



**Universitat de Lleida**

**Señalización por TrkB y Ret: vías implicadas en la supervivencia y diferenciación neuronal**

Mario Encinas Martín

Lleida, Febrero 2001

## RESUM

La gènesi i manteniment del sistema nerviós estan regulats per una sèrie de factors neurotròfics, d'entre els quals destaquen les neurotrofines (NGF, BDNF, NT-3 i NT-4/5) i els lligands de la família del GDNF o GFLs (GDNF, NRTN, PSPN i ARTN). Durant els darrers anys, s'han anat caracteritzant les cascades de senyalització intracel·lular responsables dels efectes biològics exercits per aquests factors, amb especial atenció a l'NGF i les vies MEK/MAPK i PI 3-K/Akt, dues de les millors caracteritzades. En aquest treball s'han analitzat les vies de traducció de senyal engegades per TrkB (el receptor de BDNF i NT-4/5) i Ret (el component comú del receptor per a tots els GFLs) i la seva participació en els processos de supervivència i creixement neurític en diversos paradigmes experimentals. En el cas de TrkB, i utilitzant com a model cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y pre-tractades amb àcid retinoïc (RA), s'ha determinat que la via PI3-K/Akt és el principal mitjançador de la supervivència cel·lular, mentre que la via MEK/MAPK és necessària per als processos de creixement neurític. A més, s'ha caracteritzat el fenotip de les cèl·lules SH-SY5Y pre-tractades amb RA i exposades durant temps llargs a BDNF, tot observant-se que aquestes es diferencien cap a un fenotip neuronal, expressant diversos marcadors neuronals específics i restant aturades en la fase G1 del cicle cel·lular. En el cas de Ret, s'ha observat que l'activitat PI 3-K és necessària per a la supervivència de motoneurons espinals de pollastre, neurones granulars del cerebel i neurones del gangli cervical superior, mentre que la via MEK/MAPK no sembla ésser important en els processos de supervivència. A més, c-Src sembla ser un mitjançador important en la senyalització per GFLs, estant implicat tant en la supervivència (actuant per sobre de PI 3-K) i el creixement neurític. La implicació de c-Src en aquests processos, a més, podria ser específica dels GFLs, donat que aquesta proteïna no sembla estar implicada en la supervivència induïda per NGF.

## RESUMEN

La génesis y mantenimiento del sistema nervioso están regulados por una serie de factores neurotróficos, de entre los que destacan las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5) y los ligandos de la familia del GDNF o GFLs (GDNF, NRTN, PSPN y ARTN). Durante los últimos años, se han ido caracterizando las cascadas de señalización intracelular responsables de los efectos biológicos ejercidos por estos factores, con especial atención al NGF y las vías MEK/MAPK y PI 3-K/Akt, dos de las mejores caracterizadas. En el presente trabajo se han analizado las vías de traducción de señal iniciadas por TrkB (el receptor de BDNF y NT-4/5) y Ret (el componente común del receptor para todos los GFLs) y su participación en los procesos de supervivencia y crecimiento neurítico en diversos paradigmas experimentales. En el caso de TrkB, y utilizando como modelo células de neuroblastoma humano SH-SY5Y pretratadas con ácido retinoico (RA), se ha determinado que la vía PI3-K/Akt es el principal mediador de la supervivencia celular, mientras que la vía MEK/MAPK es necesaria para los procesos de crecimiento neurítico. Además, se ha caracterizado el fenotipo de las células SH-SY5Y pretratadas con RA y expuestas durante tiempos largos a BDNF, observándose que éstas se diferencian hacia un fenotipo neuronal, expresando varios marcadores neuronales específicos y quedando detenidas en la fase G1 del ciclo celular. En el caso de Ret, se ha observado que la actividad PI 3-K es necesaria para la supervivencia de motoneuronas espinales de pollo, neuronas granulares del cerebelo y neuronas del ganglio cervical superior, mientras que la vía MEK/MAPK no parece ser importante en los procesos de supervivencia. Además, c-Src parece ser un mediador importante en la señalización por GFLs, estando implicado tanto en la supervivencia (actuando por encima de PI 3-K) y el crecimiento neurítico. La implicación de c-Src en estos procesos, además, podría ser específica de los GFLs, dado que esta proteína no parece estar implicada en la supervivencia mediada por NGF.

## **ABSTRACT**

The generation and maintenance of the nervous system is regulated by a series of neurotrophic factors that include the neurotrophins (NGF, BDNF, NT-3, and NT-4/5) and the GDNF family ligands (GFLs; GDNF, NRTN, PSPN, and ARTN). During the last years, the signaling cascades responsible for the biologic effects exerted by these factors are being characterized, with special attention to NGF and MEK/MAPK and PI 3-K/Akt pathways. In this work we have analyzed the transduction pathways engaged by TrkB (the receptor for BDNF and NT-4/5) and Ret (the common component of the receptor for GFLs) and their involvement in the processes of survival and neurite outgrowth in several experimental paradigms. Using SH-SY5Y human neuroblastoma cells pre-treated with retinoic acid (RA) as a model system, we have determined that PI 3-K/Akt pathway is necessary for TrkB-induced survival, whereas MEK/MAPK pathway is necessary for neurite outgrowth. Moreover, we have characterized the phenotype of these cells after sequential RA pre-treatment and long-term BDNF exposure. Cells treated in that way differentiate towards a neuronal phenotype, express several neuronal markers, and are arrested at the G1 phase of the cell cycle. We have also observed that PI 3-K/Akt, but not MEK/MAPK pathway, is necessary for Ret-mediated survival in chicken spinal cord motor neurons, as well as in rat cerebellar and sympathetic neurons. Moreover, c-Src appears to mediate GFLs signaling, being involved in both neuronal survival (acting upstream of PI 3-K) and neurite outgrowth. The involvement of c-Src in such processes seems to be specific for GFLs, since this kinase is not needed for NGF-mediated survival.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Drs. Joan X. Comella y Montse Iglesias, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por su dedicación en la dirección de la misma, y por compartir conmigo su visión de la ciencia. Por todas esas cosas que se dicen y que, además, en este caso son ciertas. Pero sobretodo, por su amistad.

A mis amigos del grupo de Neurobiología Molecular, por haber estado allí en todo momento (incluso los Domingos): Xavi Dolcet (Dulcito), Joaquim Egea (Pollo), Victor Yuste (Vitorino), José Ramón Bayascas (Jose). A los "seniors" del grupo, que, aunque con un horario más relajado, también han estado allí: Rosa M. Soler, Carme Espinet y Jacint Boix. También a la gente con la que empecé, que han pasado a mejor vida (en sentido literal, ojo), Núria Llecha y Meritxell Guerrero.

Al Dr. Eugene M. Johnson, Jr., por haberme permitido realizar parte de este trabajo en su laboratorio, y por mostrarme su visión única de la ciencia. También a los compañeros del Department of Molecular Biology and Pharmacology de la Washington University en St Louis, en especial a Malú "pendeja" Tansey, Girish V. Putcha, Monu Deshmukh, Brian Tsui-Pierchala y Charlie Harris, por hacer mi estancia allí muy agradable. También a Patricia Osborne "PAKO", por enseñarme involuntariamente una variada colección de "palabros" en su lengua materna. Y a Marga y Carolina Behrens, por su hospitalidad y sus partidas de "chess".

Al Dr. Dionisio Martín-Zanca, por sus "generous gifts", y por dejarnos compartir con él una semana de trabajo en Salamanca, estación MIR incluida.

A toda la gente del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, en especial a los Drs. Josep Esquerda, Martí Aldea y Carme Gallego, por compartir su experiencia conmigo.,

A Isu Sánchez, Roser Pané y Imma Montoliu, técnicas del laboratorio, por hacernos nuestro trabajo más fácil, a pesar de las (esporádicas) broncas y "seminarios de política", ejem. También a Montse Comella, por alegrarnos la vista con su excelente labor administrativa, y por sacarnos de más de un apuro a los despistados alumnos de tercer ciclo.

A las jóvenes promesas del grupo, por orden de aparición: Carme, Miquel, Mari Puri, Yolanda y Miracle. Ánimo, todavía estáis a tiempo de dejarlo!!!!

A la gente de Medicina que me ha tenido que soportar durante estos años, Tarek (el breve), Remei, Fernando (automáticamente), Mari, "los Manolos" (a por la novena!), Emeterio, Víctor Palomar (Palomino), Vishal Sahani (Pisha) y un largo etcétera.

A la "gent del barri", José Antonio, Quique, José Ramón y Vazquecillos, por llevar tan bien mi ausencia de Barcelona durante estos años. También a la peña "Ciges", orgullo del tercer mundo: Toni (el desaparecido), Sebas, David Madero (ahora sí), Gallego y Pequeñín, Pedrito, Sergio(s), Fernando. A los porteros del Karma por ser tan amables conmigo, y al ideólogo del Penta por su "savoir faire". A la gente del Rastro por su buen rollo.

A todos los que me dejo y a aquellos que nunca pasarán de aquí cuando empiecen a leer esta tesis, tenéis mi comprensión y beneplácito.

A mi familia, por todo.

## ÍNDICE

---

<b>1. Índice</b>	1
<b>2. Abreviaturas</b>	5
<b>3. Resumen</b>	7
<b>4. Objetivos</b>	9
<b>5. Introducción</b>	11
<b>5.1. Muerte celular programada en el sistema nervioso:</b>	
Teoría Neurotrófica	12
<b>5.2. Apoptosis</b>	15
<b>5.2.1. Activación de caspasas por receptores de superficie celular</b>	17
<b>5.2.2. Activación de caspasas por la vía mitocondrial</b>	17
<b>5.3. Las neurotrofinas</b>	20
<b>5.3.1. Los receptores Trk</b>	20
<b>5.3.2. Los ratones knockout para las neurotrofinas y sus receptores</b>	23
<b>5.3.3. Vías de señalización activadas por Trk</b>	26
<b>5.3.3.1. Autofosforilación del receptor</b>	26
<b>5.3.3.2. Shc activa Ras mediante el complejo Grb2/Sos</b>	27
<b>5.3.3.3. PLC<math>\gamma</math></b>	29
<b>5.3.3.4. SNT y FRS2</b>	29
<b>5.3.3.5. PI 3-K</b>	30
<b>5.3.3.6. Otras moléculas involucradas en la señalización por Trk</b>	31
<b>5.3.3.7. La vía MEK/MAPK</b>	31
<b>5.3.3.8. La vía PI 3-K/Akt</b>	34
<b>5.4. Los ligandos de la familia del GDNF (GFLs)</b>	38
<b>5.4.1. Los receptores: un complejo multiproteico</b>	39

<b>5.4.2.</b> Interacciones cruzadas entre GFLs y GFR $\alpha$ s	41
<b>5.4.3.</b> Vías de señalización activadas por Ret	42
<b>5.4.4.</b> Señalización independiente de Ret	44
<b>5.4.5.</b> Los ratones knockout para los GFLs y sus receptores	45
<b>5.5.</b> Vías de señalización intracelular implicadas en la supervivencia neuronal	49
<b>5.5.1.</b> Ras es un mediador de la supervivencia neuronal	49
<b>5.5.2.</b> La vía PI-3 K/Akt y la supervivencia neuronal	49
<b>5.5.2.1.</b> Bad	51
<b>5.5.2.2.</b> Caspasa 9	52
<b>5.5.2.3.</b> FKHRL1	53
<b>5.5.2.4.</b> GSK3 $\beta$	54
<b>5.5.3.</b> La vía MEK/MAPK y la supervivencia neuronal	55
<b>5.5.4.</b> La vía MEK/MAPK y la diferenciación neuronal	56
<b>6. Resultados</b>	59
<b>6.1.</b> Las ERK MAPKs y la PI 3-K regulan la neuritogénesis y supervivencia de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y	60
<b>6.2.</b> El tratamiento secuencial con ácido retinoico y BDNF da lugar a células con fenotipo neuronal dependientes de BDNF	74
<b>6.3.</b> La supervivencia de las motoneuronas espinales de pollo mantenidas con GFLs está mediada por PI 3-K	88
<b>6.4.</b> c-Src media la supervivencia inducida por GFLs a través de un mecanismo dependiente de PI 3-K	99
<b>7. Discusión</b>	139
<b>7.1.</b> Aparición de TrkB y TrkC funcionales en células SH-SY5Y pretratadas con ácido retinoico	139
<b>7.2.</b> Efectos del RA y el suero sobre el fenotipo de las células SH-SY5Y	140

---

7.3. MAPK y supervivencia mediada por TrkB	141
7.4. MAPK y diferenciación neuronal mediada por TrkB	143
7.5. PI 3-K y supervivencia neuronal mediada por TrkB	144
7.6. Efectos del tratamiento con RA y BDNF sobre el ciclo celular	145
7.7. Ret y supervivencia	147
7.8. Src y supervivencia	148
<b>8. Conclusiones</b>	<b>150</b>
<b>9. Comunicaciones a congresos</b>	<b>154</b>
<b>10. Publicaciones</b>	<b>157</b>
<b>11. Bibliografía</b>	<b>159</b>

## **ABREVIATURAS**

---

<b>ARTN</b> Artemin	<b>NGF</b> Nerve growth factor
<b>BDNF</b> Brain-derived neurotrophic factor	<b>NRTN</b> Neurturin
<b>DRG</b> Dorsal root ganglion	<b>NSE</b> Neuron-specific enolase
<b>EGF</b> Epidermal growth factor	<b>NT-3</b> Neurotrophin-3
<b>ERK</b> Extracellular-regulated kinase	<b>NT-4/5</b> Neurotrophin-4/5
<b>FGF</b> fibroblast growth factor	<b>PCD</b> Programmed cell death
<b>FMTC</b> Familial medullary thyroid carcinoma	<b>PDGF</b> platelet-derived growth factor
<b>FRS2</b> Fibroblast growth factor receptor substrate 2	<b>PDK</b> Phosphoinositide-dependent kinase
<b>GAP-43</b> Growth-associated protein-43	<b>PH</b> Pleckstrin homology domain
<b>GDNF</b> Glial cell line-derived neurotrophic factor	<b>PI 3-K</b> Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>GFR<math>\alpha</math></b> GDNF family receptor $\alpha$	<b>PKC</b> Protein kinase C
<b>GFAP</b> Glial fibrillary acidic protein	<b>PLC<math>\gamma</math></b> Phospholipase C-gamma
<b>GFLs</b> GDNF family ligands	<b>pRB</b> retinoblastoma gene susceptibility product
<b>GPI</b> Glycosylphosphatidyl inositol	<b>PSPN</b> Persephin
<b>IGF</b> Insulin-like growth factor	<b>PTB</b> Phosphotyrosine binding domain
<b>JNK</b> Jun N-terminal kinase	<b>PTC</b> papillary thyroid carcinoma
<b>MAP2</b> Microtubule-associated protein 2	<b>RA</b> Retinoic acid
<b>MAPK</b> Mitogen-activated protein kinase	<b>SCG</b> Superior cervical ganglion
<b>MEK</b> MAPK and ERK kinase	<b>SH2</b> Src homology domain 2
<b>MEN2</b> Multiple endocrine neoplasia 2	<b>SH3</b> Src homology domain 3
<b>NF-L,-M,-H</b> Neurofilaments of low, medium and high molecular weight	<b>Trk</b> Tropomyosin receptor kinase

## **RESUMEN**

La génesis y mantenimiento del sistema nervioso están regulados por una serie de factores neurotróficos, de entre los que destacan las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5) y los ligandos de la familia del GDNF o GFLs (GDNF, NRTN, PSPN y ARTN). Durante los últimos años, se han ido caracterizando las cascadas de señalización intracelular responsables de los efectos biológicos ejercidos por estos factores, con especial atención al NGF y las vías MEK/MAPK y PI 3-K/Akt, dos de las mejores caracterizadas. En el presente trabajo se han analizado las vías de traducción de señal iniciadas por TrkB (el receptor de BDNF y NT-4/5) y Ret (el componente común del receptor para todos los GFLs) en su participación en los procesos de supervivencia y crecimiento neurítico en diversos paradigmas experimentales. En el caso de TrkB, y utilizando como modelo células de neuroblastoma humano SH-SY5Y pretratadas con ácido retinoico (RA), se ha determinado que la vía PI3-K/Akt es el principal mediador de la supervivencia celular, mientras que la vía MEK/MAPK es necesaria para los procesos de crecimiento neurítico. Además, se ha caracterizado el fenotipo de las células SH-SY5Y pretratadas con RA y expuesta durante tiempos largos a BDNF, observándose que éstas se diferencian hacia un fenotipo neuronal, expresando varios marcadores neuronales específicos y quedando detenidas en la fase G1 del ciclo celular. En el caso de Ret, se ha observado que la actividad PI 3-K es necesaria para la supervivencia de motoneuronas espinales de pollo, neuronas granulares del cerebelo y neuronas del ganglio cervical superior, mientras que la vía MEK/MAPK no parece ser importante en los procesos de supervivencia. Además, c-Src parece ser un mediador importante en la señalización por GFLs, estando implicado tanto en la supervivencia (actuando por encima de PI 3-K) y el crecimiento neurítico. La implicación de c-Src en estos procesos, además, podría ser específica de los GFLs, dado que esta proteína no parece estar implicada en la supervivencia mediada por NGF.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo se centran básicamente en el análisis de las vías de señalización intracelular que median la supervivencia y diferenciación neuronales inducidos por TrkB y Ret, receptores miembros de dos familias de factores neurotróficos, las neurotrofinas y los ligandos de la familia del GDNF (GFLs). Los objetivos de esta tesis pueden ser clasificados así en dos bloques:

**Obtener y caracterizar un modelo experimental para el análisis de la señalización y los efectos biológicos mediados por TrkB.**

Dada la falta de líneas celulares que expresen constitutivamente TrkB, se pretende obtener y caracterizar un tratamiento *in vitro* que permita la obtención de grandes cantidades de células que presenten este receptor. Para ello se partirá de trabajos anteriores en los que se demuestra que el ácido retinoico es capaz de inducir la transcripción de *trkB* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se analizará la respuesta biológica de estas células a BDNF, el ligando mejor caracterizado de TrkB, a corto y largo plazo, así como las vías de señalización relevantes para los diferentes efectos biológicos.

