h is rescued upon re-expression of TrkA. More than 500 transfected PC12 cells were quantified per condition. All the data are represented as mean \pm SEM, $N = 3$; two-way ANOVA and Tukey's post-test was used to determine the statistical significance. P -values are showed in the graphics. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

TrkA inhibits recruitment of TRAF6 to p75CTF oligomers

To further characterize the cell death mediated by p75-CTF, we focused our efforts on the molecular mechanism behind this signal transduction. JNK and p38 MAPK modulate cell programs for cell survival and differentiation and have been previously associated with p75-mediated caspase-3 activation (Harrington et al, 2002;

Jiang et al, 2005; Pham et al, 2016). Interestingly, we showed above that in PC12nnr5 cells, apoptosis is accompanied by a significant increase in phosphorylated p38 levels that is not observed in PC12 cells (Fig 4D and E) despite that both cell lines present similar p75-CTF levels (Fig 4C). Therefore, we assessed p38 and JNK phosphorylation levels in HeLa cells co-expressing p75-CTF and TrkA (Fig 6B and C) under GSI conditions. As shown by immunoblots, the

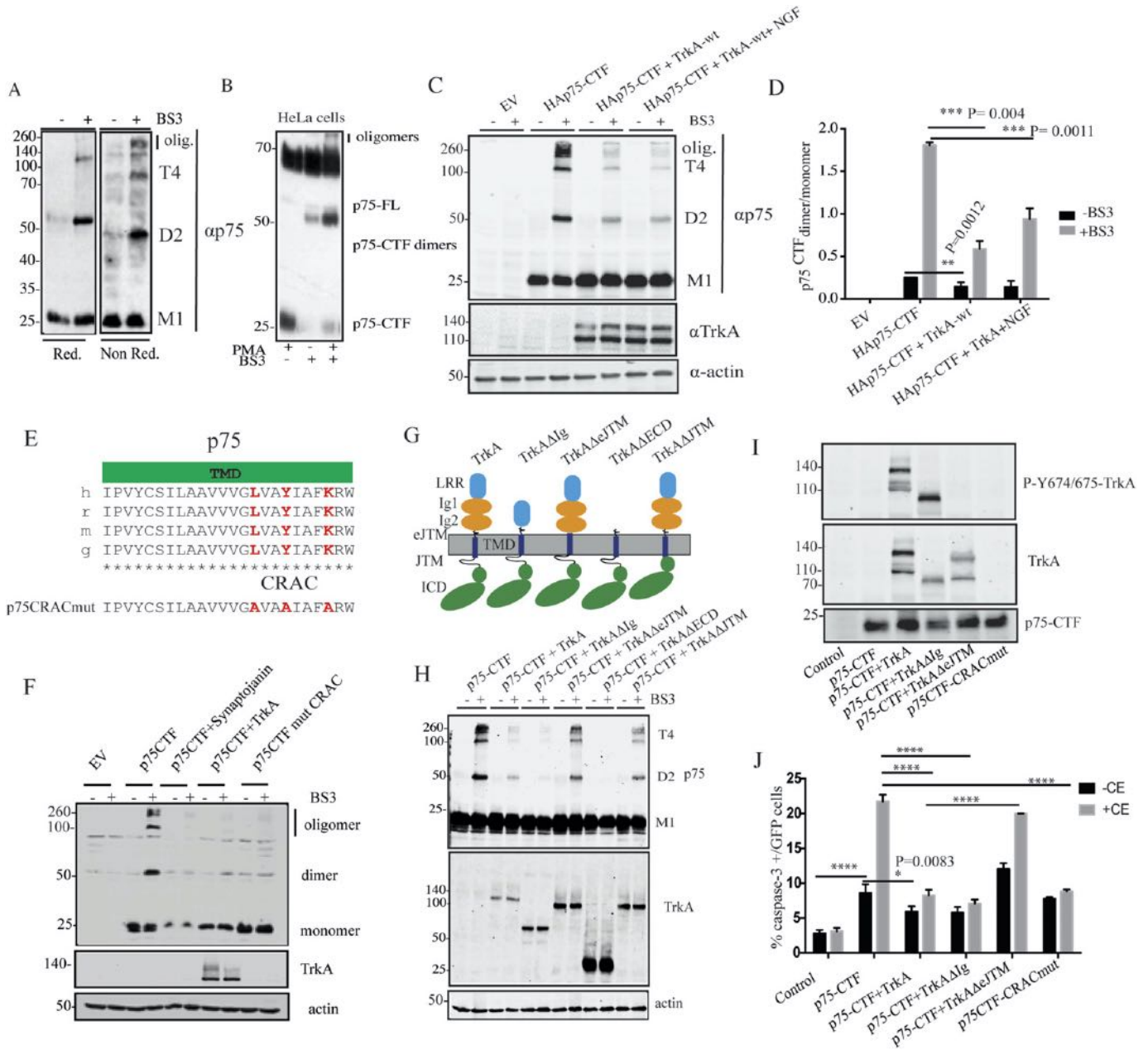


Figure 5. p75-CTF oligomerization at the plasma membrane induces cell death.

(A) Representative images of Western immunoblot analysis from p75-CTF-transfected HeLa cells cross-linked in vivo with BS3. The images show p75-CTF monomers (M1), dimers (D2), tetramers (T4), and oligomers (olig) migration detected with p75 antibody and analyzed in reducing (left) or nonreducing SDS-PAGE (right). (B) Analysis of in vivo BS3 cross-linking experiment in HeLa cells overexpressing full-length p75^{NTR} and treated with PMA (200 nM) for 40 min. In agreement with (A), p75CTF generated from full-length receptor, forms dimers and oligomers at the plasma membrane that can be identified under nonreducing conditions. (C, D) Analysis of in vivo BS3 cross-linking experiments of HeLa cells overexpressing the indicated constructs. The effect of TrkA expression in p75-CTF oligomerization was quantified as the ratio of p75CTF dimer/monomer. NGF treatment does not show a significant difference in p75-CTF oligomerization with respect to TrkA expression alone. (E) Schematic representation of the p75 TM domain structure-sequence alignment across different species (h, human; m, mouse; r, rat; and g, chicken). In red are highlighted the residues forming part of the consensus CRAC sequence. Below, the protein sequence of the p75CTFCRACmut. (F) Western blot showing that synaptotagmin and mutations in the CRAC motif sequence, as well as the presence of TrkA, reduce the formation of p75-CTF dimers and oligomers in the plasma membrane. (G) Graphic illustration of the different TrkA mutants used in this study. (H) BS3 cross-linking of membrane proteins in HeLa cells expressing the indicated constructs. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE Western blotting with p75 (top) and different TrkA antibodies (down). The presence of p75-CTF dimers (D2) and tetramers (T4) is indicated at the right. (I) Western blot of the lysates from HeLa cells transfected with the indicated constructs reprobed with the indicated antibodies. (J) Quantification of apoptotic cell death detected by immunofluorescence in HeLa cells transfected with the indicated constructs and incubated in the presence or absence of the γ -secretase inhibitor CE (10 μ M) for 24 h. Analysis of GFP/cleaved caspase-3 positive cells supports the role of TrkA kinase activity in the inhibition of p75-CTF-mediated cell death. P-values (**** P < 0.0001) were determined for the average of three independent experiments and statistical analysis was performed using a two-way ANOVA using Tukey's post-test to correct for multiple comparisons. Bars represent standard error. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

expression of p75-CTF produces an increment on P-p38 and P-JNK levels upon CE treatment (Fig 6C) that correlates with a significant increase in cleaved caspase-3-positive cells (Fig 6A). In agreement with our previous findings, TrkA co-expression rescued cells from p75-CTF-mediated cell death and blocked p38 and JNK activation in the cells subjected to γ -secretase inhibition (Fig 6B and C).

A major intracellular effector of p75 signaling is the TNFR-associated factor 6 (TRAF6) (Khursigara et al, 1999; Gentry et al, 2004; Kisiswa et al, 2018). It has been shown that this molecular adaptor binds to the intracellular juxtamembrane sequence of p75 and regulates the signal transduction of p75-induced cell death in a JNK-dependent manner (Yeiser et al, 2004; Geetha et al, 2005). To explore the relevance of CTF oligomers in TRAF6 interaction and cell

death signaling, the cells were co-transfected with TRAF6 and either wt p75-CTF or p75-CTF-C257A mutant (Fig 6D). Immunoprecipitation analysis revealed a remarkable specificity, with TRAF6 binding only to p75-CTF dimers. This finding resembles the mechanism previously observed in the full-length receptor (Vilar et al, 2009a, 2009b), but interestingly, TRAF6 and p75-CTF dimers interact in a constitutive manner that does not rely on neurotrophin binding. Consistently with our previous results, TrkA co-expression reduces the interaction between p75-CTF and TRAF6 (Fig 6E) by competing with TRAF6 for the binding to p75-CTF (Fig 6F). Hence, our data suggest that p75-CTF oligomers, generated here upon γ -secretase inhibition, induce apoptosis in a TRAF6-, JNK-, and p38-mediated pathway, with TrkA inhibiting the deadly process.

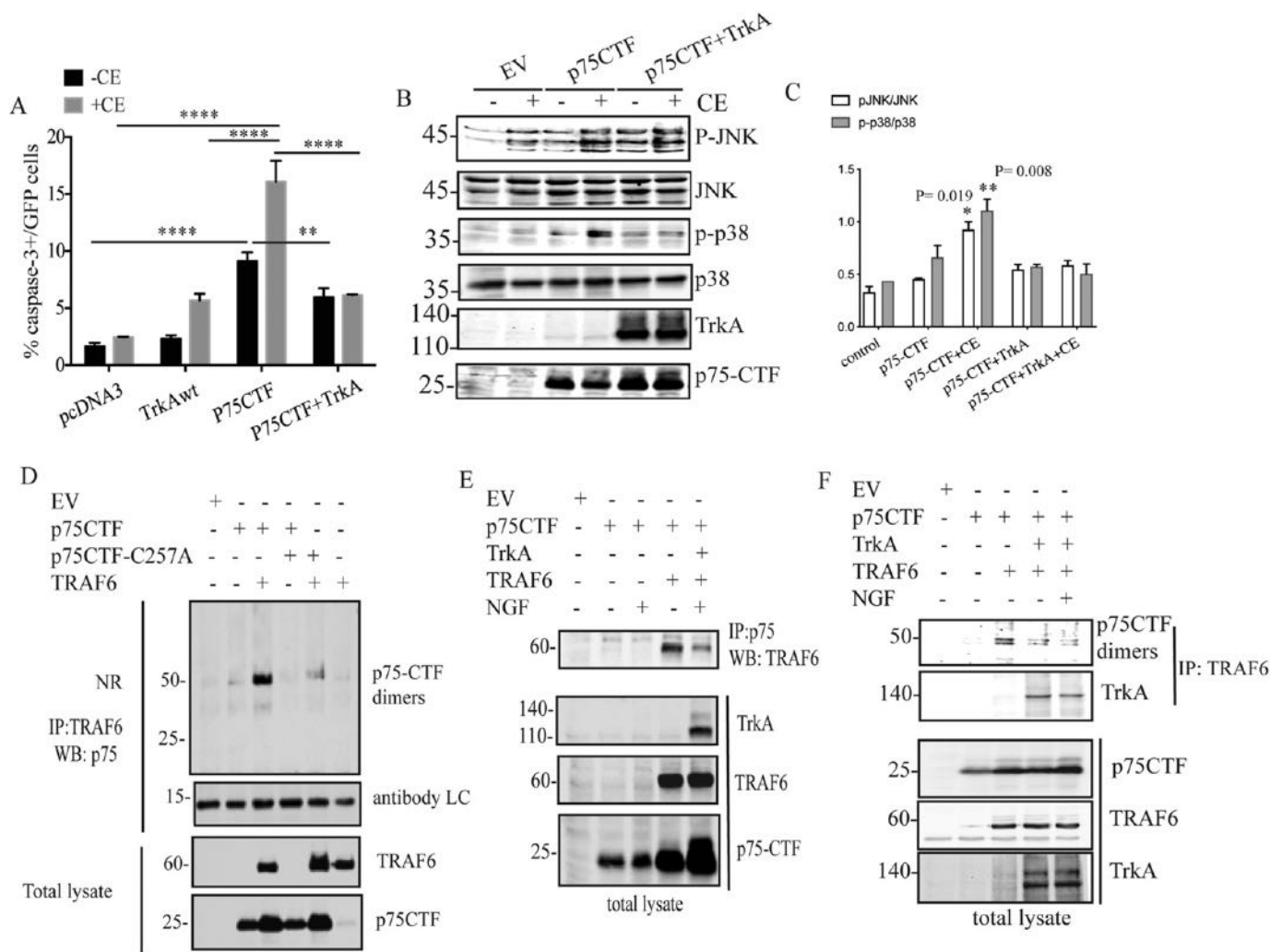


Figure 6. p75-CTF recruits TRAF6 to activate JNK and p38 signaling cascades.

(A, B, C) Inhibition of γ -secretase induces JNK and p38 activation in HeLa cells overexpressing p75-CTF. HeLa cells transiently expressing the indicated constructs were incubated in presence or absence of CE (10 μ M) for 24 h. Apoptotic cell death was determined by immunofluorescence of caspase-3+/GFP+ cells and represented as mean \pm SEM, $N = 3$; two-way ANOVA and Tukey's post-test was used to determine the statistical significance. Representative Western blot analysis of transfected HeLa cell lysates shows the expression levels of the indicated proteins. (D) TRAF6 binds to p75-CTF dimers. TRAF6 and p75-CTF interaction was determined by co-immunoprecipitation using anti-FLAG antibody (FLAG-TRAF6) and Western blot detection of p75. Nonreducing SDS-PAGE/Western blot analysis shows the co-elution of TRAF6 and p75-CTF dimers. TRAF6 and p75-CTF expression levels are showed in the total lysates. (E, F) Effect of TrkA on TRAF6 and p75-CTF interaction. Western immunoblots of the co-immunoprecipitation of TRAF6 with p75-CTF in the presence or absence of TrkA and NGF. Source data are available for this figure.

TrkA and γ -secretase inhibition induces BFCNs death in a p75-dependent manner

Although p75 is widely expressed during development, only some populations of neurons retain its expression in the adult CNS. These populations include the BFCNs, where p75^{NTR} and TrkA are present in relatively high levels and regulate cell survival functions (Counts & Mufson, 2005). BFCNs participate in several cognitive processes by cortical and hippocampal innervation and consistently, their degeneration during normal aging and AD present substantial consequences for cognitive function (Boissière et al, 1996; Granholm et al, 2000; Mufson et al, 2008; Schliebs & Arendt, 2011; Koulousakis et al, 2019). To assess the effect of γ -secretase inhibition on BFCNs, we isolated BFCN from E17 embryonic mice and cultivated them for 11 days in vitro (11 DIV) to ensure their complete maturation and proper expression of choline acetyltransferase (ChAT). Mature cholinergic neurons were identified by ChAT, p75 and TrkA immunofluorescence (Fig 7A) and incubated with GSI Compound E for three consecutive days. Although inhibition of γ -secretase was not toxic for BFCN, the impairment of TrkA signaling produced some cell death that was consistent with reported in vivo data (Fagan et al, 1997). Strikingly, the combinatory treatment of CE and the specific TrkA inhibitor K-252a produced a major increase in the percentage of apoptotic cells after 3 d in culture (Fig 7B). Furthermore, cell death was completely rescued in BFCNs from p75-KO subjected to the same GSI and K-252a treatment, demonstrating that the event is p75-dependent (Fig 7C). Together, the data suggest that in adult neuronal populations with high expression levels of p75^{NTR} and impairment of TrkA activity, as occurs in elderly BFCN, treatment with GSI drives to cholinergic neuronal apoptosis and cell death.

Discussion

Regulated intramembrane Proteolytic processing of p75^{NTR} underlies its apoptotic signaling, but the molecular mechanisms underlying its toxicity are not fully understood. Although p75^{NTR} oligomerization is still a matter of debate (Lin et al, 2015; Chao, 2019; Goncharuk et al, 2020), several lines of evidence support the role of transmembrane dimerization for p75^{NTR} biological activity (Tanaka et al, 2016; vilar et al, 2009a, 2009b). In agreement recent structural analysis reveal p75-TMD as a homodimer (Nadezhdin et al, 2016). However, p75^{NTR} single-particle tracking in transfected cells recently determined the presence of p75^{NTR} monomers at the plasma membrane (Marchetti et al, 2019). Of note, the N-terminal p75^{NTR} tagging used in this analysis only provided insights into the oligomerization state of the full-length receptor and did not inform on the status of p75^{NTR} after α -secretase shedding.

Here, we investigated the stoichiometry of p75-CTF and its role in the receptor-mediated cell death. Our in vitro cultures of DRG neurons showed that blocking the p75-CTF turnover by γ -secretase inhibition produced an accumulation of endogenous p75-CTF that leads to the enhanced formation of dimers. This evidence, together with the observation of p75-CTF disulfide dimers and oligomers in purified membranes from transfected p75-CTF cells, supports the hypothesis that p75-CTF oligomerizes under conditions that increase

its concentration. And importantly, the formation of p75-CTF oligomers directly correlates with an increase in the cell death. Furthermore, although our cross-linking studies rely on a membrane impermeable reagent is still possible that oligomerization of p75CTF could also take place in the internalized membrane vesicles.

We cannot discard the possibility that the detected oligomers are adducts of p75^{NTR} with other membrane proteins, as the presence of p75-CTF oligomers was detected by (non-selective) in vivo cross-linking assays. The data led us to propose that the increment of p75-CTF levels promotes the formation of oligomers by a mechanism that involves the oligomerization of the transmembrane domain. Although the participation of the death domain could play a role in the oligomerization of p75-CTF (Vilar et al, 2014; Lin et al, 2015), recent data contradict those results (Mineev et al, 2015; Goncharuk et al, 2020) and it will need further clarification. Interestingly, overexpression of p75-CTF-C257A also induced cell death, indicating that the covalent dimerization thorough Cys257 is not essential for the oligomerization and consequent p75-CTF-mediated apoptosis.

The localization of plasma membrane receptors in specific molecular compartments has been shown to play a relevant role in the cellular response. It has been reported that p75-CTF localizes into lipid rafts (Underwood & Coulson, 2008; Underwood et al, 2008) and cholesterol levels play a key role in p75-CTF pro-apoptotic function as its depletion abolish p75-CTF-mediated apoptosis (Underwood & Coulson, 2008; Underwood et al, 2008). We hypothesized that p75-CTF oligomers are stabilized by cholesterol and to challenge this hypothesis we disrupted the putative cholesterol-binding domain (CRAC domain) present in the transmembrane domain of p75^{NTR}. Our analyses show that mutations on the p75^{NTR} CRAC domain disrupt p75-CTF oligomerization and abolish the cell death effect observed upon p75-CTF turnover inhibition. Our results thus indicate that p75-CTF oligomers are the actual mediators of p75-mediated toxicity and indicate that their formation depends on its association with cholesterol through the p75^{NTR} CRAC domain. This would explain the recent observations of Marchetti et al (2019), where cholesterol addition also confers apoptotic capability to the cysteine mutant p75^{NTR} (Marchetti et al, 2019). Of note, cholesterol rich domains also play a role in the receptor internalization. It is known that in neurons p75^{NTR} could be internalized through clathrin-dependent and clathrin-independent pathways depending of the presence of ligand neurotrophin, each one leading to different sorting pathways, like receptor recycling or axonal transport (Bronfman et al, 2003; Deinhardt et al, 2007). In this context, the finding that oligomerization of p75CTF is modulated by cholesterol could be related to the targeting of these oligomers to specific plasma membrane locations where internalization and the sequential sorting to different internalized endosomes would take place.

In this regard, we found that PIP₂ levels also contribute to the formation or stabilization of p75CTF oligomers. It has been shown that overexpression of p75CTF increases the activity of PIP 5-kinase, which is usually enriched in the plasma membrane, leading to more synthesis of PIP₂ (Coulson et al, 2008). PIP₂ levels can also be regulated by the action of PTEN. It has been described that pro-NGF binding to p75 induces the expression and the activity of PTEN in basal forebrain neurons to counterbalance the pro-survival effects

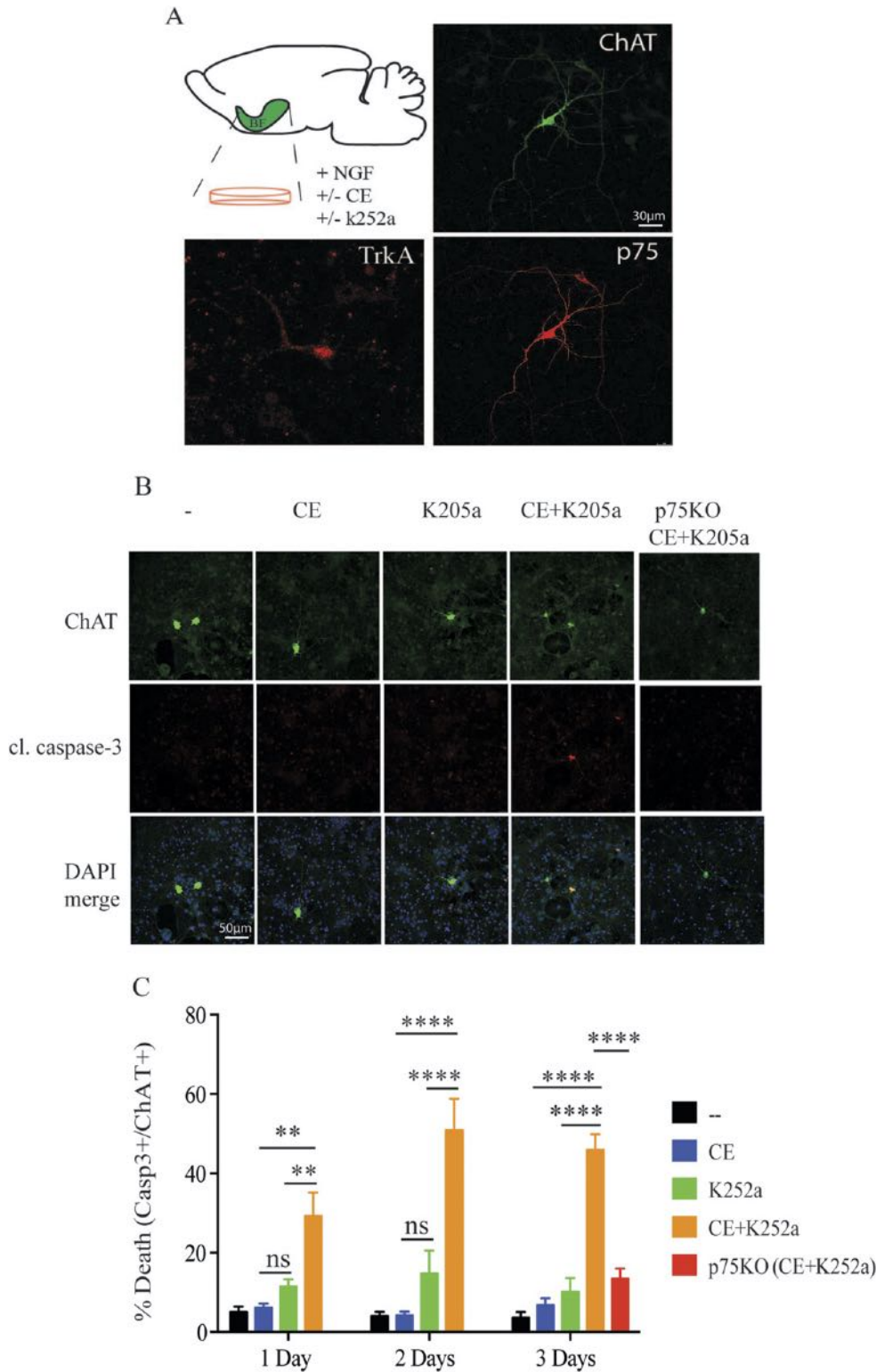


Figure 7. TrkA and γ -secretase inhibition induces death of basal forebrain cholinergic neurons in a p75-dependent manner.

(A) Graphical illustration of the basal forebrain area and the treatments used in these experiments (left). Representative confocal images from immunofluorescences of mature basal forebrain cholinergic neurons (BFCN) stained for ChAT, TrkA and p75^{NTR} at DIV 11. (B) Representative confocal images from immunofluorescence of BFCNs stained for ChAT and cleaved caspase-3 upon the indicated conditions. (C) Apoptotic cell death analysis of mature BFCN (ChAT+) from wt and p75-KO mice at DIV 11. BFCN were incubated with DMSO, compound E, and TrkA inhibitor, k2025a, over 3 d and stained for cleaved caspase-3. Quantification of cleaved caspase-3+/ChAT+ cells in the respective immunofluorescences shows a significant cell death increase upon inhibition of TrkA and γ -secretase that is rescued in p75-KO BFCNs. All the data are represented as mean \pm SEM, N = 3. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test were used to determine the statistical significance. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

of TrkA (Song et al, 2010). The modulation of the levels of PIP₂ at the plasma membrane modulates receptor internalization (Brown, 2015). The decrease in PIP₂ by specific phosphatases such as synaptojanin or phospholipases, such as phospholipase C (PLC), is

important to promote the pinch-off of the plasma membrane and the production of the endocytic vesicle (Cremona et al, 1999). TrkA activation by NGF modulates the levels of PIP₂ by activating the PI3K or the PLC γ pathways. Our results suggest that one of the

mechanisms of pro-survival roles of TrkA is to regulate the local levels of PIP₂ around the oligomers of p75CTF and facilitate p75CTF internalization to specific endosomes. Our data showing that over-expression of synaptojanin reduces p75CTF oligomerization and increases p75CTF internalization support this hypothesis. We found that inhibition of macroendocytosis by TrkA inhibits p75CTF internalization. Macropinocytosis activation by TrkA has been previously shown to sort TrkA to signaling endosomes in neurons (Shao et al, 2002). Collectively, these findings suggest that in normal conditions some p75CTF could be sorted to these specialized signaling endosomes as it has been suggested by others (Bronfman, 2007; Urrea et al, 2007).

Although internalization of p75CTF is slower in the absence of TrkA activation, it occurs at later time points (>120 min). The finding that cell death in PC12nr5 cells and in cholinergic neurons with K-252a is significant only after 48–72 h suggested that cell death is a slow process that may require a constant accumulation of endosomes enriched in p75CTF oligomers. Clustering of TNFR1 or CD95, receptors from the TNFR superfamily such as p75^{NTR}, are known to induce its endocytosis and apoptosis signaling from the these internalized endosomes (Schütze & Schneider-Brachert, 2009). One property of p75CTF oligomers is that they are resistant to down-regulation by the γ -secretase. γ -Secretase activity mainly resides in cholesterol enriched lipid rafts of Golgi and endosome membranes (Vetrivel et al, 2004). We evaluated the capacity of γ -secretase to process monomeric versus dimeric p75-CTF substrates using in vitro activity assays. Remarkably, our results demonstrated that naturally occurring p75-CTF covalent dimers are resistant to γ -secretase cleavage. Moreover, our analysis reveals a correlation between substrate DTT reduction and cleavage product generation, indicating that the reduction in the transmembrane disulfide bond is required for γ -secretase cleavage. This finding is supported by the direct determination of Michaelis–Menten constants (Table 1) for wt and mutant p75-C257A reduced substrates. The impact that substrate homodimerization has on γ -secretase-mediated proteolysis has been a matter of controversy (Langosch et al, 2015; Winkler et al, 2015). Although, the generation of engineered APP-C99 substrates forming (covalent or no covalent) dimeric structures and their analysis by in vitro γ -secretase activity assays has shown that homodimerization protects the APP-C99 fragment from γ -secretase cleavage (Winkler et al, 2015). Our studies show for the first time that γ -secretase is not able to cleave a naturally dimeric p75-CTF substrate.

Based on these findings we propose a model (Fig 8) where the inhibition of the γ -secretase leads to an increase in the levels of p75-CTF which in turn that promotes its oligomerization in cholesterol/PIP₂ rich regions at the plasma membrane. Recently Bronfman and collaborators showed that in sympathetic neurons p75^{NTR} is internalized upon brain derived neurotrophic factor (BDNF) binding and directed to multivesicular bodies where it can be exocytosed in the form of exosomes (Escudero et al, 2014, 2019). It is highly possible that the p75CTF oligomers characterized here may follow a similar pathway, taking into account that BDNF does not activate TrkA and the recent report showing that the APP-CTF (C99) localizes to brain extracellular vesicles upon γ -secretase inhibition (Lauritzen et al, 2019). This suggests a general mechanism of CTFs disposal or, more interesting, the dispersal of a neurodegenerative signal.

Our data show that p75-CTF oligomers are constitutively bound to TRAF6 leading to JNK/p38 activation and cell death. The p75 juxtamembrane region contains a putative TRAF6-C recognition site (Vilar, 2017) and the dimeric nature of TRAF6 N-terminal region confers it a preferential binding for p75^{NTR} dimers (Vilar et al, 2009b), whereas its C-terminal region, has a trimeric symmetry that could allow the formation of a high-molecular weight oligomers network (Yin et al, 2009). Thus, we propose that the newly formed p75-CTF dimers and oligomers recruit TRAF6 and the interaction trigger cell death through activation of the JNK/p38 signaling pathways. These findings are in agreement with a recent study reporting that pro-NGF binding to p75^{NTR} induces TRAF6 recruitment and JNK activation, leading to cell death in cerebellar granule neurons (Kisiswa et al, 2018). Furthermore, it has been described that TRAF6 can be recruited to lipid rafts after activation of other TNFR receptors, like RANK by its ligand RANKL (Ha et al, 2003a, 2003b). In sympathetic neurons stimulation of BDNF causes cell death mediated by p75 in a JNK-dependent manner (Escudero et al, 2019). Recently, p75 has been found in a special apoptotic endosome transported along the axon of these neurons (Pathak et al, 2018). The identity of the proteome of such endosome is still unknown. Based on our findings it would be interesting to know if TRAF6, or other TRAF members known to interact with p75 (Ye et al, 1999), form part of this pro-apoptotic signaling endosome. The finding that p75^{NTR} could be transported in Rab7-positive endosomes in the axons of motor neurons (Deinhardt et al, 2007) together with the data showing that TRAF6 co-localized to Rab7-positive endosomes in immune cells (Yan et al, 2020) suggests this could be the case.

We found that TrkA kinase activity abrogates p75-CTF oligomerization, promotes p75CTF internalization and inhibits cell death upon γ -secretase inhibition. Collectively, these observations assign a key role to TrkA in the regulation of p75^{NTR} deadly function. In agreement, our studies in cholinergic neurons show that the inhibition of TrkA along with γ -secretase exacerbates the cell death effect mediated by GSIs in a p75^{NTR}-dependent manner. Of relevance, cholinergic neurons are one of the few populations of the CNS that express relatively high levels of p75^{NTR} during adulthood and their severe loss during AD correlates with changes in hippocampal synaptic transmission and progression of dementia (Sze et al, 1997). When NGF activates TrkA it mediates p75 shedding and the internalization of p75CTF (Urrea et al, 2007) probably by inducing macropinocytosis to sort TrkA/p75CTF to signaling endosomes (Shao et al, 2002; Valdez et al, 2005; Philippidou et al, 2011) with a survival and cholinergic differentiation role. The mechanisms described here may play key roles in specific pathological situations. In AD there is an imbalance between pro-NGF and NGF (Fahnestock et al, 2001, 2004; Pedraza et al, 2005). Binding of pro-NGF induces the shedding of p75 and the activation of PTEN (Song et al, 2010), increasing the levels of PIP₂ from the pro-survival role of PIP₃, which might deregulate p75 endocytosis. As Pro-NGF does not activate TrkA the activation of PI3K would be low. If in addition the activity of the γ -secretase is compromised by familiar mutations (Chávez-Gutiérrez et al, 2012) or by the use of GSIs, cell death events are exacerbated. Thus, our results may also acquire particular significance in the context the failed phase III clinical trial with the GSI semagacestat, where the unexpected cognitive decline of the

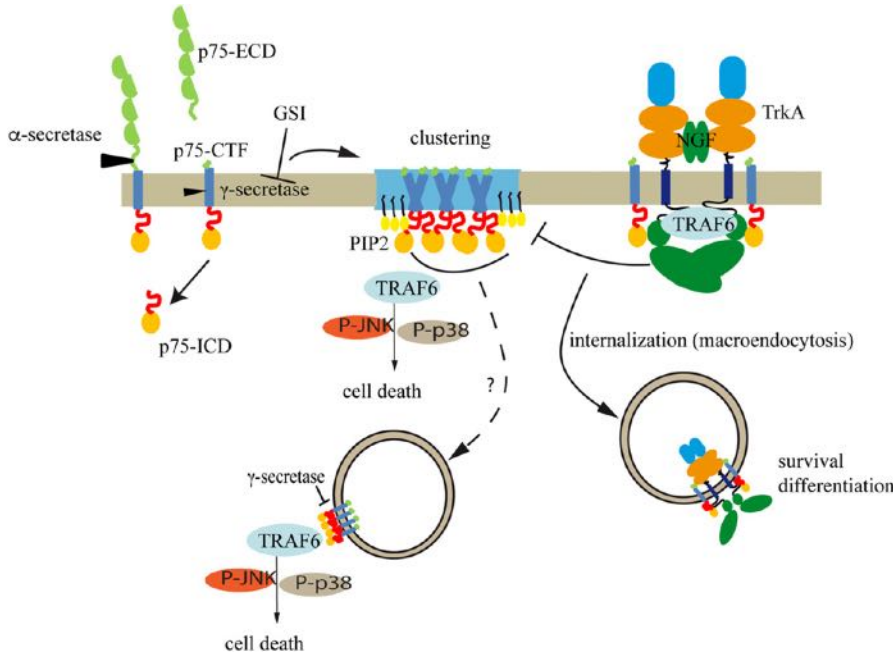


Figure 8. Model of the results presented.

Upon γ -secretase dysfunction, p75-CTF dimer and oligomerization in the cholesterol-rich region of the plasma membrane results in an increase of the PIP2 levels. Oligomers of p75CTF induce the activation of caspase-3 cleavage and cell death in a mechanism dependent of TRAF6, JNK, and p38. Alternatively p75CTF oligomers may be internalized and signal cell death from internalized vesicles (dashed line). TrkA kinase activity inhibits p75-CTF clustering and protects from cell death in part by decreasing the levels of PIP2 and promoting p75CTF internalization. Our data suggest that in a scenario where γ -secretase is inhibited, the final outcome would depend on the relative expression levels of p75 and TrkA in the cells.

treated group was observed (Doody et al, 2013). We speculate that the worsening in cognition observed in the semagacestat trial could be linked to the inhibition of p75-CTF turnover and its consequent accumulation in the cholinergic neurons of the treated AD patients. Of note, TrkA levels, but not p75NTR, are reduced in elderly AD patients (Mufson et al, 1996, 2000, 2002, 2008; Counts et al, 2004; Ginsberg et al, 2006). In vivo evaluation of the pathophysiological role of p75-CTF oligomerization warrants future research.

Materials and Methods

Cell lines culture

HeLa cells were cultured in DMEM (Gibco) containing 10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific). PC12 cells were cultured in DMEM with 10% FBS and 5% horse serum. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂.

