

Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado "Investigación en Cáncer"

"Estudio funcional de los dominios del receptor

apoptótico DR6. Señalización y procesamiento"

TESIS DOCTORAL

Julián Iglesias Rodríguez JULIO 2016



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado "Investigación en Cáncer"

"Estudio funcional de los dominios del receptor

apoptótico DR6. Señalización y procesamiento"

TESIS DOCTORAL

Julián Iglesias Rodríguez JULIO 2016



Vicerrectorado de Organización Académica Universidad de Oviedo



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1 Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio funcional de los	Inglés: Functional study of the apoptotic DR6-
dominios del receptor apoptótico DR6.	receptor domains. Signaling and shedding
Señalización y procesamiento	

2 Autor				
Nombre: JULIAN IGLESIAS RODRIGUEZ	DNI/Pasaporte/NIE:			
Programa de Doctorado: Investigación en Cánce	r			
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA				

RESUMEN (en español)

El receptor de muerte 6 (DR6) es uno de los receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores del TNF (TNFRSF) que presenta un dominio de muerte en su región intracelular. DR6 presenta 4 dominios ricos en cisteína (CRD) en su región extracelular, dominios compartidos por los receptores de esta superfamilia. En la estructura del receptor también destacan una región espaciadora situada entre los CRDs y el dominio transmembrana y una larga cola citoplasmática de 150 aminoácidos situada a continuación del DD. A pesar de haber sido descrita la participación de DR6 en diferentes procesos celulares en los que induce la activación de las rutas de activación de NF-κB, JNK o la activación de caspasas, aún se desconocen muchos aspectos funcionales del receptor, como la formación de complejos de señalización tras su activación o el mecanismo que lleva al procesamiento y escisión de su región extracelular.

A pesar del aumento de estudios centrado en el receptor, se han identificado muy pocas proteínas que participen en las rutas de señalización activadas por DR6 y tan solo se ha descrito la interacción de DR6 con TRADD, participando conjuntamente en la activación de la ruta de NF-κB. Nuestros estudios muestran que TRADD también participa en la activación de las rutas de JNK y apoptosis activadas por DR6, sugiriendo un papel central de esta proteína en la señalización del receptor. Análisis de receptores carentes de DD revelaron que este dominio no es necesario para la señalización de DR6, por lo que analizamos el resto de regiones intracelulares del receptor para conocer su implicación en los procesos de señalización. De este modo, identificamos la región C-terminal de la cola citoplasmática de DR6 como la región a través de la cual el receptor desencadena todos los procesos de señalización. A diferencia de otras regiones intracelulares, la pérdida de los últimos 10 aminoácidos de la cola citoplasmática suponen la falta de funcionalidad de DR6, sugiriendo un papel secundario para el resto de dominios presentes.

Varios receptores de la TNFRSF sufren un procesamiento de su región extracelular mediado por diversas proteasas, incluido DR6. En el procesamiento de DR6 se ha descrito la participación de la MMP14, aunque se desconocen los detalles de cómo ocurre esta escisión. El estudio de este proceso revela la presencia de varios sitios de escisión en la región espaciadora de DR6 así como la necesidad de la presencia de glicosilaciones en esta región para que el procesamiento ocurra. Estos resultados, junto con los obtenidos en estudios anteriores, sugieren que el procesamiento de DR6 puede ocurrir mediante la participación de otras proteasas además de MMP14.

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente a DR6 en diferentes tipos celulares, generamos líneas celulares derivadas de células tumorales PC3 en las que se inhibió la expresión del receptor. Varios estudios han descrito la sobreexpresión de DR6 en células tumorales, lo que podría sugerir que el receptor ejerce un papel proliferativo en estas células. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la inhibición de la expresión de DR6 induce un aumento en la proliferación celular, indicando el carácter anti-proliferativo del receptor. Nuestro estudio muestra también una disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica cFLIP en las células con expresión reducida de DR6, lo que sugiere que, ante una sobreexpresión del receptor, las células tumorales responden con un aumento de la expresión de cFLIP para contrarrestar la acción antiproliferativa del receptor.

Finalmente, hemos iniciado el estudio de DR6 en células nerviosas, en las que se ha descrito la



Vicerrectorado de Organización Académica Universidad de Oviedo



capacidad del receptor para activar diferentes caspasas. Así, hemos puesto de manifiesto un aumento de la expresión de DR6 en células PC12 según se induce su diferenciación neuronal y se ha establecido un sistema de infección lentiviral en cultivos primarios neuronales para llevar a cabo la sobreexpresión ectópica del receptor.

RESUMEN (en Inglés)

Death Receptor 6 (DR6) is a Death Domain (DD) containing receptor which belongs to the TNF receptor superfamily (TNFRSF). In its extracellular region DR6 shows 4 Cysteine Rich Domains (CRD) which are common in TNFRSF. DR6 also presents a long stalk region between the CRDs and the transmembrane domain. In its intracellular region, DR6 contains a characteristic 150 aminoacids tail in addition to the DD. DR6 is known to be implicated in the activation of signaling pathways such as those leading to the activation of JNK, NF-κB or caspases dependent-apoptosis, and yet many functional facts of the receptor such as the formation of the signaling complexes or the molecular shedding mechanism are still unknown.

Despite the increase in the number of studies related to the receptor, only a few proteins from the DR6 signaling pathways have been identified. In fact, TRADD is the only protein known to bind to DR6, an interaction that leads NF-kB activation. Our studies show the implication of TRADD in the DR6-mediated activation of JNK and the apoptotic pathway, suggesting a central role of this protein in the signaling of the receptor. The analysis of DD-lacking receptors revealed that this domain appears not to be required for DR6 signaling. Therefore we have studied the implication of other intracellular receptor regions in receptor signaling. We have identified that de C-terminus cytoplasmic tail of DR6 appears essential for DR6 to trigger any signaling pathway. Thus, the loss of the most C-terminal10 amino acids of the cytoplasmic tail results in a lack of DR6 signaling, suggesting a minor role for any other domain in receptor signaling.

Some TNFRSF receptors, including DR6, undergo shedding of their extracellular region as an important mechanism to regulate their activity. This shedding is mediated by different proteases. There are indications that the protease involved in DR6 shedding might be MMP14, but the details of this process are unknown. Our studies reveal the presence of more than a single cleavage site within the stalk region of the receptor and that receptor glycosylation appears essential. Our findings suggest that, besides MMP14 implication, other proteases might be implicated in DR6 shedding.

In order to be able to study the functions of DR6 in different cell types, we have established a set of PC3-derived cell lines in which DR6 expression is inhibited. Although DR6 has the potential of activating the apoptotic pathway, its expression is high in some tumor cells, suggesting that the receptor has a proliferative role. In our studies, however, the inhibition of DR6 expression in these PC3-derived cells increases their proliferation rate, indicating a anti proliferative role of the receptor. This coincides with a downregulated expression is a mechanism to counteract the antiproliferative action of DR6. We have initiated studies of DR6 in nervous cells, in which DR6 activates different caspases. We show that as PC12 cells undergo neuronal differentiation there is an increase of DR6 expression. We have also designed a lentiviral infection system for neuronal primary cultures to perform ectopic overexpression of the receptor.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una Tesis Doctoral no es una labor individual, aunque tan solo aparezca una firma en la autoría de la misma. En esta Tesis han participado muchas personas de un modo u otro para que, al final, todo el trabajo de estos pasados años haya llegado hasta aquí. Por ello, considero más que oportuno mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera mostrar mi agradecimiento al Dr. Sánchez Lazo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por dirigir esta Tesis Doctoral, permitiéndome así ingresar en esa gran familia que formamos todos los que hemos trabajado bajo su supervisión. Por ello, también quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ramos González, Sofía, sin la cual esta gran familia nunca hubiese sido lo que es hoy.

Gracias al grupo, gracias a todas las personas que han pasado por el laboratorio y han hecho que mi labor investigadora fuese posible. Gracias a todos, porque cada uno de vosotros ha colaborado con sus aportaciones a modelar el laboratorio en el he trabajado durante estos últimos años. Tengo que estar especialmente agradecido a aquellos con los que trabajé codo con codo, porque con ellos compartí momentos de duda, de aprendizaje y algún que otro momento de desesperación, pero también buenos momentos de compañerismo, amistad y diversión.

Quisiera agradecer también a la Dra. Luthie-Carter la oportunidad que me ha dado acogiéndome en su laboratorio durante mi estancia pre-doctoral, así como a todo su grupo por los conocimientos compartidos y los buenos momentos vividos.

Muchas gracias al personal de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo por su colaboración y enseñanzas, especialmente a los responsables de las Unidades de Citometría, Secuenciación y Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes.

No puedo olvidar dar las gracias a todos los amigos que me han acompañado durante estos años, tanto los que he conocido dentro de la Universidad como fuera de ella, así como los amigos de siempre. Gracias a todos por recordarme que hay vida más allá del laboratorio y por estar ahí, que sé que muchas veces no es fácil aguantar a un doctorando cuando hay plazos que cumplir...

Por último, quisiera dedicar unas palabras de agradecimiento a mi familia, a mi hermana, mis abuelos, mis tíos, pero especialmente a mis padres. Ellos son los máximos responsables de que yo haya llegado hasta aquí, ellos son los que han hecho posible con todos sus esfuerzos que pueda culminar mi formación académica, a ellos no me basta con darles las gracias, a ellos se lo debo.

P.D.: Gracias a mi hermana Elena también por el diseño de la portada de la Tesis :)

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS			
1. INTRODUCCIÓN			
1.1.	Las superfamilias proteicas TNFSF y TNFRSF	1	
1.2.	Clasificación de los TNFRs	3	
1.3.	Señalización de los TNFRs	4	
	1.3.1. Ruta de señalización de MAPKs	5	
	1.3.1.1. JNK	6	
	1.3.1.2. р38 МАРК	8	
	1.3.1.3. ERK	8	
	1.3.2. Ruta de señalización de NF-κB	9	
	1.3.2.1. Vías de activación de NF-κB	9	
	1.3.3. Inducción de muerte celular	11	
	1.3.3.1. Las caspasas	12	
	1.3.3.2. La apoptosis extrínseca	12	
1.4.	1.4. Papel biológico de los TNFRs		
	1.4.1. Inflamación y sistema inmune	14	
	1.4.2. Regulación tisular	15	
	1.4.3. TNFRs y cáncer	16	
1.5.	El receptor de muerte 6	17	
	1.5.1. Estructura de DR6	18	
	1.5.2. Rutas de señalización activadas por DR6	21	
	1.5.3. Papel biológico de DR6	22	
	1.5.3.1. DR6 en el sistema nervioso	23	
	1.5.3.2. DR6 en el sistema inmune e inflamatorio	25	
	1.5.3.3. DR6 y cáncer	27	

2. OBJETIVOS

29

3.	MAT	FERIALES			
	3.1.	Células y condiciones de cultivo			
		3.1.1. Líneas celulares	30		
		3.1.2. Cultivos primarios	30		
		3.1.3. Materiales de cultivo	30		
	3.2.	Plásmidos	31		
	3.3.	Oligonucleótidos	32		
	3.4.	Anticuerpos	34		
	3.5.	Partículas virales	35		
	3.6.	Otros materiales y reactivos	35		
4.	MÉT	ODOS	37		
	4.1.	. Obtención y purificación de DNA plasmídico			
		4.1.1. Transformación de E. Coli con DNA plasmídico	37		
	4.2.	Extracción de RNA y DNA genómico	37		
		4.2.1. Extracción de RNA y transcripción reversa	37		
		4.2.2. Extracción de DNA genómico	38		
	4.3.	Análisis PCR	38		
		4.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa	38		
		4.3.2. PCR cuantitativa	39		
	4.4.	Generación de receptores mutantes derivados de DR6	40		
	4.5.	Transfección transitoria de células eucariotas	41		
	4.6.	Análisis western blot	41		
		4.6.1. Preparación de extractos	41		
		4.6.2. Electroforesis y electrotransferencia	41		
		4.6.3. Incubación con anticuerpos	42		
		4.6.4. Escaneado por infrarrojos	42		

	4.7.	Inmunofluorescencia	42
	4.8.	Ensayo de activación de la ruta de JNK	43
		4.8.1. Fosforilación de c-Jun	43
		4.8.2. Actividad transcripcional de AP-1	44
	4.9.	Ensayo de activación de la ruta de NF-κB	44
	4.10.	Análisis de la inducción de muerte celular	45
		4.10.1. Cuantificación de la población celular hipodiploide	45
		4.10.2. Estudio de marcadores de muerte celular	45
	4.11.	Generación de líneas celulares con expresión	
		estable de shRNAs para inhibir la expresión de DR6	46
	4.12.	Electroforesis bidimensional	47
		4.12.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque	48
		4.12.2. Segunda dimensión o SDS-Page	48
		4.12.3. Tinción de geles	48
	4.13.	Espectrometría de masas MALDI-ToF	48
		4.13.1. Preparación de las muestras	49
		4.13.2. Análisis de las muestras	49
	4.14.	Análisis de proliferación celular	50
	4.15.	Sistema de expresión ectópica en cultivos primario	50
5.	RESU	ILTADOS	52
	5.1.	Interacción de DR6 con proteínas adaptadoras	52
		5.1.1. Interacción de DR6-TRADD en la ruta de señalización de JNK	52
		5.1.2. Interacción DR6-TRADD en la inducción de muerte celular	53
	5.2.	Análisis de la estructura primaria de los dominios de DR6	56
	5.3.	Estudio de la funcionalidad de los dominios	
		intracelulares de DR6	60
		5.3.1. Generación de receptores mutantes	61

		5.3.2. An	álisis funcional de las regiones intracelulares de DR6	64
		5.3.2.1	L. Capacidad de activación de la ruta de señalización de JNK	64
		5.3.2.2	2. Capacidad de activación de la ruta de señalización de NF-K	B 67
		5.3.2.3	3. Capacidad de inducción de muerte celular	69
	5.4.	Estudio del	procesamiento de DR6	75
		5.4.1. Ide	entificación de los sitios de procesamiento	
		ext	racelulares de DR6	79
	5.5.	Estudio de	la inhibición de la expresión de DR6	83
		5.5.1. Est	ablecimiento de líneas celulares estables A549 DR6 ^{Neg}	85
		5.5.2. Est	ablecimiento de líneas celulares PC3 DR6 ^{Neg}	86
		5.5.3. Efe	ecto de la inhibición de DR6 en la biología celular	88
	5.6.	Modelos ce	elulares para el estudio de DR6 en el sistema	
		neurológico	ט	90
		5.6.1. Cé	lulas PC12	91
		5.6.2. Cu	ltivos primarios neuronales	92
6.	DISC	USIÓN		94
	6.1.	Interacción	con proteínas adaptadoras	94
	6.2.	Funcionalic	lad de las regiones intracelulares de DR6	95
	6.3.	Regiones e	xtracelulares y procesamiento de DR6	100
	6.4.	Nuevos mo	delos celulares para el estudio de DR6	102
7.	CON	CLUSIONES		105
8.	BIBL	IOGRAFÍA		106

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

7-AAD	7-amino-actinomicina D
ADAM	Disentegrina y metaloproteasa
AP-1	Proteína activadora 1
APAF-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ASK	Quinasa estimulante de la señal apoptótica
ATCC	Colección americana de cultivos
ATP	Adenosín trifosfato
BAFF	Factor activador de células B
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proto-oncogén de linfoma de células B
Bid	Proteína agonista de muerte con dominio de interacción BH3
BSA	Seroalbúmina bovina
CD40L	Ligando de CD40
cDNA	DNA complementario
Células NK	Células Natural Killer
CoIP	Análisis de coinmunoprecipitación
CRD	Dominio rico en cisteínas
DAPI	4´,6-diamino-2-fenilindol
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DcR	Receptor señuelo
DD	Dominio de muerte
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DIABLO	Proteína de unión directa a IAP con bajo pl
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Medio EAGLE modificado por Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ERK	Proteína quinasa regulada extracelularmente
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte de Fas
FBSi	Suero fetal bovino inactivado