**Caracterización de las vías de señalización implicadas en la mediación de supervivencia y diferenciación neuronales por GFLs.**

Recientemente se ha caracterizado una familia de factores neurotróficos estructuralmente relacionados con el GDNF, la denominada familia de ligandos del GDNF (GFLs). Se pretende analizar la respuesta de las motoneuronas espinales de pollo, un modelo experimental utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio, a estos factores. Asimismo, se analizarán las vías de señalización iniciadas por Ret relevantes para la mediación de los diferentes efectos biológicos de los GFLs en diferentes modelos experimentales, con especial atención al papel de las quinasas de la familia de Src, las cuales parecen estar implicadas en la señalización por Ret.

## **INTRODUCCIÓN**

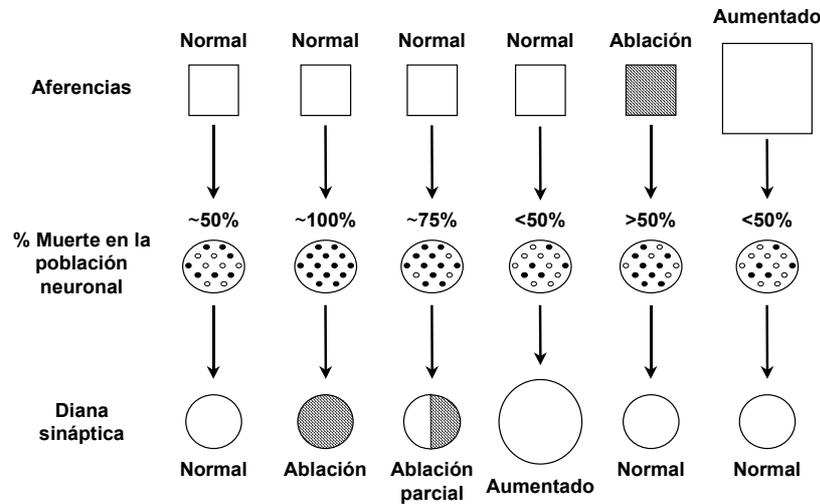
### **5.1. Muerte celular programada en el sistema nervioso: Teoría Neurotrófica**

El equilibrio dinámico entre los fenómenos de proliferación y muerte celular es imperativo para la homeostasis de los metazoos. Así como la proliferación está gobernada por una serie de pasos finamente regulados conocidos como ciclo celular, el organismo es capaz de eliminar células no deseadas mediante un programa bien establecido. El concepto de muerte celular como parte del desarrollo fisiológico del organismo, opuesto a una muerte puramente accidental, fruto de determinados insultos o condiciones patológicas, se evidenció ya durante el estudio de la metamorfosis de los anfibios, aunque ha cobrado gran relevancia en los últimos años. Así, el término muerte celular programada (PCD) se acuñó inicialmente para describir aquella muerte celular, de carácter más o menos masivo, que ocurre en lugares anatómicos concretos y en periodos de tiempo bien definidos durante la ontogenia. Dentro de esta definición se englobaría, por ejemplo, la eliminación de estructuras innecesarias durante procesos de metamorfosis (muerte metamórfica), la desaparición de órganos o tejidos vestigiales (muerte filogenética) o la creación de cavidades o estructuras específicas de la arquitectura de determinados órganos (muerte morfogenética). En el caso del sistema nervioso, aproximadamente la mitad de las neuronas inicialmente generadas se eliminan por PCD en periodos de tiempo bien definidos, coincidentes con el establecimiento de las conexiones sinápticas (revisado en Oppenheim et al., 1991). Este tipo de muerte, a la que nos referiremos como muerte neuronal fisiológica, fue inicialmente observada en los ganglios espinales, cervicales y torácicos del embrión de pollo durante los días 5 y 6 del desarrollo embrionario (E5-E6) por Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini (1949). Posteriormente se ha observado que virtualmente todas las poblaciones neuronales, tanto centrales como periféricas, experimentan un proceso de PCD, cuya magnitud varía entre el 20-80% de pérdida neuronal. Esta PCD se da durante diferentes estadios del desarrollo embrionario e incluso durante las primeras etapas de la vida postnatal. Se hipotetiza que la finalidad de la muerte neuronal fisiológica es la de ajustar numéricamente la

población neuronal al tamaño de su territorio de inervación, así como eliminar proyecciones erróneas o aberrantes (Oppenheim et al., 1991).

Estudios genéticos realizados con el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, han determinado la existencia de una serie de genes que parecen estar exclusivamente dedicados al proceso de muerte (Horvitz et al., 1982; Ellis and Horvitz, 1986). Posteriormente han sido identificados sus homólogos en mamíferos (Yuan et al., 1993; Hengartner and Horvitz, 1994). Estos hallazgos han ampliado el concepto de PCD a aquella muerte mediada por un programa intracelular controlado genéticamente, que se ha conservado a lo largo de la evolución. Actualmente se tiende a pensar que todos los procesos de muerte fisiológica, tanto en el recambio como durante la ontogenia, así como en muchas situaciones patológicas, están mediados por este programa de muerte. El concepto "programada" no implica que células específicas se vean irrevocablemente destinadas a morir, de una manera autónoma y dependiente únicamente de su linaje, si no que la decisión de que una célula determinada muera o no viene dada por la integración de diferentes señales provenientes de los tejidos circundantes. En este sentido, la magnitud de la muerte neuronal programada puede ser modificada experimentalmente aumentando o disminuyendo la cantidad de tejido diana potencialmente inervable (Figura 1) (Oppenheim, 1991; Burek and Oppenheim, 1996, Herrup and Sunter, 1987; Tanaka and Landmesser, 1986). Más recientemente se ha comprobado que no sólo el tejido diana participa en el control de la muerte neuronal fisiológica, sino que también lo hacen las aferencias, células gliales y otras células no diana (Okado and Oppenheim, 1984; Furber et al., 1987; Hamburger et al., 1981; Barde, 1989; Burek and Oppenheim, 1996).

La Teoría Neurotrófica postula, de esta manera, que los tejidos diana son capaces de sintetizar moléculas tróficas de manera limitante, por las cuales competirían las neuronas que proyectan sobre ellos. Sólo aquellas que accediesen a una cantidad suficiente de estas moléculas podrían sobrevivir, ajustándose así el número de neuronas inervantes a la cantidad de tejido diana (Barde, 1988, 1989; Oppenheim, 1989).



**Figura 1.** Ilustración esquemática de la regulación de la supervivencia neuronal por el tejido diana y por las aferencias durante la PCD. Los círculos negros en la parte central de la figura (población neuronal) representan las neuronas que están degenerando. Adaptado de Burek y Oppenheim (1996).

Esta hipótesis se confirmó con el aislamiento de la primera de estas moléculas con actividad neurotrófica, el NGF ("Nerve Growth Factor"). (Levi-Montalcini, 1987). El NGF permite la supervivencia de neuronas simpáticas, de una subpoblación de neuronas sensoriales, y de una población de neuronas colinérgicas de los núcleos de la base (Levi-Montalcini, 1987), de tal manera que su eliminación (Gorin y Johnson, 1979; Johnson et al., 1980; Levi-Montalcini, 1987;) o el bloqueo de su transporte retrógrado (Johnson, 1978; Yan et al., 1988) causa la muerte de éstas. De forma inversa, la administración de NGF exógeno atenúa la PCD de estas poblaciones neuronales (Oppenheim et al., 1982), indicando que el factor es producido en cantidades limitantes por los tejidos diana, en los cuales, efectivamente se han detectado niveles altos de NGF.

Pese a que la Teoría Neurotrófica explica de manera sencilla el fenómeno de muerte neuronal fisiológica, éste es un proceso mucho más complejo. En primer lugar, algunos de los fenómenos que regulan la supervivencia de las neuronas no toman la forma de factores neurotróficos. Así

por ejemplo, la actividad eléctrica de la neurona en desarrollo está también implicada en su supervivencia (Franklin and Johnson, 1992). En segundo lugar, se han descrito muchos factores que ejercen un efecto de supervivencia sobre las neuronas pero que no son factores que actúen estrictamente sobre el sistema nervioso. Este es el caso del EGF (Epidermal growth factor), el FGF (Fibroblast growth factor), el IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), el PDGF (Platellet-derived growth factor) o el CNTF (Cilliary neurotrophic factor). En tercer y último lugar, hoy sabemos que la PCD no sólo está regulada por la falta de factores tróficos sino también por la presencia de determinados factores inductores de muerte, como por ejemplo, los factores de la familia del TNF (Tumor Necrosis Factor) en la que se incluye el TNF, FasL y TRAIL (“TNF-related apoptosis inducing ligand”) (Nagata, 1997). Finalmente, en determinadas circunstancias los factores neurotróficos como el NGF son capaces de inducir muerte a través de receptores específicos como el p75<sup>NTR</sup>.

## 5.2. Apoptosis

El término apoptosis se refiere a un tipo de muerte que fue definida en un principio sobre la base de parámetros morfológicos, en contraposición a la necrosis (Kerr et al., 1972). La muerte celular debida a lesiones agudas, durante las cuales se produce un alejamiento drástico de las condiciones fisiológicas, se conoce como muerte necrótica. Ésta se caracteriza por un aumento del volumen de la célula, seguido de una ruptura de la envoltura celular y los orgánulos, con el consiguiente vertido del contenido intracelular que provoca frecuentemente inflamación. Por el contrario, la apoptosis conlleva un encogimiento de la célula y una condensación nuclear (picnosis) mientras que la membrana plasmática y los orgánulos se mantienen intactos. Estos cambios iniciales se continúan con una fragmentación nuclear y citoplasmática en los denominados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por macrófagos o células circundantes. Así pues, durante todo el proceso, que se completa en pocas horas, se mantiene intacta la membrana plasmática, lo que conlleva la ausencia de respuesta inflamatoria (Kerr et al., 1972, Wyllie et al., 1980). Este tipo de muerte es el que se da en el desarrollo normal del individuo, en los

procesos de recambio y en determinados estados patológicos (Jacobson et al.; 1997).

Posteriormente se han asociado una serie de cambios bioquímicos a la muerte apoptótica, como son la digestión del DNA en fragmentos oligonucleosomales, la exposición de residuos fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, la acidificación del citoplasma o la proteólisis de substratos específicos (Cryns and Yuan, 1998). Todos estos cambios bioquímicos son reflejo de la activación de un programa de muerte, que, como se ha mencionado antes, está evolutivamente conservado y cuyo núcleo central se estableció a partir de estudios genéticos en *C. elegans*. Análisis mutacionales en este organismo llevaron a la identificación de tres genes, dos de ellos necesarios para la ejecución de la muerte celular (*ced-3* y *ced-4*) y uno encargado de inhibirla (*ced-9*) (Hengartner et al., 1992; Yuan and Horvitz, 1992; Yuan et al., 1993).

El primer homólogo de *ced-3* aislado en mamíferos fue ICE (Interleukin 1 $\beta$ -Converting Enzyme) miembro fundador de la familia de las caspasas, un conjunto de cisteína-proteasas con especificidad de corte en residuos Asp. Las caspasas son zimógenos cuya activación depende de su procesamiento proteolítico, que corre a cargo de otras caspasas. La activación de una cascada de caspasas, que culmina en la proteólisis de substratos específicos, es el mecanismo efector universal de la muerte apoptótica (Cryns and Yuan, 1998). En la actualidad se conocen hasta 14 caspasas en mamíferos, que se pueden categorizar en "iniciadoras" y "ejecutoras", según la posición que ocupen en la cascada proteolítica. El homólogo de *CED-4*, denominado Apaf-1 (Zou et al., 1997) es una proteína capaz de interactuar con ciertas caspasas y regular su función (ver más adelante). Por último, el homólogo en mamíferos de *CED-9*, llamado Bcl-2, protege a las células de la muerte apoptótica actuando por encima de la activación de las caspasas (Armstrong et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996; Shimizu et al., 1996). Como en el caso de las caspasas, en mamíferos existe una familia de homólogos de Bcl-2, cuyos miembros pueden tener actividad anti o proapoptótica.

Actualmente se hallan bien caracterizadas dos cascadas de activación de caspasas, la inducida por receptores de superficie celular y la originada por cambios en la integridad mitocondrial (Figura 2).

### **5.2.1. Activación de caspasas por receptores de superficie celular**

Una de las vías que lleva a la activación de caspasas y por consiguiente a la muerte apoptótica se inicia mediante la activación de receptores "de muerte", presentes en la superficie celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del TNFR/p75<sup>NTR</sup>, que incluye TNFR1, Fas, DR-3, y los receptores para TRAIL, DR-4 y DR-5 (Ashkenazi and Dixit, 1998). Su característica estructural más sobresaliente es la presencia de un dominio citoplasmático de unos 68 kDa denominado "death domain" (DD), capaz de homodimerizar con otras proteínas con DD, y encargado así de reclutar una serie de acopladores que conducirán a la activación de las caspasas. El sistema mejor caracterizado en cuanto a la señalización por receptores de muerte es el de Fas y su ligando FasL. Tras una trimerización inducida por FasL, los DD de Fas reclutan un adaptador denominado FADD ("Fas associating protein with death domain"), que además del DD contiene un dominio llamado "death effector domain" (DED), mediante el que reclutan a las procaspasas iniciadoras como la procaspasa-8 o la procaspasa-10. Inmediatamente después de ser reclutada al complejo Fas/FADD, la procaspasa-8 es autoprocesada y por tanto activada proteolíticamente, iniciando así una cascada de caspasas que culminará con la muerte apoptótica (revisado por Budihardjo et al., 1999).

### **5.2.2. Activación de caspasas por la vía mitocondrial**

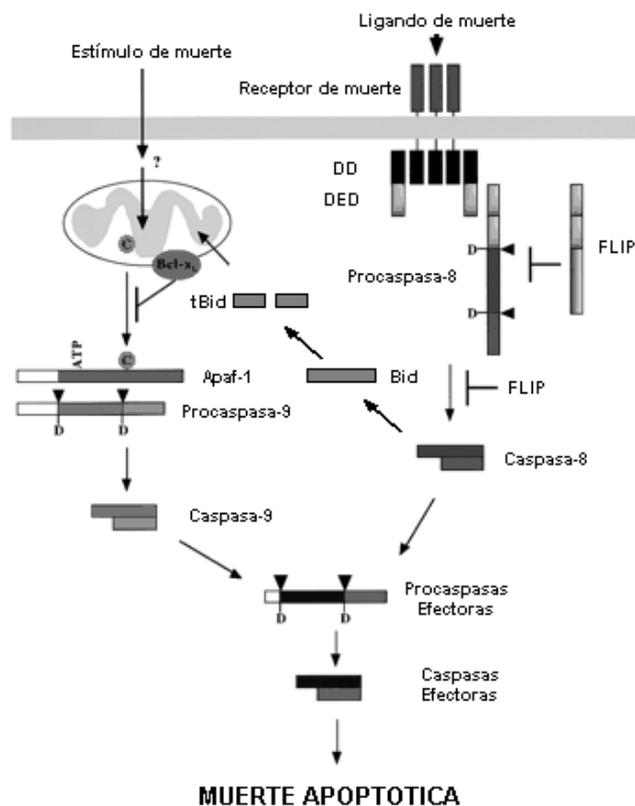
El segundo mecanismo de activación de caspasas es el denominado mecanismo interno o vía mitocondrial. Este mecanismo, que puede ser activado por agentes que inducen daño en el DNA o por retirada de factores de crecimiento, presenta como paso crítico la pérdida de integridad de la mitocondria y la liberación al citoplasma de moléculas que residen en el espacio intermembranario de la misma, como AIF ("apoptosis inducing factor") o citocromo c (Susin et al., 1999; Green and Rubin., 1998). En concreto, el

citocromo c es capaz de unirse a Apaf-1, a dATP (o ATP) y a procaspasa-9 para formar un complejo denominado "apoptosoma" (Li et al., 1997b). La formación del apoptosoma es un proceso secuencial que implica en primer lugar la unión de dATP o ATP, seguido de una hidrólisis del mismo. En ausencia de citocromo c, esta hidrólisis carece de consecuencias, de la misma manera que el citocromo c es capaz de unirse a Apaf-1 en ausencia de ATP. En ambas condiciones el complejo resultante es inestable e inactivo. Por el contrario, en presencia de citocromo c la hidrólisis de dATP o ATP conllevará una oligomerización de Apaf-1 y citocromo c, que formarán un complejo capaz de reclutar procaspasa-9 (a través de unos dominios denominados "caspase recruiting domain" o dominios CARD) de una manera eficaz. La proximidad física de las moléculas de procaspasa-9 será suficiente para promover el procesamiento cruzado entre ellas, la liberación de caspasa-9 activa y la consiguiente activación de otras caspasas como caspasa-3, -6 y -7 (revisado por Budihardjo et al., 1999). La funcionalidad y relevancia in vivo de esta cascada lineal Apaf-1 / caspasa-9 / caspasa-3 ha sido confirmada mediante la generación de ratones knockout para los tres genes (revisado por Yeh et al., 1999).