Antibodies

The following antibodies were used in immunoblotting and immunofluorescence experiments: rabbit anti-human p75^{NTR} (1:1,000; G3231; Promega), rabbit anti-TrkA (1:1,000; Millipore), rabbit anti-phosphoTyr674/5 (1:1,000; Cell Signaling), mouse anti-HA (1:2,000; Sigma-Aldrich), mouse anti-FLAG M2 (1:1,000; Sigma-Aldrich), mouse anti β -actin (1:1,000; Sigma-Aldrich), rabbit MBP-probe (1:1,000; Santa Cruz), rabbit anti-Cleaved Caspase-3 (1:1,000, 9661S; Cell Signaling), rabbit anti phospho-p38 (1:1,000, 9211; Cell Signaling), rabbit anti p38 (1:1,000, 9212; Cell Signaling), rabbit anti JNK (1:1,000, 9252; Cell Signaling), rabbit anti phospho-JNK (1:1,000, 9251; Cell Signaling), goat anti-choline acetyltransferase (1:200, AB144P; Millipore), rabbit anti Cy3 (1:500; Jackson), goat anti mouse Ig/HRP

(1:10,000; Jackson), goat anti rabbit Ig/HRP (1:10,000; Jackson), goat IRDye800 (1:15,000; Rockland), and goat anti-mouse antibodies coupled to either Alexa 555 or Alexa 488 (Invitrogen). The DNA was stained with DAPI (1:1,000).

DNA constructs design

p75^{NTR} was expressed from the pcDNA3 vector backbone (Invitrogen) using a full-length coding sequence flanked by an N-terminal HA epitope tag. Mutations in C257A were introduced by direct mutagenesis using *Pfu* Turbo DNA polymerase (Agilent), and the oligonucleotide sequences are available upon request. p75-CTF contains the p75^{NTR} signal peptide, an HA tag and the residues R₂₄₅GTTDN₂₅₀ from the p75^{NTR} juxtamembrane region followed by the transmembrane domain and the intracellular region (see scheme in Fig 3). P75-CTF-C257A was made by direct mutagenesis from wt p75-CT. For expression and purification, the pSG5-C101-3xFLAG and pSG5-C101-C257A-3xFLAG were built on the vector pSG5-APPC99-3xFLAG by digestion with EcoRI and BamHI to eliminate the APP-C99 insert and ligation of the p75^{NTR} insert produced from PCR amplification (the sequence of rat p75^{NTR} inserted into the vector pSG5 is M₂₃₁VTTVMGSSQPWTRGTTDNLIPVYCSILAAVVGLVYIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQTPPPEGEKLSHSDSGISVDSQSLHDQQTHTQTASGQALKG₃₃₂-3xFLAG, underlined in the transmembrane domain). TrkA point mutations and deletion constructs were built from pCDNA.3.1-HA-TrkA (a gift from Y Barde) using site-directed mutagenesis. DNA primers sequences will be distributed upon request. Synaptojanin2-pmCherryC1 was a gift from Christien Merrifield (plasmid # 27677; Addgene; <http://n2t.net/addgene:27677>; RRID:Addgene_27677) (Taylor et al, 2011).

Isolation and primary culture of mouse DRG

E16-E17 mice were sacrificed, first the spinal column was isolated, the head was removed by cutting at the base of the skull (C1-C2

level). The ribs were then cut parallel with and close to the spinal column on both sides, detaching the viscera connected to the anterior side of the spinal column; muscle, fat, and skin were cut from the posterior side of the spinal column using curved scissors, and the whole spinal column was put in a Petri dish containing 4°C Hank's balanced salt solution. The spinal cord was slowly peeled in a rostral to caudal direction from the column, revealing the DRGs below that were carefully removed so as not to damage them with the scissors. Three isolated DRG was collected on each cover slides of 24-well plates pre-coated with poly-D-lysine solution (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). DRG were cultured with DMEM containing 10% FBS, 1% glutamine, 0.5% penicillin-streptomycin, and 50 ng/ml NGF and were cultured at 37°C in humidified atmosphere with 5% of CO_2 .

Cell death quantification

Primary cortical neurons and HeLa and PC12 cell lines were transfected with the indicated constructs (1 μg per 10 cm plate) and GFP in a 1:10 ratio respect to the main construct. 24 h after transfections, cells were lifted, counted and re-plated in 24 well plates. Cells were incubated for 24 h in presence or absence of CE (10 μM) before fixation. Washed cells were fixated with 4% PFA/PBS solution for 15 min at room temperature and permeabilized for 1 h with 0.1% Triton/PBS before staining for cleaved caspase-3. Cell death was analyzed by immunofluorescence and quantified as the percentage of GFP and cleaved caspase-3 double positive cells, respect to all GFP-positive cells.

Membrane purification

HeLa cells were transiently transfected with wt p75-CTF or mutant p75-CTF-C257A expression vectors and collected 48 h post-transfections. Before collection, the cultures were incubated overnight (16 h) in presence or absence of GSI compound E 10 μM , to prevent p75CTF degradation. The plates not treated with compound E were incubated with DMSO as a control. Cells were collected and resuspended in 25-mm PIPES (pH 7), 120 mM KCl, 250 mM sucrose, 5 mM EGTA, and 1 \times complete protease inhibitor (Roche). Cell membranes were broken by mechanical processes and cell debris were removed by low centrifugation at 4°C. Total membranes were obtained after supernatant ultracentrifugation at 100,000g for 1 h at 4°C. Pellet was resuspended in the same buffer previously described before cleavage experiments and incubated in the presence or absence of compound E for 1 h at 37°C.

Cycloheximide treatment

HeLa cells were transfected with 1 μg of empty vector (control) or the indicated p75-CTF constructs. 48 h posttransfection, the cells were incubated in a six-well plate with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (CHX; Sigma-Aldrich) in the presence and absence of 10 μM epoxomicin (Sigma-Aldrich), 1 μM wortmannin (Sigma-Aldrich), 20 mM ammonium chloride (Sigma-Aldrich), 50 nM Semagacestat (Selleckchem), and 10 μM compound E (Callbiochem). Cells were harvested in TNE lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 mM Na_2VO_3 , 10 mM iodoacetamide, and protease inhibitor mixture), at different time

points (0, 1, 4, and 9 h) after CHX treatment. The half-lives were calculated using by densitometry of Western blots bands using the ImageQuant (Molecular Dynamics) software. Values were fit to the half-life decay equation using the GraphPad Prism software to an exponential regression of the form: $N(t) = N_{(0\text{ h})} * e^{-\lambda t}$. λ is the decay constant. Half-lives ($t_{1/2}$) were calculated using the equation $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$.

Reducing and nonreducing SDS-PAGE

Protein lysates were analyzed using reducing or nonreducing SDS-PAGE. In reducing gels, sample buffer contains 5% of β -mercaptoethanol. We observed that in nonreducing conditions, p75-CTF samples run with a high smearing background and low levels of monomer are observed probably by the formation of high molecular weight aggregates. We found that the inclusion of a small amount of β -mercaptoethanol, 1%, eliminates the smear but retains the disulfide dimers mediated by the C257.

p75 cleavage experiments

p75^{NTR} cleavage experiments were carried out according to the protocol described previously by Kanning et al (2003). PC12 cells were incubated with NGF (100 ng/ml). 48 h after differentiation, PC12 cells were incubated for 90 min with either 1 μM proteasome inhibitor epoxomicin (Sigma-Aldrich), 10 μM Compound E (Millipore), or PBS buffer. Next, 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) was added for 40 min. Cells were washed in PBS and lysed in cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 mM Na_2VO_3 , 10 mM iodoacetamide, and protease inhibitor mixture) at 4°C. Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000g for 15 min and protein quantification was performed by Bradford assay. Proteins were resolved by SDS-PAGE and membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-human p75^{NTR}. After incubation with the appropriate secondary antibody, membranes were imaged using enhanced chemiluminescence and autoradiography.

Purification of γ -secretase

The purification of γ -secretase was carried out after a previous protocol (Acx et al, 2014). Briefly, HI5 insect cells were infected with baculovirus encoding human PSEN1, NCT-GFP, APH1A_L, and PEN-2. The GFP was cloned at the C-terminal site of NCT. γ -Secretase complexes were purified using agarose beads (NHS-activated beads; GE Healthcare) coupled with anti-GFP nanobodies. A PreScission cleavage site was included between NCT and GFP and used to elute untagged γ -secretase complexes. Removal of the GST-tagged PreScission protease was carried out by immunoaffinity pulldown using Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare).

Recombinant protein production and extraction

COS1 cells were transiently transfected with wt pSG5-C101-p75wt-3xFLAG or mutant pSG5-C101-p75C257A-3xFLAG vector using using TransIT-LT1 (Mirus) according to the manufacture protocol. Before collection, cells were treated overnight with 10 μM Inhibitor X (Sigma-Aldrich) to prevent cleavage. Harvested cells were collected

by low velocity spin, resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, and complete protease inhibitor mixture (Roche) and incubated on ice for 1 h. Supernatant was obtained by ultracentrifugation at 100,000g for 20 min. Immunoaffinity purification was carried out with the anti-FLAG M2-agarose beads (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's protocol. C101-p75-3xFLAG was eluted in 100 mM glycine HCl (pH 2.4), 0.625% n-dodecyl β -D-maltoside (Sigma-Aldrich) and immediately neutralized to pH 7 by the addition of Tris-HCl (pH 8.0).

In vitro γ -secretase assay

In vitro activity assay was performed as previously described (Acx et al, 2014) with minor modifications. Purified γ -secretase (~15 nM final in assay) was incubated with purified C101-p75-3xFLAG or C99-3xFLAG at the indicated concentrations for 1 h at 37°C (in 15 μ l final volume) were carried out in 25 mM PIPES (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.5% phosphatidylcholine, 0.25% CHAPSO, 2.5% DMSO, and 1X EDTA-free complete proteinase inhibitors (Roche) at 37°C.

Quantification of in vitro γ -secretase-mediated processing of p75

Previous to SDS-PAGE analysis, lipids and remaining substrate are extracted with chloroform/methanol (2:1, vol/vol). This extraction allows a better visualization of the reaction product and a more accurate measurement of the cleavage reaction efficiency. This process was carried out as previously described (Acx et al, 2014). Because of the extraction is not complete, the remaining substrate (indicated in a general form as p75-C101-3xFLAG both for wt or C257A) can still be present in diverse lanes. The amount of substrate extracted before gel loading cannot be controlled, so in this experiment, any change in p75-C101-wt monomer band corresponds only to a different extraction efficiency and does not affect the quantification of the C-terminal product. The C-terminal fragment-x3FLAG levels were determined by semi-quantitative Western blot using the anti-FLAG M2 antibody from Sigma-Aldrich and IR detection at 800 nm using the Odyssey Infrared Imaging System.

Cell transfection

HeLa cells, which do not express endogenous p75 nor TrkA, were cultured in DMEM medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Transfection of HeLa cells was performed using polyethylenimine (PEI; Sigma-Aldrich) at a concentration of 1–2 μ g/ μ l. 48 h after transfection, the cells were starved in serum-free medium for 2 h, washed with PBS and incubated with BS3 in PBS for 15 min on ice. Cells were lysed with TNE buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) supplemented with 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), protease inhibitors (Roche), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich), and 1 mM sodium fluoride (Sigma-Aldrich). In the experiments involving the TrkA cysteine mutants, 10 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) was added to the lysis buffer. Lysates were kept on ice for 10 min and centrifuged at 12,000g for 15 min in a tabletop centrifuge. The protein level of the lysates was quantified using a Bradford kit (Pierce) and lysates were analyzed by SDS-PAGE.

p75-CTF kinetic internalization assay

Hek293 cells were grown and transfected on sterile coverslips. The p75CTF expressed on the cell surface was labeled with the primary antibody (mouse anti-HA 12CA5, dilution 1:100) diluted in PBS for 1 h at 4°C and returned to the incubator at 37°C. For kinetic internalization experiments at different time points (0, 15, 30, 60, 120 min) the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Fixed cells were incubated with blocking buffer (0.1 M PB 3% FBS) for 45 min at room temperature with the Alexa 555 conjugate secondary anti-mouse Ig (Invitrogen). This was followed by a second incubation of blocking buffer containing 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) to permeabilize the cells and a final incubation with the Alexa 488 anti-mouse secondary conjugate Ig (Invitrogen) for 45 min at room temperature. Receptor expression levels were determined by measuring the p75CTF fluorescence intensity at 561 nm (red) and 488 nm (green) light. Images of the cells were taken in a Leica SP8 spectral confocal microscope using a 63 \times magnification (oil).

p75-CTF BS3 cross-linking

Transfected cells with the p75-CTF construct were washed three times with ice-cold PBS (pH 8.0), chilled on ice, and incubated in BS3 (bis[sulfosuccinimidyl] suberate) solution to a final concentration of 1 mM dissolved in PBS for 30 min at room temperature to cross-linker the membrane proteins. Free BS3 was quenched with 15 mM Tris, pH 7.5 for 15 min at room temperature. Then, the cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed with TNE buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) supplemented with Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and a mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science) and phosphatase-like sodium orthovanadate, Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich), and sodium fluoride, NaF (Sigma-Aldrich). Proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with the p75 intracellular antibody (dilution 1:10,000; Promega) to detect p75CTF.

Western blot analysis

Cellular debris was removed by centrifugation at 12,000g for 15 min and the protein level of cell lysates was quantified using the Bradford assay (Pierce). Proteins were resolved in SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes that were incubated overnight at 4°C with the indicated antibodies. After incubation with the appropriate secondary antibody, the membranes were imaged and bands quantified using enhanced chemiluminescence and autoradiography.

Co-immunoprecipitation assay (co-IP)

A p100 plate of HEK293 cells were transfected with 5 μ g of indicated plasmids. At 48 h post-transfection, cells were washed twice with ice-cool PBS and were lysed using 400 μ l TNE buffer supplemented with 1% Triton X-100 and a mixture of protease inhibitors, orthovanadate, and sodium fluoride. Cells were harvested by scraping and transferred into a 1.5-ml tube, insoluble debris was removed by centrifugation (12,000g for 10 min), and 100 μ l of sample was reserved for input analysis.

The samples were incubated with indicated 2 μg of primary antibody (anti-Flag M2, anti-HA) overnight at 4°C with rotation and then incubated with 15 μl of Protein G Agarose resin 4 Rapid Run (4RRPG-5; Agarose Bead Technologies) for 2 h at 4°C with rotation. The beads were separated by gently centrifugation (2,800g for 1 min) and washed three times in 500 μl TNE buffer 0.5% Triton X-100. Finally, for nonreducing SDS-PAGE analysis, 30 μl nonreducing 2 \times sample buffer was added and the samples were boiled for 5 min at 96°C. For reducing SDS-PAGE analysis, 30 μl 2 \times sample buffer (with 2% β -MeOH) was added. For immunodetection, the indicated antibodies were used.

Internalization of p75CTF by flow cytometry

HeLa cells were transfected with HAP75CTF and TrkA constructs. 48 h after transfection, the cells were incubated in the presence or absence of NGF for 60 min. Then the cells were lifted, washed with PBS, and counted. 10^6 cells were resuspended in 200 μl of anti-HA primary antibody (1: 100 in PBS, the cytometry buffer), cells were incubated in suspension at 4°C for 30 min, with brief shaking every 10 min during incubation. After incubation, three washes with cold PBS were made by centrifugation for 5 min at 100g. A second incubation was performed with 100 μl of Alexa 488 anti-mouse secondary antibody (1: 100, in PBS) at 4°C for 30 min in the dark. Finally, the cells were washed two times with cold PBS and resuspended in 3 ml of PBS. The cell suspension was transferred to cytometry tubes and kept on ice to be analyzed by the Cytometer FACSCanto (BD Biosciences) and analyzed with DiVa8 software.

Isolation, culture, and transfection of embryonic cortical neurons

Late embryonic stage (E16–17) mouse fetuses were used. Fetuses were individually removed from the embryonic sac and placed into a sterile Petri dish. Mouse fetuses were decapitated, and the skin and skull were removed and the brain was placed onto another Petri dish with cold HBSS. The cerebellum, olfactory bulb, meninges, and the non-cortical structures were carefully removed. Cortical hemispheres were cut into small pieces and transferred into a 15 ml conical tube. The cortical tissue was digested in 1 ml of 2.5 mg/ml of trypsin and 0.5 ml of 200 U/ml of DNase I. The supernatant was replaced with 0.5 ml of 4% BSA and 1 ml of NB/B-27 and dissociated by passes through pipettes with decrease bore sizes. Cell suspension was centrifuged at 200g for 5 min. The pellet was suspended in 5 ml of 0.2% BSA and passed through 40 μm nylon filter, and the viable cells were counted. The cells were transfected in suspension with the AMAXA 4D-NUCLEOFECTOR using Amaxa P3 Primary Cell kit. 5×10^5 cells were incubated with 1 μg of the indicated DNA plasmids, 17 μl of P3 solution and 3 μl supplement. The mixed was put in a well of a strip and DC100 AMAXA program were used. After transfection, the cells were suspended in 1 ml of plating medium (NB medium with B-27 supplement and 2 mM L-glutamine and 0.5% penicillin–streptomycin) and 500 μl were seeded onto two cover slides of 24-well plates pre-coated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-D-lysine and 5 mg/ml laminin. Next day, 500 μl of fresh NB, B27, and 2 μM AraC were added. Neurons were allowed to adhere and recover 4 d before the assays.

BFCNs culture

BFCNs isolation protocol was adapted from Schnitzler et al (2008). Embryos of CD1 mice of 17–18 d were surgically removed and septo-hippocampal areas were dissected from the cerebral tissue in ice-cold Hanks balanced salt solution (HBSS, Gibco, Life Technologies), digested with 1 ml of trypsin, and 0.5 ml of 100 kU DNase I (GE Healthcare) during 10 min at 37°C. The fragments were dissociated by aspiration with progressive narrower tips in 0.5 ml BSA 4% and 1 ml of Neurobasal medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 2% B-27 (Gibco, Life Technologies). After tissue disaggregation, 2.5 ml of BSA 4% was added, and the tubes were centrifuged for 5 min at 250g. The supernatant was aspirated, and the pellet resuspended in 5 ml of BSA 2%. The cell suspension was filtered in 40 μm nylon filter and the cells counted in Neubauer chamber. The suspension was centrifuged again and resuspended in NB/B-27 medium and seeded in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laminin (Sigma-Aldrich) coated plates at a density of 2×10^5 cells/well in 24-well plates. The next day, NB medium was changed adding 2 μM of anti-mitotic AraC, and 100 ng/ml of NGF and reducing the concentration of B-27 to 0.2%. Neurons were kept at 37°C in a humidified incubator in a 5% CO_2 atmosphere for 11 d for posterior fixation with PFA 2% for 15 min at room temperature. To day 8–10, 10 nM of compound E (Millipore) or DMSO were added to the culture. Cells were permeabilized with 0.1% (vol/vol) Triton X-100/PBS pH 7.4 for 4 min at room temperature and posterior soft denaturalization of 5 min with 0.5% SDS. Coverslips were blocked with 2% BSA for 1 h followed by incubation overnight at 4°C in a humidified chamber with primary goat antibody anti-Choline Acetyltransferase (AB144P; Millipore) 1:200 and rabbit anti-Cleaved Caspase-3 (9661S; Cell Signaling) 1:1,000. Unbound antibody was removed by three washes of PB 0.1M and bound antibody was detected by incubation with Cy3 donkey anti rabbit (Jackson) 1: 500, for 1 h or with biotin rabbit anti-goat (Jackson) 1:200 at room temperature for 1 h and posterior cy2 streptavidin (Jackson). Nuclei were stained with DAPI 1:1,000 in PB for 5 min and samples were mounted on glass slides and cover slipped with Mowiol and 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ DABCO.

Supplementary Information

Supplementary Information is available at <https://doi.org/10.26508/lsa.202000844>.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Minister of Economy and Competitiveness grant SAF2017-84096-R and by the Generalitat Valenciana 2018-55 to M Vilar. I García-Carpio was supported by an Formación de Personal Investigador (FPI) pre-doctoral fellowship (BFU2013/42746-P) and a mobility grant (EEBB-I-15-10278) from the Spanish Minister of Economy and Competitiveness. This work was funded by the Stichting Alzheimer Onderzoek (S16013) and the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek or Flanders Research Foundation (FWO) research project (G0B2519N) to L Chávez-Gutiérrez.

Author Contributions

ML Franco: conceptualization, investigation, and methodology.
 I García-Carpio: conceptualization, investigation, methodology, and writing—original draft, review, and editing.
 R Comaposada-Baró: investigation and methodology.
 JJ Escribano-Saiz: investigation.
 L Chávez-Gutiérrez: funding acquisition, investigation, methodology, and writing—original draft, review, and editing.
 M Vilar: conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition, investigation, methodology, and writing—original draft, review, and editing.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acx H, Chávez-Gutiérrez L, Serneels L, Lismont S, Benurwar M, Elad N, De Strooper B (2014) Signature amyloid β profiles are produced by different γ -secretase complexes. *J Biol Chem* 289: 4346–4355. doi:10.1074/jbc.m113.530907
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20: 5908–5916. doi:10.1128/mcb.20.16.5908-5916.2000
- Bergman E, Fundin BT, Ulfhake B (1999) Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *J Comp Neurol* 410: 368–386. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19990802)410:3<368::aid-cne2>3.0.co;2-i
- Boissière F, Lehericy S, Strada O, Agid Y, Hirsch EC (1996) Neurotrophin receptors and selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 28: 219–223. doi:10.1007/bf02815225
- Bothwell M (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol* 220: 3–15. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_1
- Bronfman FC (2007) Metalloproteases and gamma-secretase: New membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem* 103: 91–100. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04781.x
- Bronfman FC, Tcherpakov M, Jovin TM, Fainzilber M (2003) Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: A slow route to the signaling endosome. *J Neurosci* 23: 3209–3220. doi:10.1523/jneurosci.23-08-03209.2003
- Brown DA (2015) PIP2Clustering: From model membranes to cells. *Chem Phys Lipids* 192: 33–40. doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.07.021
- Ceni C, Kommaddi RP, Thomas R, Vereker E, Liu X, McPherson PS, Ritter B, Barker PA (2010) The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci* 123: 2299–2307. doi:10.1242/jcs.062612
- Chao MV (2019) Stoichiometry counts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 21343–21345. doi:10.1073/pnas.1914583116
- Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, et al (2012) The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* 31: 2261–2274. doi:10.1038/emboj.2012.79
- Chávez-Gutiérrez L, Tolia A, Maes E, Li T, Wong PC, de Strooper B (2008) Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem* 283: 20096–20105. doi:10.1074/jbc.m803040200
- Coulson EJ, May LM, Osborne SL, Reid K, Underwood CK, Meunier FA, Bartlett PF, Sah P (2008) p75 neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 28: 315–324. doi:10.1523/jneurosci.2699-07.2008
- Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (2000) Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 275: 30537–30545. doi:10.1074/jbc.m005214200
- Counts SE, Mufson EJ (2005) The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 263–272. doi:10.1093/jnen/64.4.263
- Counts SE, Nadeem M, Wu J, Ginsberg SD, Saragovi HU, Mufson EJ (2004) Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 56: 520–531. doi:10.1002/ana.20233
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, et al (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99: 179–188. doi:10.1016/S0092-8674(00)81649-9
- De Strooper B (2014) Lessons from a failed γ -secretase Alzheimer trial. *Cell* 159: 721–726. doi:10.1016/j.cell.2014.10.016
- De Strooper B, Chávez Gutiérrez L (2015) Learning by failing: Ideas and concepts to tackle γ -secretases in Alzheimer's disease and beyond. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55: 419–437. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124309
- Deinhardt K, Reversi A, Berninghausen O, Hopkins CR, Schiavo G (2007) Neurotrophins Redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic* 8: 1736–1749. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00645.x
- DiStefano PS, Johnson EM (1988) Identification of a truncated form of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 270–274. doi:10.1073/pnas.85.1.270
- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, et al (2013) A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369: 341–350. doi:10.1056/nejmoa1210951
- Escudero CA, Cabeza C, Moya-Alvarado G, Maloney MT, Flores CM, Wu C, Court FA, Mobley WC, Bronfman FC (2019) c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent internalization and Rab5-dependent endocytic sorting mediate long-distance retrograde neuronal death induced by axonal BDNF-p75 signaling. *Sci Rep* 9: 6070. doi:10.1038/s41598-019-42420-6
- Escudero CA, Lazo OM, Galleguillos C, Parraguez JJ, Lopez-Verrilli MA, Cabeza C, Leon L, Saeed U, Retamal C, Gonzalez A, et al (2014) The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J Cell Sci* 127: 1966–1979. doi:10.1242/jcs.141754
- Fagan AM, Garber M, Barbacid M, Silos-Santiago I, Holtzman DM (1997) A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci* 17: 7644–7654. doi:10.1523/jneurosci.17-20-07644.1997
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 18: 210–220. doi:10.1006/mcne.2001.1016
- Fahnestock M, Yu G, Coughlin MD (2004) ProNGF: A neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 146: 101–110. doi:10.1016/S0079-6123(03)46007-X
- Fantini J, Barrantes FJ (2013) How cholesterol interacts with membrane proteins: An exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front Physiol* 4: 31. doi:10.3389/fphys.2013.00031

- Geetha T, Kenchappa RS, Wooten MW, Carter BD (2005) TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* 24: 3859–3868. doi:10.1038/sj.emboj.7600845
- Gentry JJ, Rutkoski NJ, Burke TL, Carter BD (2004) A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* 279: 16646–16656. doi:10.1074/jbc.m309209200
- Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE, Mufson EJ (2006) Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 97: 475–487. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03764.x
- Goncharuk SA, Artemieva LE, Nadezhdin KD, Arseniev AS, Mineev KS (2020) Revising the mechanism of p75NTR activation: Intrinsically monomeric state of death domains invokes the “helper” hypothesis. *Sci Rep* 10: 13686. doi:10.1038/s41598-020-70721-8
- Granholm AC, Sanders LA, Crnic LS (2000) Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol* 161: 647–663. doi:10.1006/exnr.1999.7289
- Ha H, Kwak HB, Le SW, Kim H-H, Lee ZH (2003a) Lipid rafts are important for the association of RANK and TRAF6. *Exp Mol Med* 35: 279–284. doi:10.1038/emmm.2003.38
- Ha H, Kwak HB, Lee SK, Na DS, Rudd CE, Lee ZH, Kim H-H (2003b) Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. *J Biol Chem* 278: 18573–18580. doi:10.1074/jbc.m212626200
- Harrington AW, Kim JY, Yoon SO (2002) Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22: 156–166. doi:10.1523/jneurosci.22-01-00156.2002
- Hopkins CR (2010) ACS chemical neuroscience molecule spotlight on semagacestat (LY450139). *ACS Chem Neurosci* 1: 533–534. doi:10.1021/cn1000606
- Ibáñez CF, Simi A (2012) p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: Paradox and opportunity. *Trends Neurosci* 35: 431–440. doi:10.1016/j.tins.2012.03.007
- Ishtitsuka R, Kobayashi T (2007) Cholesterol and lipid/protein ratio control the oligomerization of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *Biochemistry* 46: 1495–1502. doi:10.1021/bi061290k
- Jiang Y, Zhang JS, Jakobsen J (2005) Differential effect of p75 neurotrophin receptor on expression of pro-apoptotic proteins c-jun, p38 and caspase-3 in dorsal root ganglion cells after axotomy in experimental diabetes. *Neuroscience* 132: 1083–1092. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.049
- Johnson H, Hökfelt T, Ulfhake B (1999) Expression of p75(NTR), trkB and trkC in nonmanipulated and axotomized motoneurons of aged rats. *Brain Res Mol Brain Res* 69: 21–34. doi:10.1016/s0169-328x(99)00068-6
- Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* 8: 1399–1402. doi:10.1016/s0960-9822(98)00022-0
- Jung K-M, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, Kim PK, Kim DS, Ryu SH, Chao MV, et al (2003) Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278: 42161–42169. doi:10.1074/jbc.m306028200
- Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC (2003) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23: 5425–5436. doi:10.1523/jneurosci.23-13-05425.2003
- Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274: 2597–2600. doi:10.1074/jbc.274.5.2597
- Kisiswa L, Fernández-Suárez D, Sergaki MC, Ibáñez CF (2018) RIP2 gates TRAF6 interaction with death receptor p75NTR to regulate cerebellar granule neuron survival. *Cell Rep* 24: 1013–1024. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.098
- Koulousakis P, Andrade P, Visser-Vandewalle V, Sesia T (2019) The nucleus basalis of meynert and its role in deep brain stimulation for cognitive disorders: A historical perspective. *J Alzheimers Dis* 69: 905–919. doi:10.3233/jad-180133
- Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD (2014) The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb Exp Pharmacol* 220: 121–164. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_6
- Langosch D, Scharnagl C, Steiner H, Lemberg MK (2015) Understanding intramembrane proteolysis: From protein dynamics to reaction kinetics. *Trends Biochem Sci* 40: 318–327. doi:10.1016/j.tibs.2015.04.001
- Lauritzen I, Bécot A, Bourgeois A, Pardossi-Piquard R, Biferi M-G, Barkats M, Checler F (2019) Targeting γ -secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models. *Transl Neurodegener* 8: 35. doi:10.1186/s40035-019-0176-6
- Lin Z, Tann JY, Goh ETH, Kelly C, Lim KB, Gao JF, Ibanez CF (2015) Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. *Elife* 4: e11692. doi:10.7554/elife.11692
- Loeb DM, Maragos J, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF, Greene LA (1991) The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* 66: 961–966. doi:10.1016/0092-8674(91)90441-z
- Marchetti L, Bonsignore F, Gobbo F, Amodeo R, Calvello M, Jacob A, Signore G, Schirripa Spagnolo C, Porciani D, Mainardi M, et al (2019) Fast-diffusing p75NTR monomers support apoptosis and growth cone collapse by neurotrophin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 21563–21572. doi:10.1073/pnas.1902790116
- Matsumura N, Takami M, Okochi M, Wada-Kakuda S, Fujiwara H, Tagami S, Funamoto S, Ihara Y, Morishima-Kawashima M (2014) γ -Secretase associated with lipid rafts: Multiple interactive pathways in the stepwise processing of β -carboxyl-terminal fragment. *J Biol Chem* 289: 5109–5121. doi:10.1074/jbc.m113.510131
- Mineev KS, Goncharuk SA, Kuzmichev PK, Vilar M, Arseniev AS (2015) NMR dynamics of transmembrane and intracellular domains of p75NTR in lipid-protein nanodiscs. *Biophys J* 109: 772–782. doi:10.1016/j.bpj.2015.07.009
- Mufson EJ, Counts SE, Ginsberg SD (2002) Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 27: 1035–1048. doi:10.1023/a:1020952704398
- Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD (2008) Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* 8: 1703–1718. doi:10.1586/14737175.8.11.1703
- Mufson EJ, Li JM, Sobreviela T, Kordower JH (1996) Decreased trkA gene expression within basal forebrain neurons in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8: 25–29. doi:10.1097/00001756-199612200-00006
- Mufson EJ, Ma SY, Cochran EJ, Bennett DA, Beckett LA, Jaffar S, Saragovi HU, Kordower JH (2000) Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 427: 19–30. doi:10.1002/1096-9861(20001106)427:1<19::aid-cne2>3.0.co;2-a
- Nadezhdin KD, García-Carpio I, Goncharuk SA, Mineev KS, Arseniev AS, Vilar M (2016) Structural basis of p75 transmembrane domain dimerization. *J Biol Chem* 291: 12346–12357. doi:10.1074/jbc.m116.723585
- Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C (2013) Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Oncotargets Ther* 6: 943–955. doi:10.2147/OTT.S33766
- Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C (2004) Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167: 699–709. doi:10.1083/jcb.200407094

- Pathak A, Stanley EM, Hickman FE, Wallace N, Brewer B, Li D, Gluska S, Perlson E, Fuhrmann S, Akassoglou K, et al (2018) Retrograde degenerative signaling mediated by the p75 neurotrophin receptor requires p150Glued deacetylation by axonal HDAC1. *Dev Cell* 46: 376–387.e7. doi:10.1016/j.devcel.2018.07.001
- Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arévalo JC, Lee R, Hempstead B, Ferrer I, Iglesias M, Espinet C (2005) Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 166: 533–543. doi:10.1016/s0002-9440(10)62275-4
- Pham DD, Do HT, Bruelle C, Kukkonen JP, Eriksson O, Mogollón I, Korhonen LT, Arumäe U, Lindholm D (2016) p75 neurotrophin receptor signaling activates sterol regulatory element-binding protein-2 in hepatocyte cells via p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J Biol Chem* 291: 10747–10758. doi:10.1074/jbc.m116.722272
- Philippidou P, Valdez G, Akmentin W, Bowers WJ, Federoff HJ, Halegoua S (2011) Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 852–857. doi:10.1073/pnas.1015981108
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203–233. doi:10.1016/s0301-0082(02)00016-3
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221: 555–563. doi:10.1016/j.bbr.2010.11.058
- Schnitzler AC, Lopez-Coviella I, Blusztajn JK (2008) Purification and culture of nerve growth factor receptor (p75)-expressing basal forebrain cholinergic neurons. *Nat Protoc* 3: 34–40. doi:10.1038/nprot.2007.477
- Schütze S, Schneider-Brachert W (2009) Impact of TNF-R1 and CD95 internalization on apoptotic and antiapoptotic signaling. *Results Probl Cell Differ* 49: 63–85. doi:10.1007/400_2008_23
- Shao Y, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G, Cabot JB, Hilbush BS, Halegoua S (2002) Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* 157: 679–691. doi:10.1083/jcb.200201063
- Soltoff SP, Rabin SL, Cantley LC, Kaplan DR (1992) Nerve growth factor promotes the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and its association with the trk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267: 17472–17477. doi:10.1016/s0021-9258(18)41950-3
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ (2010) ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* 30: 15608–15615. doi:10.1523/jneurosci.2581-10.2010
- Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ (2008) Beta-amyloid(1–42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci* 28: 3941–3946. doi:10.1523/jneurosci.0350-08.2008
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 933–944. doi:10.1097/00005072-199708000-00011
- Tanaka K, Kelly CE, Goh KY, Lim KB, Ibáñez CF (2016) Death domain signaling by disulfide-linked dimers of the p75 neurotrophin receptor mediates neuronal death in the CNS. *J Neurosci* 36: 5587–5595. doi:10.1523/jneurosci.4536-15.2016
- Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* 9: e1000604. doi:10.1371/journal.pbio.1000604
- Underwood CK, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1664–1668. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.010
- Underwood CK, Reid K, May LM, Bartlett PF, Coulson EJ (2008) Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* 37: 346–358. doi:10.1016/j.mcn.2007.10.005
- Urra S, Escudero CA, Ramos P, Lisbona F, Allende E, Covarrubias P, Parraguez JJ, Zampieri N, Chao MV, Annaert W, et al (2007) TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem* 282: 7606–7615. doi:10.1074/jbc.m610458200
- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005) Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 25: 5236–5247. doi:10.1523/jneurosci.5104-04.2005
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G (2004) Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279: 44945–44954. doi:10.1074/jbc.m407986200
- Vilar M (2017) Structural characterization of the p75 neurotrophin receptor: A stranger in the TNFR superfamily. *Vitam Horm* 104: 57–87. doi:10.1016/bs.vh.2016.10.007
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Reversi A, Klos-Applequist JM, Karaca E, Simi A, Spuch C, Choi S, Friedman WJ, et al (2009a) Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 122: 3351–3357. doi:10.1242/jcs.055061
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, Choi S, Bothwell M, Mingarro I, Friedman WJ, et al (2009b) Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulfide-linked receptor dimers. *Neuron* 62: 72–83. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.020
- Vilar M, Sung T-C, Chen Z, García-Carpio I, Fernandez EM, Xu J, Riek R, Lee K-F (2014) Heterodimerization of p45-p75 modulates p75 signaling: Structural basis and mechanism of action. *PLoS Biol* 12: e1001918. doi:10.1371/journal.pbio.1001918
- Weskamp G, Schlöndorff J, Lum L, Becherer JD, Kim T-W, Saftig P, Hartmann D, Murphy G, Blobel CP (2004) Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279: 4241–4249. doi:10.1074/jbc.m307974200
- Winkler E, Julius A, Steiner H, Langosch D (2015) Homodimerization protects the amyloid precursor protein C99 fragment from cleavage by γ -secretase. *Biochemistry* 54: 6149–6152. doi:10.1021/acs.biochem.5b00986
- Yan H, Fernandez M, Wang J, Wu S, Wang R, Lou Z, Moroney JB, Rivera CE, Taylor JR, Gan H, et al (2020) B cell endosomal RAB7 promotes TRAF6 K63 polyubiquitination and NF- κ B activation for antibody class-switching. *J Immunol* 204: 1146–1157. doi:10.4049/jimmunol.1901170
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, et al (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274: 30202–30208. doi:10.1074/jbc.274.42.30202
- Yeiser EC, Rutkoski NJ, Naito A, Inoue J, Carter BD (2004) Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6 $^{-/-}$ mice. *J Neurosci* 24: 10521–10529. doi:10.1523/jneurosci.1390-04.2004
- Yin Q, Lin S-C, Lamothe B, Lu M, Lo Y-C, Hura G, Zheng L, Rich RL, Campos AD, Myszka DG, et al (2009) E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat Struct Mol Biol* 16: 658–666. doi:10.1038/nsmb.1605



License: This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Interaction between the transmembrane domains of neurotrophin receptors p75 and TrkA mediates their reciprocal activation

Received for publication, May 21, 2021, and in revised form, June 25, 2021. Published, Papers in Press, July 1, 2021,

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100926>

María L. Franco^{1,‡}, Kirill D. Nadezhdin^{2,‡}, Taylor P. Light³ , Sergey A. Goncharuk^{2,4}, Andrea Soler-Lopez¹, Fozia Ahmed³, Konstantin S. Mineev^{2,4} , Kalina Hristova³, Alexander S. Arseniev^{2,*}, and Marçal Vilar^{1,*} 

From the ¹Unit of Molecular Basis of Neurodegeneration, Institute of Biomedicine CSIC, València, Spain; ²Department of Structural Biology, Laboratory of NMR-Spectroscopy, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; ³Department of Materials Science and Engineering, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA; and ⁴Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Edited by Wolfgang Peti

The neurotrophin receptors p75 and tyrosine protein kinase receptor A (TrkA) play important roles in the development and survival of the nervous system. Biochemical data suggest that p75 and TrkA reciprocally regulate the activities of each other. For instance, p75 is able to regulate the response of TrkA to lower concentrations of nerve growth factor (NGF), and TrkA promotes shedding of the extracellular domain of p75 by α -secretases in a ligand-dependent manner. The current model suggests that p75 and TrkA are regulated by means of a direct physical interaction; however, the nature of such interaction has been elusive thus far. Here, using NMR in micelles, multiscale molecular dynamics, FRET, and functional studies, we identified and characterized the direct interaction between TrkA and p75 through their respective transmembrane domains (TMDs). Molecular dynamics of p75-TMD mutants suggests that although the interaction between TrkA and p75 TMDs is maintained upon mutation, a specific protein interface is required to facilitate TrkA active homodimerization in the presence of NGF. The same mutations in the TMD protein interface of p75 reduced the activation of TrkA by NGF as well as reducing cell differentiation. In summary, we provide a structural model of the p75–TrkA receptor complex necessary for neuronal development stabilized by TMD interactions.