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutatión S-transferasa
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
ΙκΒ	Proteína inhibidora de NF-κB
lg	Inmunoglobulina
IKK	Quinasa de IĸB
IL	Interleuquina
IP	loduro de propidio
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
JNK	Quinasa del extremo amino de c-Jun
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
LB	Medio de cultivo lisogénico
LPS	Lipopolisacárido
МАРК	Protéina quinasa activada por mitógenos
МКК	Quinasa de MAPK
МККК	Quinasa de MKK
NEMO	Modulador esencial de NF-κB
NF-κB	Factor nuclear ĸB
NIK	Quinasa inductora de NF-кВ
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PEI	Polietilenimina
рІ	Punto isoeléctrico
PLAD	Dominio de asociación previa a la unión del ligando
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro

PSA	Persulfato amónico
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RANK	Receptor activador de NF-ĸB
RANKL	Ligando de RANK
RIP	Proteína inhibidora del receptor
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SMAC	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
TACE	Enzima conversor del TNF
TAE	Tris acetato EDTA
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino con 0,1% de Tween 20
TEMED	N,N,N,N-tetrametilendiamina
TIM	Motivo de interacción con proteínas TRAF
TLR	Receptor Toll-like
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del TNF
TNFRSF	Superfamilia de receptores del TNF
TNFSF	Superfamilia del TNF
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada al TNFR1
TRAF	Factor asociado a los receptores del TNF
TWEAK	Inductor débil de apoptosis relacionado con el TNF
WB	Análisis Western-Blot

INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Las superfamilias proteicas TNFSF y TNFRSF

El factor de necrosis tumoral, o TNF, fue descrito por primera vez por el grupo de O'Malley al comprobar que su inducción estaba mediada por el lipopolisacárido LPS, que había sido descrito previamente por el grupo de Shear. De esta manera, O'Malley y col. identificaron el TNF como la citoquina responsable de la regresión tumoral observada previamente en los tratamientos con LPS. Conocido originalmente como factor necrotizante tumoral, debe su nombre actual a los trabajos de Old y col. en B-linfoblastos, mientras que en linfocitos se identificó una citoquina diferente pero con la misma funcionalidad que el TNF, siendo denominada por el grupo de Granger como linfotoxina o LT (Shear 1943; O'Malley, Achinstein et al. 1963; Williams and Granger 1968; Carswell, Old et al. 1975). La posterior purificación, secuenciación y clonación del TNF y de la LT, por el grupo de Aggarwal, reveló la relación entre ambas citoquinas (30% de identidad aminoacídica) y puso en evidencia la existencia potencial de una superfamilia de proteínas. Al mismo tiempo, se renombraron ambas proteínas, considerando al TNF como TNF- α y a la LT como TNF- β , pues las dos compartían receptores en la membrana celular (Aggarwal, Moffat et al. 1984; Gray, Aggarwal et al. 1984; Pennica, Nedwin et al. 1984; Aggarwal, Eessalu et al. 1985; Aggarwal, Henzel et al. 1985).

Actualmente, la superfamilia del TNF (TNFSF) está formada por 18 genes que codifican 19 proteínas diferentes, siendo en su mayoría proteínas transmembrana de tipo II, es decir, con su extremo N-terminal en la región intracelular y el extremo C-terminal en la extracelular. Parte de estas proteínas presentan además sitios de procesamiento proteolítico que generan una fracción proteica soluble y biológicamente activa. Las proteínas de esta familia comparten un dominio en su región C-terminal que las caracteriza y que se denomina Dominio de Homología del TNF (THD, *TNF homology domain*), compartiendo entre ellas un 20-30% de homología (Locksley, Killeen et al. 2001; Bodmer, Schneider et al. 2002).

La identificación y caracterización del TNF condujo, a su vez, a la identificación de los receptores de membrana con los que interactúa, TNFR1 y TNFR2 (Brockhaus, Schoenfeld et al. 1990). A partir de estos primeros receptores se identificó el resto de miembros de lo que conformaría la superfamilia de receptores del TNF (TNFRSF) (Wiens and Glenney 2011). Esta superfamilia proteica está representada por 29 miembros en humanos (Tabla 1.1), en su mayoría proteínas de tipo I, es decir, con el extremo N-terminal en la región extracelular y el C-terminal en

la intracelular. Todos los miembros de esta superfamilia se caracterizan por presentar en sus regiones extracelulares entre 1 y 6 dominios ricos en cisteína o CRD (*Cysteine rich domain*), a través de los cuales los receptores interactúan entre sí y/o con sus correspondientes ligandos (Bodmer, Schneider et al. 2002; Hehlgans and Pfeffer 2005).

Nombre	Alias	Cromosoma	Nombre	Alias	Cromosoma
TNFRSF1A	TNFR1, TNF-R, DR1	12p13.2	TNFRSF11B	OPG, TR1	8q24
TNFRSF1B	TNFR2, p75	1p36.22	TNFRSF12A	TweakR	16p13.3
TNFRSF3	LT-βR	12p13	TNFRSF13B	TACI	17p11.2
TNFRSF4	OX40, TXGP1L	1p36	TNFRSF13C	BAFFR	22q13.1-q13.3
TNFRSF5	CD40, p50	20q12-q13.2	TNFRSF14	HVEM, LIGHTR	1p36.32
TNFRSF6	FAS, APO-1, DR2	10q24.1	TNFRSF16	NGFR, p75 ^{NTR}	17q21-q22
TNFRSF6B	DcR3, TR6	20q13.33	TNFRSF17	BCMA,TNFRSF13A	16p13.1
TNFRSF7	CD27	12p13	TNFRSF18	GITR, AITR	1p36.3
TNFRSF8	CD30, KI-1	1p36	TNFRSF19	TROY, TRADE	13q12.11-q12.3
TNFRSF9	ILA, CD137, 4-1BB	1p36	TNFRSF19L	RELT	11q13.2
TNFRSF10A	DR4, Apo2, TRAILR-1	8p21	TNFRSF21	DR6, CD358	6p21.1
TNFRSF10B	DR5, TRAILR2	8p22-p21	TNFRSF25	DR3, APO-3	1p36.2
TNFRSF10C	DcR1, TRAILR3	8p22-p21	TNFRSF27	EDAR2R, XEDAR	Xq11.1
TNFRSF10D	DcR2, TRAILR4	8p21	EDAR	ED3, DL	2q13
TNFRSF11A	RANK, PDB2	18q22.1			

Tabla 1.1: Los miembros de la superfamilia de TNFRs presentes en humanos. En la tabla se muestra el nombre de cada receptor, junto con alguno de sus nombres alternativos y el cromosoma en el que se localizan. Información extraída de la base de datos del HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Comitee*).

Los miembros de la TNFS y la TNFRSF forman diferentes complejos receptor ligando, siendo habitual la formación de trímeros de los ligandos, biológicamente activos, previamente a su unión con los correspondientes trímeros de receptores, formándose un complejo hexamérico ligandoreceptor (Banner, D'Arcy et al. 1993; Chan 2007). Sin embargo, tanto ligandos como receptores también pueden interaccionar con miembros de otras familias proteicas diferentes (Idriss and Naismith 2000).

1.2.-Clasificación de los TNFRs

Los miembros de la TNFRSF pueden clasificarse atendiendo a diferentes factores. De este modo, una clasificación en función de la estructura de sus CRDs permite la agrupación de los receptores en 3 conjuntos que atienden a diferencias en el desarrollo evolutivo de estos dominios y la capacidad de los receptores para interaccionar con sus correspondientes ligandos (Magis, van der Sloot et al. 2012). Sin embargo, la clasificación de los TNFRs más habitual se realiza en 3 grupos atendiendo a las características de sus correspondientes regiones intracelulares, por lo que cada grupo presenta diferentes posibilidades de funcionamiento citoplasmático (Dempsey, Doyle et al. 2003):

- Receptores de muerte (DR, Death receptor): Los receptores dentro de este grupo se caracterizan por presentar un dominio intracelular de unos 60-80 kDa denominado dominio de muerte (DD, Death Domain), a través del cual interactúan con diferentes proteínas que presentan este mismo dominio, como son TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1associated Death Domain) o FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). A través de la interacción con estas proteínas, los receptores de este grupo son capaces de inducir la activación de apoptosis celular, aunque la interacción con TRADD puede reclutar otras proteínas, como TRAF1, TRAF2 y RIP, para activar otras rutas de señalización. Como excepción, el receptor EDAR presenta un DD que interaccionada con la proteína adaptadora EDARADD pero no con FADD ni con TRADD, siendo incapaz de inducir procesos apoptóticos (Yan, Zhang et al. 2002). Adicionalmente, los DRs pueden presentar intracelularmente otros dominios diferentes del DD para la interacción con diferentes proteínas adaptadoras. Las diferencias funcionales de los receptores de este grupo, pese a compartir todos ellos el mismo dominio, permite su sub-división en receptores principalmente involucrados en procesos de desarrollo (EDAR, p75^{NTR} y DR6) y receptores involucrados principalmente en la respuesta inmune (DR3, DR4, DR5, FAS y TNFR1) (Sessler, Healy et al. 2013).
- Receptores sin dominio de muerte: Estos receptores carecen de DD pero presentan otros dominios intracelulares mediante los cuales interaccionan con diferentes proteínas, como los dominios TIM (*TRAF interacting motifs*), a través de los cuales interaccionan con la familia de proteínas TRAF (*TNF receptor-associated factor*) y activan diferentes rutas de señalización, como la ruta de NF-κB o JNK. En este grupo se encuentran receptores como TNFR2 o RANK, entre otros.

 Receptores señuelo (DcR, Decoy Receptor): En este grupo se encuentran los receptores que presentan una región intracelular truncada y aquellos que carecen de ella, por lo que estos receptores son incapaces de activar cualquier tipo de señalización intracelular, ejerciendo una función reguladora del resto de receptores, pues comparten sus ligandos con otros receptores. Pertenecen a este grupo receptores como TRAILR3 o TRAILR4.

1.3.- Señalización de los TNFRs

La activación de los TNFRs está habitualmente mediada por su trimerización, la cual se consigue mediante unión de sus respectivos ligandos, aunque también puede lograrse por agregación mediante el uso de anticuerpos o mediante la sobreexpresión de los receptores. Sin embargo, también se han descrito receptores formando trímeros en la membrana celular sin adquirir un estado de activación, unidos mediante un dominio PLAD (*Pre-ligand Assembly Domain*), normalmente localizado en primer CRD de los receptores. En estos receptores pre-trimerizados, la unión del ligando produce un cambio conformacional en ellos que induce su activación (Chan 2000; Chan, Chun et al. 2000; Reis, van Assen et al. 2011). Sin embargo, otros receptores forman complejos con diferente estequiometria, como en el caso del receptor p75NTR, que es capaz de interaccionar con su ligando formando un complejo dimérico (Gong, Cao et al. 2008).

Los TNFRs no presentan actividad enzimática propia por lo que al activarse interactúan con diferentes proteínas citoplasmáticas adaptadoras, formando diferentes complejos de señalización que son los que median en la activación final de las diferentes rutas en las que participan. Estas proteínas adaptadoras pueden clasificarse principalmente en dos grupos: proteínas adaptadoras con DD y proteínas TRAF (Dempsey, Doyle et al. 2003).

- Proteínas adaptadoras con DD: tales como FADD y TRADD, interaccionan con los DR a través de los DD de éstos. FADD es capaz de inducir la activación de la ruta apoptótica directamente a través de un dominio DED (*Death Effector Domain*), a través del cual interacciona con las pro-caspasas 8 y 10 formando un complejo denominado DISC. La proteína TRADD hace de mediadora entre la unión de ciertos DRs y FADD para activar para formar el complejo DISC y la inducción de apoptosis, aunque también es capaz de formar otros complejos de señalización para activar la ruta de señalización de NF-κB (Sessler, Healy et al. 2013; Riley, Malik et al. 2015).
- Proteínas TRAF: son una familia de proteínas, constituida por 7 miembros en humanos, que interaccionan con los TNFRs y con receptores de otras familias proteicas para formar complejos de señalización a través de los cuales activan y regulan las rutas de NF-κB y de las

MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Las proteínas TRAF se caracterizan por presentar en su extremo carboxilo un dominio TRAF y en el amino un dominio RING (*Really Interesting New Gene*), además de varios de dedos de zinc localizados entre ambos, a través de los cuales forman los complejos de señalización en torno a los TNFRs (Chung, Park et al. 2002; Pineda, Ea et al. 2007; Cabal-Hierro, Rodriguez et al. 2014).

Uno de los procesos reguladores de la señalización de los TNFRs es el procesamiento de su región extracelular por la acción de proteasas, tales como TACE, liberándose al medio extracelular su forma soluble. Receptores como TNFR1, TNFR2, RANK, p75^{NTR} o CD27 sufren este procesamiento, inhibiendo directamente la capacidad del receptor para activarse debido al truncamiento sufrido o mediante competencia por los ligandos de la forma soluble con la forma anclada a membrana, tal y como ocurre con los DcRs (Lantz, Gullberg et al. 1990; Gruss and Dower 1995; Weskamp, Schlondorff et al. 2004; Hakozaki, Yoda et al. 2010).



Figura 1.1: Señalización clásica de los TNFRs. La interacción de los dominios extracelulares de los TNFRs con sus respectivos ligandos, la unión específica de determinados anticuerpos o la sobreexpresión de los receptores, induce la trimerización y activación de los TNFRs en la membrana plasmática. Con su activación, los TNFRs reclutan en su dominio citoplasmático diferentes proteínas adaptadoras, siendo las proteínas TRAF, FADD o TRADD las principales mediadoras de la interacción con los receptores y las diferentes cascadas de señalización. Estas proteínas forman diferentes complejos de señalización que son los responsables finales de la activación de una u otra ruta de señalización, entre las que destacan la inducción de apoptosis celular, la activación del factor de transcripción NF-κB y la activación de las MAPKs, especialmente JNK.

1.3.1.-Ruta de señalización de MAPKs

Las proteín-quinasas activadas por mitógenos, o MAPKs, constituyen una familia proteica muy conservada evolutivamente que media entre los receptores de membrana y la expresión y activación de proteínas reguladoras críticas para el mantenimiento celular. En mamíferos, las MAPKs convencionales pueden clasificarse en 4 sub-grupos proteicos: JNKs (*Jun N-terminal* *Kinases*), p38 MAPKs, ERKs (*Extracellular Regulated Kinases*) y ERK5. Además de éstas, existen también MAPKs atípicas que se agrupan en otros 3 sub-grupos. De todos ellos, los grupos mejor caracterizados y en cuya activación participan los TNFRs son los que comprenden las JNK, p38 MAPKs y las ERKs, estando solamente las ERKs activadas por mitógenos, mientras que las JNKs y p38 MAPKs son activadas ante la respuesta a citoquinas proinflamatorias y situaciones de estrés celular (Johnson and Lapadat 2002; Cargnello and Roux 2011). Las rutas de señalización activadas por las diferentes MAPKs están directamente relacionadas, de forma que la activación de una de ellas es capaz de inhibir la activación del resto (Fey, Croucher et al. 2012).

La activación de las MAPKs implica la fosforilación de éstas en su dominio catalítico, siendo reguladas por una compleja cascada de señalización que implica las proteínas MKKs (*MAPK kinases*), que son las quinasas que fosforilan directamente las MAPKs, y las MKKKs (*MKK kinases*), que son las quinasas encargadas de fosforilar y activar a las MKKs. A su vez, la activación de las MAPKs está regulada negativamente por la acción de las fosfatasas MKP (*MAPK phosphatase*). Las MAPKs activadas fosforilan residuos de serina y treonina de diversas dianas moleculares, incluyendo otras proteín-quinasas y factores de transcripción. Esta fosforilación se lleva a cabo mediante el reconocimiento de la secuencia Thr-X-Tyr, siendo el aminoácido central un residuo de Glu para las ERKs, Pro para las JNKs y Gly para las p38 MAPKs (Morrison and Davis 2003; Karin and Gallagher 2005; Lee, Kim et al. 2016).

