



**Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Fisiología**

**“ROL DEL TRÁFICO ENDOCÍTICO EN LA SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA DEL  
RECEPTOR DE NEUROTROFINAS p75 EN UN MODELO DE NEURONAS DEL  
SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO”**

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Ciencias Fisiológicas.

Por:

**CAROLINA ANDREA CABEZA HUERTA**

**Tutor de tesis: Francisca Bronfman  
Comisión de tesis: Nelson Barrera  
Ricardo Moreno  
Christian González-Billault**

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor  
para mi hijo Julián,  
mis padres, María y Juan,  
mi hermana Paz,  
y mi sobrino Clemente.  
Los pilares de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente durante estos años.

A mis amigas y amigos, en especial a mis grandes compañeras de vida que estuvieron siempre para animarme y sostenerme, Rina, Elsa, Claudia, Domi, Mari, Angie y Vale.

A la Dra. Francisca Bronfman y su laboratorio por haberme recibido y creer en mi propuesta.

A la Pontificia Universidad Católica de Chile, por ser el lugar de mayor crecimiento profesional, y haber sido el escenario idóneo para conocer grandes colegas, que luego se transformaron en trementos amigos de vida.

Al financiamiento que permitió la realización de la esta tesis: Beca de Doctorado Nacional CONICYT 2012, Beca Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado CONICYT y Proyecto Núcleo Milenio en Biología Regenerativa 120003.

Y a Daniel, por su amistad y por haber vuelto en el momento preciso a mostrarme lo que realmente vale en la vida.

## INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice.....	4
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	11
Abreviaciones .....	12
Resumen.....	15
1. Introducción.....	18
1.1. Las Neurotrofinas y su importancia biológica.....	18
1.2. Receptores de Neurotrofinas.....	20
1.2.1. Receptores Trks.....	22
1.2.2. El receptor de neurotrofinas p75.....	23
1.3. Señalización, ligandos y correceptores de p75.....	25

1.4. Importancia del rol fisiológico de p75 durante el desarrollo del sistema nervioso simpático.....	28
1.5. Tráfico endocítico y su importancia en la señalización neurotrófica durante el desarrollo del sistema nervioso.....	34
1.5.1. El desafío de la comunicación intracelular en neuronas.....	34
1.5.2. Endocitosis y señalización neurotrófica: una pareja inseparable.....	35
1.5.3. La hipótesis del endosoma de señalización y su importancia en el desarrollo del sistema nervioso.....	37
1.6. Rabs GTPasas, reguladores maestros del tráfico endocítico.....	41
1.7. Señalización apoptótica de p75 y tráfico post-endocítico.....	47
1.7.1. Mecanismo de señalización apoptótica mediada por p75.....	47
1.7.2. Señalización apoptótica retrógrada mediada por p75.....	53
1.7.3. Tráfico endocítico de p75 y su relación con GTPasas.....	55
1.8. Propuesta de Investigación.....	58
1.9. Hipótesis.....	58
1.10. Objetivo General.....	58
1.10.1 Objetivos específicos.....	59
2. Materiales.....	58
2.1. Material Biológico.....	60
2.1.1. Animales.....	60
2.1.2. Líneas celulares.....	60
2.1.3. Cepas bacterianas.....	61
2.2. Reactivos.....	61

2.3. Anticuerpos.....	65
2.4. Microscopía.....	67
2.5. Softwares.....	68
3. Métodos.....	69
3.1 Cultivo de células.....	69
3.1.1. Cultivo primario masivo y compartimentalizado de neuronas simpáticas proveniente de los ganglios cervicales superiores.....	69
3.1.2. Cultivo de células HEK 293.....	71
3.2. Preparación y montaje de cámaras de microfluidos.....	71
3.2.1. Preparación cámaras de microfluidos.....	71
3.2.2. Montaje de cámaras de microfluidos.....	72
3.3. Transfección de células.....	72
3.3.1. Transfección de neuronas simpáticas.....	72
3.3.2. Transfección de células HEK 293.....	73
3.4. Transducción de células con adenovirus.....	74
3.5. Inmunofluorescencia.....	74
3.5.1. Inmunofluorescencia en cultivos masivos.....	74
3.5.2. Inmunofluorescencia en cultivos compartimentalizados.....	75
3.6. Inmunoendocitosis .....	76
3.6.1. Inmunoendocitosis de p75 en cultivos masivos.....	76
3.6.2. Ensayo de inmunoendocitosis de p75 y colocación de NRIF junto a Rabs GTPasas en cultivos compartimentalizados.....	77
3.7. Translocación nuclear de NRIF.....	78

3.8. Ensayo de activación de JNK.....	78
3.8.1. Activación de JNK en cultivos masivos.....	78
3.8.2. Activación de JNK en cultivos compartimentalizados.....	79
3.9. Ensayo de apoptosis mediante el clivaje de la caspasa-3.....	81
3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	82
3.11. Western blot.....	82
3.12. Cuantificación de niveles proteicos de Rab5 y Rab11.....	83
3.13. Co-inmunoprecipitación de p75 y Rab5 con esferas magnéticas M-280 (dynabeads M-280 sheep-anti mouse IgG) .....	84
3.14. Detección de la actividad de Rab5.....	85
3.14.1. Producción de proteína de fusión R5BD.....	85
3.14.2. Pull-Down y medición de la actividad de Rab5.....	87
3.14.3. Detección de Rab5-GTP por inmunofluorescencia.....	88
3.15. Ensayo de transporte retrógrado de p75 en presencia del inhibidor de JNK SP600125.....	89
3.15.1. Conjugación anticuerpo MC192 biotinilado con QDtos-605.....	89
3.15.2. Ensayo de transporte retrógrado de p75 en neuronas simpáticas.....	89
3.15.3. Registro en tiempo real de transporte retrógrado de p75.....	91
3.15.4. Procesamiento de imágenes y análisis.....	91
4. Resultados.....	92
4.1. Interacción de p75 y Rab5 en respuesta a BDNF.....	92
4.1.1. Los niveles proteicos de Rab5 no se ven afectados en respuesta a BDNF.....	92
4.1.2. Interacción entre p75 y Rab5 en respuesta a BDNF. ....	95

4.1.3. La activación de p75 por BDNF modula la actividad de Rab5. ....	97
4.1.4. El receptor p75 interactúa preferentemente con la forma activa de Rab5 .....	102
4.2. La actividad de Rab5 es requerida para la señalización apoptótica del receptor p75...	105
4.2.1. La internalización del receptor p75 no requiere de la actividad de Rab5.....	105
4.2.2. La actividad de Rab5 es necesaria para el clivaje de la caspasa-3.....	107
4.2.3. La translocación nuclear de NRIF requiere de la actividad de Rab5.....	111
4.2.4 BDNF induce una moderada colocalización de p75, NRIF y endosomas Rab5 <sup>+</sup> y Rab11 <sup>+</sup> .....	117
4.3. Importancia de la activación de JNK en la señalización apoptótica retrógrada inducida por BDNF mediante p75. ....	121
4.3.1. BDNF induce activación de JNK principalmente desde los axones distales de SCGs. ....	121
4.3.2. JNK participa en el transporte retrógrado de p75 inducido por BDNF.....	129
5. Discusión.....	133
5.1.- p75 interactúa con Rab5 y regula su actividad.....	133
5.2.- La actividad de Rab5 es requerida para la señalización apoptótica mediada por p75.....	136
5.3.- La activación de JNK ocurre mayoritariamente desde los axones, la cual es requerida para el transporte retrógrado de p75.....	141
6. Modelo.....	146
7. Figuras Suplementarias.....	147
8. Bibliografía.....	150

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura N°1. Las neurotrofinas y sus receptores.....	21
Figura N°2. Ligando y co-receptores del receptor p75.....	27
Figura N°3. Esquema resumido de la participación de neurotrofinas y sus receptores durante el desarrollo del sistema nervioso simpático.....	33
Figura N°4. Señalización apoptótica de p75 en SCGs.....	51
Figura N°5. Los niveles totales de Rab5 no son regulados por la activación de p75 mediante BDNF.....	94
Figura N°6. Interacción entre p75 y Rab5 es regulada por BDNF.....	96
Figura N°7. La actividad de Rab5 es modulada por la activación de p75 mediante BDNF.....	101
Figura N°8. El receptor p75 se asocia preferentemente con la forma activa de Rab5.....	103
Figura N°9. La actividad de Rab5 no es requerida para la internalización de p75.....	106
Figura N°10. La actividad de Rab5 es necesaria para el clivaje de la caspasa-3.....	109
Figura N°11. La actividad de Rab5 es necesaria para la translocación nuclear de NRIF.....	113

Figura N°12. La sobre-expresión de Rab5CA aumenta la translocación nuclear de NRIF y mantiene a p75 atrapado en endosomas gigantes Rab5 positivos. ....	115
Figura N°13. NRIF y p75 son cargo de endosomas Rab5 positivos en respuesta a BDNF.....	119
Figura N°14. NRIF y p75 son cargo de endosomas Rab11 positivos en respuesta a BDNF....	120
Figura N°15. La activación de JNK por BDNF ocurre mayoritariamente en los axones más que en el cuerpo celular de cultivos masivos de SCGs .....	123
Figura N°16. Cinética de la activación de JNK por BDNF en axones.....	125
Figura N°17. La activación de JNK por BDNF en axones distales de cultivos compartimentalizados de SCGs es bloqueada por el inhibidor farmacológico SP600125.....	127
Figura N°18. El transporte retrógrado de p75 en respuesta a BDNF requiere de la actividad de JNK.....	131
Figura N°19. Modelo del rol de p75 y BDNF en la señalización apoptótica retrógrada en SCGs.....	146
Figura Suplementaria N°1. La internalización de p75 se ve impedida al sobre-expresar el mutante p75-YXXθ.....	147
Figura Suplementaria N°2. La translocación nuclear de NRIF requiere de la internalización del receptor p75 inducida por BDNF.....	149

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla N°1 Medios de cultivos, suplementos y reactivos generales.....	61
Tabla N°2. Sales y soluciones.....	63
Tabla N°3. Kits.....	64
Tabla N°4. Anticuerpos primarios.....	65
Tabla N°5. Anticuerpos Secundarios y marcadores fluorescentes.....	66

## ABREVIACIONES

ADN:	Acido desoxiribonucleico
ARN:	Acido ribonucleico
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (factor de crecimiento derivado de cerebro)
BSA:	Bovine serum albumine (albúmina de suero bovino)
CA:	Constitutivamente activa
c-jun:	Protein encoded by the JUN gene (proteína c-jun)
DIV:	Días in vitro
DMEM	Dulbeco's modified Eagle's medium (medio de Eagle modificado por Dulbeco)
DN:	Dominante negativo
EDTA:	Ethylenediamine-tetra-acetic Acid (Ácido etilendiamin-tetra-acético)
EGF:	Epidermal growth factor (factor de crecimiento epidermal)
EGFR:	EGF receptor (receptor del factor de crecimiento epidermal)
ERK 1/2:	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2)
ERK 5:	Extracellular signal-regulated kinase 5 (quinasa regulada por señales extracelulares 5)
GDI:	Guanosine dissociation inhibitor (Inhibidoras de la disociación de guanosina)
GEF:	Guanine nucleotide exchange factors (Factor intercambiador de nucléotido de
GTP:	Guanosine triphosphate (Guanosina tri-fosfato)
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacín-etansulfónico)

hrs:	Horas
HRP:	Horseradish peroxidase (peroxidada de rabanito)
JNK:	c-Jun N-terminal kinase (quinasa c-Jun N-terminal)
kDa:	Kilo Dalton
M:	Molar
Map2:	Microtubule associated proteína 2 (proteína asociada a microtúbulos 2)
MAPK:	Mitogen-activated proteína kinase (proteína quinasa activada por mitógenos)
mg:	Miligramos
min:	Minutos
ml:	Mililitros
mM:	Milimolar
MVB:	Multivesicular bodies (cuerpos multivesiculares)
ng:	Nanogramos
NGF:	Nerve growth factor (factor de crecimiento nervioso)
NRIF:	Neurotrophin receptor interacting factor (factor de interacción del receptor de neurotrofina)
NT-3:	Neurotrophin 3 (neurotrofina 3 )
NT-4:	Neurotrophin 4 (neurotrofina 4)
p75:	Proteína de 75 kDa o receptor de NGF de baja afinidad
PBS:	Phosphate buffer saline (solución amortiguadora de sales de fosfato)
PC12:	Pheochromocytome cell line 12 (línea celular derivada de feocromocitoma de rata 12)
PFA:	Paraformaldehído
PI3K:	Phosphatidil-inoditol 3-kinase (Fosfatidilinositol 3-quinasa)
PLC $\gamma$ :	Phospholipase C-gamma (fosfolipasa C-gama)
SCGs:	Neuronas simpáticas del ganglio cervical superior
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SEM:	Standard error of the mean (error estándar de la media)
SFB:	Suero fetal bovino
siRNA:	Small interferente RNA
SNC:	Sistema nervioso central

SNP:	Sistema nervioso periférico
SP600125:	1,9-pyrazoloanthrone
Stp:	Streptavidine (estreptavidina)
TRAF6:	Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR))
Trf:	Transferrin (transferrina)
TfR:	Transferrin receptor (transferrina)
Trk A, B, C:	Tropomyosine related kinase receptors A, B, C (receptores de tirosina quinasa relacionados con tropomiosina A, B, C)
V:	Volumen
WB:	Western-blot
WT:	Wild-type (silvestre)
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros

## RESUMEN

Las neurotrofinas son factores tróficos solubles secretados tanto por las neuronas como por los tejidos que son inervados por ellas para el correcto establecimiento del SN. Estos factores ejercen sus funciones uniéndose a dos clases de receptores transmembrana: los receptores de alta afinidad tirosina quinasa Trks (A, B y C), los cuales poseen actividad autocatalítica en su dominio citoplasmático y unen de manera diferencial las neurotrofinas dependiendo de su afinidad; y el receptor p75, el cual se une a todas las neurotrofinas con similar afinidad, pero depende la asociación de proteínas adaptadoras que se unen a su dominio citoplasmático para poder llevar a cabo su señalización.

Durante el desarrollo del sistema nervioso simpático, p75 tiene un rol dual: promueve sobrevivencia junto a TrkA en respuesta a NGF, pero además induce apoptosis tras unir BDNF. En este periodo los factores positivos como NGF, son secretados en cantidades limitantes, por lo tanto existe una competencia por la obtención de los factores que aseguren la sobrevivencia y el crecimiento axonal. Aquellas neuronas que no logran obtener el suficiente NGF y así activar a TrkA, mueren tras unir BDNF; proceso mediado por p75. Por lo tanto, el balance de ambas señales regula el número de neuronas simpáticas y la correcta inervación del tejido y la apropiada conectividad del sistema.

Las neuronas al ser células polarizadas, durante el desarrollo una vez que alcanzan el blanco a inervar, tienen el desafío de poder comunicar desde los axones distales señales progresivas o positivas, o señales regresivas o negativas hacia el cuerpo celular, y viceversa, con el fin de asegurar su mantención y la conectividad del SN. Existen diversas evidencias que sugieren que el complejo NGF/TrkA una vez internalizado utiliza un endosoma de señalización retrógrado por el axón para señalar sobrevivencia y crecimiento, e influenciar eventos tanto en el cuerpo celular como en las dendritas. Sin embargo, se desconoce si el complejo p75/BDNF y su señalización apoptótica utiliza una estrategia similar.

La señalización apoptótica a través de p75 tiene como requisito la activación de la quinasa de estrés, JNK, y el procesamiento proteolítico del receptor. En respuesta a ligandos pro-apoptóticos, JNK aumenta la proteólisis del receptor al aumentar la expresión de ADAM17, enzima a cargo del primer corte proteolítico y liberar el fragmento extracelular de p75. Consecutivamente se realiza un segundo corte que libera el fragmento intracelular o ICD-p75. Este fragmento facilita la ubiquitinación de la proteína de unión al ADN, NRIF, por la ubiquitin-ligasa TRAF6, lo que resulta en la translocación nuclear de NRIF. Además, esto conduce a una segunda ola de activación de JNK. Todo esto es necesario para una señalización apoptótica a largo plazo de p75.

Un aspecto clave en la regulación de la señalización neurotrófica es el tráfico intracelular de sus receptores. Y para esto son las proteínas Rabs GTPasas los reguladores maestros del tráfico e identidad de membrana. Recientemente, hemos mostrado en neuronas simpáticas y células PC12, que p75 tras su internalización evade la ruta endo-lisosomal, acumulándose en dos poblaciones endosomales diferentes: endosomas Rab11+ y MVBs CD63+. Estos MVBs CD63 y p75 positivos constituyen una población de MVBs que son liberados como exosomas. En su tránsito hacia ambas rutas, p75 trafica por endosomas tempranos Rab5+ desde los cuales es destinado rápidamente a una de estas rutas endosomales. Sin embargo, esta interacción pareciera depender de la actividad de Rab5, ya que la expresión de una versión constitutivamente activa de Rab5 atrapa a p75 en endosomas tempranos, lo que aumenta la translocación nuclear de NRIF en respuesta a BDNF. Tenemos datos preliminares que indican que p75 requiere internalización para la señalización, sugiriendo la importancia de su tráfico y su paso por éstos endosomas. Además, hay evidencias en la literatura que muestran que p75 interactúa en endosomas con adaptadores intracelulares que regulan su señalización. Estos datos sugieren un rol clave de la internalización, tráfico post-endocítico y la participación de Rab5 en la señalización mediada por este receptor. Sin embargo hasta la fecha no hay estudios que muestren la relevancia del tráfico endocítico en la señalización apoptótica mediada por p75 tanto en el cuerpo celular como desde el terminal axonal.

Por esto, mi tesis tuvo como objetivo evaluar el rol del tráfico endocítico en la respuesta apoptótica de p75 en un modelo de neuronas simpáticas, específicamente la participación de la GTPasa Rab5. Proponiendo como hipótesis que existe una regulación funcional entre p75 y

Rab5. Evaluamos el impacto de la interrupción del tráfico de p75 en su señalización apoptótica tras unir BDNF en SCGs, utilizando un mutante dominante negativo de Rab5.

Nuestros resultados demostraron que p75 mantiene una interacción con Rab5 la cuál es dependiente de la activación del receptor por BDNF, pero que además el receptor modula la actividad de Rab5 en respuesta a BDNF, aumentando la presencia de Rab5 activa. Adicionalmente evaluamos que p75 se une de manera preferencial a la forma activa de Rab5. En esta dirección, la modulación de la actividad de Rab5 sería de vital importancia, ya que la actividad de Rab5 es requerida para desencadenar los eventos río debajo de la señalización apoptótica del receptor, tras unir BDNF, ya que en presencia de un mutante dominante negativo de Rab5, se inhiben tanto la translocación nuclear de NRIF, así como el clivaje de la caspasa-3. Ambos requisitos para desencadenar apoptosis por p75. Sin embargo, la actividad de Rab5 no sería un requerimiento para la internalización del receptor.

Adicionalmente nuestros resultados también muestran que existe una participación relevante de JNK en el tráfico post-endocítico del receptor mostrando por primera vez datos que sugieren que la activación de JNK en SCGs es mayoritariamente axonal. De esa manera JNK tendría un rol dual en la señalización del p75, permitiendo la internalización y posterior transporte de p75 y luego participar en el reclutamiento de distintos adaptadores como TRAF6 o la activación de caspasas para llevar a cabo la respuesta apoptótica en respuesta a BDNF.

Por lo tanto, los datos de esta tesis contribuyeron a dilucidar el rol de la GTPasa monomérica Rab5 en la señalización apoptótica del receptor p75, indicando que ambas proteínas tienen una relación funcional, y que p75 interactúa con Rab5 regulando su actividad de una manera dependiente de ligando lo cual es necesario para la señalización apoptótica en SCGs.

## 1.-INTRODUCCIÓN

### 1.1. Neurotrofinas y su importancia biológica

El término neurotrofina hace referencia a una familia de 4 proteínas homodiméricas con una estructura en común, cuya importancia es vital para la regulación del desarrollo, mantención y función del sistema nervioso de los vertebrados (Gary & Barde, 1996a).

La primera neurotrofina descubierta fue el Factor de Crecimiento Nervioso o NGF, por Rita Levi Montalcini y Stanley Cohen hace más de 6 décadas atrás (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951; Cohen, Levi-Montalcini, & Hamburger, 1954). En estos trabajos se describe a un factor difusible proveniente de los sarcomas de ratón 37 y 180, los cuales al ser trasplantados en embriones de pollos estimulaban el crecimiento selectivo de ganglios simpáticos y sensoriales. Hoy se reconoce a este factor difusible como un factor vital para la diferenciación y crecimiento de neuronas del sistema nervioso periférico, el cual juega un rol central en la hipótesis de los factores neurotróficos o hipótesis neurotrófica, la cual establece que durante el desarrollo del sistema nervioso los órganos blancos secretan cantidades limitantes de factores de sobrevivencia que aseguran la correcta inervación, tamaño y cantidad de inervaciones nerviosas (Bothwell, 1995; Huang & Reichardt, 2001).

Posteriormente, vinieron los descubrimientos y purificaciones de los otros 3 miembros que conforman la familia de las neurotrofinas: el factor derivado de cerebro (BDNF) (Barde et al., 1982), la neurotrofina 3 (NT-3) (Maisonpierre et al., 1990) y la neurotrofina 4 (NT-4/5) (Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992).

En la actualidad, existe una robusta colección de evidencias que indican que las neurotrofinas y sus receptores juegan un papel clave en la fisiología del sistema nervioso (Bothwell, 1995; Huang & Reichardt, 2001; Schweigreiter, 2006). Por ejemplo, la importancia de BDNF se evidencia cuando se evaluó el fenotipo de ratones nulos para BDNF, donde la mayoría de los mutantes homocigotos no son viables, mientras que la pequeña porción que logra sobrevivir muere a la semana de vida presentando anormalidades en sus movimientos como ataxia, sumado a un déficit importante en el tamaño y número de varias poblaciones neuronales periféricas, como sensoriales o simpáticas provenientes de los ganglios cervicales superior (SCGs), además de la reducción de grupos neuronales centrales (Jones et al., 1994). En el sistema nervioso central (SNC) se destaca su participación en la diferenciación axonal durante el desarrollo de neuronas hipocampales embrionarias, cuya secreción autocrina y posterior activación del receptor TrkB es fundamental para promover una alta actividad de cAMP/PKA en la neurita que posteriormente se transformará en axón (Cheng et al., 2011); sumado a su rol en la inducción de la arborización dendrítica de neuronas hipocampales, la cual depende del complejo BDNF/TrkB para regular el sistema endosomal a través de la actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11, incrementando la señalización local en dendritas y su comunicación hacia el cuerpo celular (Moya-Alvarado.,2018); así como también se destaca su importancia en la regulación de la arquitectura neuronal y la morfología de espinas dendríticas en una manera

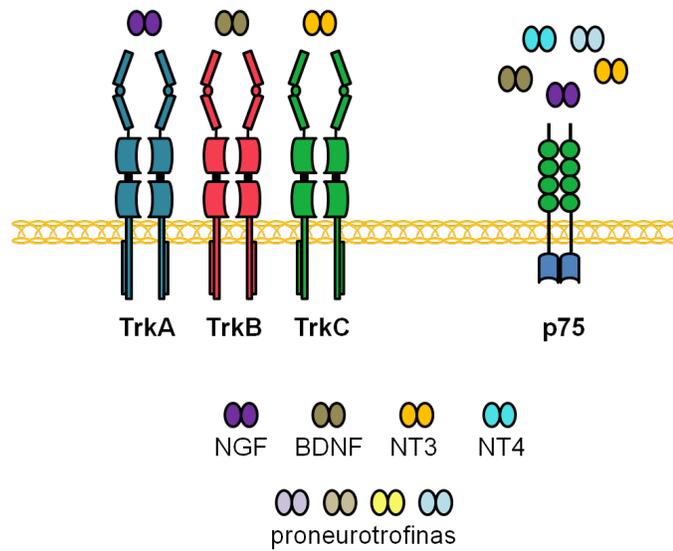
dependiente de actividad durante el desarrollo de neuronas pertenecientes a la corteza visual (McAllister et al., 1995).

Adicionalmente, la participación de BDNF en la regulación de la transmisión y plasticidad sináptica en neuronas hipocampales ha sido uno de los campos de gran interés dentro del área de las neurotrofinas (Leal et al., 2014; Lu et al., 2014), cuyos primeros trabajos originados en neuronas hipocampales, mostraron que ratones nulos para BDNF, presentan una reducción importante en la potenciación a largo plazo (LTP) (Korte et al., 1995) y que ésta puede ser reestablecida cuando se utiliza un vector viral para la incorporación de este gen en neuronas hipocampales de la capa CA1 (Korte et al., 1996).

## **1.2. Receptores de Neurotrofinas**

Para poder llevar a cabo un amplio espectro de funciones, las neurotrofinas se unen a dos clases de receptores transmembranas: los receptores tirosina quinasa Trks (Trk) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75); en donde p75 puede unir a cada neurotrofina con similar afinidad al igual que las formas inmaduras, las proneurotrofinas; mientras que los receptores Trk poseen una mayor selectividad a una neurotrofina en particular. Es así como TrkA une preferentemente a NGF y con menor afinidad a NT3, TrkB une a BDNF y con menos afinidad a NT-4/5, mientras que TrkC une específicamente a NT-3 (Figura 1) (Chao & Hempstead, 1995).

Los receptores de neurotrofinas son ampliamente expresados en el SNC y SNP, tanto en el desarrollo como en el estado adulto. La activación de estos receptores desencadena una gran variedad de respuestas, lo cual dependerá de la activación de distintas vías de señalización, de la naturaleza del ligando, así como del contexto celular (Fariñas, 1999; Gary & Barde, 1996b).



**Figura N°1. Las neurotrofinas y sus receptores.** Las neurotrofinas pueden unirse a dos clases de receptores transmembranas, los receptores tirosina quinasa Trks y al receptor p75. Los receptores Trks son 3, y se caracterizan por tener afinidad selectiva por una neurotrofina en particular, mientras que pueden unir con menos afinidad a las demás. Es así como TrkA una preferentemente a NGF, TrkB a BDNF y TrkC a NT3. Mientras que el receptor de neurotrofinas p75 tiene una afinidad similar por todas ellas, siendo capaz adicionalmente de unir las formas inmaduras de éstas, las proneurotrofinas. *Ilustración realizada por Carolina Cabeza.*

### 1.2.1 Receptores Trks

La familia de los receptores Trks, constituida por los receptores TrkA, TrkB y TrkC poseen la característica de compartir una estructura similar: un dominio extracelular que contiene repeticiones de dominios tipo inmunoglobulinas, motivos de cisteínas y motivos ricos en leucinas, además de un dominio auto-catalítico intracelular con actividad tirosina quinasa (Lewin & Carter, 2014; Huang & Reichardt, 2003). Al igual que otros receptores tirosina quinasa, tras la unión del ligando, los receptores Trks homodimerizan y ocurre autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático, asegurando sitios de reclutamiento dependientes de fosforilación para adaptadores moleculares y enzimas que modulan el inicio de las cascadas de señalización. Estas incluyen a las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) como ERK 1/2, ERK5 y p38; la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (IP3K)/Akt y la vía de la fosfolipasa C  $\gamma$ -1 (PLC  $\gamma$ -1) (Huang & Reichardt, 2001; Sofroniew et al., 2001).

La activación de las MAPKs ha sido descrita como vital para la inducción de respuestas de diferenciación en neuronas, así como en la línea celular PC12. La vía de IP3K/Akt es esencial para la supervivencia de distintas poblaciones neuronales y también participa en la determinación de la morfología neuronal. Mientras que la activación PLC  $\gamma$ -1 es necesaria para inducir crecimiento de neuritas y aumentar los niveles de calcio intracelular y regular la actividad de la proteína quinasa C (Lemmon & Schlessinger, 2010; F D Miller & Kaplan, 2001).

Un buen contexto para entender la relevancia de los receptores Trks es a través de ratones nulos para estos receptores durante el desarrollo del sistema nervioso. De manera específica, la presencia y activación del receptor TrkA por NGF es vital para la supervivencia y diferenciación de poblaciones neuronales sensoriales y simpáticas, cuya expectativa de vida de ratones nulos

constitutivos para TrkA, no es más de un mes (Smeyne et al., 1994). La ausencia de NGF o TrkA muestra una significativa reducción en el número de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal así como de ganglios simpáticos, exhibiendo una pérdida de sensibilidad a estímulos dolorosos (Crowley et al., 1994; Silos-Santiago et al., 1995), sumado a que la presencia de la señalización TrkA/NGF es requerida para la correcta invasión de neuronas sensoriales hacia sus órganos blancos (Patel et al., 2000). De igual forma, la mayoría de los modelos nulos en ratones para TrkB exhiben una baja expectativa de vida (48hrs a 2 semanas) y a nivel de sistema periférico se exhiben severas fallas en el correcto desarrollo vestibular, así como en una reducción de neuronas sensoriales debido al impacto durante la neurogenesis (Klein et al., 1993; Luikart et al., 2003; Minichiello et al., 1998). Mientras que la ausencia de TrkC o NT-3, está asociada a la pérdida de neuronas propioceptivas que otorgan información relevante sobre la posición de las extremidades en el espacio, teniendo como consecuencia anomalías en el movimiento y postura de éstos animales, además de una baja expectativa de vida (Ernfors et al., 1994; Fariñas et al., 1994; Tessarollo et al., 1994), y presentar una reducción aproximadamente del 50% de neuronas simpáticas durante la neurogénesis en ausencia de NT-3 (Belliveau et al., 1997; Fariñas et al., 1994).

### **1.2.2 El receptor de neurotrofinas p75**

La identificación del receptor p75 fue realizada a través de ensayos de cinética de disociación a NGF, el cuál fue reconocido como el receptor lento de NGF y clonado por primera vez desde células de melanoma humana (Johnson et al., 1986).

El receptor de neurotrofinas p75 es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Al igual que otros miembros de esta superfamilia, es un receptor transmembrana del tipo I, con un dominio extracelular conservado en repeticiones de cisteínas en el sitio de unión a ligando (Johnson et al., 1986), que además posee un dominio citoplasmático globular llamado “dominio de muerte” (Liepinsh et al., 1997). Sin embargo, difiere de los demás miembros en cómo desencadena muerte celular, ya sea porque no forma trímeros tras la unión del ligando, además de no activar las mismas vías de caspasas (Baker & Reddy, 1998; Vilar, 2017).

A diferencia de los receptores Trks, p75 no posee actividad catalítica inducible tras la unión del ligando, por lo que depende de la asociación de distintas proteínas adaptadoras intracelulares para activar vías de señalización. Hasta la fecha, se han descrito más de 20 adaptadores intracelulares para p75 (Barker, 2004; Bronfman & Fainzilber, 2004; Kraemer, 2014; Pathak & Carter, 2017; Roux & Barker, 2002). Sumado a las diferencias con los receptores Trks, el receptor p75 es ampliamente expresado durante el desarrollo de varias poblaciones neuronales tanto del SNP y SNC (Huang & Reichardt, 2001), cuya expresión disminuye en el estado adulto, manteniéndose presente sólo en unas pocas poblaciones neuronales adultas, pero que vuelve a ser expresado en contextos de daño o estrés al sistema nervioso (Ibáñez & Simi, 2012; Roux & Barker, 2002). Además, a diferencia de los receptores Trks, p75 une todas las neurotrofinas con similar afinidad (Rodríguez-Tebar et al., 1990) por lo cual es llamado como el receptor neurotrófico de “baja afinidad” debido a que une las neurotrofinas con baja afinidad en comparación a los receptores Trks (las neurotrofinas se unen con una afinidad a sus receptores Trks de aproximadamente  $10^{-9}$ – $10^{-10}$  M). Sin embargo, p75 puede interactuar con los receptores Trks y formar un sitio de unión de “alta afinidad” para las

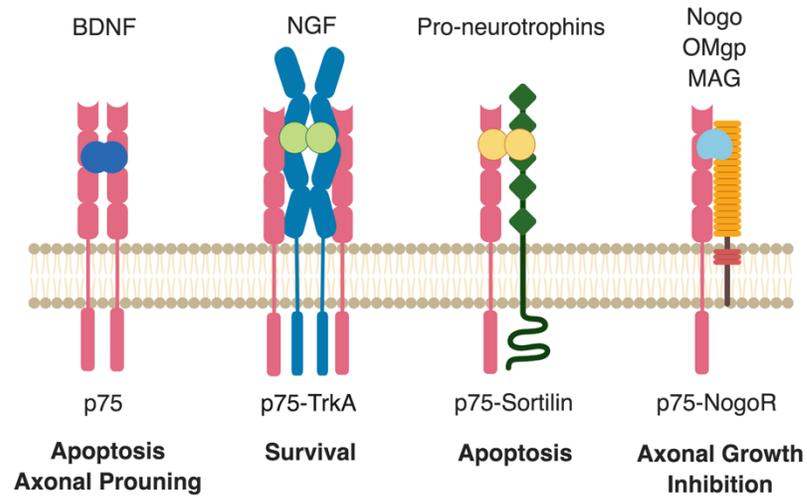
neurotrofinas (Hempstead et al., 1991), por ejemplo una gran expresión de p75 aumenta la afinidad de TrkA por NGF a  $10^{-11}$  M (Bothwell 1995, Chao and Hempstead 1995).

### **1.3. Señalización, ligandos y co-receptores de p75**

A diferencia de los Trks, p75 tiene efectos opuestos dependiendo de los co-receptores y ligandos con los cuales interactúa. De esa manera, puede promover sobrevida o inducir apoptosis neuronal, mientras que también puede inducir extensión o inhibición del crecimiento axonal al formar parte de distintos complejos de señalización (Barker, 2004) (Figura 2).

Dentro de los eventos de señalización más estudiados gatillados por p75 en respuesta a neurotrofinas, se incluye la activación de NF- $\kappa$ B para promover sobrevida tras unir a NGF (Carter et al., 1996; Hamanoue et al., 1999; Maggirwar et al., 1998). Adicionalmente, la co-expresión de p75 con TrkA produce una interacción funcional logrando un sitio de alta afinidad para NGF, lo cual aumenta la activación de TrkA a bajas concentraciones de ligandos (Hempstead et al., 1991; Barker & Shooter, 1994); lo que a su vez promueve sobrevida a través de su interacción con el receptor TrkA (Davies et al., 1993; Horton et al., 1997; Lee et al., 1994). Por otro lado, se ha observado que río abajo tras la unión de neurotrofinas a p75, ocurre activación de la quinasa activada por estrés “c-Jun N-terminal Kinase” (JNK), la cual promueve apoptosis tras unir BDNF en neuronas simpáticas (Bamji et al., 1998), NGF en neuronas hipocámpales (Friedman, 2000) y oligodendrocitos (Casaccia-Bonnet et al., 1996). Además, se ha visto que río abajo de la activación JNK, se produce activación de caspasas involucradas en la apoptosis de neuronas hipocámpales (Troy et al., 2002).

Por otro lado, p75 también interactúa con distintos co-receptores como el receptor de sortilina, que tras unir a pro-NGF (Nykjaer et al., 2004) o pro-BDNF (Teng et al., 2005) inducen muerte celular. Además, p75 detiene el crecimiento axonal en presencia de inhibidores del crecimiento axonal derivados de la mielina como Nogo, MAG y OMgP, cuyo proceso es mediado por la activación de RhoA, GTPasa que regula la dinámica del citoesqueleto de actina induciendo el colapso del cono de crecimiento (Wang et al., 2002; Yamashita & Tohyama, 2003; Yamashita et al., 1999).



**Figura N°2. Ligandos y co-receptores del receptor p75.** La multiplicidad de las respuestas celulares gatilladas por la activación de p75 radica en que tiene la capacidad de unir distintos ligandos, además de poder asociarse a distintos co-receptores para activar diversas vías de señalización. En consecuencia, esto otorga la capacidad a p75 de actuar de manera opuesta dependiendo del contexto en el que es activado. *Ilustración realizada por Carolina Cabeza.*

#### **1.4. Importancia del rol fisiológico de p75 durante el desarrollo del sistema nervioso simpático**

La complejidad del desarrollo del sistema nervioso radica en que se requiere de una acabada coordinación de eventos que son críticos para el correcto establecimiento de circuitos funcionales. Estudios sobre el desarrollo del sistema nervioso autonómico han ayudado a entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen la formación de circuitos funcionales en el SNP. Particularmente, se ha visto que las neurotrofinas y sus receptores gobiernan la guía axonal, la sobrevivencia neuronal, la inervación del blanco y la sinaptogénesis de las neuronas simpáticas post-ganglionares provenientes del ganglio cervical superior (Glebova & Ginty, 2005), las cuales son una población neuronal que expresa los receptores TrkA y p75 (Fagan et al., 1996). El receptor p75 en asociación con TrkA y tras unir NGF, promueven sobrevivencia y diferenciación. Mientras que, tras unir BDNF, p75 induce muerte celular programada o apoptosis (Huang & Reichardt, 2001; Glebova & Ginty, 2005). Siendo este un clásico ejemplo donde se observa una acción dual del receptor de neurotrofinas p75, promoviendo sobrevivencia neuronal junto a NGF/TrkA y muerte neuronal tras unir BDNF.