Nerve growth factor (NGF) is a member of the mammalian neurotrophin (NT) protein family, which also includes brain-derived neurotrophic factor, NT3, and NT4/5 (1). NTs are implicated in the maintenance and survival of the peripheral and central nervous systems and mediate several forms of synaptic plasticity (2–5). NTs interact with two

distinct receptors, a cognate member of the tyrosine protein kinase receptor A (TrkA) family and the common p75 NT receptor, which belongs to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily of death receptors (6, 7). Trk receptor signaling is involved in survival and differentiation (8, 9), whereas p75 participates in several signaling pathways (reviewed in Ref. (10)). p75-mediated signaling is governed by the cell context and the formation of complexes with different coreceptors and ligands, such as sortilin/pro-NGF in cell death (11), Nogo/Lingo-1/NgR in axonal growth (12, 13), and TrkA/NGF in survival and differentiation (14). p75 also undergoes shedding and receptor intramembrane proteolysis, resulting in the release of its intracellular domain (ICD), which itself possesses signaling capabilities (15–17).

Several lines of evidence implicate functional interactions between TrkA and p75NTR in NGF-triggered signal transduction (3, 18–20). TrkA and p75 receptors have nanomolar affinities for NGF and cooperate in transducing NGF signals (7, 21). The expression patterns of these two receptors overlap extensively (22), and in some instances, such as in the neurons of the dorsal root ganglion, TrkA is exclusively expressed in conjunction with p75 (23).

p75 has been experimentally demonstrated to enhance the response of TrkA to NGF (14, 24–26). In sympathetic neurons and oligodendrocytes, TrkA signaling inhibits the proapoptotic signaling of p75 (27–29). Primary dorsal root ganglion and sympathetic neurons derived from p75-null animals show attenuated survival responses to NGF (25, 26, 30), confirming the physiological role of p75–TrkA interactions. As the interaction between the two receptors seems to not engage the ligand-binding domains of the extracellular region (31), the structural basis of such direct interaction is still unknown.

Here, we demonstrate that the interaction between TrkA and p75 is mediated, at least in part, by the transmembrane domains (TMDs). We validate these findings using functional studies in cells expressing the full-length receptors.

[‡] These authors contributed equally to this work.

* For correspondence: Marçal Vilar, mvilar@ibv.csic.es; Alexander S. Arseniev, aars@nmr.ru.

TrkA and p75 complex formation

Results

p75 and TrkA form a constitutive complex at the plasma membrane

We performed FRET experiments to determine if TrkA and p75 interact directly at the plasma membrane of live cells. Human embryonic kidney 293T (HEK 293T) cells transiently cotransfected with full-length TrkA tagged with mTurquoise (mTurq; the donor fluorescent protein) and full-length p75 tagged with enhanced YFP (eYFP) (the acceptor fluorescent protein) were imaged, and small regions of the plasma membrane were selected and analyzed. Illustrations of the TrkA-mTurq and p75-eYFP constructs used in FRET experiments are shown in Figure 1A. In each region of the cell membrane, we determined the FRET efficiency, the concentration of TrkA-mTurq, and the concentration of p75-eYFP using the fully quantified spectral imaging (FSI)-FRET software (Fig. 1B) (32). These experiments were designed such that FRET can only occur between TrkA and p75, not between TrkA-TrkA and p75-p75. We also performed control FSI-FRET experiments using two unrelated proteins, linker for the activation of

T-cells (LAT) and fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), which are not expected to interact specifically and thus should give zero hetero-FRET. In addition, the proteins were designed such that the fluorescent tags are positioned differently with respect to the plasma membrane—the mTurq fluorophore is attached to the C terminus of full-length LAT, whereas the eYFP fluorophore is attached to the C terminus of an FGFR3 construct lacking the intracellular region, “ECTM” (Fig. 1A). Therefore, these two proteins will also not give rise to a nonspecific FRET signal (random or “proximity” FRET) (33). As expected, because of the large separation between the fluorescent tags, the FRET efficiencies measured between these two control proteins are localized around zero at all concentrations measured (Fig. 1B). Therefore, this control dataset demonstrates the scenario where there is no FRET between the proteins.

In the absence of ligand, full-length TrkA and p75 exhibit positive (greater than zero) FRET efficiency values over all TrkA and p75 concentrations measured (Fig. 1B). Therefore, these data suggest that TrkA and p75 interact directly at the plasma membrane. With these data alone, we cannot

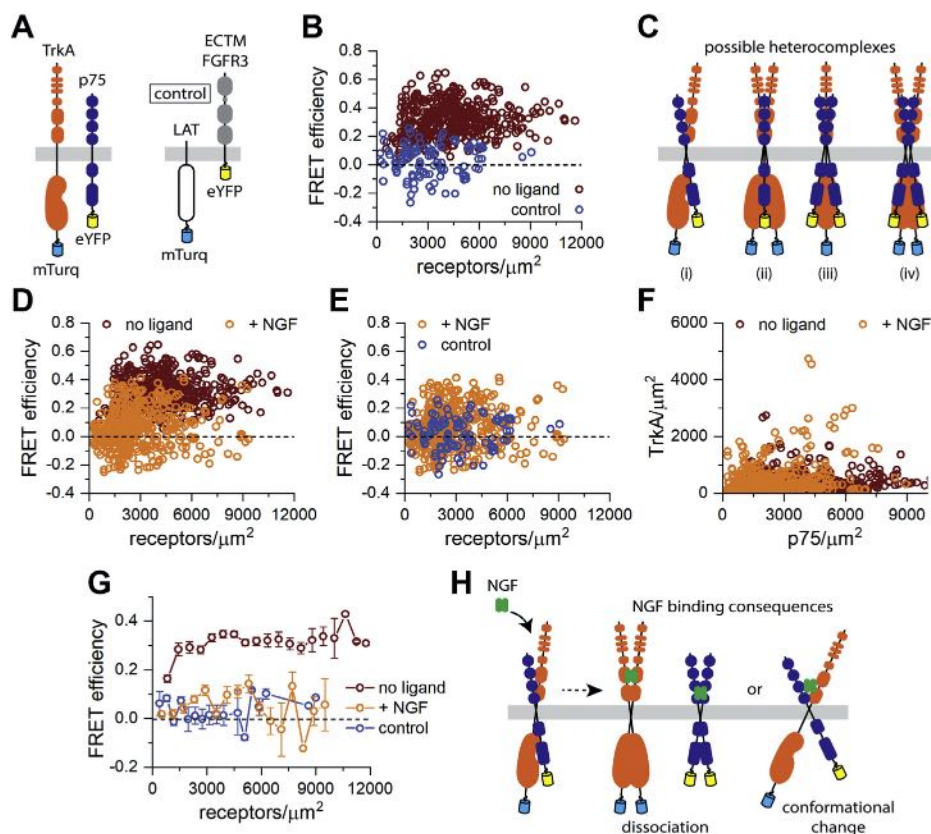


Figure 1. TrkA-p75 FSI-FRET experiments. A, illustrations of the TrkA-mTurq and p75-eYFP proteins used in FRET experiments along with the LAT-mTurq and ECTM-FGFR3-eYFP proteins used in control experiments. B, FRET efficiencies as a function of total receptor concentration measured for TrkA-mTurq and p75-eYFP in the absence of ligand compared with a zero FRET control dataset. C, illustrations of some possible stoichiometries of the TrkA-p75 hetero-complex: (i) heterodimer, (ii) heterotrimer of two TrkA and one p75, (iii) heterotrimer of one TrkA and two p75, and (iv) heterotetramer or two TrkA and two p75. D, FRET data for TrkA-mTurq and p75-eYFP in the presence of 100 ng/μl NGF compared with the data in the absence of NGF. E, the FRET data for TrkA and p75 in the presence of NGF compared with the zero FRET control dataset. F, expression of TrkA-mTurq and p75-eYFP measured on the cell surface for the experiments performed in the absence and presence of NGF. G, the FRET data for TrkA-p75 in the absence and presence of NGF and for the control dataset were binned and compared. H, illustrations of the possible consequences of NGF binding to the TrkA-p75 hetero-complex, which could be either dissociation of the hetero-complex to stabilize the respective homodimers or an NGF-induced conformational change. The bars represent the standard error of the mean. eYFP, enhanced YFP; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; FSI, fully quantified spectral imaging; LAT, linker for the activation of T-cells; mTurq, mTurquoise; NGF, nerve growth factor; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

determine an accurate stoichiometry of the TrkA–p75 heterocomplex. Given that TrkA and p75 exist in monomer–dimer equilibrium in the absence of ligand, it is possible that TrkA and p75 associate as heterodimers or oligomers of higher order (Fig. 1C). Next, we sought to determine if NGF ligand binding influences the TrkA–p75 heterocomplex, and we performed similar FSI–FRET experiments for TrkA–p75 in the presence of 100 ng/μl NGF (Fig. 1D). The FRET efficiencies measured for TrkA–p75 in the presence of NGF are noticeably lower compared with the data in the absence of ligand. Furthermore, comparison of the liganded TrkA–p75 FRET data to the LAT–FGFR3 control experiment data revealed no significant differences (Fig. 1E), which suggests that the fluorophores attached to the C termini of TrkA and p75 are too far away from one another to observe a FRET signal in the ligand-bound state. The expression levels of the TrkA and p75 at the cell surface are similar in both sets of experiments (with/without NGF) so these differences are not a reflection of altered gene expression (Fig. 1F). The decrease in FRET may mean that the heterointeractions are abolished, for instance, because of ligand-induced homodimer stabilization, or it may be because of conformational

changes in the heterocomplex, which leads to decreased FRET.

The FRET data for TrkA–p75 in the absence and presence of NGF and the control dataset were binned and compared in order to visualize the average FRET efficiency as a function of receptor concentration (Fig. 1G). For the control dataset and the TrkA–p75 data in the presence of NGF, the average FRET efficiencies remain around zero as expected from the raw data (Fig. 1G). For the TrkA–p75 data in the absence of ligand, we observe average FRET efficiencies greater than zero over all concentrations (Fig. 1G). Furthermore, at the low receptor concentration regime, the average FRET efficiencies increase as a function of receptor concentration, suggesting increasing TrkA–p75 interactions (Fig. 1G).

Direct interaction between p75 and TrkA TMDs

Previous findings have suggested that TrkA can form a complex with p75-CTF (a membrane-anchored C-terminal fragment) by means of TMD interaction (17). In addition, the TMD of p75 is involved in the formation of the high-affinity NGF-binding sites (34), suggesting that the TMD may

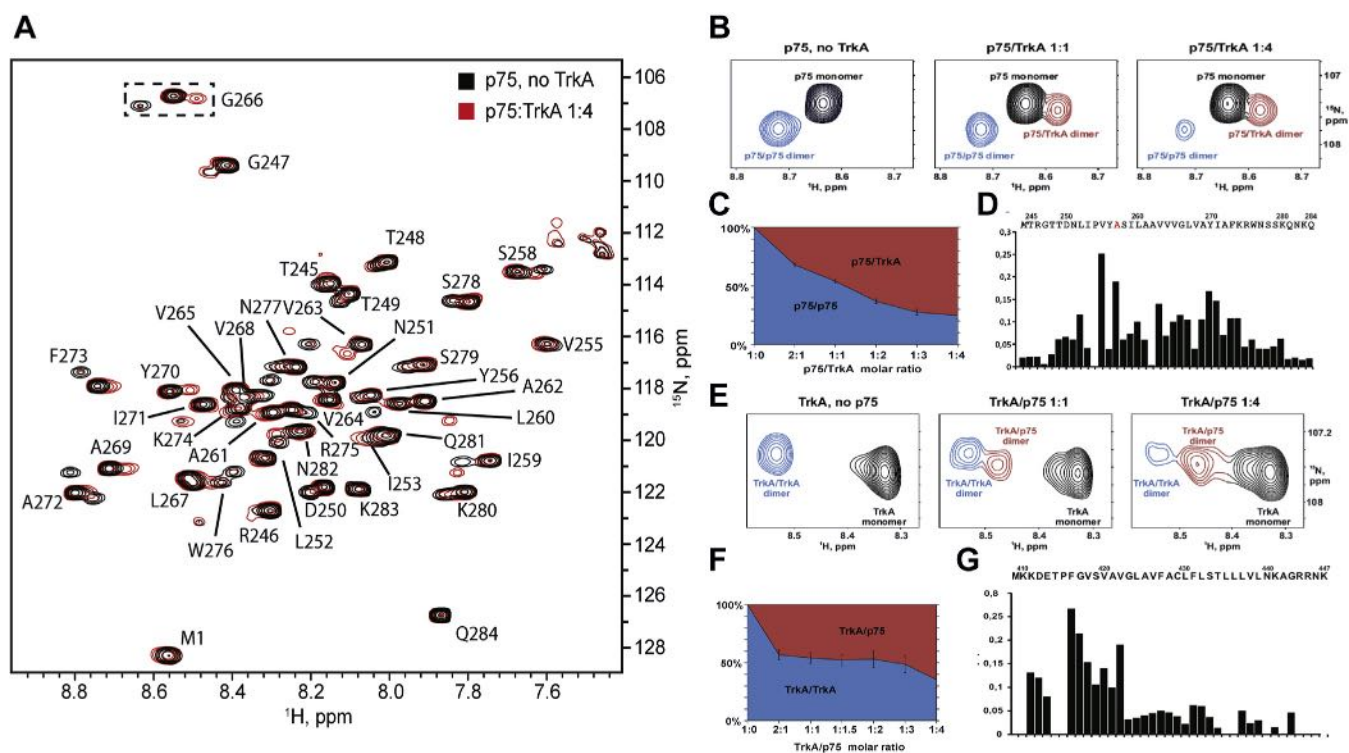


Figure 2. p75–TrkA interactions as observed by NMR. A, overlay of two ^{15}N -transverse relaxation optimized spectroscopy experiments: (black) ^{15}N -labeled p75 without TrkA and (red) ^{15}N -labeled p75 after addition of unlabeled TrkA with p75:TrkA molar ratio of 1:4. ^1H – ^{15}N assignments of p75 backbone amid proton resonances are provided. B, ^{15}N -labeled p75-TM-C257A titration with unlabeled TrkA TM. Left to right, p75 monomer (black), p75–p75 homodimer (blue), and p75–TrkA heterodimer (red) states are observed in the G266 amide proton crosspeak in $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -heteronuclear single quantum coherence spectra. G266 was chosen as representative as its crosspeak is situated away from other peaks, and it shows clear monomer–homodimer–heterodimer transitions. C, population of p75–p75 homodimers relative to that of p75–TrkA heterodimers (p75–p75 peak intensity is divided by sum of p75–p75 and p75–TrkA peak intensities), expressed as a function of the p75–TrkA molar ratio. The population of p75–p75 dimer decreases, whereas that of p75–TrkA dimer increases as more TrkA is added to the sample. D, chemical shift changes observed upon interaction with TrkA are shown on top of p75-TM sequence. E, ^{15}N -labeled TrkA-TMD titration with unlabeled p75-TM-C257A. Left to right, TrkA monomer (black), TrkA–TrkA homodimer (blue), and p75–TrkA heterodimer (red) states are observed in the amide proton crosspeak in $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -heteronuclear single quantum coherence spectra. F, population of TrkA–TrkA homodimers relative to that of TrkA–p75 heterodimers (TrkA–TrkA peak intensity is divided by sum of TrkA–TrkA and TrkA–p75 peak intensities), expressed as a function of the TrkA–p75 molar ratio. The population of TrkA–TrkA dimer decreases, whereas that of TrkA–p75 dimer increases as more p75 is added to the sample. G, chemical shift changes observed upon interaction with p75 are shown on top of TrkA-TMD sequence. For all experiments, the lipid-to-protein molar ratio (LPR) remains constant at 80. TM, transmembrane; TMD, transmembrane domain; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

TrkA and p75 complex formation

mediate the direct interaction between p75 and TrkA. Therefore, we were interested in investigating the interaction between the p75 and TrkA, taking into account the recently reported NMR structures of p75 and TrkA TMDs (35, 36). We examined the interaction of p75-TM-wt with the TrkA-TMD in lipid micelles using NMR spectroscopy. Increasing amounts of TrkA-TM were added to the ^{15}N -labeled p75-TM in dodecylphosphocholine (DPC) micelles, and the chemical shifts (CSs) were monitored in a ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum coherence spectrum (Fig. 2A). CSs are very sensitive to the electronic environment of a nucleus and serve as an ideal instrument to probe the protein-protein interaction. Previous work in our laboratory found that p75-TM-wt forms spontaneous disulfide dimers (35). We titrated the ^{15}N -labeled p75-TM-wt disulfide dimer with increasing concentrations of TrkA-TM-wt solubilized in DPC micelles, retaining the constant lipid-to-protein ratio (LPR). The titration revealed no CS changes. We used several LPRs and at least two independent preparations of p75-TM-wt. As the dimerization of p75-TMD-wt is irreversible (35), we performed the experiments with the mutant p75-C257A, which forms noncovalent homodimers (35) and allows the possibility to obtain the monomeric p75-TMD. According to the previous work (35), the C257A mutation does not induce any substantial changes to the structure of p75 TMD. Several CS changes were observed in the heteronuclear single quantum coherence-NMR spectrum of p75-TM-C257A upon titration with TrkA-TM-wt, suggesting the formation of specific p75-TrkA heterocomplexes (Fig. 2B).

To identify the oligomer size of the complex, we measured the cross-correlated relaxation rates of p75-TM-C257A signals (Fig. S1). According to the recent work, the NMR-derived hydrodynamic radii of TMDs in DPC micelles can be used to distinguish the various oligomeric forms of the proteins (37). Here, we observed the rotational correlation time (and hydrodynamic radius) of a p75-TM-C257A monomer at 45 °C to be 10.2 ± 0.4 ns (2.61 nm), a p75-TM-C257A homodimer to be 13.1 ± 0.6 ns (2.85 nm), and the heterocomplex to be 12.7 ± 0.8 ns (2.82 nm). In other words, the observed new complex formed by TrkA-TM and p75-TM-C257A is a heterodimer as the rotational correlation time of the heterocomplex was similar to that of the homodimer.

With the increase of TrkA concentration, the percentage of p75 homodimer decreased, whereas that of p75-TrkA heterodimer increased (Fig. 2C). This implies that homodimerization and heterodimerization of p75-TM are the competing processes. The titration curve revealed homodimerization and heterodimerization constants of comparable magnitudes. Similar effects were observed when ^{15}N -labeled TrkA-TMD sample was titrated with the unlabeled p75-TM-C257A (Fig. 2, E and F). Addition of p75-TM-C257A decreased the concentration of TrkA-TM homodimer, whereas the novel heterodimeric state had emerged, which is indicative of the competition. Thus, we can state that TrkA interacts with the monomeric form of p75 TMD but does not bind the disulfide-crosslinked dimer of the protein. Most likely, the covalent dimerization shields some of the p75 residues necessary to interact with the TrkA TMD, or the interaction requires a

rearrangement of the dimer that cannot be achieved because of the restraints imposed by the disulfide bonds.

CS changes were detected along the p75 TMD sequence (Fig. 2D), which is expected as the TrkA interaction breaks the p75-TM-C257A dimerization. The residues with the highest CS changes are shown in Figure 2D. To find the residues undergoing CS changes in the TrkA-TMD, we performed the titration on labeled ^{15}N -TrkA-TMD homodimer with unlabeled p75-TM-C257A (Fig. 2E). With increasing p75-TM-C257A concentration, the percentage of TrkA homodimer decreased, whereas the heterodimer increased (Fig. 2F). The NMR CSs indicated that the region of higher CS changes (Fig. 2G; $\Delta\delta > 0.1$) upon interaction of p75-TMD is located mainly at the N terminus of TrkA TMD.

These results support a direct interaction between p75-TMD and TrkA-TMD and suggest that the formation of a heterodimer outcompetes the homodimerization of each TMD. Although the NMR shows that the interaction is direct, we cannot use the CS changes to identify the protein-protein interface between the TMDs in a membrane. Recently, it has been shown that, by contrast to soluble proteins, CS changes have almost zero predictive power to map protein interfaces in transmembrane regions (38). CS changes primarily report hydrogen bonding and are insensitive to van der Waals contacts between the protein side chains, which are the main driving force for dimerization of membrane proteins (38).

Multiscale molecular dynamics

The crowding of the NMR spectra with several TrkA and p75 species (monomer, homodimer, and heterodimer) precludes the complete CS assignment and the structure calculation of the heterocomplex. To explore further the interaction between TrkA and p75 TMDs, we used molecular dynamics (MD) (Fig. 3). MD simulations provide a useful approach for modeling the TMD interactions (39). Both full-atom (FA) and coarse-grained (CG) modeling has been previously used to optimize the dynamics and interactions between different TMDs (39). To model the heterodimerization of p75-TMD and TrkA-TMD, two CG helices were inserted in a parallel orientation relative to one another separated 6 nm in a preformed 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) bilayer, and 24 simulations of 5 μs were run (total time of 120 μs) (Table S1 and Fig. 3A). In all but one of the 12 simulations, the TrkA-p75 heterodimer was formed within the first 2 μs (except for the simulation number #5 that formed the heterodimer at 5 μs) and did not dissociate during the remainder of the simulation (Fig. 3B). The POPC model membrane was well equilibrated with average values for the area per lipid and hydrophobic thickness (between glycerol groups) of 63.2 \AA^2 and 34.8 \AA , respectively, that are in good agreement with the experimental values (40) (Table S2). From each of the heterocomplexes (Fig. 3C), we compute the RMSD between them and found a cluster of seven models with an average RMSD of 2.12 \AA (Fig. 3D). The final model was converted from CG to FA to further study the packing of the interaction in a POPC lipid bilayer during 100 ns of FA-MD,

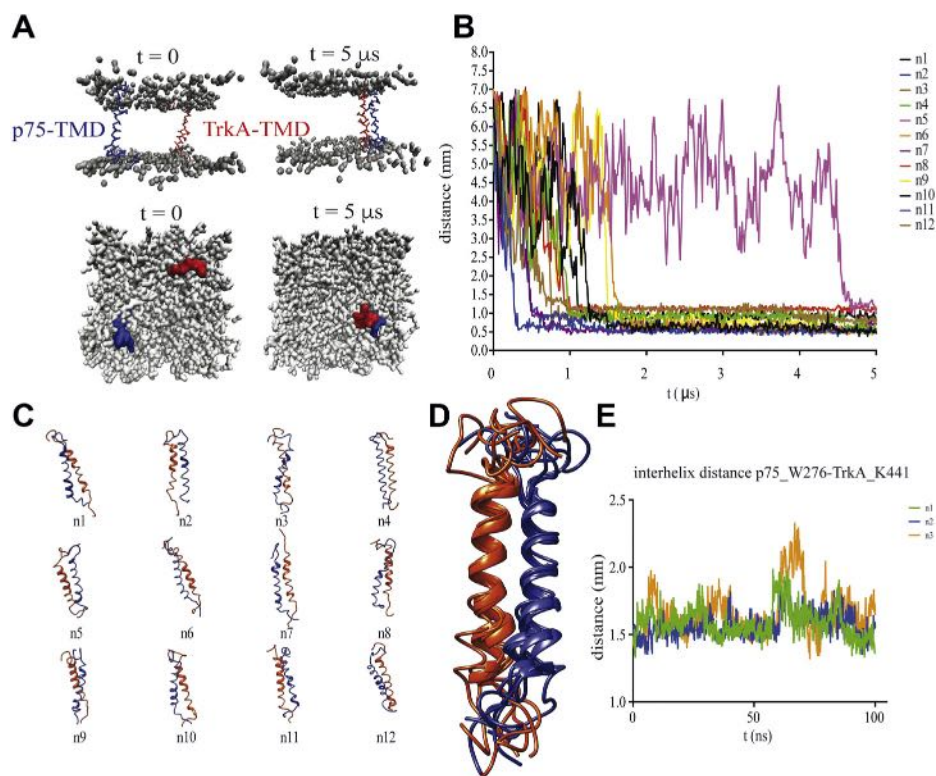


Figure 3. Multiscale MD of TrkA-TMD and p75-TMD. A, coarse-grained TrkA-TMD and p75-TMD helix dimerization simulation. The initial system configuration (0 μ s) consists of two helices (red and blue) inserted in a POPC bilayer in a parallel orientation with an interhelical separation of interhelical distance (dHH) \approx 55 Å. The choline, phosphate, and glycerol (gray) backbone particles of the POPC molecules are shown. The snapshot at 5 μ s illustrates the stable TM helix heterodimer. B, distance between TrkA-TMD and p75-TMD during CG-MD simulation time. C, structural models of the final conformations from the 12 simulations. In blue p75 and in red TrkA is shown. D, superposition of the seven conformations with lowest RMSD found by CG-MD. E, interhelical distance between p75-TMD-W276 and TrkA-TMD-K441 in the FA-MD simulation done by triplicate. CG, coarse-grained; MD, molecular dynamics; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; TM, transmembrane; TMD, transmembrane domain; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

done in triplicate. The final POPC model membrane was well equilibrated with average values for the area per lipid and hydrophobic thickness (between phosphate groups) of 63.3 Å² and 38.4 Å, respectively, which are in good agreement with the

experimental values (40). The electron density of the membrane was calculated and shown in Fig. S2. The interhelical distance between residues at the C terminus of the helix (p75-W276 and TrkA-K441) was calculated along the total

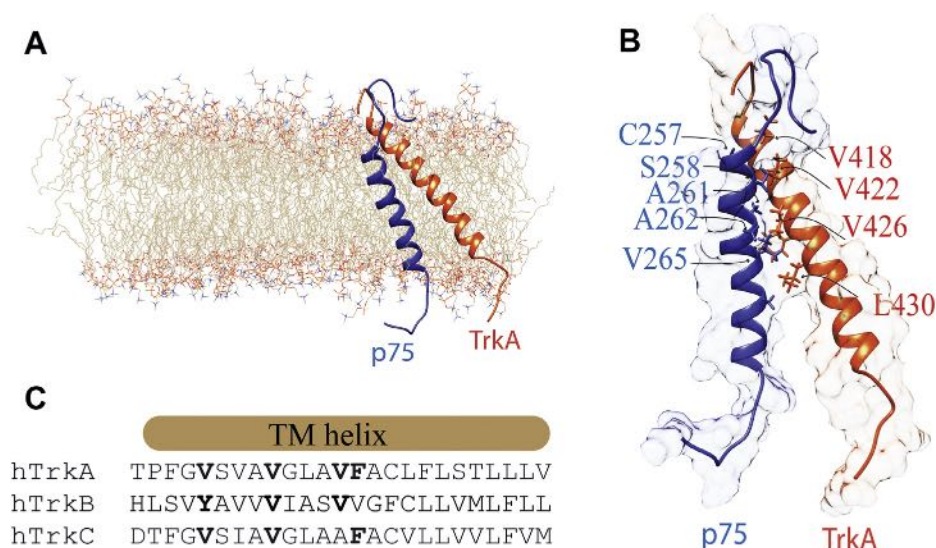


Figure 4. Structural models of the p75-TrkA TMD heterodimer. A and B, schematic representation of the spatial structure of the heterodimer p75-TMD (blue) and TrkA-TMD (orange) after 100 ns full-atom MD. The residues participating in the dimer interface are shown in blue (p75) and red (TrkA). C, protein sequence alignment of TrkA, TrkB, and TrkC TMDs. In bold are the conserved residues. MD, molecular dynamics; TMD, transmembrane domain; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

TrkA and p75 complex formation

simulation time (Fig. 3E), indicating the equilibration of a stable complex.

The protein interface of p75-TMD participating in the interaction with TrkA-TMD is $C_{257}S_{258}XXA_{261}A_{262}XXV_{265}G_{266}XXA_{269}XX$ (Fig. 4, A and B). This interface contains the motif $A_{262}XXXG_{266}XXA_{269}$ that was previously identified in the homodimerization of p75-TMD-C257A (35) and is supported by the NMR experiments shown previously, indicating that heterodimerization with TrkA-TMD competes with the p75-TMD noncovalent homodimerization. In addition, the C257 residue forms a part of the heterodimer interface supporting our observations that disulfide dimers do not significantly bind to the TrkA-TMD. The TrkA-TMD heterodimer interface is formed by the motif $V_{418}XXXV_{422}XXXV_{426}F_{427}XXL_{430}$ (Fig. 4B) where the central valine residues make the closest contact with the p75-TMD. Interestingly, several of these residues are conserved in TrkB and TrkC (Fig. 4C) suggesting that these receptors interact with p75 in a similar manner as TrkA.

Altogether, the NMR and FRET data support the direct interaction between TrkA and p75, and the MD provides insight into a possible heterodimer model.