El papel de los miembros de la familia de Bcl-2 en la regulación de la vía mitocondrial se produce a nivel de la liberación de citocromo c. En efecto, mientras que los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>) inhiben la liberación de citocromo c en respuesta a varios estímulos apoptóticos (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997; Van der Heiden et al., 1997; Scaffidi et al., 1998), los miembros pro-apoptóticos de la misma como Bax o Bid son capaces de inducirla directamente (Rosse et al., 1998; Juergensmeier et al., 1998; Luo et al., 1998; Li et al., 1998; Kuwana et al., 1998; Gross et al., 1999). En este sentido, el procesamiento de Bid por caspasa-8 genera una proteína truncada (tBid), capaz de inducir la salida de citocromo c, conectando así la vía de receptores de muerte con la vía mitocondrial (Li et al., 1998). Sin embargo, la relevancia de este "loop" de amplificación es fruto de cierta controversia (revisado por Bratton et al., 2000).

En el caso del sistema nervioso, y concretamente en el modelo de neuronas simpáticas en cultivo, se ha observado que la privación de NGF induce la salida de citocromo c, mediante un mecanismo que implica la

translocación de Bax a la mitocondria (Putcha et al, 1999), y la consiguiente activación de caspasas y muerte apoptótica (Edwards et al., 1991; Deckwerth and Johnson., 1993; Troy et al., 1996; McCarthy et al., 1997;). Sin embargo, y contrariamente a lo que ocurre en otros modelos celulares (Li et al., 1997a), la simple microinyección de citocromo c no resulta suficiente para la activación de las caspasas y la muerte apoptótica en presencia de NGF (Deshmukh and Johnson, 1998). Por el contrario, se requiere la presencia de una segunda señal, proporcionada por el NGF, que no depende de síntesis proteica ni de la presencia de Bax (la denominada "competencia para morir", Deshmukh and Johnson, 1998). Así pues, al contrario de lo que ocurre en otros sistemas, en el caso de las neuronas parece ser que el mecanismo anteriormente descrito no es suficiente para la activación de la maquinaria apoptótica.



**Figura 2.** Esquema de las vías mitocondrial y de receptores de membrana de activación de caspasas. En el esquema se muestra como Bid interconecta ambas vías (Modificado de Crins and Yuan, 1998)

### 5.3. Las neurotrofinas

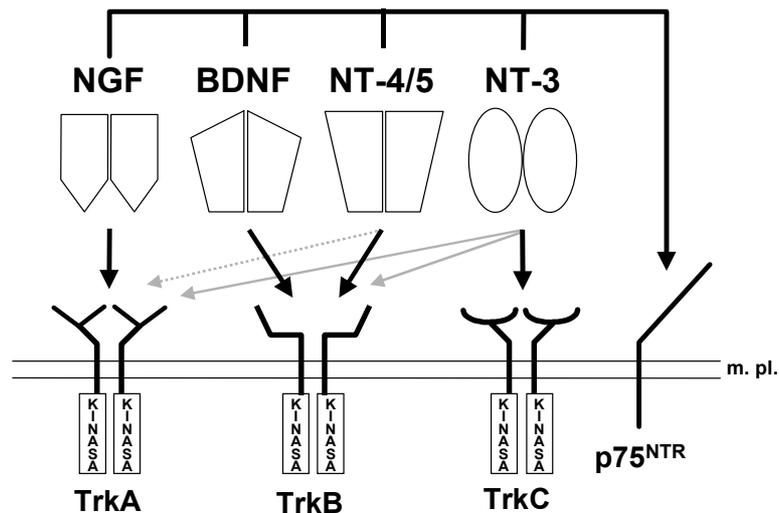
Como se ha mencionado anteriormente, el primer factor neurotrófico en descubrirse fue el NGF. A partir del NGF se han caracterizado toda una serie de factores estructuralmente relacionados con él y que han dado lugar a la familia de las neurotrofinas. Las neurotrofinas incluyen, aparte del NGF, el BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989), la neurotrofina-3 (NT-3) (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990; Kaisho et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Hallbook et al., 1991; Ip et al., 1992;) y la neurotrofina-6 (NT-6) (Gotz et al., 1994). La participación de las neurotrofinas en los procesos de desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso ha sido ampliamente documentada en modelos *in vitro* e *in vivo*. Además de promover la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales, como predice la teoría neurotrófica, las neurotrofinas modulan el crecimiento y ramificación axonal y dendrítico, la función sináptica, o la proliferación y diferenciación gliales, e incluso pueden ejercer efectos biológicos fuera del sistema nervioso (Bothwell, 1995; Lewin and Barde, 1996).

#### 5.3.1. Los receptores Trk

Los efectos de las neurotrofinas están mediados por la interacción y activación de receptores específicos de la familia Trk, que pertenecen a la superfamilia de receptores con actividad tirosina quinasa. Una vez activados, desencadenan la fosforilación en tirosinas de proteínas celulares que, a su vez, propagan los efectos de las neurotrofinas en la célula. Estas cascadas de activación permiten en última instancia cambios en la expresión de determinados genes que son necesarios para la respuesta de la célula a las neurotrofinas.

TrkA, TrkB, y TrkC son los receptores específicos para NGF, BDNF y NT-3, respectivamente. NT-4/5 tiene afinidad preferentemente para TrkB (ver, por ejemplo, Bothwell, 1995; Ip and Yancopoulos, 1996). A pesar de su especificidad, los Trk presentan interacciones funcionales cruzadas de menos afinidad para otras neurotrofinas (Figura 3). Así, TrkB tiene capacidad de

interaccionar también con NT-3 (Glass et al., 1991; Klein et al., 1991; Squinto et al., 1991; Soppet et al., 1991), mientras que TrkA también puede interaccionar con la NT-3 y NT-4/5 (Kaplan et al., 1991a; Kaplan et al., 1991b; Klein et al., 1991a, Klein et al., 1991b).

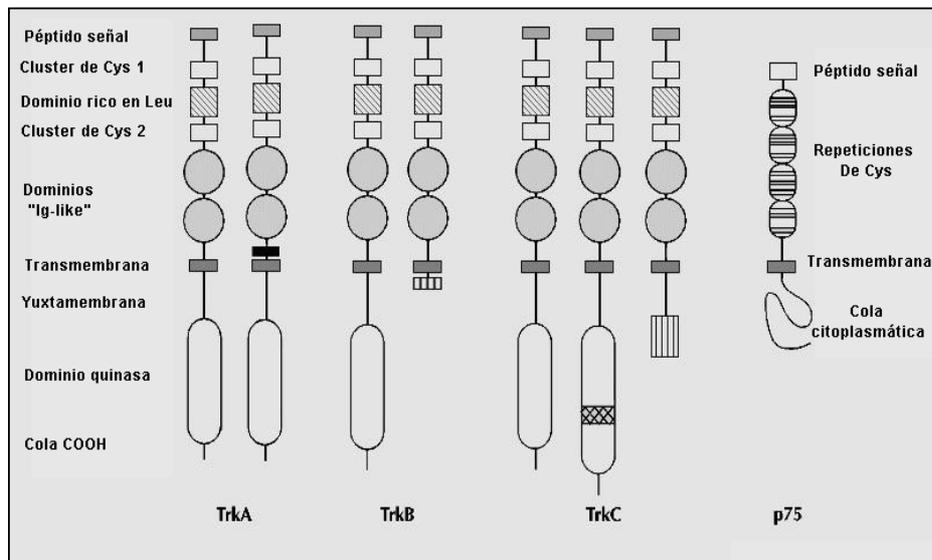


**Figura 3.** Interacción de los diferentes miembros de las neurotrofinas con sus receptores específicos. m.pl., membrana plasmática.

El primer receptor en descubrirse, TrkA, fue inicialmente identificado como una proteína oncogénica fusionada con la tropomiosina no muscular en un carcinoma de colon humano (Martin-Zanca et al., 1986). El aislamiento y la caracterización molecular de este oncogén permitió la posterior identificación del protooncogén *trkA* (Martin-Zanca et al., 1989). En general, los genes *trk* codifican proteínas de unos 800 aminoácidos, con un dominio transmembrana único y con una elevada homología tanto en su dominio extracelular como en su dominio catalítico intracelular (Figura 4). El principal producto traduccional de los genes *trk* es una proteína de unos 80 kDa. Esta proteína sufre varias etapas de glicosilación originando formas de 110 kDa y formas de 140 kDa (gp140<sup>trkA</sup>) (Martin-Zanca et al., 1989) o de 145 kDa (gp145<sup>trkB</sup> y gp145<sup>trkC</sup>) (Klein et al., 1989; Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991; Lamballe et al., 1991). Si bien ambas formas presentan actividad tirosina quinasa, sólo las

formas de 140 y 145 kDa están presentes en la superficie celular (Martin-Zanca et al., 1989; Klein et al., 1989; Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991; Lamballe et al., 1991).

La transcripción de los genes *trk* también da lugar a receptores truncados y formas catalíticas de diferentes pesos moleculares. Así el protooncogén *trkA* puede codificar una isoforma alternativa que presenta 6 residuos adicionales en el dominio extracelular, aunque aparentemente estas dos isoformas presentan propiedades biológicas similares. Por otro lado, se ha descrito la expresión de la proteína gp95<sup>trkB</sup> como una glicoproteína idéntica a gp145<sup>trkB</sup> en los primeros 465 aminoácidos de la secuencia primaria. Sin embargo, gp95<sup>trkB</sup> tiene un dominio citoplasmático muy corto de 23 aminoácidos, faltando toda la región catalítica. Por último, a diferencia de TrkA y TrkB, se han descrito diferentes formas catalíticas de TrkC que incorporan inserciones de un número variable de residuos en su dominio citoplasmático. También existen formas truncadas de TrkC con una estructura similar a las del receptor TrkB, de forma que carecen de dominio tirosina quinasa. Hasta la fecha se han descrito cuatro formas truncadas de TrkC, que difieren entre ellas en el número de residuos citoplasmáticos (revisado por Barbacid, 1994).



**Figura 4.** Estructura de los diferentes tipos de receptores para las neurotrofinas. Se esquematizan las principales isoformas de los receptores Trk, así como los diferentes dominios de éstas y del p75 Adaptado de Barbacid 1995.

### 5.3.2. Los ratones knockout para las neurotrofinas y sus receptores

En los últimos años, la generación de ratones deficientes en un determinado gen mediante recombinación homóloga (ratones “knockout”), ha permitido aproximar fisiológicamente la implicación de las diferentes neurotrofinas y sus receptores Trk en el desarrollo. En la Tabla I se recogen las anomalías más importantes descritas en cada uno de estos ratones delecionados para cada neurotrofina y para cada receptor Trk. Este tipo de estudios ha corroborado resultados previos y han aportado nuevos datos sobre la implicación fisiológica de determinadas reacciones cruzadas de las diferentes neurotrofinas con los diferentes receptores Trk (revisado por Snider, 1994).

Los animales knockout para NGF o TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994) han confirmado algunos resultados previos obtenidos mediante el uso de anticuerpos bloqueantes anti-NGF (Johnson et al., 1980; Pearson et al., 1983). Tanto los ratones deficientes en NGF como en TrkA son viables, aunque la mayoría mueren antes del primer mes de vida. Ambos animales muestran pérdidas neuronales severas en el nacimiento en los ganglios espinales (DRG) y trigémino. Además, los ganglios simpáticos están virtualmente ausentes hacia el décimo día de vida postnatal. La temporalidad de estas pérdidas correlaciona bien con los períodos de muerte neuronal en estos ganglios (Johnson et al., 1980), sugiriendo que en estas poblaciones el NGF actúa como factor neurotrófico durante el periodo de PCD. Las pérdidas en los DRG recaen principalmente en neuronas encargadas de la nocicepción y respuesta a temperatura (Crowley et al., 1994). Sorprendentemente, los knockout para NGF o TrkA no muestran pérdidas en neuronas colinérgicas de los núcleos de la base, en las que se había demostrado por diversas aproximaciones su respuesta a esta neurotrofina (revisado en Lewin and Barde, 1996). Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que el NGF sería importante para el mantenimiento del fenotipo colinérgico de estas neuronas, dado que éstas muestran un descenso en la actividad acetil colina transferasa en ratones NGF<sup>-/-</sup> (Crowley et al., 1994). De la misma manera, la actividad colinesterasa en las dianas de proyección de estas neuronas se halla reducida

en ratones  $TrkA^{-/-}$  (Smeyne et al., 1994). En cualquier caso, este ejemplo ilustra la noción de que las neuronas centrales poseen requerimientos tróficos mucho más complejos que las periféricas, dado que los ratones deficientes en un único factor o receptor muestran pocos defectos centrales en contraposición a unos déficits periféricos más severos (Snider, 1994; ver más adelante).

Los ratones  $TrkB^{-/-}$ , en los que las respuestas a BDNF y NT-4/5 se verían eliminadas, mueren en las primeras 24-48 horas, ya que no son capaces de alimentarse (Klein et al., 1993). Los animales deficientes en BDNF tienen un fenotipo menos severo (Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994), de acuerdo con la existencia de más de un ligando para TrkB. Los ratones  $BDNF^{-/-}$  muestran una gran pérdida de neuronas vestibulares, que provocan movimientos anormales de la cabeza. Además, tanto los animales  $TrkB^{-/-}$  como los  $BDNF^{-/-}$  presentan pérdidas moderadas en los ganglios trigémino, nodoso y DRG. Con respecto a las motoneuronas, un primer análisis mostró un 30% de pérdida en ratones  $TrkB^{-/-}$  (Klein et al., 1993), aunque los animales  $BDNF^{-/-}$ ,  $NT-4/5^{-/-}$  o doble mutantes no presentaban cambios en esta población neuronal (Ernfors et al., 1994; Conover et al., 1995; Liu et al., 1995). En un posterior reanálisis de mutantes  $TrkB^{-/-}$ ,  $TrkC^{-/-}$  o ambos, no se encontraron números significativamente diferentes de motoneuronas respecto a los animales control (Silos-Santiago et al., 1997). Por último, en sistema nervioso central, los ratones defectivos tanto en BDNF como en TrkB no muestran déficits en neuronas granulares del cerebelo o del hipocampo. Sin embargo, un estudio más reciente ha demostrado que el doble mutante  $TrkB/TrkC$  muestra defectos en el desarrollo de estas dos poblaciones (Minichiello et al., 1996), sugiriendo de nuevo la existencia de interacciones tróficas al menos parcialmente redundantes en sistema nervioso central.

Por último, el defecto más sobresaliente en los animales  $NT-3^{-/-}$  y  $TrkC^{-/-}$  es la pérdida de neuronas propioceptoras del DRG, cosa que se refleja en anomalías posturales y locomotoras en estos ratones (Ernfors et al., 1994b; Klein et al., 1994). Además, existe una pérdida sustancial de neuronas en el ganglio cervical superior, consistente con la observación de que NT-3 regula la supervivencia de los precursores neuronales de este ganglio (ver Lewin and Barde, 1996).