De manera simplificada la formación del sistema nervioso simpático comienza con la migración de los precursores neuronales desde la cresta neural, migrando ventral y dorsalmente por el tubo neural, para la formación de la columna de primordios de los ganglios simpáticos. Una vez que los precursores neuronales se encuentran en los primordios, comienza la proliferación y la adquisición de propiedades noradrenérgicas; luego la navegación de los axones en búsqueda del órgano blanco para su inervación, y finalmente la apoptosis neuronal de aquellas neuronas que no lograron la sinaptogénesis y poda de los axones, permitiendo el

adecuado desarrollo y conectividad del sistema (Francis & Landis, 1999; Glebova & Ginty, 2005; Luther & Birren, 2009).

En el período de navegación y de extensión axonal, NT-3 es secretada por la vasculatura, y es responsable de activar a TrkA en el cono de crecimiento de los axones simpáticos produciendo una respuesta local de crecimiento y guía para la extensión de éstos axones (Fariñas et al., 1994; Francis et al., 1999; Kuruvilla et al., 2004). Una vez que el axón se acerca al órgano blanco, la innervación final está controlada por NGF, el cual es secretado desde los órganos blanco en cantidades limitantes, para así activar a TrkA, promoviendo crecimiento y correcta densidad de innervaciones simpáticas (Glebova, 2004; Korsching & Thoenen, 1983; Levi-Montalcini, 1952). Una vez que TrkA es activado, el receptor es internalizado y se transporta retrógradamente en endosomas de señalización hasta el cuerpo celular, en una manera dependiente de dineína (Heerssen et al., 2004), donde inicia cambios a nivel transcripcional que favorece la supervivencia además de crecimiento axonal (Glebova & Ginty, 2004; Harrington et al., 2011; Kuruvilla et al., 2004; Ye et al., 2003).

Una vez en el cuerpo celular, el endosoma de señalización regula positivamente la expresión de TrkA, BDNF y p75 (Miller et al., 1991; Wyatt & Davies, 1995; Deppmann, 2008; Toma et al., 1997), lo que genera una amplificación en la señalización de NGF en neuronas que están compitiendo por responder a las cantidades limitantes de esta neurotrofina, generando un “*loop*” positivo en las neuronas que logran responder a NGF. Estas neuronas “ganadoras” sobreviven, mientras que las que no lograron unir NGF, mueren de una manera dependiente de BDNF y p75 (Deppmann et al., 2008; Ascano et al., 2009). En paralelo, la regulación génica de p75 contribuye a la disminución en la sensibilidad de TrkA por NT-3, aumentando la expresión en la membrana plasmática y afinidad por NGF (Francis et al., 1999; Harrison et al., 2000;

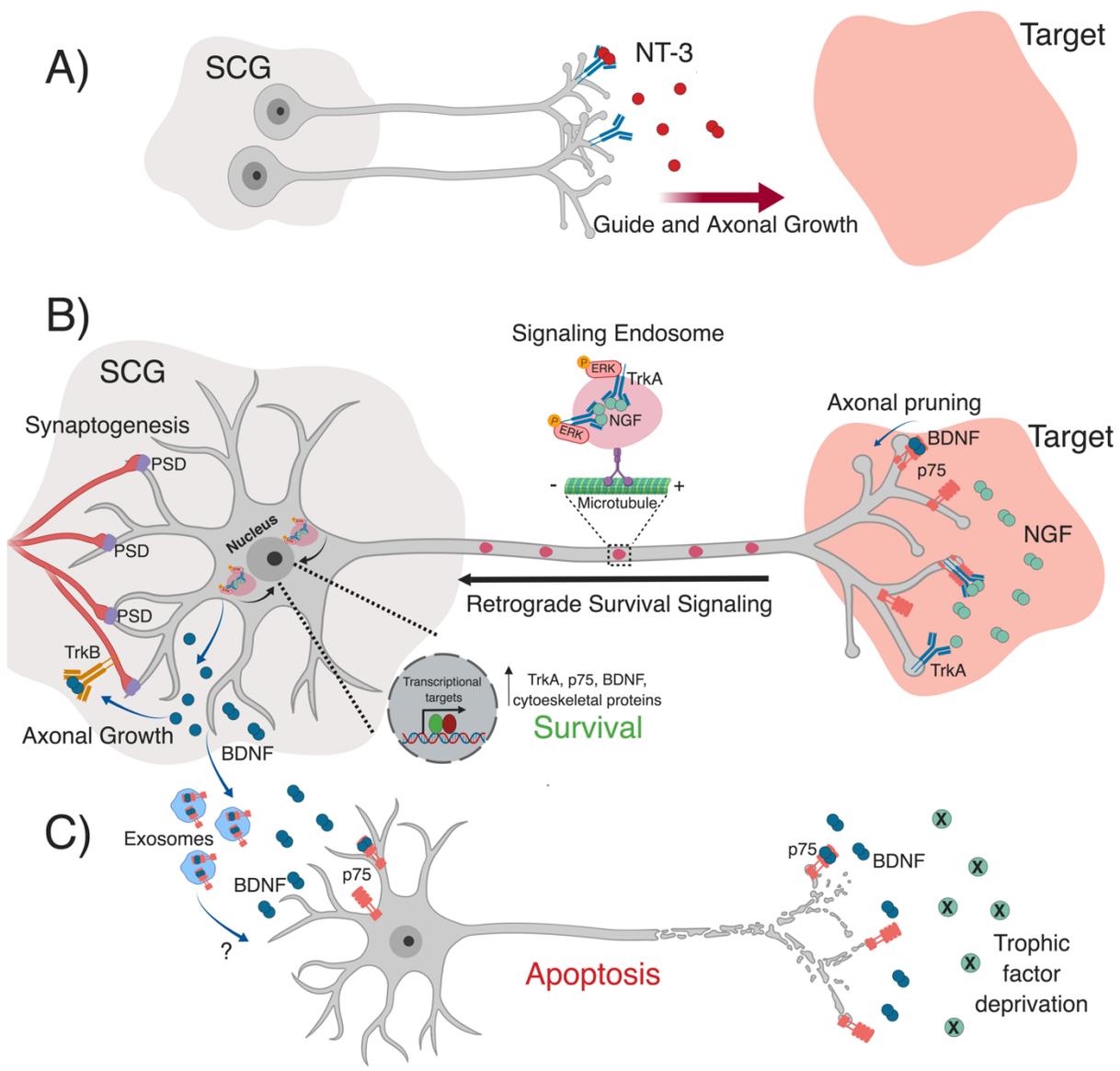
Hickman et al., 2018; Kuruvilla et al., 2004; Majdan et al., 1997; Miller et al., 1994), debido a la formación de un receptor de alta afinidad formado por TrkA y p75 (Hempstead et al., 1991). Por otro lado, BDNF también es regulado transcripcionalmente dependiente de actividad y de la señal retrógrada activada por NGF (Deppmann et al., 2008; Miller et al., 1991), pudiendo actuar de forma autocrina y paracrina en la vecindad, por lo que las neuronas que no han recibido la señal retrógrada iniciada por NGF en la periferia mueren al unir BDNF de forma paracrina (Bamji et al., 1998; Majdan et al., 2001).

De manera relevante, hay que destacar la importancia de p75 en éstos procesos, debido a que en neuronas simpáticas BDNF sólo puede activar exclusivamente a p75, ya que estas neuronas no expresan TrkB (Fagan et al., 1996), y es al responder a esta neurotrofina, donde el receptor p75 se contrapone a la respuesta de supervivencia que induce junto a TrkA (Kohn et al., 1999), ya que al unir BDNF induce apoptosis en aquellas neuronas que no han logrado responder de manera eficiente a NGF (Bamji et al., 1998). De esta forma se elimina el exceso de neuronas generado durante el desarrollo (Deppmann et al., 2008). En resumen, el número apropiado de neuronas por ganglio simpático se obtiene producto de un balance entre la señal de supervivencia inducida por NGF/TrkA y la señal apoptótica inducida por BDNF/p75. Estos datos favorecen la hipótesis neurotrófica del desarrollo del sistema nervioso periférico que propone que existe una competencia neuronal por las bajas concentraciones de neurotrofinas que secreta el órgano blanco para establecer una correcta inervación (Deppmann et al., 2008; Levi-Montalcini, 1952; Singh & Miller, 2005).

Además de inducir apoptosis, BDNF también actúa sobre los axones de las neuronas preganglionares colinérgicas que inervan a las SCGs, las cuales expresan TrkB. La activación de TrkB por BDNF regula de manera positiva la innervación sináptica entre los axones de las

neuronas presinápticas y las dendritas de las SCGs (Causing et al., 1997). Adicionalmente, BDNF en los axones de las SCGs activa a p75 induciendo poda axonal, procurando una innervación apropiada de los órganos blancos (Naska et al., 2010; Singh et al., 2008). Por otro lado, el NGF/TrkA transportado retrógradamente desde el terminal axonal de las SCGs, no sólo señala para promover sobrevivencia, sino que también promueve la formación de densidades postsinápticas en las dendritas, proceso que está restringido por la señalización de BDNF/p75 en el cuerpo celular (Sharma et al., 2010) (Resumen en Figura 3A y B).

Hasta aquí, la literatura nos muestra el rol de las neurotrofinas en el desarrollo del sistema nervioso simpático a distintos niveles favoreciendo la correcta comunicación y conectividad de las neuronas hacia sus órganos blanco a inervar y mostrando la versatilidad de p75 en una misma población neuronal.



**Figura N°3. Esquema resumido de la participación de neurotrofinas y sus receptores durante el desarrollo del sistema nervioso simpático. (A)** Durante la etapa de desarrollo inicial, desde los primordios de un SCG, se extienden los axones de las neuronas simpáticas a través de la vasculatura en dirección al órgano blanco. La vasculatura, que va creciendo y desarrollándose en paralelo al sistema nervioso, secreta (entre otros factores) NT3, que luego de activar a TrkA promueve respuestas de guía y crecimiento axonal. **(B)** El órgano blanco, secreta cantidades limitantes de NGF. Una vez que los axones se acercan al órgano blanco, NGF se une a TrkA, lo que gatilla la internalización de TrkA en endosomas de señalización. Este endosoma de señalización es transportado hasta el cuerpo celular de una manera dependiente de dineína. En el cuerpo celular, la señal retrógrada regula positivamente la respuesta de supervivencia, crecimiento y mantenimiento neuronal. Además, uno de los blancos transcripcionales que son regulados positivamente, son BDNF y p75. El BDNF secretado de manera paracrina se une a los receptores TrkB en neuronas preganglionares favoreciendo la sinaptogénesis. **(C)** El BDNF secretado, en la región de los cuerpos celulares, también puede tener un rango de acción, actuando de forma paracrina en neuronas cercanas que no lograron unir NGF para asegurar su supervivencia. *Ilustración realizada por Carolina Cabeza.*

## **1.5.- Tráfico endocítico y su importancia en la señalización neurotrófica durante el desarrollo del SN.**

### **1.5.1 El desafío de la comunicación intracelular en neuronas**

La morfología neuronal es compleja y contempla una región somatodendrítica y un axón que puede tener un largo que es desde cientos a miles de veces el diámetro del cuerpo celular. Esto trae consigo importantes desafíos espaciales para la transducción de señales en regiones distantes de la neurona (Bronfman et al., 2014; Harrington & Ginty, 2013; Solomon & Kuruvilla, 2018).

Como bien se ha descrito, la formación y el refinamiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo del SN, dependen de las interacciones entre neuronas y sus órganos blancos a inervar, los cuales se pueden encontrar a largas distancias de los cuerpos celulares neuronales (Glebova & Ginty, 2005). Desde los órganos blancos se secretan factores difusibles como lo son las neurotrofinas, las cuales regulan procesos que incluyen sobrevivencia, crecimiento y guía axonal, formación de sinapsis e inervación del blanco (Ascano et al., 2012; Barford et al., 2017). Estos factores en algunos casos producen señales en los terminales nerviosos que generan respuestas locales, pero en otros casos éstas señales son transportadas largas distancias hasta alcanzar el cuerpo celular, y generar cambios transcripcionales necesarios para respuestas como sobrevivencia, diferenciación o muerte neuronal, como hemos discutido en las secciones anteriores (Maria Ascano et al., 2012; Pathak et al., 2020; Scott-Solomon & Kuruvilla, 2018; Zahari et al., 2017).

Cuando las neurotrofinas logran unirse a sus receptores de membrana, activan cascadas de señalización que no se inician exclusivamente en la membrana plasmática, sino que también

ocurren en compartimientos de señalización a lo largo de la ruta endocítica (Bronfman et al., 2007; Hupalowska & Miaczynska, 2012; Sorkin & von Zastrow, 2009). Es por esto, que el sistema endosomal es clave en la señalización neurotrófica, porque proporciona mecanismos que permiten que las moléculas de señalización que son activadas por señales extracelulares sean transportadas a lo largo del extenso axon, permitiendo a las señales intracelulares ser mantenidas en un eficiente transporte de larga distancia, logrando una compartimentalización espacial y procesamiento específico de la señal (Bucci et al., 2014; Cosker & Segal, 2014; Matusica & Coulson, 2014; Zahari et al., 2017). Por lo tanto, la endocitosis y el posterior tráfico post-endocítico de neurotrofinas y sus receptores es un importante control de funciones neuronales (Barford et al., 2017; Bucci et al., 2014; Miaczynska et al., 2004).

### **1.5.2. Endocitosis y señalización neurotrófica: una pareja inseparable**

Luego de la unión del ligando, desde la membrana, los receptores pueden iniciar procesos de transducción de señales. Posteriormente, el complejo receptor-ligando es internalizado y principalmente distribuido a endosomas tempranos (*sorting endosomes*). Desde estos endosomas los receptores pueden reciclar a la membrana como el receptor de transferrina (TfR) a través de endosomas de reciclajes (Sorkin & von Zastrow, 2009), o continuar una ruta endo-lisosomal pasando por endosomas tardíos para posteriormente llegar a lisosomas para su degradación, como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Barbieri et al., 2016; Bucci et al., 2014). Por mucho tiempo, se pensó que la internalización del complejo receptor-ligando tenía como finalidad terminar o inactivar la señalización originada en la membrana plasmática. Sin embargo, hoy es claro que el tráfico endocítico y la señalización

están funcionalmente conectadas, y que los endosomas pueden actuar como plataformas de señalización generando un grado adicional de compartimentalización de la señalización en función de modular las respuestas celulares (Di Fiore & De Camilli, 2001; Sorkin & Von Zastrow, 2002; Cosker & Segal, 2014).

Se han establecido algunos mecanismos celulares que dan luces de cómo la endocitosis y tráfico post-endosomal pueden afectar la señalización. Primero, hay distintos mecanismos de endocitosis que pueden regular la señalización de receptores. Entre ellos, la internalización dependiente de clatrina, independiente de clatrina, dependiente de caveolina, de balsas lipídicas y la macropinocitosis dependiente de la dinámica de actina (Doherty & McMahon, 2009). Segundo, los efectores de señalización asociados a los receptores activados en endosomas, pueden ser distintos de aquellos que interactúan con el receptor en la membrana (Zerial & McBride, 2001). Tercero, los receptores activados pueden movilizarse y señalar desde diferentes tipos de endosomas (Platta & Stenmark, 2011; Sadowski et al., 2009). Luego de la internalización, el primer punto de convergencia es los endosomas tempranos (EE). Desde los EE, los receptores pueden volver a la membrana a través de endosomas de reciclaje o seguir una maduración endosomal hacia endosomas tardíos y posteriormente lisosomas para ser degradados (Villaseñor et al., 2016; Wandinger-Ness & Zerial, 2014a, 2014b). Los receptores, también pueden ser secuestrados en vesículas intraluminales (ILVs) de cuerpos multivesiculares (MVBs), desde donde pueden seguir una maduración endosomal y ser liberados al medio extracelular en exosomas (Sadowski et al., 2009; Sorkin & Von Zastrow, 2002). Así, los organelos endosomales forman una red dinámica de compartimentos subcelulares, los cuales controlan activamente la localización, el tiempo, amplitud, y especificidad de la señalización.

### 1.5.3 La hipótesis del endosoma de señalización y su rol en el desarrollo del SN

Uno de los receptores de neurotrofinas que ha contribuido a entregar evidencias sobre la importancia de los endosomas en la transducción de señales de receptores es el receptor de NGF, TrkA, a través de la hipótesis del “endosoma de señalización” (“*signaling endosome*”) (Grimes et al., 1996).

La hipótesis del endosoma de señalización surge como un mecanismo celular que permite explicar cómo neurotrofinas que son derivadas del blanco de una neurona pueden tener tanto efectos locales -en los terminales axonales- y a la vez afectar cambios transcripcionales en el cuerpo neuronal (Howe & Mobley, 2004). Actualmente, numerosas evidencias apoyan un modelo en donde las neurotrofinas y sus receptores Trks, que se encuentran en los axones distales, son internalizados como un complejo ligando-receptor, dentro de un organelo endocítico denominado “endosoma de señalización”, los cuales transportan retrógradamente este complejo a lo largo de la red de microtúbulos asociados al motor molecular dineína con destino al cuerpo celular, controlando eventos transcripcionales. (Cosker & Segal, 2014; Howe & Mobley, 2004; Miller & Kaplan, 2001; Solomon & Kuruvilla, 2018).

En el contexto del desarrollo del SNP se ha destacado el rol del tráfico endocítico y el transporte retrógrado del complejo TrkA-NGF para mediar funciones como la supervivencia, crecimiento axonal, dendritogénesis y sinaptogénesis (Ascano et al., 2012).

En primer lugar, las primeras evidencias que permitieron elaborar esta hipótesis provienen de trabajos que muestran el transporte retrógrado de NGF marcado radioactivamente ( $^{125}\text{I}$ -NGF) cuando se inyectaba intraocularmente en fibras nerviosas adrenérgicas y luego se verificaba la presencia de radioactividad en los cuerpos celulares de SCGs en ratones (Hendry

et al., 1974); el transporte retrógrado de  $^{125}\text{I}$ -NGF en cultivos compartimentalizados de neuronas simpáticas en ratas, cuya función se asocia a la mantención de la sobrevivencia neuronal (Claude et al., 1982; Ure & Campenot, 1997); sumado a los resultados obtenidos en nervios ciáticos dañados de rata, los cuales al ser ligados mostraron una acumulación de NGF endógeno en el extremo distal del daño (Korsching & Thoenen, 1983). En segundo lugar, estudios en cultivos compartimentalizados apoyaron la importancia del transporte retrógrado de NGF, donde se describió que NGF promueve la endocitosis de su receptor TrkA, además de encontrarse asociado a endosomas (Grimes et al., 1996; Grimes et al., 1997), y que tanto la internalización y transporte retrógrado de NGF aumenta en el cuerpo celular la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*), un factor necesario para sostener respuestas de sobrevivencia y de crecimiento axonal (Riccio et al., 1999; Riccio et al., 1997; Lonze et al., 2002). En apoyo a estos trabajos, se mostró a través de experimentos *in vivo* la acumulación de TrkA fosforilado junto a moléculas de señalización como Erk1/2 en el extremo distal de nervios ciáticos que fueron ligados como modelos de daño (Ehlers et al., 1995). Además, se describió que vesículas cubiertas de clatrina contenían NGF unido a TrkA fosforilado (Howe et al., 2001), y que junto a ellos habían componentes de señalización de la vía Ras-MAPK y de la vía PI3K/Akt transportándose retrógradamente hacia los cuerpos celulares de DRG de ratas (Delcroix et al., 2003; Howe et al., 2001). Por último, estudios en SCGs compartimentalizadas demostraron que la actividad quinasa de TrkA activada por NGF desde los axones distales es requisito para inducir y mantener sobrevivencia en los somas de esas neuronas (Kuruvilla et al., 2004; Ye et al., 2003).

Por otro lado, el complejo NGF/TrkA está implicado en la arborización dendrítica de neuronas simpáticas. A través de cultivos compartimentalizados de SCGs de rata se determinó

que el tráfico retrógrado del complejo NGF/TrkA mediante un “endosomas de señalización” es requerido para la formación de “*clusters*” de proteínas de densidad postsinápticas (PSD) en dendritas (Sharma et al., 2010), cuya formación es inhibida por p75, sugiriendo un importante rol antagónico entre NGF/TrkA y el receptor p75 durante el establecimiento de las sinapsis. Además, otro trabajo del grupo de Ginty complementó estos hallazgos mostrando que estos endosomas de señalización, una vez en el soma, señalizan localmente en dendritas promoviendo la formación y mantención de sinapsis entre neuronas simpáticas preganglionares y postganglionares, mostrando la capacidad de moverse bidireccionalmente cercanos a la proximidad de estos “*clusters*” para sostener la formación de éstos. Adicionalmente, se mostró que la actividad quinasa de TrkA activada de manera retrógrada, es esencial para la formación y mantención de las sinapsis entre neuronas simpáticas preganglionares y postganglionares mediante estudios *in vivo* (Lehigh et al., 2017).

Asimismo, durante la competencia por factores tróficos, donde el número final de neuronas es consecuencia de un balance entre señales de supervivencia y apoptosis (Yoon et al., 1998; Deppmann, 2008), el complejo NGF/TrkA ejerce un “*loop*” de retroalimentación positiva para asegurar el crecimiento y supervivencia de las neuronas. En este contexto, se ha descrito que NGF de manera retrógrada promueve la activación de factores de transcripción que aumentan la sensibilidad al propio NGF. Uno de los factores que potencian la sensibilidad es la regulación transcripcional positiva del receptor TrkA (Miller et al., 1991; Deppmann, 2008). Pero además, la señalización retrógrada del complejo regula la endocitosis del receptor TrkA que se encuentra en la membrana del soma de neuronas simpáticas, transportándolo anterógradamente hacia los terminales axonales, por un proceso descrito como transcitosis (Ascano et al., 2009); el cual es necesario para la respuesta de crecimiento axonal dependiente del NGF derivado del blanco.

Concomitante a este *loop* de retroalimentación, NGF regula transcripcionalmente la expresión de *p75*, *Bdnf* y *Nt4* (Miller et al., 1991; Deppmann et al., 2008). Esta regulación se ha sugerido que tiene una destacada función en el modelo de competencia, donde las evidencias indican que existe una inhibición paracrina entre neuronas vecinas, a través de la secreción de BDNF y NT-4, que señalizan induciendo muerte celular de una manera dependiente del receptor *p75* en las neuronas que no han sido protegidas por la señal de supervivencia de NGF/TrkA (Deppmann et al., 2008). La regulación positiva de *p75* se cree que contribuye de dos formas a la competencia neuronal. En primer lugar, al aumentar los niveles del receptor *p75* en neuronas que mantienen la señalización NGF/TrkA actúa aumentando la sensibilidad por NGF, formando junto a TrkA un receptor de alta afinidad por la neurotrofina (Miller et al., 1994), movilizándolo rápidamente el receptor a la superficie neuronal contribuyendo al cambio de afinidad de NT-3 por NGF (Hickman et al. 2018). Además la regulación positiva de *p75*, se ha descrito que tiene un rol en la poda axonal modulando la arquitectura del SN, a través de un mecanismo en que las neuronas más activas que lograron sobrevivir después del periodo de apoptosis natural, eliminan los axones de neuronas menos activas que no sostienen la señalización NGF/TrkA, causando degeneración de estos axones (Singh et al., 2008), proporcionando una vez más evidencias de cómo las neuronas que logran acceder a NGF favorecen la muerte de las neuronas en su vecindad. De manera especulativa, otro mecanismo de muerte neuronal inducido por BDNF/*p75* podría ser a través de la secreción de este complejo en exosomas y posterior incorporación en neuronas adyacentes en forma paracrina, ya que se ha descrito que tanto neuronas simpáticas como células PC12 producen estos organelos enriquecidos con *p75* luego de su internalización mediada por ligando (Escudero et al., 2014). Sin embargo, esta posibilidad aún tiene que ser demostrada experimentalmente.

En conjunto, estas evidencias favorecen la idea de que la endocitosis de las neurotrofinas y sus receptores no sólo regulan procesos de supervivencia, sino que otros procesos celulares esenciales para la fisiología neuronal y la conectividad del sistema (Figura 3C).

### **1.6. Rabs GTPasas, reguladores maestros del tráfico endocítico**

Las proteínas Rab GTPasas y sus efectores son los encargados de coordinar los diferentes aspectos del tráfico de membranas en células eucariontes (Zerial & McBride, 2001) incluyendo el transporte en la ruta endosomal. Estas regulan la formación de vesículas, desprendimiento de cubiertas de membranas, movilidad, anclaje y fusión de distintos compartimentos intracelulares (Hutagalung & Novick, 2011; Pfeffer, 2017). Éstos reguladores del tráfico intracelular constituyen una gran familia de GTPasas monoméricas pequeñas que pertenecen a la superfamilia de la GTPasa monomérica Ras (Barnekow et al., 2009; Wandinger-Ness & Zerial, 2014b).

Las Rabs GTPasas actúan como interruptores moleculares, ya que ciclan entre dos estados, un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP (Novick, 2016; Stenmark, 2009; Zerial & McBride, 2001). Luego de su síntesis, las Rabs son preniladas en sus motivos de cisteínas en su extremo C-terminal, lo cual permite anclar las Rabs inactivas a las membranas. La transferencia hacia la membrana es llevada a cabo por un factor inhibidor de la disociación a GDP (GDI), y puede ser asistida por un factor de desplazamiento de GDI (GDF). El mecanismo de intercambio de nucleótidos de las Rabs para actuar como interruptores, es llevado a cabo por dos proteínas accesorias: las proteínas GEFs, que son factores intercambiadores de nucleótido de guanina, y que catalizan el desplazamiento del GDP

preunido, permitiendo su reemplazo por GTP (Hutagalung & Novick, 2011; Novick, 2016), y las proteínas GAPs, que son proteínas que aceleran a las GTPasas, las cuales aceleran la hidrólisis del GTP a GDP (Barnekow et al., 2009; Mizuno-Yamasaki et al., 2012). De esta forma, las Rabs activas pueden interactuar con una variedad de proteínas efectoras, las cuales pertenecen a un gran rango de funciones, como proteínas de anclajes, motores moleculares, quinasas, fosfatasas y varias proteínas adaptadoras (Wandinger-Ness & Zerial, 2014b; Zhen & Stenmark, 2015).

Como ha sido reportado por Zerial y colaboradores, las proteínas Rabs son proteínas que participan tanto en procesos endocíticos como exocíticos, otorgándole identidad a las distintas membranas intracelulares (Mizuno-Yamasaki et al., 2012; Stenmark, 2009; Wandinger-Ness & Zerial, 2014b; Zerial & McBride, 2001). Es por esto que cada Rab GTPasa está asociada a un proceso y distribución espacial en particular. Por ejemplo, luego de la endocitosis de ligandos que se unen a receptores en la membrana plasmática, Rab5 es crítica en la biogénesis de los endosomas tempranos y la fusión de vesículas a este organelo (Bucci et al., 1992); Rab11 (Ullrich et al., 1996; Urbé et al., 1993) y Rab4 (Sheff et al., 1999; Sönnichsen et al., 2000), se relacionan con endosomas que pertenecen al reciclaje de receptores y membranas desde compartimentos endocíticos a la membrana plasmática, mientras que Rab7 le otorga identidad a los endosomas tardíos que posteriormente maduran a lisosomas para la degradación del *cargo* (Bucci et al., 2000).

Se ha propuesto un mecanismo que asegura la secuencialidad en la activación de las distintas Rabs involucradas en una vía endosomal, dependiente de la activación en cascada de específicas GEFs (Mizuno-Yamasaki et al., 2012). Los trabajos del grupo de Zerial han otorgado evidencias sobre el mecanismo que explica cómo el “*cargo*” de un endosoma puede continuar

en la ruta endosomal sin ser destinado a un intermediario para luego llevar al endosoma consecutivo, sino que más bien se habla que el endosoma va “madurando” a través de una conversión de proteínas Rabs, a medida que avanza en su tráfico (Homma et al., 2020; Zerial & McBride, 2001). Este mecanismo involucra que una vez que una GEF se encarga de activar una Rab, esta Rab en su forma activa recluta múltiples efectores, dentro de los cuales se encuentra una GEF para la Rab consecutiva en la ruta, por lo tanto dos diferentes Rabs están funcionalmente vinculadas en una cascada regulatoria a través de una GEF (Mizuno-Yamasaki et al., 2012).

Un buen ejemplo para entender esto es a través de lo que ocurre con el regulador maestro del tráfico post-endocítico, la GTPasa Rab5, sus GEFs y efectores, tanto en endosomas de la vía de reciclaje como en la vía degradativa. En primer lugar, la localización de las proteínas Rabs y sus efectores no se distribuye de manera azarosa en la membrana de los endosomas tempranos, sino que se encuentran espacialmente enriquecidos en dominios de membrana, llamados “dominios Rab” (Zerial & McBride, 2001). La forma en que los dominios de Rab se ensamblan y se conectan funcionalmente entre sí es fundamental para comprender los mecanismos que subyacen a la biogénesis de los endosomas y el transporte del *cargo*.

En el caso de la ruta de reciclaje, a través de estudios de inmunofluorescencia y microscopía en tiempo real, se ha descrito que endosomas tempranos además de contar con la presencia de Rab5, contienen a Rab4 y Rab11; sin embargo, cada una de estas Rabs exhibe un patrón de localización específica formando subdominios de Rabs en la membrana del endosoma temprano (Sönnichsen et al., 2000). Una vez que Rab5 se encuentra activa, ésta orquesta el reclutamiento de una gran maquinaria de proteínas conteniendo múltiples efectores, para así llevar a cabo sus funciones. Dentro de estos efectores se encuentra Rabenosyn-5 el cual es un

efector divalente que puede unirse tanto a Rab5 como a Rab4. Una vez que Rabenosyn-5 se ancla al complejo de efectores y se asocia con Rab5, comienza una redistribución de las Rabs aumentando la asociación entre Rab5 y Rab4 en subdominios de endosomas tempranos Rab5-Rab4, provocando una rápida distribución y reciclaje del *cargo* hacia la membrana plasmática (reciclaje rápido) (de Renzis et al., 2002). Mientras que aún no se ha descrito un mecanismo similar para Rab11, se sabe que en estos mismos endosomas una redistribución de dominios enriquecidos en Rab4 y Rab11, determina la destinación de este *cargo* a la vía de reciclaje lenta (Sönnichsen, Renzis, et al., 2000).

Respecto a la ruta de degradación, también se ha descrito un mecanismo similar de función cooperativa entre Rab5 y Rab7 en un modelo de línea celular humana. Rab5 activa interactúa con el complejo clase C VPS/HOPS, que también es un GEF y efector del regulador de endosomas tardíos, Rab7 (Wurmser et al., 2000). Ocurre que los niveles de Rab5 van fluctuando dinámicamente en los endosomas tempranos, lo cual se asocia a procesos de fusión y fisión en el tiempo, hasta que el cargo se empieza a concentrar progresivamente en menos endosomas pero mayor tamaño, los cuales comienzan a migrar desde la periferia a zonas más centrales de la célula, donde Rab5 es progresivamente reemplazado por Rab7 a través del complejo de clase C VPS/HOPS (Rink et al., 2005). Por lo tanto, la transición de endosomas tempranos a endosomas tardíos es mediada por una conversión de Rabs, que involucra que la pérdida de Rab5 de los endosomas tempranos ocurre concomitantemente con la adquisición de Rab7 activa (Huotari & Helenius, 2011).

Por otro lado, el “*cargo*” que es endocitado también puede seguir otro destino además de la ruta de reciclaje o degradativa. Esta otra alternativa de ruta deriva en la liberación del cargo endocitado al medio extracelular en vesículas llamadas exosomas (Simons & Raposo, 2009).

Estos exosomas con origen endosomal, hoy son de gran atractivo de estudio ya que en su cargo no tan sólo se encuentran componentes de membrana, sino que también se ha descrito que pueden transferir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en variadas poblaciones celulares, ganando interés la función de los exosomas como mediadores de la comunicación célula-célula (Colombo et al., 2014; Simons & Raposo, 2009). De hecho, los exosomas han sido involucrados como elementos que participan en eventos fisiológicos y patológicos, como respuestas inmunes, regeneración, cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Ching & Kingham, 2015; Gilligan & Dwyer, 2017; Liao et al., 2019; Schneider & Simons, 2013).

La biogénesis de estos exosomas comienza luego de que el cargo es endocitado desde la membrana plasmática, y luego se destina a endosomas tempranos. Dentro de endosomas intracelulares comienza un proceso de invaginación en estos endosomas formando vesículas intraluminares (*intraluminal vesicles*, ILVs) que posteriormente se convertirán en un gran reservorio de ILVs llevando a la formación de un cuerpo multivesicular (*multivesicular body*, MVBs), el cual posteriormente puede fusionarse con la membrana plasmática y liberar sus ILVs al exterior como exosomas, en vez de seguir la ruta degradativa hacia lisosomas (Colombo et al., 2014; Kowal et al., 2014).

Respecto a la formación de los MVBs, se ha descrito distintas poblaciones dependiendo de las proteínas involucradas en su biogénesis. Uno de los mecanismos mayormente descritos sobre la biogénesis de las ILVs de los MVBs es dependiente del complejo proteico complejo de sorting endosomal requerido para transporte (*endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT), el cual se asocia transitoriamente con membranas endosomales por reconocimiento de cargo endosomal ubiquitinado que será destinado posteriormente a lisosoma; aunque también existe un mecanismo independiente de ESCRT que depende de ceramidas (Colombo et al.,

2014; Hanson & Cashikar, 2012). Existe otra población de MVBs cuyas ILVs también dependen del complejo ESCRT que no son destinadas a degradación, y que liberan su cargo en exosomas hacia el medio extracelular. Sin embargo, la heterogeneidad de las poblaciones de MVBs estará determinada tanto por las proteínas que los generan, así como también por el tamaño, densidad y composición molecular y de proteínas de cubierta (Simons & Raposo, 2009; Colombo, Raposo, & Théry, 2014).

El rol de las proteínas Rabs también se ha involucrado en la regulación de la secreción de exosomas (Blanc & Vidal, 2018). Uno de los primeros estudios que relaciona las proteínas Rabs con los MVBs se realizó utilizando un dominante negativo de Rab11 en la línea celular K562 con origen de un cáncer de leucemia, en donde se determinó que la secreción de exosomas que contenían al TfR y la chaperona HSC70 disminuía en presencia del dominante negativo de Rab11 (Savina et al., 2005). Posteriormente, se realizaron dos estudios que involucraron a dos nuevas Rabs en la secreción de exosomas. En un modelo oligodendroglial murino, involucró la sobreexpresión de dominantes negativos y siRNA de algunas GEFs de Rabs, llegando a concluir que Rab35 es necesaria para la liberación de exosomas que contienen a la proteína proteolípida (*proteolipid protein*, PLP), una de la más abundantes de la mielina en el SNC (Hsu et al., 2010). Mientras que utilizando siRNA en un modelo de cultivos primarios de oligodendrocitos se obtuvieron resultados similares sobre Rab35 (Frühbeis et al., 2013). Otros trabajos que contribuye en esta línea de evidencias, usando una librería de shRNA específicos para proteínas Rabs, en un modelo de línea celular HeLa-CIITA, se destaca la labor de las proteínas Rab27a y Rab27b en la secreción de exosomas (Ostrowski et al., 2010), así como en la liberación en vivo de exosomas en melanomas (Peinado et al., 2012). Casi todas las evidencias apuntan a que las

proteínas Rabs están implicadas en el “*docking*” de los endosomas que contienen las ILVs en diferentes estados a lo largo de la ruta endocítica (Blanc & Vidal, 2018; Kowal et al., 2014).