The transmembrane heterodimer interface modulates TrkA activation and sensitization to lower concentrations of NGF

In vivo data suggest that in sensory neurons, p75 helps TrkA to respond to the lower concentrations of NGF (26) and enhances the response of TrkA to NGF (14, 24). One current hypothesis is that the binding of p75 to TrkA induces a conformational change in TrkA that facilitates both the binding of NGF to TrkA (24) and the activation of TrkA (26). To test if the protein interface found previously has any physiological role, we sought to determine if mutations on the p75 transmembrane protein interface influences TrkA activation to lower concentrations of NGF (Fig. 5A). We coexpressed p75 with TrkA full-length receptors in HeLa cells and stimulated with increasing concentrations of NGF (0, 0.1, 1, 10, and

100 ng/ml). Western blot analysis of cell lysates was probed with specific antibodies against the activation loop of the TrkA kinase domain (Tyr675 and Tyr676) (Fig. 5B). Quantification of the protein bands corresponding to the phosphorylation of TrkA was plotted against NGF concentration. Fitting the data to a dose (NGF)–response (phosphorylation) curve allows an estimation of the EC_{50} of NGF, the concentration of NGF that provokes a response halfway between the basal response and the maximal response (Fig. 5D). HeLa cells transfected with TrkA present a $LogEC_{50}$ of -9.219 ± 0.087 (an $EC_{50} = 6.03 \times 10^{-10}$ M). In cells coexpressing TrkA and p75, an $LogEC_{50}$ of -9.524 ± 0.176 (an $EC_{50} = 2.99 \times 10^{-10}$ M) was found, showing a small but significant effect of p75 on the activation of TrkA by NGF. The parallel curve suggested an agonist effect of p75 and NGF on the activation of TrkA. To analyze the effect of p75-TMD, we used a construct of p75 with its TMD swapped with the one from the TNFR, mutant p75-TNFR. A decrease in the NGF sensitivity was observed in comparison to p75-wt ($LogEC_{50} = -8.56 \pm 0.54$; $EC_{50} = 2.7 \times 10^{-9}$ M), indicating that the effect of p75-wt is lost in the p75-TNFR construct. As the protein heterodimer interface contains the motif $A_{261}A_{262}XXXG_{266}XXA_{269}$, we made a construct with a triple mutation A262,G266,A269 to Ile (p75-AGA mutation). The rationale behind this is that the introduction of a hydrophobic bulky residue, Ile, would impair the proper interaction with the TrkA-TMD. Fitting of the values obtained from the lysates transfected with TrkA and p75-AGA showed a $LogEC_{50}$ of -8.776 ± 0.037 , which corresponds to an $EC_{50} = 1.7 \times 10^{-9}$ M (Fig. 5D), that accounts for more than one order of magnitude higher than in the presence of p75-wt supporting that this interface plays a key role in TrkA activity modulation by p75.

p75 needs a specific interface in the TMD to interact to TrkA

The finding that the activation of TrkA in the presence of the p75-AGA mutant is lower than in the absence of p75

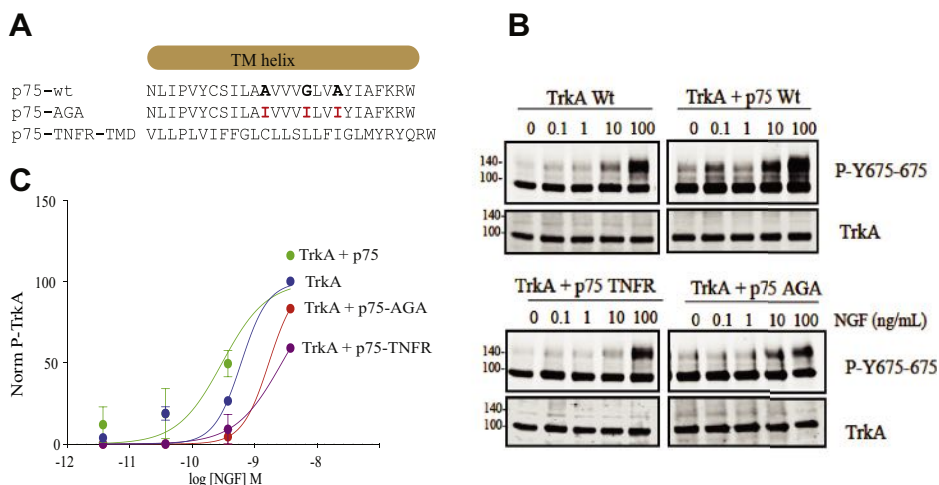


Figure 5. TrkA activation is modulated by p75-TMD. A, protein sequences of the different mutant constructs of p75-TMD. The residue mutated is shown in *bold*. B, western blots of lysates from HeLa cells transfected with the indicated constructs and stimulated with increasing concentrations of NGF. Membranes were probed using a TrkA-P-Tyr675 specific antibody. C, normalized activation of TrkA using increasing concentrations of NGF in the absence or the presence of p75 mutant constructs indicated. The bars represent the standard error of at least three independent experiments. *p* Values are reported in the article. NGF, nerve growth factor; TMD, transmembrane domain; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

suggested an antagonist or inhibitor behavior for this mutant. To further study the effect of this mutation on the heterodimer complex, we introduced the triple mutation AGA/III into the p75-TMD and performed a CG-MD followed by FA-MD simulation similar to the p75-TMD-wt constructs shown previously (Fig. S3). MD analysis showed that although p75-TMD-AGA mutant still interacts and binds to the TrkA-TMD with similar kinetics as the p75-TMD-wt, the heterodimer arrangement is changed significantly. It has been previously shown that TrkA-TMD contains two homodimer interfaces; an active dimer formed upon NGF binding and an inactive dimer formed in the absence of NGF. The 12 independent simulations of p75-TMD-wt showed a restricted binding interface localized close to the inactive homodimer interface, leaving the active homodimer interface of TrkA free and accessible (Fig. 6A). However, after 12 independent simulations, the endpoint of p75-TMD-AGA is almost equally distributed in all the possible TrkA-TMD interfaces (Fig. 6B), where the active homodimer interface is hidden by p75-TMD. This result indicates that p75-TMD-AGA could impair TrkA active homodimerization and may explain the weaker activation of TrkA in the presence of p75-TMD-AGA.

p75-AGA/III reduces NGF-induced differentiation of PC12 cells

To further support our finding that p75 needs a specific heterodimer interface to fully activate TrkA, we overexpressed p75-wt and p75-AGA/III in PC12 cells that endogenously express TrkA and quantified the neurite length upon stimulation with NGF. As shown in Figure 6C, the PC12 cells transfected with p75-AGA/III had shorter neurite lengths at 24 h than cells

transfected with p75-wt ($16.02 \mu\text{m} \pm 0.98$, $n = 181$ versus $22.63 \mu\text{m} \pm 1.69$, $n = 89$) and similar length as PC12 cells transfected with the empty vector ($14.09 \mu\text{m} \pm 1.25$, $n = 92$) (control in Fig. 6C). These experiments suggest a reduction in the activation of TrkA by NGF of p75-AGA/III in comparison to p75-wt.

Discussion

The present study provides, to the best of our knowledge, the first structural evidence of a direct interaction between p75 and TrkA. While data from *in vitro* and *in vivo* experiments have suggested the existence of a complex formed by p75 and TrkA (41–43), repeated attempts to observe the direct interaction between both receptors using different biochemical and structural approaches have been unsuccessful. Experimental evidence of the existence of a TrkA-p75 complex were based on coimmunoprecipitation studies (17, 21, 44) and by biophysical methods such as copatching (45) and fluorescence recovery after photobleaching (46). In addition, a handful of studies have suggested that the TMDs and ICDs of p75 could be responsible for its interaction with TrkA (21, 34, 47, 48).

Here, we demonstrated that the complex formed by p75 and TrkA is mediated by the TMDs, supporting the findings by previous reports (21, 34). The results of our NMR titration experiments point to a relatively weak affinity constant, similar to that calculated for p75 noncovalent dimerization. This is around ten times weaker than the affinity constant calculated for glycoprotein-A homodimerization and explains why these complexes have been difficult to detect by coimmunoprecipitation in the presence of detergents (*i.e.*, glycoprotein A TMD dimers are resistant to SDS-PAGE). Heterocrosslinking

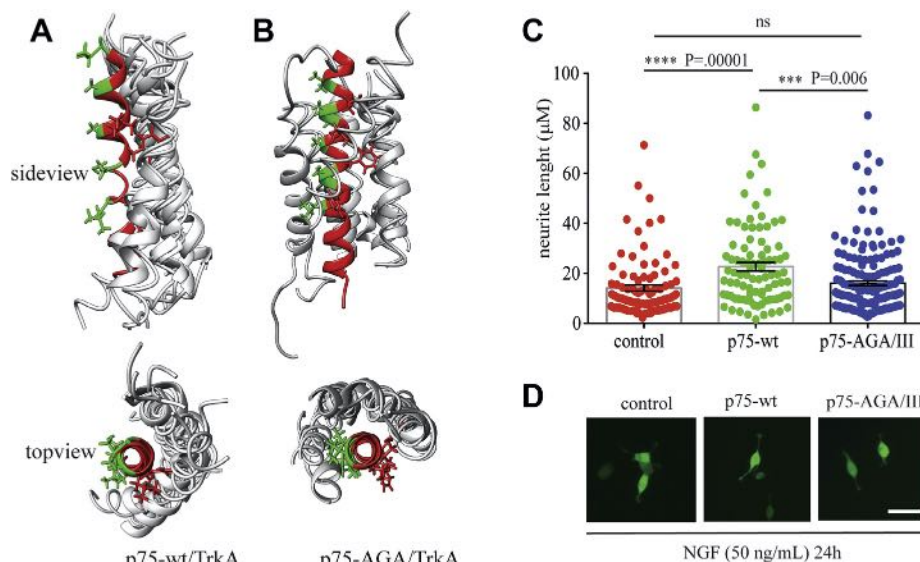


Figure 6. Effect of the mutation of the p75 heterodimer interface. A and B, result of 12 simulations by CG-MD of p75-TMD-AGA mutant (A) or p75-TMD-wt (B) and TrkA-TMD in POPC model membranes. The position of the p75-TMD helix (gray) respect to the TrkA-TMD (red) after each simulation is shown. In green and red are shown the residues that belong to the active and inactive homodimer interface of TrkA described in the study by Franco *et al.* C, quantification of the neurite length (micrometer) of PC12 cells electroporated with the indicated constructs and GFP at 24 h of addition of NGF (50 ng/ml). The bars represent the standard error of at least three independent electroporation experiments. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA, and the *p* values are reported above each bar. D, representative fluorescence microscopy of PC12 cells electroporated with the indicated constructs stimulated with NGF (50 ng/ml) for 24 h after electroporation. The bar represents 50 μm . CG, coarse-grained; MD, molecular dynamics; NGF, nerve growth factor; POPC, palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; TMD, transmembrane domain.

TrkA and p75 complex formation

experiments similarly failed to detect p75–TrkA complexes, although probably for different reasons, as crosslinking requires the specific residues (*i.e.*, Lys) to be close to each other and oriented in a specific manner, not always possible even in a heterocomplex. Our results are in agreement with those of fluorescence recovery after photobleaching experiments, which show that p75 is fully mobile at the cell membrane but becomes restricted in mobility upon TrkA coexpression (46), and with biochemical evidence suggesting that the TMD of p75 is necessary for the formation of high-affinity NGF-binding sites (34). Although the TMD interaction is weak, *in vivo*, the levels of p75 and Trk normally exist at a ratio of approximately 10:1 (49, 50) favoring their heterointeractions over TrkA homointeractions.

Recently, it has been shown that TrkA has two homodimer interfaces in the TMD; one active and one inactive (36). The active interface corresponds to the TrkA bound to its ligand NGF. And the inactive dimer interface corresponds to the preformed dimer of TrkA in the absence of NGF. The observed binding of p75-TMD to TrkA takes place mainly through an interface that is opposite to the active interface and partially covering part of the inactive dimer interface, suggesting that binding of p75 to TrkA may favor the formation or stabilization of TrkA active homodimers. In addition, stabilization of a preformed dimer would be compatible to an increase in the affinity of TrkA for NGF in the presence of p75 (18), suggesting that the heterodimer p75–TrkA described here forms the basic unit of the NGF high-affinity sites. The finding that mutations in the p75 protein interface, as shown here with the p75–AGA mutant, impact the TrkA activation and supports the requirement of specific TMD interactions in the NT receptors. As it has been shown recently, NGF binding can induce the rotation of the TrkA TM dimer from the inactive to the active interface (36, 51). This conformational change is supported by our FRET analysis, which reveals that NGF binding alters the TrkA–p75 heterocomplex that we observed in the absence of ligand. There are some possible explanations for this result, which are both illustrated in Figure 1H. The first option is that NGF binding could cause the dissociation of the TrkA–p75 heterocomplex, stabilizing the respective homodimers instead. Another explanation is that NGF binding induces a conformational change of the TrkA–p75 heterocomplex that alters the positioning of the fluorescent proteins, increasing their separation and thus decreasing the FRET signal. While these data cannot distinguish between these two possible effects, the FRET data clearly demonstrate that TrkA and p75 interact directly in the absence of ligand and that NGF binding alters the heterocomplex.

Our MD analysis of p75–AGA–TrkA interactions showed that the inactive dimer interface is accessible suggesting that p75–AGA interaction may displace the equilibrium toward the inactive homodimer of TrkA in the absence of NGF. This would affect the activation of TrkA and lead to lower cell differentiation capabilities of PC12 cells overexpressing the p75–AGA mutant. Alternatively, the binding of the p75–AGA mutant may affect the conformational change induced by NGF binding resulting in a less activation of TrkA.

Altogether, we show that a specific transmembrane interaction is required for the positive role of p75 in TrkA activation by NGF. In conclusion, we provide a new structural insight on the highly dynamic p75–TrkA heterocomplex, paving the way to new investigations about the biological relevance of such interactions.

Experimental procedures

p75-TM and TrkA-TM constructs for cell-free expression

The gene encoding transmembrane and juxtamembrane residues 245 to 284 (MT245RGT^DNLIPVYCSILA^VVVGLVAYIAFKRW^NSSKQNKQ284) of human p75 receptor (p75-TM-wt) was amplified by PCR from six chemically synthesized oligonucleotides (Evrogen) partially overlapped along its sequence. The C257A point mutant form of p75-TM (p75-TM-C257A) was obtained by site-directed mutagenesis by PCR. The PCR products were cloned into a pGEMEX-1 vector by three-component ligation using the NdeI, AatII, and BamHI restriction sites. Expression constructs for human TrkA-TM (MK410KDETPFGVSVAVGLAVFAC^LFLSTLLLVLNK^AGRRNK447) were similarly prepared by PCR.

FSI–FRET experiments

HEK 293T cells used in the FRET experiments were purchased from American Type Culture Collection (CRL-3216). The cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Scientific; 31600-034) containing 3.5 g/l D-glucose, 1.5 g/l sodium bicarbonate, and 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma–Aldrich; F4135). HEK 293T cells were seeded in 35-mm glass bottom collagen-coated petri dishes (MatTek Corporation) at a density of 2 × 10⁵ cells/dish and cultured for 24 h. The cells were cotransfected with pcDNA constructs encoding for TrkA tagged with mTurq (the donor) and p75 tagged with eYFP (the acceptor). The TrkA–mTurq plasmid was generated as described (32, 52). The p75–eYFP construct was cloned by overlapping PCR into the same pcDNA vector. The LAT and ECTM FGFR3 plasmids used for control experiments were generated as described previously (53, 54). Transfection was performed with Lipofectamine 3000 (Invitrogen; L3000008) using 1 to 4 µg of total DNA at a TrkA:p75 ratio of 2:1 or 1:1. In addition, cells singly transfected with either TrkA–mTurq or p75–eYFP were used for calibration as described (32). After 12 h following transfection, the cells were washed twice with starvation media (serum-free and phenol red-free media) and serum starved in starvation media for 12 h overnight. Prior to imaging, the starvation media were replaced with hypo-osmotic media (10% starvation media, 90% deionized water, and 25 mM Hepes) to “unwrinkle” the highly ruffled cell membrane under reversible conditions as described (55). Cells were incubated for 10 min and then imaged under these conditions for approximately 1 h. In some experiments, soluble human beta nerve growth factor (Cell Signaling Technology; 5221SC) was diluted to a final concentration of 100 ng/µl with the hypo-osmotic media before adding to the cells.

Cell images were obtained following published protocols (32) with a spectrally resolved two-photon microscope set up using a Zeiss Inverted Axio Observer and the OptiMis True Line Spectral Imaging system (Aurora Spectral Technologies) with line-scanning capabilities (56, 57). Fluorophores were excited with a mode-locked laser (MaiTai, Spectra-Physics) that generates femtosecond pulses between wavelengths 690 and 1040 nm. For each cell, two images were collected: the first at 840 nm to excite the donor and the second at 960 nm to primarily excite the acceptor. Solutions of purified soluble fluorescent proteins (mTurq and eYFP) were produced at known concentrations following a published protocol (58) and imaged at each of these excitation wavelengths. A linear fit generated from the pixel-level intensities of the solution standards was used to calibrate the effective three-dimensional protein concentration, which can be converted into two-dimensional membrane protein concentrations in the cell membrane as described (32). Small micron-sized regions of the cell membrane were selected, and the FRET efficiency, concentration of TrkA-mTurq, and concentration of p75-eYFP present in the cell membrane were quantified using the FSI-FRET software (32).

Cell-free gene expression

Bacterial S30 cell-free extract was prepared from 10 l of cell culture of the *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS strain, using a previously described protocol (59–61). Preparative-scale reactions (2–3 ml of reaction mixture) were carried out in 50-ml tubes.

Titration of TrkA and p75 TMDs by NMR

All TrkA–p75 titration ¹⁵N-transverse relaxation optimized spectroscopy experiments were carried out at LPR 80, pH 5.9, temperature 318 K with 20 mM sodium phosphate buffer. Two independent sets of experiments were conducted: (1) unlabeled p75-TM-C257A was incrementally added to 0.5 mM sample of ¹⁵N-labeled TrkA-TM and (2) unlabeled TrkA-TM was incrementally added to the 0.4 mM sample of ¹⁵N-labeled p75-C257A-TM sample to observe p75–TrkA interactions. Intensities of corresponding peaks were measured at each point, population of the p75–p75 dimer, TrkA–TrkA dimer, and TrkA–p75 complex were calculated and plotted against TrkA–p75 molar ratio.

Cross-correlated relaxation of amide groups was measured as described (62) using two transverse relaxation optimized spectroscopy-based experiments with 10.8 ms relaxation delay, recorded in an interleaved mode. Monomer, dimer, and heterodimer crosspeaks of I259, V263, G266, A269, and Y270 of p75-TM-C257A were taken for the analysis, because only these five residues provide the separate and well-resolved signals of the heterodimer (Fig. S1). Cross-correlated relaxation rates were averaged, converted to the rotational diffusion correlation times as described (62) and then to the hydrodynamic radii of the equivalent sphere using the Stokes–Einstein relationship for the rotational diffusion.

Modulation of TrkA activity by p75

HeLa cells were transfected with 1 μg of TrkA and 1 μg of p75 or p75-TNFR using PEI (ratio 10:1). About 24 h after transfection, cells were lifted and split in identical numbers to a 6-well plate. About 48 h after transfection, cells were starved for 2 h with DMEM without serum and stimulated with different concentrations of NGF (from 0 to 100 ng/ml) for 15 min. Cells were washed with PBS and lysed with TNE buffer (Tris–HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) on ice for 15 min. Lysates were clarified by centrifugation, and the cell supernatants quantified and analyzed by SDS-PAGE Western immunoblots. Phosphotyrosine-specific antibodies (anti P-Tyr674/675 from Cell Signaling Technology; 1:3000 dilution) and anti-p75 intracellular antibody (Promega) were used. To quantify the effect of p75 on TrkA, we consider an allosteric interaction between p75 and TrkA and fit to a dose–response curve. The protein band corresponding to the phosphotyrosine signal was quantified, and the ratio to the total TrkA was calculated. This is the response to Figure 4. We plot the log of the concentration of NGF *versus* the response, and the curve was fit to a log(agonist) *versus* response (three parameters) equation using the GraphPad software (GraphPad Software, Inc). The equation is $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{-((\text{LogEC}_{50} - X))})$, and the EC₅₀ is the concentration of agonist, in this case NGF, that gives a response halfway between bottom and top. At least three independent experiments were quantified.

CG molecular simulation methods

One monomer from the TrkA-TMD dimer structure (Protein Data Bank: 2n90) and one monomer from the p75-TMD dimer structure (Protein Data Bank: 2mic) were converted to a CG model using the script martinize.py from the martini Web page (www.cgmartini.nl) and the tools from GROMACS, version 5.0.5 (www.gromacs.org). In CG models, four heavy atoms are grouped together in one CG bead. Each residue has one backbone bead and zero to four side-chain beads depending on the residue type (63). For all helix dimerization simulations, two α-helices were inserted into a preformed POPC bilayer (containing 260 lipids) such that they were separated by an interhelix distance (dHH) ≈ 55 Å (Fig. 6). Each system was solvated with 2975 CG water particles and 0.15 M NaCl counter ions. The energy of the system was minimized and followed by 12 MD simulations of 5 μs each simulation in a total time of 60 μs. CG simulations were performed using GROMACS, version 5.0.5 (www.gromacs.org) (64). All simulations were performed at constant temperature, pressure, and number of particles. The temperatures of the protein, lipid, and solvent were each coupled separately using the Berendsen algorithm at 305 K, with 774 at a coupling constant of τ_T = 1 ps. The system pressure was semi-isotropically using the Parrinello–Rahman algorithm at 1 bar with a coupling constant of τ_P = 12 ps and a compressibility of 3 Å³ ~ 10⁻⁴ bar⁻¹. The time step for integration was 20 fs. Coordinates were saved for subsequent analysis every 200 ps.

TrkA and p75 complex formation

Atomic MD

GROMACS, version 5.0.5 was also used for all FA MD simulations. CG models were converted to FA using the CHARMM-GUI portal (www.charmm-gui.org). FA was calculated using the CHARMM36m force field. The van der Waals interactions were smoothly switched off at 10 to 12 Å by a force-switching function. Long-range electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald method. The simulations were performed at a temperature of 303.15 K using a Nose–Hoover thermostat with $\tau_T = 1$ ps. A constant pressure of 1 bar was maintained with a Parrinello–Rahman algorithm with a semi-isotropic coupling constant $\tau_P = 5.0$ ps and compressibility = $4.5 \text{ \AA}^3 \sim 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. The integration time step was 2 fs. The LINear Constraint Solver (LINCS) method was used to constrain bond lengths. Coordinates were saved every 5 ps for analysis. Analysis of all simulations was performed using the GROMACS suite of programs. VMD (65) and Chimera UCSF (66) were used for visualization and graphics. Membrane equilibration was assessed measuring the area per lipid and the membrane thickness using the APLVoro application (67). The electron density profiles were calculated using the *gmx density* tool in GROMACS. A representation of the electron density of the porous organic cage model membrane with TrkA and p75 TMDs is shown in Fig. S2.

Cell culture and transfection

HeLa cells, which do not endogenously express neither TrkA nor p75, were cultured in DMEM (Fisher) supplemented with 10% FBS (Fisher) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. PC12 and PC12nnr5 cells were cultured in DMEM with 10% FBS and 5% horse serum. Transfection in HeLa cells was performed using PEI (Sigma) at 1 to 2 µg/µl. We found that by using PEI as the transfection reagent in HeLa cells, the transfection is suboptimal (10–15% of cells transfected) that allow having a small amount of TrkA expressed in the cells. As a comparison using the same PEI–DNA ratio in HEK 293T cells, TrkA is expressed in higher amounts and ligand-independent activation is seen at these quantities of TrkA DNA. About 500 to 1000 ng of DNA per plate was used in TrkA activation experiments. About 24 h after transfection, cells were lifted and replated in 12-well plates with 100,000 cells per well. Using this procedure, the percentage of transfection is identical in all the wells. About 48 h after transfection, the cells were starved with serum-free medium for 2 h and stimulated with NGF (Alomone) at the indicated concentrations and time intervals. Cells were lysed with TNE buffer (Tris–HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) supplemented with 1% Triton X-100 (Sigma), protease inhibitors (Roche), 1 mM PMSF (Sigma), 123 mM sodium orthovanadate (Sigma), and 1 mM sodium fluoride 545 (Sigma). The lysates containing p75 were supplemented with iodoacetamide (Sigma) to avoid postlysate dimer disulfide formation. Lysates were kept on ice for 10 min and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min on a tabletop centrifuge. The lysates

were quantified using a Bradford kit (Pierce) and analyzed by SDS-PAGE or used in immunoprecipitation.

Western blot analysis

Cells were washed in PBS and lysed in cold lysis buffer (50 mM Tris–HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 mM Na₂VO₃, 10 mM iodoacetamide, and protease inhibitor cocktail) at 4 °C. Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000g for 15 min, and protein quantification was performed by Bradford assay. Proteins were resolved in reducing and nonreducing SDS-PAGE gels, and membranes were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies: rabbit polyclonal antihuman p75 ICD (1:1000 dilution; Promega); mouse monoclonal anti-HA (1:2000 dilution; Sigma); rabbit polyclonal MBP probe (1:1000 dilution; Santa Cruz); rabbit anti-phosphoTyr674/5 (1:1000 dilution; Cell Signaling); and rabbit anti-TrkA (1:1000 dilution; Millipore). Following incubation with the appropriate secondary antibody, membranes were imaged using enhanced chemiluminescence and autoradiography.

Electroporation of PC12 and differentiation experiments

The electroporation of the different plasmids was carried out with the Multiporator (Eppendorf). PC12 cells were grown with DMEM supplemented with 10% FBS and 5% horse serum and antibiotics (gentamycin and penicillin). For electroporation, cells were grown to 70 to 80% confluence on a 10-cm plate and washed with PBS. They were then raised with 3 ml of DMEM and centrifuged for 2.5 min at 500 rpm. The pellet obtained was resuspended in 3 ml of the hypo-osmolar electroporation buffer (KCl 25 mM, KH₂PO₄ 0.3 mM, K₂HPO₄ 0.85 mM, and pH 7.2), and a viable counting with trypan blue was carried out. 1×10^5 cells, and a concentration of 5 µg/ml of the plasmid of interest (control, wt, or mutant) and a concentration of 5 µg/ml of the plasmid with GFP were transferred to an electroporation cuvette (2 mm wide and 400 µl in volume [Eppendorf]). After optimizing the transfection parameters, it was determined that the best results were obtained with a pulse of 100 µs at 200 V; therefore, the electroporation was carried out under these conditions. Finally, the cells were seeded on a 6-well plate with 2 ml of DMEM supplemented with 5% horse serum (Gibco). At 24 h after transfection, the cells were treated with NGF (50 ng/ml) in order to induce the differentiation of neurites as a function of the plasmid. The length of each neurite was quantified from fluorescence microscopy images using the ImageJ software (National Institutes of Health). Three independent electroporation experiments were analyzed, and at least 100 neurites per each condition were quantified.

Data availability

All the data are contained within the article. CSs from TrkA-TMD and p75-TMD are deposited in the Biological

Magnetic Resonance Data Bank with accession number 25872 for TrkA-TMD and 19673 for p75-TMD.

Supporting information—This article contains [supporting information](#) (37).

Acknowledgments—We thank Dr M. D. Paul for the acquisition of the LAT-FGFR3 control FRET dataset.

Author contributions—M. L. F., K. D. N., T. P. L., S. A. G., A. S.-L., K. S. M., K. H., A. S. A., and M. V. investigation; M. L. F., K. D. N., T. P. L., S. A. G., F. A., K. S. M., A. S. A., and M. V. methodology; K. D. N., S. A. G., K. S. M., and M. V. validation; T. P. L., K. S. M., K. H., and M. V. writing—original draft; K. S. M., A. S. A., and M. V. conceptualization; K. S. M., A. S. A., and M. V. supervision; K. S. M., K. H., A. S. A., and M. V. funding acquisition; K. S. M., K. H., and M. V. writing—review and editing.

Funding and additional information—This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project BFU2013-42746-P and SAF2017-84096-R), the Generalitat Valenciana Prometeo grant 2018/055 (to M. V.), and the National Institutes of Health GM068619 (to K. H.). NMR studies of TRKA-TM and p75-TM were supported by the Russian Science Foundation (grant no. 19-74-30014 to A. S. A.). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: CG, coarse-grained; CS, chemical shift; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DPC, dodecylphosphocholine; eYFP, enhanced YFP; FA, full-atom; FBS, fetal bovine serum; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; FSI, fully quantified spectral imaging; ICD, intracellular domain; LAT, linker for the activation of T-cells; LPR, lipid-to-protein ratio; MD, molecular dynamics; mTurq, mTurquoise; NGF, nerve growth factor; NT, neurotrophin; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; TMD, transmembrane domain; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TrkA, tyrosine protein kinase receptor A.

References

- Bothwell, M. (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 3–15
- Ceni, C., Unsain, N., Zeinieh, M. P., and Barker, P. A. (2014) Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 193–221
- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 299–309
- Hempstead, B. L. (2014) Deciphering proneurotrophin actions. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 17–32
- Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 223–250
- Friedman, W. J., and Greene, L. A. (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp. Cell Res.* **253**, 131–142
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003) Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609–642
- Deinhardt, K., and Chao, M. V. (2014) Trk receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 103–119
- Reichardt, L. F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361**, 1545–1564
- Kraemer, B. R., Yoon, S. O., and Carter, B. D. (2014) The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 121–164
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., and Petersen, C. M. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843–848
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R. L., McCoy, J. M., and Pepinsky, R. B. (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* **7**, 221–228
- Wang, K. C., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R., and He, Z. (2002) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**, 74–78
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**, 678–683
- Kanning, K. C., Hudson, M., Amieux, P. S., Wiley, J. C., Bothwell, M., and Schecterson, L. C. (2003) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci.* **23**, 5425–5436
- Skeldal, S., Sykes, A. M., Glerup, S., Matusica, D., Palstra, N., Autio, H., Boskovic, Z., Madsen, P., Castrén, E., Nykjaer, A., and Coulson, E. J. (2012) Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 43798–43809
- Jung, K.-M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P. K., Kim, D. S., Ryu, S. H., Chao, M. V., and Kim, T.-W. (2003) Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 42161–42169
- Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 223–253
- Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1995) p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* **18**, 321–326
- Yano, H., and Chao, M. V. (2000) Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm. Acta Helv.* **74**, 253–260
- Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y. A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* **18**, 616–622
- Rifkin, J. T., Todd, V. J., Anderson, L. W., and Lefcort, F. (2000) Dynamic expression of neurotrophin receptors during sensory neuron genesis and differentiation. *Dev. Biol.* **227**, 465–480
- White, F. A., Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Nishimura, M., Phillips, H., Barbacid, M., and Snider, W. D. (1996) Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **16**, 4662–4672
- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 6884–6891
- Lee, K. F., Davies, A. M., and Jaenisch, R. (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* **120**, 1027–1033
- Davies, A. M., Lee, K. F., and Jaenisch, R. (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* **11**, 565–574
- Majdan, M., and Miller, F. D. (1999) Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**, 153–161
- Majdan, M., Walsh, G. S., Aloyz, R., and Miller, F. D. (2001) TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival *in vivo* by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *J. Cell Biol.* **155**, 1275–1285
- Yoon, S. O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., and Chao, M. V. (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J. Neurosci.* **18**, 3273–3281

TrkA and p75 complex formation

30. Lee, K. F., Li, E., Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V., and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* **69**, 737–749
31. Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., and Garcia, K. C. (2007) Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**, 25–38
32. King, C., Stoneman, M., Raicu, V., and Hristova, K. (2016) Fully quantified spectral imaging reveals *in vivo* membrane protein interactions. *Integr. Biol. (Camb.)* **8**, 216–229
33. King, C., Raicu, V., and Hristova, K. (2017) Understanding the FRET signatures of interacting membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **292**, 5291–5310
34. Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R., and Hempstead, B. L. (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and TrkA receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 32687–32695
35. Nadezhdin, K. D., García-Carpio, I., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., and Vilar, M. (2016) Structural basis of p75 transmembrane domain dimerization. *J. Biol. Chem.* **291**, 12346–12357
36. Franco, M. L., Nadezhdin, K. D., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., and Vilar, M. (2020) Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **295**, 275–286
37. Kot, E. F., Wang, Y., Goncharuk, S. A., Zhang, B., Arseniev, A. S., Wang, X., and Mineev, K. S. (2020) Oligomerization analysis as a tool to elucidate the mechanism of EBV latent membrane protein 1 inhibition by pentamidine. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1862**, 183380
38. Lesovoy, D. M., Mineev, K. S., Bragin, P. E., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V., and Arseniev, A. S. (2017) NMR relaxation parameters of methyl groups as a tool to map the interfaces of helix-helix interactions in membrane proteins. *J. Biomol. NMR* **69**, 165–179
39. Chavent, M., Chetwynd, A. P., Stansfeld, P. J., and Sansom, M. S. P. (2014) Dimerization of the EphA1 receptor tyrosine kinase transmembrane domain: Insights into the mechanism of receptor activation. *Biochemistry* **53**, 6641–6652
40. Shahane, G., Ding, W., Palaiokostas, M., and Orsi, M. (2019) Physical properties of model biological lipid bilayers: Insights from all-atom molecular dynamics simulations. *J. Mol. Model.* **25**, 76
41. Chang, M.-S., Arevalo, J. C., and Chao, M. V. (2004) Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J. Neurosci. Res.* **78**, 186–192
42. Zampieri, N., and Chao, M. V. (2006) Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 607–611
43. Franco, M. L., García-Carpio, I., Comaposada-Baró, R., Escribano-Saiz, J. J., Chávez-Gutiérrez, L., and Vilar, M. (2021) TrkA-mediated endocytosis of p75-CTF prevents cholinergic neuron death upon γ -secretase inhibition. *Life Sci. Alliance* **4**, e202000844
44. Huber, L. J., and Chao, M. V. (1995) A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J. Neurosci. Res.* **40**, 557–563
45. Ross, A. H., Daou, M. C., McKinnon, C. A., Condon, P. J., Lachyankar, M. B., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., and Wolf, D. E. (1996) The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA. *J. Cell Biol.* **132**, 945–953
46. Wolf, D. E., McKinnon, C. A., Daou, M. C., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., and Ross, A. H. (1995) Interaction with TrkA immobilizes gp75 in the high affinity nerve growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 2133–2138
47. Iacaruso, M. F., Galli, S., Martí, M., Villalta, J. I., Estrin, D. A., Jares-Erijman, E. A., and Pietrasanta, L. I. (2011) Structural model for p75(NTR)-TrkA intracellular domain interaction: A combined FRET and bioinformatics study. *J. Mol. Biol.* **414**, 681–698
48. Sykes, A. M., Palstra, N., Abankwa, D., Hill, J. M., Skeldal, S., Matusica, D., Venkatraman, P., Hancock, J. E., and Coulson, E. J. (2012) The effects of transmembrane sequence and dimerization on cleavage of the p75 neurotrophin receptor by γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **287**, 43810–43824
49. Holtzman, D. M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham, E. T., Lenn, N. J., Clary, D. O., Reichardt, L. F., and Mobley, W. C. (1995) TrkA expression in the CNS: Evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J. Neurosci.* **15**, 1567–1576
50. Verge, V. M., Merlio, J. P., Grondin, J., Erfors, P., Persson, H., Riopelle, R. J., Hökfelt, T., and Richardson, P. M. (1992) Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: Responses to injury and infusion of NGF. *J. Neurosci.* **12**, 4011–4022
51. Ahmed, F., Paul, M. D., and Hristova, K. (2020) The biophysical basis of receptor tyrosine kinase ligand functional selectivity: Trk-B case study. *Biochem. J.* **477**, 4515–4526
52. Ahmed, F., and Hristova, K. (2018) Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: Effects of their cognate ligands. *Biochem. J.* **475**, 3669–3685
53. Paul, M. D., Grubb, H. N., and Hristova, K. (2020) Quantifying the strength of heterointeractions among receptor tyrosine kinases from different subfamilies: Implications for cell signaling. *J. Biol. Chem.* **295**, 9917–9933
54. Chen, L., Novicky, L., Merzlyakov, M., Hristov, T., and Hristova, K. (2010) Measuring the energetics of membrane protein dimerization in mammalian membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3628–3635
55. Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., *et al.* (2011) Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* **144**, 402–413
56. Raicu, V., Stoneman, M. R., Fung, R., Melnichuk, M., Jansma, D. B., Pisterzi, L. F., Rath, S., Fox, M., Wells, J. W., and Saldin, D. K. (2009) Determination of supramolecular structure and spatial distribution of protein complexes in living cells. *Nat. Photon.* **3**, 107–113
57. Biener, G., Stoneman, M. R., Acbas, G., Holz, J. D., Orlova, M., Komarova, L., Kuchin, S., and Raicu, V. (2013) Development and experimental testing of an optical micro-spectroscopic technique incorporating true line-scan excitation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 261–276
58. Sarabipour, S., King, C., and Hristova, K. (2014) Uninduced high-yield bacterial expression of fluorescent proteins. *Anal. Biochem.* **449**, 155–157
59. Aoki, M., Matsuda, T., Tomo, Y., Miyata, Y., Inoue, M., Kigawa, T., and Yokoyama, S. (2009) Automated system for high-throughput protein production using the dialysis cell-free method. *Protein Expr. Purif.* **68**, 128–136
60. Kai, L., Roos, C., Haberstock, S., Proverbio, D., Ma, Y., Junge, F., Karbyshev, M., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2012) Systems for the cell-free synthesis of proteins. *Methods Mol. Biol.* **800**, 201–225
61. Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2007) Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2**, 2945–2957
62. Chill, J. H., Louis, J. M., Baber, J. L., and Bax, A. (2006) Measurement of ¹⁵N relaxation in the detergent-solubilized tetrameric KcsA potassium channel. *J. Biomol. NMR* **36**, 123–136
63. Monticelli, L., Kandasamy, S. K., Periole, X., Larson, R. G., Tieleman, D. P., and Marrink, S.-J. (2008) The MARTINI coarse-grained force field: Extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 819–8345
64. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718
65. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38
66. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
67. Lukat, G., Krüger, J., and Sommer, B. (2013) APL@Voro: A Voronoi-based membrane analysis tool for GROMACS trajectories. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 2908–2925



Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor

Received for publication, October 1, 2019, and in revised form, November 26, 2019. Published, Papers in Press, December 4, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.011312

María L. Franco^{‡1}, Kirill D. Nadezhdin^{§¶1}, Sergey A. Goncharuk^{§¶}, Konstantin S. Mineev^{§¶}, Alexander S. Arseniev^{§¶1,2}, and Marçal Vilar^{‡¶3}

From the [‡]Molecular Basis of Neurodegeneration Unit, Institute of Biomedicine of València, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46010 València, Spain, the [§]Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russian Federation, and the [¶]Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Institutskiy Pereulok 9, Dolgoprudny, Moscow Region 141700, Russian Federation

Edited by Karen G. Fleming

Tropomyosin-receptor kinases (TRKs) are essential for the development of the nervous system. The molecular mechanism of TRKA activation by its ligand nerve growth factor (NGF) is still unsolved. Recent results indicate that at endogenous levels most of TRKA is in a monomer–dimer equilibrium and that the binding of NGF induces an increase of the dimeric and oligomeric forms of this receptor. An unsolved issue is the role of the TRKA transmembrane domain (TMD) in the dimerization of TRKA and the structural details of the TMD in the active dimer receptor. Here, we found that the TRKA–TMD can form dimers, identified the structural determinants of the dimer interface in the active receptor, and validated this interface through site-directed mutagenesis together with functional and cell differentiation studies. Using *in vivo* cross-linking, we found that the extracellular juxtamembrane region is reordered after ligand binding. Replacement of some residues in the juxtamembrane region with cysteine resulted in ligand-independent active dimers and revealed the preferred dimer interface. Moreover, insertion of leucine residues into the TMD helix induced a ligand-independent TRKA activation, suggesting that a rotation of the TMD dimers underlies NGF-induced TRKA activation. Altogether, our findings indicate that the transmembrane and juxtamembrane regions of TRKA play key roles in its dimerization and activation by NGF.