Fenotipos de los ratones mutantes (-/-) para neurotrofinas y receptores Trk			
Mutación	Comportamiento	SNP (% pérdida neuronal)	SNC (inmunohistoquímica y % de pérdida neuronal)
<u>NGF</u> ∨ <u>TrkA</u>	Pérdida de nocicepción; La mayoría mueren en un plazo de 3 semanas	Ganglio Cervical Superior, 99% Ganglios Espinales, 70-80% Ganglio Nodoso, 0% Ganglio Trigémino, 70%	Motoneuronas, 0% Núcleos de la base encefálica: atrofia neuronal, < actividad colina acetiltransferasa, menor ramificación axonal.
<u>BDNF</u> ∨ <u>TrkB</u>	Dificultad para amamantarse; La mayoría mueren en 48 h; Los animales BDNF (-/-) presentan movimientos anómalos de la cabeza en la 2ª semana	Ganglio Cervical Superior, 0% Ganglios Espinales, 30-50% Ganglio Vestibular, >80% Ganglio Nodoso, 45-65% Ganglio Trigémino, 25-55%	Motoneuronas TrkB, 35% BDNF, 0% Vmes, 40-50% Córtex, < parvalbúmina, <NPY
<u>NT-3</u> ∨ <u>TrkC</u>	Pseudoatetosis; Pérdida de propiocepción; Algunos sobreviven 1 mes	Ganglio Cervical Superior, NT-3, 55% Ganglios Espinales TrkC, 20% NT-3, 55% Ganglio Nodoso, 50% Ganglio Trigémino, 65% (NT-3)	Motoneuronas TrkC, 30% NT-3, 0% Núcleo mesencefálico del Vº par craneal, 50% Córtex, no analizado

Tabla I. Características de los ratones *knockout* para las diferentes neurotrofinas y receptores Trk. Los porcentajes expresan la pérdida de neuronas en los animales mutantes en comparación con los animales control (adaptado de: (Snider, 1994)).

Por otra parte, todas las neurotrofinas pueden interactuar con un receptor común denominado p75<sup>NTR</sup> (Figura 4) (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987; Large et al., 1989; Heuer et al., 1990; Dechant and Barde, 1997). p75 fue el primer receptor conocido para las neurotrofinas (Johnson et al., 1986). Este receptor pertenece a una familia de proteínas de superficie celular constituida, entre otros, por los dos receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRs), CD40 y el antígeno Fas (Baker and Reddy, 1996; Smith et al., 1994; Suda et al., 1993; Nagata and Golstein, 1995). Esta familia de moléculas presenta un grado importante de homología a nivel del extremo amino-terminal de su dominio extracelular que, en el caso de p75, determinan los diferentes sitios de unión a las neurotrofinas (Welcher et al., 1991). Este tipo de receptores presentan en su parte extracelular cuatro dominios ricos en repeticiones de cisteínas (Banner et al., 1993). El dominio intracelular se caracteriza por la presencia del denominado “dominio de muerte” (“death domain”) (Boldin et al., 1995; Chapman and Kuntz, 1995; Brakebusch et al., 1992; Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Feinstein and Kimchi, 1995). Los dominios de muerte median la interacción de proteínas con

capacidad para inducir muerte celular (Nagata, 1997). La función de p75 como receptor inductor de apoptosis junto con su especificidad de unión a ligandos implicados en la supervivencia celular, es un fenómeno paradójico cuya implicación fisiológica continúa siendo objeto de intenso estudio (Miller and Kaplan, 1998; Barker, 1998; Dechant and Barde, 1997; Carter and Lewin, 1997)

### **5.3.3. Vías de señalización activadas por Trk**

La mayor parte de los estudios sobre la señalización por Trk se han realizado sobre la línea de feocromocitoma de rata PC12 (Greene and Tischler, 1976). Las células PC12 expresan niveles altos de TrkA (Kaplan et al., 1991a,b) y de p75 (Radeke et al., 1987), pero no de TrkB o TrkC. Cuando se exponen a NGF estas células, que dado su origen tumoral se dividen activa e indefinidamente, se diferencian hacia un fenotipo neuronal que recuerda al de neuronas simpáticas (Green and Tischler, 1982). Además, si se cultivan en medio libre de suero, las PC12 requieren el aporte continuo de NGF para su supervivencia (Greene and Tischler, 1982). Existen cada vez más evidencias que apuntan a que los efectos de NGF sobre las PC12 se deben a la activación de los receptores Trk, que causarían la expresión de genes tempranos, que a su vez regularían la expresión de genes tardíos, responsables del fenotipo final observado (revisado por Segal and Greenberg, 1996).

#### **5.3.3.1. Autofosforilación del receptor**

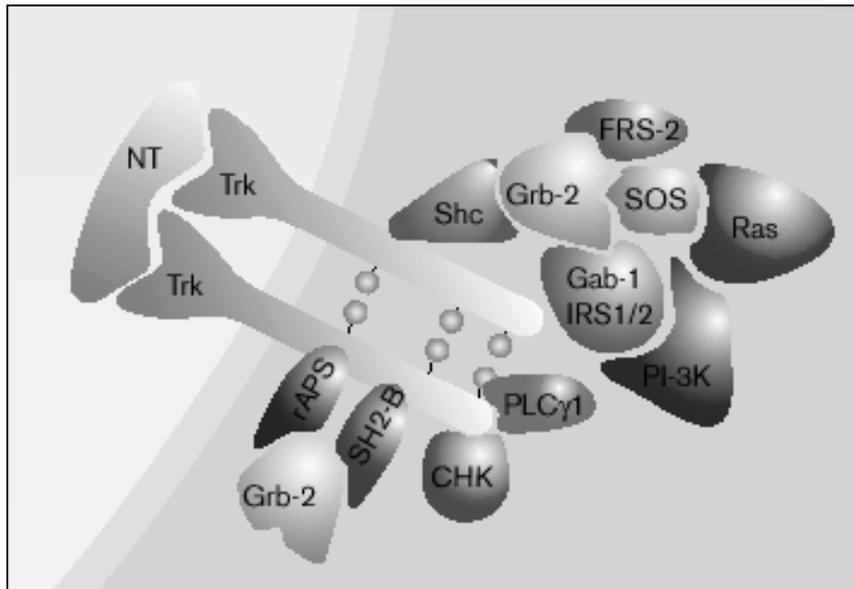
La señalización vía Trk se inicia con una dimerización del receptor inducida por NGF, lo que provoca una activación inicial de la actividad quinasa del mismo (Jing et al., 1992). Como consecuencia, se fosforilan *en trans* tres residuos situados en el “loop” de activación del receptor, las tirosinas 670, 674 y 675 (la numeración hace referencia a la secuencia de Trk humano), fosforilación que es esencial para la adquisición de plena actividad catalítica del mismo (Cunningham et al., 1997). En un modelo reciente, se propone que en ausencia de ligando el “loop” de activación se hallaría en una conformación tal que impediría el acceso de los substratos al dominio quinasa. La fosforilación de estos residuos estabilizaría al receptor en una conformación “abierta”, que

permitiría el acceso y fosforilación de los mismos (Cunningham and Greene, 1998). Recientemente, y de acuerdo con este modelo, se ha descrito que la sustitución de las tirosinas del “loop” de activación por residuos ácidos conlleva la activación constitutiva de la actividad quinasa del receptor, así como una correcta señalización y el crecimiento neurítico en ausencia de NGF (Gryz et al., 2000). Posteriormente se produce la fosforilación de los residuos Tyr<sup>785</sup> y Tyr<sup>490</sup>, situados fuera del dominio quinasa y responsables de la unión a diferentes moléculas señalizadoras, encargadas de la propagación de la señal. (Figura 5). La unión de estas proteínas a Trk se realiza generalmente mediante dominios específicos presentes en éstas, capaces de unir fosfotirosinas, como son los dominios SH2 (Src homology domain 2) y los dominios PTB (phosphotyrosine binding domain) (Sudol, 1998). De entre las proteínas reclutadas al receptor activado, destacan Shc, que activa Ras mediante el complejo Grb2/Sos, FRS2 y PLC $\gamma$  (revisado en Segal and Greenberg, 1996; Kaplan and Miller, 1997, 2000). A partir de estas proteínas se generan dos de las vías de señalización más estudiadas para receptores tirosina quinasa, la vía MEK/MAPK (también conocida como Ras/MAPK) y la vía PI 3-K/Akt.

### **5.3.3.2. Shc activa Ras mediante el complejo Grb2/Sos**

Shc es una proteína adaptadora que se une a la Tyr<sup>490</sup> de Trk (Obermeier et al., 1993b; Stephens et al., 1994). Aunque en principio se anticipó que la unión a esta fosfotirosina de Trk se realizaba a través de un dominio SH2 de Shc, estudios mutacionales han puesto de manifiesto que ésta se produce a través de un dominio PTB (Dikic et al., 1995). Después de unirse a Trk, Shc se convierte en un sustrato del receptor. La tirosina fosforilada de Shc es reconocida por los dominios SH2 de otra proteína adaptadora denominada Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992). Al margen del dominio SH2, Grb2 contiene dominios SH3 (Src homology domain 3) (Lowenstein et al., 1992), que también median la interacción entre proteínas reconociendo zonas ricas en prolina (Cohen et al., 1995). En el caso de Grb2, sus dos dominios SH3 permiten la asociación con Sos, una proteína con actividad intercambiadora de GTP (actividad GEF), específica de Ras (McCormick,

1994;). Este hecho permite relacionar la activación de Trk con la activación de Ras (Qiu and Green, 1991).



**Figura 5.** Señalización proximal por TrkA. Se muestran las principales proteínas adaptadoras encargadas de propagar la señal de NGF hacia Ras y PI 3-K, así como las interacciones entre ellas. Adaptado de Kaplan y Miller, 2000.

Ras es una GTPasa farnesilada asociada a la cara interna de la membrana plasmática (Casey, 1995). Su función biológica está regulada por un ciclo de unión a GTP (estado activo) o a GDP (estado inactivo) (Macara et al., 1996; Casey, 1995; Wiesmuller and Wittinghofer, 1994). Las proteínas con actividad GEF, como Sos, catalizan la formación de Ras-GTP mientras que las proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa de Ras (proteínas GAP) catalizan la formación de Ras-GDP (Boguski and McCormick, 1993; Quilliam et al., 1995). Las proteínas de la familia de Ras controlan la activación de numerosos efectores y por ello están consideradas como verdaderos “interruptores” celulares que coordinan e integran las vías de transducción de señal activadas por diferentes estímulos (Marshall, 1995a; Vojtek and Cooper, 1995; Katz and McCormick, 1997; Campbell et al., 1998).

### 5.3.3.3. PLC $\gamma$

PLC $\gamma$  se une a la Tyr<sup>785</sup> de TrkA también a través de un dominio SH2 (Obermeier et al., 1993a; Stephens et al., 1994). Esta asociación provoca la fosforilación y la consecuente activación de PLC $\gamma$  (Vetter et al., 1991; Obermeier et al., 1993a). Una vez activada, PLC $\gamma$  degrada fosfolípidos de membrana para generar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> se une a su receptor en el retículo endoplasmático induciendo la salida al citoplasma de iones Ca<sup>2+</sup> (Berninger et al., 1993). Por su parte, el DAG actúa como cofactor de la proteína quinasa C (PKC), a veces conjuntamente con el Ca<sup>2+</sup> (Berridge, 1993).

### 5.3.3.4. SNT y FRS2

SNT (“suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target”) se identificó originalmente a partir de ensayos de cromatografía de afinidad con la proteína p13<sup>suc1</sup> (Rabin et al., 1993). SNT hace referencia en realidad a un grupo de proteínas de peso molecular entre 78 y 90 kDa que se fosforilan muy rápidamente tras el estímulo con NGF (Rabin et al., 1993). La activación de estas proteínas por parte de Trk no depende de la fosforilación de la Tyr<sup>490</sup> ni de la Tyr<sup>785</sup> (Stephens et al., 1994). Sin embargo, la delección de un dominio yuxtamembrana de Trk, constituido por los aminoácidos lisina (Lys), fenilalanina (Phe) y glicina (Gly) (dominio “KFG”, aminoácidos 441-443) inhibe completamente la fosforilación de las SNT (Peng et al., 1995).

Por otro lado, recientemente se ha clonado y caracterizado una proteína adaptadora que se fosforila en tirosinas en respuesta a NGF, FGF (Kouhara et al., 1997;) y BDNF (Easton et al., 1999), llamada FRS2. Una vez fosforilada, FRS2 activa la vía MEK/MAPK, aparentemente formando un complejo con la fosfatasa SHP-2, Grb2/Sos y Crk (Kouhara et al., 1997; Easton et al., 1999; Meakin et al., 1999; Hadari et al., 1998). Aunque originalmente se describió que FRS2 era equivalente a SNT (Kouhara et al., 1997), existen algunas evidencias

que plantean algunas dudas a este respecto. Por ejemplo, recientemente se ha descrito que al margen del dominio KFG, FRS2 se une a Trk mediante la fosofotirosina 490 (Meakin et al., 1999), cosa que parece no ocurrir con SNT. Además, mientras SNT se localiza predominantemente en el núcleo (Rabin et al., 1993), FRS2 está anclada a membrana (Kouhara et al., 1997). Dado que no se conoce la secuencia de SNT, el grado de homología entre estas proteínas sigue siendo desconocido.

### 5.3.3.5. PI 3-K

La PI 3-K es una proteína heterodimérica constituida por una subunidad reguladora de 85 kDa con dos dominios SH2 (p85) y por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Carpenter et al., 1990). Después de algunos años de controversia parece ser que la unión de PI 3-K a TrkA no es directa (Ohmichi et al., 1992a; Obermeier et al., 1993b; Rodríguez-Viciano et al., 1994; Wang et al., 1995). En efecto, estudios realizados con neuronas corticales *in vitro* apuntan a que BDNF es capaz de inducir la fosforilación de IRS-1 e IRS-2, promoviendo así la unión y activación de PI 3-K (Yamada et al., 1997). En PC12, NGF es capaz de inducir la fosforilación en tirosinas de la proteína "IRS-like", Gab1 (Grb-associated binder-1), la cual sería capaz de interaccionar y activar la PI 3-K (Holgado-Madruga et al., 1996; 1997).

A pesar de qué se ha detectado en algunos casos la fosforilación de la PI 3-K por parte de la actividad quinasa del receptor (Hu et al., 1992; Kazlauskas and Cooper, 1989; Kazlauskas and Cooper, 1990) este hecho no parece ser crítico para regular su función. Sin embargo, lo que sí parece determinante es la ocupación de los dos dominios SH2 de la p85 por tirosinas fosforiladas ya que parece provocar un cambio de conformación de la subunidad p110 activando así la actividad quinasa del enzima (Rordorf-Nikolic et al., 1995).

Se ha observado también que Ras puede interaccionar con la subunidad p110 de la PI 3-K (Rodríguez-Viciano et al., 1994). La relevancia de esta interacción no se conoce con detalle pero parece no modular la activación de Ras (Hallberg et al., 1998). Sin embargo, en algunos modelos esta interacción sí parece regular la actividad de la PI 3-K por lo que en estos casos PI 3-K

actuaría como un efector más de Ras (Rodríguez-Viciano et al., 1994; Rodríguez-Viciano et al., 1996)

#### **5.3.3.6. Otras moléculas involucradas en la señalización por Trk**

SHP-2 es una tirosina fosfatasa que se fosforila y activa rápidamente en respuesta a NGF (Goldsmith and Koizumi, 1997). Hasta el momento no se conoce si la unión de SHP-2 a Trk es directa o está mediada por adaptadores como FRS2. En cualquier caso, se sabe que una consecuencia de su activación es la contribución a la activación de la vía MEK/MAPK (Wright et al., 1997).

En segundo lugar, se han identificado dos nuevas proteínas, que contienen dominios SH2, substratos de Trk, conocidas como rAPS y SH2-B (Qian et al., 1998). Estas proteínas funcionan como adaptadores, capaces de unirse a Grb2 y activar así la vía MEK/MAPK, así como inducir diferenciación neuronal. Aunque se desconocen los lugares de interacción con Trk, se sabe que la perturbación de estas proteínas interfiere con la señalización vía Trk, indicando que son necesarias para ésta.

Por último, la quinasa CHK (Csk homologous kinase) ha sido identificada como otra proteína capaz de unirse a la Tyr<sup>785</sup> de Trk (Yamashita et al., 1999). Parece ser que esta quinasa está implicada en el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12, dado que anticuerpos bloqueantes contra ella son capaces de inhibir este efecto biológico. Sin embargo, dado que la mutación en la Tyr<sup>785</sup> de Trk no previene el crecimiento neurítico en PC12 (Obermeier et al., 1994; Stephens et al., 1994), CHK debe utilizar vías alternativas para promover la neuritogénesis.