## **1.7. Señalización apoptótica de p75 y tráfico post-endocítico**

### **1.7.1 Mecanismo de señalización apoptótica mediada por p75**

Como se describió anteriormente, el tráfico endocítico de neurotrofinas y sus receptores es clave para que se lleve a cabo la señalización neurotrófica. Como un buen ejemplo de esto, las evidencias descritas anteriormente (sección 1.5.3) destacan la relevancia del tráfico endocítico del complejo TrkA/NGF durante el desarrollo del SN. Sin embargo, el tráfico post-endocítico de p75 y su relación con la señalización tras unir neurotrofinas, tanto en el cuerpo celular como desde el terminal axonal, ha sido menos estudiado. Por estos motivos, es de nuestro interés estudiar este fenómeno en neuronas simpáticas, donde la activación de p75 por BDNF induce apoptosis de manera natural durante el desarrollo (Bamji et al., 1998); pero que interesantemente también está involucrado en la muerte neuronal en situaciones patológicas, cuya expresión del receptor aumenta en respuesta a daño (Ibáñez & Simi, 2012).

Se ha descrito la apoptosis dependiente de p75 en respuesta a la unión de neurotrofinas (BDNF) o pro-neurotrofinas (en asociación con sortilina) en distintas poblaciones celulares incluyendo las neuronas simpáticas (Bamji et al., 1998; Singh et al., 2008); así como en , neuronas sensoriales (Lee et al., 1992; Barrett & Bartlett, 1994), neuronas hipocampales (Friedman, 2000) y oligodendrocitos (Casaccia-Bonnet et al., 1996; Yoon et al., 1998).

La apoptosis mediante p75 se describe como un evento que regula el neurodesarrollo, cuyo fin es asegurar el correcto número de neuronas del SNP, mediante la eliminación de neuronas o proyecciones que no son apropiadas para la conectividad del SN y sus blancos. Esto queda en evidencia a través de estudios en ratones transgénicos nulos para p75 (*p75<sup>-/-</sup>*), donde se observó un exceso de SCGs durante el periodo de apoptosis natural, pero que además se propone a BDNF como la neurotrofina encargada de activar a p75 en estas neuronas, ya que en el ratón nulo para BDNF (*BDNF<sup>-/-</sup>*) se observa el mismo incremento de SCGs (Bamji et al., 1998).

Una de las quinasas involucradas en la señalización apoptótica mediante p75 es JNK (Casaccia-Bonnet et al., 1996; Yoon et al., 1998; Friedman, 2000); donde el grupo de Carter ha contribuido con distintos estudios sobre los mecanismos moleculares que permiten la señal apoptótica de p75 en SCGs. A través de estudios en cultivos primarios de SCGs, se ha mostrado que p75 tras unir BDNF y pro-BDNF activa a JNK (preferentemente a JNK3) en una modalidad bifásica. La primera ola de activación de JNK provoca una regulación positiva en la transcripción de la metaloproteasa TACE/ADAM17 (Kenchappa et al., 2010), la cual regula el primer paso del procesamiento de p75 (Weskamp et al., 2004). El procesamiento proteolítico de p75 se ha descrito como un requisito para su señalización (Kenchappa et al., 2010; Skeldal et al., 2011), el cual involucra dos pasos consecutivos: primero TACE/ADAM17 produce un clivaje que libera el dominio extracelular de p75, generando un fragmento carboxi-terminal anclado a membrana o p75-CTF (*carboxyl-terminal fragment*) (Weskamp et al., 2004; Zampieri et al., 2005), luego un complejo  $\gamma$ -secretasa procesa a p75 en el dominio transmembrana liberando un pequeño fragmento intracelular p75-ICD (*intracellular domain*), el cual es

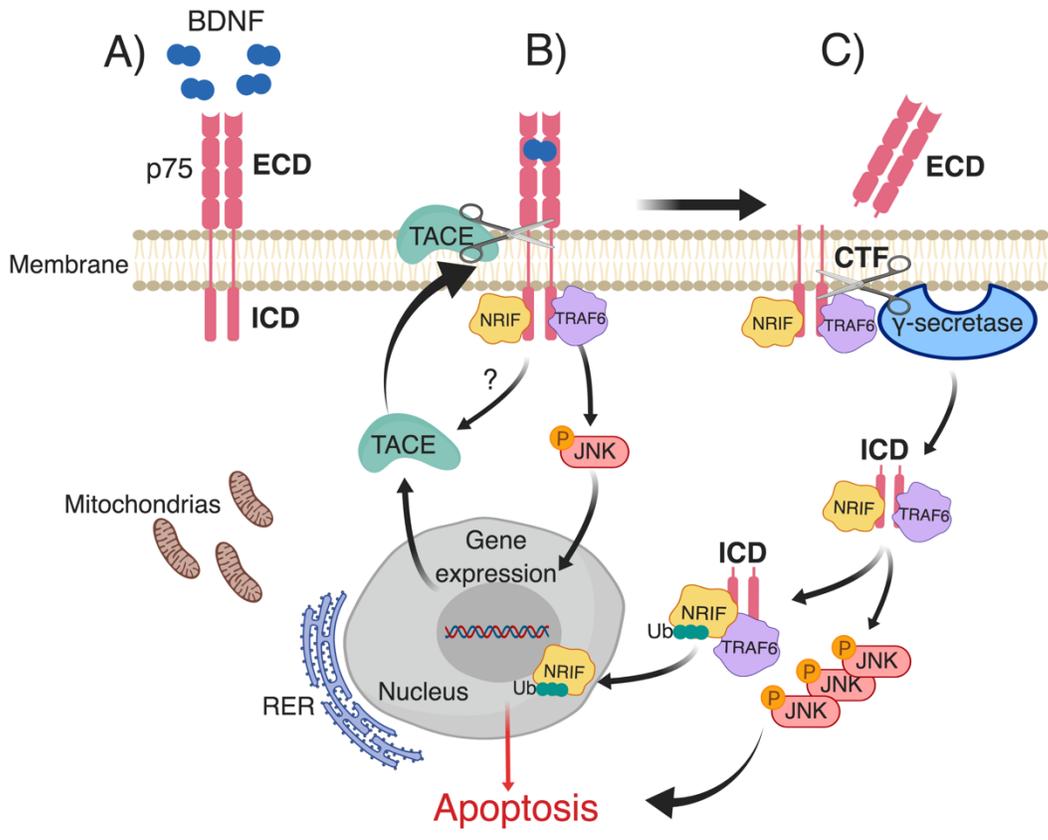
requerido para la señalización apoptótica de p75 tanto en el SNC como SNP (Majdan et al., 1997; Jung et al., 2003; Kenchappa et al., 2006; Tanaka et al., 2016).

Para que p75 pueda llevar a cabo su señalización apoptótica, se han descrito dos adaptadores intracelulares que se asocian al dominio intracelular del receptor: la ubiquitin E3 ligasa, TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*) (Yeiser et al., 2004), y la proteína de unión al ADN con dedos de zinc, NRIF (*neurotrophin receptor interacting factor*) (Casademunt et al., 1999). Secuencialmente, la primera ola de activación de JNK3 río abajo de la activación de p75 es requerida para el procesamiento proteolítico del receptor, cuya liberación del p75-ICD es necesaria para la ubiquitinación de NRIF por TRAF6 (Geetha., 2005; Kenchappa et al., 2006), resultando en la translocación de NRIF al núcleo, lo cual es un requisito para inducir apoptosis mediada por p75 en SCGs (Kenchappa et al., 2006; Linggi et al., 2005).

La segunda ola de activación tardía de JNK3 depende de la liberación del p75-ICD, y de la interacción entre NRIF y TRAF6, ya que en cultivos de SCGs nulas para NRIF (*nrif -/-*) (Linggi et al., 2005) o TRAF6 (*traf6 -/-*) (Yeiser et al., 2004) la estimulación con BDNF sólo genera la primera ola de activación selectiva de JNK3, inhibiéndose la apoptosis. Complementario a estos resultados, cuando se inhibe el segundo clivaje proteolítico de p75 se obtienen los mismos resultados (Kenchappa et al., 2010), sugiriendo un rol clave del p75-ICD en la señalización apoptótica (Figura 4).

Finalmente, la activación de JNK mediante p75 involucra una regulación positiva en los niveles de factores pro-apoptóticas como p53 (*p53 tumor suppressor protein*) y consecutivamente su blanco Bax (Aloyz et al., 1998), así como también la fosforilación de Bim (Becker et al., 2004) y Bad (Bhakar et al., 2003); donde el rol de estas proteínas se ha descrito

como parte de la vía apoptótica intrínseca de una célula, que involucra la liberación de proteínas mitocondriales, así como activación de caspasas (Strasser et al., 2000).



**Figura N°4. Señalización apoptótica de p75 en SCGs. (A)** Cuando ligandos pro-apoptóticos como BDNF se unen a p75, se activa rápidamente la quinasa JNK (primera ola de activación), la cual es requerida para regular positivamente la expresión de TACE, la *alpha*-secretasa encargada de producir el primer corte proteolítico de p75, liberando así el dominio extracelular del receptor o ECD, dejando al receptor anclado a la membrana mediante un fragmento CTF. **(B)** Adicionalmente, p75 al activarse recluta dos adaptadores citoplasmáticos, NRIF y TRAF6, en su dominio intracelular o ICD. Si bien no se tiene total claridad si estos cortes proteolíticos ocurren obligatoriamente en la membrana plasmática, si se sabe que están asociados a estructuras membranosas en donde se encuentre el receptor. **(C)** Consecutivamente el receptor sufre un segundo corte proteolítico en su dominio yuxtamembrana, liberando así su dominio ICD asociado a los adaptadores requeridos para su señalización apoptótica. La liberación de este fragmento es requerida para una segunda ola de activación de JNK necesaria para inducir apoptosis. Además, TRAF6 ubiquitina a NRIF el cuál requiere de esta modificación para translocar al núcleo y así desencadenar apoptosis.

### 1.7.2. Señalización apoptótica retrógrada mediada por p75

Si bien, hay ciertos detalles que se han dilucidado sobre el mecanismo de la señalización apoptótica de p75, la localización espacial y dinámica temporal permanece poco explorada, el cual podría cumplir un rol determinante en la respuesta celular final (Pathak & Carter, 2017). Durante el desarrollo, hoy se tiene conocimiento en que muchas señales que se requieren en el establecimiento del SNP deben recorrer largas distancias desde los terminales axonales, a diferencia de lo que ocurre con la señal retrógrada de señales positivas (progresivas), cuyas evidencias han logrado un gran avance y entendimiento de las bases moleculares, poco se sabe sobre las señales retrogradas negativas (regresivas) para la fisiología neuronal (Pathak et al., 2020).

Se ha documentado el transporte retrógrado de p75 en algunas poblaciones neuronales como SCGs (Escudero et al., 2019; Hibbert et al., 2006; Pathak et al., 2018) o motoneuronas (Deinhardt et al., 2006; Deinhardt et al., 2007). Sin embargo, son pocos los estudios que sugieren un mecanismo que involucre el tráfico endocítico de p75 o la identidad que pueda tener un endosoma retrógrado para este proceso.

Dentro de los estudios significativos, se encuentran básicamente trabajos que involucran a proneurotrofinas y apoptosis mediada por p75. Uno de éstos fue realizado en cultivos de motoneuronas de embriones de pollo, donde se demostró que pro-BDNF secretado desde los músculos, induce apoptosis en el soma de neuronas motoras, activando a p75 junto a sortilina, y que estos efectos son revertidos cuando se utiliza un anticuerpo bloqueante para p75 o para pro-BDNF (Taylor et al., 2012); sugiriendo una señalización apoptótica retrógrada. A través de estudios *in vitro* en cultivos compartimentalizados de SCGs el tratamiento con pro-NT3

exclusivamente en los axones distales, induce apoptosis la cual es detectada en los somas de las neuronas; adicionalmente para demostrar que esta apoptosis era mediada por p75, se utilizaron cultivos de SCGs provenientes de ratones *p75<sup>-/-</sup>*, los cuales fueron resistentes a pro-NT3, demostrando así que p75 es responsable de la apoptosis retrógrada en esas neuronas (Yano et al., 2009).

Recientemente el grupo de Carter ha logrado obtener evidencias de que la señalización apoptótica retrógrada a gran distancia depende del procesamiento del receptor p75, ya que se requiere de la liberación del p75-ICD, en respuesta a la privación de factores tróficos o tras la estimulación de ligandos pro-apoptóticos como BDNF para inducir muerte neuronal (Pathak et al., 2018). Interesantemente, en este mismo estudio se determinó que este fragmento p75-ICD era transportado en MVBs CD63<sup>+</sup>, y además se involucra que el fragmento p75-ICD se transportaba retrógradamente junto a la enzima histona deacetilasa 1, HDCA1 (*histone deacetylase 1*), la cual se involucró con deacetilar a la subunidad p150<sup>Glued</sup> de la dinactina, el cuál es un complejo activador del motor molecular dineína, cuya deacetilación aumenta la interacción con dineína, otorgando evidencias de que la procesividad de la señal retrógrada axonal de p75 requiere de este mecanismo.

Además de los contextos fisiológicos en donde se involucra a p75 y su señal retrógrada apoptótica, existen evidencias que sugieren que el receptor está involucrado en señales de daño generadas en el axón. Por ejemplo, en un modelo de axotomía del tracto cortico-espinal se obtuvo a través de estudios *in vivo*, un aumento del receptor p75, sugiriendo que esto favorecería la muerte de estas neuronas, y que un ligando endógeno que podría estar a cargo de esta muerte sería pro-NGF (A W Harrington et al., 2004). De manera similar, también se ha documentado que p75 está implicado en la apoptosis luego del daño en axones distales de neuronas sensoriales

provenientes de DRGs (Sørensen et al., 2003), o en neuronas receptoras del olfato (Carson et al., 2005). Por otro lado, el grupo de Perlson, utilizando un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), mostró que existían endosomas asociados a dineína desde el axoplasma del nervio ciático factores pro-apoptóticos como caspasa 8, JNK y el fragmento p75-ICD (Perlson et al., 2009), lo cual sugiere que estos factores pueden contribuir a la degeneración en ALS.

### **1.7.3 Tráfico endocítico de p75 y su relación con GTPasas**

Dada la multifuncionalidad de p75, el tráfico de éste también posee características no canónicas en su tráfico post-endocítico en comparación a los otros receptores de neurotrofinas, como los receptores Trks, sumado a que la relación entre tráfico y señalización ha sido menos estudiada.

La importancia de la internalización de p75 tras la unión de ligando para su señalización ha sido descrita en distintos tipos celulares como en células PC12 o COS (Bronfman et al., 2003; Saxena et al., 2004), SCGs (Escudero et al., 2014) así como en motoneuronas (Deinhardt et al., 2007). Sin embargo, la internalización de este receptor ocurre con una dinámica más lenta dentro de la ruta endocítica, en comparación a otros receptores transmembrana como TrkA, EGFR o TfR, tanto en PC12 como SCGs (Bronfman et al., 2003; Saxena et al., 2004; Escudero et al., 2014). Además, la endocitosis de p75 ha sido demostrada como un proceso que puede ser dependiente de clatrina o independiente de clatrina en SCGs (Bronfman, Escudero, Weis, & Kruttgen, 2007) y motoneuronas (Deinhardt et al., 2007).

Una vez que el receptor ha internalizado tras la unión de ligando, éste ha sido detectado en endosomas tempranos Rab5<sup>+</sup>, acumulándose en endosomas de reciclaje Rab11<sup>+</sup> asociado a

adaptadores de señalización como necdin y NRAGE (Bronfman et al., 2003; Tcherpakov et al., 2002) en células PC12. Interesantemente, a través de ensayos de fraccionamiento subcelular, se ha reportado la presencia de p75-CTF (resultado del procesamiento por TACE/ADAM17) en endosomas Rab5/Rab11<sup>+</sup>, sugiriendo que el procesamiento proteolítico del receptor ocurre en la ruta endosomal (Bronfman et al., 2003; Urra et al., 2007). También, en el soma de células PC12 como en SCGs se ha reportado que p75 tras la unión de ligando colocaliza de manera breve por endosomas tempranos Rab5<sup>+</sup>, y que posteriormente se acumula en dos poblaciones endosomales, endosomas Rab11<sup>+</sup> y MVBs CD63<sup>+</sup>, el cual puede ser secretado al medio extracelular a través de exosomas, tanto en células PC12 y como en SCGs (Escudero et al., 2014).

En contraste a los estudios realizados en SCGs o PC12, se ha documentado que en axones del núcleo istmo-óptico el tráfico retrógrado de p75 que induce apoptosis, se encuentra acumulado en el soma junto a NGF en MVBs (Butowt & von Bartheld, 2009; von Bartheld et al., 1996), mientras que en motoneuronas tras la internalización de p75 desde axones distales, el receptor luego de pasar por endosomas Rab5<sup>+</sup>, transita retrógradamente hasta el soma de estas neuronas en endosomas Rab7<sup>+</sup> (Deinhardt et al., 2006, 2007). Tomando todos estos datos, podemos establecer una vez más que el tipo de población endosomal que utiliza p75 para transportarse retrógradamente por los axones, o acumularse en los somas de las células dependerá del tipo celular, como también del ligando que una.

Dado que p75 carece de un motivo catalítico, su dominio intracelular interactúa con distintos adaptadores para llevar a cabo su señalización. Dentro de estos adaptadores, se ha documentado que p75 puede interactuar directamente a través de su dominio citoplasmático con distintas GTPasas monoméricas, como Rho y Ras para la regulación de la formación de neuritas

(Blöchl et al., 2004). Por otro lado, p75 activa a RhoA desplazando a su GDI, participando en la regulación de la extensión axonal (Yamashita et al., 1999), y la asociación de p75 con Rac es necesaria para la activación de JNK en la señalización apoptótica (Harrington et al., 2002).

En un contexto celular distinto a neuronas, p75 ha sido implicado en la regulación de la homeostasis de la glucosa en adipocitos (Bernat Baeza-Raja et al., 2016). Se ha descrito que p75 interactúa de manera directa con la GTPasa Rab5 y Rab31 en la zona de la cuarta hélice de su dominio de muerte, regulando la actividad de estas GTPasas llevando a una disminución de la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática, lo cual resulta en una disminución de la captura de glucosa estimulada por insulina (B. Baeza-Raja et al., 2012), sugiriendo un blanco terapéutico de gran interés en patologías como diabetes por resistencia a la insulina.

Dado el rol de BDNF derivado de los blancos o de las propias SCGs mediante secreción paracrina durante el desarrollo (Singh and Miller, 2005; Singh et al., 2008), es importante poder definir las acciones y la importancia de BDNF tras unirse a p75 en los axones distales de SCGs. Es por esto que a través de ensayos de cultivos compartimentalizados de SCGs, recientemente se demostró que en axones distales BDNF induce la internalización de p75 y juntos viajan retrógradamente en un mismo endosoma para inducir apoptosis en estas neuronas (Escudero & Cabeza., 2019; Pathak et al., 2018). Sin embargo, no se ha determinado la identidad de ese endosoma hasta la fecha, o si p75 al igual que en adipocitos regula la actividad de alguna de las GTPasas de su tráfico endocítico, y que esto determine su señalización apoptótica.

## **1.8. Propuesta de Investigación**

Los literatura discutida anteriormente sugiere que la internalización y tráfico endocítico de p75 regula su procesamiento y señalización. Sin embargo, no está descrito cuál es la población endosomal relevante para estos procesos.

Esta tesis tuvo por objetivo dilucidar el rol del tráfico endocítico en la respuesta apoptótica de p75, específicamente la participación de la GTPasa Rab5, debido a que es una GTPasa clave en la regulación de la generación y dinámica de los endosomas tempranos, en los cuales se regula la destinación de receptores a otros compartimentos endosomales. Por lo cual, proponemos que existe una regulación funcional entre p75 y Rab5.

## **1.9. Hipótesis**

*“La señalización apoptótica mediada por BDNF/p75 requiere de la actividad de la GTPasa Rab5 en neuronas simpáticas (SCGs)”.*

## **1.10. Objetivo General**

Evaluar la participación de la actividad de Rab5 en la respuesta apoptótica inducida por BDNF/p75 en un modelo de SCGs.

### **1.10.1. Objetivos Específicos**

**Objetivo 1.- Estudiar si p75 interactúa y regula la actividad de Rab5 de manera dependiente de su ligando BDNF.**

- 1.1. Evaluar si los niveles proteicos de Rab5 son regulados por BDNF.
- 1.2. Evaluar si p75 interactúa con Rab5 en respuesta a BDNF.
- 1.3. Evaluar si la activación de p75 en respuesta a BDNF incrementa la actividad de Rab5.
- 1.4. Evaluar la interacción de p75 en respuesta a BDNF con la forma activa e inactiva de Rab5.

**Objetivo 2.-Evaluar si la actividad de Rab5 es requerida para la señalización apoptótica mediada por BDNF/p75.**

- 2.1. Estudiar si la actividad de Rab5 es requerida para la internalización de p75 en respuesta a BDNF.
- 2.2. Estudiar la activación de JNK en respuesta a BDNF, y evaluar si la actividad de Rab5 es requerida para la activación de JNK.
- 2.3. Evaluar la colocación de NRIF junto a endosomas positivos para p75 y Rab5.
- 2.4. Estudiar si la actividad de Rab5 es requerida para la translocación nuclear de NRIF.
- 2.5. Estudiar si la actividad de Rab5 es requerida para la activación de la caspasa-3.

## **2. MATERIALES**

### **2.1. Material Biológico**

#### **2.1.1. Animales**

Para la obtención de los cultivos de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, se utilizan ratas Sprague-Dawley de 1 a 3 días de vida, que son mantenidas de acuerdo a estándares internacionales de cuidado y manejo de animales en un ambiente a 20-22°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h en el vivero central de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### **2.1.2. Líneas celulares**

Células HEK293:

Células de riñón embrionario humano.

### 2.1.3. Cepas bacterianas

DH5 $\alpha$ : Cepa de E. Coli no patógena. Fenotipo: dlacZ Delta M15 Delta (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1.

### 2.2. Reactivos

**Tabla N°1 Medios de cultivos, suplementos y reactivos generales.**

Reactivo	Detalle
Afidicolina	Sigma Aldrich. Cat. N° A0781
Albúmina de suero de bovino libre de IgG y proteasas	Jackson Immuno Research. Cat. N° 001-000-162
Antibiótico/Antimicótico	Gibco. Cat. N° 15240062
Anticuerpo bloqueante anti NGF	Merck-Millipore. Cat. N° MAB5260Z
Avertina (2,2,2-tribromoethanol)	Sigma-Aldrich. Cat. N° T48402
BDNF	Alomone Labs. Cat. N° B-250
Ciliobrevina-D	Merck-Millipore. Cat. N° 250401
Cocktail inhibidor de proteasas	Roche. Cat. N° 11836145001
Cocktail inhibidor de fosfatasa	Pierce. Cat. N° 88667
DMEM sin rojo fenol alto en glucosa	Gibco. Cat. N° 21063029

DMEM con rojo fenol alto en glucosa	Gibco. Cat. N° 12100046
DNA-asa	Sigma-Aldrich. Cat. N° D5025
Esferas magnéticas <i>dynabeads M-280 sheep anti mouse IgG</i>	Life Technologies. Cat. N° 11201D
Esferas magnéticas <i>dynabeads M-28 sheep anti rabbit IgG</i>	Life Technologies. Cat. N° 11203D
Esferas magnéticas de transfección Neuromag	OZ biosciences. Cat. N° KC30800
Estándar de proteínas preteñidas, 10 a 180 kDa	Pierce. Cat. N° 26616
Estándar de proteínas preteñidas, 10 a 250 kDa	Bio Rab. Cat. N° 1610374
Films fotosensible	Fujifilm. Cat. N° 4741012892
Inhibidor de JNK SP600125	Merck-Millipore. Cat. N° 420119
L-glutamina	Gibco. Cat. N° 25030081
Laminina	Life Technologies. Cat. N° 23017015
Membrana Nitrocelulosa	Bio Rad. Cat. N° 1620115
Medio Ultraculture	Lonza. Cat. N° 12-725F
NGF	Alomone Labs. Cat. N° N-100
Optimem	Gibco. Cat. N° 11058021
Papel filtro para <i>western blot</i>	Bio Rad. Cat. N° 1703932
Penicilina/Estreptomicina	Gibco. Cat. N° 15140122
Poli-L-ornitina	Sigma-Aldrich. Cat. N° P4957
Proteína quimera TrkA-Fc	R&D Systems. Cat. N° 175-TK-050

Proteína quimera TrkB-Fc	R&D Systems. Cat. N° 688-TK-100
Q-Dots Estreptoavidina 605	Life Technologies. Cat. N° Q10101MP
Suero de caballo	Gibco. Cat. N° 16050122
Suero fetal de bovino	Hyclone. Cat. N° 11306060
Tamiz celular con poros de 40µm	Falcon. Cat. N° 352340
Tripsina pancreática de bovino	Merck-Millipore. Cat. N° 6502

---



---

**Tabla N°2. Sales y soluciones**

<b>Reactivo</b>	<b>Detalle</b>
Acrilamida/Bisacrilamida	Bio Rad. Cat. N° 1610154
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich. Cat. N° E6758
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich. Cat. N° M3148
Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck-Millipore. Cat. N° 1063291000
Cloruro de Potasio (KCl)	Merck-Millipore. Cat. N° 1049380500
Cloruro de Sodio (NaCl)	Merck-Millipore. Cat. N° 1064060500
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Sigma-Aldrich. Cat. N° L3771
Etanol Absoluto	Merck-Millipore. Cat. N° 1009832500

Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck Millipore. Cat. N° 1048731000
Fosfato de Sodio ( Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	Merck Millipore. Cat. N° 1065751000
Gelatina de Pez	Sigma-Aldrich. Cat. N° G7765
Glicerina 85%	Merck-Millipore. Cat. N° 104094
HEPES	Sigma-Aldrich. Cat. N° H3375
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich. Cat. N° 81381
Nonedit <sup>TM</sup> P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich. Cat. N° NP-40
Paraformaldehído	Merck-Millipore. Cat. N° 104005
Persulfato de Amonio (APS)	Sigma- Aldrich. Cat. N° A9164
Rojo PONCEAU S	Sigma-Aldrich. Cat. N° P7170
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	Sigma- Aldrich. Cat. N° T9281
Tris-Base	Merck-Millipore. Cat. N° US1648311
Tritón X-100	Sigma-Aldrich. Cat. N° X100-1L
Tween-20	Sigma-Aldrich. Cat. N° P1379

---

**Tabla N°3. Kits**

<b>Kit</b>	<b>Detalle</b>
DC <sup>TM</sup> , Ensayo medición proteínas	Bio Rad. Cat. N° 5000111

Lipofectamina 2000	Invitrogen. Cat. N° 11668
Neuromag, transfección magnética	OZ Biosciences. Cat. N° KC30800
Ensayo purificación adenoviral	Virapur. Cat. N° 003059
West Femto, Ensayo quimioluminiscente	Thermo-Fisher. Cat. No. 34095
West Pico, Ensayo quimioluminiscente	Thermo-Fisher, Cat. No. 34087

---

### 2.3. Anticuerpos

**Tabla N°4. Anticuerpos primarios**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Detalle</b>
Anti-Acetylated Tubulin (mouse)	1:1000	Sigma-Aldrich Cat. N° T7451
$\beta$ III-Tubulin (mouse)	1:1000	Sigma-Aldrich Cat. N° T8578
$\beta$ -Tubulin H-235 (mouse)	1:1000	Santa Cruz Cat. N° sc-9104
Cleaved Caspase-3 (rabbit)	1:400	Cell Signaling Cat. N° 9664S
GST (rabbit)	1:300	Abcam Cat. N° AB-9085
GST (mouse)	1:1000	Thermo Fisher Cat. N° 8-326
MAP2 (AP20) (mouse)	1:200	Pierce Cat. N° MA1-25044

MC192 (mouse)		Hibridoma laboratorio Dra. Francisca Bronfman
Normal Mouse IgG		Millipore Cat. N° 12-371
Normal Rabbit IgG		Millipore Cat. N° 12-370
NRIF (rabbit)	1:5000	No comercial. Donado por el laboratorio Dr. Bruce Carter.
Phospho SAPK/JNK (rabbit)	1:500	Cell Signaling Cat. N° 9255
p75NTR (rabbit)	1:500	Millipore Cat. N° 07-476
Rab5 (rabbit)	1:500	Abcam Cat. N° AB 18211
Rab5 (mouse)	1:500	Santa Cruz Cat. N° SC-46692
Rab11 (rabbit)	1:1000	Invitrogen Cat. N° 715300

**Tabla N°5. Anticuerpos Secundarios y marcadores fluorescentes**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Detalle</b>
Alexa 488 Donkey anti mouse	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-21206
Alexa 488 Donkey anti rabbit	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-21202

Alexa 555 Donkey anti mouse	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-31570
Alexa 555 Donkey anti rabbit	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-31572
Alexa 647 Donkey anti mouse	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-31571
Alexa 647 Donkey anti rabbit	1:300	Molecular Probes Cat. N° A-31573
Hoechst 33258	1:10000	Sigma-Aldrich Cat. N° B2261
HRP - IgG (H + L) Conjugate Goat anti Mouse	1:10000	Bio Rad Cat. N° 170-6516
HRP - IgG (H + L) Conjugate Goat anti Rabbit	1:10000	Bio Rad Cat. N° 170-6515

---

#### 2.4. Microscopía.

Para la microscopía confocal se utiliza un equipo Zeiss LSM Pascal 5, incluyendo un módulo de tres láseres (Arg 458/488/514 nm, HeNe 633nm; Carl Zeiss), conectado a un microscopio invertido Axiovert 2000.

Para la microscopía confocal espectral se utiliza un equipo Nikon Eclipse C2, que incluye cuatro láseres de estado sólidos (405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm), montado sobre una plataforma invertida motorizada modelo Eclipse Tie de Nikon.

Para la microscopía de luz y epifluorescencia se utiliza un microscopio invertido Olympus IX7I conectado a una cámara refrigerada QICAM Fast.

Para la microscopía en tiempo real se utiliza un equipo Olympus Spinning Disk conectado a un microscopio invertido Olympus IX81, con un sistema de lámpara de Xenón.

## **2.5. Software**

Para los análisis estadísticos y la realización de gráficos se utiliza el programa GraphPad Prism 5.0.

Para los análisis de las imágenes de microscopía se utiliza el programa ImageJ 1.48v from NIH.

Para la edición y composición de las figuras se utiliza el programa Photoshop versión 6.0.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo de células**

##### **3.1.1. Cultivo primario masivo y compartimentalizado de neuronas simpáticas proveniente del ganglio cervical superior**

Las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (nSCGs) son obtenidos de neonatos de ratas Sprague Dawley de 1 a 3 días de vida (P1-P3).

Los neonatos son anestesiados con 4 mg/ml de avertina (2,2,2-tribromoetanol 97%) para luego disectar a través de la tráquea los ganglios, basándonos como fue descrito previamente (Vaillant et al., 1999). Una vez extraído los ganglios, éstos son colectados en una placa de 35 mm<sup>2</sup> con medio de cultivo (Ultraculture suplementado con suero fetal bovino 6%, glutamina 2 mM, penicilina 1000 unid/ml y estreptomicina 1000 ug/ml) suplementado con NGF (2 nM o 50 ng/ml) sobre hielo durante toda la cirugía. Una vez obtenidos los ganglios, éstos son desencapsulados y lavados en solución tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7,4) 3 veces. Posteriormente se incuban en una solución de tripsina

pancreática de bovino (0,5 mg/ml) durante 30 min a 37°C. Consecutivamente se les adiciona 0,2 mg/ml de DNasa durante 5 min a 37°C. Luego, los ganglios son lavados con medio de cultivo 3 veces y se disgregan con una pipeta Pasteur con la punta afinada en medio de cultivo suplementado con NGF (2 nM o 50 ng/ml). Finalmente, los ganglios ya disgregados son pasados por un tamiz celular de 40 µm para eliminar restos celulares que interfieran con el cultivo.

Se realizan dos tipos de siembra dependiendo del diseño experimental; cultivos masivos y cultivos compartimentalizados.

Para cultivos masivos se utiliza el sustrato poli-L-ornitina (1 mg/ml) – laminina (2 mg/ml). Previo al cultivo, 24 horas antes se incuba la placa o los cubre-objetos a utilizar, con el sustrato poli-L-ornitina durante 2 horas a 37°C. Se retira y luego se deja incubando la laminina a 37°C disuelta en agua estéril hasta el día del cultivo. El día del cultivo se retira la laminina y se lavan las placas 2 veces con agua destilada.

Desde el segundo día in vitro (DIV) el cultivo es mantenido cambiando la mitad del medio suplementado con NGF (50 ng/ml) y afidicolina (3,3 ug/ml).

En el caso de los cultivos compartimentalizados se utiliza el mismo sustrato sobre cubre-objetos de 25 mm<sup>2</sup>. El primer día de siembra se utiliza mayor volumen en el compartimiento axonal (130 ul) que en el compartimiento de los cuerpos celulares (50 ul cada compartimiento). El segundo día se realiza cambio de medio suplementando con NGF (50 ng/ml) y afidicolina (3,3 ug/ml) revirtiendo los flujos; dejando con mayor volumen los compartimientos de los cuerpos celulares potenciando el crecimiento de los axones hacia el compartimiento de axones distales.

Las células se mantienen en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C y una humedad relativa de aproximadamente 80%.

### **3.1.2. Cultivo de células HEK 293**

La línea celular HEK 293 derivadas de células embrionarias de riñón humano (HEK 293, human embryonic kidney cells) es mantenida en placas de 10 cm<sup>2</sup> con medio D-MEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino (10%), glutamina (1%) y antibiótico/antimicótico (penicilina 1000 unid/ml, estreptomycin 1000 ug/ml). Las células se mantienen en una incubadora con CO<sup>2</sup> al 5% a 37°C y una humedad relativa de aproximadamente 80%.

## **3.2. Preparación y montaje de cámaras de microfluidos**

### **3.2.1. Preparación cámaras de microfluído**

Las cámaras son hechas a través de un molde fabricado por litografía que se pone en la base de una placa de Petri de 150 mm de diámetro, basándonos en lo descrito anteriormente por (Park et al., 2006). Este molde se incuba con vapores de clorotrimetilsilano y luego es cubierto con silicona (Sylgard184 - silicone elastomer kit) e incubado en una cámara de vacío para eliminar todas las burbujas de la silicona. Una vez extraídas todas las burbujas, la silicona se deja solidificar por 48 h a temperatura ambiente o por 2 h a 70°C. Luego las cámaras se cortan con ayuda de un bisturí y un punzón dando la forma deseada a la cámara.

Para esterilizar las cámaras, éstas se lavan por al menos 3 h en etanol al 70%, luego se secan dentro de una cámara de flujo laminar y se les aplica radiación ultravioleta durante 15 min por ambos lados.

### **3.2.2. Montaje de cámaras de microfluído**

Se utilizan cubre-objetos de 25 mm<sup>2</sup> de diámetro para montar las cámaras. Los cubre-objetos son tratados con etanol al 70% y ácido clorhídrico al 1% por 2 h, lavados y luego esterilizados en una mufla a 150°C por 12 h aproximadamente. Posteriormente, los cubreobjetos son incubados con poli-L-ornitina (2 mg/ml) por 2 h a 37°C, luego lavados con agua y secados a temperatura ambiente dentro de una cámara de flujo laminar. Las cámaras de cultivo compartimentalizadas son montadas sobre los cubre-objetos y se incuban con laminina (2 µg/ml) tanto en el compartimento de los cuerpos celulares como en el compartimento de los axones, teniendo precaución de que los microsurcos queden llenos de laminina sin burbujas. La laminina se incuba durante toda la noche a 37°C. Previo a sembrar las neuronas las cámaras son lavadas con agua estéril.

### **3.3. Transfección de células**

#### **3.3.1 Transfección de neuronas simpáticas**

Cultivo de neuronas simpáticas de 6 DIV son transfectadas con el método de transfección magnética utilizando el kit Neuromag. Para la optimización de los reactivos se utiliza el formato de área de un pocillo de una multi-placa de 96 pocillos, para la siembra de las células con un total aproximado de 20.000 células por pocillo, equivalente a medio ganglio. Se realiza un formato de cámara de un solo pocillo de silicona, realizada de la misma manera que las cámaras de microfluído compartimentalizadas como fue descrito anteriormente en la sección

3.2.1. Esta cámara de un único pocillo es montada sobre un cubre-objeto de 25 mm<sup>2</sup> que fue previamente incubado con poli-L-ornitina y laminina, como fue descrito anteriormente en la sección 3.2.2.

Previo a la transfección se retira el medio completo en donde son mantenidas las células y se reemplaza por medio de mantención Ultraculture, sin suero ni antibiótico, sólo suplementado con NGF (50 ng/ml) durante 2 h.