La activación de esta ruta de señalización por parte de los TNFRs depende principalmente de su interacción con TRAF2 y las proteínas cIAP1 y cIAP2, aunque TRAF3 y TRAF6 también pueden participar en la formación del complejo de señalización. Este complejo puede a su vez interaccionar con las MKKKs (MEKK1, TAK1 y ASK), responsables principales de la activación de las rutas de JNK y p38 MAPK, o activar a Tpl2, responsable de la ruta de ERK (Takaesu, Kishida et al. 2000; Sabio and Davis 2014; Sui, Kong et al. 2014).

1.3.1.1.-JNK

Las proteínas pertenecientes al subgrupo de JNKs están codificadas por los genes JNK1, JNK2 y JNK3, los cuales pueden dan lugar a 10 proteínas diferentes (Gupta, Barrett et al. 1996). Aunque originalmente fueron identificadas como quinasas activadas en respuesta a procesos de estrés, las JNKs son activadas en respuesta a una gran diversidad de estímulos. El tipo celular y el origen del estímulo inducen la activación de diferentes rutas de señalización con diferentes MKKKs implicadas, que convergen en la activación de MKK4 y MKK7, las MKKs finalmente responsables de la activación de las diferentes proteínas JNK (Krishna and Narang 2008).

6



Figura 1.2: Activación de las diferentes MAPKs por los TNFRs. La activación de los receptores induce la formación de un complejo de señalización en torno a sus dominios intracelulares formado por proteínas TRAFs, que median la interacción entre los TNFRs y proteínas cIAPs y diferentes MKKKs en función del estímulo y del tipo de receptor. De esta forma, el reclutamiento de TAK1 o ASK induce su activación y con ello la fosforilación de las MKKs implicadas en la activación de JNK y p38 MAPK. La activación de ERK por parte de los TNFRs se produce mediante la activación de la quinasa Tpl2, la cual se encuentra inhibida en el citoplasma por p105. La ubiquitinación y degradación de p105 permite queTpl2 fosforile las MKK implicadas en la activación de ERK.

La activación de JNK produce su translocación al núcleo celular para, una vez allí, fosforilar diversos factores de transcripción y receptores hormonales nucleares (Mizukami, Yoshioka et al. 1997). Entre los sustratos de las proteínas JNK, el más importante es c-Jun, el cual es una de las posibles subunidades que forman parte del dímero del factor de transcripción AP-1 (Bogoyevitch, Ngoei et al. 2010). A su vez, AP-1 es un heterodímero que está formado por proteínas de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD), proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2), proteínas ATF (ATD2, B-ATF, JDP-1 y JDP-2) y proteínas Maf (cMaf, MafB, MafA, Maf G-F-K), siendo las familias de proteínas Jun y Fos las principales y cJun el activador transcripcional más potente (Ryseck and Bravo 1991). Por tanto, la fosforilación de c-Jun por parte de JNK produce un aumento de la actividad transcripcional de AP-1, el cual está implicado en la regulación de diversos genes (Shaulian and Karin 2002). Por otro
lado, JNK también es capaz de fosforilar otros factores de transcripción, como ATF-2 o p53, y otros sustratos no nucleares, como proteínas adaptadoras, proteínas de andamiaje celular o proteínas de la membrana mitocondrial externa, como proteínas de la familia Bcl-2 (Bogoyevitch and Kobe 2006).

La respuesta celular ante la activación de JNK no solo depende de la capacidad de esta quinasa para fosforilar sus sustratos, sino que depende de la duración y magnitud del estímulo activador. De esta forma, un estímulo prolongado puede inducir la apoptosis celular a través de la activación prolongada de JNK, mientras que un estímulo transitorio estimulará una respuesta de proliferación y supervivencia celular (Chen and Tan 2000; Shaulian and Karin 2002; Cao, Zeng et al. 2013).

1.3.1.2.-p38 MAPK

Las p38 quinasas, cuya isoforma principal es p38α, son MAPKs activadas en respuesta a estrés ambiental y citoquinas proinflamatorias (Han, Lee et al. 1994). La activación de p38α ocurre tras su fosforilación por las quinasas MKK3 y MKK6, aunque también se ha descrito la participación de MKK4, relacionándose de esta forma con la ruta de JNK (Brancho, Tanaka et al. 2003). Las p38 MAPKs son activadas principalmente en células del sistema inmune, regulando, mediante la fosforilación de sus sustratos, procesos de inflamación, diferenciación o muerte celular (Sui, Kong et al. 2014).

1.3.1.3.-ERK

Las quinasas ERK están presentes en mamíferos como dos isoformas, ERK1 o p42 y ERK2 o p44, cuya expresión se produce en todos los tejidos. Estas MAPK son activadas en respuesta a factores mitógenos, pero también responden ante la activación de receptores asociados a proteínas G, citoquinas y situaciones de estrés celular. En la ruta de señalización de estas MAPKs la proteína más importante es Raf la cual activa por fosforilación a las proteínas MKK1 y MKK2 o MEK1 y MEK2 (*MAPK ERK Kinases*), que son las responsables de la fosforilación y activación de ERK. En la activación de esta ruta por los TNFRs el papel de la proteína Raf lo ejerce principalmente la proteína Tpl2, que forma el complejo citoplasmático Tpl2/p105/ABIN-2 en ausencia de activación. En respuesta a un estímulo que active este ruta de señalización, p105 es fosforilado, ubiquitinizado y degradado por la acción del complejo IKK (ver apartado 1.3.2) y de la proteína de unión de ubiquitina ABIN-2, permitiendo que Tpl2 fosforile a MEK1/MEK2 y éstas a ERK1/2. Debido a la gran cantidad de sustratos de las proteínas ERK1/2, estas proteínas son capaces de regular procesos muy

diferentes, como proliferación, diferenciación o apoptosis celular (Das, Cho et al. 2005; Sturm, Orton et al. 2010; Gantke, Sriskantharajah et al. 2012; Lavoie and Therrien 2015).

1.3.2.-Ruta de señalización de NF-κB

El factor de transcripción NF-κB, identificado por su interacción con un elemento intensificador del gen de la cadena κ de las inmunoglobulinas en células B (Sen and Baltimore 1986), es un factor nuclear que presenta una expresión ubicua y que está formado por dímeros de proteínas de la familia NF-κB/Rel en su estado activo, la cual es una familia proteica formada por 5 miembros: NF-κB1 (p50 y su precursor p105), NF-κB2 (p52 y su precursor p100), c-Rel, RelA (p65) y RelB. Todos los miembros de la familia NF-κB/Rel se caracterizan por presentar un dominio RHR (*Rel Homology Region*) en su región N-terminal a través del cual median su translocación nuclear y su interacción con el DNA, además de su interacción con proteínas inhibidoras y su dimerización. Por su parte, c-Rel, RelA y RelB presentan un dominio de activación que participa en la regulación transcripcional, mientras que p50 y p52 carecen de él (afectando así el emparejamiento de los dímeros a su actividad transcripcional) (Karin 2006; Gilmore and Wolenski 2012).

Cuando esta ruta de señalización no está activada, NF-κB se encuentra retenido en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras IκB que ocultan la señal de translocación nuclear de los dímeros por medio de dominios tipo anquirina (dominios que también presentan los precursores p105 y p100). Ante un estímulo activador de esta ruta, se produce la fosforilación y degradación de estos inhibidores (Hayden and Ghosh 2008; Kamata, Tsuchiya et al. 2010).

1.3.2.1.-Vías de activación de NF-κB

La activación de NF-ĸB se produce cuando las señales de translocación al núcleo celular quedan expuestas, pudiendo diferenciarse dos vías diferentes para ello, comúnmente llamadas vía clásica y vía alternativa de activación de NF-ĸB. El tipo de estímulo, las quinasas implicadas en la fosforilación de las proteínas inhibidoras y las subunidades que conforman el dímero NF-ĸB implicarán la activación de una u otra vía (Bonizzi and Karin 2004). A su vez, ambas rutas pueden ser activadas por distintos miembros de la superfamilia de TNFRs (Rickert, Jellusova et al. 2011).

En la vía clásica, los heterodímeros predominantes son los formados por las parejas RelA/p50 y c-Rel/p50, mientras que la fosforilación de las proteínas inhibidoras IκB se produce a través del complejo IKK. Este complejo, cuya activación es dependiente de TRAF2 y/o RIP1, está formado por las subunidades catalíticas IKKα e IKKβ y la subunidad reguladora IKKγ, también conocida como NEMO (*NF-κB Essential Modulator*). Ante la ausencia de estímulo, la proteína IκBα enmascara la señal de importación nuclear de RelA y expone su propia secuencia de exportación nuclear, manteniendo los dímeros RelA/p50 en el citoplasma. Con la activación de los TNFRs se produce el reclutamiento en sus regiones intracelulares de las proteínas RIP1 y TRAF2/6, además de las proteínas cIAPs. Este complejo de señalización activa la quinasa IKK, la cual fosforila a IκBα en Ser32 y Ser36, lo que a su vez induce la poliubiquitinación de la proteína en Lys29 y su degradación en el proteasoma 26S. Esto deja expuesta la señal de localización nuclear de RelA e induce la translocación del dímero al núcleo (Wu, Conze et al. 2006; Vallabhapurapu and Karin 2009; Vince, Pantaki et al. 2009).

La vía alternativa de activación de NF- κ B fue descrita ante la activación de un grupo de TNFRs mediada por un conjunto selecto de ligandos: CD40L (ligando de CD40), BAFF (*B-cell activating factor*), RANKL (ligando de RANK), TWEAK (*TNF related weak inducer of apoptosis*) y TNF (Senftleben, Cao et al. 2001). En torno a estos receptores se forma un complejo proteico formado por cIAPs, TRAF2, TRAF3 y la quinasa NIK (*NF-\kappaB Inducing Kinase*). Una vez activados, se induce la degradación de TRAF3 y, como consecuencia, la liberación de NIK. Ésta, a su vez, es capaz de activar a IKK α , que fosforila a p100 para inducir su ubiquitinación y procesamiento parcial, lo cual lleva a la activación de los heterodímeros RelB/p52. Estos dímeros activos son finalmente translocados al núcleo, completando la activación de NF- κ B (Senftleben, Li et al. 2001; Rauert, Wicovsky et al. 2010; Sun 2011; Mitchell, Vargas et al. 2016).

Ante estímulos prolongados, la quinasa NIK es capaz de activar el complejo IKK al completo, participando así en la vía clásica y estableciéndose un vínculo entre ambas vías de activación de NFκB (Zarnegar, Wang et al. 2008). Ambas vías están también conectadas a través de la proteína RIP1, la cual media en la activación de la vía clásica por parte de ciertos receptores activando el complejo IKK (Lin, Bai et al. 2010), mientras que en la vía alternativa, RIP1 puede interaccionar con TRAF2 inhibiéndolo, ejerciendo una regulación negativa en este caso (Kim, Morgan et al. 2011).



Figura 1.3: Las rutas de señalización de NF-κB activadas por los TNFRs. Los receptores de la TNFRSF son capaces de activar tanto la vía clásica como la vía alternativa de señalización de NF-κB. En el primer caso, la activación de la ruta comienza con el reclutamiento de un complejo de señalización formado por las proteínas TRAF2/TRAF6, proteínas cIAPs y al que se le puede unir RIP, aunque esta proteína es capaz de iniciar la cascada de señalización directamente sin la colaboración de otras proteínas adaptadoras. A continuación se produce la activación del complejo IKK, el cuál fosforila a la proteína inhibidora IκBα para su degradación y la liberación de los complejos p50/ReIA activos y con capacidad de translocarse al núcleo celular. En la vía alternativa, las proteínas que forman el complejo de señalización inicial son TRAF2, TRAF3, cIAPs y la quinasa NIK. Cuando los receptores se activan, TRAF3 se separa del complejo, facilitando la liberación de NIK, que activa a la subunidad NEMO del complejo IKK, la cual fosforila a p100 para inducir su degradación parcial, resultando en la formación de complejos ReIB/p52 activos. Ante episodios de activación prolongada, NIK es capaz de activar no solo a IKKα, sino a todo el complejo IKK, relacionándose de esta manera ambas vía de activación.

1.3.3.-Inducción de muerte celular

La muerte celular es un proceso que puede cursar a través de diferentes vías en respuesta tanto a estímulos exógenos como endógenos, lo que permite su clasificación en función de varios criterios (características morfológicas, criterios enzimológicos, aspectos funcionales o características inmunológicas). Así pues, desde la clasificación de muerte celular en 3 grandes tipos basados en aspectos morfológicos (apoptosis, autofagia y necrosis) las rutas de inducción de muerte celular han sido ampliamente estudiadas para llegar, actualmente, a su clasificación en 6 grandes grupos: apoptosis extrínseca, apoptosis intrínseca caspasas-dependiente y caspasasindependiente, necrosis regulada, muerte celular autofágica y catástrofe mitótica. Además de estos grupos, también hay determinados procesos de muerte celular que cursan con una características especiales que hacen posible que se denominen de forma especial, denominándose con términos como cornificación, anoikis, piroptosis, netosis o partanatos (Kroemer, Galluzzi et al. 2009; Galluzzi, Vitale et al. 2012).

De entre todos los procesos de muerte celular descritos, los TNFRs participan con un papel principal en la inducción de apoptosis extrínseca, a través del reclutamiento de diferentes proteínas intracelulares y activando principalmente la caspasa iniciadora 8. Sin embargo, también se ha descrito la participación de TNFRs en la vía intrínseca apoptótica y procesos necróticos regulados en los que los TNFRs participan a través de las proteínas RIP y FADD pero independientemente de su interacción con caspasas iniciadoras, denominándose necroptosis a esta última ruta de inducción de muerte celular (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013; Green and Llambi 2015).

1.3.3.1.-Las caspasas

Las caspasas son las proteínas encargadas de la ejecución de todos los procesos finales que llevan a la muerte celular. Son cisteín proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos tras un residuo de Asp, siendo todas ellas expresadas como pro-enzimas inactivos. Esta familia de proteínas está formada por 11 miembros en humanos que, a su vez, se clasifican en caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), caspasas efectoras (3, 6 y 7) y caspasas inflamatorias (caspasas 1, 4 y 5) ,siendo reclutadas y activadas por proteínas que presentan en su estructura los dominios DED (*Death Effector Domain*) y CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) (Degterev, Boyce et al. 2003; Kumar 2007; Lamkanfi and Dixit 2012). Todas las caspasas se caracterizan por la presencia de 3 dominios en su estructura: un dominio N-terminal, una subunidad grande p20 (subunidad catalítica) y una subunidad pequeña p10. La regulación de las caspasas depende del procesamiento de estas subunidades grandes y pequeñas. Debido a la alta especifidad de las caspasas, el procesamiento proteolítico ocurre de forma organizada y escalonada (Galluzzi, Lopez-Soto et al. 2016).

1.3.3.2.-La apoptosis extrínseca

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que cursa con una cascada de señalización molecular compleja, siendo posible su reversión en determinados puntos clave de la ruta anteriores a la activación masiva de las caspasas, la pérdida de potencial y permeabilización de

la membrana mitocondrial externa y la exposición de la fosfatidil serina de la membrana plasmática al exterior celular (Ashe and Berry 2003).



Figura 1.4: Inducción de apoptosis por los TNFRs. La inducción de apoptosis por la activación de los TNFRs cursa normalmente a través de la formación del complejo DISC, que puede constituirse de dos maneras alternativas. En el primer caso, FADD interacciona con los DD de los receptores, reclutando y activando a la procaspasa 8. En el segundo caso, la unión de TRADD, también a través de sus DD, permite la unión de FADD, en el que se incluyen proteínas TRAF, cIAP y RIP. Una vez formado, DISC se separa de los receptores para reclutar y activar la procaspasa 8. En cualquier caso, la activación de la procaspasa 8 (o 10) induce su autoprocesamiento para dar lugar a su forma activa, que, a su vez, activa las caspasas efectoras 3 y 7. La activación de las caspasas iniciadoras puede ser inhibida en el complejo DISC por la acción de las proteínas cFLIP. Cuando la activación de caspasa 8 no es suficiente para activar caspasa 3 y 7 directamente, los TNFRs pueden inducir apoptosis mediante la activación de la vía apoptótica intrínseca. De este modo, caspasa 8 procesa a Bid para dar lugar a su forma activa, tBid, que activa a Bad y Bax para producir la perforación de la membrana mitocondrial y liberar las proteínas pro-apoptóticas mitocondriales Smac y citocromo C. Éste forma un complejo junto a la proteína Apaf-1 para activar la caspasa iniciadora 9, que activa a caspasa 3 y 7.