#### **5.3.3.7. La vía MEK/MAPK**

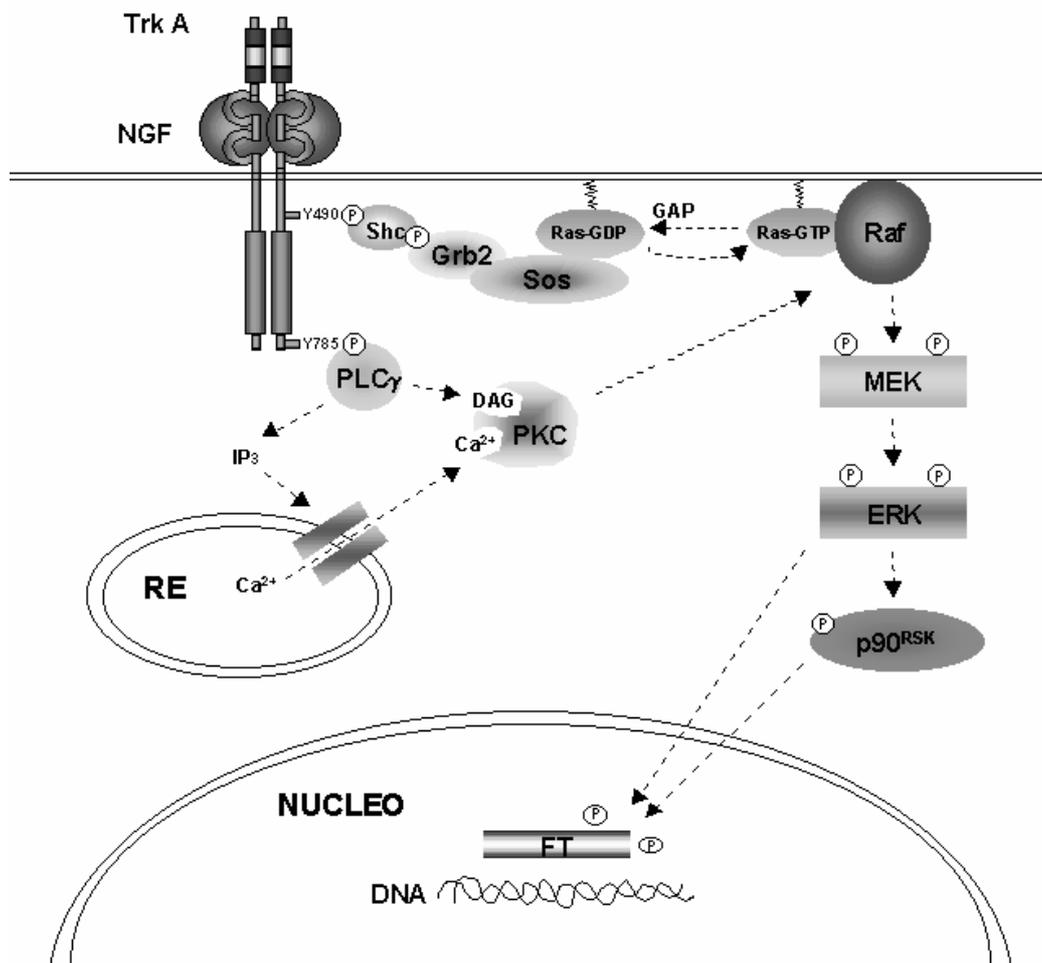
La activación de Ras en PC12 da lugar a la activación de una cascada de quinasas, conocida como cascada MAPK (Mitogen Associated Protein kinases, Figura 6). La estructura típica de una cascada MAPK está constituida por una serina/treonina (Ser/Thr) proteína-quinasa (MAPKKK o MEKK), que fosforila y activa una proteína quinasa con especificidad dual para Ser/Thr y Tyr

(MAPKK o MKK) (estas quinasas fosforilan la Thr y la Tyr de la secuencia consensus treonina (Thr, T), glutámico (Glu, E) y tirosina (Tyr, Y) (TEY)) la cual, a su vez, fosforila y activa otra Ser/Thr proteína-quinasa (MAPK) (Marshall, 1994). En última instancia, la activación de la vía desemboca en la fosforilación y activación de diferentes factores de transcripción que modificarán la transcripción de los genes necesarios para adecuar el fenotipo celular al estímulo original (Blenis, 1993).

La activación de Ras en células PC12 da lugar a la activación de las MAPKK del tipo Raf (Oshima et al., 1993; Ohmichi et al., 1992b; Wood et al., 1992; Marshall, 1994). La familia de proteínas Raf la forman tres miembros denominados A-Raf, B-Raf y c-Raf-1 (Daum et al., 1994). Mientras que c-Raf-1 parece activarse exclusivamente por Ras, la activación de A-Raf y B-Raf puede implicar otras proteínas con actividad GTPasa como por ejemplo Rap1 (Ohtsuka et al., 1996). Muchos de los estudios de la activación de Raf se han realizado tomando como paradigma c-Raf-1. Estos estudios sugieren que la activación de Raf es un proceso complejo constituido por múltiples pasos (Morrison and Cutler Jr, 1997). La función de Ras está relacionada con la de transportar Raf hacia la membrana plasmática de la célula (Leevers et al., 1994; Stokoe et al., 1994). Una vez en la membrana, se requiere una segunda señal (posiblemente una fosforilación) para inducir la máxima actividad quinasa de la enzima (Williams et al., 1992; Daum et al., 1994). Un posible candidato de esta segunda señal podría ser la PKC, ya que se ha descrito que PKC puede fosforilar y activar c-Raf-1 (Kolch et al., 1993).

En las células PC12, el tratamiento con NGF provoca la activación de A-Raf, B-Raf y c-Raf-1 aunque con un patrón temporal diferente (Wixler et al., 1996). c-Raf-1 tiene una activación fuerte y rápida con un pico de actividad a los 2.5 minutos, la cual desaparece casi por completo al cabo de 30 minutos de estimulación. Sin embargo, B-Raf y A-Raf se activan más lentamente alcanzando un pico de actividad entre 45 y 90 minutos, que sigue siendo aún detectable al cabo de muchas horas de haber iniciado la estimulación (Wixler et al., 1996). Clásicamente, los efectos producidos por NGF sobre una célula PC12 han sido atribuidos a B-Raf (Oshima et al., 1993; Traverse and Cohen, 1994).

Una vez activadas, las proteínas Raf activan mediante fosforilación las MAPKK conocidas como MEK1 y MEK2 (Kyriakis et al., 1992; Howe et al., 1992; Vaillancourt et al., 1994). En el caso de las proteínas MEK humanas, los residuos fosforilados por las proteínas Raf son las serinas situadas en las posiciones 217 y 221 (Alessi et al., 1994). Como se ha descrito anteriormente para las MAPKK en general, MEK1/2 tienen una actividad quinasa dual para Ser/Thr y Tyr con la que fosforilan la secuencia consenso TEY de sus únicos substratos conocidos, las MAPK de tipo ERK (Extracellular Regulated Kinases) (Dhanasekaran and Reddy, 1998). La fosforilación de las ERKs en esta secuencia consenso correlaciona con la actividad quinasa de estas enzimas (Boulton et al., 1991; Sanghera et al., 1991), mientras que la desfosforilación de cualquiera de los dos residuos bloquea por completo esta activación (Chung et al., 1991; Sanghera et al., 1991). ERK1 y ERK2 son proteínas Ser/Thr quinasas que fosforilan lugares ricos en prolina con una secuencia consenso P-LXT-SP (Marshall, 1994). Una vez activadas, las ERKs se translocan al núcleo (Chen et al., 1992), donde fosforilan y activan una serie de factores de transcripción induciendo así la expresión de ciertos genes como por ejemplo *c-fos* (Treisman, 1996). Las proteínas ERKs pueden además, fosforilar y activar otra familia de proteínas-quinasa denominadas *proteínas-quinasa ribosomales S6* (pp90rsk) (Chen et al., 1993; Hill and Treisman, 1995). Aunque originalmente definidas como un grupo de enzimas que catalizaban la fosforilación de la proteína ribosomal S6 *in vitro*, parece que no es la función que desempeñan *in vivo*. Más bien, parece ser que las proteínas Rsk también fosforilan y activan factores de transcripción (Blenis, 1993; Chen et al., 1993).



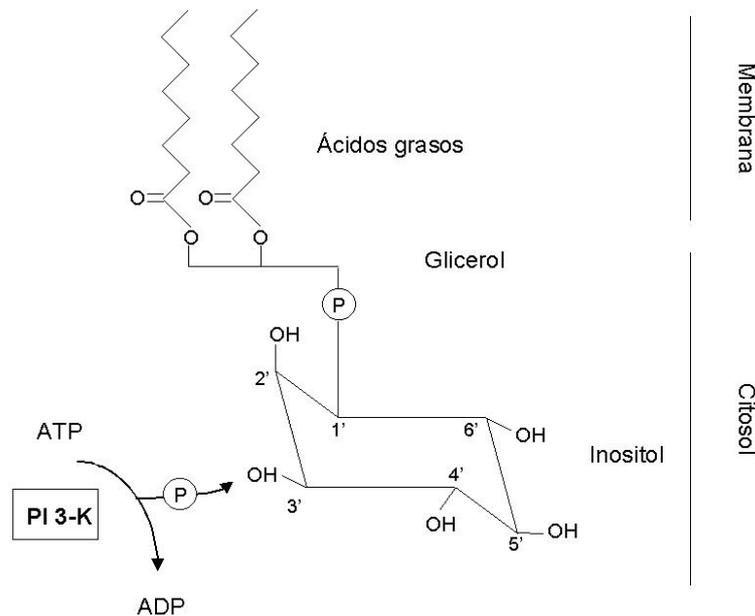
**Figura 6.** La vía MEK/MAPK activada por TrkA. Se muestra la cascada de MAPK (Raf/MEK/MAPK) y su conexión con el receptor activado a través de Ras y PLC $\gamma$ . FT: factor de transcripción.

Una observación importante es que para bloquear completamente la activación de la vía MEK/MAPK inducida por Trk en células PC12 se deben mutar simultáneamente la Tyr<sup>490</sup> y la Tyr<sup>785</sup> del receptor, sugiriendo que PLC $\gamma$  está implicada también en la activación de las MAPK (Stephens et al., 1994, Figura 6).

### 5.3.3.8. La vía PI 3-K/Akt

La PI 3-K cataliza la fosforilación en posición 3' del anillo de inositol de los fosfatidil inositoles (PtdIns), un tipo de lípidos contenidos en la membrana

plasmática de la célula (Figura 7). Si bien *in vitro* la PI3K puede fosforilar PtdIns, PtdIns(4)P y PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, *in vivo* sus substratos preferentes son PtdIns(4)P y PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> generando así PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> y PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, respectivamente (Vanhaesbroeck, et al., 1997). Una vez fosforilados, estos lípidos actúan como segundos mensajeros, uniéndose a múltiples efectores a través de los denominados dominios PH (Pleckstrin Homology domains) presentes en éstos. Uno de los efectores más conocidos es la Ser/Thr proteína-quinasa Akt (conocida también como PKB o RAC), una proteína quinasa de la misma familia que PKA y PKC (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Muchos de los estudios realizados sobre la activación de la PI3K y de la Akt se han realizado utilizando como paradigma el receptor de insulina (Shepherd et al., 1998; Alessi et al., 1996a; Alessi et al., 1996b). No obstante, otros muchos estímulos como las interleuquinas, receptores ligados a proteínas G o neurotrofinas, pueden activar también esta vía (Park et al., 1996; Stephens et al., 1994). Akt posee un dominio de homología a pleckstrina (dominio PH) con el que puede unirse a PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> y PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> (Stephens et al., 1998). Esta interacción parece mediar la translocación de la Akt del citosol a la membrana plasmática que se observa tras el tratamiento con factores de crecimiento ya que la inhibición de la actividad PI 3-K o la delección del dominio PH de la Akt bloqueen este proceso (Andjelkovic et al., 1997). Sin embargo, contrariamente a la idea original (Franke et al., 1995; Klippel et al., 1997; Franke et al., 1997), los 3-PtdIns no activan directamente la actividad quinasa de Akt sino que permiten que Akt sea activada por una segunda señal, posiblemente una fosforilación (Alessi et al., 1997b; Stokoe et al., 1997, Figura 8). Los tratamientos con inhibidores de Ser/Thr fosfatasa han demostrado que la fosforilación de la Akt juega un papel crítico en su activación (Burgering and Coffey, 1995; Andjelkovic et al., 1996; Stephens et al., 1998). Los lugares de fosforilación requeridos para la activación de la enzima son el residuo Thr308, situado en el dominio quinasa de la proteína, y el residuo Ser473, situado en el extremo carboxi-terminal de la misma (Alessi et al., 1996a). La fosforilación única de cualquiera de estos dos residuos activa parcialmente la actividad quinasa mientras que la fosforilación simultánea de los dos residuos causa una fuerte activación (Alessi et al., 1996a).



**Figura 7.** Diana de fosforilación de la PI 3-K sobre PtdIns. Nótese que por convenio los carbonos del inositol se numeran con una "prima". Adaptado de Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

Recientemente, dos grupos han identificado y caracterizado independientemente una proteína quinasa, denominada PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase), que fosforila la Thr308 de la Akt (Alessi et al., 1997b; Stokoe et al., 1997, Figura 8). A diferencia de la Akt, la actividad de PDK1 está fuertemente estimulada *in vitro* por PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> y por PtdIns-3,4-P<sub>2</sub>. (Alessi et al., 1997b; Stokoe et al., 1997). El clonaje de PDK1 ha revelado que su cDNA codifica para un proteína quinasa de 556 aminoácidos de la misma familia que Akt, PKA y PKC y que contiene un dominio PH cerca de su extremo carboxilo-terminal (Alessi et al., 1997a). La importancia del dominio PH de la PDK1 en la activación de la Akt se ha demostrado al observar que la activación de la Akt se reduce considerablemente si se elimina el dominio PH de PDK1 (Alessi et al., 1997a). La fosforilación de Akt en la Thr308 no precede la fosforilación de la Ser473 sugiriendo que este segundo sitio se fosforila por una quinasa diferente a PDK1. Aunque se han descrito proteínas con actividad quinasa capaces de fosforilar *in vitro* el residuo Ser473, parece que ninguna de ellas sea quienes fisiológicamente ejerza esta función (Alessi

and Cohen, 1998; Downward, 1998). Sin embargo, se ha descrito que la actividad de esta quinasa (denominada PDK2) parece estar bajo control de la actividad PI3K ya que la fosforilación de este segundo residuo también es sensible a inhibidores específicos de la PI 3-K como la wortmannina (Alessi et al., 1996a).

Todas estas observaciones sugieren que los 3-PtdIns juegan un papel importante en la activación de Akt a través del control de la actividad PDK. Sin embargo, varios resultados indican que los 3-PtdIns y su interacción con el dominio PH de Akt regulan también la activación de Akt ejerciendo así un efecto directo sobre esta proteína (Bellacosa et al., 1998). Se ha hipotetizado que la interacción de los PtdIns con el dominio PH de la Akt provocaría un cambio de conformación de este enzima de tal manera que la Thr308 fuera accesible a PDK1 (Downward, 1998; Marte and Downward, 1997; Alessi and Cohen, 1998). Esta conclusión está corroborada por la observación de que una forma de Akt mutante que no puede interaccionar con los PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> no puede ser fosforilada por PDK1 (Stokoe et al., 1997). Además las formas de Akt a las que les falta el dominio PH se pueden fosforilar por PDK1 independientemente de la presencia de PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> o PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> (Stokoe et al., 1997; Alessi et al., 1997a). Por otro lado, la substitución del dominio PH de la Akt por una secuencia de miristoilación que transloca la directamente a la membrana, induce la fosforilación constante de este enzima (Andjelkovic et al., 1997; Kohn et al., 1996). En concordancia con estas observaciones, una forma truncada de PDK1 a la cual le falta el dominio PH sigue requiriendo PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> para poder fosforilar la Akt (Alessi et al., 1997a). Sin embargo aún falta por determinar si la acción de los 3-PtdIns sobre la activación de la Akt se debe a un efecto alostérico de éstos sobre la actividad quinasa de las PDKs o bien si simplemente median la colocalización de las PDKs y la Akt en las mismas vesículas lipídicas. Esta última hipótesis se apoya en observaciones que describen la translocación a la membrana de PDK1 a la membrana a través de un mecanismo dependiente de la unión de 3-PtdIns a su dominio PH (Anderson et al., 1998).