Se comienza realizando una mezcla que contiene 0,5 ug de ADN por 1,75 ul de reactivo Neuromag en un volumen de incubación de 50 ul en Optimem. La mezcla ADN-Neuromag se incuba durante 15 min en movimiento suave sobre un vortex a temperatura ambiente. Luego se incuba el complejo ADN-Neuromag en las células en un volumen final de transfección de 150 ul de optimem, poniendo la placa sobre una superficie magnética estática durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se retira todo el medio que contiene el complejo de transfección y se reemplaza por medio de mantención suplementado con NGF (50 ng/ml) y se espera 24 h para realizar los experimentos.

### **3.3.2 Transfección de células HEK 293**

Las células HEK 293 son cultivadas 24 h antes de la transfección con medio completo sin antibiótico-antimicótico (medio de transfección). Se comienza realizando dos tipos de complejos: Optimem-Lipofectamina y Optimem-ADN, en las relaciones adecuadas según tamaño de placa a transfectar. Para el caso del formato de placa utilizada en el experimento (60 mm<sup>2</sup>) se requiere 200 µl de optimem + 2 µg de ADN, y 200 µl de optimem + 6 µl de lipofectamina. Se incuban 5 minutos, luego de lo cual ambas preparaciones se mezclan,

incubando la preparación final (Lipofectamina-ADN-Optimem) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, la mezcla Lipofectamina-Optimem-ADN se incuba en las células de manera cuidadosa y por goteo para no levantar las células, en un volumen final de 3 ml de Optimem. Se incuba por 24 h hasta realizar el experimento.

### **3.4. Transducción de células con adenovirus**

Las nSCGs de 6 DIV son transducidas utilizando partículas adenovirales que conducen a la expresión de EGFP, la versión silvestre de Rab5-GFP (Rab5WT-GFP) y la versión dominante negativa de Rab5-GFP (Rab5DN-GFP) (Escudero & Cabeza., 2019).

Previo a la infección adenoviral se realiza un cambio de medio para eliminar los restos de afidicolina. Dependiendo del título del adenovirus, se utiliza una concentración que asegure al menos un 60% de infección del total de las células sembradas, en un volumen total de 400  $\mu$ l de medio de mantención suplementado con NGF (50 ng/ml). Veinte y cuatro horas post-infección se retira el medio y se realizan los experimentos.

### **3.5. Inmunofluorescencia**

#### **3.5.1. Inmunofluorescencia en cultivos masivos**

La inmunofluorescencia de cultivos masivos comienza con un bloqueo y permeabilización de las células con gelatina de pez (10%) y Tritón X-100 (0,1%) respectivamente, en solución tampón PBS durante 90 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se retira esta solución de bloqueo para incubar los anticuerpos primarios. Se utiliza una solución de incubación que contiene gelatina de pez (5%), Tritón X-100 (0,1%) en solución tampón PBS junto a los anticuerpos primarios. Esta incubación se realiza a 4°C durante toda la noche. Excepcionalmente en el caso de las inmunofluorescencia de translocación nuclear de NRIF, en la solución de bloqueo-permeabilización se adicionó citrato de sodio (0,1%). Luego, una vez retirada la solución con los anticuerpos primarios, se procede a incubar los anticuerpos fluorescentes secundarios Alexa (1:300) en una solución de incubación que contiene gelatina de pez (1%) en tampón PBS durante 1 h a temperatura ambiente. En el caso de los anticuerpos que reconocen proteínas fosforiladas durante todas las incubaciones de suplementa con inhibidores de fosfatasas. Para finalizar se procede a retirar la solución de incubación y se lava 2 veces con gran precaución con solución tampón PBS, luego se retira el exceso de líquido antes de montar la muestra sobre 20  $\mu$ l de *mowiol* en el porta-objeto con el fin de que no queden burbujas en la muestra. Se espera a que el *mowiol* se seque durante toda la noche a temperatura ambiente, para luego proceder a sellar la muestra con esmalte. Se guardan las muestras a 4°C.

Las concentraciones de los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de esta tesis son los siguientes: NRIF (rabbit 1:5000), Tubulina Acetilada (mouse 1:1000),  $\beta$ III-Tubulina (mouse 1:1000), Caspasa-3-clivada (rabbit 1:300), Fosfo-JNK (rabbit 1:200), p75 (rabbit 1:500), y la tinción para núcleo Hoechst (1:10000).

### **3.5.2. Inmunofluorescencia en cultivos compartimentalizados**

La realización de inmunofluorescencia en cultivos compartimentalizados comienza bloqueando y permeabilizando de manera simultánea, en solución tampón PBS con gelatina de

pez (10%) y Tritón X-100 (0,1%) durante 2 horas y media a temperatura ambiente, utilizando 200 ul de solución en ambos compartimentos. Posteriormente, se retira esta solución de bloqueo para incubar los anticuerpos primarios. Previo a la incubación de los anticuerpos primarios se realiza un lavado con tampón PBS. Se utiliza una solución de incubación que contiene gelatina de pez (5%), Tritón X-100 (0,1%) en solución tampón PBS junto a los anticuerpos primarios. Esta incubación se realiza a 4°C durante toda la noche. Luego de retirar la solución con los anticuerpos primarios, se procede a incubar los anticuerpos fluorescentes secundarios Alexa (1:300) en una solución de incubación que contiene gelatina de pez (1%) en tampón PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lava 2 veces en solución tampón PBS. Se retira el exceso de líquido antes de sellar las muestras con 10 ul de mowiol en el compartimiento de los cuerpos celulares y 15 ul en el compartimiento axonal. Se deja esperar que el mowiol se seque durante toda la noche a temperatura ambiente. Se guardan las muestras a 4°C.

### **3.6. Inmunoendocitosis**

#### **3.6.1. Inmunoendocitosis de p75 en cultivos masivos**

Se siembran SCGs en cubre-objetos de 12 mm<sup>2</sup> con un número aproximado de 40.000 células por pocillo. A los 7 DIV se inicia el experimento privando de factores tróficos con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de BSA) suplementado con KCL 12,5 mM y un anticuerpo anti-NGF (1:1000) para eliminar el NGF del medio, durante 1 h a 37 °C.

Para el reconocimiento del receptor p75 se incuban con un anticuerpo que se une al dominio extracelular del receptor, el anticuerpo MC192 (3 µg/ml) (basándonos en lo descrito

por Bronfman et al., 2003), en presencia o ausencia de BDNF (50 nM o 150 ng/ml) a distintos tiempos de incubación para inducir la internalización del receptor. También se considera el punto experimental tiempo cero incubando el anticuerpo MC192 durante 1 hora a 4 °C. Transcurrido los tiempos experimentales, se retira el medio y se lava con PBS 1 vez. Luego se fijan las células con PFA 4% durante 15 min para posteriormente realizar una inmunofluorescencia, como fue descrito en la sección 3.5.1.

### **3.6.2. Ensayo de inmunoendocitosis de p75 y colocación de NRIF junto a Rabs GTPasas en cultivos compartimentalizados.**

Cultivos compartimentalizados de SCGs de 6 DIV se transducen con adenovirus que contienen la versión silvestre de Rab5 y Rab11 fusionado a GFP (Rab5-GFP y Rab11-GFP). Luego de 24 h post-infección se incuban las células con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de suero albúmina de bovino) suplementado con el anticuerpo anti-NGF (1:1000). Luego se realiza una inmunoendocitosis de p75 con el el anticuerpo MC192 (3 µg/ml) en presencia de BDNF (150 ng/ml) en ambos compartimentos en medio de depleción durante 90 min a 37°C. El punto experimental sin BDNF es incubado con un anticuerpo bloqueante para BDNF, TrkB-Fc, junto el anticuerpo MC192 (3 µg/ml) durante 1 h a 4°C. Se lavan las células y se fijan con PFA (4%) durante 15 min.

Se realiza una inmunofluorescencia como fue descrito en la sección 3.5.2. utilizando un anticuerpo contra NRIF.

### **3.7. Translocación nuclear de NRIF**

Cultivos masivos de SCGs sembrados en cubre-objetos de 12 mm<sup>2</sup> de 6 DIV son transducidas con adenovirus que conducen a la expresión de EGFP y Rab5DN-GFP como fue descrito anteriormente (3.4). Después de 24 horas post-infección se realiza una privación de factores tróficos con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de suero albúmina de bovino) suplementado con anti-NGF (1:1000) durante 1 hora a 37°C. Para inducir la translocación de NRIF hacia el núcleo se incuba con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 30 h en presencia de KCL 12,5 mM y anti-NGF (1:1000). El punto experimental control sin BDNF contiene adicionalmente un anticuerpo anti-BDNF (1:100). Posteriormente se fijan las células con PFA (4%) y se realiza una inmunofluorescencia contra NRIF en conjunto con una tinción de núcleo Hoechst, como fue previamente descrito (Linggi et al., 2005).

La cuantificación de la translocación de NRIF se realiza midiendo la intensidad de fluorescencia de la marca de NRIF delineando el núcleo respecto al área de la marca positiva para núcleo con Hoechst.

### **3.8. Ensayo de activación de JNK.**

#### **3.8.1. Activación de JNK en cultivos masivos**

Cultivos de SCGs de 6 DIV sembrados en cubre-objetos de 12mm<sup>2</sup> con un número de células aproximadamente de 40.000 por cubre-objetos, son privadas de factores tróficos con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de suero albúmina de bovino)

suplementado con un anticuerpo TrkA-Fc (100 mg/ml) para capturar el NGF que pueda quedar remanente en el medio, durante 1 h a 37°C. Posteriormente las células son estimuladas con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 30, 60, 120 y 240 min. El punto experimental sin BDNF además se suplementa con el anticuerpo TrkB-Fc para eliminar cualquier residuo de BDNF y evitar activación de JNK por esta neurotrofina. Luego de la estimulación, las células son lavadas 1 vez con tampón PBS y finalmente son fijadas con PFA (4%). Desde aquí en adelante el tampón PBS utilizado para la inmunofluorescencia está suplementado con un cocktail de inhibidores de fosfatasas.

Se realiza una inmunofluorescencia como fue descrito en la sección 3.5.1 para las proteínas fosfo-JNK y tubulina.

### **3.8.2. Activación de JNK en cultivos compartimentalizados**

Para evaluar la activación de la quinasa JNK en cultivos compartimentalizados se inicia sembrando las SCGs en cámaras de microfuido como fue descrito en la sección 3.2.2. Se utilizan aproximadamente 25.000 células en total repartidas en ambos orificios de los compartimentos de los cuerpos celulares, para que el cultivo tenga una densidad media.

Previo a comenzar el experimento, para asegurar la compartimentalización del cultivo, 16 hrs antes del experimento se incuba en el compartimento axonal con la subunidad beta de la toxina del cólera la cual está conjugada a un fluoróforo-647 (1:750), como un marcador del transporte retrógrado. Las SCGs de 6 DIV son privadas de factores tróficos en ambos compartimentos con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de suero albúmina de bovino) suplementado con TrkA-Fc (100 mg/ml) durante 1 h a 37°C. En este paso no se necesita

hacer flujo en dirección a algún compartimento por lo tanto los volúmenes utilizados son 100  $\mu$ l para el compartimento de los cuerpos celulares y 150 para el compartimento axonal. Luego se procede a incubar a distintos tiempos (0, 30, 120 y 240 min) con BDNF (150 ng/ml) sólo en los compartimentos axonales. En este paso se requiere generar flujo hacia los axones de manera que el BDNF agregado en este compartimiento no se filtre hacia los cuerpos celulares. La forma de realizarlo es utilizar un volumen mayor en los compartimentos celulares, 120  $\mu$ l (60  $\mu$ l en cada orificio), y un volumen menor en el compartimento axonal (100  $\mu$ l). Durante todo el experimento los compartimientos celulares contienen medio de depleción suplementado con TrkA-Fc (100 mg/ml) y TrkB-Fc (150 mg/ml), mientras que el compartimento axonal contiene medio de depleción suplementado con BDNF y TrkA-Fc. Posteriormente al cumplirse el tiempo de incubación se retira el medio en la cámara completa y se lavan las células una vez con tampón PBS y son fijadas con PFA (4%) durante 10 min. Finalmente, se retira el PFA y se lava una vez con PBS suplementado con un cocktail de inhibidores de fosfatas. Desde aquí en adelante se utilizará este tampón para toda la inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia se realiza como fue descrito en la sección 3.5.2. Se utilizan los anticuerpos primarios para fosfo-JNK (1:200) y tubulina acetilada (1:1000). Para la detección de fosfo-JNK se utiliza un anticuerpo Alexa donkey-anti-rabbit-555 (1:300) y para el reconocimiento de tubulina un anticuerpo Alexa donkey-anti-mouse-488 (1:300).

Los niveles de fosfo-JNK son cuantificados de acuerdo con la marca de tubulina total. Se hace una selección de toda la marca inmuno-positiva para tubulina en el software image J, para luego utilizar esta área axonal de referencia en la cuantificación de la quinasa fosforilada.

### 3.9. Ensayo de apoptosis mediante el clivaje de la caspasa-3

Cultivos masivos de SCGs se siembran en cubre-objetos de 12mm<sup>2</sup> con un número aproximado de 40.000 células por cubre-objeto. Las SCGs de 6 DIV son transducidas con adenovirus que conducen a la expresión de EGFP y Rab5DN-GFP como fue descrito anteriormente (3.4). Después de 24 horas post-infección se comienza el experimento realizando una privación con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, 1 mg/ml de BSA) suplementado con TrkA-Fc (100 mg/ml) durante 1 h a 37°C. Posteriormente se incuba con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 24 h en presencia de KCL 12,5 mM y TrkA-Fc (100 ug/ml) a 37°C. El punto experimental control sin BDNF contiene adicionalmente un anticuerpo TrkB-Fc (100 ug/ml). En paralelo se realiza un cultivo como control positivo y negativo en donde SCGs son mantenidas con y sin NGF (50 ng/ml) durante 18 h respectivamente. Para finalizar se lavan las células 1 vez con tampón PBS y son fijadas con PFA (4%) durante 15 min.

Se realiza una inmunofluorescencia como fue descrito en la sección 3.5.1. Se utilizan los anticuerpos primarios para caspasa-3 clivada (1:300) y tubulina acetilada o  $\beta$ III- tubulina (1:1000). Para la detección de caspasa-3 clivada se utilizó un anticuerpo Alexa donkey-anti-rabbit-555 (1:300) y para la tubulina acetilada un anticuerpo Alexa donkey-anti-mouse-488 (1:300).

El criterio de análisis consiste en considerar marca positiva de caspasa-3 clivada a células que presentaran al menos el doble del valor de la marca basal.

### 3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los geles de poliacrilamida-SDS se preparan a partir de una solución concentrada al 30% de acrilamida/bis-acrilamida, en una razón 29:1. El gel separador o resolutivo (0,375 M de Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % de SDS) y el gel concentrador (y 0,125 M de Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % de SDS), se realizan disolviendo el volumen de solución acrilamida-bis-acrilamida correspondiente.

Las muestras son preparadas utilizando un tampón de carga que contiene 0,25 M de Tris-HCl, pH 6,8, 10 % de glicerol, 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,5 % de SDS y azul de bromofenol. Las muestras previo a ser cargadas son calentadas a 95°C por 10 min para denaturar las proteínas y luego la muestra es cargada en un gel-PAGE.

### 3.11. Western blot

Las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida-SDS son transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 250 mA por 90 min a 4°C. Luego la membrana se incuba con tampón TBST (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %) y BSA (5 %) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas son lavadas con tampón TBST 6 veces por 5 minutos cada vez y luego son incubadas con un anticuerpo contra un antígeno determinado en tampón TBST y BSA (5 %) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas son lavadas con tampón TBST 5 veces por 10 minutos cada vez e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en tampón TBST por 1 h a temperatura ambiente en movimiento. Finalmente, las membranas son lavadas con tampón TBST 5 veces por 10 minutos cada vez.

Para revelar las bandas se utilizan los reactivos de detección por quimioluminiscencia de “*Super Signal Femto Maximum Sensitivity Substrate*” y “*Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate*”.

### **3.12. Cuantificación de niveles proteicos de Rab5 y Rab11**

Cultivos masivos de SCGs son crecidos en placas de 3,5 cm<sup>2</sup> con aproximado 160.000 células sembradas por placa. A los 6 DIV se priva de nutrientes durante 1 h en medio de depleción suplementado con un anticuerpo bloqueante para NGF (TrkA-Fc 1:1000), BSA (1mg/ml) y KCL (12,5mM). Luego se realiza la estimulación con BDNF (150ng/ml) durante 0, 4 y 30 h en medio de depleción. Se lava 1 vez con solución tampón PBS y posteriormente se realiza una lisis adicionando 200 ul de buffer de lisis por placa (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, inhibidor de proteasas, 250 mM sucrosa, pH 7.6). Se utiliza un *cell-scraper* para colectar todo el material celular y se deposita en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se deja lisando el contenido durante 20 minutos en hielo. Se centrifuga la muestra a 14.000 rpm durante 12 min a 4°C. Se conserva el sobrenadante que contiene la porción proteica.

Se realiza una electroforesis en un gel resolutivo al 10% de acrilamida/bisacrilamida, cargando aproximadamente 40 ug de proteína por cada punto experimental. Posteriormente, se realiza un western blot (ver sección 3.10 y 3.11) para la detección de las GTPasas Rab5 (1:1000) y Rab11(1:1000), además de tubulina (1:1000) como control de carga de proteína total.

### 3.13. Co-inmunoprecipitación de p75 y Rab5 con esferas magnéticas M-280 (*dynabeads M-280 sheep-anti mouse IgG*)

Cultivos masivos de SCGs son sembradas en placas de 3,5 cm<sup>2</sup> a una densidad de 240.000 células por placa. A los 7 DIV son privadas de suero con medio de depleción (DMEM sin rojo fenol suplementado con BSA 1mg/ml, KCL 12,5 mM y TrkA-Fc 100 ng/ml) durante 60 min. Luego se reemplaza el medio por medio de depleción con y sin BDNF (150 ng/ml) durante 90 y 240 min a 37°C; el punto experimental sin BDNF adicionalmente es incubado con TrkB-Fc (200 ng/ml). Una vez transcurrido el tiempo los cultivos son lavados 1 vez con tampón PBS y lisadas en 200 µl de solución de lisis (Tris 10mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Glicerol 10%, NP40 1% suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas) durante 15 min en hielo. Se centrifuga el homogenizado a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se colecta el sobrenadante para comenzar la inmunoprecipitación.

Una vez que se obtiene el sobrenadante, se procede a medir proteínas para conservar aproximadamente el 10% del lisado total como material de entrada de la inmunoprecipitación (*input*). Previo al inicio del experimento, 24 h antes se deja incubando las *dynabeads* con el anticuerpo MC192 (4 µg/ml) en rotación a 4°C. Para cada punto experimental se utilizan 100 µl de *dynabeads* resuspendidas en 1ml de solución de lavado (PBS suplementado con 0,1 % de BSA y 2 mM EDTA, pH 7.4) junto al anticuerpo en un tubo *ependorf* de 1,5 ml.

Utilizando un magneto con pocillos para tubos *ependorf* para precipitación de *dynabeads*, se introducen los tubos y se espera que decante la muestra durante 2 minutos. Se retira el sobrenadante y se adiciona la muestra que contiene las proteínas (~90% del material proteico) llevando el volumen de la muestra a un total de 1 ml el cual debe ser completado con

solución de lavado. Se incuba la muestra durante 90 min a 4°C en rotación. Nuevamente se debe repetir el paso de incorporar los tubos con muestras en el magneto y esperar 2 minutos a que esta decante para extraer el sobrenadante y obtener el complejo *dynabeads-proteínas*. Se lavan las beads con solución de lavado durante 1 min y luego se repite el paso anterior. Luego del último lavado se retira de manera acuciosa todo el líquido remanente. Una vez retirado todo el sobrenadante se procede a eluir por pH la muestra agregando 30 µl de solución citrato (0.1 M citrato, pH 2-3). En movimiento se incuba durante 3 min para luego volver a precipitar las *dynabeads* durante 2 min. Se rescata el sobrenadante en un tubo nuevo, y se vuelve a agregar 30 µl de solución citrato al tubo de las *dynabeads*, repitiendo el paso anterior. Una vez obtenida toda la muestra eluída se agrega buffer de carga y se calienta la muestra a 95°C durante 8 min.

Para finalizar se realiza una electroforesis en un gel al 10% de acrilamida/bisacrilamida para la detección de p75 (1:1000) y Rab5 (1:1000) por western blot.

### **3.14. Detección de la actividad de Rab5**

#### **3.14.1. Producción de proteína de fusión R5BD**

Las bacterias transformadas que contienen el vector pGEX con la proteína de fusión GST junto con el dominio de unión de Rabaptina 5 a la GTPasa Rab5 (pGEX GST-R5BD) fue donado por el Dr. Vicente Torres (Facultad de Odontología, Universidad de Chile).

Desde glicerol stock se dejan crecer 200 µl de bacterias transformadas con el plásmido pGEX GST-R5BD en placa de agar de LB/Ampicilina de 10 cm<sup>2</sup> a 37°C durante 8 h. Se selecciona una colonia y se crece en 5 mL de medio LB/Ampicilina durante 6 h. a 37°C. Se

toman 200  $\mu$ L de la suspensión y se crecen a 37°C durante la noche (14 h aproximadamente) en un matraz *Erlenmeyer* conteniendo 200 mL de medio LB/Ampicilina. En la mañana siguiente se agrega al cultivo otros 200 mL de medio LB/Amp fresco y se induce la expresión de la proteína de fusión GST-R5BD con IPTG a concentración final 0,3 mM durante 2 h y 30 min a 37°C. Luego se resuspende la totalidad del pellet en 4 mL de buffer de lisis (25mM HEPES pH 7.4, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP-40, 10% glicerol, 1mM ditiotriol, cóctel inhibidor de proteasas). Se sonica la suspensión 2 veces, durante 15 segundos a nivel 3 (25 Watts) descansando 1 min en hielo entre sonicados. Agregar detergente IGEPAL a una concentración final 0,5%. Incubar a 4°C durante 1 h en rotación. Centrifugar a 13000 rpm (velocidad máxima) durante 30 min a 4°C. Colectar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 600  $\mu$ L de *slurry* 50% Glutathion-Sepharose 4B Beads. Incubar durante 1 h a 4°C en rotación. Realizar lavados de las *beads* en buffer de lisis con NP-40. Centrifugar durante 1 min a 1200 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 800  $\mu$ L de buffer de lisis con IGEPAL 0,5%. Realizar 3 lavados de las *beads* en buffer de lisis sin IGEPAL. Centrifugar durante 1 min a 1200 rpm; se descarta el sobrenadante y se resuspende en 800  $\mu$ L de buffer de lisis sin IGEPAL. Recuperar las *beads* y descartar la mayor cantidad posible de sobrenadante. Resuspende la totalidad del volumen obtenido en el mismo volumen de Glicerol. Para finalizar se debe alicuotar en volúmenes de 50  $\mu$ L. Congelar rápidamente por descenso crioscópico al sumergir los tubos en mezcla metanol/hielo seco, y almacenar a -80°C.

### 3.14.2. *Pull-Down* y medición de la actividad de Rab5

Cultivos masivos de SCGs son sembrados y crecidos en placas de 10 cm<sup>2</sup>, con aproximadamente 500.000 células por pocillo. A los 7 DIV son privados de suero durante 1 h en medio de depleción suplementado con un anticuerpo bloqueante para NGF (TrkA-Fc 1:1000), BSA (1mg/ml) y KCL (12,5mM).

Posteriormente se retira el medio para estimular con BDNF (150 ng/ml) durante 0, 90 y 240 min en medio de depleción. El punto experimental sin BDNF está suplementado con TrkB-Fc (200 mg/ml).

Transcurrido el tiempo de estimulación, se retira el medio y se lisan las células agregando 500 µl de solución de lisis (HEPES 20mM, pH 7.4, NaCl 100mM, MgC 125 mM, NP-40 1%, Glicerol 10%, DTT 1mM, coctel de inhibidor de proteasas) utilizando un *cell-scraper* lo más rápido posible se colecta el material de inicio, el cual se deposita en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se realiza una lisis suave con 5 movimientos *up and down* con la pipeta, el tubo nunca apartándolo del hielo. El lisado se somete a centrifugación a máxima velocidad (14.000 rpm) durante 45 segundos para obtener el sobrenadante con la porción proteica. Luego se incuba el 90% del extracto con la proteína de fusión que tiene el dominio de unión a Rabaptina-5 fusionado a GST (GST-RB5) asociados a *beads* de sefarosa durante 15 min a 4°C en rotación. Transcurrido el tiempo se realizan 2 lavados con solución tampón PBS suplementado con todos los componentes del buffer de lisis. Entre cada lavado se realiza una centrifugación a 3000g durante 30 segundos. Luego se resuspende la muestra en buffer de carga con SDS en calor (aproximadamente 90°C) durante 5 min.

Se realiza una electroforesis en un gel resolutivo de acrilamida/bisacrilamida al 12% (sección 3.10). El 10% restante del extracto inicial se utiliza para ser cargado como el material de entrada (*input*) del *pull-down* en un gel independiente, y así medir los niveles totales de Rab5 (1:500), para luego evaluar la proporción de los niveles de Rab5 activo (1:500) en relación a niveles totales de Rab5 al inicio (Díaz et al., 2014).

Luego de realizar un western blot (ver sección 3.11), las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa que es teñida con rojo *Ponceau* para determinar el límite de dónde se encuentran las esferas de agarosa que fueron transferidas (aproximadamente a la altura del peso molecular de 35 KDa) y cortar en esta zona. Sólo se debe utilizar la porción de la membrana descartando la zona donde migraron las esferas, pues intervienen en la detección de la marca para Rab5 . En ocasiones la porción de Rab5 activa debe ser revelado con el kit Femto West para hacer visible la marca.

### **3.14.3. Detección de Rab5-GTP por inmunofluorescencia**

Cultivos de SCGs de 6 DIV sembrados en cubre-objetos de 12mm<sup>2</sup> con un número de células aproximadamente de 40.000 por cubre-objetos. Son privadas de suero con medio de depleción suplementado con un anticuerpo TrkA-Fc (100 mg/ml), durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las células son estimuladas con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 0 y 240 min. El punto experimental sin BDNF además se suplementa con el anticuerpo TrkB-Fc (200 mg/ml) para eliminar cualquier residuo de BDNF. Luego de la estimulación, las células son lavadas 1 vez con tampón PBS y finalmente son fijadas con PFA 4%.

Se lavan las células, se bloquea y permeabiliza como es descrito en la sección 3.5.1. Luego en medio tampón PBS suplementado con gelatina de pez (5%) y Tritón X-100 (0,1%) se incorpora la proteína de fusión que contiene el dominio de unión del efector Rabaptina-5 a Rab5 en su forma activa (Rab5 asociada a GTP) asociado a GST (R5BD-GST). Se incuba toda la noche a 4°C. Posteriormente se retira la R5BD-GST, se lava una vez con el tampón PBS y se vuelve a fijar la muestra con PFA 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se comienza una inmunofluorescencia convencional como está descrito en la sección 3.5.1 para la inmunodetección de GST (1:1000) y tubulina (1:1000).

### **3.15. Ensayo de transporte retrógrado de p75 en presencia del inhibidor de JNK SP600125**

#### **3.15.1. Conjugación anticuerpo MC192 biotinilado con QDtos-605**

Se utiliza el anticuerpo monoclonal MC192, que reconoce el dominio extracelular del receptor p75, el cual es biotinilado utilizando el kit “EZ Link Micro PEO4 Biotinylation”. Posteriormente, el MC12 biotinilado (200 nM) es incubado junto a las Qdots 605 el cual está conjugado a estreptavidina (200 nM) en DMEM sin rojo fenol durante 30 min a 4°C en un volumen total de incubación de 30 µl (Escudero & Cabeza ., 2019).

#### **3.15.2. Ensayo de transporte retrógrado de p75 en neuronas simpáticas**

Cultivos compartimentalizados de SCGs se siembran en cámaras de microfuido como fue descrito en la sección 3.2.2. Se utilizan aproximadamente 25.000 células en total repartidas

en ambos orificios de los compartimentos de los cuerpos celulares, para que el cultivo tenga una densidad media.

A los 6 DIV se inicia el experimento con la privación de suero de los cultivos en medio de depleción (DMEM sin rojo fenol, BSA 1mg/ml, suplementado con KCL 12mM y TrkA-Fc 150 ng/ml) durante 1 h a 37°C. El volumen a utilizar son 60  $\mu$ l en cada compartimento de los cuerpos celulares y 150  $\mu$ l en el compartimento axonal. No es necesario hacer flujo en este paso. En paralelo se realiza la conjugación del anticuerpo MC192 biotinilado como fue descrito en la sección 3.15.1.

Se retira el medio de todos los compartimentos y se agrega medio de depleción en los cuerpos celulares suplementado con KCL (12,5 mM), TrkB-Fc (150 ng/ml) y TrkA-Fc (150 ng/ml). El volumen por cada compartimento es de 70  $\mu$ l. Luego se procede a agregar el medio en el compartimento axonal. Este medio (DMEM sin rojo fenol, BSA 1mg/ml y TrkA-Fc 150 ng/ml) tendrá la conjugación MC192/Qdots junto con BDNF (150 ng/ml). El volumen de este compartimento son 100  $\mu$ l. Se deja incubando por 4 horas a 37°C.

Se realizan lavados cortos 2 o 3 veces con medio de depleción. Para retirar los medios de cada compartimento se comienza por el compartimento axonal y luego el compartimento de los cuerpos celulares para evitar el flujo de medio desde los axones a los cuerpos celulares.

Se incuba la droga SP600125 (10  $\mu$ M) o DMSO (vehículo) en el compartimento de los cuerpos celulares durante 30 min utilizando los mismos volúmenes descritos anteriormente en el paso de la incubación con BDNF. Adicionalmente, se realiza un cultivo control con el inhibidor de dineína Ciliobrevina-D (20  $\mu$ M) en el cuerpo celular.

### 3.15.3. Registro en tiempo real de transporte retrógrado de p75

El registro en células vivas se realiza en medio de depleción. Se registra en un Microscopio Spinning Disk invertido Olympus IX81 sobre una plataforma termoregulada utilizando un objetivo de 60X.

Las capturas de cada *frame* se realiza cada 0,6 seg con un total de 100 o 125 *frames* en total para cada video.

### 3.15.4. Procesamiento de imágenes y análisis

Para el procesamiento de los videos se utiliza el programa Image J.

Para los análisis de velocidad y distancia recorrida a cada video se le realiza una proyección en Z del total de *frames*, para luego seleccionar partículas en movimiento y realizar un quimograma de esa partícula y luego medir la velocidad y distancia alcanzada por la partícula con el *plugin Multi Kymograph*.

Para los análisis del porcentaje del número de detenciones para las partículas móviles se utiliza el *plugin Velocity Measurement Tool* para realizar un kimograma del video completo. Se consideraron detenciones en el movimiento sobre los 20 seg.

Para los análisis del porcentaje de partículas móviles se utiliza un quimograma del video completo realizado con el *plugin Velocity Measurement Tool*, y luego se evalúa el total de partículas con movimiento o detenidas en el video completo.

## **4.-RESULTADOS**

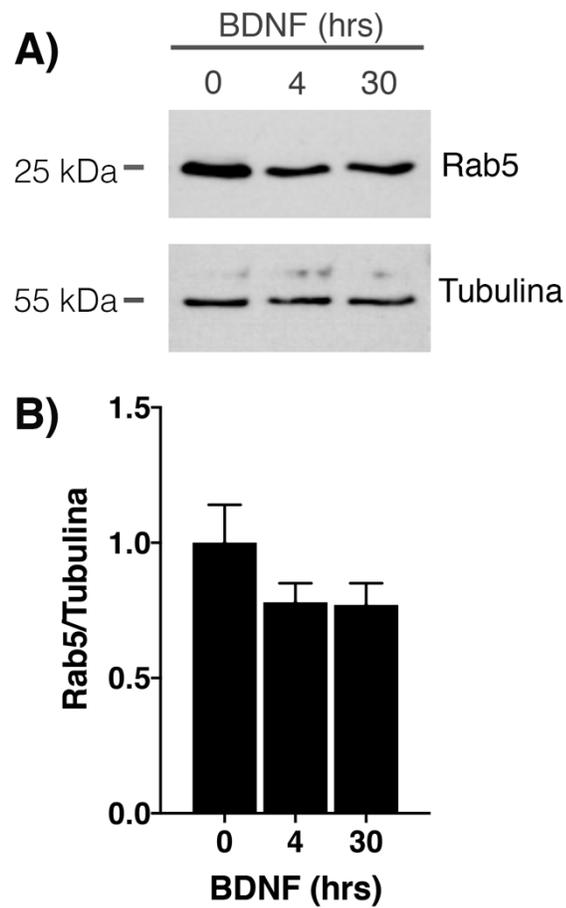
### **4.1 Interacción de p75 y Rab5 en respuesta a BDNF.**

#### **4.1.1 Los niveles proteicos de Rab5 no se ven afectados en respuesta a BDNF.**

Para evaluar si p75 interactúa con Rab5 en respuesta a la activación por BDNF, primero estudiamos si BDNF tiene incidencia en la regulación de los niveles de Rab5 cuando el receptor p75 se activa por esta neurotrofina. Es por esto que se realizaron ensayos de estimulación con BDNF de cultivos masivos de SCGs a distintos tiempos y luego se analizaron los niveles totales de Rab5 a través de western blot.

La Figura 5 muestra la marca para Rab5 de las fracciones completas de homogenizados de SCGs a distintos tiempos de estimulación con BDNF. Los distintos tiempos de estimulación con BDNF coinciden con 2 eventos importantes en el tráfico y señalización del receptor p75. En primer lugar, se utilizó 4 h de estimulación, punto experimental que coincide con el tiempo de máxima internalización del receptor en SCGs (Escudero et al., 2014); y 30 h de estimulación, que es el tiempo necesario para que NRIF llegue desde el citoplasma al núcleo e induzca

apoptosis (Kenchappa et al., 2006). Nuestros resultados muestran que la estimulación con BDNF no modula los niveles totales de Rab5 cuando se cuantifican respecto al total de  $\beta$ -tubulina en comparación al control sin BDNF (Figura 5A y B).

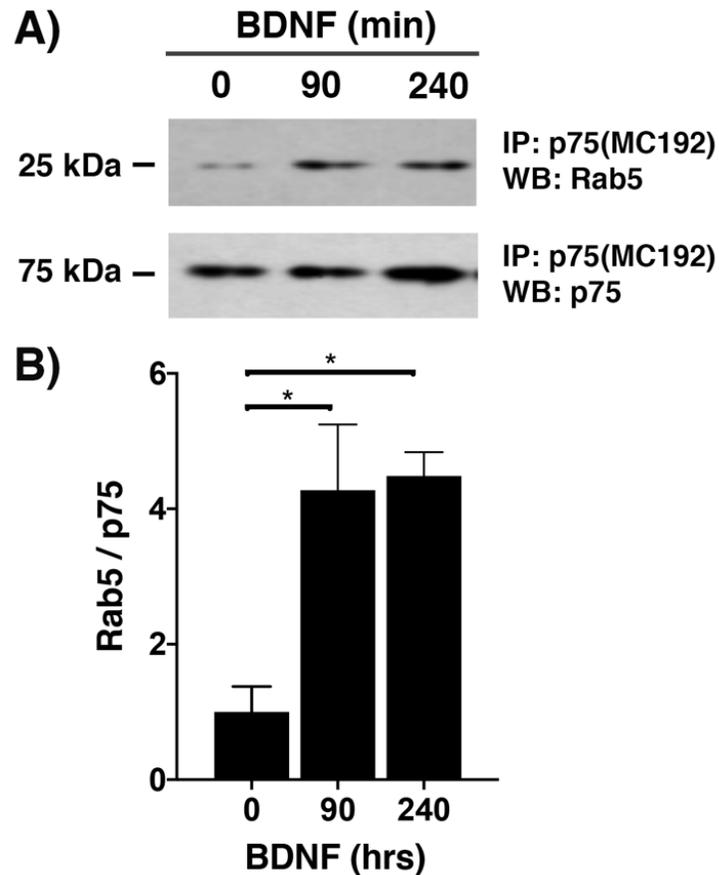


**FIGURA N°5. Los niveles totales de Rab5 no son regulados por la activación de p75 mediante BDNF.** (A) Western blot de los niveles totales de Rab5 (arriba) y  $\beta$ III-Tubulina (abajo) provenientes de cultivos masivos de SCGs de 6 DIV que fueron estimulados con BDNF (150 ng/ml) en presencia de KCL (12,5 mM) durante 0, 4 y 30 h. (B) El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de Rab5 normalizados por los niveles totales de  $\beta$ III-Tubulina de cada punto experimental, y posteriormente corregidos como la proporción respecto al nivel basal sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. La significancia de los datos fue analizada por un test ANOVA de una vía seguido de un post-test de Tukey; de 3 experimentos independientes ( $P= 0.3421$  y  $P=0.3150$ ).