Nerve growth factor (NGF)⁴ is a member of the mammalian neurotrophin protein family implicated in the maintenance and survival of the peripheral and central nervous systems (1–3). NGF is a dimer that interacts with two distinct receptors: TRKA, a cognate member of the Trk receptor tyrosine kinase family, and the p75 neurotrophin receptor, which belongs to the tumor necrosis factor receptor superfamily of death receptors (4–6). TRKA signaling is essential for sensory and sympathetic neuron survival during development (7). Genetic mutations in the gene that encodes TRKA, *NTRK1*, cause congenital insensitivity to pain with anhidrosis (8), and somatic mutations and chromosomal rearrangements generate aberrant protein fusions with constitutive kinase activation causing several types of cancer (9, 10).

Despite all these important roles, the molecular mechanisms of TRKA activation have been poorly studied compared with those of other receptor-tyrosine kinase (RTK) family members (11, 12). The first three extracellular domains of TRKA consist of a leucine-rich region (Trk-d1) that is flanked by two cysteine-rich domains (Trk-d2 and Trk-d3). The fourth and fifth domains (Trk-d4 and Trk-d5) are Ig-like domains, and they are followed by a 30-residue-long linker that connects the extracellular portion of the receptor to the single transmembrane domain and a juxtamembrane intracellular region that is connected to the kinase domain. TRKA is activated by NGF a member of the neurotrophin family (3). The NGF-binding domain is located in the Trk-d5(Ig2) domain (13), although other domains also participate in the activation by neurotrophins through an unknown mechanism (14, 15).

Two models for TRKA activation are postulated; a ligand-induced dimerization of TRKA monomers and a ligand-induced conformational activation of preformed inactive dimers. The first model, which is based on the crystal structure of NGF with the ligand-binding domain of TRKA (13, 16), assumed that

This work was supported by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad Projects BFU2013-42746-P and SAF2017-84096-R and by Generalitat Valenciana Prometeo Grant 2018/055 (to M. V.). The studies of TRKA-TM homodimerization were supported by Russian Science Foundation Grant 19-74-30014 (to A. S. A.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Table S1 and Figs. S1–S7.

The atomic coordinates and structure factors (code 2n90) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

The NMR chemical shift data of this paper are available from the Biological Magnetic Resonance Data Bank under BMRB accession number 25872.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed: Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russian Federation. E-mail: aars@nmr.ru.

³ To whom correspondence may be addressed: Neurodegeneration Unit, Institute of Biomedicine CSIC, C/ Jaume Roig 11, 46010 València, Spain. E-mail: mvilar@ibv.csic.es.

⁴ The abbreviations used are: NGF, nerve growth factor; TRK, tropomyosin-receptor kinase; TM, transmembrane; TMD, TM domain; JTM, juxtamembrane; eJTM, extracellular JTM; RTK, receptor-tyrosine kinase; ICD, intracellular domain; DPC, dodecylphosphocholine; DPR, detergent-to-protein molar ratio; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; eJTM, extracellular juxtamembrane region; PEI, polyethylenimine; ANOVA, analysis of variance.

TRKA transmembrane domain dimerization

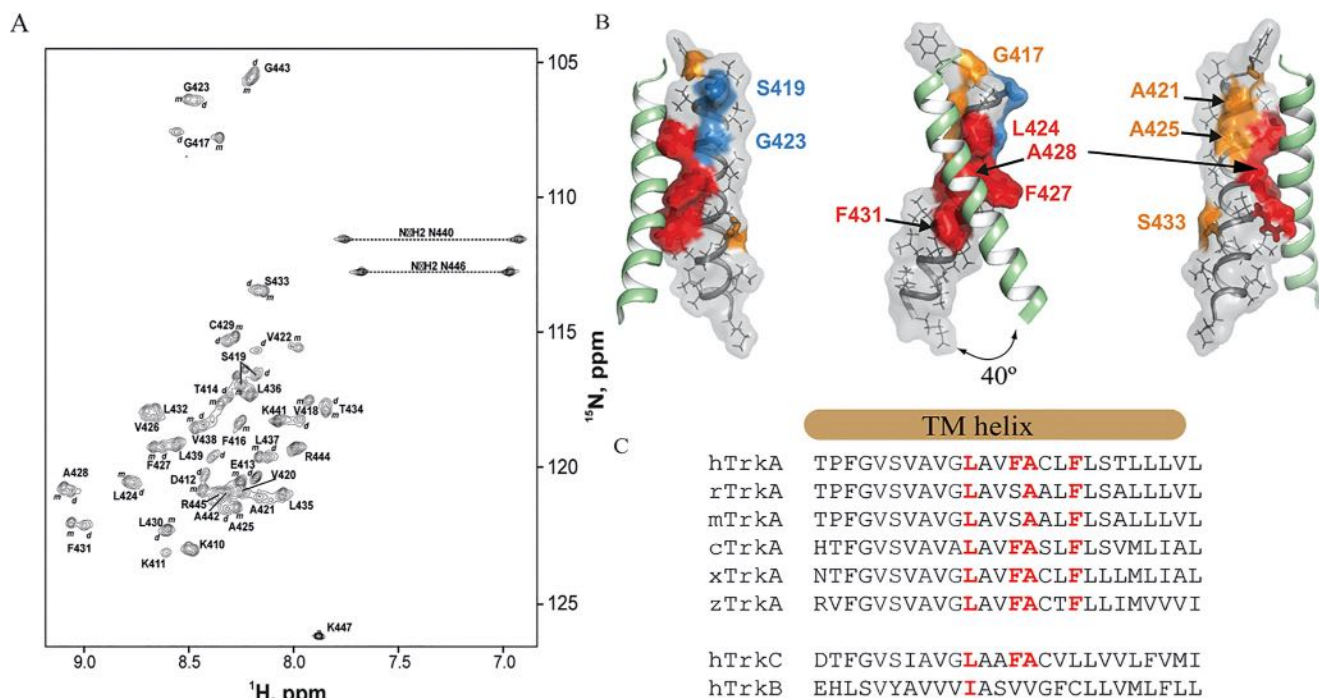


Figure 1. NMR structure of TRKA transmembrane domain dimers in DPC micelles. A, the $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC spectrum of the human TRKA–TMD–wt. The human TRKA–TMD was solubilized in an aqueous suspension of DPC micelles at a DPR of 50:1 and at 45 °C and pH 5.9. ^1H – ^{15}N backbone and side-chain resonance assignments are shown. B, schematic representation of the NMR spatial structure of the human TRKA–TMD dimer in detergent micelles, from different angles. The surface of one TMD helix is represented with the NMR dimer interface in red. The TMD of the other monomer within the dimer is represented as ribbons, and side chains are indicated as sticks. The location of the NMR dimer interface LXXFAXF on the NMR structure is colored red, and other mutated residues are colored orange. The putative dimerization motif SXXXG is shown in blue. The Protein Data Bank accession code is 2n90. C, alignment of the amino acid sequences of the transmembrane helical domain of TRKA from different species (*h*, *Homo sapiens*; *r*, *Rattus norvegicus*; *m*, *Mus musculus*; *c*, *Gallus gallus*; *z*, *Danio rerio*; *x*, *Xenopus laevis*). The residues participating in the NMR dimer interface are highlighted in red.

the dimerization of TRKA is solely ligand-mediated and that receptor–receptor interactions are not present in the absence of its ligand. In the second model, TRKA exists as a preformed inactive dimer, suggesting receptor–receptor contacts in the absence of NGF (17, 18). The most recent data using single-particle tracking (19) and FRET studies (20) suggest that TRKA is, at endogenous levels, predominantly monomer (80%), and NGF binding induces an increase and a stabilization of the TRKA dimers and the formation of oligomers, together with a conformational change leading to kinase activation. This mechanism of activation has been called the “transition model” (20) and postulates a dynamic transition from a monomer to an inactive dimer to a ligand-bound active dimer, suggesting that Trk receptors are activated through a combination of the two mentioned models.

Whatever the model, it is clear that dimerization of TRKA is required for its activation. Deletion constructs suggested that dimerization of TRKA is mediated by the transmembrane (TM) and by the intracellular domains (ICDs) (20). In the case of the ICDs, this is supported by the crystal structure of the kinase domain of TRKA that showed the presence of dimers in the crystallographic unit (21, 22). However, the structural determinants of the TMD dimerization are not known, and in this regard, it is important to understand the conformation of the TRKA–TMD dimer and identify the active dimer interface that may represent the functional state of the full-length receptor. In addition biochemical data supporting a conformational activation of TRKA are lacking. In the present work, we investigated

the structural basis of TRKA–TMD dimerization in the activation of TRKA by NGF, using complementary structural and biochemical approaches.

Results

Structure of TRKA transmembrane domain dimers

It has been shown that the isolated TMDs of all human RTKs form dimers in bacterial membranes (23). In addition functional studies indicate that TMDs play an important role as a modulator of RTK homodimerization and kinase activation (reviewed in Refs. 23–25). Switching between two dimerization modes of the transmembrane helix has recently been described as part of the activation mechanism of the epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor, and fibroblast growth factor receptors (26–29). However, to date the role of TRKA–TMD dimerization in TRKA receptor activation has not been studied in detail.

To obtain a structural insight into TRKA–TMD dimerization, we solved the structure of human TRKA–TMD dimers in detergent micelles using NMR (Fig. 1). For this study, the human TRKA–TMD was produced in a cell-free system (see “Experimental procedures”) as previously described (30). When the peptide is solubilized in dodecylphosphocholine (DPC) micelles at a detergent-to-protein molar ratio (DPR) of 50:1, the TRKA–TMD is in equilibrium between monomeric, dimeric, and other oligomeric states. The ratio of these states varies as the DPR value is altered (Fig. S1A). We then titrated TRKA–

TMD in DPC micelles to measure the standard free energy of dimerization (ΔG_0) using standard methods (31) (see details under “Experimental procedures” and Fig. S1B). The ΔG_0 value obtained (-1.9 ± 0.2 kcal/mol) suggested that the TRKA–TMD dimer is quite stable compared with the TMD dimers of other RTKs. Thus, although its dimerization energy is weaker than that of the vascular endothelial growth factor receptor 2 dimer ($\Delta G_0 = -2.5$ kcal/mol in DPC) (32), it is stronger than those of fibroblast growth factor receptor 3 ($\Delta G_0 = -1.4$ kcal/mol in DPC/SDS 9:1 mixture) and ErbB4 ($\Delta G_0 = -1.4$ kcal/mol in DMPC/DHPC 1:4 bicelles) (33). The ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N -labeled TRKA–TMD (Fig. 1A) contained the expected number of cross-peaks, and the good quality of the spectra allowed solving of the structure of the dimer in DPC micelles (Figs. 1B, Figs. S2–S4, and Table S1). The α -helical region of the TRKA–TM dimer starts at Gly⁴¹⁷, ends at Asn⁴⁴⁰, and is ~ 38 Å in length (Fig. S2). The crossing angle of the TRKA–TM helices is 40° , and the minimal distance between two monomers is 8.8 Å (Fig. 1B and Table S1). The hydrophobicity plot and contact surface area of the dimer is shown in Fig. S4. The dimerization interface lies along the sequence motif ⁴²⁴LXXFAXXF⁴³¹ (Fig. 1B and Fig. S4) that is conserved in the TRKA–TMD of several species and also in TrkC but not in TrkB (Fig. 1C). Although the TRKA–TMD sequence contains a putative dimerization motif of the form SXXXG (shown in blue in Fig. 1B), this motif resides in an opposite helix interface.

These analyses of TRKA–TMD dimerization suggested the existence of the dimerization motif ⁴²⁴LXXFAXXF⁴³¹ (Fig. 1B). The biological relevance of this motif can be questioned, because the presence of large extracellular and intracellular globular domains or the lipid environment of the plasma membrane may favor or hinder a specific interaction interface (34). We therefore used different functional assays to verify the found dimer interface in the context of the full-length receptor.

Functional identification of the dimer interface upon NGF stimulation

The state of full-length TRKA was followed by assay of three different aspects of its activity: dimerization of the receptor, phosphorylation of intracellular tyrosine residues, and neurite differentiation of PC12nnr5 cells. To investigate the dimerization of TRKA, we individually mutated most of the N-terminal residues of the rat TRKA–TMD to cysteine (Fig. 2A), expressed these constructs in HeLa cells, and then measured the amount of cross-linked species. To facilitate cross-linking via these cysteine residues in the transmembrane domains, we used oxidation with molecular iodine (I_2) as previously described (35). Such oxidation allows the formation of a disulfide bond between two close cysteine residues inside the lipid bilayer. Plasma membrane fractions from cells expressing different single-cysteine mutants were incubated in the absence or presence of NGF, together with molecular I_2 and were then analyzed by nonreducing SDS-PAGE and Western immunoblotting. Upon transfection in HeLa cells, the mutants G417C and V418C formed covalent dimers in the absence of NGF (Fig. 2, B and C). NGF stimulation increased the amount of G417C and V418C dimers, and low quantities of dimers in the V420C, A421C, and

V422C mutants were observed (Fig. 2, B and C). Overexpression of TRKA induces a ligand-independent activation. To see whether the constitutive dimerization of some of these mutants induces the activation of TRKA, we transfected the cysteine mutants in PC12nnr5 cells and studied the differentiation in NGF-independent manner. As we can see in Fig. 2D, only the mutant V418C is able to induce the differentiation in the absence of NGF, suggesting that V418C is part of the active dimer interface.

To further study the significance of the found interfaces, we mutated the small residues Ala, Gly, and Ser within this region to the bulky Ile residue, and we then assayed TRKA activation upon NGF stimulation (Fig. 2, E and F). The rationale behind this approach was that the mutation of a small residue to a bulky one on the relevant interface would prevent the formation of the active dimeric state by inducing steric clashes and would therefore reduce TRKA activation. To perform this assay, we transfected HeLa cells that do not express endogenous TRKA with these mutants, stimulated these cells with nonsaturating concentrations (10 ng/ml) of NGF, and then assayed TRKA activation by analysis of TRKA autophosphorylation using Western blotting. Upon transfection, two TRKA electrophoretic bands are present in the TRKA immunoblots of HeLa cells: a lower band (~ 110 kDa) of intracellular immature TRKA that has not completed Golgi-mediated processing of high-mannose *N*-glycans (36) and an upper band (~ 140 kDa) with mature sugars that is expressed in the plasma membrane. Exposure to NGF substantially increased the phosphorylation of the upper TRKA band as assessed by blotting with a phospho-specific antibody against the phosphotyrosine residues of the activation loop, P-Tyr⁶⁷⁴ and P-Tyr⁶⁷⁵. This autophosphorylation was quantified to follow TRKA activation. Constitutive ($t = 0$, no NGF added) and ligand-dependent phosphorylation of plasma membrane-localized TRKA after 5 and 15 min were measured. Because overexpression of TRKA induces ligand-independent autophosphorylation, we first transfected the HeLa cells with increasing concentrations of TRKA to determine a TRKA level that could still be detected but that displayed no autophosphorylation in the upper band in the absence of NGF (Fig. S5). It is noteworthy that all mutants are expressed at the plasma membrane as evidenced by immunofluorescence localization in the absence of Triton X-100 using an antibody against an epitope in the TRKA N terminus (Fig. S6) and by flow cytometry (Fig. 2F). Of the seven single-point mutants tested, only the A428I substitution demonstrated a pronounced inhibitory effect on receptor autophosphorylation (Fig. 2E). Ala⁴²⁸ is the only small-chain residue that is found deep and in the closest position in the dimerization interface of the TRKA TMD structure determined using NMR, which supports the relevance of the obtained NMR structure. The inhibitory effect of A428 substitution on receptor activity was further enhanced when all three Ala residues that are at least somehow involved in the TMD dimerization in the NMR-based structure: Ala⁴²¹, Ala⁴²⁵, and Ala⁴²⁸, were simultaneously substituted (TRKA-3A/3I).

Lastly, we studied the effect of the same mutations on the NGF-induced differentiation of transfected PC12nnr5 cells

TRKA transmembrane domain dimerization

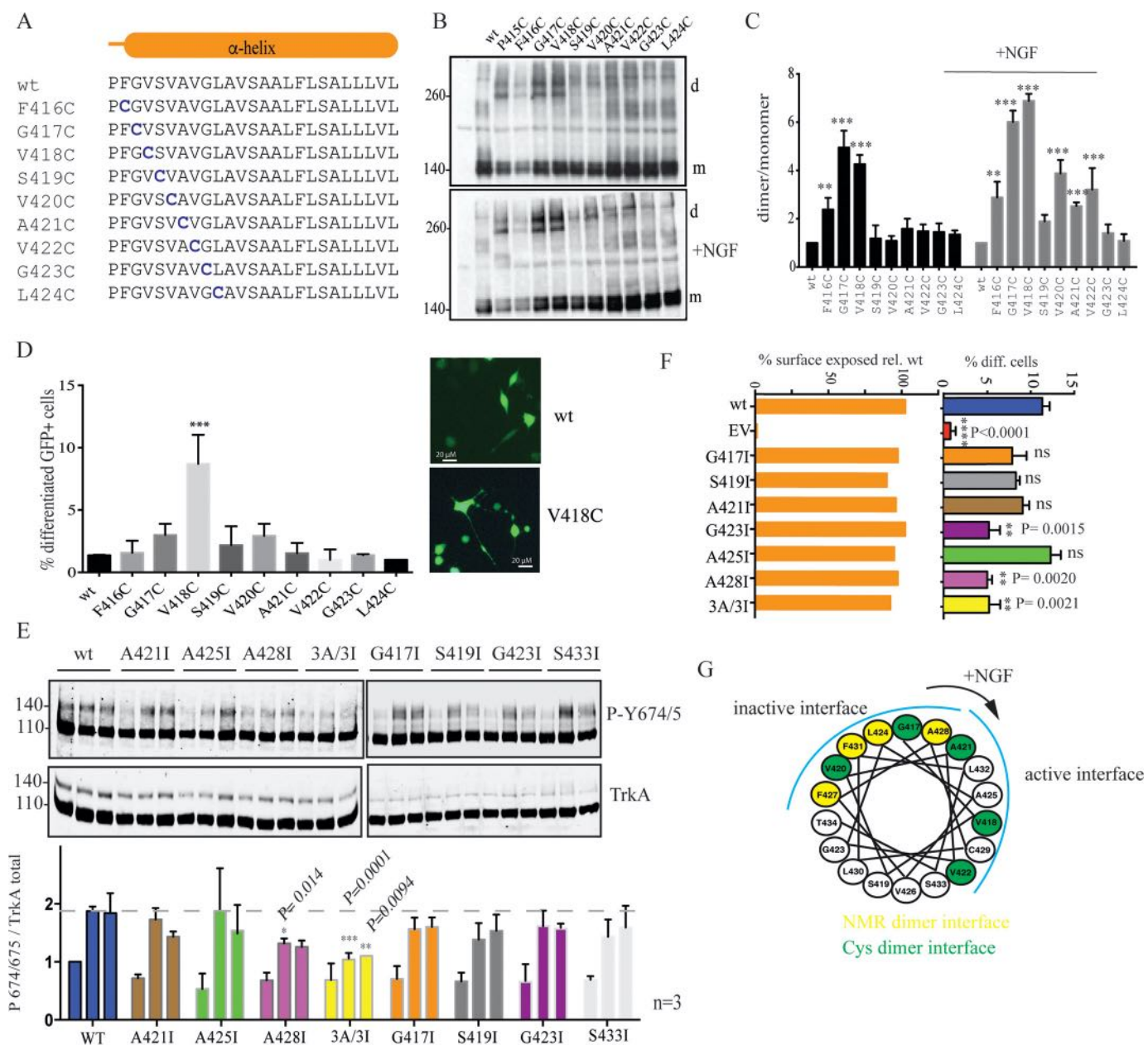


Figure 2. Functional identification of the active dimer interface in the TRKA-TMD. *A*, amino acid sequence of the transmembrane domain of rat TRKA showing the location of the single cysteine residue substitutions. *B*, Western blotting of HeLa cells transfected with the indicated TRKA-TMD constructs and analyzed using nonreducing SDS-PAGE, showing the formation of covalent cysteine dimers (*d*) arising from monomers (*m*) cross-linked using molecular iodine (*I*₂) in the presence or absence of NGF. *C*, quantification of the data in *B* derived from at least three independent experiments. *Bars* represent standard error of the mean. Statistics were performed using two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test using GraphPad software. ****, $p < 0.0001$; ***, $p = 0.0004$. *D*, PC12nr5 cells were transfected with the indicated constructs and 48 h later analyzed for the presence of neurites. The percentage of cells with at least one neurite longer than the cell body was quantified. At right fluorescence microscopy showing the formation of neurites in the PC12nr5 cells co-transfected with TRKA and GFP. *E*, *top panel*, HeLa cells transfected with the indicated TRKA constructs were stimulated with NGF (10 ng/ml) for 0, 5, or 15 min. The immunoblots show the activation (autophosphorylation) of TRKA as detected using an antibody specific for TRKA P-Tyr^{674/675}. The levels of total TRKA are shown *below* each blot. Molecular weight markers are shown at *left*. *Bottom panel*, quantification of the data from the *top panel* derived from at least three independent experiments. *Bars* represent standard error of the mean. Statistics were performed using two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test using GraphPad software. *p* values of conditions significantly different from WT are shown on *top* of the *error bars*. *F*, cytometric analysis of the expression of the TRKA mutants at the plasma membrane (*orange bars*) and quantification of the percentage of PC12nr5 differentiated cells (*multicolored bars*) transfected with the indicated TRKA constructs together with GFP. *EV*, empty vector. The percentage of the total GFP-positive transfected cells with a neurite twice as long as the length of the cell body was quantified. *G*, helical wheel model of the TRKA-TMD showing the two dimer interfaces identified by NMR and by functional studies. An *arrow* shows the putative rotation from the two interfaces. *Bars* represent the standard error of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, using Bonferroni's multicomparison test compared with wt. The *p* values of significant differences are shown. *ns*, not significant.

(Fig. 2H). Again, the A428I mutant displayed substantial inhibition of this TRKA activity. Unexpectedly the mutation G423I did have an impact on cell differentiation (Fig. 2F).

The residues Gly⁴¹⁷, Val⁴²⁰, and Ala⁴²¹ share the same helix interface as the LXXFAXL motif found in the NMR structure (green and yellow, respectively, in Fig. 2G). However, the resi-

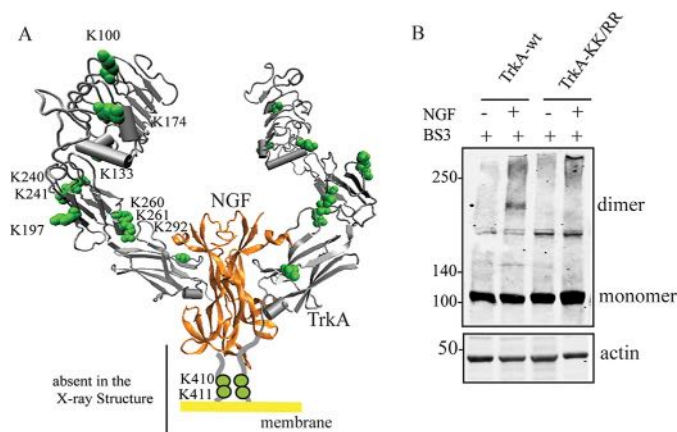


Figure 3. Lys⁴¹⁰ and Lys⁴¹¹ of eJTM are cross-linked with BS3 upon NGF binding. *A*, location of the Lys residues in the crystal structure of the rat TRKA-ECD/NGF complex (Protein Data Bank code 2IFG) (16). The Lys residues, shown in green, are located in the extracellular juxtamembrane region of the TRKA-ECD. *B*, Western immunoblots of lysates of HEK293 cells transfected with the indicated TRKA constructs (see Fig. 3*A*) and incubated with or without NGF in the presence of the cross-linker BS3. Molecular weights are indicated at left. Actin was assayed as a loading control.

dues Val⁴¹⁸ and Val⁴²² are in a different interface. Interestingly the mutation V418C induces a ligand-independent differentiation of PC12nnr5 cells, indicating that this residue belongs to the active dimer interface (Fig. 2*G*).

The combined results of the functional assays suggest a transition from an inactive to an active dimer interface and support the importance of the NMR-derived TMD structure for TRKA activation. The residue Ala⁴²⁸ plays a critical role in TRKA activation by NGF. Its location in the closest dimer interface suggests a pivoting role in the transition from the ligand-free to the ligand-bound dimer interface (Fig. 2*G*). Because activation of TRKA is a consequence of this change in the dimer interface in the next sections, we study the nature of this conformational change induced by NGF binding.

NGF induces a rearrangement of the extracellular juxtamembrane region of TRKA

Stimulation of HeLa cells transfected with TRKA-wt with NGF induces the formation of TRKA dimers that are cross-linked with BS3 (Fig. 3). Although it has been described that TRKA dimers are formed in the absence of NGF, we were not able to detect cross-linking without the ligand, even at overexpression levels, supporting that NGF binding is not only promoting a TMD dimerization but is accompanied by changes in the conformation of the extracellular part of the protein. Because BS3 reacts only with free amines (the side chains of Lys residues or a free N terminus), we searched for possible sites in TRKA that might have caused the observed cross-linking. According to the crystal structure of the TRKA-NGF complex (15) (Fig. 3*A*), there are no lysine residues in the TRKA-ECD that are located in a position where cross-linking of the side chains of Lys residues of two monomers could occur. Because BS3 does not cross-the plasma membrane and because we used the full-length TRKA receptor in our assays, we wondered whether the observed BS3 cross-linking was mediated via cross-linking of Lys⁴¹⁰ and Lys⁴¹¹ in the extracellular juxtamembrane region (eJTM) of TRKA (Fig. 3*A*) because this

region is not observed in the crystal structure (16). To verify this hypothesis, we mutated both Lys⁴¹⁰ and Lys⁴¹¹ to Arg and repeated the initial experiment using HEK293 cells transfected with this TRKA-KK/RR construct (Fig. 3*B*). No BS3-induced TRKA cross-linking was observed in the TRKA-KK/RR-transfected cells, suggesting that NGF binding brings this region of the eJTM into close proximity.

We considered that if NGF indeed induces contacts between these eJTM regions, then we should be able to mimic this activity of NGF by forcing the dimerization of eJTM in the absence of NGF. For this purpose, we individually mutated most of the residues in the eJTM of TRKA to cysteine and subsequently analyzed the dimerization of these transfected single point mutants (Fig. 4*A*). After transfection of HeLa cells, disulfide dimers were spontaneously formed in all constructs but the amount of dimers differed between the various mutants (Fig. 4*B*). The amount of dimer is significantly higher in the positions D412C and K411C. As a functional assay, we then transfected these mutants into HeLa cells, which do not express endogenous TRKA and quantified the phosphorylation of the tyrosines from the kinase activation loop (Tyr^{674/675}) in the absence and presence of NGF (Fig. 4*C*). This analysis showed the presence of active dimers (D406C, K410C, and K411C) that are activated constitutively in the absence of NGF and dimers that are not active in the absence of NGF (V408C, D412C, E413C, and T414C). In the presence of NGF, these mutants showed no further activation by NGF (Fig. 4*C*), suggesting they are fully active and the dimer interface adopted by the cysteine dimers is similar or identical to the one obtained with NGF binding. As a whole, there is a poor correlation ($R^2 = 0.07$; Fig. 4*D*, red line) between the amount of dimer formation and constitutive activation, suggesting that dimerization by itself is not enough for TRKA activation. However, the mutants with higher constitutive activation (D406C, K410C, and K411C) showed a good correlation between dimer formation and activation ($R^2 = 0.92$; Fig. 4*D*, green line). We then transfected some of the active mutants in PC12nnr5 cells. In the absence of NGF, the R405C, K410C, and K411C mutants induced the formation of neurites in PC12nnr5 cells (Fig. 4, *F* and *G*), supporting the constitutive activation of these mutants and suggested that disulfide bond formation through this interface mimics the binding of NGF. If we assume that the TMD α -helix continues in the juxtamembrane region, the residues Asp⁴⁰⁶, Lys⁴¹⁰, and Lys⁴¹¹ are in one face of the helix (in green in the Fig. 4*H*). By contrast the residues whose mutation to cysteine do not activate constitutively the receptor are located in another face (in red in Fig. 4*H*). All the mutants are correctly expressed at the plasma membrane as found by flow cytometry (Fig. 4*E*). In summary, our results support the notion of the insufficiency of TRKA dimerization alone for higher receptor activation and support the existence of a preferred active dimer interface that is formed upon ligand binding.