Aparte de la Akt se conocen otros substratos de los 3-PtdIns. Se ha descrito que los nuevos miembros de la familia de las PKC (las denominadas PKC atípicas), que tienen una actividad independiente de Ca<sup>2+</sup> (Chou et al.,

1998; Toker et al., 1994), pueden activarse *in vitro* e *in vivo* por PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> o por PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> (Toker and Cantley, 1997). En relación con esta observación, la activación de las PKC atípicas con PDGF parece mediada por un mecanismo dependiente de PI3K (Moriya et al., 1996)

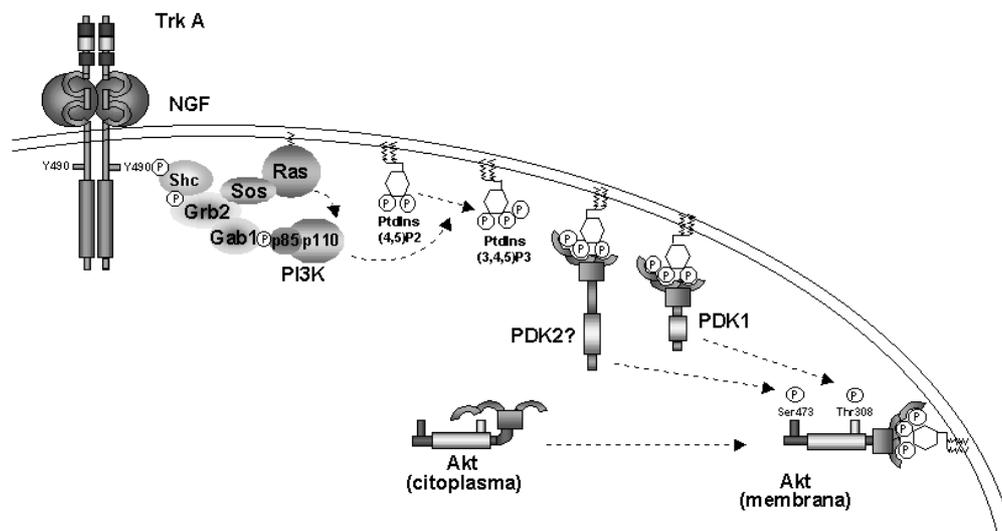


Figura 8. La vía PI 3-K/Akt: mecanismo de activación.

#### 5.4. Los ligandos de la familia del GDNF (GFLs)

El GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) fue aislado como un factor secretado por una línea celular de glioma capaz de mantener la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo *in vitro* (Lin et al., 1993). Posteriormente, la lista de poblaciones neuronales capaces de responder a GDNF se ha ampliado, incluyendo varias poblaciones del SNC (entre ellas las motoneuronas espinales), así como al menos subpoblaciones de todos los ganglios periféricos examinados hasta el momento (Lin et al., 1993; Henderson et al., 1994; Arenas et al., 1995; Buj-Bello et al., 1995; Trupp et al., 1995; Hearn et al., 1998; Heuckeroth et al., 1998).

Tres años después se purificó el segundo miembro de esta familia, la neurturina (NRTN), que comparte aproximadamente un 44% de identidad en su secuencia con el GDNF (Kotzbauer et al., 1996). Posteriormente, y utilizando

técnicas basadas en homología de secuencia, se clonaron los restantes miembros de la familia conocidos hasta el momento, Persefina (PSPN, Milbrandt et al., 1988) y Artemina (ARTN, Baloh et al., 1998b). Mientras NTRN y ARTN promueven la supervivencia de neuronas periféricas simpáticas y sensoriales, así como de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Kotzbauer et al., 1996; Baloh et al., 1998b; Horger et al., 1998), el espectro de actuación de PSPN está restringido a neuronas centrales dopaminérgicas y motoras, no teniendo efectos conocidos sobre el sistema nervioso periférico (Milbrandt et al., 1998).

#### **5.4.1. Los receptores: un complejo multiproteico**

Pese a que la similitud de secuencia sitúa a los GFLs como miembros distantes de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), los GFLs presentan un sistema de receptores distinto al de los miembros de ésta. Éste consiste en un complejo dimérico, en el cual un componente común es utilizado por múltiples ligandos mediante la unión a un co-receptor específico para cada uno de ellos. El componente común es el receptor transmembrana Ret, que presenta actividad tirosina quinasa intrínseca, mientras que el co-receptor, que está anclado a la cara externa de la membrana plasmática mediante un enlace glicosil-fosfatidil inositol, y por tanto carece de dominio intracelular, es uno de los denominados GFR $\alpha$  (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996), de los cuales se han descrito cuatro hasta el momento (GFR $\alpha$ 1-4).

Ret fue inicialmente descrito como un oncogén (Takahashi et al., 1985), cuyas mutaciones activantes ("gain of function") se encuentran en carcinomas de tiroides humanos (PTC y FMTC) y en los síndromes de neoplasia endocrina múltiple (MEN2), mientras que mutaciones inactivantes ("loss of function") son las causantes de la enfermedad de Hirschprung (revisado por Eng, 1996; Pasini et al., 1996; Edery et al., 1997). El protooncogén c-ret codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa (Takahasi and Cooper, 1987). Su dominio quinasa se halla dividido en dos por una región "inserto", lo que lo hace muy similar al receptor de FGF. En cambio, la región extracelular no tiene homología con otros receptores tirosina quinasa conocidos, y presenta

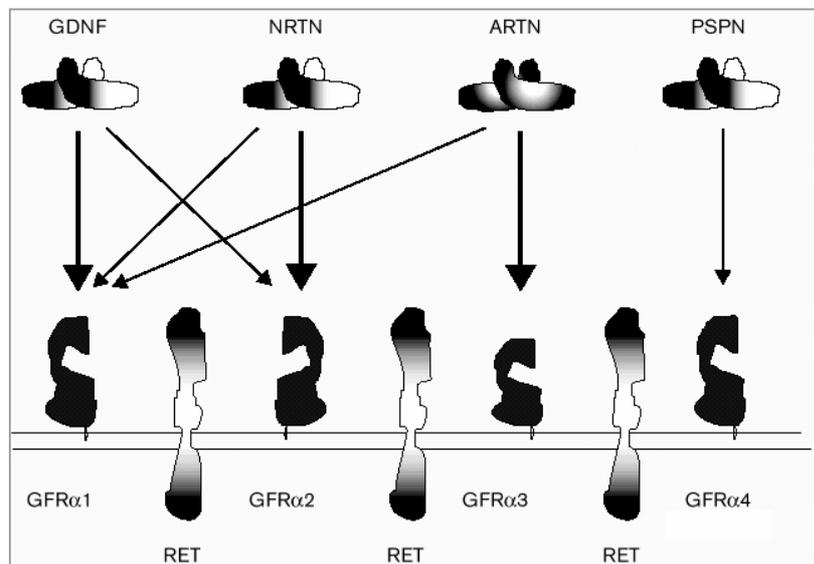
como singularidad un dominio con homología a cadherinas, aunque no existen evidencias de propiedades adhesivas de Ret. Existen dos isoformas principales de Ret generadas por "splicing" alternativo, que difieren en la región C-terminal, presentando 51 (Ret L) o 9 (Ret S) aminoácidos diferentes a partir del residuo 1063 (Iwamoto et al, 1993).

Durante mucho tiempo Ret fue un receptor huérfano. El solapamiento de fenotipos de los ratones "knockout" para GDNF y c-ret (Schuchardt et al., 1994; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sanchez et al 1996; Durbec et al ,1996b) constituyó el primer indicio de que GDNF era en realidad el ligando fisiológico de Ret, como se confirmó poco después. (Durbec et al. 1996a, Trupp et al., 1996). Posteriormente, mediante el screening de una librería de expresión de moléculas capaces de interactuar con GDNF, se estableció que este factor no interactúa directamente con Ret, sino que se une con alta afinidad a un co-receptor anclado a la membrana plasmática mediante un grupo GPI (glicosil-fosfatidilinositol), denominado  $GFR\alpha 1$  (Jing et al., 1996, Treanor et al, 1996;). En el modelo de activación del complejo propuesto por Jing y colaboradores, una molécula de GDNF se uniría en primer lugar con un monómero o dímero de  $GFR\alpha 1$ , tras lo cual el complejo interactuaría con Ret, induciendo su homodimerización y consiguientemente su actividad quinasa intrínseca.

Como se ha mencionado anteriormente, existen cuatro miembros distintos de la familia de los  $GFR\alpha s$ , cada uno de los cuales liga preferencialmente a un miembro de los GFLs (Figura 9). Así,  $GFR\alpha 1$  se une con mayor afinidad a GDNF, mientras que  $GFR\alpha 2$  (Baloh et al., 1997; Klein et al., 1997; Sanicola et al., 1997; Suvanto et al., 1997) lo hace a NTRN y  $GFR\alpha 3$  (Baloh et al., 1998a; Jing et al., 1997; Navheilan et al., 1998; Trupp et al., 1998; Worby et al. 1998) a ARTN. El receptor  $GFR\alpha 4$ , clonado inicialmente en pollo (Thompson et al., 1998; Enokido et al.,1998) y más recientemente en mamífero (Lindahl et al., 2000) es el receptor preferido de PSPN.

### 5.4.2. Interacciones cruzadas entre GFLs y GFR $\alpha$ s

Como se muestra en la figura 9, al margen de las interacciones anteriormente descritas, existen interacciones cruzadas de menor afinidad entre los GFLs y los diferentes GFR $\alpha$ s. La magnitud y relevancia de estas reacciones cruzadas es fruto de cierta controversia, dada la cantidad de datos contradictorios existentes en la literatura. Además, la complejidad de estas interacciones se ve incrementada, dada su dependencia del contexto celular considerado. Desde un contexto puramente bioquímico, un primer estudio mostró como la molécula de GFR $\alpha$ 1 purificada, en ausencia de Ret, parecía presentar una mayor afinidad por GDNF que por NRTN (Klein et al., 1997). Sin embargo, en otro trabajo en el que se utilizó una técnica tipo ELISA, usando moléculas de ligando inmovilizadas y proteínas de fusión GFR $\alpha$ 1-Fc ("receptor bodies", donde Fc es el fragmento constante de las inmunoglobulinas), se halló que tanto GDNF como NTRN se unían con igual afinidad a GFR $\alpha$ 1 (Baloh et al., 1998). En ambos trabajos se halló que GFR $\alpha$ 2 fijaba con gran afinidad NTRN, pero si este co-receptor era incubado en presencia de Ret soluble, era capaz también de ligar GDNF (Sanicola et al., 1997).



**Figura 9.** Representación esquemática de las interacciones entre los GFLs y sus co-receptores, obtenidas a través de estudios *in vitro*. Las líneas gruesas representan las interacciones preferidas o de mayor afinidad, mientras que las finas indican

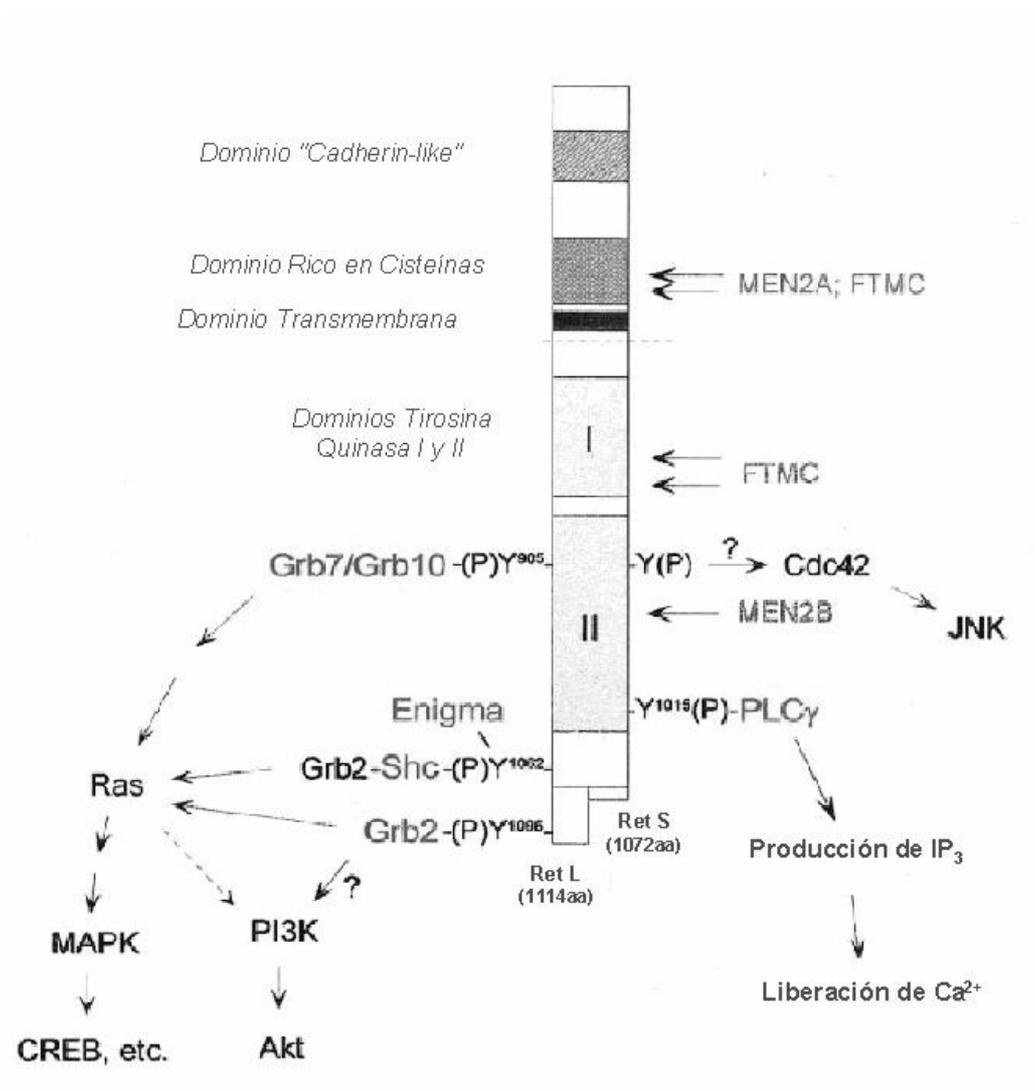
interacciones alternativas para las que no se ha demostrado, sin embargo, su relevancia *in vivo*. (Adaptado de Baloh et al., 2000).

Por otra parte, experimentos realizados en líneas celulares apuntan a que tanto GDNF como NRTN son igualmente eficaces a la hora de provocar la fosforilación de Ret vía GFR $\alpha$ 1 (Baloh et al., 1997; Jing et al., 1997), mientras que NRTN es de 30 a 100 veces más potente que GDNF activando Ret vía GFR $\alpha$ 2 (Baloh et al., 1997; Jing et al., 1997). Sin embargo, en neuronas simpáticas microinyectadas el GDNF puede promover, a altas concentraciones, su supervivencia vía GFR $\alpha$ 2, mientras que la NRTN es incapaz de hacer lo mismo vía GFR $\alpha$ 1 (Buj-Bello et al., 1997). Por último, las neuronas dopaminérgicas, que expresan GFR $\alpha$ 1 y no GFR $\alpha$ 2, sobreviven de manera similar con GDNF o NRTN *in vivo* e *in vitro* (Horger et al., 1998). Así pues, el conjunto de reacciones cruzadas entre los diferentes GFLs y sus co-receptores parece depender tanto de la presencia de Ret como del tipo celular examinado. Los estudios realizados con ratones “knockout” para GDNF, NRTN, GFR $\alpha$ 1 y GFR $\alpha$ 2, no obstante, parecen indicar que a grandes rasgos las interacciones preferidas (GDNF-GFR $\alpha$ 1, NTRN-GFR $\alpha$ 2) por estos ligandos y sus receptores son las que realmente juegan un papel importante *in vivo*, dado que el fenotipo de los ratones carentes de un determinado ligando es comparable al del “knockout” para su receptor preferido. Una excepción a esto lo constituyen las neuronas del DRG, cuya pérdida es más severa en ratones GDNF<sup>-/-</sup> que en ratones GFR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup>, sugiriendo que GDNF puede estar promoviendo la supervivencia vía otro co-receptor, presumiblemente GFR $\alpha$ 2 (revisado por Baloh et al., 2000).