#### 4.1.2. Interacción entre p75 y Rab5 en respuesta a BDNF.

Con el objetivo de estudiar si p75 y Rab5 interactúan de una manera dependiente de BDNF se realizó una co-inmunoprecipitación con *beads* magnéticas asociando el anticuerpo MC192 a las *beads*. Las SCGs fueron estimuladas por 90 y 240 min con BDNF, de acuerdo a los tiempos de mayor internalización del receptor (Escudero et al., 2014), posteriormente las células fueron lisadas y se realizó la precipitación de p75 y posteriormente se evaluó la presencia de Rab5 por western blot. En la figura 6A se puede apreciar que existe una interacción basal de p75 con Rab5. Esta interacción se ve significativamente incrementada en presencia de 90 y 240 min de tratamiento con BDNF.

Éstos datos sugieren que una vez que el receptor p75 es activado en respuesta a BDNF, estas proteínas tienen una interacción que se sostiene en el tiempo a medida que el receptor está internalizando y avanzando en su paso por la ruta endocítica.



**FIGURA N°6. Interacción entre p75 y Rab5 es regulada por BDNF. (A)** Co-immunoprecipitación de p75 y Rab5, realizada con lisados totales provenientes de cultivos masivos de SCGs de 6 DIV que fueron privadas de factores tróficos durante 60 min y posteriormente estimulados con BDNF (150 ng/ml) durante 0, 90 y 240 min. Posteriormente se llevó a cabo la precipitación de p75 por medio del anticuerpo MC192 asociado a *beads* magnéticas, para luego evaluar los niveles proteicos en un gel de SDS y revelar la marca de Rab5 y p75 por *western blot*. **(B)** El gráfico muestra la cuantificación de la proporción de Rab5 respecto a lo que precipita de p75 normalizada por el nivel basal sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\*  $p < 0.05$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA de una vía seguido de un post-test de Tukey, de 4 experimentos independientes.

#### **4.1.3. La activación de p75 por BDNF modula la actividad de Rab5.**

Todos los miembros de la superfamilia de las proteínas Ras funcionan como interruptores moleculares dependiendo del nucleótido que mantengan unido (GTP o GDP); es así como estas GTPasas se consideran activas cuando están unidas a GTP (Mizuno-Yamasaki et al., 2012). La actividad de Rab5 es requerida para que ocurran procesos de tráfico endocítico una vez que se comienzan a formar pequeñas vesículas desde la membrana plasmática, para posteriormente fusionarse y formar endosomas tempranos (Bucci et al., 1992). Si bien no se tiene total claridad de si la actividad de Rab5 es necesaria para que p75 lleve a cabo sus procesos celulares, ha sido descrito que en motoneuronas la actividad de Rab5 es requerida para la destinación del receptor en endosomas que viajan retrógradamente para la subsecuente respuesta celular en el soma (Deinhardt et al., 2007).

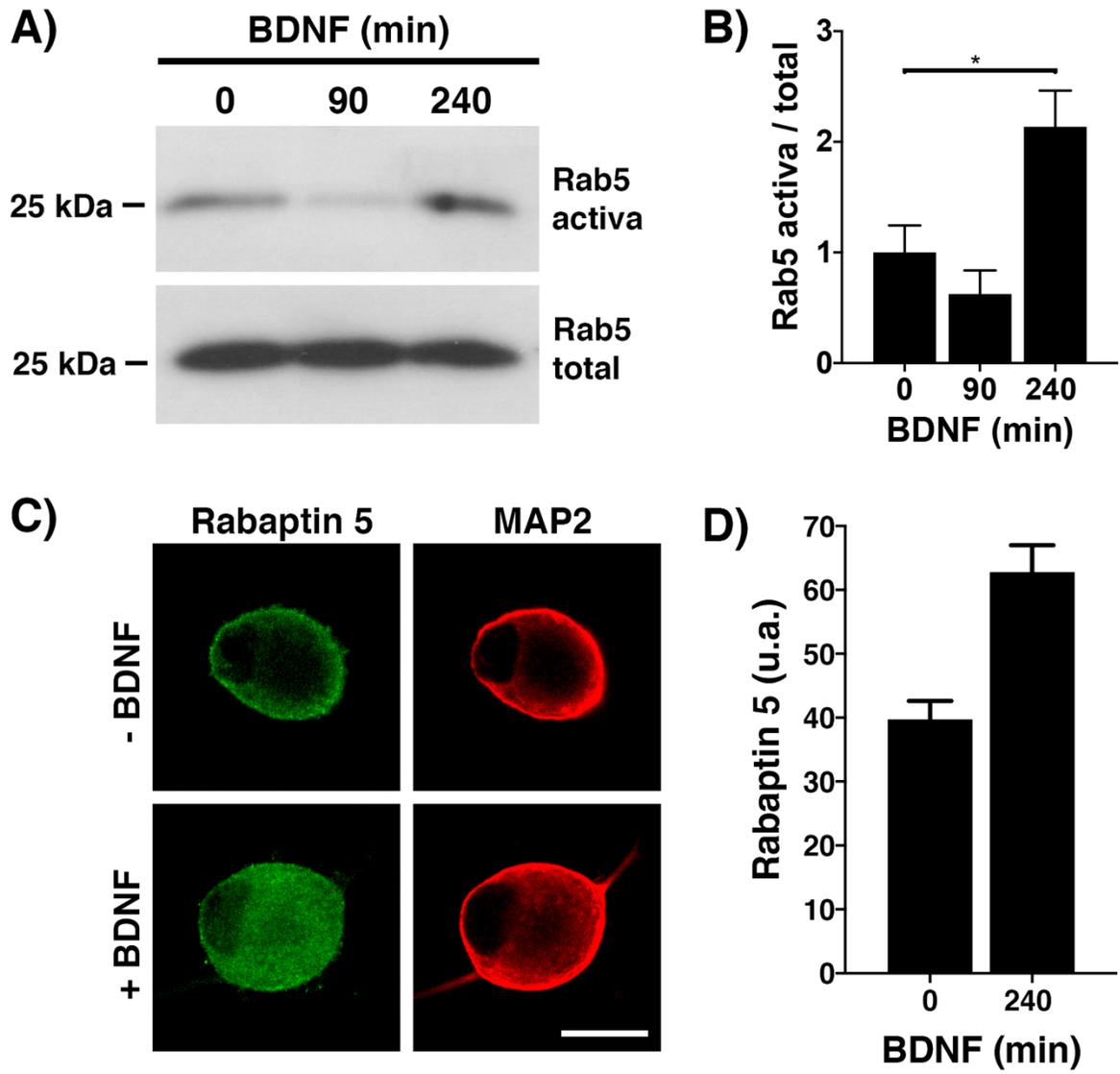
En esta etapa es importante saber si la activación del receptor p75 por BDNF, y su subsecuente internalización, juega un rol en la modulación de la actividad de Rab5, para posteriormente evaluar si esta actividad es requerida para la señalización apoptótica del receptor; ya que se conoce que p75 regula la actividad de otras GTPasas, como Rac (Harrington et al. 2002) , Ras (Blöchl et al. 2004) y RhoA (Yamashita et al. 1999). Para evaluar si p75 incrementa la actividad de Rab5 se realizaron ensayos de precipitación usando beads asociadas a una proteína de fusión que contiene el dominio de unión de Rabaptina-5 a Rab5-GTP (R5BD). Quisimos recuperar la fracción activa de Rab5 luego de la estimulación de las SCGs con BDNF, para posteriormente evaluar la marca de Rab5 por western blot. En la Figura 7A se observa que la estimulación de BDNF modula la actividad de Rab5. Si bien, luego de 90 min de estimulación con BDNF se ve una tendencia a una disminución de la actividad, a los 240 min de estimulación

con BDNF se observa un incremento significativo de la actividad de BDNF con respecto al basal (Figura 7B). Esto nos sugiere que la activación del receptor estaría participando en la modulación de la actividad de la GTPasa Rab5.

Para confirmar estos hallazgos, quisimos tener otra aproximación experimental para evaluar cómo se modifica temporal y/o espacialmente la actividad de Rab5 cuando las SCGs son estimuladas con BDNF. Para esto, utilizando cultivos masivos de SCGs, estimulamos con BDNF para luego fijar con PFA, y permeabilizar para hacer una primera incubación con la sonda GST-R5BD y posteriormente volver a fijar con PFA y realizar una inmunofluorescencia para detectar la marca de GST. En la Figura 7C se puede observar en imágenes de microscopia confocal que la marca para Rab5 activa (GST-R5BD) sin estimulación de ligando mantiene una distribución espacial mayoritariamente en la periferia de las SCGs, cercana a la membrana, y una marca positiva de manera homogénea en el centro de ésta. Sin embargo, cuando se analiza la distribución y el total de la marca de Rab5 activa en los tratamientos con BDNF, podemos notar que la distribución de ésta cambia y se convierte en una marca homogénea en lo amplio del área celular. Mientras que cuando se analizan los niveles totales de ésta marca y se normalizan por el área celular nos encontramos con una tendencia al aumento cuando SCGs son estimuladas con BDNF, en comparación al punto experimental sin BDNF (Figura 7D). Curiosamente, éstos resultados son similares cuando se evaluó la distribución de Rab5 total en SCGs una vez que eran estimuladas con BDNF, mostrando que Rab5 en condiciones tempranas de estimulación se encontraba en la periferia de las células, para luego distribuirse de manera homogénea por la célula luego de 60 min de estimulación con BDNF (Escudero et al., 2014).

Por lo tanto, éstos resultados muestran que BDNF una vez que activa al receptor p75 y éste comienza a internalizar, la actividad de Rab5 aumenta significativamente en comparación

al control sin BDNF, sugiriendo que p75 podría estar involucrado en la modulación de la actividad de esta GTPasa.



**FIGURA N°7. La actividad de Rab5 es modulada por la activación de p75 mediante BDNF.** (A) Western blot de los niveles de Rab5-GTP utilizando un ensayo de pull-down con la proteína de fusión R5BD, realizado con lisados totales provenientes de cultivos masivos de SCGs de 6 DIV que fueron privados de factores tróficos durante 60 min y posteriormente estimulados con BDNF (150 ng/ml) durante 0, 90 y 240 min, para posteriormente rescatar la porción activa de Rab5 a través de la proteína de fusión R5BD y evaluar sus niveles a través de un gel de SDS y revelar la marca para Rab5. (B) El gráfico representa la cuantificación de los niveles de Rab5-GTP normalizados por el total de Rab5, mostrados como las veces de aumento con respecto al basal. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\*  $p < 0.05$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA de una vía corregido con un post-test de Tukey, de 3 experimentos independientes. (C) Imágenes de microscopía confocal provenientes de cultivos masivos de SCGs de 6 DIV, que fueron privados de factores tróficos durante 60 min y posteriormente estimulados con BDNF (150 ng/ml) durante 0 y 240 min, para posteriormente realizar una incubación con la proteína de fusión R5BD-GST para marcar la porción activa de Rab5 y luego realizar una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GST para determinar la marca de Rabaptin-5 (verde) y Map2 (rojo). (D) El gráfico representa la cuantificación de los niveles de fluorescencia de Rabaptin-5. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM, provenientes de un total de 20 células correspondientes a 2 experimentos independientes.

#### 4.1.4. El receptor p75 interactúa preferentemente con la forma activa de Rab5

Una vez determinado que p75 interactúa con Rab5 a través de los ensayos de co-inmunoprecipitación descrito anteriormente (Figura 6), y dado que se sabe que p75 y Rab5 se asocian de manera transiente en SCGs en respuesta a BDNF (Escudero et al., 2014), surge la inquietud de saber si el receptor podría interactuar de manera preferencial con alguna de sus dos formas funcionales, unida a GDP o GTP. Esto sumado al hecho de que la actividad de Rab5 aumenta es presencia de BDNF (Figura 7).

Para llevar a cabo este objetivo, sobreexpresamos las distintas versiones de mutantes de Rab5 fusionado a GFP, Rab5WT, Rab5CA y Rab5DN en células HEK293 para determinar a través de una co-inmunoprecipitación si p75 se asociaba de manera diferencial con algunas de estas versiones, a través de muestras que fueron analizadas por western blot, en un modelo celular en donde nos permitiera obtener grandes cantidades de proteínas para evaluar la co-inmunoprecipitación. Como se muestra en la Figura 8A y 8B el receptor p75 precipita de manera preferencial con la versión constitutivamente activa de Rab5, cuando se revela para la marca de GFP. Si bien no podemos determinar hasta ahora si esta asociación es directa o indirecta, podemos notar que en efecto el receptor se encuentra junto a Rab5 cuando esta se encuentra unida a GTP, lo que sugiere que la actividad de esta GTPasa es requerida para el tráfico post-endocítico del receptor y su posterior destinación a endosomas Rab11<sup>+</sup> o MVBs (Escudero et al., 2014).



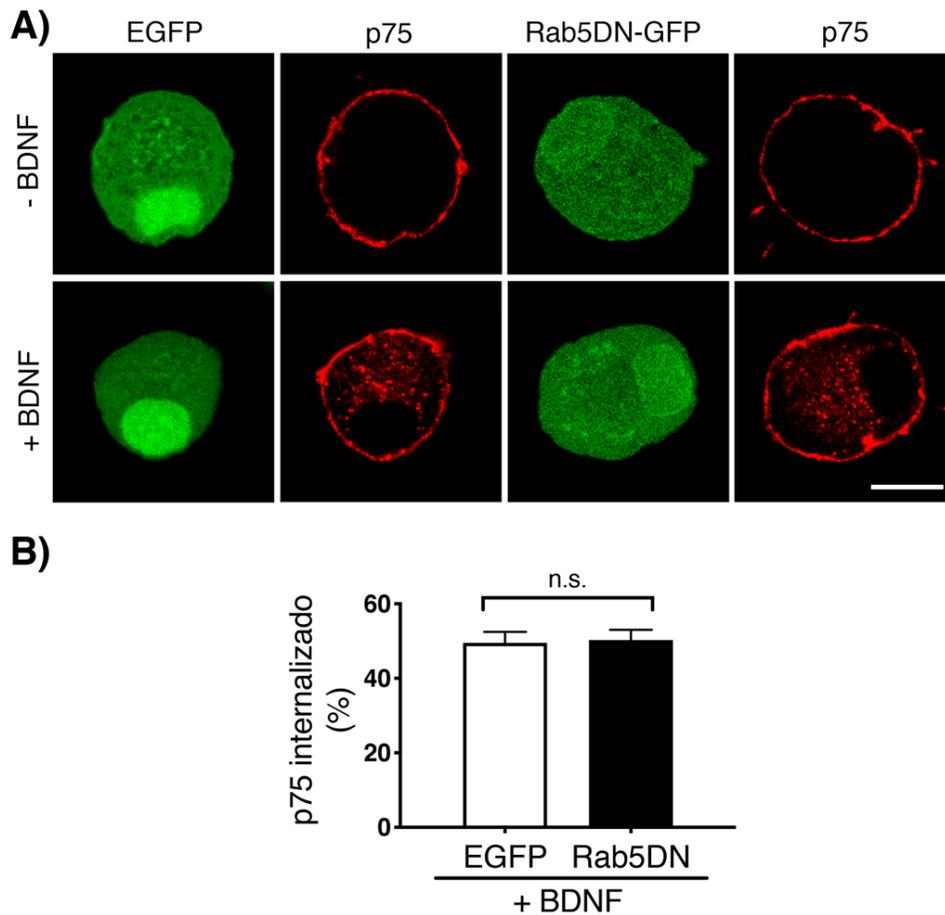
**FIGURA N°8. El receptor p75 se asocia preferentemente con la forma activa de Rab5.** (A) Co-inmunoprecipitación de p75 y Rab5, realizada con lisados totales provenientes de cultivos de células HEK293. Las células fueron transfectadas, sobre-expresando durante 24 h las versiones Rab5-WT, Rab5-CA y Rab5-DN, para posteriormente lisar las células y llevar a cabo la precipitación de p75 por medio del anticuerpo MC192 asociado a *beads* magnéticas, y así evaluar los niveles proteicos de Rab5 y p75 por western blot. (B) El gráfico representa la cuantificación de los niveles de Rab5 normalizados por el total de p75 de la co-inmunoprecipitación, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental que sobre-expresa Rab5-WT. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM, provenientes de 2 experimentos independientes. (C) Western blot de los controles de la co-inmunoprecipitación mostrados como la marca de Rab5 y p75 de los niveles totales de proteínas al iniciar la precipitación (*input*) y al finalizar el experimento (*output*).

## **4.2. La actividad de Rab5 es requerida para la señalización apoptótica del receptor p75**

### **4.2.1. La internalización del receptor p75 no requiere de la actividad de Rab5**

Nuestros resultados (Figura 6 y 7) nos indican que p75 y Rab5 tienen una relación funcional. Por esta razón, quisimos estudiar el efecto fisiológico de esta interacción usando como herramienta la expresión de una mutante dominante negativo de Rab5 (Rab5DN-GFP). Primero estudiamos si Rab5 reduce la internalización de p75, dado que datos anteriores de nuestro laboratorio (Figura Suplementaria 1), nos indicaron que la inhibición de la internalización de p75 reduce la señalización río abajo del receptor. Más específicamente, mostramos que la sobreexpresión de un p75 que tiene mutado los sitios de consenso en la cola citosólica del receptor para la internalización mediada por clatrina bloquea la translocación nuclear de NRIF (Figura suplementaria 1), cuyo proceso es requerido para desencadenar apoptosis en SCGs (Kenchappa et al. 2006).

La internalización de p75 en SCGs que expresaban GFP o Rab5DN-GFP fue evaluada mediante ensayos de inmunoendocitosis del receptor marcando el receptor p75 en su región extracelular con el anticuerpo MC192. En la figura 9A podemos observar que la internalización de p75 no se ve alterada en presencia de la sobreexpresión de Rab5DN comparada con las neuronas que expresan GFP. Por lo tanto, podemos concluir que la actividad de Rab5 no es requerida para que el receptor p75 internalice en respuesta a BDNF.



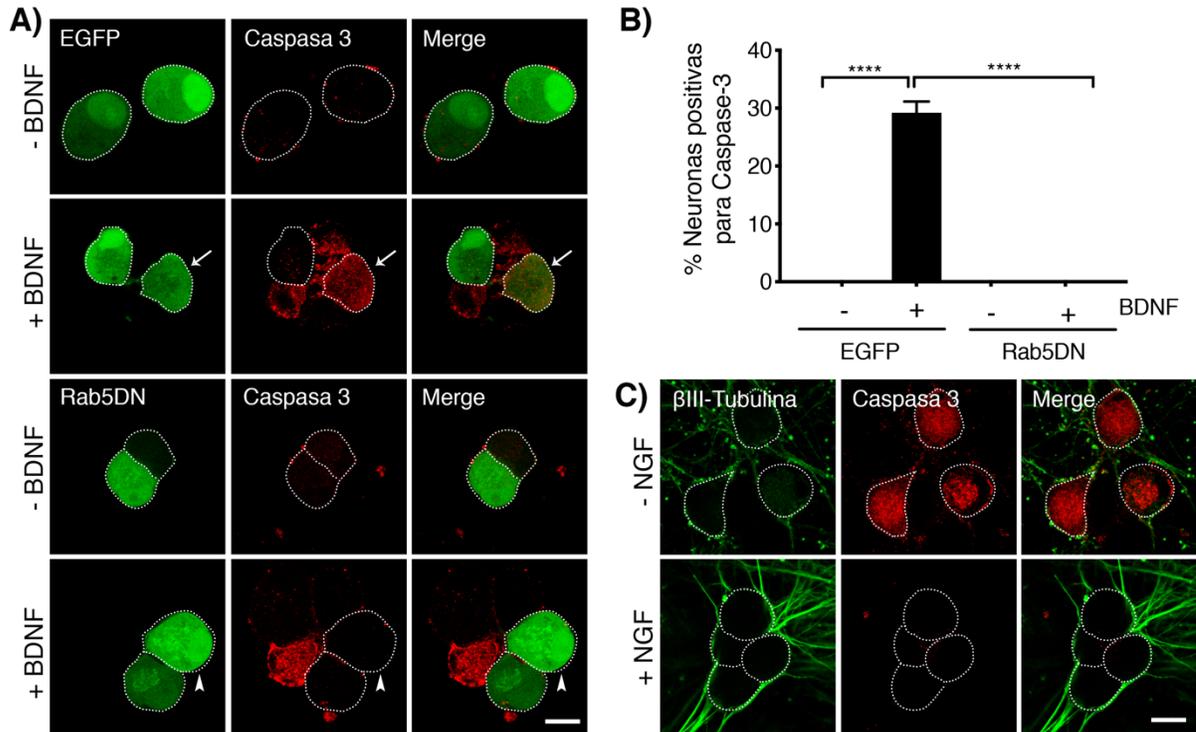
**FIGURA N°9. La actividad de Rab5 no es requerida para la internalización de p75. (A)** Inmunofluorescencia de la internalización de p75 realizada en cultivos masivos de SCGs de 6 DIV, que fueron transducidos con adenovirus que conducen a la sobre-expresión de Rab5DN-GFP y GFP. Luego de 24 h post-transducción, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente inducir la inmunoendocitosis de p75 con el anticuerpo MC192, estimulando con BDNF (150 ng/ml) durante 0 y 90 min. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca de p75 (rojo) y GFP (verde) por microscopía confocal. Barra de escala 20  $\mu$ m. **(B)** El gráfico representa la cuantificación del porcentaje de internalización de p75 a los 90 min de estimulación con BDNF de ambas condiciones experimentales. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. La significancia estadística fue analizada por un Student t-Test ( $P=0.8609$ ), de un total de 30 células provenientes de 3 experimentos independientes.

#### **4.2.2. La actividad de Rab5 es necesaria para el clivaje de la caspasa-3 río abajo de la activación de p75 por BDNF en SCGs.**

La muerte celular inducida por la activación de p75 involucra distintos adaptadores moleculares que participan en la cascada río abajo en la señalización apoptótica. Si bien p75 es miembro de la familia del receptor de necrosis tumoral (TNF), los cuales inducen muerte a través de la activación de la vía extrínseca de apoptosis utilizando la activación de la caspasa 8 (Gaur & Aggarwal, 2003), el receptor p75 difiere con los otros miembros de esta familia, al utilizar la vía intrínseca para inducir muerte celular. En neuronas hipocámpales se ha estudiado que son la caspasa 6 y 3 las que ejecutan el proceso apoptótico a través de p75 (Troy et al., 2002). En neuronas sensoriales se ha visto que la ausencia del receptor p75, atenúa la activación de la caspasa-3 y la posterior muerte neuronal (Agerman et al., 2000). Por otro lado, en cultivos de oligodendrocitos se ha descrito que la muerte inducida por p75 involucra la activación de la caspasa-3 (Gu et al., 1999).

Por las razones señaladas, analizamos el clivaje de la caspasa-3 como marcador río abajo de la activación de la señalización apoptótica inducida por p75. En las imágenes ilustradas en la Figura 10, se puede observar que el estímulo con BDNF y KCL durante 24 h en SCGs que expresan GFP induce el clivaje de la caspasa 3 en el 30% del total del cultivo (Figura 10A y 10B). Este proceso fue inhibido en los cultivos de SCGs que expresaban Rab5DN-GFP (Figura 10A inferior y 10B). Como control positivo, comparamos estos resultados con cultivos en paralelos donde se indujo la muerte de neuronas por privación de factores tróficos (ausencia de NGF) (Figura 10C), donde se puede observar claramente la activación/clivaje de la caspasa3 y la marca fragmentada de la tubulina en los axones, probablemente como señal de degeneración

o muerte de las neuronas. Estos resultados nos sugieren que la muerte celular programada y clivaje de la caspasa 3 inducida por BDNF/p75 requiere de la actividad de Rab5.



**FIGURA N°10. La actividad de Rab5 es necesaria para el clivaje de la caspasa-3. (A)** Inmunofluorescencia del clivaje de la caspasa-3 en cultivos masivos de SCGs de 6 DIV, que fueron transducidos con adenovirus que conducen a la sobre-expresión de Rab5DN-GFP y GFP. Luego de 24 h post-transducción, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas con BDNF (150 ng/ml) en presencia de KCL (12,5 mM) durante 24 h. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca del clivaje de la caspasa-3 (rojo) y GFP (verde) por microscopía confocal. Las flechas indican células positivas para la marca de GFP y el clivaje de la caspasa 3. Las puntas de flechas indican células positivas para la marca de Rab5-DN y que son negativas para la marca del clivaje de la caspasa 3. Escala de barra 20  $\mu$ m. **(B)** El gráfico representa la cuantificación del porcentaje de células positivas para la marca del clivaje de la caspasa-3 y positivas para GFP y Rab5DN- GFP. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA de dos vías corregido por un post-test de Tukey, de un total de 100 células provenientes de 3 experimentos independientes. **(C)** Inmunofluorescencia del clivaje de la caspasa-3 en cultivos masivos de SCGs de 6 DIV. Cultivos masivos que fueron crecidos en paralelo a los de **(A)** y que fueron crecidos en presencia de NGF (50 ng/ml) (panel superior) o en ausencia de NGF (panel inferior) durante 24 h. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca del clivaje de la caspasa-3 (rojo) y  $\beta$ III-Tubulina (verde) por microscopía confocal. Escala de barra 20  $\mu$ m.

#### **4.2.3. La translocación nuclear de NRIF requiere de la actividad de Rab5 en SCGs estimuladas con BDNF.**

La proteína NRIF por “*neurotrophin receptor interacting factor*” fue descubierta porque interactuaba con el dominio intracelular de p75 (Casademunt et al., 1999). Posteriormente se demostró que era una proteína con dedos de zinc de unión al ADN y que su presencia es requerida para desencadenar apoptosis a través de BDNF/p75 en SCGs (Linggi et al., 2005). De hecho, se encontró que en SCGs derivadas de ratones nulos para *nrif*, la inducción de apoptosis por BDNF/p75 está significativamente reducida en comparación a SCGs derivadas de ratones silvestres. Además, se determinó que NRIF es necesario para la muerte neuronal inducida por p75/BDNF, y no así cuando se induce muerte por eliminación de factores tróficos necesarios para la supervivencia neuronal (Linggi et al., 2005).

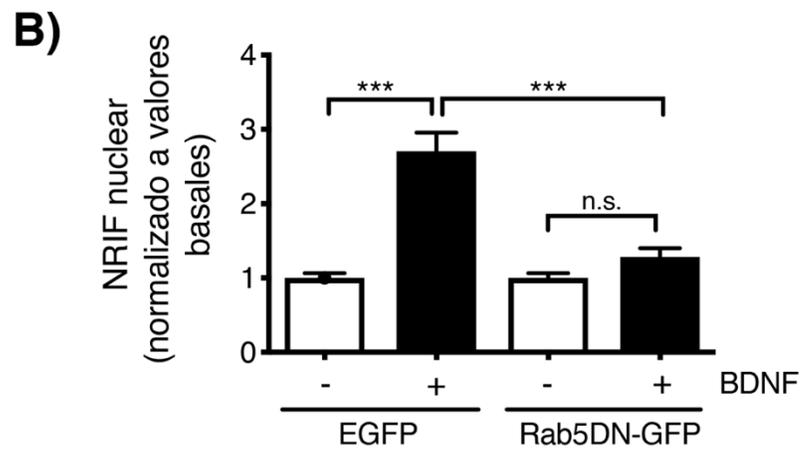
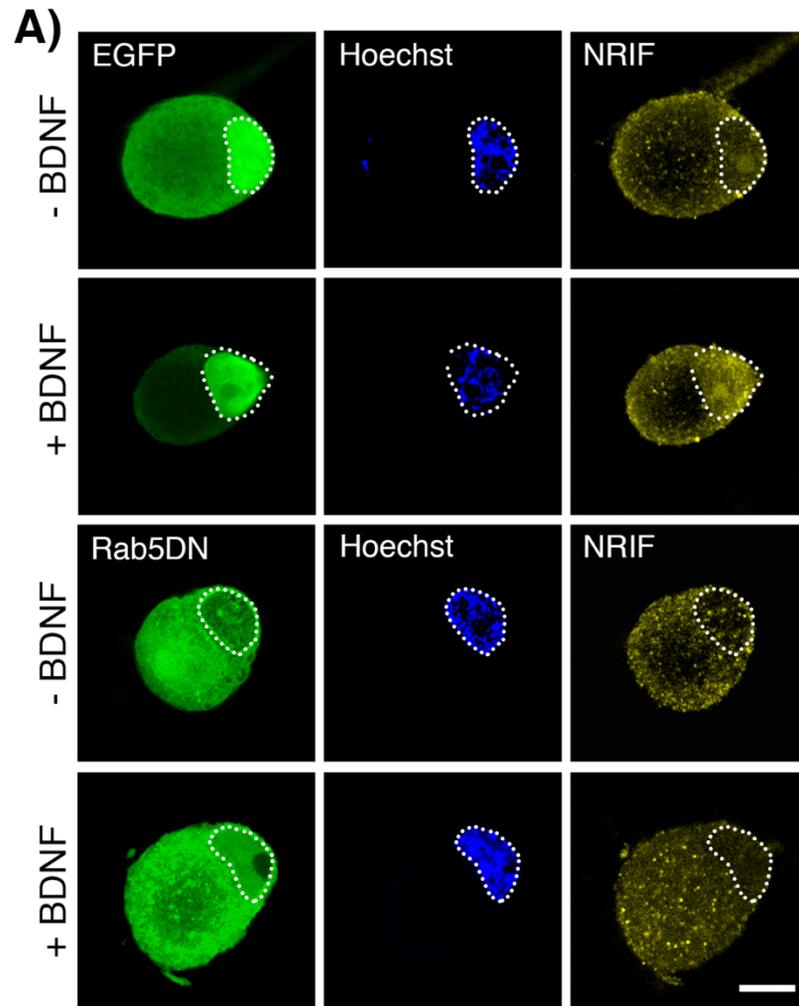
El rol clave de NRIF en la señalización apoptótica de p75 se debe a que esta proteína transloca al núcleo regulando genes pro-apoptóticos, y se ha visto que dicha translocación depende de dos eventos, en primer lugar requiere la ubiquitinación de TRAF6 (Geetha et al., 2005), y del procesamiento proteolítico de p75, que es requerido para que TRAF6 active su función de ubiquitin-ligasa (Kenchappa et al., 2006).

Teniendo en cuenta la importancia de este adaptador, es que evaluamos la translocación nuclear de NRIF en neuronas que expresan GFP o Rab5DN-GFP, a través de la marca nuclear por inmunofluorescencia para NRIF como ha sido descrito anteriormente (Kenchappa et al., 2006). Como muestran las imágenes de microscopía confocal en la Figura 11, se puede observar la translocación nuclear de NRIF en cultivos de SCGs que expresan GFP estimulados con BDNF en presencia de KCL. De forma contraria, cuando evaluamos la marca nuclear de NRIF en SCGs

que sobreexpresan Rab5DN-GFP y estimuladas con BDNF, notamos que esta marca se encuentra reducida en comparación a las células que están sobre-expresando GFP, presentando niveles nucleares de NRIF similares al control sin estimular con BDNF (Figura 11A y B).

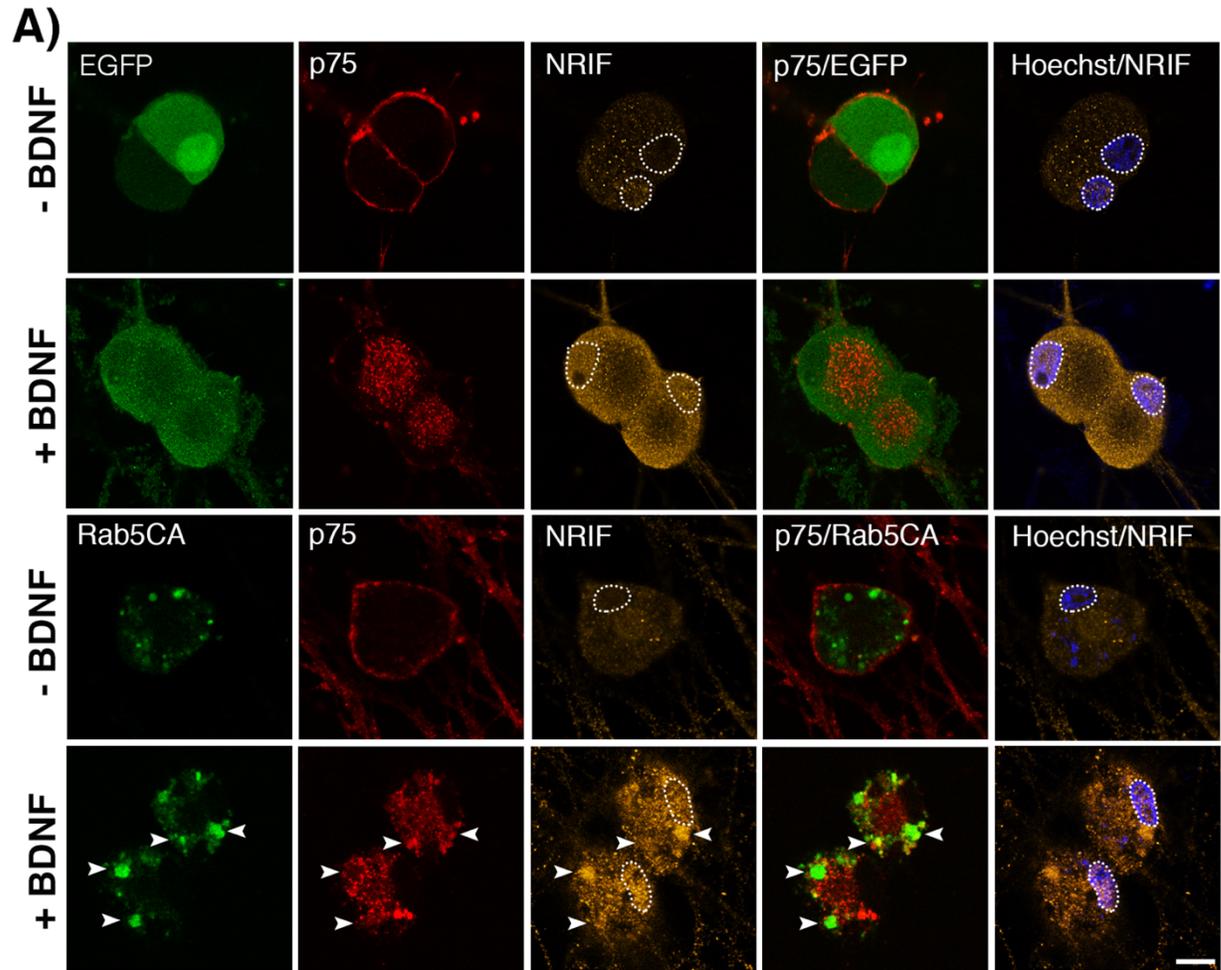
Para complementar estos experimentos se estudió la distribución de NRIF en neuronas que sobreexpresan el mutante constitutivamente activo de Rab5 (Rab5CA-GFP) y se comparó con la distribución de NRIF en condiciones control (neuronas que expresan GFP). Las imágenes de la figura 12A muestran que la marca positiva para NRIF tanto nuclear como en el área celular es mayor en SCGs que sobre-expresan Rab5CA-GFP a diferencia de las células que sólo están expresando GFP. Cuando se cuantificaron los niveles nucleares de NRIF (Figura 12B) se pudo observar que la fluorescencia asociada a la marca de NRIF es mayor en las células que sobre-expresan este mutante. Adicionalmente, podemos notar que en aquellos endosomas gigantes positivos para Rab5, producto de la sobre-expresión de Rab5 (Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 2014), encontramos la marca de p75 atrapado en estos endosomas, además de estar decorados de manera intensa con la marca positiva para NRIF, lo que nos sugiere que este endosoma puede ser un lugar de interacción para estas tres proteínas, y que esta interacción depende de la actividad de Rab5.

Estos resultados indican que la actividad de Rab5 es requerida para la translocación de NRIF al núcleo, y sugieren que el destino de p75 a endosomas tempranos y su interacción con Rab5 es un requisito para la translocación nuclear de NRIF.