La vía extrínseca apoptótica comienza con la activación de los TNFRs y el reclutamiento a través de sus dominios intracelulares de la proteína FADD para formar el complejo de señalización DISC. Algunos DRs interaccionan directamente a través de sus DD con FADD, lo que causa el reclutamiento de la pro-caspasa 8 y su auto-procesamiento y activación. Sin embargo, otros DRs interaccionan con FADD indirectamente a través de la proteína TRADD, mediante el reclutamiento

de la forma desubiquitinada de RIP1 y proteínas cIAPs y TRAF, que confieren estabilidad al complejo. Una vez formado, este complejo se separa de los receptores para inducir la activación de caspasa 8. La forma activa de la caspasa 8 induce a su vez la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, comenzando así el proceso apoptótico (Ashkenazi and Dixit 1998; Festjens, Vanden Berghe et al. 2007; Keller, Mares et al. 2009). En esta ruta de activación apoptótica pueden participar también otras proteínas dependiendo de los receptores que la inician o el tipo celular en donde se activa. De este modo, proteínas como RAIDD, MADD, REAPER o p53DL1 colaboran en la formación de los complejos de señalización contribuyendo a la ejecución del proceso apoptótico, aunque no presentan un papel imprescindible en él. Por otro lado, proteínas como cFLIPL, SODD, cIAPs o survivina, interaccionan con el complejo apoptótico a nivel del DISC o directamente con las caspasas produciendo la inhibición de la apoptosis (Bhardwaj and Aggarwal 2003; Guicciardi and Gores 2009; He and He 2013).

1.4.-Papel biológico de los TNFRs

Los TNFRs, a través de todas las rutas de señalización celular que son capaces de activar, participan en una gran cantidad de procesos biológicos con consecuencias muy diferentes dependiendo no solo de la interacción ligando-receptor sino del tipo celular y las condiciones en las que se da dicha interacción. De este modo, se ha descrito la participación de esta superfamilia de receptores en procesos de inflamación, homeostasis del sistema inmunológico y desarrollo tisular, mientras que su desregulación resulta en una amplia variedad de condiciones patológicas, como enfermedades inmunológicas e inflamatorias, cáncer o infecciones virales (Croft, Benedict et al. 2013).

1.4.1.-Inflamación y sistema inmune

Considerando que el TNF es uno de los mayores mediadores inflamatorios tanto del sistema inmune como de otros tejidos, no es de extrañar que los receptores de la TNFRSF tengan un papel central en los procesos que ocurren durante los episodios de inflamación. En este sentido, los TNFRs pueden activar la ruta de señalización de la esfingomielina para la producción de citoquinas proinflamatorias (Sedger and McDermott 2014).

Por otro lado, los receptores de la TNFRSF también median en la regulación de las células del sistema inmune, controlando su proliferación, diferenciación. De esta forma, receptores como TNFR1, OX40, 4-1BB, HVEM o CD30 regulan la activación y diferenciación de células T, mientras que

CD40 está implicado en la activación de células B y su cambio de isotipo. Por otro lado, el receptor LTβ ejerce una regulación sobre células dendríticas y la activación de macrófagos, aunque también promueve la organogésis en nodos linfoides, mientras que el receptor 4-1BB induce un aumento de linfocitos T citotóxicos y de la actividad de las células NK, aunque también se asocia con una inhibición de la inflamación, favoreciendo la población de células T CD8⁺ en lugar de CD4⁺. Esta capacidad de regulación de la respuesta del sistema inmune además de la respuesta ante la generación de especies reactivas de oxígeno y la participación en los procesos inflamatorios hace que los TNFRs participen también durante los procesos de infección viral, contribuyendo tanto al control de la infección como a la patología inmunológica (Hehlgans and Pfeffer 2005; Croft 2014; Mbanwi and Watts 2014).

1.4.2.-Regulación tisular

La función principal de varios TNFRs está relacionada directamente con su capacidad para la regulación del desarrollo de diferentes tejidos, activando tanto procesos apoptóticos como favoreciendo la supervivencia y la proliferación celular.

Así, por ejemplo, el complejo RANK/RANKL tiene un papel central en la regulación de la homeostasis ósea mediante la activación de TRAF6, en donde el receptor señuelo OPG regula dicha activación. En el tejido glandular mamario RANK/RANKL también juega un importante papel, controlando la supervivencia celular mediante la activación de la proteína antiapoptótica PKB (*Protein Kinase B*), mientras que el complejo Fas/FasL, que activa los procesos apoptóticos en este tejido (Locksley, Killeen et al. 2001).

En el tejido nervioso, diferentes receptores de la superfamilia actúan activando procesos de crecimiento neuronal, diferenciación, inervación, sensibilización y formación de dendritas. De esta forma, el receptor Fas es capaz de inducir procesos de derivación axonal, TNFR1 media en la neurotoxicidad y movilidad axonal, mientras que TNFR2 promueve la supervivencia. Por otra parte, el receptor p75^{NTR}, que es capaz de interaccionar con ligandos fuera de la TNFSF, forma un complejo de señalización intracelular denominado Lingo-1 que activa proteínas inhibidoras de la mielinación, responsable de la extensión de las neuritas. p75^{NTR} también regula el desarrollo de las dendritas y está involucrado tanto en la degeneración axonal como en la supervivencia neuronal. Al igual que p75^{NTR}, el receptor TROY también puede reclutar al complejo de señalización Lingo-1, por lo que también inhibe la mielinación axonal. TROY también es capaz de activar las rutas de señalización de

NF-κB y JNK mediante el reclutamiento de proteínas TRAF, regulando el desarrollo de neuritas y la diferenciación neuronal (Mi 2008; Park, Grosso et al. 2010; Twohig, Cuff et al. 2011).

1.4.3.-TNFRs y cáncer

Desde el descubrimiento del TNF se ha descrito la relación directa tanto de la TNFSF como de la TNFRSF con procesos tumorales, ejerciendo un efecto inhibitorio de la progresión tumoral en algunos casos, pero también participando en varios de los procesos necesarios para la formación del tumor descritos por Hanahan y Weinberg (Drutskaya, Efimov et al. 2010; Hanahan and Weinberg 2011).

Parte de la capacidad de los TNFRs para influir en los procesos tumorales se debe en parte a la regulación que estos receptores ejercen en procesos inflamatorios y en el sistema inmunológico. De este modo, la activación de receptores como 4-1BB, OX40, DR3 o GITR presenta un efecto antitumoral mediado por una mayor respuesta inmune, lo que ha llevado al desarrollo de terapias antitumorales empleando anticuerpos específicos que causen su activación. Otros receptores, como HVEM o CD27, también median la respuesta inmune ante procesos tumorales, aunque la diferenciación de las células inmunológica mediada por su activación también puede inducir la evasión tumoral del control inmunológico (Slebioda, Rowley et al. 2011; Schaer, Hirschhorn-Cymerman et al. 2014).

La capacidad apoptótica de los TNFRs, principalmente causada por los DRs, es otro de los mecanismos que las células tumorales tienen que evadir durante la progresión tumoral, encontrándose en muchos tumores estos receptores mutados o con una expresión reprimida. Así pues, se ha descrito la regresión tumoral debida a la inducción apoptótica por parte de receptores como TNFR1, DR3, EDAR, Fas o los receptores de TRAIL (DR4 y DR5) (Muntane 2011). De entre ellos cabe destacar la inducción de la vía extrínseca apoptótica por parte de los receptores DR4 y DR5, la cual se activa principalmente en células tumorales. Esto ha permitido plantear terapias antitumorales basadas en la activación de este receptor con una citotoxicidad más específica que en otros receptores (Holland 2014), sin embargo, la activación de los receptores de TRAIL ha sido relacionada también con episodios inflamatorios y supervivencia celular, favoreciendo así el crecimiento tumoral (Cullen and Martin 2015). Debido a esto, las terapias antitumorales basadas en señalización de TRAIL están siendo dirigidas hacia dianas específicas de la ruta apoptótica (De Miguel, Gallego-Lleyda et al. 2016).

16

Por el contrario, otros TNFRs favorecen la progresión tumoral permitiendo que las células evadan los procesos apoptóticos, encontrándose sobreexpresados en muchos casos. Uno de los receptores que actúa en este sentido es el receptor señuelo OPG, que inhibe la inducción de apoptosis del receptor RANK en varios tipos tumorales (Goswami and Sharma-Walia 2016). De forma similar, las células tumorales pueden inducir un aumento de la expresión del receptor DcR3 para inhibir la apoptosis causada por la activación de Fas (Ghavami, Hashemi et al. 2009).

1.5.-<u>El receptor de muerte 6</u>

El receptor de muerte 6, DR6 (*Death Receptor 6*), TNFRSF21 o CD358, es uno de los miembros de la superfamilia de receptores del TNF más conservado en vertebrados, que se agrupa dentro del subgrupo de receptores de muerte, pues presenta un DD en su región intracelular. Identificado mediante análisis de secuencias ETS (*Expressed Sequences Tags*) utilizando los dominios CRDs del receptor TNFR2, DR6 es un receptor transmembrana tipo I, con tendencia a localizarse en balsas lipídicas de la membrana plasmática celular y cuya expresión se produce en la gran mayoría de tejidos humanos, siendo ésta más abundante en colon, corazón, cerebro, placenta, páncreas, órganos linfoides y células hematopoyéticas, pulmones, ovario, tejido hepático en regeneración y en determinados tipos tumorales (Pan, Bauer et al. 1998; Kasof, Lu et al. 2001; Klima, Zajedova et al. 2009; Matesanz-Isabel, Sintes et al. 2011; Santonocito, Guglielmino et al. 2013; Zhou, Xu et al. 2015).

Se ha descrito que la expresión de DR6 se encuentra regulada por el factor de transcripción NF-κB en la línea celular tumoral de próstata LnCAP y en tumores sólidos siendo, a su vez, regulada la activación del factor de transcripción por la presencia de TNF-α. Esta dependencia de la expresión de DR6 con el estado de activación de NF-κB ha sido propuesta como una posible causa de la alta expresión del receptor de muerte en determinadas líneas celulares tumorales en las que hay unos niveles basales de actividad del factor de transcripción altos (Kasof, Lu et al. 2001; DeRosa, Ryan et al. 2008).

El ligando de DR6 ha permanecido sin identificar durante un largo periodo de tiempo desde la identificación del receptor. Por ello, los estudios del receptor en los que se ha requerido la activación del receptor han empleado la sobreexpresión o el uso de anticuerpos para este propósito. El grupo de Nikolaev y col. ha empleado el extremo N-terminal de la proteína precursora del péptido amiloide APP (*Amyloid Precursor Protein*) como ligando capaz de activar el receptor en condiciones concretas (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009). Sin embargo, esta interacción entre DR6

17

y APP ocurre de forma independiente de la proteasa β-secretasa BACE-1, descrita como la responsable del procesamiento del péptido N-APP, sugiriendo que el receptor es capaz de unirse con la proteína APP en la superficie de la membrana plasmática sin que esta sufra procesamiento alguno (Kallop, Meilandt et al. 2014; Olsen, Kallop et al. 2014). A pesar de la validación mediante modelos informáticos y observaciones cristalográficas de esta interacción (Ponomarev and Audie 2011; Xu, Olsen et al. 2015), no se ha encontrado la interacción de DR6 con APP en todas las células y tejido estudiados, sugiriendo formas alternativas para inducir la activación del receptor (Klima, Brouckova et al. 2011; Mi, Lee et al. 2011). De este modo, Wang y col. han descrito la interacción directa de DR6 con la proteína S5a, la cual es una subunidad de reconocimiento de poliubiquitinaciones internas del proteasoma 26S, formando un complejo receptor-ligando que induce la diferenciación de monocitos mediante la activación de DR6 con el receptor p75NTR, formando un complejo al que se une el péptido β-amiloide, aunque no se ha descrito la interacción directa de DR6 con éste (Hu, Lee et al. 2013).

Otra de las características de DR6 es el procesamiento que sufre su región extracelular por parte de la metaloproteasa MMP14, mecanismo descrito en células linfáticas. De este modo, la región N-terminal del receptor es liberada de la membrana plasmática al medio extracelular (Tam, Morrison et al. 2004; DeRosa, Ryan et al. 2008).

1.5.1.-Estructura de DR6

El receptor DR6 es una proteína transmembrana de 655 aminoácidos que presenta una secuencia de señal putativa entre los aminoácido 1 y 41, siendo Gln42 el primer aminoácido del extremo N-terminal de la proteína madura. En su región extracelular presenta 4 CRDs (aminoácidos 52-211), cuyas secuencias guardan mayor relación con los CRDs de los receptores OPG y TNFR2. Seguidos de éstos, DR6 presenta una larga región espaciadora que llega hasta el dominio transmembrana, comprendido entre los aminoácidos 350 y 370. En su región intracelular, DR6 presenta un DD, característica común de los DRs. Sin embargo, el DD de DR6 está próximo a la región transmembrana, no en el extremo C-terminal del receptor. En su lugar, seguido del DD, el receptor presenta una cola citoplasmática de 150 aminoácidos en la que se ha identificado un dominio de cremallera de leucina y una región rica en prolina, además de un posible dominio CARD-L (*Caspase Recruitment Domain-Like*). En su región intracelular, situados en los aminoácidos comprendidos entre el dominio transmembrana y el DD, han sido descritos dos posibles motivos de unión a proteínas TRAF (aminoácidos 381-385 y 400-404 (Pan, Bauer et al. 1998; Saito 2005).

En su región extracelular, DR6 presenta un complejo patrón de glicosilaciones a través de enlaces tanto N- como O-glicosídicos. Estas glicosilaciones se localizan principalmente en la región espaciadora de DR6, aunque hay algún sitio de glicosilación en la secuencia de los CRDs, y afectan directamente a la localización del receptor en la membrana plasmídica, siendo las O-glicosilaciones las que dirigen el transporte del receptor desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática, mientras que las N-glicosilaciones carecen de funcionalidad en el transporte y localización del receptor en la membrana. Además de esta glicosilaciones, DR6 presenta una S-palmitoilación en Cys368 que, a diferencia de otros receptores, no afecta a la localización del receptor en la membrana plasmídica y cuyo papel no ha sido descrito aún (Klima, Zajedova et al. 2009).



Figura 1.5: Estructura de DR6. Representación esquemática de la distribución de las diferentes regiones y modificaciones post-traduccionales del receptor DR6. DR6 presenta un péptido se señalización en los primeros aa de su extremo amino terminal (1-41), el cuál es procesado en la forma madura de la proteína. A continuación se encuentra la región extracelular del receptor, donde se localizan 4 CRDs entre los aa 52 y 211, seguidos por una región espaciadora de 139 aa, más larga que las presentes en otros receptores de la TNFRSF. En esta región extracelular se encuentran además 6 sitios de unión a N-glicosilaciones y otros 6 sitios de O-glicosilaciones. El domino transmembrana de DR6 abarca desde el aa 350 al 370, y en él se localiza una secuencia de palmitoilación (368). La región intracelular de DR presenta 2 secuencias de reconocimiento de proteínas TRAF próximas a la región transmembrana, situadas entre los residuos 381-385 y 400-404, seguidas del DD del receptor. Este DD se encuentra más próximo a la región transmembrana que el otros receptores de la superfamilia, dando origen a una larga cola citoplasmática de 158 aa, en cuyos últimos 100 aa anteriores al extremo carboxilo terminal se ha sugerido la presencia de un dominio CARD-L (sin confirmar).