#### **5.4.3. Vías de señalización activadas por Ret**

Dado que Ret fue un receptor huérfano durante mucho tiempo, gran parte de los estudios que han establecido las vías de señalización activadas por él se han realizado con formas oncogénicas o quiméricas (generalmente proteínas de fusión con el dominio extracelular del receptor de EGF) de este receptor. Así, se sabe que de los 14 residuos de tirosina del dominio

intracelular de la forma larga de Ret, cuatro actúan como sitios de unión a proteínas adaptadoras cuando son fosforilados por el propio receptor. La Tyr<sup>905</sup> es la responsable de la unión a Grb7/Grb10, la Tyr<sup>1015</sup> se une a PLC $\gamma$ , la Tyr<sup>1062</sup> lo hace a Shc y a Enigma, y la Tyr<sup>1096</sup> a Grb2 (Borrello et al., 1996; Durick et al., 1996; Liu et al., 1996; Arighi et al., 1997; Lorenzo et al., 1997; Ohiwa et al., 1997; Alberti et al., 1998; Xing et al., 1998) (Figura 10). Por otro lado, la forma corta de Ret carece de dos tirosinas en el dominio C-terminal, una de las cuales es la Tyr<sup>1096</sup>. Ret activa diferentes vías de señalización intracelular típicas de los receptores tirosina quinasa, incluyendo la vía Ras-MAPK (Santoro et al., 1994; Worby et al., 1996), la vía PI 3-K (van Weering et al., 1997), la JNK (Jun N-terminal kinase) (Chiarello et al., 1998; Xing et al., 1998) y la PLC $\gamma$  (Borrello et al., 1996). La contribución relativa de cada una de estas vías en los procesos de supervivencia, diferenciación o proliferación está peor caracterizada que en otros factores tróficos como las neurotrofinas. Sin embargo, se sabe que la señalización por PI 3-K (posiblemente de forma independiente de su substrato Akt) parece estar implicada en la formación de lamelipodios (van Weering et al., 1997) y en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas *in vitro* (Pong et al., 1998). GDNF puede, por otra parte, activar la JNK a través de Cdc42 (Chiarello et al., 1998), fenómeno relacionado con la supervivencia neuronal en otros sistemas (revisado por Kaplan and Miller, 2000). Por otra parte, tanto PLC $\gamma$  como Akt parecen jugar un importante papel en la propagación de la actividad oncogénica de Ret (Borrello et al., 1996; Segouffin-Cariou and Billaud; 2000). Por último, el papel de la proteína Enigma es desconocido, aunque su secuencia sugiere que puede estar relacionada con la localización de Ret en zonas específicas de la membrana plasmática (Durick et al., 1998). Recientemente se ha descubierto que Ret puede activar Src de una manera dependiente de fosfotirosina, y que esta activación es necesaria para la capacidad transformante de Ret (Melillo et al., 1999).



**Figura 10.** Vías de señalización activadas por Ret. Se indican los dominios principales del receptor, así como las fosfotirosinas responsables de la unión de las proteínas adaptadoras que se unen al receptor activado. Adaptado de Airaksinen et al., 1999.

#### 5.4.4. Señalización independiente de Ret

Aunque Ret es normalmente co-expresado con uno o varios GFR $\alpha$ s, existen algunas regiones del cerebro y algún tipo celular como las células de Schwann en que los GFR $\alpha$ s son expresados en ausencia de Ret. Este dato sugiere bien que Ret pueda interactuar con formas solubles de los GFR $\alpha$ s (Naveilhan et al., 1997) o *en trans* (Trupp et al., 1997). Alternativamente, los

GFR $\alpha$ s pueden ser capaces de señalizar en ausencia de Ret. Existe cierta controversia sobre la relevancia *in vivo* de estos mecanismos alternativos de señalización. Saarma y colaboradores abogan por un modelo de señalización independiente de Ret, en el cual las moléculas de GFR $\alpha$ , que se encuentran concentradas en microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos conocidos como "lipid rafts" (Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 1998; 2000), pueden responder a GFLs activando a las quinasas de la familia de Src, que también se hallan localizadas en estos dominios, aunque en la cara interna de la membrana plasmática (ver Airaksinen et al., 1999). Por el contrario, recientemente se ha propuesto un modelo *in vitro* en el que los GFR $\alpha$ s actuarían reclutando, de manera dependiente de ligando, a Ret a estos microdominios, pero en el que la señalización, y por tanto los efectos biológicos, independientes de Ret serían muy ineficientes (Tansey et al., 2000). En cualquier caso, se requerirá un análisis detallado de los knockout de Ret y los GFR $\alpha$ s para validar o reconciliar estas hipótesis en principio contradictorias.

#### **5.4.5. Los ratones knockout para los GFLs y sus receptores**

Al igual que los ratones Ret<sup>-/-</sup>, tanto los animales GDNF<sup>-/-</sup> como los GFR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> presentan agénesis del riñón y pérdida de las neuronas entéricas distales al estómago, muriendo poco después del nacimiento (Schuchardt et al., 1994; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996; Cacalano et al., 1998; Enomoto et al., 1998). Existen varias líneas de evidencia que sugieren que el sistema GDNF-GFR $\alpha$ 1-Ret es crítico para el mantenimiento y/o la proliferación de los precursores de las neuronas entéricas. En primer lugar, Ret se expresa en los precursores de estas células, en segundo lugar, experimentos *in vitro* demuestran que el GDNF modula la supervivencia y proliferación de estos precursores, y en tercer y último lugar, en el tubo digestivo de los ratones Ret<sup>-/-</sup> se observa un alto número de células apoptóticas no observado en animales control. Respecto a la ausencia de riñones, el patrón de expresión de GDNF, GFR $\alpha$ 1 y Ret sugiere que este factor actúa como un verdadero factor derivado de diana. Además, parece ser que GDNF está presente en cantidades limitantes, ya que el 30% de los ratones GDNF<sup>+/-</sup>

presentan un único riñón, mientras que ambos están presentes tanto en animales  $GFR\alpha1^{+/-}$  como en los  $Ret^{+/-}$ .

Al margen de los defectos en neuronas entéricas, los animales deficientes en GDNF o  $GFR\alpha1$  muestran pérdidas en subpoblaciones de neuronas sensoriales del DRG y el ganglio nodoso, aunque no se han caracterizado con exactitud las mismas. Contrariamente a los animales  $Ret^{-/-}$ , en los que existe una pérdida del 100% de neuronas del ganglio cervical superior (SCG), en animales  $GDNF^{-/-}$  solo existe un 35%, lo que sugiere que otros factores de la familia (presumiblemente ARTN, ver más adelante) participan en la génesis y mantenimiento de este ganglio.

Contrariamente a los ratones deficientes en GDNF o  $GFR\alpha1$ , el fenotipo de los knockout para NRTN o  $GFR\alpha2$  es poco severo. Los animales son viables, no muestran ningún defecto severo en su desarrollo y son fértiles (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999). Respecto a las neuronas entéricas, presentan una disminución en la densidad del plexo mientérico, lo que se traduce en un déficit de la función contráctil (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999). Esto, junto con el hecho de que las neuronas entéricas expresan  $GFR\alpha1$  en periodos tempranos del desarrollo embrionario, para pasar a expresar predominantemente  $GFR\alpha2$  varias semanas después de nacer, sugiere que el sistema NRTN- $GFR\alpha2$  es importante para el mantenimiento del sistema nervioso entérico, o bien para su desarrollo tardío.

El co-receptor  $GFR\alpha2$  se expresa en los ganglios sensoriales, y la NRTN promueve la supervivencia de una subpoblación de neuronas del DRG y de las neuronas del ganglio trigémino en cultivo. Aunque no hay un descenso global en el número de neuronas de estos ganglios en los animales  $NRTN^{-/-}$  y  $GDNF^{-/-}$ , el número de células expresasoras de  $GFR\alpha2$  se ve drásticamente reducido o es nulo en ratones  $NRTN^{-/-}$ , lo cual sugiere bien que la subpoblación que muere en estos animales es pequeña o que por algún motivo dejan de expresar el co-receptor.

La única deficiencia observable macroscópicamente en animales  $NRTN^{-/-}$  o  $GFR\alpha2^{-/-}$  es una ptosis (caída de los párpados) resultante de la ausencia de inervación parasimpática de la glándula lacrimal. Además, ambos animales presentan ausencia de inervación parasimpática en la glándula

submaxilar, y presentan un número reducido de neuronas en el ganglio submaxilar. Dado que NRTN se expresa en las glándulas lacrimales y submaxilares en desarrollo, y que Ret y GFR $\alpha$ 2 son expresados en los ganglios parasimpáticos, parece ser que NRTN actúa como un verdadero factor derivado de tejido diana para estas neuronas. Esta fue la primera demostración experimental de un factor neurotrófico para las neuronas parasimpáticas.

Actualmente se conoce sólo el fenotipo de los ratones GFR $\alpha$ 3<sup>-/-</sup> (Nishino et al., 1999), y curiosamente estos también presentan ptosis, aunque por razones totalmente distintas a los anteriores. En este caso, el defecto se debe a una falta de inervación simpática del músculo tarsus, derivada de un severo defecto en el desarrollo del ganglio cervical superior (SCG). Efectivamente, en estos animales el ganglio se halla en posición caudal respecto a los animales normales, debido a un defecto en la migración de las neuronas del mismo durante el desarrollo. Dado que las células de este ganglio mueren con un curso temporal similar a las de los ratones NGF<sup>-/-</sup> o TrkA<sup>-/-</sup>, se hipotetiza que la incapacidad de estas células para acceder al NGF derivado del músculo, debido a la incorrecta migración de sus precursores, es la causa última de la pérdida neuronal observada en el SCG de los ratones GFR $\alpha$ 3<sup>-/-</sup>.

Sorprendentemente, y pese a que este co-receptor se expresa a niveles altos en muchos ganglios periféricos durante el desarrollo, los animales GFR $\alpha$ 3<sup>-/-</sup> no presentan déficits en otros ganglios.

En la tabla II se resumen los déficits más importantes en los ratones knockout para los GFLS y sus receptores.

	Ret <sup>-/-</sup>	GFR $\alpha$ 1 <sup>-/-</sup>	GDNF <sup>-/-</sup>	GFR $\alpha$ 2 <sup>-/-</sup>	NRTN <sup>-/-</sup>	GFR $\alpha$ 3 <sup>-/-</sup>
<b>SNC</b>						
<i>Dopaminérgico</i>						
Substantia nigra	ND	ns	ns	ncd	ncd	ND
<i>Motor</i>						
Trigémino	ND	22% pérdida	19% pérdida	ND	ND	ND
Espinal	ND	24% pérdida	22-31% pérdida	ND	ND	ND
<b>PNS</b>						
<i>Sensorial</i>						
Trigémino	ND	ns	ns	↓ respuesta a NRTN	↓ neuronas GFRa2	ns
Nodoso	ND	0-15% pérdida	40% pérdida	ns	ns	ND
DRG	ND	ns	23% pérdida	ns	↓ neuronas GFRa2	ns
<i>Autónomo</i>						
Simpático						
SCG	100% pérdida	ns	35% pérdida	ns	ns	20-40% pérdida (P1), 100% (P60)
<i>Parasimpático</i>						
Ciliar	ND	ND	ND	ncd	50% pérdida	ND
Submaxilar	ND	ND	ND	81% pérdida	45% pérdida	ncd
Esfenopalatino	ND	ND	ND	Pérdida inervación tejidos diana		ND
Otíco	ND	ND	ND			ND
<b>SNE</b>	100% pérdida neuronas distales al estómago	100% pérdida neuronas distales al estómago		Disminución densidad y actividad plexo mientérico		ncd
<b>Otros déficits</b>	Agénesis o disgénesis del riñón	Agénesis o disgénesis del riñón		Retraso en el crecimiento	(Crecimiento normal)	(Crecimiento normal)
<b>Viabilidad</b>	Letal	Letal	Letal	Viable	Viable	Viable

Tabla II. Resumen de los déficits en el desarrollo de los ratones knockout para Ret, GFLs y GFR $\alpha$ s. ND: No determinado; ns: diferencia no significativa; ncd: déficits no aparentes (no contados). SNE: Sistema nervioso entérico. Adaptado de Baloh et al., 2000.

## **5.5. Vías de señalización intracelular implicadas en la supervivencia neuronal**

### **5.5.1. Ras es un mediador de la supervivencia neuronal**

Como se ha comentado anteriormente, Ras es una proteína clave implicada en la transducción de una serie de estímulos capaces de promover proliferación, diferenciación o supervivencia. En el caso de la supervivencia neuronal, el uso de anticuerpos bloqueantes contra Ras demostró que esta proteína era necesaria para la supervivencia mediada por neurotrofinas en neuronas sensoriales de pollo (Borasio et al., 1993) y simpáticas de rata (Nobes and Tolkovsky, 1995). Curiosamente, en el primer estudio se halló que las neuronas simpáticas de pollo mantenidas con NGF no utilizaban Ras como mediador de la supervivencia, lo que sugiere que existen diferencias inter-específicas así como entre tipos celulares. Posteriormente, el uso de dominantes negativos de Ras ha confirmado que su activación es necesaria para la supervivencia de neuronas simpáticas de rata mediada por NGF (Mazzoni et al., 1999). A la inversa, las formas activas de Ras promueven la supervivencia independiente de factor trófico, demostrando que Ras puede ser necesario y suficiente en determinados modelos (Borasio et al., 1989; Vogel et al., 1995).

Sin embargo, Ras no parece mediar sus efectos sobre la supervivencia directamente, si no que lo hace a través de dos de sus efectores más relevantes, la PI 3-K y las MAPK.

### **5.5.2. La vía PI-3 K/Akt y la supervivencia neuronal**

El primer trabajo en el que se demostró que la actividad enzimática de la PI-3 K era necesaria para la supervivencia neuronal se debe a Yao y Cooper (1995). En ese estudio, mediante la utilización de los inhibidores específicos de PI-3 K Wortmanina y LY294002, se demostró que el bloqueo de la actividad PI-3 K resulta en la reversión de la supervivencia mediada por NGF en células PC12. Además, transfectando estas células con receptores de PDGF mutados en la tirosina crítica para la unión a PI-3 K, los autores demostraron que la

activación de éste enzima era necesaria para la inducción de supervivencia por PDGF. Posteriormente, se puso en evidencia que estos efectos podían ser explicados en última instancia por la activación de Akt, la cual era necesaria y suficiente para la supervivencia de neuronas granulares del cerebelo (Dudek et al., 1997). Actualmente existe una considerable evidencia experimental a favor de que PI-3 K, a través de su efector Akt, es capaz de regular la supervivencia mediada por neurotrofinas y otros factores neurotróficos (como por ejemplo IGF-I) en diferentes poblaciones, incluyendo neuronas simpáticas, cerebelares, sensoriales, corticales y motoneuronas (Crowder and Freeman, 1998, D'Mello et al., 1997; Barlett et al., 1997; Vaillant et al., 1999; Klesse et al., 1998; Virdee et al., 1999; Hetman et al., 1999; Dolcet et al., 1999). Sin embargo, no todos los estudios realizados llegan a esta conclusión. En concreto, existe cierta controversia respecto a si la actividad PI-3 K es necesaria para la supervivencia de neuronas de ganglio cervical superior mediada por NGF. En este sentido, Philpott y colaboradores afirman que el bloqueo de la actividad PI-3 K no reduce la supervivencia debida a NGF (aunque un mutante constitutivamente activo es capaz de rescatar a las neuronas de privación de este factor) (Philpott et al., 1997), mientras que otros trabajos afirman que PI-3 K es necesaria para la supervivencia debida a NGF (Crowder y Freeman, 1998; Mazzoni et al., 1999).

La vía PI-3 K/Akt no solo es responsable de la supervivencia neuronal mediada por factores tróficos, sino que parece estar ligada, al menos en algunos modelos, a la supervivencia debida a despolarización crónica de la membrana plasmática (Blair et al., 1999; Crowder y Freeman, 1998; Miller et al., 1997a; Vaillant et al., 1999). En este último trabajo, y dado que concentraciones subóptimas de NGF y KCl parecen actuar sinérgicamente en la activación de Akt, los autores hipotetizan que aquellas neuronas que durante el desarrollo estuvieran sometidas a concentraciones subóptimas de neurotrofinas, pero que presentasen actividad eléctrica, tendrían ventaja para sobrevivir respecto a aquellas que se mantuvieran inactivas (Vaillant et al., 1999).

Asimismo, el papel que la vía PI-3 K/Akt juega en la supervivencia celular no sólo se reduce a modelos neuronales, sino que otros tipos celulares, como oligodendrocitos mantenidos con NT-3, PDGF o IGF-I (Vemuri and

McMorris, 1996) o células hematopoyéticas mantenidas con SCF o IL-3 (Blume-Jensen et al., 1993) también dependen de la actividad de ella para su supervivencia. Además, la vía es capaz de antagonizar la apoptosis inducida por radiación ultravioleta (Kulik et al., 1997; Ulrich et al., 1998), exposición a agentes oxidantes (Spear et al., 1997), sobreexpresión de c-myc (Ulrich et al., 1998; Kennedy et al., 1997; KauffmannZeh et al., 1997) o pérdida de adhesión al substrato (anoikis) (Khwaja et al., 1997). Por último, parece ser que ciertos estímulos proapoptóticos, como por ejemplo el  $TNF\alpha$ , ejercen al menos de manera parcial sus acciones mediante la inhibición directa de la vía PI-3 K/Akt, un concepto que se ha denominado SOSS ("silencing of survival signals") (revisado en Venter et al., 2000).

Una hipótesis sencilla para explicar estos efectos pasaría por la fosforilación, directa o indirecta, de componentes de la maquinaria apoptótica por parte de Akt. Esta hipótesis se vio reforzada tras el establecimiento de la secuencia consenso de fosforilación *in vitro* de Akt, y la constatación de que ésta se hallaba presente en varias familias de proteínas implicadas en el proceso apoptótico, incluyendo homólogos de *ced-9*, *ced-4*, *ced-3* e IAPs (ver Datta et al., 1999). Recientemente se han propuesto tres de estos substratos cuya fosforilación por parte de Akt inhibiría los procesos apoptóticos, BAD, caspasa 9 y FRKHL1.