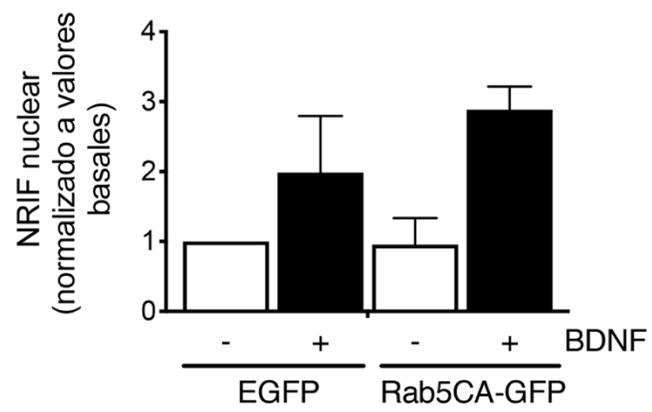


**FIGURA N°11. La actividad de Rab5 es necesaria para la translocación nuclear de NRIF.**

**(A)** Inmunofluorescencia de la translocación nuclear de NRIF realizada en cultivos masivos de SCGs de 6 DIV, que fueron transducidos con adenovirus que conducen a la sobre-expresión de Rab5DN-GFP y GFP. Luego de 24 h post-transducción, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas con BDNF (150 ng/ml) en presencia de KCL (12,5 mM) durante 24 h. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca NRIF (amarillo), GFP (verde) y la tinción nuclear Hoechst (azul) por microscopía espectral. Escala de barra 20  $\mu$ m. **(B)** El gráfico representa la cuantificación del total de NRIF en el área nuclear delineado por la marca nuclear de Hoechst de células positivas para GFP y Rab5DN-GFP, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al punto experimental de estimulación con BDNF en SCGs que están sobre-expresando GFP (\*\*\*)  $p < 0.0002$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA de dos vías corregido por un post-test de Tukey, provenientes del análisis de 36 o 46 neuronas por cada punto experimental, de 3 experimentos independientes.



**B)**

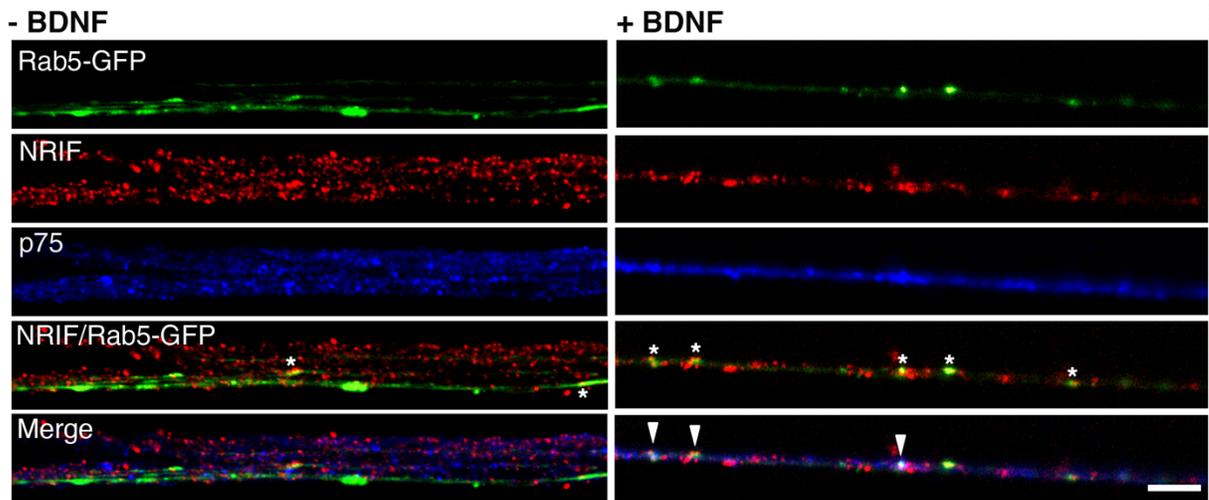


**FIGURA N°12. La sobre-expresión de Rab5CA aumenta la translocación nuclear de NRIF y mantiene a p75 y NRIF acumulados en endosomas gigantes Rab5 positivos. (A)** Inmunofluorescencia para NRIF que muestra la distribución celular de esta proteína luego de inducir o no la internalización de p75 con BDNF. La inmunoendocitosis de p75 realizada en cultivos masivos de SCGs de 6 DIV, que fueron transfectados con plasmidios que conducen a la sobre-expresión de GFP y Rab5CA-GFP. Luego de 24 h post-transfección, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas con BDNF (150 ng/ml) en presencia de KCL (12,5 mM) durante 30 h. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca NRIF (amarillo), GFP (verde), p75 (rojo) y la tinción nuclear Hoechst (azul) por microscopía espectral. Las cabezas de flecha blancas destacan endosomas gigantes positivos para las marcas de Rab5, NRIF y p75. Escala de barra 20  $\mu$ m. **(B)** El gráfico representa la cuantificación del total de NRIF en el área nuclear delineado por la marca nuclear de Hoechst de células positivas para GFP y Rab5CA-GFP, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM, de 30 células de 2 experimentos independientes .

#### **4.2.4 BDNF induce colocalización moderada de p75, NRIF y endosomas Rab5<sup>+</sup> y Rab11<sup>+</sup> en SCGs.**

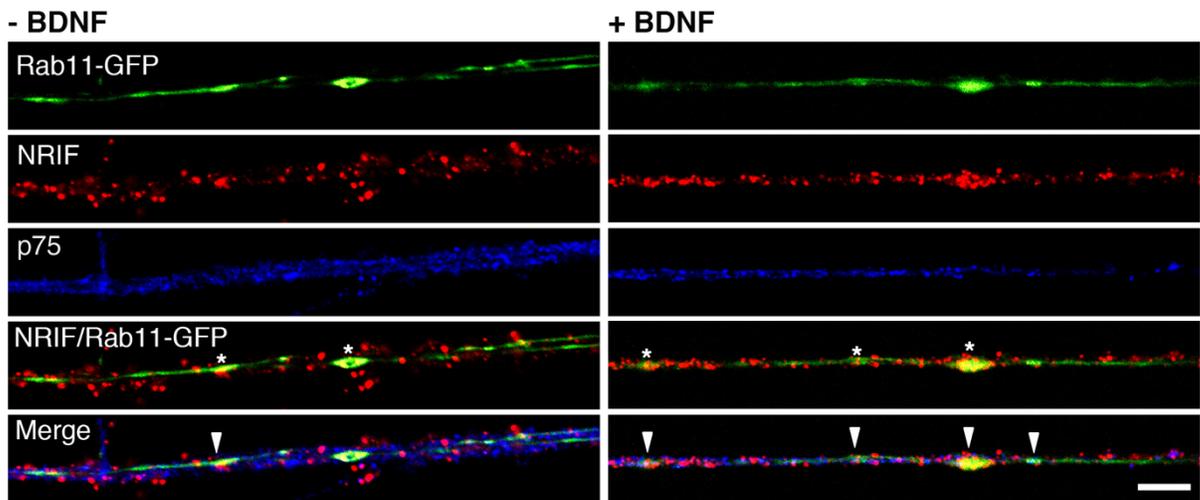
Dado que los resultados anteriores nos sugieren que NRIF colocaliza con endosomas positivos para la Rab5CA-GFP y que la actividad de Rab5 es requerida para la translocación nuclear de NRIF, nos planteamos el objetivo de estudiar si NRIF colocaliza con distintas estructuras endosomales luego de la adición de BDNF en SCGs. Es importante mencionar que estudios anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que el paso de p75 por endosomas Rab5<sup>+</sup> es de modo transiente y que el receptor no se acumula en estos endosomas, sino que en endosomas Rab11<sup>+</sup> y MVBs CD63<sup>+</sup> (Escudero et al., 2014). Usando cultivos compartimentalizados de SCGs estudiamos la co-localización de NRIF y p75 con Rab5 y Rab11 silvestre, sobreexpresando estas GTPasas mediante infección adenoviral (Figuras 13 y 14). Estudiamos la colocalización de estas proteínas especialmente en axones, debido a que se ha sugerido que la señal apoptótica a cargo de p75 proviene desde los axones distales que están cercanos a la inervación del órgano blanco (Yano et al. 1999; Escudero & Cabeza, 2019). Las imágenes de microscopía indicaron que en respuesta a ligando p75 y NRIF colocalizan parcialmente con endosomas positivos Rab5<sup>+</sup> (puntas de flechas blancas de la Figura 13, panel izquierdo). Sin embargo, llama la atención que es mucho más frecuente encontrar marca positiva para NRIF junto a endosomas Rab5<sup>+</sup> (asteriscos blancos de la Figura 13, panel derecho e izquierdo), que NRIF junto a p75. Cuando evaluamos la colocalización con endosomas Rab11 positivos, dado que sabemos que p75 se acumula en esta población endosomal durante su tráfico endocítico (Escudero et al, 2014) podemos notar que la superposición de las marcas positivas para p75, NRIF y Rab11 (puntas de flechas blancas) es mayor en respuesta a BDNF (Figura 14).

Igualmente, cuando evaluamos la coincidencia de las marcas para NRIF y Rab11 (asteriscos blancos) notamos que NRIF pareciera ser cargo de endosomas Rab11<sup>+</sup>. Tomando en cuenta estos resultados, sumado a que p75 se acumula en endosomas Rab11<sup>+</sup>, podríamos sugerir que este endosoma puede ser importante para la incorporación de moléculas adaptadoras de su señal apoptótica, como NRIF; y que probablemente un endosoma Rab5<sup>+</sup> es un lugar importante en su tráfico, pero no sea necesariamente el único lugar que sirva de plataforma para que p75 se asocie a sus adaptadores de señalización.



**FIGURA N°13. NRIF y p75 son cargo de endosomas Rab5 positivos en respuesta a BDNF.**

Immunoendocytosis de p75 realizado en axones de cultivos compartimentalizados de SCGs de 6 DIV que fueron transducidos con adenovirus que conducen a la sobre-expresión de GFP y Rab5WT-GFP. Luego de 24 h post-transducción, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente inducir la immunoendocytosis de p75 con el anticuerpo MC192, estimulando desde los axones con BDNF (150 ng/ml) durante 90 min (paneles derechos), o sin BDNF (paneles izquierdos) en presencia de anti-BDNF. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca NRIF (rojo) y p75 (azul). Las puntas de flechas blancas indican puntos de colocalización de fluorescencia de las 3 marcas, Rab5GFP, NRIF y p75. Los asteriscos blancos indican puntos de colocalización para las marcas de NRIF y Rab5GFP. Escala de barra 5  $\mu$ m.



**FIGURA N°14. NRIF y p75 son cargo de endosomas Rab11 positivos en respuesta a BDNF.**

Immunoendocitosis de p75 realizado en axones de cultivos compartimentalizados de SCGs de 6 DIV que fueron transducidos con adenovirus que conducen a la sobre-expresión de GFP y Rab11WT-GFP. Luego de 24 h post-transducción, las células fueron privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente inducir la immunoendocitosis de p75 con el anticuerpo MC192, estimulando desde los axones con BDNF (150 ng/ml) durante 90 min (paneles derechos), o sin BDNF (paneles izquierdos) en presencia de anti-BDNF. Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca NRIF (rojo) y p75 (azul). Las puntas de flechas blancas indican puntos de colocalización de fluorescencia de las 3 marcas, Rab11GFP, NRIF y p75. Los asteriscos blancos indican puntos de colocalización para las marcas de NRIF y Rab11GFP. Escala de barra 5  $\mu$ m.

### **4.3. Importancia de la activación de JNK en la señalización apoptótica retrógrada inducida por BDNF mediante p75.**

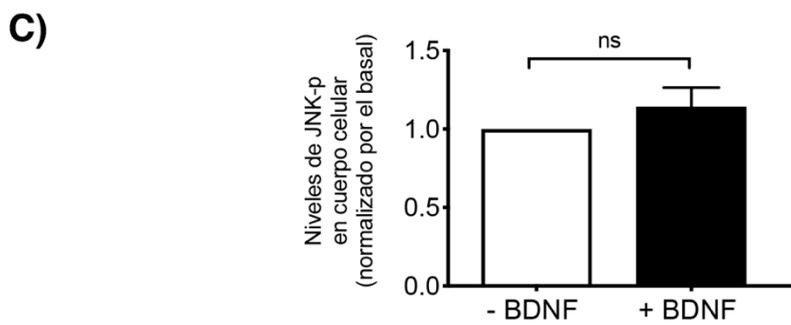
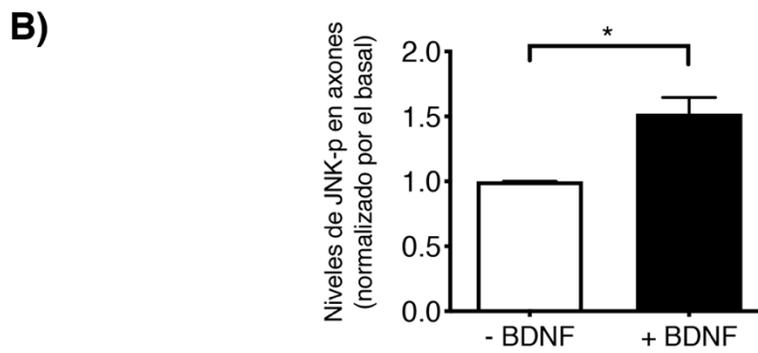
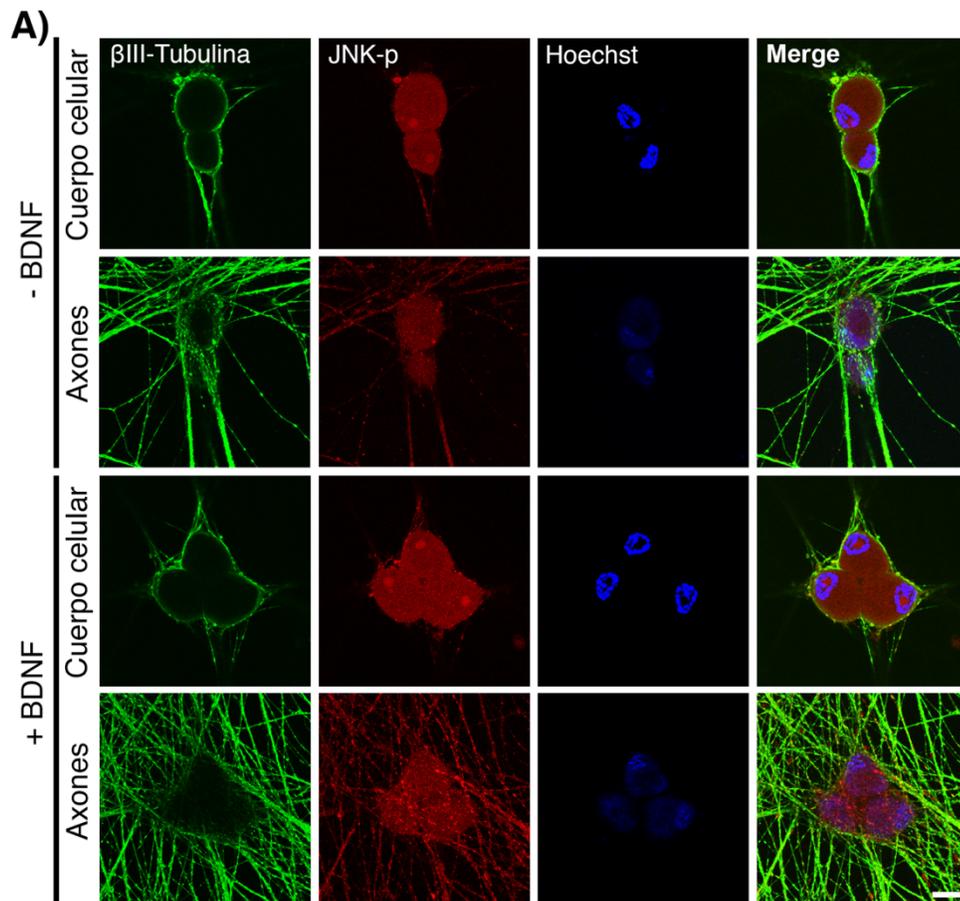
#### **4.3.1 BDNF induce activación de JNK principalmente desde los axones distales de SCGs.**

La activación de JNK ha sido descrita como parte vital en la señalización apoptótica inducida por p75 (Harrington et al, 2002; Salehi et al, 2002; Bertrand et al, 2008; Kenchappa et al, 2010). En el marco de evaluar la importancia de JNK y su participación en la señalización apoptótica retrógrada de p75 por BDNF en SCGs, nos preguntamos si la activación de esta quinasa se realiza de manera diferencial en alguno de los compartimientos celulares en particular, ya sea en el cuerpo celular o en los axones de las neuronas. Los resultados mostraron que en cultivos no compartimentalizados la activación de JNK se observa mayormente en los axones comparado con los cuerpos celulares donde la activación es periférica y el tratamiento con BDNF no incrementa la activación asociada al soma (Figura 15A y C). Sin embargo, cuando se cuantifica la activación asociada a los axones, se observó que BDNF incrementa significativamente la marca axonal de JNK fosforilada (Figura 15A y B). Estos datos muestran que la activación de JNK por BDNF/p75 ocurre principalmente a nivel axonal.

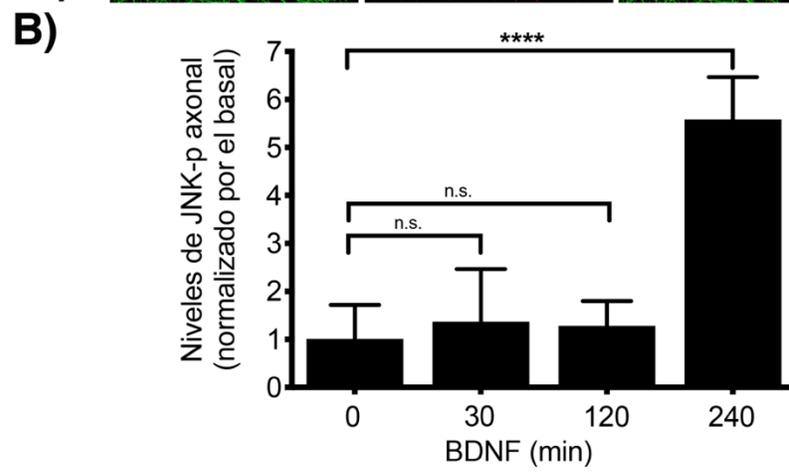
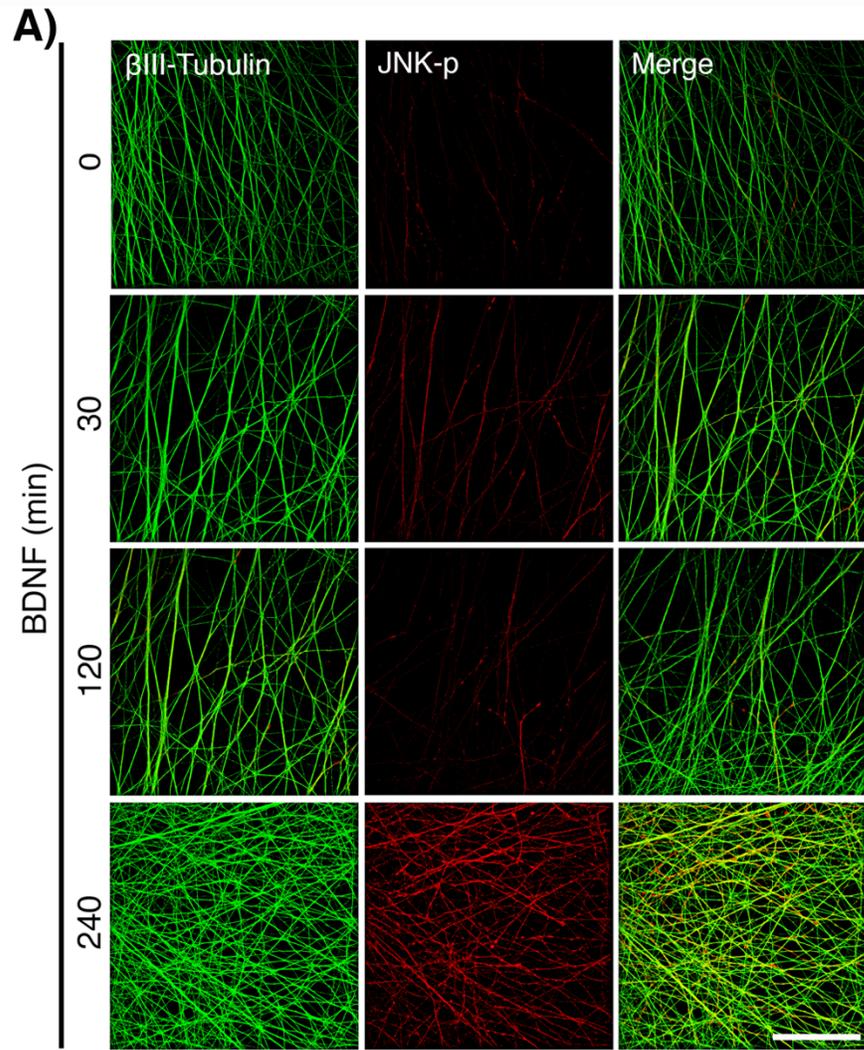
Datos del laboratorio mostraron que JNK es requerida para la internalización de p75 en el soma y posterior transporte retrógrado, a su vez mostraron que la señalización apoptótica inducida por BDNF/p75 desde el axón requiere de la actividad de Rab5. Esto nos sugirió que la la activación de JNK es exclusivamente desde los axones distales de cultivos de SCGs, dando mayor robustez a la idea de que la señal apoptótica mediante p75 al unir BDNF sería una señal de muerte retrógrada (Pathak et al., 2020). Para esto, utilizando cultivos compartimentalizados

de SCGs, se estimularon con BDNF a distintos tiempos para evaluar la cinética de activación de esta quinasa a través del marcaje de JNK fosforilado por inmunofluorescencia. Como muestra la Figura 16A y B, a tiempos tempranos no se observa un aumento de la fosforilación de JNK diferente a la situación basal. Sin embargo, vemos que la activación comienza a ser evidente y significativamente mayor respecto al basal a los 240 min de activación por BDNF, cuyos valores cuantificados muestran una diferencia significativa con respecto al basal (Figura 16B). Esto parece tener una dinámica similar a la encontrada por el grupo de Carter y colaboradores, en donde describen una cinética de activación bifásica para JNK en cultivos masivos de SCGs, encontrándose una activación temprana a los 30 min y luego un segundo *peak* de activación tardía sostenida en el tiempo (Kenchappa et al., 2010).

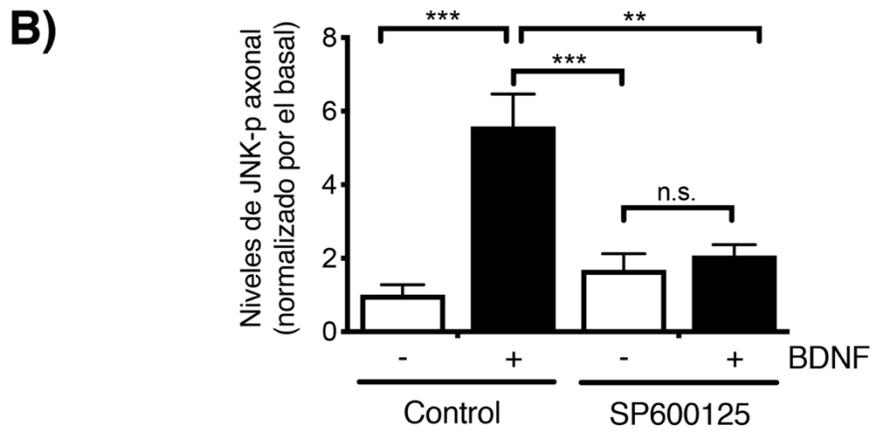
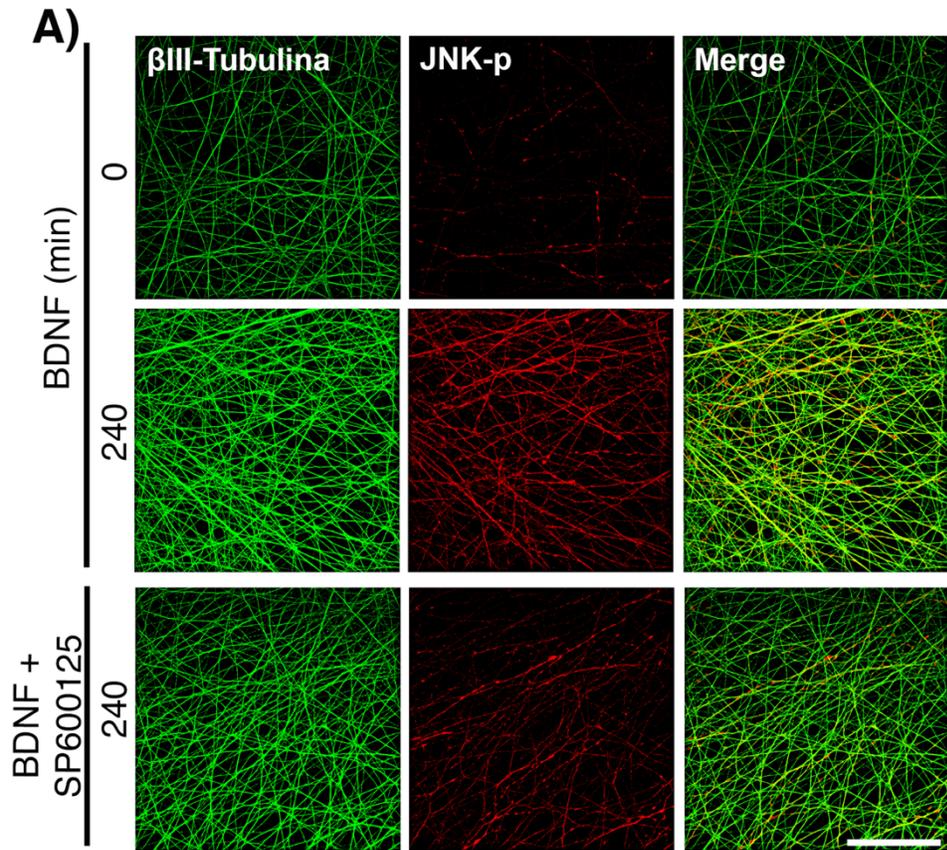
Una vez determinado que a los 240 min la fosforilación de JNK muestra una marca positiva, quisimos verificar la especificidad de la marca utilizando un inhibidor selectivo de la actividad de JNK, el SP600125. Para esto, utilizando cultivos compartimentalizados repetimos el protocolo de estimular desde los axones con BDNF, esta vez en presencia de SP600125 o del vehículo (DMSO) durante 240 min. La Figura 17A nos muestra imágenes de microscopía confocal, en donde efectivamente la marca de JNK fosforilado es significativamente mayor en los cultivos tratados con BDNF en comparación al control sin BDNF; y que en presencia de SP600125 la marca para JNK fosforilada disminuye (Figura 17B) validando la activación de JNK desde los axones de SCGs.



**FIGURA N°15. La activación de JNK por BDNF ocurre mayoritariamente en los axones más que en el cuerpo celular de cultivos masivos de SCGs.** (A) Inmunofluorescencia de la activación de JNK por BDNF en cultivos masivos de SGCs de 7 DIV. Las células son privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 240 min, en presencia de KCL (12,5 mM) y el anticuerpo bloqueante de NGF TrkA-Fc (1:1000). Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar fosfo-JNK (rojo),  $\beta$ III-Tubulina (verde) y la tinción nuclear Hoechst (azul) por microscopía confocal. Las imágenes corresponden a microscopía confocal de *stacks* en z de la zona del cuerpo celular y de los axones para todos los puntos experimentales. Barra de escala 20  $\mu$ m. (B) El gráfico muestra la cuantificación de la marca total para fosfo-JNK delimitado en el área axonal (izquierda) por la marca de  $\beta$ III-Tubulina. (C) El gráfico muestra la cuantificación de la marca total para fosfo-JNK en un corte óptico a través de los cuerpos celulares delimitado por la marca de  $\beta$ III-Tubulina, de los distintos tiempos de tratamiento con BDNF, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\* $p$ <0.05). La significancia estadística fue analizada por Student t-Test, a partir de 20 imágenes para los axones y 50 células para los cuerpos celulares por punto experimental de 3 experimentos independientes.



**FIGURA N°16. Cinética de la activación de JNK por BDNF en axones. (A)** Inmunofluorescencia del curso temporal de la activación de JNK por BDNF en axones distales de cultivos compartimentalizados de SCGs de 7 DIV. Las células son privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas en los axones con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 0, 30, 120 y 240 min, en presencia de KCL (12,5 mM). Los cuerpos celulares fueron mantenidos sin BDNF y en presencia de KCl (12,5 mM) y TrkB-Fc (150 ng/ml). Finalmente, las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar fosfo-JNK (rojo) y  $\beta$ III-Tubulina (verde) por microscopía confocal. Barra de escala 50  $\mu$ m. **(B)** El gráfico muestra la cuantificación de la inmunotinción para fosfo-JNK delimitado en el área axonal por la marca de  $\beta$ III-Tubulina a los distintos tiempos de tratamiento con BDNF, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\*\*\*) $p < 0,0001$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA seguido de un post-test de Tukey, a partir de 6-7 cámaras por punto experimental de 3 experimentos independientes.



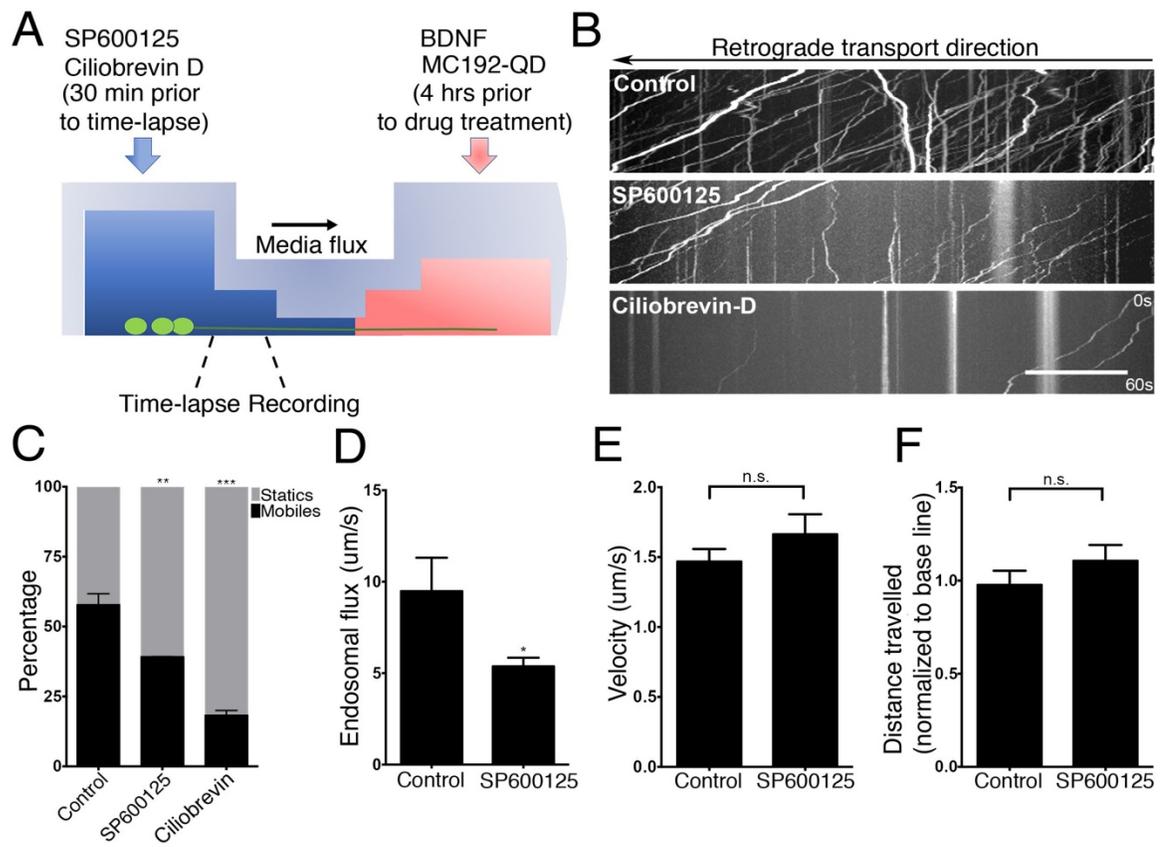
**FIGURA N°17. La activación de JNK por BDNF en axones distales de cultivos compartimentalizados de SCGs es bloqueada por el inhibidor farmacológico SP600125.**

**(A)** Inmunofluorescencia de la activación de JNK por BDNF en axones distales de cultivos compartimentalizados de SGCs de 7 DIV. Las células son privadas de factores tróficos y suero durante 60 min para posteriormente ser estimuladas desde los axones con o sin BDNF (150 ng/ml) durante 240 min, en presencia de KCL (12,5 mM) con o sin el inhibidor SP600125. Los cuerpos celulares fueron mantenidos sin BDNF y en presencia de KCl (12,5 mM) y TrkB-Fc (150 ng/ml). Finalmente, las células fueron fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar fosfo-JNK (rojo) y  $\beta$ III-Tubulina (verde) por microscopía confocal. Barra de escala 50  $\mu$ m. **(B)** El gráfico muestra la cuantificación de la marca total para fosfo-JNK delimitado en el área axonal por la marca de  $\beta$ III-Tubulina a los distintos tiempos de tratamiento con BDNF, mostrados como las veces de aumento con respecto al punto experimental sin BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al basal (\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ );). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni, a partir de 5-7 cámaras por punto experimental de 3 experimentos independientes.

#### 4.3.2. JNK participa en el transporte retrógrado de p75 inducido por BDNF

Hasta hace poco se había descrito a JNK como una quinasa que formaba parte de la vía de transducción de señales de p75 con un rol en la señalización apoptótica. Una vez activa, JNK fosforila un número de sustratos involucrados en muerte celular como miembros de la familia Bcl-2 (Costa et al, 2010). Datos del laboratorio recientemente publicados (Escudero & Cabeza, 2019), indicaron que la inhibición de JNK en SCGs reduce la internalización del receptor en cuerpos celulares y axones. Estos datos, junto con los resultados mostrados en las figuras 15-17 nos indicaron que JNK juega un rol en la señal apoptótica mediada por p75 preferentemente desde los axones. Sin embargo, no había sido estudiado si la activación de JNK desde el axón regula solo la internalización o también el transporte retrógrado de endosomas positivos para p75. Para estudiar esta posibilidad, generamos un diseño experimental que nos permitiera dilucidar la participación de JNK solo en el proceso del tráfico endocítico y no estar enmascarados por el efecto de JNK en la internalización del receptor desde la membrana plasmática (Figura 18A). Utilizando cultivos compartimentalizados de SCGs, se gatilló el transporte retrógrado de p75 por BDNF desde los axones distales, a través de la inmunoendocitosis del receptor utilizando el anticuerpo MC192 asociado a *quantum dots* fluorescentes (Q-Dots 605). Y luego de 4 h de inducción de la internalización y transporte retrógrado del receptor, desde el compartimento de los cuerpos celulares se estimuló con el inhibidor de JNK, SP600125 y el inhibidor de dineína, Ciliobrevina-D, para posteriormente evaluar distintos parámetros sobre el transporte de endosomas positivos para p75 que vienen del axón y que van llegando al compartimento de los cuerpos celulares. En la Figura 18B se muestran quimogramas representativos de cada condición experimental de cultivos de SCGs,

en donde podemos apreciar que en la condición control hay un gran número de partículas móviles que se dirigen desde los axones a los cuerpos celulares (dirección retrógrada). Sin embargo, esta característica se ve disminuída en la condición con el inhibidor de JNK (panel del medio) y dramáticamente reducida en la condición de los cultivos con Ciliobrevina-D (panel inferior). Estas diferencias se pueden ver reflejadas cuando se evalúa el porcentaje de partículas móviles (Figura 18C), siendo significativamente reducido el porcentaje en las condiciones de la estimulación con SP600125 y Ciliobrevina-D, en comparación al control con el vehículo (DMSO). Sumado a esto, cuando se evalúa el flujo de endosomas positivos para p75, este se ve reducido en el tratamiento con el inhibidor de JNK (Figura 18D). Sin embargo, cuando se evalúa la velocidad de las partículas (promedio 1.5  $\mu\text{m/s}$  en el control y 1.7  $\mu\text{m/s}$  en SP600125) o la distancia alcanzada durante el tiempo de registro, no existen diferencias significativas entre el tratamiento control y con el inhibidor de JNK (Figura 18E y 18F respectivamente). Estos resultados nos sugieren que JNK y dineína son requeridos para el tráfico correcto y posterior señalización retrógrada de p75 en el cuerpo celular.