La estructura de la región extracelular de DR6 ha sido estudiada también mediante predicciones estructurales llevadas a cabo con programas informáticos y mediante cristalografía de rayos X, analizando especialmente la secuencia que comprende los 4 CRDs del receptor. El resultado de estos análisis revelan que los CRDs están formados principalmente por hélices y láminas estabilizados por 2 o 3 enlaces disulfúricos y que juntos adoptan una estructura alargada ligeramente curvada en forma de cesta que se asemeja estructuralmente a la región extracelular del receptor p75NTR. En cuanto a la interacción ligando-receptor, el modelo predictivo resultante de la interacción de DR6 con N-APP muestra que la conformación de la región extracelular del receptor se adapta a la estructura glomerular del fragmento proteico procesado interaccionando de forma independiente de los sitios de glicosilación del receptor. Por otro lado, la interacción de

DR6 con el dominio ectópico completo de APP ha sido estudiada mediante cristalografía, observándose un cambio conformacional en la estructura del receptor, que se pliega entre el CRD 2 y 3 para favorecer su unión con APP. Estos estudios estructurales muestran que la fracción extracelular de DR6, al igual que ocurre con la de APP, en forma soluble adopta una estructura dimérica, estando implicados los aminoácidos de la región espaciadora en esta dimerización. Este hecho, junto con una predicción de estabilidad energética favorable, sugiere que DR6 y APP forman un complejo mediante la interacción de sus formas diméricas (Kuester, Kemmerzehl et al. 2011; Ponomarev and Audie 2011; Ru, Zhao et al. 2012; Xu, Olsen et al. 2015).

El DD de DR6 presenta 3 de los 6 sitios críticos para la funcionalidad del dominio en comparación con el DD del receptor TNFR1 (Glu465, Trp474, Ile502), mientras que los otros 3 sitios presentan los mismos cambios en el DR6 humano, murino y en aves (Ile441, Gln443 y Ala448). A pesar de esto, mutaciones puntuales en estos residuos no muestran cambios en la señalización del receptor (Bridgham, Bobe et al. 2001).



Figura 1.6: Estructura cristalina de la región extracelular de DR6. Los análisis por difracción de rayos X han revelado la estructura cristalina de la región extracelular del receptor que comprende los 4 CRDs, en donde se produce la interacción entre DR6 y APP. **A)** Representación de la estructura de DR6 desde los aminoácidos Leu50 a Gly212. Esta región del receptor adopta una conformación alargada ligeramente curvada en forma de cesta. Además de encontrarse varias hojas β en la estructura, los CRDs se pueden dividir en varios módulos estructurales, coloreados con diferentes colores. **B)** Representación de la estructura cristalina que adopta la región extracelular de DR6 durante su unión con APP. La conformación de DR6 (violeta) se adapta a la proteína APP (verde), a quien se une por sus hélices H1 y H2. Adicionalmente, la estructura está estabilizada por un átomo de Mg²⁺ (azul) y por varios puentes disulfuro (amarillo) formados en los CRDs del receptor (Kuester, Kemmerzehl et al. 2011; Xu, Olsen et al. 2015).

1.5.2.-Rutas de señalización activadas por DR6

DR6, al igual que el resto de TNFRs, carece de actividad enzimática propia, necesitando la interacción con proteínas adaptadoras para llevar a cabo la transducción de señales tras su activación. Sin embargo, DR6 es uno de los receptores de esta superfamilia peor caracterizado, conociéndose su interacción con TRADD en células HEK293, pero no con otras proteínas adaptadoras que normalmente interaccionan con los DRs, como FADD, RAIDD o RIP (Pan, Bauer et al. 1998). También se ha descrito la interacción del receptor con la proteína reguladora del receptor de andrógenos ARA267 α , actuando de forma cooperativa con el receptor de andrógenos en células tumorales, aunque sin conocer el efecto que esta interacción tiene en la señalización del receptor (Wang, Yeh et al. 2001; Mai, Wang et al. 2004).

Sin embargo, a pesar de desconocer los complejos proteicos que se forman en torno a la región intracelular de DR6, mediante sobreexpresión se ha descrito la capacidad del receptor para inducir apoptosis y la activación de las rutas de señalización de NF-κB y JNK. De igual forma, se ha observado que esta señalización por parte de DR6 se pierde cuando el receptor carece de los últimos 195 aminoácidos del extremo C-terminal, aunque en el caso de JNK la pérdida de actividad observada es menor (Pan, Bauer et al. 1998; Mi, Lee et al. 2011). Por otro lado, la activación de DR6 mediante el uso de anticuerpos induce la expresión de IL-6 mediante la activación de la ruta de NF-κB de forma dependiente del DD del receptor y de TRADD (Hu, Du et al. 2014).

La ruta de señalización apoptótica de DR6 cursa sin la interacción del receptor con FADD y con la activación de diferentes proteínas pro-apoptóticas, dependiendo del tipo celular en el que se expresa el receptor e incluso de la localización subcelular del mismo. De esta forma se han descrito procesos apoptóticos inducidos por DR6 en los que participa la proteína Bax y se produce la activación de las caspasas 3 y 6 (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009), así como una activación de apoptosis independiente de la activación de caspasa 8 (caspasa activada en procesos apoptóticos inducidos por otros DRs) que cursa con la liberación del citocromo C mitocondrial y la translocación de Bax de forma independiente de tBid, sugiriendo que la apoptosis inducida por la activación clásica de esta ruta que siguen otros TNFRs (Zeng, Li et al. 2012). Por otro lado, la capacidad apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L, al igual que mediante la proteína survivina (proteína de la familia cIAP) mediante la inhibición de caspasa-3 y 7, lo que apoya la activación de la apoptosis intrínseca por parte de DR6 (Kasof, Lu et al. 2001).



Figura 1.7: Señalización del receptor DR6. La activación de DR6, mediante sobreexpresión, unión de anticuerpos o interacción con sus ligandos (S5a, APP y su extremo N-terminal), es capaz de inducir las rutas de señalización clásicas de los TNFRs, aunque se desconocen muchos de los elementos que intervienen en las cascadas de señalización. Intracelularmente, DR6 interacciona con ARA267α pero no se ha descrito que esta unión active ninguna señalización, aunque parece colaborar con la inducción de apoptosis del receptor de estrógenos. Por su parte, TRADD también se une a DR6 pero no es capaz de activar caspasa 8. En su lugar, se ha visto una activación de Bax de forma independiente de la activación de tBid. Bax estaría relacionado con la activación de la ruta mitocondrial apoptótica, observándose la liberación de citocromo C y activación de caspasa 3 y 7 en respuesta a la activación de DR6. La participación de la mitocondria está también respaldada por el papel antiapoptótico que Bcl-2, Bcl-x_L y survivina ejercen en la apoptosis inducida por DR6. Por otro lado, DR6 también es capaz de activar la caspasa efectora 6 por medio de la activación de caspasa 3. En cuanto a las rutas de las MAPKs y de NF-κB, no se han identificado los complejos de señalización que se forman para su activación, siendo descrita tan solo la activación de c-Rel en el caso de la última.

1.5.3.-Papel biológico de DR6

Debido a la expresión ubicua de DR6 y de la capacidad del receptor para activar no solo la ruta apoptótica, sino también otras rutas de señalización que conllevan la activación de diversos factores de transcripción, éste participa en una gran variedad de procesos en diferentes tejidos y tipos celulares. Así pues, se ha descrito un aumento de la expresión de DR6 en procesos tan dispares como en la polipliodía por envejecimiento de células endoteliales vasculares, la involución durante

el desarrollo del tejido mamario en determinados mamíferos, (Borradaile and Pickering 2010) (Khalil, Digby et al. 2011)

La generación de ratones *knock out* DR6^{-/-} revela que la falta de expresión del receptor no afecta a la viabilidad de estos ratones, que son fértiles y no muestran signos patológicos, encontrándose únicamente algunas diferencias en el desarrollo del sistema neurológico, acompañados de ciertos cambios en el comportamiento, y en el sistema inmune. Con el 88% de identidad proteica, los estudios en ratones deficientes en la expresión de DR6 han servido para el estudio de muchos de los papeles biológicos que el receptor ejerce (Zhao, Yan et al. 2001; Kallop, Meilandt et al. 2014).

1.5.4.1.-DR6 en el sistema nervioso

Al igual que otros TNFRs, como p75NTR, Fas o TNFR1, el receptor DR6 ejerce un importante papel en el sistema nervioso, siendo descritos cada vez más procesos neuronales en los que el receptor participa. En este sentido, el receptor se expresa de forma significativa en varios tipos celulares de este sistema, como en neuronas corticales adultas, neuronas diferenciadas de la espina dorsal y ganglios dorsales u oligodendrocitos inmaduros (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009; Mi, Lee et al. 2011; Hu, Lee et al. 2013)

El estudio de ratones DR6^{-/-} muestra que, a pesar de presentar un fenotipo similar a los ratones DR6^{+/+}, DR6 ejerce un papel regulador del sistema neurológico a varios niveles, tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta de los individuos. Así pues, se ha descrito la implicación del receptor en la regulación de la formación de las ramificaciones axonales durante el desarrollo embrionario (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009), así como en la regulación de la formación del hipocampo cerebral y el neocortex (Iyer, van Scheppingen et al. 2013), en los procesos de plasticidad cortical dependiente de experiencias durante la vida adulta de los individuos (Marik, Olsen et al. 2013) y en el proceso de maduración y mielinización de oligodendrocitos y sus precursores NG2⁺ (Mi, Lee et al. 2011; Yang, Zhang et al. 2016).

La regulación que DR6 ejerce en el sistema neurológico depende principalmente de su capacidad para llevar a cabo la activación de caspasas en las diferentes células que se expresa, aunque no activando necesariamente procesos apoptóticos en todos los casos. La primera mención del papel de DR6 en el sistema inmune fue por su capacidad para inducir la muerte neuronal en condiciones de privación trófica y la reorganización axonal, de forma dependiente de su unión a N-APP y mediante la participación de la proteína pro-apoptótica Bax junto con caspasa 3 (en los

cuerpos neuronales) y caspasa 6 (en los axones) (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009; Simon, Weimer et al. 2012). Además de la activación de DR6 mediada por su interacción con N-APP, también se ha descrito el papel neurotóxico de DR6 en asociación con p75NTR en respuesta al péptido β -amiloide (otro de péptidos resultantes del procesamiento de APP) en neuronas corticales, mediante una ruta de señalización que implica la activación de caspasa-3 (Hu, Lee et al. 2013). Igualmente, se ha descrito la correlación entre la expresión de DR6 y APP, junto con Tau y caspasa 3, en la degeneración neuronal causada por episodios epilépticos asociados a tumores glioneuronales (Prabowo, Iyer et al. 2015). Esta relación de DR6 con APP en células neuronales se evidencia con la inducción de la expresión del receptor causada por el tratamiento con el péptido β -amiloide, que también induce la liberación de N-APP, aumentando su neurotoxicidad (Xu, Wang et al. 2015). La activación de las caspasas 3 y 6 mediada por DR6 también está implicada, respectivamente, en la muerte neuronal y en la degeneración axonal observada en respuesta a la isoforma patológica de la proteína priónica en neuronas de la espina dorsal (Wang, Zhao et al. 2015). A su vez, la reorganización dependiente de caspasas de las ramificaciones y conexiones axonales mediada por DR6 se encuentra bajo el control inhibitorio de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L(Park, Licznerski et al. 2015). Por otro lado, también se ha descrito la capacidad de DR6 para activar caspasa 3 e inducir muerte celular en casos de hipoxia (Park, Licznerski et al. 2015) y en oligodendrocitos y sus células precursoras (Mi, Lee et al. 2011; Yang, Zhang et al. 2016).

DR6 también juega un importante papel en el desarrollo de la vasculatura del sistema nervioso central y de la barrera hematoencefálica mediante la activación de la ruta de señalización de JNK de forma conjunta con el receptor de muerte TROY, con el cuál interacciona física y genéticamente, estando ambos regulados por la ruta Wnt/beta-catenina en células endoteliales cerebrales (Tam, Richmond et al. 2012).

Los estudios llevados a cabo en ratones DR6^{-/-} revelan un fenotipo similar a los ratones deficientes en la expresión de la proteína APP que, junto con la capacidad de esta para interaccionar con el receptor y la presencia de altos niveles de expresión del receptor en tejidos cerebrales en casos de enfermedad de Alzheimer, sugieren una posible implicación de DR6 en esta patología (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009; Hu, Lee et al. 2013). Sin embargo, a pesar de compartir DR6 y APP una ruta de señalización genética, los modelos animales para esta enfermedad revelan que la ausencia funcional de DR6 no mejora el fenotipo patológico asociado con el desarrollo de Alzheimer (Kallop, Meilandt et al. 2014). También se han encontrado niveles de expresión de DR6 elevados en pacientes de esclerosis múltiple, relacionándose directamente con el papel que el receptor ejerce

24

sobre la mielinización axonal (Mi, Lee et al. 2011) y proponiéndose el bloqueo del receptor como un posible estrategia para el tratamiento de esta enfermedad (Popko 2011). La inhibición de DR6 se ha relacionado también con una mayor supervivencia y regeneración neuronal en casos de hipoxia, por lo que también se ha propuesto el bloqueo de la activación del receptor con el objetivo de promover la regeneración neuronal tras episodios de isquemia cerebral (Qiu, Sheng et al. 2012). De igual forma se ha propuesto el bloqueo de DR6 mediante el uso de anticuerpos antagónicos del receptor para aumentar la supervivencia en neuronas motoras y el crecimiento axonal en casos de esclerosis amiotrófica lateral, enfermedad en la que la expresión de DR6 se relaciona con un aumento de la apoptosis neuronal vía caspasa 3 (Huang, Lee et al. 2013).

1.5.4.2.-DR6 en el sistema inmune e inflamatorio

En el sistema inmune, DR6 se expresa principalmente en células T y B, además de en monocitos y líneas tumorales hematopoyéticas, como las células Jurkat (Zhao, Yan et al. 2001; Klima, Zajedova et al. 2009). En estas células, la expresión de DR6 está asociada con procesos de regulación celular, principalmente mediante la activación de las rutas de NF-KB y JNK. En cuanto al papel apoptótico del receptor en este sistema, tan solo se ha descrito un ligero aumento de su expresión ante la infección crónica de virus de hepatitis C, afectando a la supervivencia de las células sanguíneas mononucleares. Esta ligera sobreexpresión se produce junto con la de varios genes pro-apoptóticos más y no se ha confirmado la implicación directa de DR6 en la inducción de apoptosis observada (Barathan, Gopal et al. 2015).

El principal papel que DR6 ejerce en el sistema inmune es la modulación de la respuesta inmunológica en células T y B. De esta forma, DR6 controla la activación y diferenciación de células T mediante la regulación de las rutas de señalización de JNK y NF-AT (factor nuclear de células T activadas). Así pues, la expresión de DR6 ha sido relacionada con un control de la proliferación de células T y su respuesta Th2, sin ejercer control en la respuesta Th1. De esta forman, la falta de expresión del receptor induce un aumento de la población de células T CD4⁺ y una mayor producción de citoquinas características de la respuesta Th2 linfocítica (Liu, Na et al. 2001; Zhao, Yan et al. 2001). Sin embargo, contradiciendo estos resultados, otros autores han observado un aumento de la expresión de DR6 en células T CD4⁺ activadas, aunque no en células Jurkat, de forma controlada por la activación de las rutas de señalización de NF-B y NF-AT pero no mediante la activación de JNK (Klima, Brouckova et al. 2011). En cuanto a células B, DR6 participa inhibiendo la activación de estas células, observándose la pérdida de expresión del receptor durante dicha activación. Además, DR6 ejerce un papel inhibitorio en la proliferación de estas células mediante la

inducción de apoptosis, estando este proceso inhibido a través de la activación de c-Rel y un aumento de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L. Ante la falta de expresión de DR6 en células B, éstas muestran una respuesta CD86⁺, afectando directamente a la respuesta de las células T (Schmidt, Liu et al. 2003).