#### **5.5.2.1. Bad**

Bad es un miembro proapoptótico de la familia de bcl-2, que en ausencia de factores tróficos se halla unido a bcl-2 o bcl-X<sub>L</sub>, inhibiendo así la función antiapoptótica de éstos (Zha et al., 1996). Cuando Bad es fosforilado bien en la Ser-112 o en la Ser-136, es secuestrado por miembros de la familia de proteínas adaptadoras 14-3-3, acumulándose en el citoplasma, lejos de su lugar de acción en la membrana mitocondrial. De acuerdo con este modelo, la expresión de mutantes de Bad deficientes en estos sitios de fosforilación es suficiente para incrementar la apoptosis (Zha et al., 1996). Posteriormente se ha demostrado que Akt es capaz de fosforilar a Bad en la Ser-136 tanto *in vitro* como cuando es sobreexpresada junto con Bad en diversos sistemas celulares (Datta et al., 1997; DeIPeso et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998; Wang et

al., 1999). Además, el “pool” endógeno de Bad resulta fosforilado en células 3T3 sobrepresoras de un mutante constitutivamente activo de Akt (Datta et al., 1997). Por último, cuando Bad y Akt son sobrepresados son capaces de coimmunoprecipitar (Datta et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998). Sin embargo, pese a la considerable evidencia derivada de modelos de sobrepresión o trabajos *in vitro*, el único caso en el que se ha demostrado que Akt endógena puede fosforilar a Bad endógeno es en neuronas granulares del cerebelo expuestas a BDNF (Bonni et al., 1999).

Con respecto a las consecuencias funcionales de la fosforilación de Bad por Akt en la Ser-136, nuevamente existe un cuerpo de evidencias experimentales, basadas en experimentos de sobrepresión, que indican que ésta tiene un efecto inhibitorio de la apoptosis. Por ejemplo, un mutante activo de Akt puede bloquear la apoptosis inducida por Bad en una variedad de tipos celulares, mientras que la cotransfección de Akt con una forma de Bad no fosforilable en el residuo Ser-136 no es capaz de rescatarla (Datta et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998; Wang et al., 1999). Sin embargo, como en el caso anterior, la relevancia *in vivo* de este mecanismo es controvertida dado que el knockout de Bad no presenta alteraciones en la apoptosis (Shindler et al., 1998), mientras que Bax, otro miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2, parece ser esencial para la muerte de neuronas cerebelares y simpáticas *in vivo*, como se deduce de estudios en ratones knockout para esta proteína (Miller et al., 1997b, Deckwerth et al., 1996).

#### **5.5.2.2. Caspasa 9**

Una de las observaciones que llevó a la identificación de nuevos substratos de Akt consistió en la demostración de que Akt podía inhibir la muerte celular incluso después de la salida de citocromo C de la mitocondria. En lisados provenientes de líneas celulares sobrepresoras de Ras o Akt, la adición de citocromo C no inducía activación de caspasas (Cardone et al., 1998). Dado que la diana mejor conocida del citocromo C es el apoptosoma, era razonable pensar que Akt podría mediar la fosforilación de alguno de sus componentes. De hecho, en el anterior trabajo se demostró que Akt era capaz de fosforilar a la procaspasa 9 en la Ser-196, previniendo el autoprosesamiento

de la misma, e inhibiendo así la apoptosis (Cardone et al., 1998). No obstante, la ausencia del sitio consensus de fosforilación para Akt en las procaspasas 9 no humanas (Fujita et al., 1999), así como la falta de datos experimentales en los que se demuestre la fosforilación de procaspasa 9 endógena por Akt en neuronas, indican que éste puede no ser un mecanismo universal de inhibición de apoptosis por Akt.

### 5.5.2.3. FKHRL1

La tercera diana propuesta de Akt es el factor de transcripción FKHRL1 (Forkhead 1). Desde hace tiempo se sabe que muchos tipos celulares requieren síntesis macromolecular para la ejecución del programa apoptótico. Por ejemplo, la apoptosis neuronal derivada de la deprivación trófica es bloqueada por agentes que inhiben la transcripción o la traducción (Galli et al., 1995; Miller and Johnson, 1997). De entre los genes candidatos cuya expresión sería necesaria para la muerte apoptótica destacaría Bax (Miyashita et al., 1994; Zhan et al., 1994; Miyashita and Reed; 1995) o los genes que codifican para Fas, FasL o TNF $\alpha$  (Sung et al., 1991; Rhoades et al., 1992; Dockrell et al., 1998; Faris et al., 1998; Li-Weber et al., 1998; Le-Niculescu et al., 1999). El concepto de que Akt podría modificar la expresión génica mediante la fosforilación de factores de transcripción surge de dos observaciones independientes. En primer lugar, la activación de Akt por factores de crecimiento conlleva translocación nuclear de ésta (Andjelkovic et al., 1997; Meier et al., 1997). La segunda evidencia, de tipo genético, proviene de la observación de que en *C.elegans* la vía PI 3-K/Akt antagoniza la función del factor de transcripción DAF-16, que contiene dianas consensus de fosforilación por Akt (Paradis and Ruvkun, 1998). Los ortólogos de DAF-16 en mamíferos, FKHR, FKHRL1 y AFX contienen también estos sitios de fosforilación, y recientemente se ha demostrado que son eficientemente fosforilados por Akt *in vitro*, cuando Akt es sobreexpresada, y tras estimulación con IGF-I (ver Datta et al., 1999). Además, la expresión ectópica de un mutante de FKHRL1 que carece de la Thr-32 y la Ser-315, dos sitios de fosforilación de Akt, revierte el rescate por IGF-I en neuronas cerebelares en cultivo (Brunet et al., 1999). El mecanismo de inactivación funcional de FKHRL1 por Akt propuesto por estos

autores pasa por la retención citoplasmática de este factor de transcripción cuando está fosforilado, ya sea mediante la inhibición de su translocación a núcleo, el aumento de su exportación desde el núcleo o la retención en el citoplasma por 14-3-3. El hallazgo de que FKHRL1 puede unirse a sitios presentes en el promotor de FasL, induciendo la expresión de genes “reporter” bajo este promotor (Brunet et al., 1999), junto con el hecho de que la expresión de FasL es necesaria y suficiente para la muerte neuronal por privación (Le-Nicolescu et al, 1999), indican que Akt bloquearía al menos en parte el proceso apoptótico fosforilando e inactivando FKHRL1, y por tanto bloqueando la expresión de FasL. Esta correlación se demostró causalmente al comprobar que la muerte inducida por el mutante en los lugares de fosforilación de FKHRL1 era inhibida por la adición de receptores Fas solubles, que actúan como “decoy receptor” para el FasL recién sintetizado (Brunet et al., 1999).

#### **5.5.2.4. GSK3 $\beta$**

Por último, recientemente se ha descrito la participación de una de las dianas de fosforilación de Akt, la GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase -3 $\beta$ ) en el proceso apoptótico. En neuronas corticales, diferentes estímulos apoptóticos, como la retirada de suero o la inhibición de PI 3-K, inducen una activación de la GSK3 $\beta$ , que precede a la muerte apoptótica. Además, la expresión de un dominante negativo o de una proteína inhibitoria de la GSK3 $\beta$  reduce la muerte provocada por los anteriores estímulos, mientras que la sola expresión de GSK3 $\beta$  causa apoptosis (Hetman et al., 2000). Aunque no se conocen los mecanismos mediante los que esta quinasa provoca la muerte, se cree que éstos no incluyen la fosforilación y desestabilización de  $\beta$ -catenina, una de las dianas de GSK3 $\beta$  (Hetman et al., 2000).

### 5.5.3. La vía MEK/MAPK y la supervivencia neuronal

Otro de los efectores de Ras candidatos para la mediación de sus efectos sobre la supervivencia neuronal son las ERKs, a través de la cascada de quinasas Raf-MEK. En PC12 diferenciadas con NGF, así como en neuronas del ganglio cervical superior, la activación de MEK es *suficiente* para prevenir la muerte por privación de NGF (Xia et al., 1995; Klesse et al., 1999), posiblemente antagonizando la función de la JNK ("c-jun N-terminal kinase") (Xia et al., 1995), cuya activación parece señalar muerte tras privación de factores neurotróficos en neuronas (Estus et al., 1994). Sin embargo, la mayoría de evidencias apuntan a que la activación de la vía MEK/MAPK no es *necesaria* para la supervivencia neuronal mediada por agentes como el NGF o el cAMP, dado que su inhibición tiene repercusiones mínimas sobre este efecto biológico (Creedon et al., 1996; Virdee et al., 1996; Klesse et al., 1999; Mazzoni et al., 1999). Existe, sin embargo, un trabajo en el que se apunta que tanto la actividad PI 3-K como la actividad ERK son necesarias para la supervivencia de células PC12 diferenciadas con NGF mediada por IGF-I (Párrizas et al., 1997), indicando que diferentes factores tróficos pueden utilizar o no la vía para ejercer sus efectos de supervivencia (ver discusión). Los mecanismos mediante los que la vía MEK/MAPK promueve supervivencia parecen estar centrados en la inducción de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como bcl-2 o el factor de transcripción CREB. Se sabe que el NGF promueve un incremento en los niveles de bcl-2 en neuronas simpáticas (Aloyz et al., 1998), a través de un aumento de su expresión vía MEK/MAPK (Liu et al., 1999). Además, CREB es necesario y suficiente para la supervivencia de neuronas simpáticas estimuladas con NGF, siendo bcl-2 una de las dianas transcripcionales de CREB (Riccio et al., 1999). La activación de CREB por factores tróficos como el BDNF probablemente tiene lugar a través de su fosforilación en la Ser133, y se sabe que una de las proteínas capaces de fosforilarlo en este residuo es Rsk, que a su vez está activada por las MAPK de tipo ERK (Bonni et al., 1999). Por último, recientemente se ha descrito que Bad puede ser fosforilado en la Ser112 mediante un mecanismo dependiente de MEK (Scheid et al., 1999; Fang et al., 1999), y que esta fosforilación es indispensable para su disociación de bcl-X<sub>L</sub> (Scheid et al., 1999) y por tanto para la inhibición del efecto pro-apoptótico de Bad.

#### **5.5.4. La vía MEK/MAPK y la diferenciación neuronal.**

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los estudios centrados en las vías de transducción de señal mediadas por Trk se han realizado en la línea celular derivada de feocromocitoma de rata PC12 (Greene and Tischler, 1976). Cuando se exponen a NGF, las células PC12 experimentan varios ciclos de replicación, para después diferenciarse en células postmitóticas que en muchos aspectos recuerdan a las neuronas simpáticas (Greene and Tischler, 1982). Este efecto de diferenciación del NGF contrasta con el de otros factores de crecimiento, como por ejemplo el EGF, cuya actividad más sobresaliente es la de estimular la división celular en PC12. La manera cómo una célula PC12 responde de una manera tan diametralmente diferente a uno u otro estímulo proporcionó un paradigma experimental ideal para estudiar las vías intracelulares de señalización implicadas en la diferenciación neuronal. Paradójicamente, NGF y EGF estimulan esencialmente las mismas vías de transducción de señal (Chao, 1992), al menos de forma cualitativa, ya que existen diferencias cuantitativas importantes entre el estímulo mitogénico y el estímulo diferenciador. Así, la estimulación con NGF produce un incremento persistente en los niveles de RasGTP, mientras que el incremento producido por EGF desaparece rápidamente (Muroya et al., 1992; Qiu and Green, 1992). De la misma forma, la activación de las ERKs por NGF es mucho más duradera que la misma activación inducida por EGF (Traverse et al., 1992; Nguyen et al., 1993; Qiu and Green, 1992).

Estas observaciones condujeron en un primer momento a hipotetizar que la activación sostenida de Ras estaba relacionada con la diferenciación neuronal, probablemente a través de las ERKs (Marshall, 1995a). Esta idea fue corroborada en experimentos en los que la expresión de las formas oncogénicas de Ras o de Raf estimulaba el crecimiento neurítico de la célula PC12 (Noda et al., 1985; Wood et al., 1993). Contrariamente, la microinyección de anticuerpos bloqueantes de Ras o la expresión de formas inactivas de Ras (RasN17), que interferían con la función normal de proteína endógena, inhibía

la diferenciación inducida por NGF (Hagag et al., 1986; Kremer et al., 1991; Szeberenyi et al., 1990). Además, dominantes negativos de MEK bloqueaban la respuesta diferenciadora inducida por NGF, mientras que mutantes constitutivamente activos de MEK eran capaces de inducir diferenciación en PC12, aunque de una manera no tan prominente en comparación con la inducida por NGF (Cowley et al., 1994; Fukuda et al., 1995). Otro abordaje más reciente ha sido la utilización de inhibidores farmacológicos selectivos de la actividad MEK. Uno de ellos, denominado PD98059 ha sido ampliamente utilizada para estudiar la relevancia de la vía MEK/MAPK en diferentes procesos (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995). La utilización del PD98059 en células PC12 estimuladas con NGF, bloquea completamente la diferenciación inducida por este factor sobre estas células, sugiriendo una vez más que la activación de las ERKs por NGF está implicada en la diferenciación de las células PC12 (Pang et al., 1995a).

Una idea atractiva para explicar por qué la activación sostenida de las ERKs induce diferenciación, parece estar relacionada con la acumulación de formas activas de estas proteínas en el núcleo celular. En todos los casos examinados, la activación sostenida de las ERKs provoca la localización masiva de las éstas en el núcleo, mientras que en un estímulo puntual sólo una proporción muy pequeña de las ERKs se localizan en este compartimento celular (Traverse et al., 1992; Traverse et al., 1994; Nguyen et al., 1993; Dikic et al., 1994; Marshall, 1995b). La acumulación de ERKs activas en el núcleo podría fosforilar durante mucho más tiempo factores de transcripción específicos. Así el NGF, pero no el EGF, podría modificar la expresión de los genes tardíos que codificarían para proteínas necesarias en la adquisición del fenotipo neuronal (Bonni et al., 1995).

Todos estos experimentos trazaban la vía Ras-Raf-MEK-ERK como la más relevante en la inducción de crecimiento neurítico en PC12 estimuladas con NGF. Sin embargo, la activación de las ERKs por si misma no explica todos los aspectos de la diferenciación neuronal, sugiriendo que deben existir vías alternativas implicadas en este proceso (Cowley et al., 1994; Vaillancourt et al., 1995; Kaplan and Stephens, 1994). En primer lugar, un mutante de Trk delecionado en el dominio yuxtamembrana de unión a SNT (aminoácidos 441-443, KFG) es incapaz de mediar el crecimiento neurítico en PC12, pese a que

el patrón de fosforilación de ERKs, Shc, PLC $\gamma$  y PI 3-K no está afectado (Peng et al., 1995). En segundo lugar, la activación de Raf, pero no la de MEK o ERKs resulta suficiente para el crecimiento neurítico en una línea celular derivada de células del hipocampo (Kuo et al., 1996), mientras que la activación sostenida de las ERKs es también insuficiente para la diferenciación por PDGF en PC12 sobrepresoras de PDGFR (Vaillancourt et al., 1995). Por último, el inhibidor de la MEK PD98059 no es capaz de revertir el crecimiento neurítico en neuronas sensoriales y simpáticas de pollo (Klinz et al., 1996). Recientemente se ha demostrado que la GTPasa Rap1, a través de los adaptadores Crk y su GEF C3G es la responsable de la activación sostenida de las ERKs (York et al., 1998). Pese a que la activación de la vía Crk/C3G/Rap1 es necesaria y suficiente para la inducción de ciertos parámetros de diferenciación neuronal como la expresión de canales de sodio o del gen transina en PC12, la expresión de RapN17, un dominante negativo de Rap1, no evita el crecimiento neurítico por NGF (York et al., 1998).

Se ha comprobado también que algunos aspectos relacionados con la diferenciación de las células PC12 están regulados por la PI 3-K. Se ha descrito que la inhibición de la PI 3-K bloquea la diferenciación celular inducida por el GDNF en células dopaminérgicas (Pong et al., 1998). Además, la fase tardía del crecimiento neurítico inducida por el tratamiento continuado con NGF en células PC12 se puede bloquear con inhibidores específicos de la PI 3-K (Kimura et al., 1994). Posteriormente, estos mismos autores han comprobado que la expresión de una forma constitutivamente activa de la PI 3-K es capaz de simular algunos aspectos, aunque no todos, de la diferenciación celular (Kobayashi et al., 1997).

Por lo tanto, todos estos resultados indican que la diferenciación neuronal está regulada por numerosos mecanismos, si bien las ERKs parecen estar implicadas en aspectos importantes de estos procesos.