**Figura N°18. El transporte retrógrado de p75 en respuesta a BDNF requiere de la actividad de JNK. (A)** Esquema de la metodología utilizada para el experimento en cámaras compartimentalizadas. Cultivos compartimentalizados de 6 DIV de SCGs fueron incubados en el compartimento axonal con el anticuerpo MC192 conjugado a *Qdots605* durante 4 h. Durante 30 min antes del registro de células vivas, se eliminó el medio que contenía el anticuerpo conjugado y se realizaron 3 lavados en ambos compartimentos de la cámara, para luego incubar en el compartimento de los cuerpos celulares los inhibidores SP600125 o Ciliobrevina D (20uM) durante 30 minutos. Para finalizar, el registro de células vivas fue realizado en la proximidad de los microsurcos del compartimento de los cuerpos celulares, para así evaluar el efecto de los inhibidores en la llegada de endosomas que contienen a p75 endocitado desde el axón, hacia el cuerpo de las neuronas. **(B)** Quimogramas representativos del transporte retrógrado de p75 marcado con MC192-QD605 en axones de los 3 grupos experimentales (vehículo, SP60125 y Ciliobrevina-D). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . **(C)** El gráfico muestra la cuantificación de número de partículas móviles (mayor a 5  $\mu\text{m}$  recorrido) y estáticas (menos a 5  $\mu\text{m}$  recorrido) en los axones de las SCGs. La cuantificación fue realizada con los promedios de los datos obtenidos de 3 videos por cámara de 4 cámaras en cada condición experimental, de 2 experimentos independientes. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al control (\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). La significancia estadística fue analizada por un test ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. **(D)** El gráfico muestra la cuantificación del flujo lineal, lo que representa el número de partículas visibles durante 30 segundos en 50  $\mu\text{m}$  de un axón, multiplicado por el promedio de la velocidad de las partículas de cada video. La cuantificación fue realizada con los promedios de los datos obtenidos de 3 videos por cámara de 4 cámaras en cada condición experimental, de 2 experimentos independientes. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al control (\*  $p < 0.005$ ). La significancia estadística fue analizada por un Student t-Test. **(F-G)** Los gráficos muestran el promedio de la velocidad y la distancia recorrida de las partículas móviles en cada condición experimental. Las cuantificaciones fueron realizadas de la misma manera descrita anteriormente, provenientes de 58 (SP600125) a 106 (control) partículas por condición. En ambos casos no hubo diferencias significativas, lo cual fue evaluado por un Student t-Test ( $P = 0.5868$  y  $P = 0.3249$  respectivamente).

## 5.-DISCUSIÓN

### 5.1.- p75 interactúa con Rab5 y regula su actividad

La arquitectura neuronal trae consigo el gran desafío de poder tener una comunicación efectiva desde el soma hacia los terminales, y viceversa. Desde la propuesta del “endosoma de señalización” como mecanismo de propagación de la señalización de NGF tras activar al receptor TrkA en los axones distales, y así promover supervivencia y diferenciación de neuronas periféricas durante el desarrollo del SN, cada vez se refuerzan más el número trabajos que indican que el tráfico post-endocítico de neurotrofinas y sus receptores es un mecanismo celular que permite la mantención y correcta propagación de la señalización, para regular la conexión y la correcta innervación del órgano blanco (Ascano, Bodmer, and Kuruvilla 2012; Howe and Mobley 2004).

Esto nos hace a reflexionar sobre la importancia y lo crítico que son los endosomas para la continuación de la señalización desde las zonas distales de una neurona para la regulación de los procesos celulares en los cuerpos celulares (Di Fiore & De Camilli 2001).

El receptor p75 cumple un rol importante durante el desarrollo del SN periférico, pues permite junto a TrkA formar un receptor de gran afinidad para inducir sobrevida durante la competencia neuronal por las bajas concentraciones de neurotrofinas que se secretan desde el órgano blanco (Ascano, Bodmer, and Kuruvilla 2012). Sin embargo, su rol antagónico a esta respuesta es que tras unir a BDNF induce muerte (Bamji et al. 1998), degeneración de axones (Singh et al. 2008) en aquellas neuronas que no tuvieron una exitosa señalización pro-sobrevida. Por lo tanto, saber qué componentes del tráfico endocítico son cruciales para que se desencadene la señalización apoptótica de p75, nos acerca a entender cómo este receptor actúa en contextos de daño o enfermedades, en donde también se le asocia con la apoptosis neuronal (Ibáñez & Simi 2012).

En primer lugar, para poder abordar la contribución del tráfico endocítico en la señalización apoptótica de p75 evaluamos la interacción del receptor con Rab5, debido a que los endosomas Rab5<sup>+</sup> son el primer compartimiento en el tráfico endocítico una vez que los receptores internalizan, luego de ser activado tras unir ligandos (Bucci et al. 1992), y p75 no es la excepción (Deinhardt et al. 2006; Escudero et al. 2014). En el trabajo de Escudero et al., se describió que p75 en un modelo de SCGs colocaliza con endosomas Rab5<sup>+</sup> de manera transiente, cuando el receptor se une a NGF o BDNF, sin embargo, cuando se sobre-expresa Rab5CA-GFP el receptor queda atrapado en endosomas Rab5<sup>+</sup>. Este resultado nos hace pensar que el paso por este endosoma y la interacción del receptor con Rab5 en su forma activa es un evento clave para la señalización del receptor. Nuestros resultados muestran que a través de ensayos de co-inmunoprecipitación la interacción de p75 y Rab5 aumenta en los tiempos en que la internalización del receptor alcanza su tiempo medio y su máxima capacidad de internalización (90 y 240 min respectivamente) (Escudero et al. 2014). Además, se ha descrito

que Rab5 cambia su distribución correlacionándose con los tiempos en que el receptor internaliza. Es interesante que los niveles totales de Rab5 no se ven alterados por la estimulación con BDNF, reafirmando que el aumento de la co-immunoprecipitación de ambas proteínas se debe a que BDNF promueve la interacción entre p75 y Rab5, y no a un tipo de regulación transcripcional de Rab5, al menos a tiempos tempranos.

La importancia de las funciones múltiples que cumplen las proteínas Rabs en la ruta endocítica han sido descritas en excelentes artículos de revisión (Mizuno-Yamasaki, Rivera-Molina, and Novick 2012; Stenmark 2009; Wandinger-Ness and Zerial 2014; Zerial and McBride 2001). Sin embargo, evaluar la importancia de la interacción de las Rabs con sus propios cargos es un aspecto menos descrito. Nuestros resultados avalan que la interacción entre p75 y Rab5 aumenta en respuesta a la unión de BDNF al receptor, lo cual viene a complementar una lista de GTPasas que al interactuar directamente con el dominio intracelular de p75, modifican su actividad para inducir una respuesta fisiológica. Es el caso de las GTPasas Rho y Ras las cuales están involucradas en la formación de neuritas (Blöchl et al., 2004), RhoA y su rol en el crecimiento axonal (Yamashita et al., 1999), y la interacción con Rac la cuál es necesaria para inducir apoptosis a través de JNK (Harrington et al., 2002). Sumado a esto logramos identificar que la activación de p75 ligando-dependiente modula la actividad de Rab5, mostrando una correlación entre los tiempos de estimulación con BDNF cuando evaluamos interacción p75-Rab5 y un aumento de la versión activa unida a GTP de Rab5.

Hasta ahora los trabajos que han descrito una interacción directa entre p75 y Rab5 provienen sólo de modelos experimentales en tejido adiposo, donde se describe que p75 tiene un rol en la homeostasis de la glucosa. En este contexto p75 forma un complejo por unión directa con Rab5 y Rab31 y su dominio de muerte, modulando la actividad de ambas GTPasas para

regular el tráfico de GLUT4 y así la captura de glucosa (Baeza-Raja et al. 2012). Sin embargo, no existen evidencias que p75 regule la actividad de Rab5 o que exista una interacción directa de ambas proteínas en un contexto neuronal. Aunque, existe evidencia de que la actividad de Rab5 es necesaria para el transporte retrógrado axonal del receptor en neuronas motoras y SCGs (Deinhardt et al. 2006; Escudero & Cabeza, 2019). De manera adicional, nuestros resultados muestran que p75 interactúa preferentemente con la forma activa de Rab5 cuando sobre-expresamos las distintas variantes de la GTPasa en células HEK para evaluar la interacción con p75.

Tomando todos estos resultados en cuenta, podemos confirmar que p75 interactúa con Rab5 en respuesta a BDNF, y que no sólo existe una interacción preferente a Rab5 activa, sino que además modula la actividad de Rab5 aumentando los niveles de Rab5 activa en respuesta a BDNF. Esto nos hace pensar que justamente la actividad de Rab5 puede estar cumpliendo un rol importante dentro de la señalización de p75. Dado que p75 no posee un sitio intracelular catalítico, y no ha sido descrito aún un dominio GEF, podemos especular que p75 regula la actividad de Rab5 desplazando una GDI para esta GTPasa, así como lo hace con RhoA (Yamashita and Tohyama 2003).

## **5.2.- La actividad de Rab5 es requerida para la señalización apoptótica mediada por p75**

Nuestros resultados revelan que la actividad de Rab5 es necesaria para que se lleve a cabo la activación de la cascada apoptótica río abajo de p75 cuando es activado por BDNF en la membrana plasmática. Sabemos que luego de la activación del receptor en la membrana, el siguiente paso para seguir a cabo el curso de su señalización es la internalización de éste. Estos

resultados fueron aportados por el laboratorio del Dr. Carter, donde utilizando un mutante de p75 que tiene mutado los sitios de consenso para la internalización mediada por clatrina, la estimulación de las neuronas por BDNF no logró aumentar la translocación nuclear de NRIF. Estos datos nos muestran que la señalización apoptótica requiere de la internalización y posterior tráfico post-endocítico del receptor, y que la activación de éste en la membrana plasmática es insuficiente para gatillar todo el proceso apoptótico (datos no publicados, Figura complementaria 2, Tesis Claudia Escudero). Dado este antecedente, cuando evaluamos si la internalización de p75 dependía de la actividad de Rab5 notamos que la sobre-expresión del dominante negativo de Rab5 no impide que el receptor internalice tras la activación por BDNF. Estos resultados podrían tener dos explicaciones: que en efecto la actividad de Rab5 no es requerida en esta acción temprana, pero que pudiese tener un rol a medida que el endosoma va madurando en la ruta endocítica; sin embargo, la otra opción es que al igual que sucede con el receptor de EGF, el tráfico post-endocítico del receptor ligando-dependiente utilice preferentemente una isoforma en particular de Rab5, ya que cuando se silencia la isoforma *Rab5A* la internalización del receptor no se ve alterada, pero lo que sí ocurre es un retraso en la salida del receptor hacia la ruta degradativa (Chen et al. 2009). Sumado a esto, en el protista *Leishmania*, también se ha descrito un rol diferencial de las isoformas de Rab5 en los procesos de endocitosis de este organismo (Rastogi et al. 2016); mientras que el grupo de Bucci sostiene que las distintas isoformas de Rab5 regulan de manera cooperativa los procesos de endocitosis en células eucariontes (Bucci et al., 1995), y que estas diferencias funcionales podrían deberse a que las 3 isoformas son fosforiladas de manera diferencial, lo cual impactaría en la distinción de sus funciones (Chiariello et al., 1999). En el caso de nuestros experimentos, el dominante negativo de Rab5 que utilizamos fue para la isoforma A de Rab5, por lo que podría ser que la

sobre-expresión de esta isoforma incapaz de unir GTP sea insuficiente para detener la internalización de p75. En el futuro podría evaluarse si las distintas isoformas expresadas de Rab5 en SCGs contribuyen de manera específica a la internalización del receptor p75.

Si bien la actividad de Rab5 parece no ser necesaria para la internalización del receptor p75, cuando quisimos evaluar dos marcadores de la señalización apoptótica que son necesarios para que se lleve a cabo la apoptosis inducida por p75, encontramos que la ausencia de actividad de Rab5 impacta negativamente en la translocación nuclear de NRIF, así como en el clivaje de la caspasa-3.

En primer lugar, a través de los trabajos del grupo de Carter et al., sabemos que la activación de NRIF y posterior translocación nuclear de esta proteína es necesaria para inducir apoptosis mediada por p75 (Casademunt et al. 1999; Linggi et al. 2005). Esta activación depende de que NRIF sea ubiquitinado por la ubiquitin ligasa TRAF6 (Geetha et al. 2005), y para que esto ocurra es obligatorio que p75 sufra procesamiento proteolítico y libere su ICD para que TRAF6 pueda ubiquitinar a NRIF (Kenchappa et al., 2006). En este sentido es necesario recordar que el procesamiento de p75 dependiente de ligando se ha descrito como una serie de clivajes que ocurren asociados a membranas y/o endosomas durante su tráfico post-endocítico (Urra et al. 2007). Junto a éstos antecedentes, nuestros resultados indican que la ausencia de actividad de Rab5 inhibe la translocación de NRIF al núcleo, y que de manera opuesta, cuando se encuentra sobreexpresado Rab5CA la translocación nuclear de NRIF aumenta, además de encontrar a p75 atrapado en endosomas gigantes Rab5<sup>+</sup>. Esto nos lleva a pensar que la actividad de Rab5 es requerida para modular parte de los eventos de la señalización de p75, ya sea porque el procesamiento de p75 pueda realizarse en endosomas Rab5<sup>+</sup>, o que la actividad de Rab5 sea necesaria para que p75 pueda ser destinado a otro compartimento endosomal, como endosomas

Rab11<sup>+</sup>, para que pueda ocurrir procesamiento del receptor. Sin embargo, el hecho de que Rab5 al encontrarse constitutivamente activa regula positivamente la translocación de NRIF al núcleo, nos hace sospechar que este compartimiento endosomal podría ser el lugar de procesamiento del receptor. De todas maneras, en ambos casos todo parece apuntar a que la actividad de Rab5 podría estar afectando el procesamiento proteolítico del receptor, y esto incida en los eventos río abajo del procesamiento. Esto podría dilucidarse evaluando el procesamiento del receptor o la ubiquitinación de NRIF en presencia del dominante negativo de Rab5 en este mismo contexto experimental.

Si bien p75 es considerado un receptor de la familia de los receptores de muerte de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFR), los cuales promueven muerte celular a través de la vía extrínseca de apoptosis, p75 difiere de esta vía. Al contrario de los demás miembros, se ha descrito que no trimeriza tras unir ligandos pro-apoptóticos (Vilar et al. 2009), además de ocupar la vía intrínseca para inducir apoptosis. En el contexto de muerte celular inducido por p75, se ha descrito que se requiere de la participación de caspasas como la caspasa-3 durante la apoptosis inducida por neurotrofinas en neuronas hipocampales (Troy, Friedman, and Friedman 2002), así como en oligodendrocitos (Gu et al. 1999) y células de Schwann (Linggi et al. 2005); durante el desarrollo del sistema nervioso de neuronas sensoriales (Agerman et al. 2000); así como en DRGs luego de una axotomía (Jiang, Zhang, and Jakobsen 2005), descartando la activación de la caspasa-8 cuyo clivaje es un marcador clásico de la vía extrínseca de receptores de muerte. Interesantemente, se ha encontrado que la muerte neuronal por p75 requiere del clivaje de la caspasa-3, y es depende de la activación de JNK para la regulación positiva de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas y para la subsecuente liberación

de citocromo-c, tanto en neuronas simpáticas (Bertrand et al. 2008) como en células PC12 (Salehi et al. 2002).

Al evaluar el clivaje de la caspasa-3 en respuesta a la estimulación con BDNF en presencia de Rab5DN obtuvimos que el clivaje de esta caspasa se ve dramáticamente inhibido. Cuando comparamos el clivaje de la caspasa-3 en cultivos control que fueron privados de factores tróficos, podemos notar que la caspasa-3 muestra una marca 4 veces superior que el bajo porcentaje de células tratadas con BDNF en presencia de Rab5DN, cuya marca para la caspasa es casi indetectable.

Tomando la evidencia que existe hasta ahora, sabemos que tanto la translocación nuclear de NRIF (Kenchappa et al., 2010), como la activación de la caspasa-3 requieren de la activación de JNK. Si bien temporalmente pueden ser dos vías que actúan en paralelo, río debajo de la activación de p75 y su señalización apoptótica dependiente de JNK, podríamos pensar que la actividad de Rab5 es requerida para la activación de esta quinasa. Al menos en tiempos tardíos, posterior a la internalización del receptor, y que probablemente la activación de JNK requiera que p75 ya se encuentre en compartimientos endosomales.

El hecho de que la actividad de Rab5 sea requerida para los eventos en la señalización apoptótica por p75, además de los resultados de interacción descritos en la primera parte, apuntan a entender de que la relación entre estas dos proteínas, directa o indirectamente, probablemente es de suma importancia para el reclutamiento de adaptadores que se unen a p75 en su dominio intracelular, cuya misión es asegurar la correcta señalización que desencadenará la muerte neuronal. Por esta razón quisimos evaluar si es que había alguna interacción entre p75-Rab5-NRIF a través de ensayos de colocalización. Sin embargo, no pudimos encontrar grandes diferencias entre el control sin BDNF y cuando estimulábamos con BDNF. Suponemos

que al haber marcado a p75 con un anticuerpo que reconoce el dominio extracelular del receptor, para poder realizar ensayos de inmunoendocitosis era poco probable que encontráramos la marca de p75 colocalizando con NRIF o Rab5, ya que posiblemente las interacciones con estas dos últimas proteínas podrían encontrarse en el otro extremo del receptor, tanto en el CTF o el ICD, ambos fragmentos que pueden desprenderse al ser clivados producto del procesamiento proteolítico del receptor. Adicionalmente, la falta de colocalización de las marcas puede verse afectada en los tiempos experimentales que se escogieron (0 y 90 min). Sumado a esto, y en concordancia con estos resultados, recientemente se publicó un artículo donde describe que la señal degenerativa dependiente de la activación de p75 por BDNF o por la privación de factores tróficos, proveniente de axones distales de SCGs, involucra al fragmento ICD en endosomas viajando retrógradamente, y no a la versión completa del receptor (que contendría la porción ECD), el cuál tendría otra rol (Pathak et al., 2018).

Es por esto que sería interesante poder evaluar la interacción de éstas proteínas con una aproximación experimental que nos permita a través de ensayos de co-inmunoprecipitación evaluar la presencia de p75 y NRIF en endosomas Rab5<sup>+</sup> o Rab11<sup>+</sup>, así como otros adaptadores a distintos tiempos durante la señalización apoptótica de p75.

### **5.3.- La activación de JNK ocurre mayoritariamente desde los axones, la cual es requerida para el transporte retrógrado de p75**

La activación de JNK es parte fundamental de la señalización apoptótica por p75 (Bertrand et al., 2008; Friedman, 2000; Kenchappa et al., 2010; Yoon et al., 1998). Existen evidencias en un modelo de SCGs, que JNK tiene una activación bifásica, en la cual cada *peak*

en su activación está correlacionado con un evento de la señalización apoptótica (Kenchappa et al. 2010), la activación temprana de la quinasa es necesaria para el primer clivaje proteolítico del receptor, mientras que la activación tardía y sostenida de JNK es necesaria para el segundo corte proteolítico, la interacción de adaptadores con el ICD y la inducción de apoptosis a través de la translocación nuclear de NRIF.

En el artículo que hemos publicado recientemente “*c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates long-distance retrograde death signaling from BDNF-p75 signaling endosomes*” hemos otorgado evidencia novedosa sobre el rol de la señalización de muerte a través de p75 activado desde axones distales en SCGs por BDNF, cuya internalización y tráfico retrógrado a lo largo del axón requiere de la participación de JNK. Estos son los primeros experimentos que indican que JNK es requerida para la internalización y transporte p75. También se determinó que p75 viaja junto a BDNF en un mismo endosoma hacia el cuerpo celular, el cual requiere de la actividad de Rab5 para que su transporte retrógrado y señalización apoptótica, el cual además depende en su tráfico del motor molecular dineína (Escudero & Cabeza et al., 2019).

Dado el contexto descrito anteriormente, cuando evaluamos la activación de JNK en cultivos compartimentalizados, encontramos que la dinámica de activación de JNK requiere al menos 240 min para ser detectada en los axones al estimular con BDNF en el compartimiento de los axones distales. A diferencia de los axones, la marca para JNK fosforilada en los cuerpos celulares de estos cultivos no mostró diferencias significativas respecto al control sin BDNF, y sumado a esto, cuando se evaluó la fosforilación de JNK en los cuerpos celulares de cultivos masivos a los 240 min de estimulación con BDNF no se observaron diferencias con respecto al basal, por lo tanto, estos resultados sugieren que la activación de JNK en los axones podría tener un curso espacio-temporal muy parecido al trayecto que realiza el endosoma que transporta

retrógradamente a p75, además de tener una activación prioritariamente en los axones de SCGs, para luego re-distribuirse hacia el cuerpo celular. Estos resultados podrían sumarse a las evidencias que surgieron en un modelo de motoneuronas provenientes de ratones transgénicos que presentan un fenotipo de ALS. En ese estudio se observó que en la fracción de axoplasma derivadas de nervio ciático, contiene endosomas enriquecidos p75 y JNK fosforilado (Perlson et al. 2009). Complementario a estos estudios, en un modelo de DRGs, la privación de NGF desde los axones distales en cultivos compartimentalizados induce selectivamente la activación de una señal apoptótica retrógrada y de neurodegeneración dependiente de JNK y caspasa 3 (Ghosh et al., 2011). Frente a estos resultados, es plausible pensar que la activación de JNK para inducir apoptosis neuronal podría estar supeditada al compartimento axonal, más que en el cuerpo celular.

Por otro lado, en el artículo de Escudero & Cabeza et al. 2019, se describe que JNK es requerida para la internalización de p75. Para estos estudios se utilizaron 2 inhibidores de JNK: el inhibidor farmacológico y un péptido soluble por la membrana plasmática que contiene la secuencia de unión a JNK del adaptador JIP1. Al estimular con BDNF, se observó una disminución de la internalización de p75 en presencia de ambos inhibidores, cuyo efecto no se producía en otros receptores como el de transferrina. Estos resultados sugieren un nuevo rol de la activación temprana de JNK en el proceso de tráfico post-endocítico del receptor. Hasta ahora se había descrito que la activación temprana de JNK luego de la activación de p75, daba lugar a una regulación positiva en los niveles de TACE para el primer corte proteolítico de p75 necesario para desencadenar la señalización apoptótica río abajo del receptor (Kenchappa et al., 2006). Por lo tanto, esta información pueda dar cuenta del rol multifacético que tiene JNK en la fisiología celular, y de sus múltiples acciones dentro de la señalización apoptótica de un

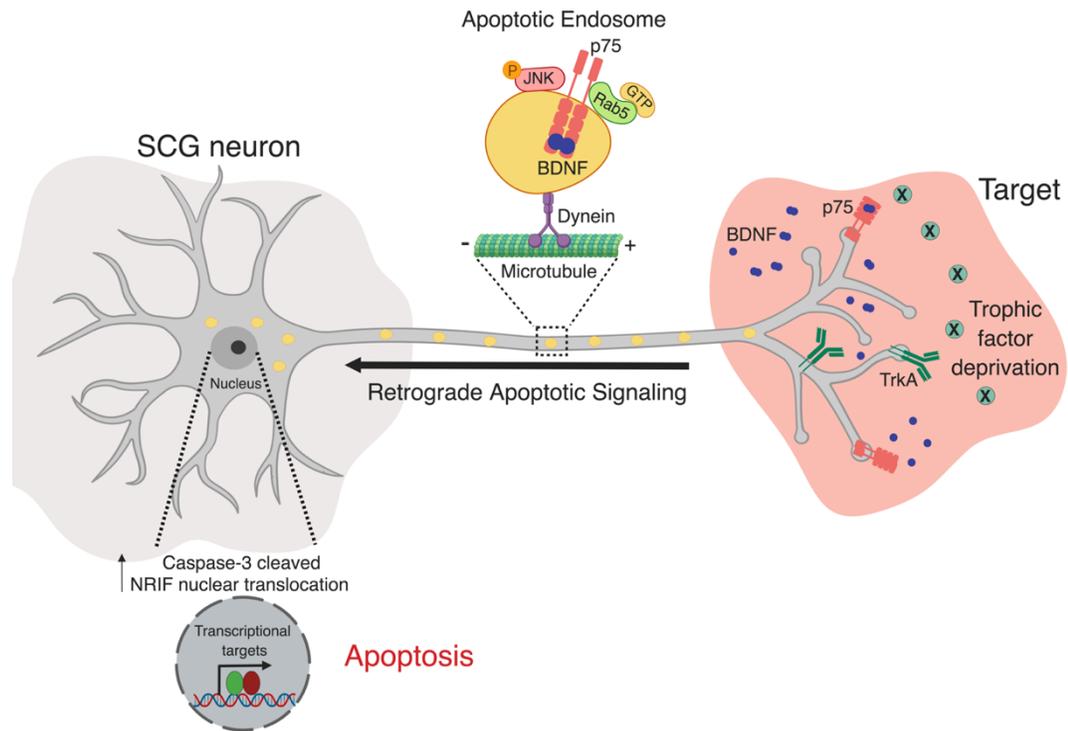
receptor. Si bien, esta es la primera evidencia de que JNK contribuye en la internalización de p75 tras la unión de ligandos, existen trabajos que describen la asociación entre una proteína *scaffold* llamada  $\beta$ -arrestin 2 que se asocia al adaptador AP-2, el cuál está involucrado en la endocitosis clatrina-dependiente y desensibilización de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) luego de la unión de agonistas (Beautrait et al., 2017; Oakley et al., 2002). Este punto es interesante, ya que AP-2 se ha descrito como un adaptador clave en la internalización clatrina-dependiente de p75 (Escudero et al., 2014). Notablemente,  $\beta$ -arrestin 2 además actúa como lugar de *docking* para proteínas río arriba de la señalización de JNK, como MKK4 y ASK1, y también  $\beta$ -arrestin 2 interactúa de manera directa con la isoforma 3 de JNK (Guo & Whitmarsh, 2008), cuya interacción es necesaria para la activación de JNK3 y su colocación con esta *scaffold* hacia endosomas intracelulares (McDonald, 2002). Sería interesante la búsqueda de un adaptador con las características de  $\beta$ -arrestin 2 que sirve como lugar de encuentro para JNK y proteínas río arriba de su activación, así como el adaptador involucrado en la endocitosis clatrina-dependiente AP-2 (Miller & Lefkowitz, 2001; Picard et al., 2014), quienes también forman parte de la señalización e internalización de p75.

Ahora, si bien JNK participa de la internalización del receptor, también es importante destacar que cuando se evaluó el rol de la quinasa en el transporte retrógrado del receptor, se observó que JNK también tenía participación del proceso. Esto se pudo dilucidar ocupando una metodología que nos permitiera evaluar el rol del tráfico de p75 sin interferir con la internalización desde la membrana plasmática. Utilizando cultivos compartimentalizados de SCGs, en donde una vez que se indujo el transporte retrógrado durante 4 horas estimulando axones distales con BDNF, se estimuló la zona de los cuerpos celulares con inhibidores de dineína y JNK para evaluar la llegada de p75 en los axones proximales hacia el cuerpo celular

de las neuronas. Al inhibir el transporte dependiente de dineína, la llegada de p75 fue impedida y casi nula hacia los cuerpos celulares, mientras que al inhibir la actividad de JNK se observó que tanto el flujo como el porcentaje de partículas móviles disminuía con respecto al vehículo. Lo cual le otorga a JNK una participación novedosa en el tráfico axonal post-endocítico del receptor p75. Estos resultados se sostienen con evidencias que describen el transporte retrógrado de JNK dineína-dependiente a través de un adaptador llamado JIP3 (Drerup & Nechiporuk, 2013), además de encontrar presencia de vesículas positivas para JNK transportándose retrógradamente a través del adaptador JIP3 para su interacción con dineína, luego de daño axonal (Coffey, 2014; Ghosh et al., 2011).

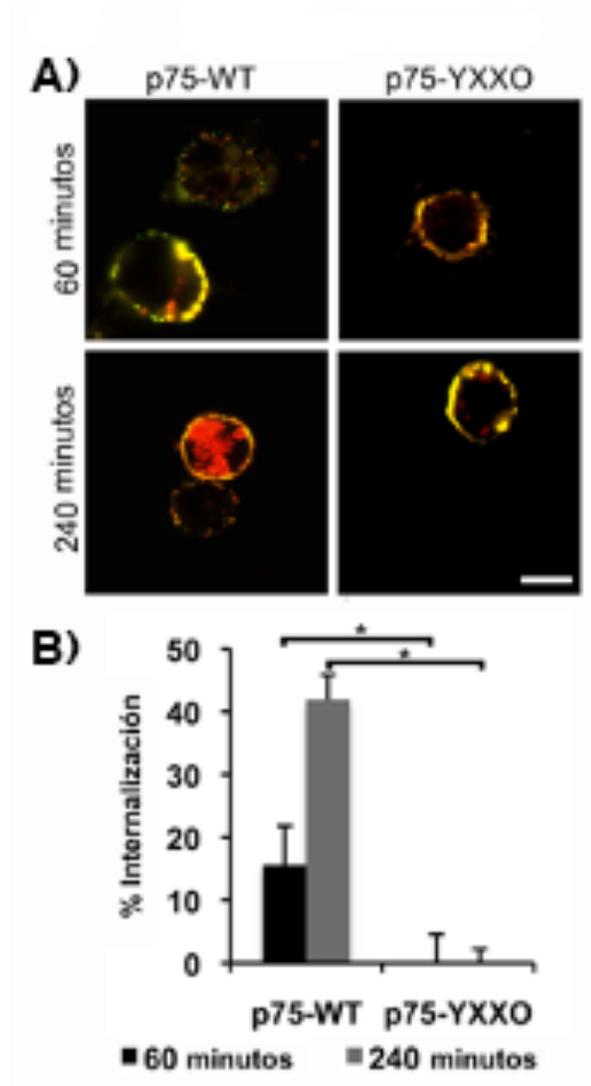
En resumen, los datos de esta tesis contribuyeron a dilucidar el rol de la GTPasa monomérica Rab5 en la señalización apoptótica del receptor p75, indicando que ambas proteínas tienen una relación funcional. Mostramos que p75 interactúa con Rab5 y regula su actividad de una manera dependiente de ligando y a su vez la actividad de Rab5 es necesaria para la señalización apoptótica en SCGs. Nuestros resultados también muestran que existe una participación relevante de JNK en el tráfico post-endocítico del receptor mostrando por primera vez datos que sugieren que la activación de JNK en SCGs es mayoritariamente axonal. De esa manera JNK tendría un rol dual en la señalización del p75, donde permite la internalización y posterior transporte de p75 y luego participa en el reclutamiento de distintos adaptadores como TRAF6 o la activación de caspasas para llevar a cabo la respuesta apoptótica en respuesta a BDNF.

## 6.- MODELO

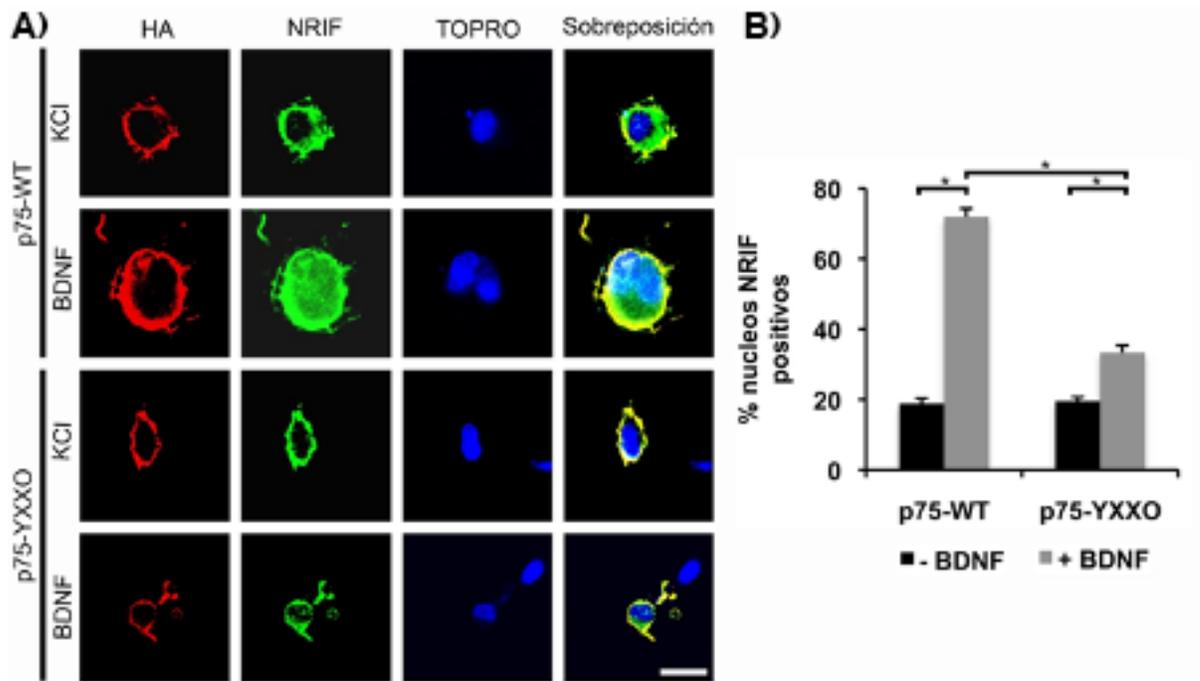


**FIGURA N°19.** Modelo del rol de p75 y BDNF en la señalización apoptótica retrógrada en SCGs. En neuronas simpáticas que no recibieron eficientemente NGF proveniente del órgano blanco, fallan en promover una señal sostenida de sobrevivencia, por lo tanto, el BDNF circulante que es secretado tanto en los órganos blancos como de las propias neuronas simpáticas de la vecindad activan al receptor p75 en los axones distales. Luego de la internalización de p75, éste requiere de la actividad de Rab5 para promover su señalización apoptótica de manera eficiente. Esta señal es transportada retrógradamente en un endosoma que en primera instancia requiere de Rab5, pero que también es dependiente de dineína y de la activación de JNK para que pueda arribar correctamente en el cuerpo celular. La correcta activación de Rab5 y JNK es requerida para que adaptadores pro-apoptóticos de p75, como NRIF y la caspasa-3, puedan llevar a cabo la respuesta apoptótica activada por p75 tras unir BDNF.