Por otro lado, DR6 también participa en diferentes procesos que afectan a la regulación de los monocitos. De esta forma, DR6 media en la diferenciación de células de leucemia monocítica aguda THP-1 (línea celular empleada como modelo para el estudio de monocitos) en macrófagos, mediante su interacción con la proteína S5a. La activación del receptor en respuesta a su unión con esta proteína induce la activación de NF-κB, aumentando la expresión del factor de transcripción WT1 (*Wilm's Tumor 1*). A su vez, WT1 se une al promotor de otro factor de transcripción, c-myb, inhibiendo su transcripción y promoviendo de este modo la diferenciación de las células THP-1 e inhibiendo su proliferación (Wang, Fan et al. 2014). Por otro lado, la fracción extracelular del receptor en su forma soluble, liberada al medio extracelular tras su procesamiento por MMP-14, es capaz de afectar a la maduración de monocitos diferenciados en células dendríticas inmaduras, disminuyendo igualmente su supervivencia y cambiando su perfil de producción de citoquinas (DeRosa, Ryan et al. 2008).

La participación de DR6 en los procesos inflamatorios también depende principalmente de su capacidad para activar la ruta de señalización de NF-ĸB. En este sentido, se ha descrito la sobreexpresión del receptor en casos de osteoartritis, en donde una inhibición de la transcripción DR6 mediante la unión del microRNA-210 con su promotor reduce los niveles de activación de NFĸB, induciendo, a su vez, una disminución en la respuesta inflamatoria relacionada con el desarrollo de la enfermedad (Karlsson, Dehne et al. 2010; Zhang, Cao et al. 2015).

A pesar de todas las funciones reguladoras del sistema inmune asociadas al receptor DR6 antes descritas, los ratones DR6^{-/-} no muestran ninguna patología aparente que afecte directamente al desarrollo del sistema inmune en condiciones normales. Sin embargo, estos ratones deficientes en la expresión de DR6 presentan una peor respuesta inmunológica ante ciertas patologías debido a la desregulación de la activación de células T y B, como es el caso de la enfermedad injerto contra huésped (Liu, Heuer et al. 2002). En el sentido opuesto, la inhibición del receptor y el bloqueo de sus funciones en el sistema inmune afecta favorablemente a la progresión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la encefalomielitis o el asma(Schmidt, Zhao et al. 2005; Venkataraman, Justen et al. 2006).

26

1.5.4.3.-DR6 y cáncer

DR6 se expresa en líneas celulares tumorales pulmonares, colonrectales, células tumorales hematopoyéticas y, en menor medida, en líneas tumorales de pecho. DR6 también se expresa en tumores sólidos, como tumores prostáticos, glioneuronales, de ovario y de pecho en estadíos tardíos. En muchos de estos tumores la expresión del receptor es significativamente mayor que en los correspondientes tejidos sanos, indicando una correlación entre la expresión de DR6 y la malignidad tumoral, tal y como se ha observado en adenocarcinomas (Kasof, Lu et al. 2001; Huang, de Reynies et al. 2010; Sasaroli, Gimotty et al. 2011; Prabowo, Iyer et al. 2015). Por otro lado, algunas células tumorales muestran una inhibición de la expresión de DR6, al igual que otros genes pro-apoptóticos, en respuesta a la activación de diferentes rutas oncogénicas (Mirzaei, Najafi et al. 2014).

La capacidad apoptótica de DR6 contrasta con su alta expresión en determinadas células tumorales, por lo que algunas de estas células han desarrollado mecanismos para evitar la inducción de apoptosis por parte del receptor. De esta forma, en células prostáticas tumorales PC3 y DU145, DR6 es capaz de activar la ruta de señalización de NF-κB y la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L, promoviendo la supervivencia celular, además de presentar una alta expresión de la metaloproteasa MMP14, involucrada en el procesamiento del receptor. Por su parte, la capacidad reguladora de la respuesta inmunológica por parte de DR6 también ha sido propuesta como una posible causa de la alta expresión de DR6 en células tumorales, favoreciendo la evasión del tumor al control inmunológico (DeRosa, Ryan et al. 2008; Benschop, Wei et al. 2009). En otros casos la expresión de DR6 se ve afectada mediante silenciamiento génico inducido por la metilación de su promotor en adenocarcinomas protáticos (Carvalho, Filipe et al. 2010), mediante desacetilación de histonas en células quísticas estromales endometriales (Kai, Nasu et al. 2013).

Relacionado con la progresión y homeostasis tumoral, se ha descrito que la inhibición de DR6 en células de melanoma B16 induce una disminución del tamaño de los tumores resultantes tras su implantación subcutánea en ratones, observándose una menor vascularización tumoral. De esta forma, DR6 actúa promoviendo la formación de vasos sanguíneos en el tumor mediante la regulación positiva de las citoquinas pro-vasculares IL-6 y VEGF-A mediante la activación de las rutas de señalización de NF-κB y p38 MAPK (Yang, Zhang et al. 2016). Igualmente, se ha observado una alta expresión de DR6 en el tejido endotelial vascular en tumores de ovario, relacionándose también con la progresión de estos tumores (Sasaroli, Gimotty et al. 2011).

27

Por otro lado, ciertos tratamientos antitumorales experimentales inducen un aumento de la expresión de DR6 (Lee, Ban et al. 2012; Kollipara, Jeong et al. 2013; Fares, Azzam et al. 2014), estando directamente relacionado este aumento con una mayor inducción de apoptosis en algunos de estos tratamientos (Jo, Park et al. 2012; Ban, Jung et al. 2014; Lee, Park et al. 2015).

Pese a ser un receptor de membrana, el procesamiento de la región extracelular de DR6 permite su detección en el suero sanguíneo, lo que ha permitido el uso del receptor como biomarcador tumoral experimental en tumores de ovario, algunos tipos de sarcoma y en carcinomas de pecho y útero (Buckanovich, Sasaroli et al. 2007; Yang, Mooney et al. 2012; Bilecova-Rabajdova, Urban et al. 2014; Urban, Rabajdova et al. 2014). De igual forma, empleando modelos celulares para el estudio de la progresión del proceso de desarrollo tumoral en ovario, se ha llegado a relacionar el incremento de la expresión de DR6 con la progresión de este tumor (Barua, Yellapa et al. 2012).



Figura 1.8: Procesos biológicos en los que DR6 participa. El receptor DR6, a través de las diferentes rutas de señalización que es capaz de activar, se encuentra implicado en una gran variedad de procesos a nivel celular y sistémico, destacando su papel en los sistemas nervioso e inmune y en la progresión/supresión tumoral. De esta manera, la respuesta apoptótica de DR6 está relacionada tanto con neurotoxicidad, control de la población celular linfocítica o la muerte celular en diversos tumores, mientras que su capacidad para activar factores de transcripción, como NF-kB y AP-1, está relacionada con la angiogénesis, la proliferación celular o eventos de diferenciación.

OBJETIVOS

2.-OBJETIVOS

Los receptores de la superfamilia de TNFRs desempeñan una gran cantidad de funciones, con carácter muy diferente y cuya desregularización está directamente relacionada con la aparición de diferentes patologías. En este sentido, DR6 es también capaz de intervenir en diferentes procesos celulares, destacando su papel en la regulación de sistema inmune y nervioso. A pesar de esto, DR6 continúa siendo uno de los TNFRs peor caracterizado funcionalmente, desconociéndose los detalles de los mecanismos moleculares en los que está involucrado.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un estudio funcional de DR6 centrándonos en la participación de las regiones estructurales del receptor en los diferentes procesos celulares en los que interviene, planteándonos los siguientes objetivos concretos:

- Estudiar el papel de la interacción de DR6 con proteínas adaptadoras en las rutas de señalización activadas por el receptor.
- Analizar la participación de las diferentes regiones intracelulares de DR6 en la activación de las rutas de señalización en las que participa el receptor.
- Estudiar el procesamiento que DR6 sufre en su región extracelular.
- Generar y caracterizar nuevos modelos celulares para el estudio de DR6 que presenten una inhibición constitutiva de la expresión del receptor.
- Establecer un modelo celular para el estudio funcional de DR6 en células nerviosas.

MATERIALES

3.-MATERIALES

3.1.-Células y condiciones de cultivo

3.1.1.-Líneas celulares

En la presente Tesis Doctoral se han empleado las siguientes líneas celulares:

- **HEK293 (ATCC CRL-1573):** Línea celular epitelial de riñón embrionario humano, transformada con el adenovirus de tipo V.
- HeLa (ATCC CCL-2): Línea celular epitelial de adenocarcinoma de útero humano.
- A549 (ATCC CCL-185): Línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano.
- PC3 (CRL-1435): Línea celular de adenocarcinoma de próstata humano.
- PC12 (CRL-1721): Línea celular de feocromocitoma de glándula adrenal de rata.
- HEK293T (CRL-3216): Línea celular epitelial de riñón embrionario humano, derivada de células HEK293 con el antígeno T del virus SV40.

3.1.2.- Cultivos primarios

En el presente trabajo se han empleado cultivos primarios de oligodendrocitos de rata Sprague-Dawley PO, cedidos por la Dra. Ruth Luthie-Carter. Estos cultivos primarios han sido empleados para la expresión de diferentes receptores humanos mediante infección lentiviral.

3.1.3.-Materiales de cultivo

Todas las líneas celulares se cultivan para su mantenimiento en placas de plástico de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 ml del medio correspondiente para cada línea celular a 37°C y en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. En el caso de las células PC12, las placas de cultivo han sido previamente colagenizadas con colágeno de rata (Sigma-Aldrich). Para el subcultivo celular se emplea PBS para el lavado de las células y tripsina/EDTA para separar las células de la placa.

Las células HEK293 y HEK293T se cultivan en medio MEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Lonza) inactivado por calor a 56°C durante 60 minutos, 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogen), NaHCO₃ 0,13M (Sigma-Aldrich) y penicilina 100 U/ml + estreptomicina 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich).

La células HeLa se mantienen en medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Lonza), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogen), y penicilina 100 U/ml + estreptomicina 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich).

Las células A549 y PC3 se cultivan en medio DMEM F-12 (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Lonza) inactivado, 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogen), y penicilina 100 U/ml + estreptomicina 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich).

Las células PC12 se mantienen en medio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Lonza) inactivado, 10% de suero de caballo (Lonza), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogen), y penicilina 100 U/mI + estreptomicina 0,1 U/mI (Sigma-Aldrich).

Los cultivos primarios de oligodendrocitos se mantienen en medio Neurobasal (Gibco Invitrogen) suplementado con B-27 1x (Gibco Invitrogen), L-glutamina 0,5 mM (Sigma-Aldrich), KCl 15 mM (Sigma-Aldrich) y penicilina 100 U/ml + estreptomicina 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich).

3.2.-Plásmidos

El plásmido pFLAG-CMV-1 (Sigma-Aldrich) se ha empleado en este trabajo como control en los ensayos de señalización llevados a cabo. Además, en este plásmido se han clonado los diferentes receptores generados para su expresión en células eucarióticas.

El plásmido pEGFP-F (cedido por el Dr. David S. Ucker) se emplea para la expresión en células eucariotas de la proteína verde fluorescente GFP fusionada con la secuencia de farnesilación de p21^{ras}, empleada como control de transfección en diversos ensayos.

En los ensayos de actividad luciferasa se utilizan los plásmidos pRL-TK (Promega), que codifica la luciferasa de *Renilla* y se emplea como control interno del ensayo, el plásmido pNF-κB-luc (cedido por el Dr. David S. Ucker), codificante de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor con elementos de respuesta κB, y el plásmido p-73-luc (cedido por la Dra. Ana Aranda), codificante de la luciferasa de luciérnaga de luciérnaga de luciérnaga bajo el control de respuesta AP-1.

Para el ensayo de fosforilación de c-Jun se ha utilizado el plásmido pCDNA3B-HA-JNK (cedido por la Dra. Pila de la Peña), que codifica la quinasa JNK marcada con el epítopo HA.

Los plásmidos pCDNA3-hTNFR1 (cedido por el Dr. B.B. Aggarwal), codificante del receptor TNFR1 humano, y pCDNA3-hTRADD, codificante de la proteína TRADD humana, se han empleado para la expresión en células eucariotas.

Los plásmidos pFLAG-CMV-1-hDR6, codificante del receptor DR6 humano, pFLAG-CMV-1hDR6 Δ 239, codificante del receptor truncado DR6 Δ 239, y pFLAG-CMV-1-hDR6 Δ 239-345, codificante del receptor truncado DR6 Δ 239-345, han sido generados previamente en el laboratorio y se han empleado para la expresión en células eucariotas de los receptores que codifican fusionados con el epítopo FLAG y con señal de localización en membrana celular de pre-protripsina

Para la generación de partículas lentivirales se han empleado los plásmidos pCMVDR8.92, codificante de genes virales de la transcriptasa, pMD.2G, codificante de la envoltura del virus G de estomatitis vesicular, y pRSV-Rev, codificante de la proteína rev del HIV-1. El plásmido SIN-PGK-WHV ha sido empleado para la clonación en él de diversos receptores y su empaquetamiento en partículas lentivirales para la expresión de estos receptores en cultivos primarios. El plásmido SIN-PGK-FLAG HSP 104-WHS, codificante de la proteína HSP 104 fusionada con el epítopo FLAG, ha sido empleado como control de infección. Todos estos plásmidos han sido cedidos por la Dra. Ruth Luthie-Carter.

3.3.-Oligonucleótidos

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han utilizado los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 3.1, siendo todos ellos suministrados por Sigma Aldrich.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	Sentido	DIANA DE HIBRIDACIÓN	USO
JM7	GGAAGATCTGCCAGAACAGAAGGCCTCGAAT	Directo	hDR6	PCR, <mark>Bgl II</mark>
JM2	GGCTCTAGACTACAGCAGGTCAGGAAGATGG	Reverso	hDR6	PCR, Xba I, señal de stop
JM20a	ACTGTCGACTTTCAGAGTCCTCGAGCTTTTCC	Reverso	hDR6	PCR, Sal I
JM4	ACGGTCGACTTGGGCTGCTACAAGCTTCAG	Reverso	hDR6	PCR, Sal I
N5	TTATAGATCTGTTGTGGAGAAGATTCGTG	Directo	hDR6	PCR, Bgl II
N8	GTCCGTCGACATCAATGAGCATTTGCCC	Directo	hDR6	PCR, Sal I
Ju3	GCTCTCTAGA <mark>TCA</mark> GTCCAGGAGGAGGGTCTGGCTGG	Reverso	hDR6	PCR, Xba I, señal de stop
Ju4	GTCCGTCGACGAGGGTCTTGTTCAC	Reverso	hDR6	PCR, Sal I
Ju5	GTCGACAAGAAGGACACAGTGTTGCGG	Directo	hDR6	PCR, Sal I

Ju6	GCTGTCGACGTCTTCCATCAGCCCACG	Reverso	hDR6	PCR, Sal I
Ju7	GTCCGTCGACCCAAACCTTCAGGTAGTC	Directo	hDR6	PCR, Sal I
Ju8	GTCCGTCGACGAGTCGGAGCCCCTTCTC	Directo	hDR6	PCR, Sal I
Ju9	GCTCTCTAGATCAGTCACAGCGGAGAAGGGGGCTC	Reverso	hDR6	PCR, Xba I, señal de stop
Ju14	GTCCGTCGACTCCAACTCTTCTGCC	Directo	hDR6	PCR, Sal I
Ju13	GTCCGTCGACGACGTTGTCTGTCTC	Reverso	hDR6	PCR, Sal I
Ju18	GGAACGCGTACCATGTCTGCACTTCTG	Directo	hDR6	PCR, Mlu I
Ju19	GCCGGTAACCCTACAGCAGGTCAGGAAG	Reverso	hDR6	PCR, Bst Ell
Ju20	GCTGGTAACCCTAGTCACAGCGGAGAAG	Reverso	hDR6	PCR, Bst Ell
Ju21	GAAACGCGTGTGGGGATCCGTACCTTT	Reverso	SIN-PGK-WHV	PCR, Mlu I
Ju22	GCTGGTAACCAGGGCCCTTCGAACAAAA	Directo	SIN-PGK-WHV	PCR, Bst Ell
Ju23	AAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATT	Directo	SIN-PGK-WHV	Secuenciación
Ju24	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTC	Reverso	SIN-PGK-WHV	Secuenciación
PCMV1	ATGTCGTAATAAQCCCCGCCCCGTTGACGC	Directo	pFLAG-CMV-1	Secuenciación
PCMV2	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC	Reverso	pFLAG-CMV-1	Secuenciación
PCMV3	AGTGGTTCACGCCTGTAATCCCAGCAA	Reverso	pFLAG-CMV-1	Secuenciación
tGFP-F	ACCTGCACCCCATGGGCGAT	Directo	GFP	PCR
tGFP-R	CGGGGTCTTGAAGGCGTGCT	Reverso	GFP	PCR
LK5	CAGAAGACTGTGGATGG	Directo	GAPDH	PCR
LK6	ACCCTGTTGCTGTAGCC	Reverso	GAPDH	PCR
shRNA-F	CTTCAGTACTTTACAGAATC	Directo	pGIPZ	Secuenciación
shRNA-R	TCAAAGAGAGATAGCAAGGTAT	Reverso	pGIPZ	Secuenciación
DR6-F	CAGCCCCAACGCGAAAC	Directo	hDR6	QPCR
DR6-R	TCCGACTCATCCACGAAGAAG	Reverso	hDR6	QPCR
RatDR6-F	ACCCAGAACCGGAGAAATG	Directo	mDR6	QPCR
RatDR6- R	TGCGCTGCTACAAGCTTCAG	Reverso	mDR6	QPCR
Ratbact- F	ATCCTGACCCTGAAGTACCC	Directo	mβ-actina	QPCR
Ratbact- R	TACGACCAGAGGCATACAG	Reverso	mβ-actina	QPCR

B acting 1H	TATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTAC	Directo	hβ-actina	QPCR
B acting 2H	CTTGATGAGGTAGTCAGTCAGGTCC	Reverso	hβ-actina	QPCR
Mafk-F	CAAAGATACAAAAGCAGTCAC	Directo	mMafk	QPCR
Mafk-R	AAGTGAGTTTTCTGTCTTGTT	Reverso	mMafk	QPCR

Tabla 3.1: Lista de oligonucleótidos empleados en la presente Tesis Doctoral. Se detallan los oligonucleótidos empleados para diferentes funciones a lo largo del desarrollo de este trabajo. Se indica el nombre de cada oligo, junto con su secuencia 5'-3', su sentido, el gen o plásmido en el cual hibridan y el uso que se les ha dado. Se muestran en color azul aquellos sitios de reconocimiento de enzimas de restricción que se han añadido en la secuencia de los oligos para la construcción de diversos receptores, así como el enzima de restricción correspondiente en cada caso. En rojo se muestran los codones de parada añadidos en la secuencia de los oligos.