Insertion of leucine residues into the TMD constitutively activates TRKA

Overexpression of TRKA is able to activate the receptor in the absence of ligand, and as we show above, the TMD dimer interface is quite similar, although not identical, to the one

TRKA transmembrane domain dimerization

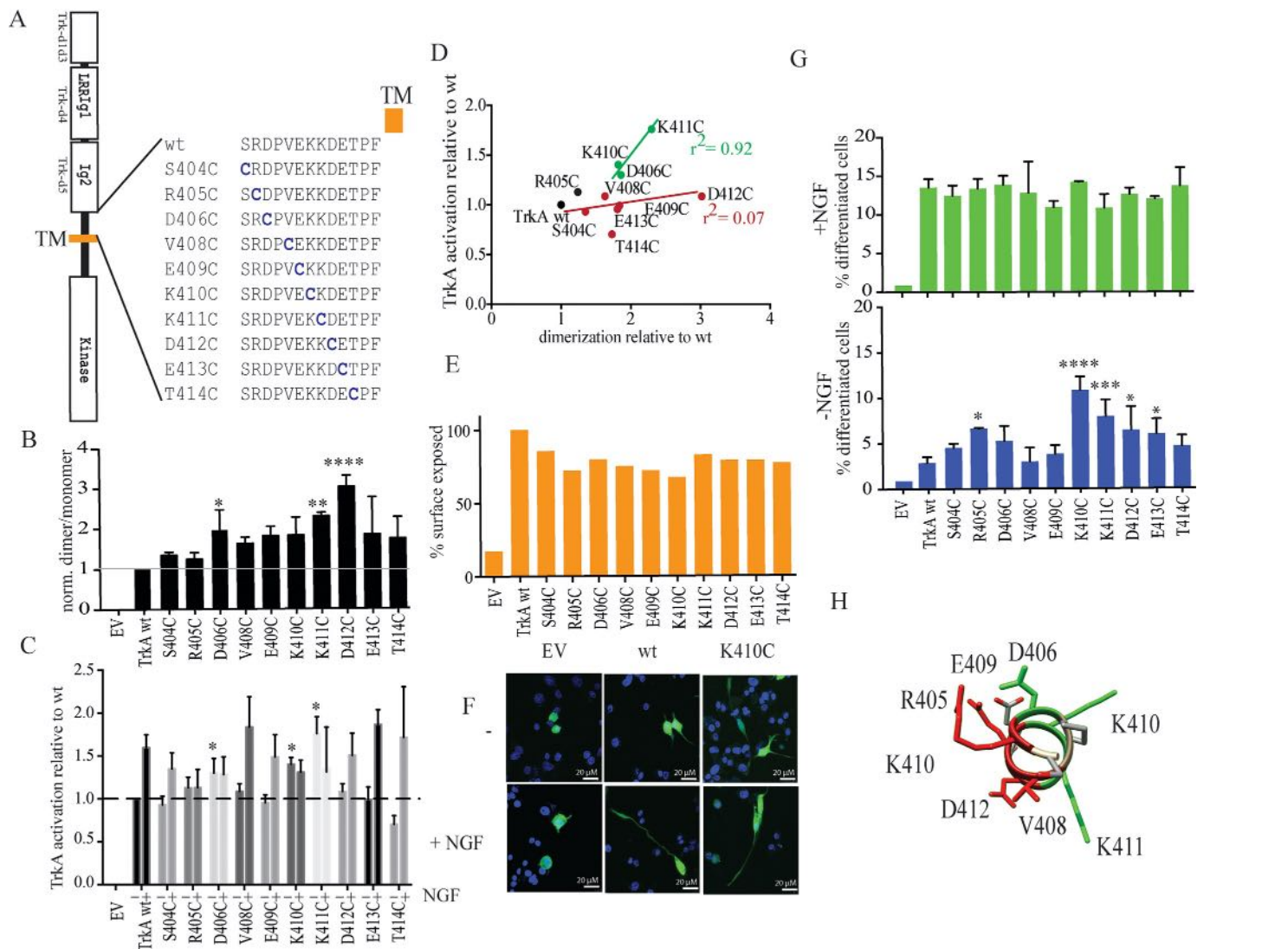


Figure 4. A preferred dimer interface in the TRKA juxtamembrane region. *A*, amino acid sequence of the rat TRKA cysteine mutant constructs that are mutated in the region of the eJTM closest to the TMD. *B*, quantification of the ratio of dimer:monomer of the TRKA mutants as determined using nonreducing SDS-PAGE. *C*, quantification of the activation of TRKA (with and without NGF) by quantifying the signal from the phosphorylation of the Tyr_{674/675} using Western blotting of the cysteine mutants in the JTM region. *D*, scatter plot of the dimerization of TRKA cysteine mutants respect to its activation in the absence of NGF. A regression fit using the active (green) and inactive (red) cysteine mutant dimers is shown with the indicated r^2 . *E*, cytometric analysis of the expression of the TRKA mutants at the plasma membrane of HeLa cells. *F*, PC12nr5 cell differentiation assay of TRKA-wt and TRKA-K410C in the presence and absence of NGF. *G*, quantification of the differentiation of PC12nr5 cells transfected with the indicated TRKA constructs and incubated in the absence (blue bars) or presence (green bars) of NGF. *H*, model of the eJTM into an ideal α -helix showing the spatial location of the indicated residues. Error bars represent the standard error of the mean. Statistics were done using two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test using GraphPad software. The p values of significant differences are shown. ****, $p < 0.0001$. EV, empty vector.

obtained with NGF stimulation, suggesting that overexpression may induce a basal activation of TRKA. The Western blotting shown in Fig. 5A shows that although the overexpression of TRKA induces a ligand-independent activation, the presence of NGF is required for a higher and complete activation of the receptor. This could be the result of the conformational change induced by NGF binding in the JTM region concomitantly with the rotation of the dimer interface of the TMD dimer. This complete sequence of the events caused by the ligand is of great importance for receptor activation. To test this mechanism, we introduced a different number of leucine residues into the TRKA-TMD and analyzed the resulting TRKA activation in the absence of NGF (Fig. 5B). The insertion of each Leu should rotate the

intracellular region around an angle of $\sim 100^\circ$. Thus, Leu insertion allows evaluation of whether a change in the rotation angle of the intracellular domain plays any role in TRKA activation (Fig. 5C). We transfected the constructs TRKA-ins1L, TRKA-ins2L, TRKA-ins3L, and TRKA-ins4L that included 1–4 inserted leucines, respectively. The insertion of one Leu, TRKA-ins1Leu, significantly increased both the constitutive activation of TRKA in transfected HeLa cells compared with that of transfected TRKA-wt (Fig. 5, D and E) and the differentiation of PC12nr5 cells compared with wt-transfected cells (Fig. 5F) in a ligand-independent manner. Equal levels of all constructs were expressed at the plasma membrane as determined using flow cytometry (Fig. S7). These data indicate that NGF binding is accompanied by a

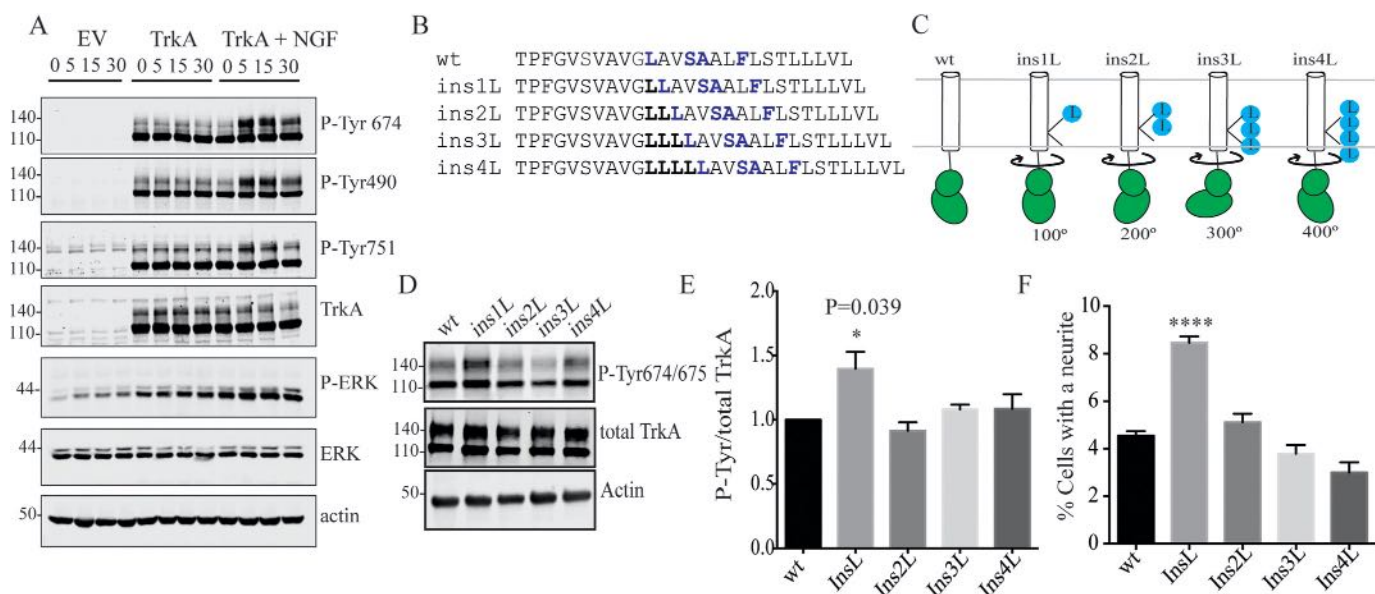


Figure 5. Rotation of the TRKA-TMD as a mechanism of TRKA activation by NGF. *A*, effect of NGF on the activation of overexpressed TRKA. HeLa cells transfected with the indicated constructs were stimulated with NGF (10 ng/ml) for 0, 5, 15, or 30 min. The immunoblots show the activation of TRKA as detected using an antibody specific for the autophosphorylated P-Tyr^{674/675}, P-Tyr⁴⁹⁰, and P-Tyr⁷⁵¹ residues and for the downstream activated P-ERK. The levels of total TRKA and total ERK are shown *below* each blot. Actin was blotted as a loading control. A representative blot of at least three independent experiments is shown. *B*, amino acid sequences of the rat TRKA Leu insertion mutants indicating the location of the inserted Leu residues. *C*, schematic drawing of the TRKA-TMD-ICD showing how the different numbers of inserted Leu residues (*blue*) in the TMD induce a different rotation of the intracellular domain (*green*). *D*, HeLa cells were transfected with the indicated TRKA-TMD insertion mutants. The immunoblots show the activation of TRKA as detected using an antibody specific for the TRKA autophosphorylation P-Tyr^{674/675} residues. The levels of total TRKA are shown below. Actin was assayed as a loading control. *E*, quantification of the data in *D* from at least three independent experiments. *Bars* represent standard error of the mean. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnett's multicomparison test and TRKA-wt as a control. The *p* value of the significant difference is shown. *F*, PC12nr5 cell differentiation of TRKA-TMD insertion mutant-transfected cells incubated in the absence of NGF. The percentage of the total GFP positive-transfected cells with a neurite twice as long as the length of the cell body was quantified. *Bars* represent the standard error of at least four independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnett's multicomparison test and TRKA-wt as a control. The *p* values of significant differences are shown. *EV*, empty vector.

conformational rearrangement in the JTM that is transmitted, as a rotation of the TMD, to the intracellular region for TRKA activation.

Discussion

TRKA belongs to a subfamily of RTKs that includes the other family members TrkB and TrkC. These RTKs are essential for the formation of the nervous system and mediate a variety of cellular responses in normal biological processes and in pathological states (37). An understanding of their mechanism of action is necessary to facilitate the design of new pharmacological agents targeted to the processes in which they play a role.

In this regard, in the present work we posed two major questions: 1) what is the dimer interface of TRKA TMD in the active/inactive states? and 2) how is the coupling between the ligand binding and receptor activation? To answer the first question, we employed structural characterization using NMR spectroscopy together with mutagenesis studies, disulfide cross-linking, and functional assays. We described the high-resolution NMR structure of the TRKA transmembrane domain dimer, which is the first such description of a neurotrophin receptor of the Trk family. The obtained spatial structure was verified using functional assays and cross-linking, which confirmed both the relevance of this structure for TRKA activity and assignment of the found dimer conformation to the receptor active state. This result combined with the crystal structure of the extracellular domain of the TRKA complex with NGF (16, 38), the crystal structure of the TRKA inactive

kinase domain (21, 22), and the recently reported structures of the entire TRKA intracellular region (39, 40) provides an almost complete picture of the full-length Trk receptor family, lacking only the structure of the small JTM regions. Our results highlight the key role of Ala⁴²⁸ in the activation of TRKA by NGF. The importance of this residue may reside in its pivotal position modulating the transition between the inactive to the active dimer interface. This transition could be hampered by the introduction of a bulky residue like Ile. This is also reflected by its high conservation in the TRKA and TrkC protein sequences from several species. The protein sequence divergence of TrkB-TMD is notable (Fig. 1) and may reflect a totally different mechanism of activation as has been recently proposed (41). The finding that the mutation of G423I reduces significantly the differentiation of PC12 cells with NGF suggests that small rearrangements in this TMD region could play an important role in the activation of the downstream signaling, leading to cell differentiation.

To answer the second question posed above, we investigated the role of the eJTM regions of the TRKA receptor upon NGF binding in receptor activation and dimerization. We showed that full-length TRKA receptors could be activated by specific single-point cysteine mutations in the eJTM and in the TMD, in which the position of the mutation relative to the TMD was more important for activation than the dimerization propensity of the mutant. In addition the insertion of Leu residues upstream of the TMD dimerization motif activated TRKA in

TRKA transmembrane domain dimerization

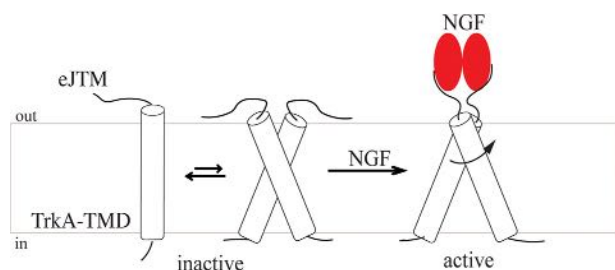


Figure 6. Model of the role of TRKA eJTM and TM domains in receptor activation. TRKA is in equilibrium monomer-dimer by TMD interactions. Binding of NGF stabilizes the TRKA dimers and induces a rearrangement of the eJTM that couples ligand binding to rotation of the TMD. For simplicity only the TMD plus the JTM region is shown. The NGF dimer is shown in red.

the absence of ligand. This suggests that rotation of the downstream domain may be behind the activation of the kinase domain. Other authors have suggested the rotational mechanism of RTK activation (42, 43). In this model the ligand would induce a rotation of the TMD dimer interface that will reorient the kinase domains to facilitate the transphosphorylation. Although our results support this model of activation, other alternative possibilities may exist. For instance the insertion of extra residues increases the TMD length and could induce a piston-like mechanism of activation. However, an increase in the length by two, three, or four residues should also activate the kinase, and this was not the case, because only the Ins1L mutant showed activation. Also, because the insertion of the residues are located into the TMD, it may alter the dimer interface of the TMD dimer, leading to the formation of another dimer interface compatible with a higher activation of the kinase domains. Although we cannot discard this possibility, in the constructs we made, the Leu residues were inserted upstream of the active dimer interface (Fig. 5B) to not alter the dimer interface found by NMR studies.

Bearing all of these findings in mind, we propose a mechanism of receptor activation that suggested a ligand-induced dimerization (or stabilization of preformed dimers) accompanied by a conformational change in the JTM that is transmitted to the intracellular regions by a rotation of the TMD (Fig. 6). This model is supported by our data showing that cysteine mutants in the eJTM and in the TMD in some specific positions can activate TRKA without ligand and that NGF binding induce the formation of new cysteine dimers in the TMD and the ligand-independent activation of TRKA by an induced rotation of its TMD. In addition our model may allow the existence of preformed inactive dimers of TRKA and a conformational activation by NGF as others have suggested (18, 44). Future structural and functional studies of the TRKA should address how the kinase domain is activated if they are connected to the TMD by a flexible intracellular juxtamembrane region. In summary, we have provided functional and structural evidence of the roles played by the JTM and the TMD in TRKA dimerization and activation by NGF.

Experimental procedures

DNA constructs

A plasmid encoding rat TRKA with an N-terminal hemagglutinin tag was kindly provided by Dr. Y. Barde. All TRKA

mutants and constructs were derived from this plasmid. Mutagenesis was done using the site-directed mutagenesis kit (Agilent) according to the manufacturer's protocol. The oligonucleotide sequences of all of the constructs are available upon request. All DNA constructs were sequenced using local facilities.

Cell culture and transfection

HeLa cells, which do not express endogenous TRKA, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Fisher) supplemented with 10% fetal bovine serum (Fisher) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. PC12 and PC12nr5 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 5% horse serum (Fisher). Transfection of HeLa cells was performed using polyethylenimine (PEI; Sigma) at a concentration of 1–2 μg/μl. The use of PEI as the transfection reagent for HeLa cells resulted in suboptimal transfection (10–15% of cells transfected) and in the expression of only a small amount of TRKA in the cells. In contrast, when the same PEI/DNA ratio was used for transfection of HEK293 cells, TRKA was expressed in higher amounts, and ligand-independent activation of TRKA was seen. A concentration of 500–1000 ng of DNA per 10-cm cell plate was used for the TRKA activation experiments. Twenty-four hours after transfection, the cells were lifted and replated into 12-well plates at a density of 100,000 cells/well. By using this procedure, the percentage of cells transfected was identical in all the wells. Forty-eight hours after transfection, the cells were starved in serum-free medium for 2 h and were then stimulated with NGF (Alomone) at the indicated concentrations and time intervals. The cells were lysed with TNE buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with 1% Triton X-100 (Sigma), protease inhibitors (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), and 1 mM sodium fluoride (Sigma). In the experiments involving the TRKA cysteine mutants, 10 mM iodoacetamide (Sigma) was added to the lysis buffer. Lysates were kept on ice for 10 min and centrifuged at 12,000 × g for 15 min in a tabletop centrifuge. The protein level of the lysates was quantified using a Bradford kit (Pierce), and lysates were analyzed by SDS-PAGE

Western blotting analysis

Cellular debris was removed by centrifugation at 12,000 × g for 15 min, and the protein level of cell lysates was quantified using the Bradford assay (Pierce). The proteins were resolved in SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes that were incubated overnight at 4 °C with one of the following antibodies: mouse monoclonal anti-hemagglutinin (1:2000, Sigma); rabbit polyclonal MBP-probe (1:1000, Santa Cruz); rabbit anti-P-Tyr^{674/675} (1:1000, Cell Signaling); and rabbit anti-TRKA (1:1000, Millipore). Following incubation with the appropriate secondary antibody, the membranes were imaged, and the bands were quantified using enhanced chemiluminescence and autoradiography.

TRKA-TMD constructs for cell-free expression

The gene encoding the transmembrane domain of the human TRKA-TM (⁴⁰⁹MKKDET⁶⁷⁴PF⁶⁷⁵GVSVAVGLAVFAC⁶⁸⁰LFL-

STLLLVLNKAGRRNK⁴⁴⁷) was amplified by PCR from six chemically synthesized oligonucleotide templates (Evrogen) whose sequences partially overlapped along its sequence. The PCR products were cloned into a pGEMEX-1 vector by three-component ligation using the NdeI, AatII, and BamHI restriction sites.

Cell-free gene expression

A bacterial S30 cell-free extract was prepared from a 10-liter culture of the *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS strain according to a previously described protocol. The S30 cell extract was stored in 500- μ l aliquots at -80°C . The continuous exchange mode of preparation using a 12.5-kDa membrane was used in this study. Preparative-scale reactions (2–3 ml of reaction mixture) were carried out in 50-ml tubes. Optimal reaction conditions such as Mg^{2+} and K^{+} concentrations, the ratio of the reaction mixture to the feeding mixture or the DNA concentration were established using homemade reactors based on the Mini-CECF reactor previously described (45, 46). The final reaction mixture was a standard feeding mixture:reaction mixture ratio of 8:1 and a cell-free reaction mixture containing 100 mM HEPES, 0.83 mM EDTA with KOH added to achieve a pH of 8.0, 0.1 mg/ml folinic acid, 20 mM acetyl phosphate, 1.2 mM ATP, 0.8 mM each of G/C/UTP, 2 mM 1,4-DTT, 0.05% sodium azide, 2% PEG 8000, 20 mM magnesium acetate, 270 mM potassium acetate, 60 mM creatine phosphate, 1 mM each of 20 amino acids or 0.25% of a 20-amino acid mix (Cambridge Isotope Laboratories, USA), 1 tablet/50 ml of complete protease inhibitor (Roche, Switzerland), 0.5 mg/ml *E. coli* tRNA (Roche, Switzerland), 0.25 mg/ml creatine kinase from rabbit muscle (Roche, Switzerland), 0.05 mg/ml T7 RNA polymerase prepared using a previously described protocol (47), 0.1 unit/ μ l Ribolock (Fermentas), 0.02 μ g/ μ l plasmid DNA, and 30% S30 cell-free extract. All reagents were provided by Sigma unless otherwise specified. Plasmid DNA was purified using a Promega MaxiPrep kit. The reactions were conducted overnight at 34°C and in an Innova 44R shaker (New Brunswick) set at 150 rpm.

Protein purification

The cell-free reaction mixture was diluted three-times with buffer A (50 mM Tris, pH 8.0, and 200 mM NaCl). After 10 min of incubation, the mixture was centrifuged for 10 min at $18,000 \times g$ at room temperature. The precipitate was washed consecutively with buffer A containing 30 μ g/ml RNase A (Fermentas) and buffer B (50 mM Tris, pH 8.0, and 100 mM NaCl). The target protein was solubilized with 200 μ l of buffer B containing 1% lauryl sarcosine. After each step, the protein was centrifuged for 10 min at $18,000 \times g$ at room temperature, and aliquots of the supernatant were analyzed using 12.5% Tricine SDS-PAGE (53). The clarified protein solution was applied onto a 10/300 Tricorn column prepacked with Superdex 200 (GE Healthcare) and pre-equilibrated with buffer B containing 0.2% lauryl sarcosine. Protein-containing fractions were combined and precipitated using the TCA/acetone procedure (48).

Preparation of NMR samples in a membrane mimetic medium

The so-called “isotopic heterodimer” (1:1 mixture of unlabeled and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled peptides) samples were prepared

corresponding to the TRKA–TMD construct to solve its structure. The powder containing the peptides of both samples was first dissolved in a 1:1 trifluoroethanol– H_2O mixture with the addition of deuterated DPC (d_{38} , 98%, Cambridge Isotope Laboratories, USA) and phosphate buffer and was then kept for several minutes in an ultrasound bath and lyophilized. Subsequently, the dried samples were dissolved in 350 μ l of a 9:1 $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ mixture. To attain a uniform micelle size and uniform distribution of the peptide throughout the micelles, the samples were sonicated in an ultrasound bath for several minutes until the solution was completely transparent. The TRKA–TMD concentration in the isotopic-heterodimer sample was 1.9 mM, and other conditions were as follows: DPR 50:1, pH 5.9, and 20 mM phosphate buffer. The samples were placed in Shigemitsu NMR tubes with a glass plunger. Selective-residue labeling was implemented to avoid peaks overlapping while processing the NMR spectra.

NMR spectroscopy and spatial structure calculation

NMR spectra were acquired at 45°C using 600 and 800 MHz AVANCE III spectrometers (Bruker BioSpin, Germany) equipped with pulsed-field gradient triple-resonance cryoprobes. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonances of TRKA–TMD were assigned with CARS software (49) using two- and three-dimensional heteronuclear experiments (50): $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ transverse relaxation optimized spectroscopy, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HNHA, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HNCA, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HN(CO)CA, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HNCO, 3D-Hcch total correlation spectroscopy, and ^{13}C - and ^{15}N -edited NOESY HSQC (recorded on 600 and 800 MHz spectrometers, respectively). Dimeric spatial structures were calculated with the CYANA program (51) based on torsion angle restraints estimated from the chemical shift values obtained with the standard protocol of the TALOS-N program (52) and with intra- and intermonomeric NOE distance restraints derived through analysis of the three-dimensional ^{15}N - and ^{13}C -edited NOESY and $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ F1-filtered/F3-edited NOESY spectra (50) acquired for isotopic heterodimer samples. MOLMOL software was used to calculate the contact areas between the dimer subunits and to visualize the structures (53). Hydrophobic properties of the α -helices in the TRKA–TMD dimers were calculated using the molecular hydrophobicity potential approach implemented in the PRED-DIMER program (54).

Free energy measurements

To measure the free energy we used an NMR-based approach (31). 1 mM ^{15}N -labeled TRKA–TMD sample was prepared in DPC micelles at DPR 50 in NMR buffer and then gradually diluted by 10% DPC solution. At each point, the band-selective excitation short transient-transverse relaxation optimized spectroscopy spectrum with a 0.8-s relaxation delay was acquired to ensure the equilibrium longitudinal magnetization of amide protons (55). The populations of monomeric, dimeric, and oligomeric states were measured from the integrals of separate cross-peaks in these spectra, applying the correction to take into account the coherence losses caused by the transverse relaxation (31). Obtained populations were then converted to monomer and dimer concentrations and approx-

TRKA transmembrane domain dimerization

imated by the micelle-based model of TMD dimerization (31): $K_D = M^2/(D[\text{Emic}])$, where M and D stand for the concentrations of monomer and dimer, whereas $[\text{Emic}]$ is the concentration of “empty” micelles. An additional constraint equation was applied: $N_e[\text{Emic}] + N_m M + N_d D = [\text{Dpc}]$, where N_e , N_m , and N_d stand for the number in detergent molecules in empty, monomer-bearing, and dimer-bearing micelles, respectively. N_e was fixed to 55 (56), whereas K_D , N_m , and N_d were the parameters of approximation. The resulting free energy was additionally corrected by $RT \ln(N_e)$, to change to the generally accepted standard conditions of 1 M detergent (the original value corresponded to the standard conditions of 1 M of empty micelles) (57).

Isolation of membrane fractions

TRKA mutants were overexpressed in HeLa cells by transfection using PEI (1 mg/ml; Sigma). 48 h after transfection, the cells were resuspended in 1 ml of ice-cold homogenization buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris buffer, pH 7.1, plus protease inhibitors) and broken by sonication in two time intervals (30 and 30 s) with 50 W and frequency at 30 MHz on ice. The broken cell homogenate was centrifuged for 10 min at $500 \times g$ at 4 °C to remove whole cells and nuclei. To collect the membrane fraction the cleared supernatant was centrifuged at $100,000 \times g$ at 4 °C for 1 h in a Beckman Optima MAX ultracentrifuge with a TLA110 rotor using polycarbonate thick-wall centrifuge tubes (Beckman Coulter). The supernatant that contains soluble proteins was removed, and the pellet-containing membranes were resuspended in 1 ml of ice-cold homogenization buffer by sonication and recentrifuged at $100,000 \times g$. The final pellet contains the membrane fraction used to the iodine oxidation protocol.

Iodine oxidation for cross-linking of TRKA mutants

Because cysteine residues are buried deep in the phospholipid bilayer, the membranes were isolated, and I_2 was used as the oxidation agent as described in Ref. 58. The membrane fractions were diluted in the homogenization buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris buffer, pH 7.1 plus protease inhibitors). Protein content was quantified using a Bradford kit (Pierce), and equal amounts of isolated membranes fractions were incubated for 10 min with or without NGF (10 ng/ml). A solution of 2.5 mM I_2 in absolute ethanol was freshly prepared immediately before the cross-linking of cysteine residues and was added to the incubated membrane fractions with NGF (250 μM final iodine concentration) for 30 s at room temperature. The reaction was stop adding 1/10 volume of a freshly made solution of sodium thiosulfate (60 μM final concentration). Nonreducing SDS-PAGE sample buffer was added, and the samples were boiled for 5 min before analyzed by nonreducing SDS-PAGE.

Differentiation of PC12nr5 cells

Transfection in PC12nr5 cells was performed using Lipofectamine 2000 as per the manufacturer's instructions. The mutant or the WT TRKA-transfected cells and mock-transfected cells, as well as nontransfected cells, were treated under the same conditions in a 6-well tissue culture plate. The cells

were washed three times with serum-free medium and incubated for 48 h in a medium containing 1% fetal bovine serum and 50 ng/ml of NGF (Alomone). At time 0, 24 h, and 48 h, the cells were washed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. The cells were imaged using a Leica SP8 spectral confocal microscope. The percentage of cells with a neurite twice as long as the cell body was counted as differentiated.

Accession codes

The atomic coordinates and experimental restraints were deposited in the Protein Data Bank under accession code 2n90 for TRKA-TM-wt.

Author contributions—M. L. F., S. A. G., K. S. M., A. S. A., and M. V. conceptualization; M. L. F. and M. V. data curation; M. L. F., K. D. N., S. A. G., K. S. M., A. S. A., and M. V. formal analysis; M. L. F. and M. V. supervision; M. L. F., A. S. A., and M. V. funding acquisition; M. L. F., K. D. N., S. A. G., K. S. M., A. S. A., and M. V. investigation; M. L. F., K. D. N., S. A. G., K. S. M., A. S. A., and M. V. methodology; M. L. F. and M. V. writing-original draft; M. L. F., S. A. G., K. S. M., A. S. A., and M. V. writing-review and editing.

Acknowledgments—We thank Dr. Carlos Ibañez for critical reading of the manuscript and Dr. Yves Barde for the TRKA plasmid.

References

1. Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 299–309 [CrossRef Medline](#)
2. Bothwell, M. (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 3–15 [CrossRef Medline](#)
3. Ceni, C., Unsain, N., Zeinieh, M. P., and Barker, P. A. (2014) Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 193–221 [CrossRef Medline](#)
4. Friedman, W. J., and Greene, L. A. (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp. Cell Res.* **253**, 131–142 [CrossRef Medline](#)
5. Bothwell, M. (2016) Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research* **5**, 1885 [CrossRef Medline](#)
6. Vilar, M. (2017) Structural characterization of the p75 neurotrophin receptor: a stranger in the TNFR superfamily. *Vitam. Horm.* **104**, 57–87 [CrossRef Medline](#)
7. Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., and Barbacid, M. (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246–249 [CrossRef Medline](#)
8. Indo, Y., Tsuruta, M., Hayashida, Y., Karim, M. A., Ohta, K., Kawano, T., Mitsubuchi, H., Tonoki, H., Awaya, Y., and Matsuda, I. (1996) Mutations in the TRKA-NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat. Genet.* **13**, 485–488 [CrossRef Medline](#)
9. Martin-Zanca, D., Hughes, S. H., and Barbacid, M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**, 743–748 [CrossRef Medline](#)
10. Cocco, E., Scaltriti, M., and Drilon, A. (2018) NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 731–747 [CrossRef Medline](#)
11. Endres, N. F., Barros, T., Cantor, A. J., and Kuriyan, J. (2014) Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 437–446 [CrossRef Medline](#)
12. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 [CrossRef Medline](#)
13. Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H., and de Vos, A. M. (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TRKA receptor. *Nature* **401**, 184–188 [CrossRef Medline](#)

14. Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. I., Chao, M. V., Martín-Zanca, D., and Pérez, P. (2001) A novel mutation within the extracellular domain of TRKA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* **20**, 1229–1234 [CrossRef Medline](#)
15. Zaccaro, M. C., Ivanisevic, L., Perez, P., Meakin, S. O., and Saragovi, H. U. (2001) p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J. Biol. Chem.* **276**, 31023–31029 [CrossRef Medline](#)
16. Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., and Garcia, K. C. (2007) Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TRKA and p75 receptors. *Neuron* **53**, 25–38 [CrossRef Medline](#)
17. Mischel, P. S., Umbach, J. A., Eskandari, S., Smith, S. G., Gundersen, C. B., and Zampighi, G. A. (2002) Nerve growth factor signals via preexisting TRKA receptor oligomers. *Biophys. J.* **83**, 968–976 [CrossRef Medline](#)
18. Shen, J., and Maruyama, I. N. (2011) Nerve growth factor receptor TRKA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS Lett.* **585**, 295–299 [CrossRef Medline](#)
19. Marchetti, L., Callegari, A., Luin, S., Signore, G., Viegi, A., Beltram, F., and Cattaneo, A. (2013) Ligand signature in the membrane dynamics of single TRKA receptor molecules. *J. Cell Sci.* **126**, 4445–4456 [CrossRef Medline](#)
20. Ahmed, F., and Hristova, K. (2018) Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: effects of their cognate ligands. *Biochem. J.* **475**, 3669–3685 [CrossRef Medline](#)
21. Artim, S. C., Mendrola, J. M., and Lemmon, M. A. (2012) Assessing the range of kinase autoinhibition mechanisms in the insulin receptor family. *Biochem. J.* **448**, 213–220 [CrossRef Medline](#)
22. Bertrand, T., Kothe, M., Liu, J., Dupuy, A., Rak, A., Berne, P. F., Davis, S., Gladysheva, T., Valtre, C., Crenne, J. Y., and Mathieu, M. (2012) The crystal structures of TRKA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition. *J. Mol. Biol.* **423**, 439–453 [CrossRef Medline](#)
23. Bocharov, E. V., Bragin, P. E., Pavlov, K. V., Bocharova, O. V., Mineev, K. S., Polynsky, A. A., Volynsky, P. E., Efremov, R. G., and Arseniev, A. S. (2017) The conformation of the epidermal growth factor receptor transmembrane domain dimer dynamically adapts to the local membrane environment. *Biochemistry* **56**, 1697–1705 [CrossRef Medline](#)
24. Li, E., and Hristova, K. (2006) Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry* **45**, 6241–6251 [CrossRef Medline](#)
25. Li, E., and Hristova, K. (2010) Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhesion Migration* **4**, 249–254 [CrossRef Medline](#)
26. Jura, N., Endres, N. F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M. H., Wemmer, D. E., Zhang, X., and Kuriyan, J. (2009) Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**, 1293–1307 [CrossRef Medline](#)
27. King, C., and Hristova, K. (2019) Direct measurements of VEGF-VEGFR2 binding affinities reveal the coupling between ligand binding and receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* **294**, 9064–9075 [CrossRef Medline](#)
28. Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K., and Hristova, K. (2016) VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife* **5**, e13876 [CrossRef Medline](#)
29. Sarabipour, S., and Hristova, K. (2016) Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nat. Commun.* **7**, 10262 [CrossRef Medline](#)
30. Nadezhdin, K. D., García-Carpio, I., Goncharuk, S. A., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., and Vilar, M. (2016) Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization. *J. Biol. Chem.* **291**, 12346–12357 [CrossRef Medline](#)
31. Mineev, K. S., Lesovoy, D. M., Usmanova, D. R., Goncharuk, S. A., Shulepko, M. A., Lyukmanova, E. N., Kirpichnikov, M. P., Bocharov, E. V., and Arseniev, A. S. (2014) NMR-based approach to measure the free energy of transmembrane helix-helix interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 164–172 [CrossRef Medline](#)
32. Mineev, K. S., Goncharuk, S. A., and Arseniev, A. S. (2014) Toll-like receptor 3 transmembrane domain is able to perform various homotypic interactions: an NMR structural study. *FEBS Lett.* **588**, 3802–3807 [CrossRef Medline](#)
33. Bocharov, E. V., Mineev, K. S., Goncharuk, M. V., and Arseniev, A. S. (2012) Structural and thermodynamic insight into the process of “weak” dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2158–2170 [CrossRef Medline](#)
34. Cymer, F., Veerappan, A., and Schneider, D. (2012) Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 963–973 [CrossRef Medline](#)
35. Hughson, A. G., Lee, G. F., and Hazelbauer, G. L. (1997) Analysis of protein structure in intact cells: crosslinking *in vivo* between introduced cysteines in the transmembrane domain of a bacterial chemoreceptor. *Protein Sci.* **6**, 315–322 [Medline](#)
36. Schecterson, L. C., Hudson, M. P., Ko, M., Philippidou, P., Akmentin, W., Wiley, J., Rosenblum, E., Chao, M. V., Haleboua, S., and Bothwell, M. (2010) Trk activation in the secretory pathway promotes Golgi fragmentation. *Mol. Cell Neurosci.* **43**, 403–413 [CrossRef Medline](#)
37. Deinhardt, K., and Chao, M. V. (2014) Trk receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 103–119 [CrossRef Medline](#)
38. Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S. H., and de Vos, A. M. (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TRKA, TrkB and TrkC. *J. Mol. Biol.* **290**, 149–159 [CrossRef Medline](#)
39. Furuya, N., Momose, T., Katsuno, K., Fushimi, N., Muranaka, H., Handa, C., Ozawa, T., and Kinoshita, T. (2017) The juxtamembrane region of TRKA kinase is critical for inhibitor selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 1233–1236 [CrossRef Medline](#)
40. Su, H. P., Rickert, K., Burlein, C., Narayan, K., Bukhtiyarova, M., Hurzy, D. M., Stump, C. A., Zhang, X., Reid, J., Krasowska-Zoladek, A., Tummala, S., Shipman, J. M., Kornienko, M., Lemaire, P. A., Krosky, D., et al. (2017) Structural characterization of nonactive site, TRKA-selective kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E297–E306 [CrossRef Medline](#)
41. Zahavi, E. E., Steinberg, N., Altman, T., Chein, M., Joshi, Y., Gradus-Pery, T., and Perlson, E. (2018) The receptor tyrosine kinase TrkB signals without dimerization at the plasma membrane. *Sci. Signal.* **11**, ea04006 [CrossRef Medline](#)
42. Bell, C. A., Tynan, J. A., Hart, K. C., Meyer, A. N., Robertson, S. C., and Donoghue, D. J. (2000) Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3589–3599 [CrossRef Medline](#)
43. Maruyama, I. N. (2015) Activation of transmembrane cell-surface receptors via a common mechanism?: The “rotation model.” *Bioessays* **37**, 959–967 [Medline](#)
44. Shen, J., and Maruyama, I. N. (2012) Brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB exists as a preformed dimer in living cells. *J. Mol. Signal.* **7**, 2 [CrossRef Medline](#)
45. Aoki, M., Matsuda, T., Tomo, Y., Miyata, Y., Inoue, M., Kigawa, T., and Yokoyama, S. (2009) Automated system for high-throughput protein production using the dialysis cell-free method. *Protein Expr. Purif.* **68**, 128–136 [CrossRef Medline](#)
46. Kai, L., Roos, C., Haberstock, S., Proverbio, D., Ma, Y., Junge, F., Karbyshev, M., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2012) Systems for the cell-free synthesis of proteins. *Methods Mol. Biol.* **800**, 201–225 [CrossRef Medline](#)
47. Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2007) Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2**, 2945–2957 [CrossRef Medline](#)
48. Goncharuk, S. A., Goncharuk, M. V., Mayzel, M. L., Lesovoy, D. M., Chupin, V. V., Bocharov, E. V., Arseniev, A. S., and Kirpichnikov, M. P. (2011) Bacterial synthesis and purification of normal and mutant forms of human FGFR3 transmembrane segment. *Acta Naturae* **3**, 77–84 [Medline](#)
49. Keller, R. L. J. (2004) *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, Cantina Verlag, Goldau, Switzerland

TRKA transmembrane domain dimerization

50. Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., and Skelton, N. J. (2006) *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA
51. Güntert, P. (2003) Automated NMR protein structure calculation. *Prog. NMR Spectrosc.* **43**, 105 [CrossRef](#)
52. Shen, Y., and Bax, A. (2013) Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. *J. Biomol. NMR* **56**, 227–241 [CrossRef](#) [Medline](#)
53. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55, 29–32 [CrossRef](#) [Medline](#)
54. Polyansky, A. A., Volynsky, P. E., and Efremov, R. G. (2012) Multistate organization of transmembrane helical protein dimers governed by the host membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 14390–14400 [CrossRef](#) [Medline](#)
55. Favier, A., and Brutscher, B. (2011) Recovering lost magnetization: polarization enhancement in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **49**, 9–15 [CrossRef](#) [Medline](#)
56. Tieleman, D. P., van der Spoel, D., and Berendsen, H. J. C. (2000) Molecular dynamics simulations of dodecylphosphocholine micelles at three different aggregate sizes: micellar structure and chain relaxation. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6380–6388 [CrossRef](#)
57. Fleming, K. G. (2002) Standardizing the free energy change of transmembrane helix-helix interactions. *J. Mol. Biol.* **323**, 563–571 [CrossRef](#) [Medline](#)
58. Schwem, B. E., and Fillingame, R. H. (2006) Cross-linking between helices within subunit a of *Escherichia coli* ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle. *J. Biol. Chem.* **281**, 37861–37867 [CrossRef](#) [Medline](#)

Mutations in TrkA Causing Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis (CIPA) Induce Misfolding, Aggregation, and Mutation-dependent Neurodegeneration by Dysfunction of the Autophagic Flux*

Received for publication, February 18, 2016, and in revised form, August 19, 2016 Published, JBC Papers in Press, August 22, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.722587

María Luisa Franco^{‡1}, Cristina Melero^{‡1,2}, Esther Sarasola[§], Paloma Acebo[¶], Alfonso Luque^{||3}, Isabel Calatayud-Baselga[‡], María García-Barcina[§], and  Marçal Vilar^{‡4}

From the [‡]Molecular Basis of Neurodegeneration Unit, Institute of Biomedicine of València, IBV-CSIC, c/o Jaume Roig 11, 46010 València,, the [§]Department of Genetics, Basurto University Hospital (osakidetza/Servicio Vasco de Salud), Bilbao, and the [¶]Chronic and ^{||}Rare Disease Centers, ISCIII, Crta. Majadahonda a Pozuelo km.2 Majadahonda, Madrid 28220, Spain

Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) is a rare autosomal recessive disorder characterized by insensitivity to noxious stimuli and variable intellectual disability (ID) due to mutations in the NTRK1 gene encoding the NGF receptor TrkA. To get an insight in the effect of NTRK1 mutations in the cognitive phenotype we biochemically characterized three TrkA mutations identified in children diagnosed of CIPA with variable ID. These mutations are located in different domains of the protein; L213P in the extracellular domain, Δ736 in the kinase domain, and C300stop in the extracellular domain, a new mutation causing CIPA diagnosed in a Spanish teenager. We found that TrkA mutations induce misfolding, retention in the endoplasmic reticulum (ER), and aggregation in a mutation-dependent manner. The distinct mutations are degraded with a different kinetics by different ER quality control mechanisms; although C300stop is rapidly disposed by autophagy, Δ736 degradation is sensitive to the proteasome and to autophagy inhibitors, and L213P is a long-lived protein refractory to degradation. In addition L213P enhances the formation of autophagic vesicles triggering an increase in the autophagic flux with deleterious consequences. Mouse cortical neurons expressing L213P showed the accumulation of LC3-GFP positive puncta and dystrophic neurites. Our data suggest that TrkA misfolding and aggregation induced by some CIPA mutations disrupt the autophagy homeostasis causing neurodegeneration. We propose that distinct disease-causing mutations of TrkA generate different levels of cell toxicity, which may provide an explanation of the variable intellectual disability observed in CIPA patients.

Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA)⁵ (MIM number 256800), also known as hereditary sensory and

* This work was supported in part by the Spanish Minister of Economy and Competitiveness Grants BFU2013/42746-P (to M. V.) and TPY-M-1068/13 (to A. L.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ Both authors contributed equally to the results of this work.

² Present address: Faculty of Life Sciences, The University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PT, United Kingdom.

³ Miguel Servet fellow.

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: mvilar@ibv.csic.es.

⁵ The abbreviations used are: CIPA, congenital insensitivity to pain with anhidrosis; ID, intellectual disability; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated

autonomic neuropathy type IV (HSAN-IV), is a rare autosomal recessive disorder (1, 2). It is characterized by insensitivity to noxious stimuli, recurrent hyperpyrexia related to high ambient temperature, inability to sweat (anhidrosis), self-mutilation in the first months of life, and increased risk to bone fractures, multiple scars, osteomyelitis, joint deformities, and limb amputation as children grow older (1, 3). Death from hyperpyrexia occurs within the first 3 years of life in almost 20% of the patients and most patients show intellectual disability (ID) of varying severity.

Inactivating mutations in the NTRK1 gene encoding TrkA, a receptor tyrosine kinase for nerve growth factor (NGF), are responsible of CIPA development (4). The survival of nociceptive neurons and sympathetic ganglia derived from the neural crest depends on NGF stimulation (5–7). NGF/TrkA signaling is required not only for survival, but also for the sprouting and differentiation of nociceptive neurons during development (6, 8). The altered perception of pain and temperature and anhidrosis in CIPA are due to the absence of unmyelinated C-fibers, small-diameter myelinated Aδ-fibers, and lack of sweat glands innervations (1). In addition, CIPA patients present variable ID, although the causes for this are still unknown, its variability may indicate a mutation-specific phenotype.

To date, more than 50 TrkA mutations that cause CIPA have been described (9). Mutations are distributed all along the protein sequence of TrkA, from the extracellular to the kinase domain. Missense mutations usually affect the kinase domain where they disturb the kinase activity of TrkA by inducing conformational changes or misfolding. There are, as well, several nonsense mutations changing the open reading frame or introducing a stop codon. Although these mutations are clearly detrimental to the TrkA function, they generate truncated forms that may impinge the protein homeostasis, *proteostasis*, of the cell where they are expressed.

The folding of the secretory and the membrane proteins takes place in the endoplasmic reticulum (ER). The quality of the proteins folded in the ER is carefully monitored by an ER-quality control mechanism, which allows only correctly folded proteins to be transported to their final destinations (10–14).

ciated degradation; ENDO-H, endoglycosidase-H; LC-3, light chain 3; AV, autophagosome vesicle.

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

Misfolded and aggregated proteins are subsequently degraded by different clearance pathways like “ER-associated degradation” (ERAD) (11, 13–15) or by autophagy (16, 17) or a combination of both.

Autophagy allows recycling of cytoplasmic constituents or aged proteins for the maintenance of cellular homeostasis (18). Autophagy dysfunction can lead to cellular toxicity and diseases (19–21). Accumulation of abnormal protein aggregates, a common cause of neurodegenerative diseases, can be reduced through autophagic degradation. Defects in autophagy are implicated in neurodegenerative disorders (22, 23). Not only autophagy defects are detrimental, an excessive increase in autophagy can also cause neurodegeneration.

TrkA activity has been linked to autophagy-induced cell death. Several reports described the activation of autophagy upon TrkA overexpression in cancer cell lines (24–29), however, as the activation of autophagy is in some cases ligand-independent (30, 31) the physiological role of TrkA-induced autophagy is still questionable. Another possibility is that TrkA overexpression may saturate the lysosome pathway with toxic outcomes. Lysosomes constitute the degradation destiny of TrkA. Activation by NGF induces TrkA ubiquitination necessary for internalization and targeting to the lysosomal pathway for degradation (32, 33), however, how non-functional TrkA mutants are degraded has not been studied.

In addition, no study has addressed if TrkA mutations causing CIPA induce protein misfolding, aggregation, and cell toxicity. In this context, we biochemically characterized three mutations in NTRK1 causing CIPA that were identified in children with mild or absence of ID. One mutation is described in this work for the first time. We found that distinct TrkA mutations behaved differently in terms of misfolding, subcellular localization, degradation pathways, and cell toxicity.

Results

TrkA-Cys300stop a New Mutation in NTRK1 Causing CIPA—In this paper we report the clinical history of a family (Fig. 1A) with two members affected of CIPA: a 17-year-old male (index case) and his 8-year-old sister. This family also includes a non-affected sister and both parents. The index case was diagnosed at the age of 6 with HSN-IV, which was characterized due to multiple fractures, hemarthrosis of lower limbs, especially of the left knee, and non-infectious fever related to high ambient temperature. At that time, he was using a wheelchair but was able to stand alone. Strength decrease in the lower limb (knees and ankles) was detected and the rest of the neurologic exploration was normal (coordination, balance, cranial pairs, tendon, and skin reflexes), except for the absence of nociceptive sensitivity (tactile and proprioceptive sensitivities were conserved). ID was not present at the time of the clinical history.

Blood samples were collected from all the family members available: the two affected siblings, their healthy sister, the father, and the mother. Genomic DNA was purified from the blood of the 17-year-old affected male. All of the 17 exons and intron-exon boundaries of the longest *NTRK1* isoform (NM_002529.3) were analyzed using PCR amplification of

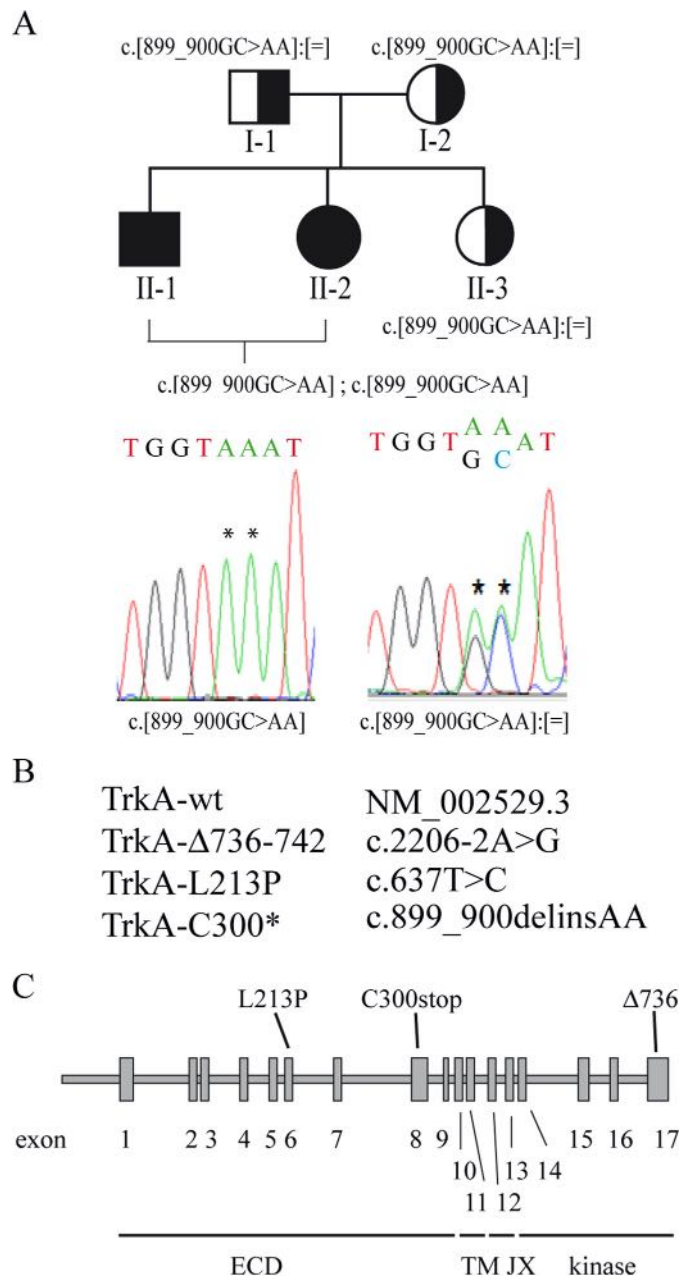


FIGURE 1. Mutations in NTRK1 used in this study. A, pedigree of the family and results of the NTRK1 genetic analysis in CIPA patients. As indicated by the symbols in the pedigree, individuals II-1 and II-2 are affected by CIPA, whereas the parents and the sister are all carriers. The NTRK1 mutation detected in each individual is indicated under the corresponding symbol. Electropherograms demonstrating the presence of the NTRK1 point mutations. The position of each mutation is indicated by an asterisk. B, the mutations described in this report are named following the recommendations from the Human Genome Variation Society. C, location of the different mutations in the TrkA protein is shown in a scheme of the NTRK1 gene. Exons are numbered and shown as boxes.

genomic DNA from the patient followed by direct DNA sequencing. The presence of the identified *NTRK1* mutations was subsequently investigated in the other relatives using the same methods. Mutation screening in the index case (17-year-old male) revealed the presence of a new mutation in homozygosity in the NTRK1 gene, c.899_900delinsAA (p.Cys300*). The presence of this mutation was subsequently investigated in the other relatives using the same methods, confirming the

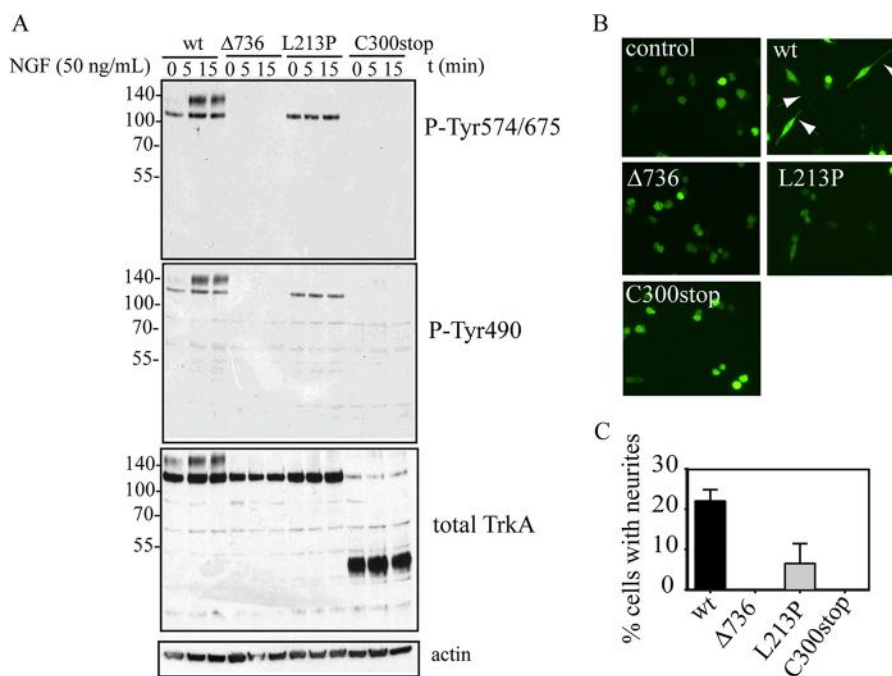


FIGURE 2. Inactivation of the signaling and neurite differentiation mediated by TrkA mutations. *A*, Western blotting of PC12nr5 cells transfected with the indicated constructs after stimulation with NGF (50 ng/ml) during different time points. *B*, differentiation of PC12nr5 cells co-transfected with GFP and the indicated TrkA constructs upon stimulation with NGF (50 ng/ml) during 72 h. Presence of neurites is observed in TrkA-wt (white arrows). *C*, percentage of PC12nr5 transfected with the indicated construct cells having neurites longer than the cell body.

homozygous status of the affected sister and the carrier status of the rest of the family members (Fig. 1A).

Together with C300stop, in this study we also investigated two other mutations in *NTRK1* causing CIPA, which cover different domains of TrkA (Fig. 1B); the mutation TrkA- Δ 736(c.2206–2A>G), which is a short in-frame deletion that eliminates 7 residues in the kinase domain of TrkA (Fig. 1B), which we previously described in a female child in Northern Spain with no evidences of ID (34); and the mutation L213P (c.637T>C), a missense mutation in the extracellular domain of TrkA originally characterized by Mardy *et al.* (35–38) with mild ID with speech problems. For practical reasons, we will refer to them as C300stop, Δ 736, and L213P. These mutations causing variable ID are located in different regions of the TrkA protein (Fig. 1C) and are representative of the different types of mutations found in CIPA, missense, deletion, and truncated forms.

TrkA Signaling Pathways Are Impaired in All TrkA Mutants—To study how the new mutations influence TrkA activity, PC12nr5 cells were transfected with plasmids encoding the TrkA-wt and all TrkA mutations. PC12 cells derived from a pheochromocytoma recapitulate neurite differentiation and survival in the presence of NGF and constitutes a good model of signaling and differentiation in the TrkA/NGF pathway (39). The PC12nr5 cell line was generated by the Greene laboratory (40) and does not express TrkA, so it cannot differentiate in the presence of NGF being a good model for testing TrkA mutants. Two days after transfection cells were serum starved and treated with NGF for different time points and then, subjected to protein extraction and Western blot analysis (Fig. 2A). Upon transfection two TrkA bands are visible after Western blot analysis; a lower band that reflects the TrkA that

has not completed Golgi-mediated processing of high-mannose *N*-glycans (41) (immature form of TrkA) and an upper mature band expressed in the plasma membrane (mature form of TrkA). It is established that the lowest band of TrkA is intracellular and its activation corresponds to spontaneous dimerization due to defective glycosylation (42). However, exposure to NGF substantially increases the phosphorylation of the upper TrkA band, consistent with that band protein being in the plasma membrane that has access to NGF. Upon NGF binding TrkA is activated by trans-phosphorylation in different tyrosine residues (43). We used two phospho-specific antibodies: one against phospho-Tyr-490, a site for Shc binding, and another against phospho-Tyr-674/675 in the kinase activation loop. The TrkA wild type is activated in a NGF-dependent manner, as we can see from the phosphorylation of the 140-kDa band after 5 and 15 min. The mutants Δ 736, L213P, and the C300stop, however, are not activated by NGF and are not phosphorylated (Fig. 2A). In the L213P mutation, the lower band of TrkA corresponding to intracellular TrkA is recognized by the phospho-specific antibodies, indicating that the kinase domain is actually functional, although TrkA-L213P is causing CIPA due to a defective maturation process (35, 37). In the case of TrkA- Δ 736, no phospho-reactive bands are observed, indicating that this mutation probably induces a global misfolding in the kinase domain (see below), making the kinase activity non-functional. C300stop has no kinase domain, and then no kinase activity was expected but it was used as an internal control (Fig. 2A). Western blotting against total TrkA indicates that TrkA-wt shows the bands corresponding to the mature form of TrkA, which is able to reach the plasma membrane (presence of the upper protein band), however, TrkA- Δ 736 and TrkA-

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

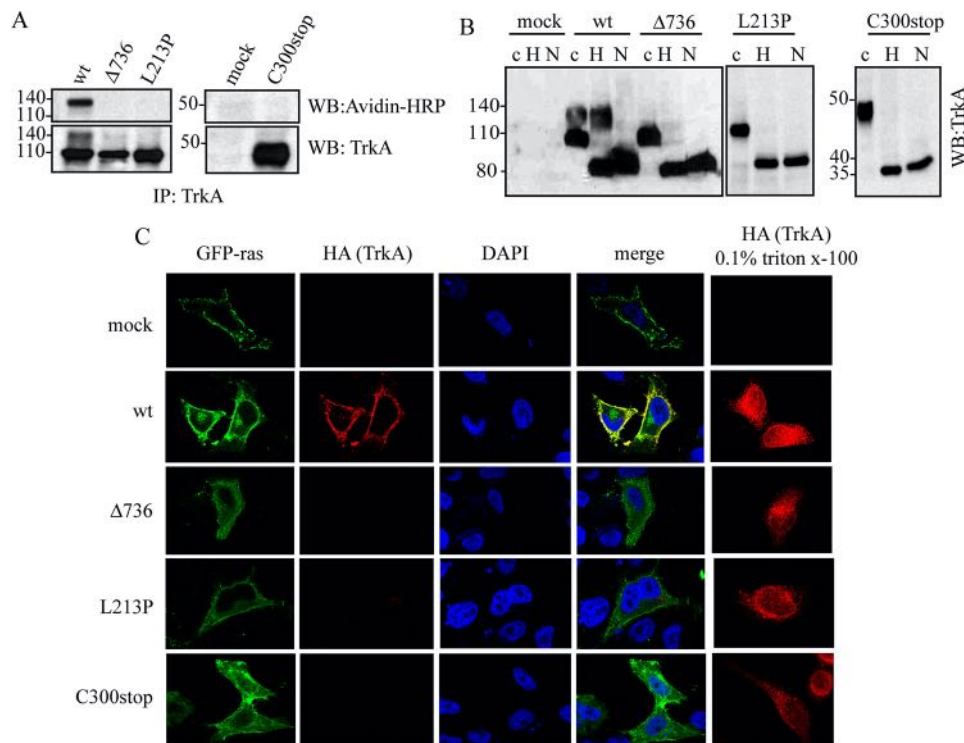


FIGURE 3. TrkA CIPA mutants have impaired traffic to the plasma membrane. *A*, biotinylation protocol. Avidin-HRP immunodetection of TrkA immunoprecipitates from HeLa cells transfected with TrkA-wt and TrkA mutants. *Mock* indicates HeLa cells transfected with empty control plasmid. *B*, Western blotting of lysates from cells transfected with TrkA-wt and TrkA mutants treated with buffer (*c*), End-H (*H*), and *N*-glycosidase (*N*). *C*, immunolocalization of HeLa cells co-transfected with TrkA mutants (*red*) and GFP-Ras (*green*) in the absence and presence of 0.1% Triton X-100. DAPI nuclear staining and merge of three channels are shown. *WB*, Western blot.

L213P are not able to mature and traffic correctly to the plasma membrane (absence of the upper protein band).

To further analyze the effect of TrkA mutations in neurite development, PC12nr5 cells were transfected and stimulated by NGF and the formation of neuronal-like dendrites was examined and quantified (Fig. 2, *B* and *C*). PC12nr5 cells expressing TrkA-wt are able to form dendrites but not PC12nr5 cells transfected with $\Delta 736$, L213P, or C300stop (Fig. 2, *B* and *C*). Altogether this analysis showed that all three TrkA mutations identified in CIPA patients induce inactivation of the TrkA receptor.

TrkA Mutants Are Retained in the ER and Do Not Traffic to the Plasma Membrane—As we noted above, Western immunoblotting analysis shows that TrkA- $\Delta 736$ and TrkA-L213P migrate with a unique protein band around 110 kDa, suggesting an improper processing or traffic to the plasma membrane (see Fig. 2*A*). We carried out different approaches to analyze the traffic of these mutants. First we used a surface-exposed biotinylation protocol to determine whether TrkA proteins are located at the cell surface. When expressed in HeLa cells the TrkA-wt is labeled with biotin but not the TrkA mutants (Fig. 3*A*), confirming that TrkA mutants are not exposed at the cell surface and suggesting that they have a defective traffic to the plasma membrane. Next we analyzed if the TrkA mutants are retained in the ER. We treated a total lysate of HeLa cells transfected with TrkA-wt and the mutants with endoglycosidase-H (Endo-H) (Fig. 3*B*), an enzyme that removes the glycans added to asparagine residues during transit from the ER to Golgi apparatus. As shown in Fig. 3*B*, the TrkA mutants are totally sensi-

tive to the Endo-H treatment as well as some pools of TrkA-wt. As a control of deglycosylation the samples were incubated with *N*-glycosidase (*N* in Fig. 3*B*), an enzyme that removes all *N*-linked sugars. After treatment with *N*-glycosidase, a new expected band around 80 kDa appears, corresponding to the fully deglycosylated form of TrkA. This result suggests that all TrkA mutants tested, but not TrkA-wt, are retained during maturation through the ER, and do not reach the plasma membrane.

We also analyzed the cellular localization of TrkA-wt and the three mutants by immunofluorescence (Fig. 3*C*). An N-terminal HA tag was introduced in TrkA constructs. We performed the immunofluorescence using an anti-HA antibody without permeating the cells. Only proteins in the plasma membrane would be able to be labeled with HA antibody. A construct encoding the fusion protein GFP-ras was used as a marker of the plasma membrane (green fluorescence in Fig. 3*C*). Our results showed that only TrkA-wt is localized in the plasma membrane but all the TrkA mutants tested remained intracellular (Fig. 3*C*). A control experiment in the presence of 0.1% Triton X-100 to permeate the cells before the immunofluorescence showed that all constructs are equally expressed (Fig. 3*C*).

We next studied the intracellular localization of TrkA-wt and TrkA mutants. We used two protein markers: calnexin, an ER resident transmembrane protein, and giantin a Golgi marker (Fig. 4). We used the Pearson's coefficient to assess colocalization of TrkA with calnexin (Fig. 4*B*) or giantin (Fig. 4*D*). Using this analysis we found that the three TrkA mutants are significantly co-localized with calnexin in comparison to

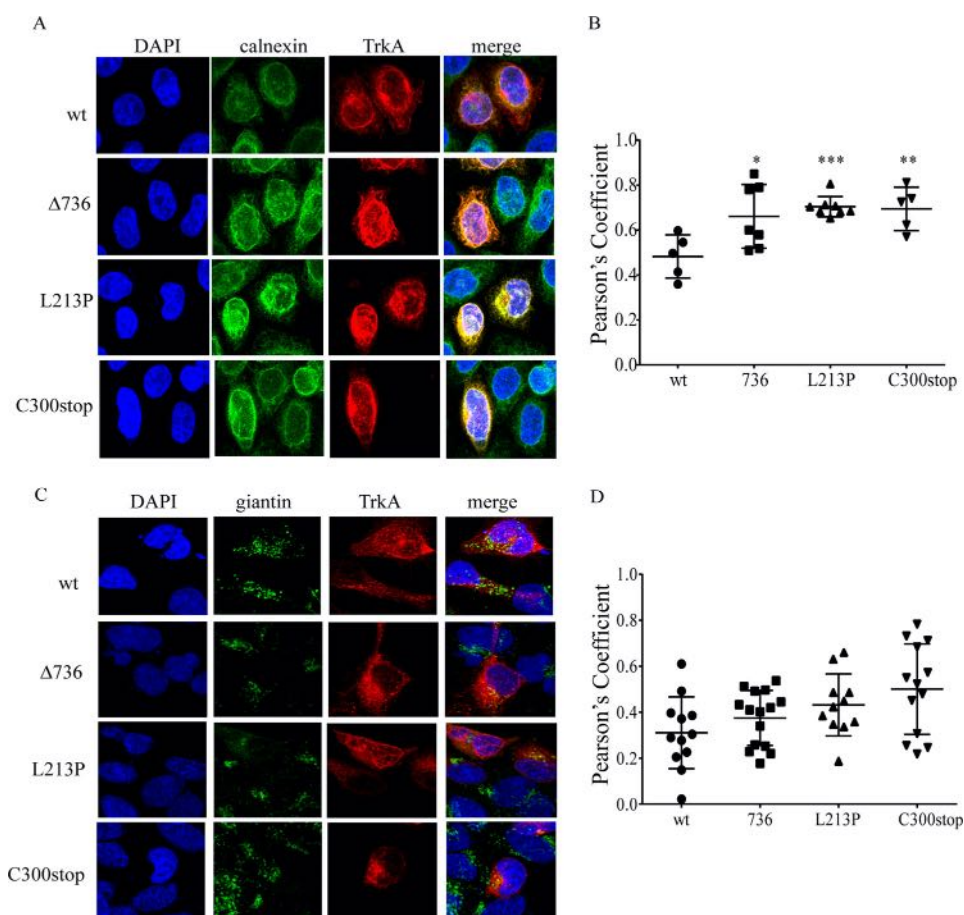


FIGURE 4. TrkA CIPA mutants are retained in the ER. *A*, TrkA mutants (red) co-localization with calnexin (green) in transfected HeLa cells. DAPI nuclear staining and merge of three channels are shown. *B*, Pearson's coefficient to assess the co-localization of TrkA-wt and mutants with calnexin. *C*, TrkA mutants (red) co-localization with giantin (green) in transfected HeLa cells. DAPI nuclear staining and merge of three channels are shown. *D*, Pearson's coefficient to assess the co-localization of TrkA-wt and mutants with giantin. Error bars are S.E.; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. *t* test compared with wt.

TrkA-wt (Fig. 4, *A* and *B*). In addition, all the mutant constructs showed a poor co-localization with giantin, the Golgi marker (Fig. 4, *C* and *D*). These results indicate that the TrkA mutants are retained in the ER, although some pools of C300stop may reach some regions of the Golgi (Fig. 4*D*).

For the case of TrkA-wt we observed that TrkA-wt overexpression induces Golgi fragmentation (Fig. 4*C*), supporting earlier reports (41). In this case the co-localization analysis is difficult. Although analyzed in the whole cell most of TrkA-wt is not co-localized with giantin (Fig. 4*D*), some TrkA-wt pools showed evidence of co-localization with giantin (yellow dots in Fig. 4*C*) promoting the Golgi fragmentation by autoactivation of TrkA, as previously reported (41).

CIPA Mutations Induce TrkA Misfolding and Protein Aggregation—ER retention is usually caused by protein misfolding. To prove misfolding we incubated a Triton X-100-soluble fraction of TrkA-wt and the mutants with an increasing concentrations of trypsin. The sensitivity to trypsin digestion is indicative of local or global misfolding. TrkA-wt digestion with trypsin is shown in Fig. 5*A*. We observed that all mutations induced a different protein band pattern in SDS-PAGE in comparison to the TrkA-wt. This indicates a different accessibility to the protease digestion suggesting a local or global misfolding (Fig. 5*A*).

Protein misfolding may induce the exposition of hydrophobic residues to the protein surface promoting protein aggregation. We evaluated if the mutations on TrkA promote the formation of insoluble aggregates (44). Transfected HeLa cells with the different TrkA constructs were lysed with buffer containing the non-ionic detergent Triton X-100, and after centrifugation the pellet was treated with SDS-PAGE buffer containing 1% SDS and β -mercaptoethanol (Fig. 5*B*). TrkA- Δ 736 and TrkA-C300stop are recovered in the Triton X-100-soluble fraction (Fig. 5*B*). However, TrkA-L213P is mainly found in the pellet, suggesting an aggregated state (Fig. 5, *B* and *C*). Due to Leu-213 residue localization in the middle of a β -sheet in the TrkA extracellular domain, the L213P mutation probably induces a structural change in that region and a subsequent aberrant aggregation of TrkA. The L213P mutation will probably induce a structural change in that region, potentially inducing an aberrant aggregation of TrkA. Some minor forms of TrkA-wt were also found in the aggregated pellet, suggesting the existence of off-pathways in the folding of TrkA when overexpressed.

TrkA Mutants Are Differentially Sensitive to Proteasome and Autophagy Inhibitors—Misfolded proteins retained in the ER are targeted to degradation by an ER quality control (11). We determined the half-life times of the mutant proteins by a cyclo-

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

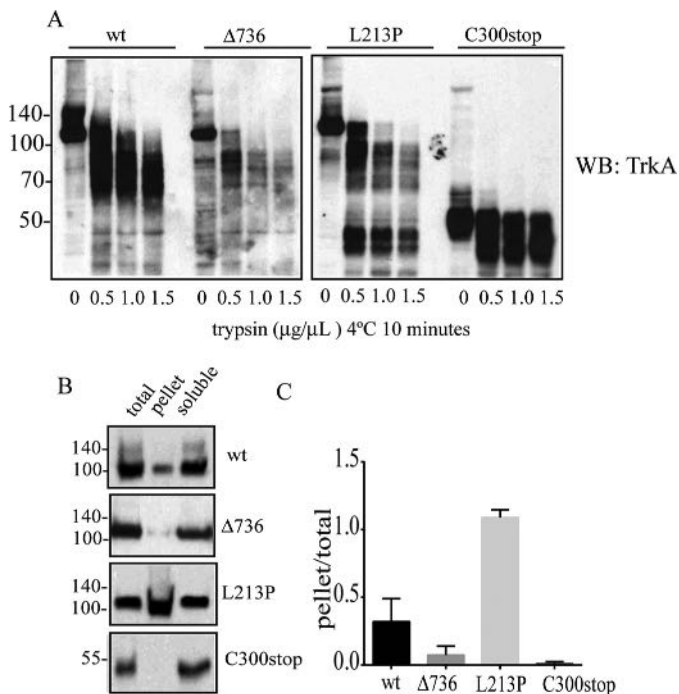


FIGURE 5. TrkA CIPA mutations induce protein misfolding and aggregation. *A*, trypsin digestion of Triton X-100-soluble fractions of TrkA mutants. Samples were incubated with the indicated concentrations of trypsin during 10 min on ice, quenched by adding SDS-PAGE sample buffer (2 times), boiled, and analyzed by SDS-PAGE/immunoblot with a specific antibody against the extracellular region of TrkA. *B*, analysis of disease protein solubility in the non-ionic detergent Triton X-100. Cell extracts were prepared in lysis buffer supplemented with 1% Triton X-100. Total, pellet, and supernatant were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. *C*, the ratio of pellet to total (pellet/total) was quantified for two independent experiments. *Error bars* are S.E. *WB*, Western blot.

heximide chase experiment (Fig. 6A). We found that TrkA-L213P ($t_{1/2} = 26$ h) is degraded to a slower rate than TrkA-wt ($t_{1/2} = 4.5$ h) suggesting a long-lived protein, probably due to the formation of aggregates. TrkA-C300stop ($t_{1/2} = 0.7$ h) is degraded faster than TrkA-wt, indicating a very unstable conformer (Fig. 6B) and TrkA-Δ736 ($t_{1/2} = 6.5$ h) is degraded to a similar rate as TrkA-wt (Fig. 6B). We then tested the degradation pathways of TrkA mutants using inhibitors of the proteasome or the autophagy (Fig. 6C). HeLa cells were transfected with the constructs that encode the different mutant TrkA, and treated with: epoxomycin, a proteasome inhibitor; wortmannin, an inhibitor of autophagosome formation; rapamycin, an inducer of autophagy; or compound E, an inhibitor of the γ -secretase complex (Fig. 6, C and D). All TrkA constructs showed resistance to degradation in the presence of wortmannin, indicating they are degraded mainly by the autophagy/lysosome pathway (Fig. 6, C and D). However, epoxomycin had a significant effect in the accumulation of the mutant TrkA-Δ736, suggesting that some pools of this mutant are also degraded by the proteasome. TrkA-L213P is a long-lived protein and even after 9 h some pools were still present implying a resistance of this construct to be degraded or a dysfunction of the degradation pathways in these cells.