## 7.- FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**FIGURA SUPLEMENTARIA N°1. La internalización de p75 se ve impedida al sobre-expresar el mutante p75-YXX0.** (A) Inmunoendocitosis de p75 por BDNF utilizando el anticuerpo MC192 en cultivos masivos de SCGs que fueron electroporados con versiones mutantes del receptor p75. Las células son electroporadas con los constructos control HA-p75-WT y el mutante que no internaliza HA-p75-YXX0. Luego de 36 h post-electroporación las células son privadas de factores tróficos para luego ser incubadas con el anticuerpo MC192 y detectar la marca de p75, estimulando con BDNF (200 mg/ml) en presencia de KCL (12,5 mM) durante 60 y 240 min. Posteriormente las células son fijadas y previo a la permeabilización, se incuban con un anticuerpo contra el epítipo HA para detectar a p75 en la membrana (verde). Luego las células son permeabilizadas y se procede a incubar con anticuerpos secundarios para detectar los niveles de p75 internalizados unidos al anticuerpo MC192 (rojo) por microscopía confocal. Barra de escala 10  $\mu$ m. (B) El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de internalización de p75 a los distintos tiempos de estimulación con BDNF para los grupos control HA-p75-WT y el mutante HA-p75-YXX0. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto grupo control estimulados durante 60 min con BDNF (\* $p < 0.01$ ), a partir del análisis de 10 células por punto de 3 experimentos independientes. *Resultados obtenidos en tesis doctoral Claudia Escudero.*



**FIGURA SUPLEMENTARIA N°2. La translocación nuclear de NRIF requiere de la internalización del receptor p75 inducida por BDNF.** (A) Inmunofluorescencia de la translocación nuclear de NRIF en cultivos masivos de SCGs que fueron electroporados con versiones mutantes del receptor p75. Las células son electroporadas con los constructos control HA-p75-WT y el mutante que no internaliza HA-p75-YXX $\theta$ . Luego de 36 h post-electroporación las células son privadas de factores tróficos para luego ser estimuladas con BDNF (200 mg/ml) en presencia de KCL (12,5mM) durante 30 h. Posteriormente las células son fijadas y se realiza una inmunofluorescencia para detectar la marca de NRIF (verde), p75 (rojo) y la tinción nuclear TOPRO (azul). Barra de escala 10  $\mu$ m. (B) El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para NRIF para los grupos control HA-p75-WT y el mutante HA-p75-YXX $\theta$  a los distintos tiempos de estimulación con BDNF. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM. \* Indica la significancia con respecto al grupo control y entre tratamientos de ligando (\* $p < 0.05$ ), a partir del análisis de al menos 20 células por punto de 3 experimentos independientes. *Resultados obtenidos por el laboratorio del Dr. Bruce Carter en colaboración con Claudia Escudero.*

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Agerman, K., Baudet, C., Fundin, B., Willson, C., & Ernfors, P. (2000). Attenuation of a caspase-3 dependent cell death in NT4- and p75-deficient embryonic sensory neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *16*(3), 258–268.
- Ascano, M., Richmond, A., Borden, P., & Kuruvilla, R. (2009). Axonal Targeting of Trk Receptors via Transcytosis Regulates Sensitivity to Neurotrophin Responses. *Journal of Neuroscience*, *29*(37), 11674–11685.
- Ascano, M., Bodmer, D., & Kuruvilla, R. (2012). Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends in Cell Biology*, *22*(5), 266–273. Agerman, K., Baudet, C., Fundin, B., Willson, C., & Ernfors, P. (2000). Attenuation of a caspase-3 dependent cell death in NT4- and p75-deficient embryonic sensory neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *16*(3), 258–268. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0875>
- Ascano, M., Richmond, A., Borden, P., & Kuruvilla, R. (2009). Axonal Targeting of Trk Receptors via Transcytosis Regulates Sensitivity to Neurotrophin Responses. *Journal of Neuroscience*, *29*(37), 11674–11685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1542-09.2009>
- Ascano, Maria, Bodmer, D., & Kuruvilla, R. (2012). Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends in Cell Biology*, *22*(5), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.005>
- Baeza-Raja, B., Li, P., Le Moan, N., Sachs, B. D., Schachtrup, C., Davalos, D., Vagena, E., Bridges, D., Kim, C., Saltiel, A. R., Olefsky, J. M., & Akassoglou, K. (2012). p75 Neurotrophin Receptor Regulates Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(15), 5838–5843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103638109>
- Baeza-Raja, Bernat, Sachs, B. D., Li, P., Christian, F., Vagena, E., Davalos, D., Le Moan, N., Ryu, J. K., Sikorski, S. L., Chan, J. P., Scadeng, M., Taylor, S. S., Houslay, M. D., Baillie, G. S., Saltiel, A. R., Olefsky, J. M., & Akassoglou, K. (2016). p75 Neurotrophin Receptor Regulates Energy Balance in Obesity. *Cell Reports*, *14*(2), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.028>
- Baker, S. J., & Reddy, E. P. (1998). *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., & Miller, F. D. (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *The Journal of Cell Biology*, *140*(4), 911–923. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.911>
- Barbieri, E., Di Fiore, P. P., & Sigismund, S. (2016). Endocytic control of signaling at the plasma membrane. *Current Opinion in Cell Biology*, *39*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.012>
- Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*, *1*(5), 549–553. <https://doi.org/10.1093/emboj/1/5/549>
- Barford, K., Deppmann, C., & Winckler, B. (2017). The neurotrophin receptor signaling endosome: Where trafficking meets signaling. *Developmental Neurobiology*, *77*(4), 405–

418. <https://doi.org/10.1002/dneu.22427>
- Barker, P. A. (2004). p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: Novel partners and new insights. *Neuron*, 42(4), 529–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.04.001>
- Barnekow, A., Thyrock, A., & Kessler, D. (2009). Chapter 5 Rab Proteins and Their Interaction Partners. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 274(C), 235–274. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)02005-4](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)02005-4)
- Barrett, G. L., & Bartlett, P. F. (1994). The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6501–6505. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6501>
- Beautrait, A., Paradis, J. S., Zimmerman, B., Giubilaro, J., Nikolajev, L., Armando, S., Kobayashi, H., Yamani, L., Namkung, Y., Heydenreich, F. M., Khoury, E., Audet, M., Roux, P. P., Veprintsev, D. B., Laporte, S. A., & Bouvier, M. (2017). A new inhibitor of the  $\beta$ -arrestin/AP2 endocytic complex reveals interplay between GPCR internalization and signalling. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15054>
- Belliveau, D. J., Krivko, I., Kohn, J., Lachance, C., Poznaniak, C., Rusakov, D., Kaplan, D., & Miller, F. D. (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neurogenesis. *Journal of Cell Biology*, 136(2), 375–388. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.375>
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., & Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, 7(5), 857–866. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90287-A](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90287-A)
- Bertrand, M. J. M., Kenchappa, R. S., Andrieu, D., Leclercq-Smekens, M., Nguyen, H. N. T., Carter, B. D., Muscatelli, F., Barker, P. A., & De Backer, O. (2008). NRAGE, a p75<sup>NTR</sup> adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death and Differentiation*, 15(12), 1921–1929. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.127>
- Blanc, L., & Vidal, M. (2018). New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*, 9(1–2), 95–106. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1264352>
- Blöchl, A., Blumenstein, L., & Ahmadian, M. R. (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2321–2335. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03692.x>
- Bothwell, M. (1995). *FUNCTIONAL INTERACTIONS OF NEUROTROPHINS AND Additional Functions of Neurotrophins*.
- Bronfman, F. C., Escudero, C. A., Weis, J., & Kruttgen, A. (2007). Endosomal Transport of Neurotrophins: Roles in Signaling and Neurodegenerative Diseases. *Developmental Neurobiology*, 67(9), 1183–1203. <https://doi.org/10.1002/dneu.22087>
- Bronfman, F. C., Lazo, O. M., Flores, C., & Escudero, C. A. (2014). *Spatiotemporal Intracellular Dynamics of Neurotrophin and Its Receptors . Implications for Neurotrophin Signaling and Neuronal Function*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5>
- Bronfman, Francisca C., & Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: Sortilin things out? *EMBO Reports*, 5(9), 867–871. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400219>
- Bronfman, Francisca C., Tcherpakov, M., Jovin, T. M., & Fainzilber, M. (2003). Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome.

- The Journal of Neuroscience*, 23(8), 3209–3220. <https://doi.org/23/8/3209> [pii]
- Bucci, C., Alifano, P., & Cogli, L. (2014). The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes*, 4(4), 642–677. <https://doi.org/10.3390/membranes4040642>
- Bucci, C., Lütcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C. B., Simons, K., & Zerial, M. (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. *FEBS Letters*, 366(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00477-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00477-Q)
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., & Zerial, M. (1992). *The Small GTPase rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway*. 70, 715–728.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., Deurs, B. Van, Califano, M. L., Spermentale, O., & Salvatore, G. (2000). *Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis* □. 11(February), 467–480.
- Butowt, R., & von Bartheld, C. S. (2009). Fates of Neurotrophins after Retrograde Axonal Transport: Phosphorylation of p75NTR Is a Sorting Signal for Delayed Degradation. *Journal of Neuroscience*, 29(34), 10715–10729. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2512-09.2009>
- Casaccia-Bonnel, P., Carter, B. D., Dobrowsky, R. T., & Chao, M. V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. In *Nature* (Vol. 383, Issue 6602, pp. 716–719). <https://doi.org/10.1038/383716a0>
- Casademunt, E., Carter, B. D., Benzel, I., Frade, J. M., Dechant, G., & Barde, Y. A. (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO Journal*, 18(21), 6050–6061. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.6050>
- Causing, C. G., Gloster, A., Aloyz, R., Bamji, S. X., Chang, E., Fawcett, J., Kuchel, G., & Miller, F. D. (1997). Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron*, 18(2), 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80266-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80266-4)
- Chao, M. V., & Hempstead, B. L. (1995). p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends in Neurosciences*, 18(7), 321–326. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93922-K](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93922-K)
- Cheng, P. L., Song, A. H., Wong, Y. H., Wang, S., Zhang, X., & Poo, M. M. (2011). Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18430–18435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115907108>
- Ching, R. C., & Kingham, P. J. (2015). The role of exosomes in peripheral nerve regeneration. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 743–747. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156968>
- Claude, P., Hawrot, E., Dunis, D., & Campenot, R. (1982). Binding, internalization, and retrograde transport of 125I-nerve growth factor in cultured rat sympathetic neurons. *J Neurosci*, 2, 431–442.
- Coffey, E. T. (2014). Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 285–299. <https://doi.org/10.1038/nrn3729>
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Sarcoma 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(10), 1014–1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.10.1014>

- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Cosker, K. E., & Segal, R. A. (2014). Neuronal signaling through endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020669>
- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., & Phillips, H. S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 76(6), 1001–1011. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90378-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90378-6)
- Davies, A. M. (1995). *Regulation of Nerve Growth Factor Receptor Gene Expression in Sympathetic Neurons during Development*. 130(6), 1435–1446.
- Davies, A. M., Lee, K., & Jaenisch, R. (1993). *p75-Deficient Trigeminal Sensory Neurons Have an Altered Response to NGF but Not to Other Neurotrophins*. 11, 565–574.
- Deinhardt, K., Reversi, A., Berninghausen, O., Hopkins, C. R., & Schiavo, G. (2007). Neurotrophins redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic*, 8(12), 1736–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00645.x>
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., & Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 Control Endocytic Sorting along the Axonal Retrograde Transport Pathway. *Neuron*, 52(2), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.018>
- Delcroix, J.-D., Valletta, J. S., Wu, C., Hunt, S. J., Kowal, A. S., & Mobley, W. C. (2003). NGF Signaling in Sensory Neurons: Evidence that Early Endosomes Carry NGF Retrograde Signals. *Neuron*, 39(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00397-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00397-0)
- Deppmann, C. D., Mihalas, S., Sharma, N., Lonze, B. E., Niebur, E., & Ginty, D. D. (2008). A Model for Neuronal Competition. 369(2008). <https://doi.org/10.1126/science.1152677>
- Di Fiore, P. P., & De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling: An inseparable partnership. *Cell*, 106(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00428-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00428-7)
- Díaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., Díaz, N., Leyton, L., Stupack, D., Quest, A. F. G., & Torres, V. A. (2014). Rab5 is required in metastatic cancer cells for caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 127(11), 2401–2406. <https://doi.org/10.1242/jcs.141689>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Drerup, C. M., & Nechiporuk, A. V. (2013). *JNK-Interacting Protein 3 Mediates the Retrograde Transport of Activated c-Jun N-Terminal Kinase and Lysosomes*. 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003303>
- Ehlers, M. D., Kaplan, D. R., Price, D. L., & Koliatsos, V. E. (1995). NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *Journal of Cell Biology*, 130(1), 149–156. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.1.149>
- Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., & Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents.

- Cell*, 77(4), 503–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90213-5)
- Escudero, C. A., Cabeza, C., Moya-Alvarado, G., Maloney, M. T., Flores, C. M., Wu, C., Court, F. A., Mobley, W. C., & Bronfman, F. C. (2019). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent internalization and Rab5-dependent endocytic sorting mediate long-distance retrograde neuronal death induced by axonal BDNF-p75 signaling. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42420-6>
- Escudero, C. A., Lazo, O. M., Galleguillos, C., Parraguez, J. I., Lopez-Verrilli, M. A., Cabeza, C., Leon, L., Saeed, U., Retamal, C., Gonzalez, A., Marzolo, M.-P., Carter, B. D., Court, F. A., & Bronfman, F. C. (2014). The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *Journal of Cell Science*, 127(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.141754>
- Fagan, A. M., Zhang, H., Landis, S., Smeyne, R. J., Silos-Santiago, I., & Barbacid, M. (1996). TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. *Journal of Neuroscience*, 16(19), 6208–6218. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-19-06208.1996>
- Fariñas, I. (1999). Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system. *Microscopy Research and Technique*, 45(4–5), 233–242. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19990515/01\)45:4/5<233::AID-JEMT7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<233::AID-JEMT7>3.0.CO;2-Y)
- Fariñas, I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X. Y., & Reichardt, L. F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*, 369(6482), 658–661. <https://doi.org/10.1038/369658a0>
- Francis, N., Farinas, I., Brennan, C., Rivas-plata, K., Backus, C., Reichardt, L., & Landis, S. (1999). *NT-3*, like *NGF*, Is Required for Survival of Sympathetic Neurons, but Not Their Precursors. 427, 411–427.
- Francis, N. J., & Landis, S. C. (1999). Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.541>
- Friedman, W. J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *The Journal of Neuroscience*, 20(17), 6340–6346. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2017-00.2000> [pii]
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K. A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., & Krämer-Albers, E. M. (2013). Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>
- Gary, R., & Barde, Y. (1996a). *Physiology of the*. 289–317. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001445>
- Gary, R., & Barde, Y. (1996b). *PHYSIOLOGY OF THE*. 289–317.
- Gaur, U., & Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1403–1408. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00490-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00490-8)
- Geetha, T., Kenchappa, R. S., Wooten, M. W., & Carter, B. D. (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO Journal*, 24(22), 3859–3868. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600845>
- Ghosh, A. S., Wang, B., Pozniak, C. D., Chen, M., Watts, R. J., & Lewcock, J. W. (2011). DLK

- induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *Journal of Cell Biology*, 194(5), 751–764. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103153>
- Gilligan, K. E., & Dwyer, R. M. (2017). Engineering exosomes for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061122>
- Glebova, N. O. (2004). Heterogeneous Requirement of NGF for Sympathetic Target Innervation In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 24(3), 743–751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4523-03.2004>
- Glebova, Natalia O., & Ginty, D. D. (2005). Growth and Survival Signals Controlling Sympathetic Nervous System Development. *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), 191–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135659>
- Grimes, M L, Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnett, N. W., & Mobley, W. C. (1996). Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(24), 7950–7964.
- Grimes, Mark L., Beattie, E., & Mobley, W. C. (1997). A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9909–9914. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9909>
- Gu, C., Casaccia-bonnefil, P., Srinivasan, A., & Chao, M. V. (1999). *Oligodendrocyte Apoptosis Mediated by Caspase Activation*. 19(8), 3043–3049.
- Guo, C., & Whitmarsh, A. J. (2008). The  $\beta$ -arrestin-2 scaffold protein promotes c-Jun N-terminal kinase-3 activation by binding to its nonconserved N terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15903–15911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710006200>
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R. T., & Davies, a M. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14, 28–40. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0770>
- Hanson, P. I., & Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 337–362. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>
- Harrington, A W, Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J. C., Lee, R., Mörl, K., Meyer, M., Hempstead, B. L., Yoon, S. O., & Giehl, K. M. (2004). *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury*.
- Harrington, Anthony W., & Ginty, D. D. (2013). Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(3), 177–187. <https://doi.org/10.1038/nrn3253>
- Harrington, Anthony W., St. Hillaire, C., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Philippidou, P., Haleboua, S., & Ginty, D. D. (2011). Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell*, 146(3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.008>
- Harrington, Anthony W, Kim, J. Y., & Yoon, S. O. (2002). *Activation of Rac GTPase by p75 Is Necessary for c- jun N-Terminal Kinase-Mediated Apoptosis*. 22(1), 156–166.
- Harrison, S. M. W., Jones, M. E., Uecker, S., Albers, K. M., Kudrycki, K. E., & Davis, B. M. (2000). Levels of nerve growth factor and neurotrophin-3 are affected differentially by the presence of p75 in sympathetic neurons in vivo. *Journal of Comparative Neurology*,

- 424(1), 99–110. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000814\)424:1<99::AID-CNE8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000814)424:1<99::AID-CNE8>3.0.CO;2-J)
- Heerssen, H. M., Pazyra, M. F., & Segal, R. A. (2004). Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nature Neuroscience*, 7(6), 596–604. <https://doi.org/10.1038/nn1242>
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., & Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678–683. <https://doi.org/10.1038/350678a0>
- Hendry, I. A., Stöckel, K., Thoenen, H., & Iversen, L. L. (1974). The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Research*, 68(1), 103–121. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90536-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90536-8)
- Hibbert, A. P., Kramer, B. M. R., Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2006). The localization, trafficking and retrograde transport of BDNF bound to p75NTR in sympathetic neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32(4), 387–402. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.06.001>
- Hickman, F. E., Stanley, E. M., & Carter, B. D. (2018). Neurotrophin Responsiveness of Sympathetic Neurons Is Regulated by Rapid Mobilization of the p75 Receptor to the Cell Surface through TrkA Activation of Arf6. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(24), 5606–5619. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0788-16.2018>
- Homma, Y., Hiragi, S., & Fukuda, M. (2020). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS Journal*, 1–20. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Horton, A., Laramée, G., Wyatt, S., Shih, A., Winslow, J., & Davies, A. M. (1997). *at Different Stages of Development*. 172, 162–172.
- Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2004). Signaling Endosome Hypothesis: A Cellular Mechanism for Long Distance Communication. *Journal of Neurobiology*, 58(2), 207–216. <https://doi.org/10.1002/neu.10323>
- Howe, C. L., Valletta, J. S., Rusnak, A. S., & Mobley, W. C. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: Evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron*, 32(5), 801–814. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00526-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00526-8)
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S. I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S. Y., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J. S., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24, pp. 677–736). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hupalowska, A., & Miaczynska, M. (2012). The new faces of endocytosis in signaling. *Traffic*, 13(1), 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01249.x>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 91(1), 119–149.

- <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Ibáñez, C. F., & Simi, A. (2012). P75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.007>
- Ip, N. Y., Ibáñez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., & Squinto, S. P. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 3060–3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3060>
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., & Chaot, M. (1986). *Expression and Structure of the Human NGF Receptor*. 47, 545–554.
- Jones, K. R., Fariñas, I., Backus, C., & Reichardt, L. F. (1994). Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 76(6), 989–999. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90377-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90377-8)
- Jung, K. M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P. K., Kim, D. S., Ryu, S. H., Chao, M. V., & Kim, T. W. (2003). Regulated Intramembrane Proteolysis of the p75 Neurotrophin Receptor Modulates Its Association with the TrkA Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42161–42169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306028200>
- Kenchappa, R. S., Tep, C., Korade, Z., Urra, S., Bronfman, F. C., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2010). P75 Neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20358–20368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082834>
- Kenchappa, R. S., Zampieri, N., Chao, M. V., Barker, P. A., Teng, H. K., Hempstead, B. L., & Carter, B. D. (2006). Ligand-Dependent Cleavage of the P75 Neurotrophin Receptor Is Necessary for NRIF Nuclear Translocation and Apoptosis in Sympathetic Neurons. *Neuron*, 50(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.011>
- Klein, R., Smeyne, R. J., Wurst, W., Long, L. K., Auerbach, B. A., Joyner, A. L., & Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell*, 75(1), 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80088-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80088-1)
- Kohn, J., Aloyz, R. S., Toma, J. G., Haak-Frendscho, M., & Miller, F. D. (1999). Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(13), 5393–5408. [papers://a160a322-7748-499f-b1e5-c793de7b7813/Paper/p204](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4160-99.2000)
- Korsching, S., & Thoenen, H. (1983). *Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: Correlation with density of sympathetic innervation*. 80(June), 3513–3516.
- Korsching, Sigrun, & Thoenen, H. (1983). Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neuroscience Letters*, 39(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90155-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90155-6)
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19),

- 8856–8860. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8856>
- Korte, M., Griesbeck, O., Gravel, C., Carroll, P., Staiger, V., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. (1996). Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(22), 12547–12552. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12547>
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, *29*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Kuruvilla, R., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Lonze, B. E., Valdez, G., Ye, H., & Ginty, D. D. (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell*, *118*(2), 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.021>
- Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, *76*(PART C), 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>
- Lee, K., Davies, A. M., & Jaenisch, R. (1994). *p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF*. *1033*, 1027–1033.
- Lee, K. F., Li, E., Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, *69*(5), 737–749. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90286-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90286-L)
- Lehigh, K. M., West, K. M., & Ginty, D. D. (2017). Retrogradely Transported TrkA Endosomes Signal Locally within Dendrites to Maintain Sympathetic Neuron Synapses. *Cell Reports*, *19*(1), 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.028>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). *Review Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Levi-Montalcini, R. (1952). EFFECTS OF MOUSE TUMOR TRANSPLANTATION ON THE NERVOUS SYSTEM. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *55*(2), 330–344. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26548.x>
- Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, *116*(2), 321–361. <https://doi.org/10.1002/jez.1401160206>
- Lewin, G. R., & Carter, B. D. (2014). Neurotrophic Factors. In G. R. Lewin & B. D. Carter (Eds.), *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 220). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5>
- Liao, W., Du, Y., Zhang, C., Pan, F., Yao, Y., Zhang, T., & Peng, Q. (2019). Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta Biomaterialia*, *86*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.045>
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., & Iba, C. F. (1997). *NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor*. *16*(16), 4999–5005.
- Linggi, M. S., Burke, T. L., Williams, B. B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B. L., Sung, O. Y., & Carter, B. D. (2005). Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13801–13808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410435200>
- Lonze, B. E., Riccio, A., Cohen, S., & Ginty, D. D. (2002). Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, *34*(3), 371–385.

- [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00686-4)
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. In *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 220). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5>
- Luikart, B. W., Nef, S., Shipman, T., & Parada, L. F. (2003). In vivo role of truncated trkB receptors during sensory ganglion neurogenesis. *Neuroscience*, *117*(4), 847–858. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00719-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00719-4)
- Luther, J. A., & Birren, S. J. (2009). Neurotrophins and target interactions in the development and regulation of sympathetic neuron electrical and synaptic properties. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *151*(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.08.009>
- Macnes, M. Y. K., Sm, R. F., Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-matthaei, R., Baeuerle, P. A., & Barde, Y. (1996). *Selective Activation of [ VF-KB by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor p75*. *148*(April), 3–6.
- Maggirwar, S. B., Sarmiere, P. D., Dewhurst, S., & Freeman, R. S. (1998). Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(24), 10356–10365.
- Maisonpierre, P., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N., Furth, M., Lindsay, R., & Yancopoulos, G. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, *247*(4949), 1446–1451. <https://doi.org/10.1126/science.2321006>
- Majdan, M., Lachance, C., Gloster, a, Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Bhakar, a, Belliveau, D., Fawcett, J., Miller, F. D., & Barker, P. a. (1997). Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(18), 6988–6998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278534>
- Majdan, Marta, Walsh, G. S., Aloyz, R., & Miller, F. D. (2001). TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *Journal of Cell Biology*, *155*(7), 1275–1285. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110017>
- Matusica, D., & Coulson, E. J. (2014). Local versus long-range neurotrophin receptor signalling: Endosomes are not just carriers for axonal transport. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *31*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.032>
- McAllister, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, *15*(4), 791–803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90171-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-X)
- McDonald, P. H. (2002). beta -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science*, *290*(5496), 1574–1577. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1574>
- Miaczynska, M., Pelkmans, L., & Zerial, M. (2004). Not just a sink: Endosomes in control of signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(4), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.005>
- Miller, F D, & Kaplan, D. R. (2001). Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *58*(8), 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/PL00000919>
- Miller, F D, Mathew, T. C., & Toma, J. G. (1991). Regulation of nerve growth factor receptor

- gene expression by nerve growth factor in the developing peripheral nervous system. *The Journal of Cell Biology*, 112(2), 303–312. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1671048%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671048%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2288812](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1671048%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671048%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2288812)
- Miller, Freda D., & Kaplan, D. R. (2001). On Trk for retrograde signaling. *Neuron*, 32(5), 767–770. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00529-3)
- Miller, Freda D., Speelman, A., Mathew, T. C., Fabian, J., Chang, E., Pozniak, C., & Toma, J. G. (1994). Nerve Growth Factor Derived from Terminals Selectively Increases the Ratio of p75 to trkA NGF Receptors on Mature Sympathetic Neurons. *Developmental Biology*, 161(1), 206–217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1021>
- Miller, W. E., & Lefkowitz, R. J. (n.d.). *Expanding roles for  $\beta$ -arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking*. 139–145.
- Minichiello, L., Casagrande, F., Tatche, R. S., Stucky, C. L., Postigo, A., Lewin, G. R., Davies, A. M., & Klein, R. (1998). Point mutation in trkB causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron*, 21(2), 335–345. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80543-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80543-7)
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P. (2012). GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 637–659. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052810-093700>
- Moses, V. (2014). *Neurotrophic Factors - Trk chapter* (Vol. 220). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5>
- Moya-Alvarado, G., Gonzalez, A., Stuardo, N., & Bronfman, F. C. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Regulates Rab5-Positive Early Endosomes in Hippocampal Neurons to Induce Dendritic Branching. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00493>
- Naska, S., Lin, D. C., Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2010). P75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(2), 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.05.015>
- Novick, P. (2016). Regulation of membrane traffic by Rab GEF and GAP cascades. *Small GTPases*, 7(4), 252–256. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1213781>
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., & Jansen, P. (2004). *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death*. 427(February), 15–20. <https://doi.org/10.1038/nature02289>
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Caron, M. G., Holt, J. A., & Barak, L. S. (2002). The Interaction of  $\beta$ -Arrestin with the AP-2 Adaptor Is Required for the Clustering of  $\beta$  2 -Adrenergic Receptor into Clathrin-coated Pits . *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23120–23126. <https://doi.org/10.1074/jbc.m002581200>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Park, J. W., Vahidi, B., Taylor, A. M., Rhee, S. W., & Jeon, N. L. (2006). Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nature Protocols*, 1(4), 2128–2136. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.316>

- Patel, T. D., Jackman, A., Rice, F. L., Kucera, J., & Snider, W. D. (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron*, 25(2), 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80899-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80899-5)
- Pathak, A., & Carter, B. D. (2017). Retrograde apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *Neuronal Signaling*, 1(1), NS20160007. <https://doi.org/10.1042/NS20160007>
- Pathak, A., Clark, S., Bronfman, F. C., Deppmann, C. D., & Carter, B. D. (2020). Long-distance regressive signaling in neural development and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, April, 1–22. <https://doi.org/10.1002/wdev.382>
- Pathak, A., Stanley, E. M., Hickman, F. E., Wallace, N., Brewer, B., Li, D., Gluska, S., Perlson, E., Fuhrmann, S., Akassoglou, K., Bronfman, F., Casaccia, P., Burnette, D. T., & Carter, B. D. (2018). Retrograde Degenerative Signaling Mediated by the p75 Neurotrophin Receptor Requires p150Glued Deacetylation by Axonal HDAC1. *Developmental Cell*, 46(3), 376–387.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.07.001>
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C. M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>
- Perlson, E., Jeong, G.-B., Ross, J. L., Dixit, R., Wallace, K. E., Kalb, R. G., & Holzbaur, E. L. F. (2009). A Switch in Retrograde Signaling from Survival to Stress in Rapid-Onset Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9903–9917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0813-09.2009>
- Pfeffer, S. R. (2017). Rab GTPases: Master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 28(6), 712–715. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-10-0737>
- Picard, B., Gagaoua, M., Micol, D., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Terlouw, C. E. M., Hosford, A. D., Hergenreder, J. E., Kim, J. K., Baggerman, J. O., Ribeiro, F. R. B., Anderson, M. J., Spivey, K. S., Rounds, W., Johnson, B. J., Korn, K. T., Lemenager, R. P., Claeys, M. C., Waddell, J. N., ... Chung, K. Y. (2014). Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential. *Journal of Animal Science*, 93(9), 757–766. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5962>
- Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.008>
- Ransduccion, S. I. T., Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). *TRK RECEPTORS : ROLES IN NEURONAL CONTENTS*. 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Renzis, S. De, Sönnichsen, B., & Zerial, M. (2002). *Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes*. 4(February). <https://doi.org/10.1038/ncb744>
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A., & Ginty, D. D. (1999). Mediation by a CREB Family Transcription Factor of NGF-Dependant Survival of Sympathetic Neurons. *Science*, 286(5448), 2358–2361. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2358>
- Riccio, Antonella, Pierchala, B. A., Ciarallo, C. L., & Ginty, D. D. (1997). An NGF-TrkA-Mediated Retrograde Signal to Transcription Factor CREB in Sympathetic Neurons An

- NGF-TrkA – Mediated Retrograde Signal to Transcription Factor CREB in Sympathetic Neurons. *Science*, 277(1997), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1097>
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., & Médecine, F. De. (2005). *Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes*. 122, 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., & Barde, Y. A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*, 4(4), 487–492. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90107-Q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90107-Q)
- Roux, P. P., & Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology*, 67(3), 203–233. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00016-3)
- Sadowski, L., Pilecka, I., & Miaczynska, M. (2009). Signaling from endosomes: Location makes a difference. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1601–1609. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.021>
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, 6(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>
- Saxena, S., Howe, C. L., Cosgaya, J. M., Hu, M., Weis, J., & Krüttgen, A. (2004). Differences in the surface binding and endocytosis of neurotrophins by p75NTR. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(2), 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.02.006>
- Schneider, A., & Simons, M. (2013). Exosomes: Vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell and Tissue Research*, 352(1), 33–47. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1428-2>
- Schweigreiter, R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *BioEssays*, 28(6), 583–594. <https://doi.org/10.1002/bies.20419>
- Scott-Solomon, E., & Kuruvilla, R. (2018). Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.013>
- Sharma, N., Deppmann, C. D., Harrington, A. W., St. Hillaire, C., Chen, Z. Y., Lee, F. S., & Ginty, D. D. (2010). Long-Distance Control of Synapse Assembly by Target-Derived NGF. *Neuron*, 67(3), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.018>
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., & Mellman, I. (1999). The receptors recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *Journal of Cell Biology*, 145(1), 123–139. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.123>
- Shooter, E. M. (1994). *Disruption of NGF Binding to the Low Affinity Neurotrophin Receptor p75NTR Reduces NGF Binding to TrkA on PC12 Cells*. 13, 203–215.
- Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Ozaki, S., Smeyne, R. J., Fagan, A. M., Barbacid, M., & Snider, W. D. (1995). Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 15(9), 5929–5942. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-09-05929.1995>
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Cell and Tissue Research*, 352(1), 33–47. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1428-2>
- Singh, K. K., & Miller, F. D. (2005). Activity regulates positive and negative neurotrophin-derived signals to determine axon competition. *Neuron*, 45(6), 837–845.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.049>
- Singh, K. K., Park, K. J., Hong, E. J., Kramer, B. M., Greenberg, M. E., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2008). Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nature Neuroscience*, *11*(6), 649–658. <https://doi.org/10.1038/nn.2114>
- Skeldal, S., Matusica, D., Nykjaer, A., & Coulson, E. J. (2011). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75NTR. *BioEssays*, *33*(8), 614–625. <https://doi.org/10.1002/bies.201100036>
- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., & Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, *368*(6468), 246–249. <https://doi.org/10.1038/368246a0>
- Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). *NERVE GROWTH FACTOR SIGNALING, NEUROPROTECTION, AND NEURAL REPAIR*.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., & Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *Journal of Cell Biology*, *149*(4), 901–913. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.901>
- Sönnichsen, B., Renzis, S. De, Nielsen, E., Rietdorf, J., & Zerial, M. (2000). *Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11*. *149*(4), 901–913.
- Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(9), 609–622. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>
- Sorkin, A., & Von Zastrow, M. (2002). Signal transduction and endocytosis: Close encounters of many kinds. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *3*(8), 600–614. <https://doi.org/10.1038/nrm883>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., & Zerial, M. (2014). *Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. April 1994*.
- Strasser, A., Connor, L. O., & Dixit, V. M. (2000). Poptosis ignaling. *Annual Review of Biochemistry*, *69*(0066-4154 LA-eng PT-Journal Article PT-Review PT-Review, Academic), 217–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.217>
- Tanaka, K., Kelly, C. E., Goh, K. Y., Lim, K. B., & Ibanez, C. F. (2016). Death Domain Signaling by Disulfide-Linked Dimers of the p75 Neurotrophin Receptor Mediates Neuronal Death in the CNS. *Journal of Neuroscience*, *36*(20), 5587–5595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4536-15.2016>
- Tcherpakov, M., Bronfman, F. C., Conticello, S. G., Vaskovsky, A., Levy, Z., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Arenas, E., & Fainzilber, M. (2002). The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(51), 49101–49104. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200533200>
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., & Hempstead, B. L. (2005).

- ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75 NTR and Sortilin*. 25(22), 5455–5463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- Tessarollo, L., Vogel, K. S., Palko, M. E., Reid, S. W., & Parada, L. F. (1994). Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 11844–11848. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11844>
- Toma, J. G., Rogers, D., Senger, D. L., Campenot, R. B., & Miller, F. D. (1997). Spatial regulation of neuronal gene expression in response to nerve growth factor. *Developmental Biology*, 184(1), 1–9. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8515>
- Troy, C. M., Friedman, J. E., & Friedman, W. J. (2002). Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons: Role of caspases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34295–34302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205167200>
- Ullrich, O., & Molecular, E. (1996). *Rab1 1 Regulates Recycling through the Pericentriolar Recycling Endosome*. 135(4), 913–924.
- Urbé, S.; Huber, L. A.; Zerial, M.; Tooze, S. A. and Parton, R. G. (1993). Rab 11, a small GTPase associated with both constitutive and regulatory secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.*, 334, 175–182.
- Ure, D. R., & Campenot, R. B. (1997). Retrograde Transport and Steady-State Distribution of 125 I-Nerve Growth Factor in Rat Sympathetic Neurons in Compartmented Cultures. *The Journal of Neuroscience*, 17(4), 1282–1290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-04-01282.1997>
- Urrea, S., Escudero, C. A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J. I., Zampieri, N., Chao, M. V., Annaert, W., & Bronfman, F. C. (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal  $\gamma$ -secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7606–7615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610458200>
- Vaillant, A. R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (1999). 3-Kinase – Akt Pathway to Synergistically Regulate Neuronal Survival. *Cell*, 146(5), 955–966.
- Vilar, M. (2017). Structural Characterization of the p75 Neurotrophin Receptor: A Stranger in the TNFR Superfamily. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 104, pp. 57–87). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.007>
- Villaseñor, R., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2016). Signal processing by the endosomal system. *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.002>
- von Bartheld, C. S., Williams, R., Lefcort, F., Clary, D. O., Reichardt, L. F., & Bothwell, M. (1996). Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75NTR and trkB receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(9), 2995–3008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622129> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2710111>
- Wandinger-Ness, A., & Zerial, M. (2014a). Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(11), a022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>
- Wandinger-Ness, A., & Zerial, M. (2014b). Rab Proteins and the Compartmentalization of the

- Endosomal System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(11), a022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>
- Wang, K. C., Kim, J. A., & Sivasankaran, R. (2002). *p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo*, *MAG and OMgp*. 420(November), 97–101.
- Weskamp, G., Schlöndorff, J., Lum, L., Becherer, J. D., Kim, T. W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G., & Blobel, C. P. (2004). Evidence for a Critical Role of the Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Convertase (TACE) in Ectodomain Shedding of the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR). *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4241–4249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307974200>
- Wurmser, A. E., Sato, T. K., & Emr, S. D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *Journal of Cell Biology*, 151(3), 551–562. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.551>
- Yamashita, T., & Tohyama, M. (2003). *The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI*. 461–467. <https://doi.org/10.1038/nn1045>
- Yamashita, T., Tucker, K. L., & Barde, Y. A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24(3), 585–593. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81114-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81114-9)
- Yano, H., Torkin, R., Martin, L. A., Chao, M. V., & Teng, K. K. (2009). Proneurotrophin-3 Is a Neuronal Apoptotic Ligand: Evidence for Retrograde-Directed Cell Killing. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2059-09.2009>
- Ye, H., Kuruvilla, R., Zweifel, L. S., & Ginty, D. D. (2003). Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron*, 39(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00266-6)
- Yeiser, E. C., Rutkoski, N. J., Naito, A., Inoue, J. i., & Carter, B. D. (2004). Neurotrophin Signaling through the p75 Receptor Is Deficient in *traf6*<sup>-/-</sup> Mice. *Journal of Neuroscience*, 24(46), 10521–10529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1390-04.2004>
- Yoon, S. O., Casaccia-Bonofil, P., Carter, B., & Chao, M. V. (1998). Competitive Signaling Between TrkA and p75 Nerve Growth Factor Receptors Determines Cell Survival. *J. Neurosci.*, 18(9), 3273–3281. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.42.30202>
- Zahari, E. E., Maimon, R., & Perlson, E. (2017). Spatial-specific functions in retrograde neuronal signalling. *Traffic*, 18(7), 415–424. <https://doi.org/doi:10.1111/tra.12487>
- Zampieri, N., Xu, C. F., Neubert, T. A., & Chao, M. V. (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by  $\alpha$ -secretase and  $\gamma$ -secretase requires specific receptor domains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 14563–14571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412957200>
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 107–117. <http://dx.doi.org/10.1038/35052055>
- Zhen, Y., & Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(17), 3171–3176. <https://doi.org/10.1242/jcs.166074>