3.4.-Anticuerpos

En la Tabla 3.2 se recogen los anticuerpos empleados en el presenta trabajo junto con datos relevantes de cada uno.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL (REFERENCIA)	ESPECIE	APLICACIÓN	DILUCIÓN
Anti FLAG	Sigma-Aldrich (F3165)	Ratón	WB, IF	1:5000 (WB), 1:100 (IF)
Anti β-actina	Sigma-Aldrich (A5441)	Ratón	WB	1:10000
Anti Actina	Sigma-Aldrich (A5060)	Conejo	WB	1:10000
Anti HA 14CA5	Santa Cruz Biotechnology (sc- 57592)	Ratón	IP	0,4 μg/μl
Anti c-Jun Ser73	Cell Signalling Technology (9164)	Conejo	WB	1:5000
Anti IgG de ratón Alexa Flour 633	Invitrogen (A2105)	Ratón	IF	1:1000
Anti IgG de ratón IRDYE 800CW	Li-Cor Biotechnologies (926- 32210)	Ratón	WB	1:15000
Anti IgG de conejo IRDYE 600LT	Li-Cor Biotechnologies (926- 68021)	Conejo	WB	1:15000

Tabla 3.2: Lista de anticuerpos empleados en la presente Tesis Doctoral. Se muestran los anticuerpos empleados en el desarrollo del presente trabajo, indicando junto con el nombre de cada anticuerpo la casa comercial de los mismos, su referencia, la especie en la que fueron producidos, su aplicación práctica y la dilución o concentración en la que han sido utilizados. Las siglas WB corresponden a western-blot, IP corresponden a inmunoprecipitación e IF corresponden a inmunofluorescencia.

3.5.-Partículas virales

Para la generación de líneas celulares que presentan una inhibición estable de la expresión de DR6 se han empleado partículas lentivirales en suspensión que portan plásmidos pGIPZ (Open Biosystems, Thermo) con diferentes secuencias de shRNA dirigidos contra la secuencia del receptor. Las partículas virales empleadas portan el shRNA V2LHS_197222, el shRNA V2LHS_206208 o el plásmido pGIPz vacío.

Estas partículas lentivirales han sido generadas previamente en nuestro laboratorio, alicuotando y conservando los sobrenadantes resultantes tras la transfección de los correspondientes plásmidos virales en células HEK293T.

3.6.-Otros materiales y reactivos

El material fungible empleado en cultivos celulares (placas de cultivo, pipetas serológicas, rascadores, etc.) es de Falcon. Los filtros y material para filtrar es de la casa comercial Millipore. Las enzimas desglicosidasas empleadas para el tratamiento de medios de cultivo fueron PNGasa F, O-Glicosidasa y neuraminidasa, todas ellas suministradas por NewEngland Biolabs.

Los reactivos químicos generales empleados en este trabajo (SDS, glicina, EDTA, NaCl, Tris, etc.) han sido adquiridos a la casa comercial Sigma-Aldrich.

Para las reacciones de PCR se han empleado la polimerasa Kapa Hi-Fi, de Kapabiosystem, y la polimerasa GoTaq, de Promega. La primera se ha empleado para reacciones de amplificación con mayor fidelidad, mientras que la segunda se ha empleado para comprobar la integridad de las diferentes muestras de DNA. Los enzimas de restricción empleados fueron adquiridos a Takara, mientras que el enzima T4 DNA ligasa se ha adquirido a Fermentas. Para llevar a cabo las QPCR se ha empleado el kit *Power SYBR Green Master Mix*, de ThermoFisher.

Las electroforesis de DNA se han desarrollado empleando agarosa de la casa comercial USB Corporation, TAE de la casa comercial Invitrogen y bromuro de etidio de Sigma-Aldrich. Los marcadores de peso molecular empleados como referencia son λ DNA/Hind III y escalera de 100 pb, ambos de Invitrogen.

Las electroforesis de proteína realizadas en los análisis western blot se llevaron a cabo utilizando acrilamida/bisacrilamida de Bio-Rad, TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamina) y PSA (persulfato amónico), estos dos últimos de Sigma-Aldrich. Los marcadores pre-teñidos de referencia de peso molecular empleados fueron *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) mientras que las membranas de PVDF empleadas para la transferencia fueron *Immobilon-FL Ttransfer Membrane*, de Millipore.

Los reactivos empleados en citometría fueron ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) y RNAasa (Roche), además del kit para el estudio de marcadores de muerte celular *AnexinV-PE Apoptosis Detection Kit I*, de BD.

En los ensayos de análisis de luciferasa se ha empleado el kit *Dual-Luciferase™ Reporter Assay System*, de Promega, mientras que la proteína de fusión GST-cJun, empleada en los ensayos de activación de JNK, fue proporcionada por Cell Signaling.
MÉTODOS

4.-MÉTODOS

4.1.-Obtención y purificación de DNA plasmídico

4.1.1.-Transformación de *E. coli* con DNA plasmídico

Las células competentes *Escherichia coli* de la cepa XL-1 Blue se preparan según el método desarrollado por V. Simanis (Sambrook et al., 1989) y se congelan a -80°C. Para llevar a cabo la transformación se parte de 100 µl de células competentes recién descongeladas a las que se añade 1 µl de DNA plasmídico (15 ng/µl). A continuación se incuba durante 30 minutos en hielo para luego someter a las células a un choque térmico (90 segundos a 42°C) y enfriar de nuevo en hielo durante 90 segundos. Luego se añaden 0,3 ml de medio LB (extracto de levadura al 0,5%, triptona al 1% y NaCl al 1%) y se incuban 45 minutos a 37°C. Finalmente las bacterias se extienden sobre placas de medio sólido LB selectivo (LB con 1,5% de agar bacteriológico y con ampicilina 20 µg/ml o kanamicina 10 µg/ml, según los plásmidos transformados).

4.1.2.-Preparación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se ha preparado empleando el kit de purificación de plásmidos *Nucleobond AX* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. EL DNA obtenido se comprueba en geles de agarosa y se cuantifica midiendo su absorbancia a 260 nm.

Para la comprobación rutinaria de nuevos plásmidos construidos se llevó a cabo la purificación de DNA plasmídico siguiendo el método de lisis alcalina de Saambrook (Sambrook et al., 1989).

4.2.-Extracción de RNA y DNA genómico

4.2.1.-Extracción de RNA y transcripción reversa

La extracción de RNA de los cultivos celulares se realiza empleado el reactivo TRI-Reagent, siguiendo las especificaciones de la casa comercial. La concentración de RNA se determina midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en un espectrofotómetro Epperndorf.

La reacción de transcripción reversa (RT) se lleva a cabo empleando el enzima M-MLV transcriptasa reversa y partiendo de 2 μ g de RNA, que se diluye junto con 1 μ l de oligo dT y H₂O hasta una volumen de 12 μ l. La mezcla se incuba durante 5 minutos a 65ºC y posteriormente en

hielo 3 minutos. A continuación se añaden 4 µl de First Strand Buffer, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de dNTPs 10 mM. Se incuba 2 minutos a 37°C para luego añadir 1 µl de transcriptasa reversa y se incuba durante 50 minutos a 37°C. Por último, se detiene la reacción inactivando el enzima a 70°C durante 15 minutos.

4.2.2.-Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico, las células cultivadas en placa de 10 cm se lavan con PBS, se recogen y se lisan durante toda la noche a 37°C con agitación en tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 10 mM), suplementado con 50 µg de proteinasa K y 10% de SDS. A continuación se añaden 2,5 ml de NaCl 5 M, se agita y se centrifuga durante 15 minutos a 13000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se le añaden 5,6 ml de isopropanol para, a continuación, centrifugar 20 minutos a 13000 rpm a 4°C, tras lo cual se elimina el sobrenadante. El DNA precipitado se lava dos veces con 1 ml de etanol al 70% y se resuspende en 30 µl de H₂O MQ, guardándose para su conservación a -20°C.

4.3.-Análisis PCR

4.3.1.-Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar una región de cDNA o DNA genómico de interés mediante PCR se utiliza el enzima GoTaq polimerasa junto con un par de nucleótidos diseñados específicamente para su hibridación en las regiones flanqueantes de la secuencia de interés. La reacción se completa con los siguientes reactivos: 10 µl de *Colorless GoTaq FLexi Buffer*, 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada ilogonucloótido 10 µM, 1 µl de DNA molde, 0,25 µl de GoTaq polimerasa 5 U/µl y H_2O MQ hasta 50 µl.

Las reacciones de PCR se han realizado en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystem), mientras que las condiciones en las que se llevan a cabo las reacciones de PCR se muestran en la Figura 4.1. Los pares de oligonucleótidos empleados en cada caso se detallan a continuación:

- Para la amplificación de GAPDH (proteína empleada como control de la reacción de RT) se emplea LK5 y LK6, con una temperatura de hibridación de 55ºC.
- Para la amplificación de DR6 en líneas celulares humanas se emplean los oligonucleótidos
 DR6-F y DR6-R, con una temperatura de hibridación de

- Para la amplificación de DR6 en células murinas se emplean los oligonucleótidos RatDR6-F y RatDR6-R, con una temperatura de hibridación de
- La amplificación de la proteína GFP turbo se lleva a cabo con el par de oligonucleótidos tGFP-F y tGFP-R, con una temperatura de hibridación de
- •



Figura 4.1: Condiciones de la reacción de PCR. Se muestran las condiciones en las que se llevan a cabo las diferentes reacciones de RT-PCR, siendo Tm la temperatura de hibridación +/- 5°C de cada pareja de oligonucleótidos empleada en cada caso.

Los resultados de las reacciones de PCR se comprueban en gel de agarosa al 1% en TAE, utilizándose como marcadores del tamaño molecular de los fragmentos de DNA el marcador escalera de 100pb y visualizándose los fragmentos de DNA mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV.

4.3.2.-PCR cuantitativa

El análisis de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (QPCR) se ha realizado empleando el reactivo *Sybr Green PCR Master Mix* según las indicaciones de la casa comercial. Las muestras de cDNA fueron analizadas por triplicado, realizando a su vez tres repeticiones independientes de cada análisis. Para el diseño de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de QPCR se ha empleado el programa Primer Express v2.0 que, al igual que el termociclador AB Prism 7000, son de la casa comercial Applied Biosystem.

Como control endógeno de los niveles de cDNA de cada una de las muestras se utilizó el gen de la β -actina, mientras que para comprobar que sólo se produce un producto de amplificación en cada reacción se realizaron curvas de disociación y se separaron los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% en TAE para comprobar el tamaño de cada fragmento amplificado.

4.4.-Generación de receptores mutantes derivados de DR6

En la presente Tesis Doctoral se ha generado una colección de nuevos receptores derivados del receptor DR6 humano con diferentes deleciones en sus secuencias de nucleótidos. Para la generación de estos receptores se ha empleado una estrategia de amplificación de las diferentes partes del receptor y su posterior ligación empleando el enzima T4 DNA ligasa a través de diferentes sitios de reconocimiento de enzimas de restricción que se han añadido a las secuencias amplificadas.

Las reacciones de amplificación por PCR de las diferentes partes del receptor DR6 se llevaron a cabo empleando el enzima Kapa-HiFi polimerasa siguiendo las especificaciones del fabricante. Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystem), con las condiciones que se detallan en la Figura 4.2.



Figura 4.2: Condiciones de la reacción de PCR. Se muestran las condiciones en las que se llevan a cabo las diferentes reacciones de PCR para la generación de nuevos receptores, siendo Tm la temperatura de hibridación de la pareja de oligonucleótidos empleados en cada caso +/- 10°C. La duración del último paso de amplificación está definido por el tamaño (en Kb) del fragmento de DNA que se quiere amplificar.

Las reacciones de amplificación se comprueban en gel de agarosa al 1% en TAE, empleando los marcadores de peso molecular λ DNA/Hind III. A continuación se digieren con los enzimas de restricción correspondientes en cada caso para llevar, posteriormente, su ligación y clonación en los plásmidos adecuados. Una vez secuenciados los plásmidos en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Oviedo se lleva a cabo la transformación de células competentes.

Debido al uso de esta estrategia para la generación de nuevos receptores, aquellos receptores generados que presentan una deleción interna en la secuencia de DR6 adquieren los aminoácidos correspondientes al sitio de reconocimiento del enzima de restricción Sal I, sin que esto afecte a la integridad ni a la funcionalidad de estos receptores.

4.5.-Transfección transitoria de células eucariotas

Las líneas celulares HEK293 y HEK293T se transfectan en placas de 6 pocillos con una confluencia celular del 60% utilizando para ello el policatión polietilenimina (PEI). Los complejos de transfección se preparan mezclando 2 µg de DNA con 4,25 µg de PEI pH 7,5 en 200 µl de medio DMEM suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos para luego añadirla sobre las células, a las que se le ha cambiado previamente el medio por medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de aminoácidos no esenciales. Por último, después de 8 horas de incubación a 37°C en incubador se cambia el medio por medio completo.

La línea celular HeLa se transfectó en placas de 6 pocillos con una confluencia celular del 60%, utilizando el reactivo Lipofectamine PLUS en presencia de suero, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

4.6.-Análisis western blot

4.6.1.-Preparación de extractos celulares

Las células se recogen en tubos eppendorf mediante resuspensión o mediante rascado, realizando a continuación un lavado con PBS y se centrifugan a 1500 rpm a 4°C durante 5 minutos. A continuación las células se resuspenden en tampón de lisis frío (Tris-HCl 20 mM pH7,4, NaCl 250 mM, Tritón X-100 1%, DTT 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml y β-glicerolfosfato 25 mM) y se incuban durante 30 minutos en hielo. Luego se centrifugan a 4°C a 13000 rpm durante 15 minutos y se guardan los sobrenadantes en tubos nuevos.