TrkA-L213P Enhance the Formation of Autophagic Vesicles—HeLa cells were transfected with the TrkA mutants and with a plasmid encoding the fusion between microtubule-associated

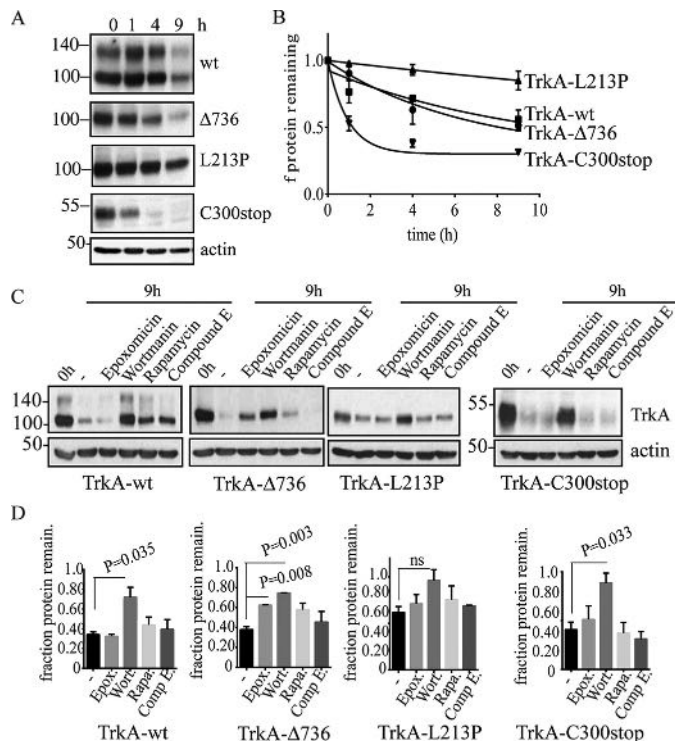


FIGURE 6. TrkA constructs have different degradation kinetics and differential sensitivity to proteasome and lysosome inhibitors. *A*, Western immunoblots of a representative experiment showing the levels of TrkA after protein translation inhibition with cycloheximide during the indicated time points. *B*, protein turnover half-lives of TrkA mutants were determined by quantifying the remaining levels of TrkA protein normalized to the actin blot. Three independent experiments consisting of independent transfections were performed. Data points were adjusted to a one exponential decay curve (black line) using GraphPad Prism software to calculate the half-lives times of each TrkA construct. *C*, Western blot analysis of cycloheximide treatment for 9 h and the sensitivity of the different TrkA constructs to the indicated inhibitors. *D*, fraction of the total protein remaining after 9 h. The values were normalized to time 0 h (1.0). Quantification of at least three independent experiments was quantified. *Errors bars* are S.E. *p* values are shown on the graph. *t* test compared with the control (-). *ns*, not significant.

protein light chain 3 (LC3) and GFP, LC3-GFP, to evaluate the formation of autophagosome vesicles (AVs). Green fluorescent AVs were observed in the cells from all constructs (Fig. 7A). We did not observe a significant difference in the number of autophagosomes between TrkA-wt and Δ736 and C300stop constructs (Fig. 7B). However, we observed a significant increase in the number of GFP-positive AVs into the cells transfected with L213P (Fig. 7, A and B). The presence of large and abundant autophagosomes could be caused by a disruption of the autophagy flux, due to enhanced autophagosome synthesis or reduced autophagosome turnover (45). To test if L213P is influencing the autophagic flux we co-transfected HeLa cells with L213P and LC3-GFP and stimulated them with wortmannin, which prevents autophagosome formation, and with Bafilomycin A1 (BafA1), which inhibits the fusion between lysosomes and the autophagosome (Fig. 7C). Wortmannin treatment significantly reduced the number of AVs (Fig. 7, C and D), suggesting an efficient degradation of the AVs in L213P-transfected cells. This together with the observation that BafA1 induces the accumulation of more AVs (Fig. 7, C and D) suggests that L213P is not disrupting the degradation of the autolysosomes *per se* but that L213P enhances the formation of AVs disrupting the

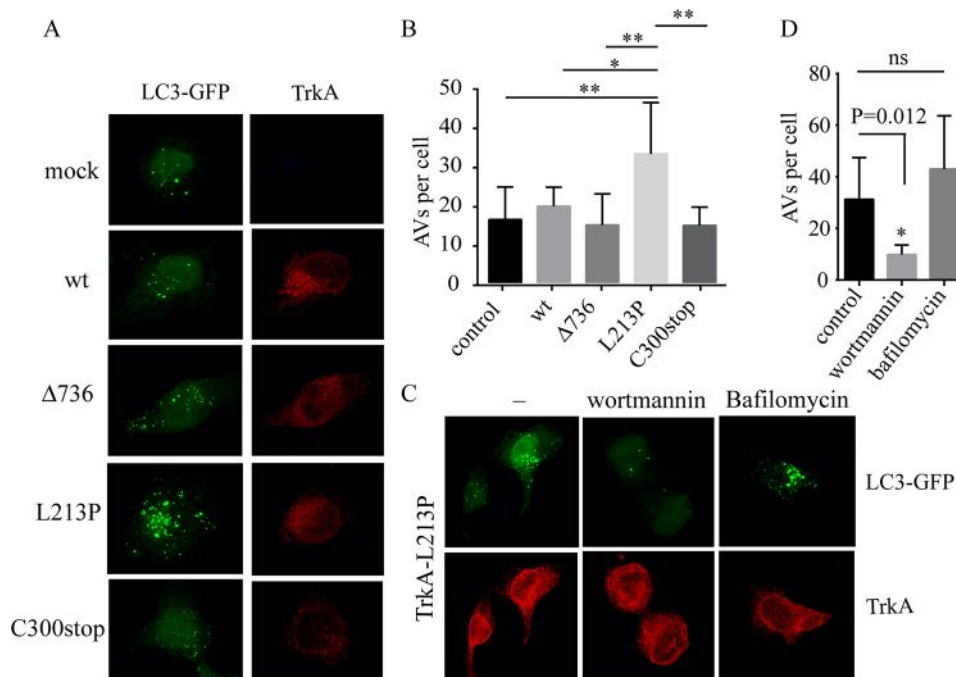


FIGURE 7. TrkA CIPA mutants induce the autophagic flux. *A*, HeLa cells were co-transfected with mock vector and the indicated TrkA constructs with LC3-GFP. A composite of confocal microscopy images for the channel *green* (LC3-GFP) and *red* (TrkA) is shown. *B*, the presence of green puncta indicative of AVs was quantified and plotted as the number of AVs per cell. *C*, HeLa cells co-transfected with TrkA-L213P and LC3-GFP were mock, wortmannin, and bafilomycin stimulated for 6 h, fixed, and analyzed by confocal microscopy. The number of green puncta of at least 20 cells was plotted in *D*. Error bars are S.E. *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. One-way analysis of variance test with Tukey's multiple comparisons test (*B*) and *t* test (*D*) was compared with control.

normal autophagy flux saturating their degradation and leading to an aberrant accumulation of AVs in the L213P cells.

TrkA Mutants Causing CIPA Induce Different Levels of Cell Toxicity—Given that a delayed degradation, an accumulation of misfolded proteins in the ER, and disruption of the autophagic flux can trigger cell toxicity, we examined whether the expression of TrkA mutants induced cell toxicity (Fig. 8). To evaluate this possibility we first transfected PC12nnr5 cells with all the TrkA constructs and quantified cell death. To increase ER stress and further challenge the cells, we added 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tunicamycin. Tunicamycin induces ER stress by blocking glycosylation and ER retention. The addition of tunicamycin induces a faster migration in the SDS-PAGE of all TrkA constructs, indicating impairment in the glycosylation pathway (Fig. 8A). Cell death assays analyzed by flow cytometry revealed that TrkA-L213P and, to a lower extent, TrkA- $\Delta 736$, mutations increased basal cell toxicity, compared with cells transfected with constructs encoding TrkA-wt and TrkA-C300stop (Fig. 8B). The presence of tunicamycin significantly increased cell death caused by the expression of TrkA-L213P ($p = 0.015$, $n = 3$) and TrkA- $\Delta 736$ ($p = 0.003$, $n = 3$) (Fig. 8B). These results suggest that TrkA mutations causing CIPA differently increase the toxicity and vulnerability of cells to ER stress-induced cell death, pointing to mutation-specific cell toxicity.

TrkA CIPA Mutations Induce Dystrophic Neurites in Cortical Neurons—Autophagy has been reported to protect the neurons by eliminating dysfunctional organelles and aged aggregated proteins. We co-transfected TrkA-wt and L213P with LC3-GFP in mouse embryonic cortical neurons (E16–E17) and assessed for the presence of AVs (Fig. 9A). We found the presence of AVs in the dendrites and in the soma of neurons trans-

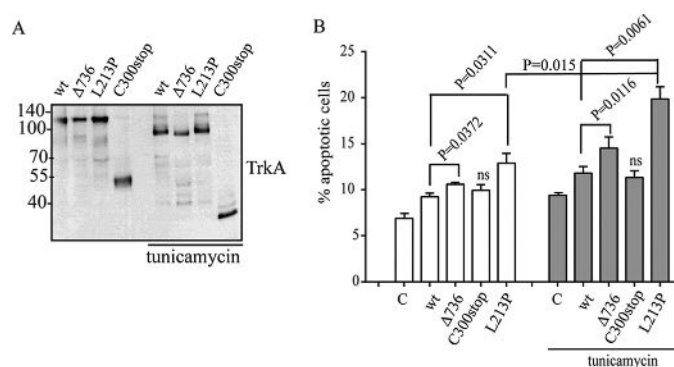


FIGURE 8. Cell toxicity of TrkA CIPA mutations in PC12nnr5 cells. Tunicamycin induces inhibition of protein glycosylation of all TrkA mutants. *A*, Western immunoblotting showing a decrease in the molecular weight due to inhibition of *N*-glycosylation of all the TrkA constructs upon tunicamycin treatment. *B*, percentage of PC12nnr5-transfected cells experimenting cell death (apoptotic cells) quantified by annexin V/propidium iodide. 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tunicamycin were added to increase the basal ER stress. Three independent experiments were quantified. Error bars are S.E. *p* values are shown on the graph. *t* test compared with the control (C) is shown. *ns*, not significant.

fected with L213P mutant (Fig. 9A) but not in neurons expressing TrkA-wt (Fig. 9A). This supports the role of TrkA-L213P in enhancing the autophagy inducing an accumulation of AVs that may underlay neuronal toxicity.

We then co-transfected mouse embryonic cortical neurons with TrkA-wt and TrkA-L213P together with a vector encoding GFP. 48 h after transfection we noticed the presence of swelling neurites in the neurons expressing L213P and not in TrkA-wt (Fig. 9, *B* and *C*). Swollen neurites have been described as a sign of neurodegeneration and synaptic loss in some neurodegenerative diseases (46). Altogether this indicates that

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

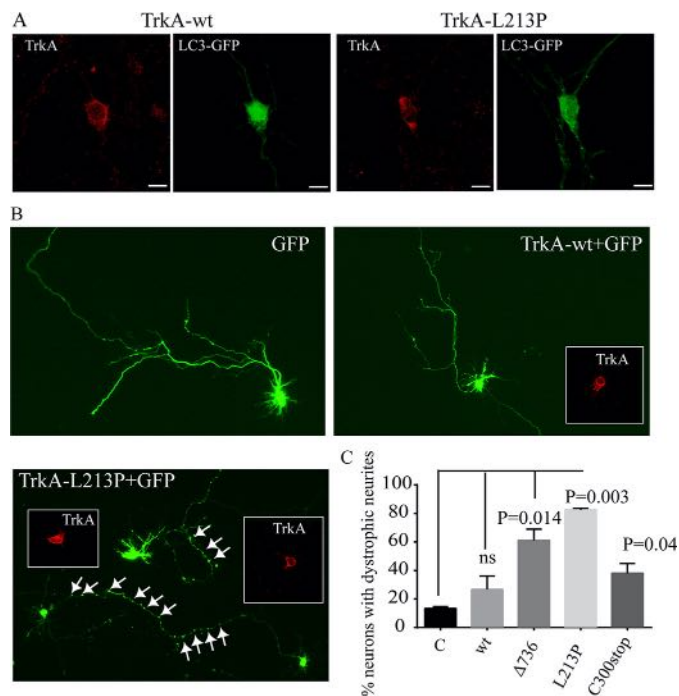


FIGURE 9. Presence of AVs and dystrophic neurites in L213P-transfected embryonic cortical neurons. *A*, embryonic cortical neurons were co-transfected with LC3-GFP and TrkA-wt or TrkA-L213P. 24 h post-transfection neurons were fixed and stained with TrkA antibody immunofluorescence (red). Several green positive AVs are observed in the soma and in the neurites of the neurons transfected with TrkA-L213P. *B*, E17 embryonic mouse cortical neurons were co-transfected with TrkA-wt and the CIPA mutants and GFP. Representative transfected neurons are shown. The presence of swollen regions in the neurites is indicated by white arrows. Inserts showed the TrkA staining. *C*, quantification of the percentage of transfected neurons bearing swollen regions. A positive neuron is counted if it has more than 10 swollen regions in the axon or in the neurites. Error bars are S.E. *p* values are shown on the graph. *t* test compared with the control (C) is shown. *ns*, not significant.

TrkA-L213P induce an increase in the formation of autophagosomes that causes cell toxicity and dystrophic neurites in neurons.

Discussion

In this work we characterize three mutations in TrkA causing CIPA. We analyzed the subcellular localization, degradation half-life times, misfolding, aggregation, and cellular toxicity in cells and in primary culture of neurons. Our data suggest that distinct TrkA mutations causing CIPA induce different conformers with different fates and toxicities. The new CIPA mutation TrkA-C300stop forms soluble misfolded conformers that are rapidly cleared by autophagy. When overexpressed in neurons TrkA-C300stop induces mild toxic effects. TrkA-L213P mutation induces TrkA misfolding, and retention in the ER. Some pools of TrkA-L213P form Triton X-100-insoluble aggregates and a delayed degradation. When expressed in cells this mutant significantly increased the formation of autophagic vesicles inducing swollen regions in neurons and sensitized PC12nnr5 cells to cell death induced by tunicamycin. The mutant TrkA-Δ736 shows an intermediate phenotype between C300stop and L213P.

Misfolding could potentially affect not only the specific function of the protein but it could also lead to aggregation and toxicity. Accumulation of misfolded proteins in the ER is

known to induce ER stress, which has also been implicated in human disease, including several neurodegenerative conditions (47–49). Our data suggest that some TrkA mutations increase the autophagic flux and this promotes toxicity and neurodegeneration. Disruption of the autophagy homeostasis can lead to cellular dysfunction and diseases. Moreover, excessively deregulated autophagy can also cause neurodegeneration. In CIPA the absence of pain sensation is due to the lack of nociceptor neurons by disruption of TrkA/NGF signaling during embryonic development. However, the molecular mechanism by which CIPA patients present intellectual disability, a problem that must be localized in the central nervous system, is still unknown. TrkA is expressed in the cholinergic neurons from the basal forebrain during brain development and in adulthood and probably in other neuron populations of the CNS. As TrkA mutations induce different levels of cell toxicity, we suggest they may play a role in exacerbating some of the symptoms of CIPA patients in the central nervous system like mental retardation.

We think that depending of the type of mutation in TrkA, a higher or lower toxicity is induced in the population of neurons that expressed TrkA in the CNS and this may provide an explanation to the variable mental retardation or ID seen in CIPA patients. The patient with the mutation C300stop described here has CIPA but according to his clinical history is mentally healthy. The mutation Δ736 was described by our group (Dr. Garcia-Barcina) in a girl that at that time (2011) was mentally healthy, but because our study suggest that Δ736 induce some toxicity in neurons a follow-up of her cognitive abilities are needed to validate if some neurodegeneration will appear in the future. TrkA-L213P was first described in 2001 in a boy but no clinical data about his mental status was reported (35, 36, 50). In 2003 another boy with CIPA carrying the same mutation, L213P, was diagnosed with speech problems indicative of mild ID (38), which agrees with a stronger toxicity in the neurons expressing L213P.

In addition, our data suggest that the expression of toxic aggregates of TrkA in the neurons could be detrimental to its survival or could sensitize them to a neurodegenerative process promoted by normal aging. Recently a study in Arab-Bedouins children addressed the ID issue in CIPA (51). A cohort of 22 children (2–21 years old) with CIPA, carrying the same TrkA mutation (1926-ins-T) and 19 age-matched healthy children were assessed and documented for cognitive and adaptive behaviors (51). The results showed an inverse correlation between intelligent quotient (IQ) and age among children with CIPA; the older the child with CIPA, the lower the IQ score deterioration. We think this may reflect a neurodegenerative process in the CNS caused by the TrkA mutation during brain maturation. However, an analysis with more mutations and a standardized value of ID is needed to fully validate this hypothesis.

Finally, several works have linked TrkA activity to enhanced autophagy and cell death (24–29). Although we used small amounts of TrkA in our transfections, we observed that overexpression of TrkA-wt is able to increase the autophagic flux to levels that are toxic to HeLa cells (data not shown). This finding is supported by early work demonstrating that TrkA-induced

cell death is dose-dependent (52) and that TrkA overexpression is able to trigger autophagy and apoptosis in glioblastoma (26) and in neuroblastoma cells (31), cancer cell lines where TrkA overexpression is of good prognosis. Furthermore, in medulloblastoma Daoy cells overexpression of TrkA induced cell death by micropinocytosis (28). Because in some of these systems the autophagy is activated in a ligand independent manner (30, 31, 53) or by TrkA inactivating mutations (this study) no kinase activity is necessary. One possibility is that TrkA protein by itself would be a specific target for autophagy receptors and able to nucleate the autophagosome formation. In this sense p62/sequestosome 1, one of the best characterized autophagy receptors (54), binds to TrkA and participates in TrkA degradation (55–57).

In summary our analysis indicates that different mutations in TrkA have different outcomes and this may provide an explanation for the variable phenotype seen in the CNS of CIPA patients. Although we do see significant differences between TrkA-wt and TrkA-L21P phenotypes, our studies are carried out by overexpressing the different constructs. We consider that generation of a mouse model of CIPA expressing endogenous levels of TrkA mutants is necessary to validate our hypothesis.

Experimental Procedures

Cell Lines—HeLa cells, a cell line derived from humans, were cultured in DMEM (Gibco) containing 10% fetal calf serum (ThermoFisher). PC12 and PC12nr5 cells were cultured in DMEM with 10% FBS and 5% horse serum. All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂.

Identification of the New NTRK1 Mutation pCys300stop—Written informed consent was obtained from the patient and all family members participating in this study. This research work was approved by the Ethical Committee of Basurto University Hospital, conforming to Helsinki Declaration. Blood samples were collected from all the family members available. Genomic DNA was purified using a standard “salting-out” purification protocol and its quality was assessed using a spectrophotometer. Mutation screening was performed in the index case. Primers for PCR amplification were designed for all 17 exons and intron-exon boundaries of the longest NTRK1 isoform (NM_002529.3) using the Primer3 on-line application. Primer sequences and optimal annealing temperature for each primer pair are available upon request. All PCR were carried out using TaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems) with 5% DMSO (Sigma). Direct sequencing of both strands of the amplified DNA fragments was performed using BigDye Terminator version 3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing reactions were resolved on ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer and analyzed using Sequence Scanner software (Applied Biosystems). The mutations described in this report are named following the recommendations from the Human Genome Variation Society.

In Vitro Site-directed Mutagenesis—To generate the constructs of the TrkA mutants a pair of selected oligonucleotides for each mutation was purchased from Sigma and the QuikChange mutagenesis kit (Agilent) was used following the commercial guidelines. Sequences of the oligonucleotides are as follows. For TrkA L213P, TrkA-L213Pfw, 5'-GGGGGATG-

ACGTTTTTCCGCAGTGCCAGGTGGAGG-3' and TrkA-L213P-rev, 5'-CCTCCACCTGGCACTGCGGAAAAACGT-CATCCCC-3'. For TrkA-C300STOP, a stop codon was introduced after the position Cys-300 of TrkA using the following pair of oligonucleotides; TrkA-C300fw, 5'-GGTGGA-GATGCACCACTGGTAAATCCCCTTCTCTGTGG-3' and TrkA-c300-rev, 5'-CCACAGAGAAGGGGATTTACCACT-GGTGCATCTCCACC-3'. For TrkA-Δ736, a deletion of seven residues in-frame was created using the following pair of oligonucleotides: TrkA-del736fw, 5'-TGGTACCAGCT-CTCCAACACTGAGGGCCGGGAGCTGGAGCGG-3' and TrkA-del736-rev, 5'-CCGCTCCAGCTCCCGGCCCTCAGTGTGGAGAGCTGGTACCA-3'. The plasmid DNA was sequenced using the local genomic facilities of ISCIII.

Stimulation of Cells with NGF—The mutant or the wild-type TrkA-transfected cells and mock-transfected cells as well as non-transfected cells were treated under the same conditions in a six-well tissue culture plate. The cells were washed three times with serum-free medium and incubated for 2 h in a serum-free medium. After the medium was aspirated, 1 ml of fresh serum-free medium containing 50 ng of NGF (Alomone) was followed by incubation at 37 °C at the different time points. The cells were then immediately washed three times with phosphate-buffered saline and lysed using TNE buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with Triton X-100 (Sigma) and a mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science) and phosphatase-like sodium orthovanadate (Na₃VO₄, Sigma) and sodium fluoride (NaF) (Sigma). Cells were harvested by scraping, transferred into a 1.5-ml tube, and collected by centrifuging at 12,000 × g for 5 min in a microcentrifuge. Supernatant was analyzed by SDS-PAGE or processed as indicated.

Immunoblotting—Primary antibodies used were as follows: a rabbit polyclonal antibody against TrkA (dilution 1:3000, 06-574 from Millipore) and two phospho-specific antibodies (TrkA(Tyr-490) 4619, dilution 1:1000, and TrkA(Tyr-674/675) 4621 dilution 1:1000 from Cell Signaling). Polyclonal anti-TrkA was used to directly detect total TrkA protein. The latter two phospho-specific antibodies were prepared to detect phosphorylated Tyr-490 and Tyr-674/675 residues. The membrane was incubated with the primary antibody diluted in TBS + 0.1% Tween 20 (Sigma) overnight at 4 °C. For detection we used ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) and exposure to x-ray film.

Trypsin Digestion and Triton X-100 Solubility Assay—Cell pellets were lysed for 1 h at 4 °C in TNE buffer supplemented with 1% Triton X-100, pH 7.5. Protein concentrations of lysate were determined using the Bradford assay (Bio-Rad) and normalized across all samples. An aliquot of lysate was removed for the trypsin digestion assay. The remaining lysate was subjected to centrifugation at 20,000 × g for 15 min at 4 °C. Supernatant was removed and added to 67 μl of 4× SDS-sample buffer with 1.25% β-mercaptoethanol. Pellet was solubilized with the same volume of 2× SDS-sample buffer with 1.25% β-mercaptoethanol.

Trypsin digestion assays were performed by incubating the soluble lysate with three increasing concentrations of trypsin in PBS and on ice for 5 min. The reaction was stopped by adding 2× SDS-PAGE sample buffer and boiled for 10 min.

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

Cell Surface Biotinylation Assay—Transfected cells with the indicated TrkA constructs were washed sequentially using room temperature PBS and cold PBS, chilled on ice, and incubated in 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce) dissolved in biotinylation buffer (PBS, 1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2) for 20 min at 4 °C to label the membrane proteins. Free biotin was quenched with 0.1 M glycine for 15 min at 4 °C. Cells were then washed twice with cold PBS and lysed as indicated above. Biotinylated proteins were isolated from the total cell lysate by immobilization on NeutroAvidin beads (Pierce) overnight at 4 °C. Beads were washed three times with lysis buffer and 20 μl of 2 \times SDS sample buffer was added before boiling for 7 min. Proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with HA antibodies to detect TrkA.

Cycloheximide Treatment and Half-life Calculations—HeLa cells were transfected with 1 μg of empty vector (control) or the indicated TrkA mutants. 48 h post-transfection, cells in a 6-well plate were incubated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide in the presence and absence of 15 μM chloroquine or 10 μM epoxomycin. Cells were harvested in TNE lysis buffer $t = 0, 1, 4,$ and 9 h post-cycloheximide. The half-lives were calculated using the values obtained from densitometry of Western blots using ImageQuant (Molecular Dynamics) software. Values were fit to the half-life decay equation using GraphPad Prism software to an exponential regression of the form: $N(t) = N(0 \text{ h}) \times e^{-\lambda t}$. λ is the decay constant. Half-lives ($t_{1/2}$) were calculated using the equation $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$.

Confocal Microscopy—HeLa cells were grown and transfected on sterile coverslips. Thirty-six h post-transfection, coverslips were removed from media and fixed with 4% paraformaldehyde. Coverslips were washed 3 times in PBS, and 100 μl of blocking buffer (PBS with 1% FBS) were added on coverslips for 1 h. Blocking buffer was aspirated and replaced with primary antibody (rabbit anti-calnexin C5C9, number 2679 from Cell Signaling, dilution 1:500; rabbit anti-giantin number ab80864 from Abcam, dilution 1:1000; and mouse anti-HA antibody number H3663 from Sigma, dilution 1:2000) diluted in blocking buffer for 1 h. Primary antibody was then aspirated, coverslips were washed three times, and secondary antibody (anti-mouse Ig Alexa 555, number A31570 Invitrogen, anti-rabbit Ig Alexa 488 number A21206, Invitrogen) diluted in blocking buffer with DAPI stain was added. After 1 h, the solution was aspirated and coverslips were washed three times with PBS, and mounted onto slides using mounting media. Slides were allowed to dry in the dark at room temperature for at least 12 h before imaging. Cells were imaged using a Leica SP5 spectral confocal microscope. Pearson's coefficient of co-localization was calculated using Leica software with at least five different cells from each experiment.

Cell Viability and Apoptosis Assay—PC12nnr5 were transfected with the indicated constructs. 48 h after transfection, cells were lifted in PBS and analyzed by annexin V/propidium iodide apoptosis assay by flow cytometry. Propidium iodide and annexin V-FITC were used to discriminate between apoptotic and necrotic cells. According to the manufacturer's instructions, cells were incubated with the reagent for 20 min at room temperature in the dark and then analyzed via flow cytometry using a MACSQuant Analyzer cytometer (Miltenyi Biotec).

Embryonic Cortical Neurons Culture Methods—E16–E17 mice cortex was dissected. Briefly whole cortices from three embryos were collected in a Petri dish containing Hanks' balanced salt solution. After carefully removing the meninges, the tissue was divided into cortical hemispheres, dissected, and the non-cortical structures were removed. Then cortical tissue was digested in 1 ml of 2.5 mg/ml of trypsin and 0.5 ml of 200 units/ml of DNase I, incubated for 10 min at 37 °C and turned twice. The supernatant was removed and after that, the pellet was suspended in 0.5 ml of 4% BSA, 1 ml of NB/B-27. The solutions must be cold all the time. The tissue was disaggregated with a pipette until tissue was completely dispersed. 2.5 ml of 4% BSA was added in the bottom of the tube and the dissociated cell suspension was centrifuged at 200 $\times g$ for 5 min. The supernatant was replaced with 5 ml of 0.2% BSA in PBS. The cell suspension was passed through a 40- μm nylon filter. Viable cells were counted using trypan blue. After cells were counted, cells suspension was centrifuged again at 200 $\times g$ for 5 min and the supernatant replaced with plating medium (NB medium with B-27 supplement and 2 mM L-glutamine and 0.5% penicillin-streptomycin). Isolated cells were seeded onto cover slides of 24-well plates pre-coated with poly-D-lysine (100 $\mu\text{g/ml}$) and laminin (5 $\mu\text{g/ml}$) at a density of 250,000 cells/well (2×10^5 cell/ cm^2). Neurons were allowed to adhere and recover. On the second day, half of the medium was replaced with fresh NB, B27, and 2 μM AraC. 4 days after, the cells were transfected.

Author Contributions—M.-L. F., C. M., P. A., I. C.-B., A. L., E. S., M. G.-B., and M. V. designed and performed the experiments. E. S. and M. G.-B. sequenced and identified the new mutation Cys300stop in a CIPA patient. M. V. designed and supervised the entire project and wrote the manuscript with the supervision of all the authors.

Acknowledgments—We acknowledge Dr. J. M. Rojas for the GFP-ras construct, Dr. F. Gonzalez the help in the confocal microscopy, Dr. M. Llovera for PC12nnr5 cells, and Dr. Y. Campos for the bafilomycin A1 reagent.

References

1. Indo, Y. (2010) Nerve growth factor, pain, itch and inflammation: lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Expert Rev. Neurother.* **10**, 1707–1724
2. Indo, Y. (2002) Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin. Auton. Res.* **12**, I20–32
3. Sztriha, L., Lestringant, G. G., Hertecant, J., Frossard, P. M., and Masouyé, I. (2001) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Pediatr. Neurol.* **25**, 63–66
4. Indo, Y., Tsuruta, M., Hayashida, Y., Karim, M. A., Ohta, K., Kawano, T., Mitsubuchi, H., Tonoki, H., Awaya, Y., and Matsuda, I. (1996) Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat. Genet.* **13**, 485–488
5. Lallemand, F., and Ernfors, P. (2012) Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.* **35**, 373–381
6. Marmigère, F., Montelius, A., Wegner, M., Groner, Y., Reichardt, L. F., and Ernfors, P. (2006) The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nat. Neurosci.* **9**, 180–187

7. Liu, Y., and Ma, Q. (2011) Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 52–60
8. Petruska, J. C., and Mendell, L. M. (2004) The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors. *Neurosci. Lett.* **361**, 168–171
9. Indo, Y. (2001) Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum. Mutat.* **18**, 462–471
10. Merulla, J., Fasana, E., Soldà, T., and Molinari, M. (2013) Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Traffic* **14**, 767–777
11. Brodsky, J. L. (2012) Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* **151**, 1163–1167
12. Liu, Y., and Ye, Y. (2012) Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 436–446
13. Araki, K., and Nagata, K. (2011) Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a007526
14. Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2010) Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 500–511
15. Vembar, S. S., and Brodsky, J. L. (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957
16. Senft, D., and Ronai, Z. A. (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 141–148
17. Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., and Imaizumi, K. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9220–9231
18. Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Dröge, W., Ffrench, M., and Terman, A. (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy* **1**, 131–140
19. Schneider, J. L., and Cuervo, A. M. (2014) Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 16–23
20. Morimoto, R. I., and Cuervo, A. M. (2014) Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, S33–38
21. Cuervo, A. M., and Wong, E. (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* **24**, 92–104
22. Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2015) Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* **125**, 65–74
23. Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014) Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 197–204
24. Bodnarchuk, T. W., Napper, S., Rapin, N., and Misra, V. (2012) Mechanism for the induction of cell death in ONS-76 medulloblastoma cells by Zhangfei/CREB-ZF. *J. Neurooncol.* **109**, 485–501
25. Dadakhujaev, S., Jung, E. J., Noh, H. S., Hah, Y. S., Kim, C. J., and Kim, D. R. (2009) Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death. *Autophagy* **5**, 103–105
26. Hansen, K., Wagner, B., Hamel, W., Schweizer, M., Haag, F., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007) Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J. Neurochem.* **103**, 259–275
27. Kaasinen, S. K., Harvey, L., Reynolds, A. J., and Hendry, I. A. (2008) Autophagy generates retrogradely transported organelles: a hypothesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 625–634
28. Li, C., Macdonald, J. I., Hryciw, T., and Meakin, S. O. (2010) Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J. Neurochem.* **112**, 882–899
29. Mnich, K., Carleton, L. A., Kavanagh, E. T., Doyle, K. M., Samali, A., and Gorman, A. M. (2014) Nerve growth factor-mediated inhibition of apoptosis post-caspase activation is due to removal of active caspase-3 in a lysosome-dependent manner. *Cell Death Dis.* **5**, e1202
30. Jung, E. J., and Kim, D. R. (2011) Ectopic expression of H2AX protein promotes TrkA-induced cell death via modulation of TrkA tyrosine-490 phosphorylation and JNK activity upon DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 841–847
31. Jung, E. J., and Kim, D. R. (2008) Apoptotic cell death in TrkA-overexpressing cells: kinetic regulation of ERK phosphorylation and caspase-7 activation. *Mol. Cells* **26**, 12–17
32. Geetha, T., Jiang, J., and Wooten, M. W. (2005) Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol. Cell* **20**, 301–312
33. Arévalo, J. C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z. Y., Lee, F. S., and Chao, M. V. (2006) Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* **50**, 549–559
34. Sarasola, E., Rodríguez, J. A., Garrote, E., Arístegui, J., and García-Barcina, M. J. (2011) A short in-frame deletion in NTRK1 tyrosine kinase domain caused by a novel splice site mutation in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *BMC Med. Genet.* **12**, 86
35. Mardy, S., Miura, Y., Endo, F., Matsuda, I., and Indo, Y. (2001) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 179–188
36. Mardy, S., Miura, Y., Endo, F., Matsuda, I., Sztriha, L., Frossard, P., Moosa, A., Ismail, E. A., Macaya, A., Andria, G., Toscano, E., Gibson, W., Graham, G. E., and Indo, Y. (1999) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1570–1579
37. Miranda, C., Di Virgilio, M., Sella, S., Zanotti, G., Pagliardini, S., Pierotti, M. A., and Greco, A. (2002) Novel pathogenic mechanisms of congenital insensitivity to pain with anhidrosis genetic disorder unveiled by functional analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase type 1/nerve growth factor receptor mutations. *J. Biol. Chem.* **277**, 6455–6462
38. Bonkowsky, J. L., Johnson, J., Carey, J. C., Smith, A. G., and Swoboda, K. J. (2003) An infant with primary tooth loss and palmar hyperkeratosis: a novel mutation in the NTRK1 gene causing congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Pediatrics* **112**, e237–241
39. Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2424–2428
40. Loeb, D. M., Maragos, J., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., Parada, L. F., and Greene, L. A. (1991) The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* **66**, 961–966
41. Schecterson, L. C., Hudson, M. P., Ko, M., Philippidou, P., Akmentin, W., Wiley, J., Rosenblum, E., Chao, M. V., Halegoua, S., and Bothwell, M. (2010) Trk activation in the secretory pathway promotes Golgi fragmentation. *Mol. Cell. Neurosci.* **43**, 403–413
42. Watson, F. L., Porcionatto, M. A., Bhattacharyya, A., Stiles, C. D., and Segal, R. A. (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* **39**, 323–336
43. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609–642
44. Houck, S. A., Ren, H. Y., Madden, V. J., Bonner, J. N., Conlin, M. P., Janovick, J. A., Conn, P. M., and Cyr, D. M. (2014) Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Mol. Cell* **54**, 166–179
45. Barth, S., Glick, D., and Macleod, K. F. (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* **221**, 117–124
46. Nixon, R. A. (2014) Alzheimer neurodegeneration, autophagy, and A β secretion: the ins and outs (comment on DOI 10.1002/bies.201400002). *Bioessays* **36**, 547
47. Matus, S., Lisbona, F., Torres, M., León, C., Thielen, P., and Hetz, C. (2008) The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr. Mol. Med.* **8**, 157–172
48. Doyle, K. M., Kennedy, D., Gorman, A. M., Gupta, S., Healy, S. J., and Samali, A. (2011) Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2025–2039
49. Gestwicki, J. E., and Garza, D. (2012) Protein quality control in neurodegenerative disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **107**, 327–353
50. Indo, Y., Mardy, S., Miura, Y., Moosa, A., Ismail, E. A., Toscano, E., Andria, G., Pavone, V., Brown, D. L., Brooks, A., Endo, F., and Matsuda, I. (2001) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): novel mutations

Misfolded TrkA Induce Protein Aggregation and Cell Toxicity

- of the TRKA (NTRK1) gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant TRKA and PKLR genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency. *Hum. Mutat.* **18**, 308–318
51. Levy Erez, D., Levy, J., Friger, M., Aharoni-Mayer, Y., Cohen-Iluz, M., and Goldstein, E. (2010) Assessment of cognitive and adaptive behaviour among individuals with congenital insensitivity to pain and anhidrosis. *Dev. Med. Child Neurol.* **52**, 559–562
52. Yan, C., Liang, Y., Nylander, K. D., and Schor, N. F. (2002) TrkA as a life and death receptor: receptor dose as a mediator of function. *Cancer Res.* **62**, 4867–4875
53. Jung, E. J., and Kim, D. R. (2010) Control of TrkA-induced cell death by JNK activation and differential expression of TrkA upon DNA damage. *Mol. Cells* **30**, 121–125
54. Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., and Dikic, I. (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* **20**, 21–30
55. Wooten, M. W., Seibenhener, M. L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M. T., Barker, P. A., and Moscat, J. (2001) The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF- κ B activation by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 7709–7712
56. Geetha, T., Seibenhener, M. L., Chen, L., Madura, K., and Wooten, M. W. (2008) p62 serves as a shuttling factor for TrkA interaction with the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 33–37
57. Wooten, M. W., Geetha, T., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 6783–6789