La cantidad total de proteína se cuantifica mediante el método de Bradford y se preparan cantidades iguales de cada una de las muestras a analizar, a las que se añade tampón de carga Laemmli 1x (Tris HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, DTT 50 mM y azul de bromofenol al 0,01%) y se hierven 5 minutos a 95°C.

4.6.2.-Electroforesis y electrotransferencia

Las muestras diluidas en tampón de carga y hervidas se separan en un gel de poliacrilamida al 10% (30:1 acrilamida:bis-acrilamida) en un tampón que contiene Tris base 24,8 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%. Tras la electroforesis, las proteínas se electrotransfieren a membranas de PVDF en tampón de transferencia (Tris base 24,8 mM, glicina 192 mM, y metanol al 20% v/v) utilizando un sistema de transferencia húmeda. La transferencia se realiza durante 1 hora a 100 V y, una vez transferidos, los geles se tiñen con una solución de Coomasie (Laemmli, 1970) para verificar la eficacia de la transferencia.

4.6.3.-Incubación con anticuerpos

Tras la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF, éstas se incuban durante 30 minutos con agitación en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) con leche desnatada en polvo al 5% p/v o BSA al 0,25% p/v. Seguidamente, las membranas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Tween 20 0,1% v/v, con o sin leche desnatada en polvo al 5% p/v o BSA al 5% p/v durante toda la noche a 4°C en agitación.

A continuación se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en TBS-Tween y leche desnatada en polvo al 5% p/v durante 50 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y uno final de 10 minutos antes del escaneado de las membranas.

4.6.4.-Escaneado por infrarrojos

Las membranas incubadas con los diferentes anticuerpos secundarios se analizan tras su lavado en un escáner de infrarrojos Oddyssey Infrared Imaging System de LI-COR Biosciences. De esta forma se puede analizar la señal debida a dos anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos diferentes pudiendo diferenciar la señal emitida a 680 y 800 nm, observándose señales rojas o verdes, respectivamente.

4.7.-Inmunofluorescencia

Para llevar a cabo las tinciones de inmunofluorescencia las células se crecen sobre portas especiales (Lab-Tek II Chamber Slide, Nunc). Las células se transfectan tal y como se detalla en el apartado 4.5 con el plásmido codificante de cada uno de los receptores a estudiar y el plásmido pEGFP-F. Tras 48 horas de transfección las células se lavan con PBS y se fijan con 4% de paraformaldehído durante 25 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las células se lavan con PBS y se realizan dos incubaciones de 10 minutos con 50 mM de cloruro de amonio y con 20 mM de glicina, con lo que se consigue disminuir la autofluorescencia. Posteriormente las células se

permeabilizan durante 5 minutos con Tritón X-100 0,1% en PBS y se bloquean con medio de bloqueo (2,5% de suero de caballo en PBS).

Las células permeabilizadas y bloqueadas se incuban con el anticuerpo primario (anti FLAG) diluido 1:100 en medio de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual se lavan dos veces con PBS y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa 663 en una dilución 1:1000 en medio de bloqueo. Tras la incubación con los anticuerpos las células se lavan de nuevo con PBS y se incuban con DAPI (Sigma-Aldrich) 1 µg/ml durante 5 minutos para teñir los núcleos celulares. Por último se realiza un lavado con PBS y otro con H₂O y se colocan cubres con medio de montaje Vectashield (Vector).

Para la toma de imágenes se utiliza un sistema de microscopía láser confocal ultra-espectral Leica TCS-SP2-AOBS, utilizando un láser de argón con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de emisión de 520 nm para detectar la fluorescencia emitida por la proteína GFP, un láser de helio-neón con una longitud de onda de excitación de 543 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm para detectar la fluorescencia emitida por Alexa 633 y un diodo láser con una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 470 nm para detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo DAPI. El análisis y tratamiento de las imágenes obtenidas se ha realizado con el programa ImageJ.

4.8.-Ensayo de activación de la ruta de JNK

4.8.1.-Fosforilación de c-Jun

Las células HEK293, cultivadas en placas de 6 pocillos, se transfectan con 0,5 µg del plásmido HA-JNK junto con los plásmidos de expresión de los diferentes receptores estudiados en cada caso, manteniendo siempre la cantidad de DNA total transfectado con el vector control pFLAG-CMV-1. A las 48 horas después de la transfección, las células se recogen y se resuspenden en 200 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, pirofosfato sódico 2,5 mM, β-glicerolfosfato 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1 mM), incubándose en hielo durante 15 minutos para luego centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 2 minutos. Los sobrenadantes se pasan a tubos limpios y se cuantifica la proteína total presente mediante el método Bradford para incubar cantidades iguales de proteína con 1 µg del anticuerpo monoclonal de ratón anti HA 12CA5 durante 4 horas en agitación a 4°C, con el fin de inmunoprecipitar la proteína HA-JNK. Los inmunocomplejos formados se incuban con 20 µl de

proteína G unida a sepharosa (GE Healthcare) durante toda la noche en rotación a 4°C, tras lo cual se centrifugan a 2000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavan 2 veces con tampón de lisis y otras 2 veces con tampón quinasa (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, β -glicerolfosfato 5 mM, DTT 2 mM, ortovanadato sódico 0,1, MgCl₂ 10 mM).

Para analizar la activación de JNK por su capacidad para fosforilar c-Jun, los inmunocomplejos recuperados y lavados se resuspenden en 40 μ l de tampón quinasa suplementado con ATP 200 μ M y 1 μ g de GST-cJun. La reacción de fosforilación se lleva a cabo mediante incubación a 30°C durante 30 minutos y se detiene con la adición de 20 μ l de tampón Laemmli 3x. Las muestras se analizan mediante ensayo western blot utilizando el anticuerpo primario anti cJun-fosforilado (Ser73).

4.8.2.-Actividad transcripcional de AP-1

La activación de AP-1 en células HeLa, cultivadas en placas de 6 pocillos, se determina mediante un ensayo transcripcional midiendo actividad luciferasa. Las células se transfectan con el plásmido codificante del receptor de interés junto con 0,4 µg del plásmido p73-luc (codificante de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de las 73 primeras pb del promotor de la colagenasa humana, el cual contiene una secuencia de reconocimiento AP-1 entre las posiciones -73 y -63) y 0.05 µg del plásmido pRL-TK (codificante de la luciferasa de *Renilla*, con expresión constitutiva).

Para la determinación de la actividad AP-1 se utiliza el mismo sistema que en caso de la activación de NF-κB.

4.9.-Ensayo de activación de la ruta de NF-κB

Para estudiar la actividad del factor de transcripción nuclear κB se lleva a cabo un ensayo transcripcional luminométrico midiendo actividad luciferasa. Las células se transfectan con el plásmido que codifica el receptor de interés junto con 0,4 μg del plásmido pNF-κB-luc (codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor que contiene dos elementos de respuesta a κB) y 0,05 μg del plásmido pRL-TK (codifica la luciferasa de *Renilla* expresada de manera constitutiva al estar bajo control de la región promotora del gen timidina quinasa del virus HSV-TK), manteniéndose siempre las cantidades totales de DNA transfectado con el vector control pFLAG-CMV-1.

Ambas luciferasas tienen distintos sustrato, lo que hace posible discriminar entre la bioluminiscencia debida a la reacción de cada una de ellas. Los niveles de actividad de NF-κB

registrados se normalizan frente a la luciferasa de Renilla, considerándose como la unidad de activación la actividad correspondiente en la situación control del ensayo (transfección con el plásmido pFLAG-CMV-1). En el resto de condiciones, los datos se representan como veces de activación sobre la situación control.

Para medir la señal correspondiente a cada luciferasa se ha empleado el kit comercial Dual-Luciferase[™] Reporter Assay System, según las instrucciones del fabricante. La bioluminiscencia se determinó con un luminómetro Lumat LB 9507 de la casa comercial Berthold Technologies.

4.10.-Análisis de la inducción de muerte celular

4.10.1.-Cuantificación de la población celular hipodiploide

Durante el proceso de apoptosis celular, el DNA nuclear sufre un proceso de desintegración, lo que supone la aparición de una población celular con menos DNA que las células diploides normales a la que se denomina población hipodiploide o sub G₀/G₁. Mediante el análisis del contenido de DNA celular se puede cuantificar esta población.

Las células se transfectan con los plásmidos codificantes de los receptores de interés y con 0,2 µg del plásmido pEGFP-F, lo que permite la selección de las células transfectadas por su fluorescencia verde. Tras 48 horas de transfección, las células se recogen y centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C, para luego resuspenderlas en 500 µl de tampón H (HEPES 20 mM pH7,2, NaCl 0,16 M, EGTA 1 mM). A continuación se añaden 500 µl de tampón H suplementado con digitonina al 0,04% p/v y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las células. Posteriormente, las células se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos, se resuspenden en 1 ml de tampón H conteniendo RNasa A 200 µg/ml y yoduro de propidio (IP) 10 µg/ml, para luego incubarlas durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La señal del DNA teñido con el yoduro de propidio se analiza en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter) y se cuantifica la población celular hipodiploide usando el programa informático Cytomis RXP Analysis.

4.10.2.-Estudio de marcadores de muerte celular

La anexina V reconoce y se une a los lípidos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran orientados hacia el interior celular en condiciones normales. Sin embargo, durante el proceso apoptótico, estos fosfolípidos quedan expuestos, lo que permite la unión y detección de la anexina V en el exterior de las células. De esta manera, la anexina V sirve de indicador de apoptosis en combinación con otros marcadores, como el 7-AAD (7-amino-actinomicina D) o el IP. El 7-AAD es un fluoróforo capaz de interaccionar con el DNA cuando las membranas celulares se encuentran fragmentadas, empleándose, en combinación con anexina V, como marcador de apoptosis tardía. El marcaje único con 7-AAD se considera característico de procesos de necrosis celular.

Las células HeLa, cultivadas en placas de 6 pocillos, se transfectan con los plásmidos codificantes de los receptores de interés y 0,2 µg del plásmido pEGFP-F, empleado para la selección de las células positivas para la fluorescencia verde de la proteína GFP. Para el análisis de marcadores de muerte celular se determina el porcentaje de células positivas para anexina V y 7-AAD por citometría de flujo, empleando el kit comercial Annexin V PE Apoptosis detection Kit I (BD), siguiendo las instrucciones del fabricante y analizándose los datos utilizando el programa Cytomis RXP Analysis.

Las células HEK293, cultivadas y transfectadas de forma similar que las células HeLa, fueron analizadas por el Servicio de Citometría de la Universidad de Oviedo, siguiendo un protocolo similar al llevado a cabo en células HeLa para medir anexina V pero analizándose la tinción de yoduro de propidio en lugar de 7-AAD, ya que producen una tinción del DNA similar.

4.11.-Generación de líneas celulares con expresión estable de shRNAs para inhibir la expresión de DR6

Para la generación de líneas celulares que expresan de manera estable shRNAs dirigidos contra la secuencia de DR6 para inducir la inhibición de la expresión del receptor se han empleado partículas lentivirales en suspensión producidas previamente en nuestro laboratorio y que contienen plásmidos pGIPZ con la secuencia de diferentes shRNAs. Estos plásmidos, tal y como se puede observar el la Figura 4.3, presentan 2 secuencias LTR de integración en el genoma de células eucariotas entre las cuales se encuentra clonada la secuencia del shRNA correspondiente en cada caso, así como diferentes elementos útiles en la generación de las líneas celulares estables (gen de la proteína GFP turbo, gen de resistencia al antibiótico puromicina, etc).

Las células A549 y PC3 son infectadas con las diferentes partículas lentivirales empleadas en cada caso, comprobando la eficacia de la infección 72 horas después por microscopía de fluorescencia. A continuación se lleva a cabo la selección de las células infectadas mediante adición al medio de cultivo de 4 µg/ml de puromicina. Posteriormente, se comprueba la eficacia de la selección tanto por citometría, cuantificando el porcentaje de células verdes fluorescentes, como

por análisis de PCR de DNA genómico, comprobando la integración del gen de GFP en el genoma celular.

Para asegurar la continua selección de las células que han incorporado en su genoma los diferentes shRNAs empleados, las líneas celulares estables generadas se cultivan manteniendo la presencia de antibiótico en el medio de cultivo.



Figura 4.3: Representación esquemática del vector pGIPZ. EL vector pGIPZ presenta dos secuencias de repeticiones lasrgas terminales (LTR) para la integración en el DNA genómico celular del fragmento comprendido entre ellas, que incluye la secuencia del gen de GFP (tGFP), empleado como marcador de expresión del shRNA, la secuencia del gen de resistencia a puromicina (Puro^R), empleado como marcador selectivo de células de mamífero, y la secuencia del shRNA correspondiente (shRNA). La expresión de todos estos genes se encuentra regulada por el promotor de la RNA polimerasa II (CMV).

4.12.-Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional o 2DE (O'Farrell, P.H., 1975) es una técnica utilizada en proteómica para el análisis de mezclas complejas de proteínas, las cuales son separadas en función de sus propiedades físico-químicas mediante dos pasos diferenciados: primera dimensión o separación en función de su punto isoeléctrico (pl) y segunda dimensión o separación en función de su peso molecular.

4.12.1.-Primera dimensión o Isoelectroenfoque

Las células se cultivan en placas de 6 pocillos y se recogen cuando alcanzan el 80-90% de confluencia, resuspendiéndolas en 600 µl de tampón UTATH (urea 7 M, tiourea 2 M,

amidosulfobetaína-14 (ASB-14) 1% p/v, hidroxietil disulfuro (HED) 50 mM) y lisándolas mediante sonicación durante 1 hora a temperatura inferior a 10°C. A continuación se añade a las muestras 0.5% v/v de tampón de isoelectroenfoque (*IPG Buffer*, GE Healthcare) de pH igual al de las tiras a utilizar, se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C para sedimentar los posibles restos celulares no lisados y, a continuación, se pasan por una columna de desalado 125 µl de cada muestra a analizar. Posteriormente, se cargan las muestras desaladas en sus correspondientes contenedores de primera dimensión o sarcófagos. Sobre la muestra situada en el interior del contenedor se coloca una tira que posee un gel en el que tiene lugar el isoelectroenfoque (Inmobiline[™] DryStrips), cubriéndola con aceite mineral para evitar que las proteínas difundan hacia la superficie del contenedor. El enfoque de las proteínas en la primera dimensión se realiza con el equipo Ettan IPGphor (GE Healthcare) durante 12 horas a 30 V, 250 VH a 500 V, 500 Vh a 1000 V y 8000 Vh a 5000 V.

4.12.2.-Segunda dimensión o SDS-Page

Una vez finalizada la primera dimensión, se equilibran las tiras 2 veces durante 30 minutos con el tampón de equilibrado (TRIS-HCl 50 mM pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,002% p/v). A continuación se lleva a cabo la segunda dimensión, que se realiza mediante una electroforesis SDS-PAGE utilizando geles de acrilamida al 10% suplementados con urea 6 M y HED 50 mM.

4.12.3.-Tinción de geles

Tras finalizar la separación electroforética, los geles se fijan con metanol 20% v/v y ácido acético 10% v/v durante al menos 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñen con una disolución de azul de Comassie (azul brillante R250 0,25% p/v, metanol 45% v/v, ácido acético 10% v/v) durante 1 hora para, a continuación, desteñirlos durante 24 horas con la disolución de fijación. Por último, los geles se escanean en un escáner ScanMaker 9800XL (Microtek).

4.13.-Espectrometría de masas MALDI-ToF

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite determinar y medir iones, en estado gaseoso, con diferente relación m/z (siendo m el peso molecular del ion y z su carga). Para ello, los espectrómetros de masas están formados por una fuente de ionización que produce los iones gaseosos, un analizador de masas capaz de separar los iones, un detector para registrarlos y un sistema informático para operar el espectrómetro y almacenar los datos obtenidos.

El espectrómetro MALDI-ToF posee una fuente de ionización del tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) (Karas, M. et al., 1985) en la que los analitos (péptidos, proteínas o nucleótidos) son cocristalizados con una matriz apropiada que absorbe la energía de un láser. Esta matriz transfiere dicha energía al analito, convirtiéndolo en iones gaseosos (principalmente de carga +1). La fuente de ionización va acoplada a un analizador de tiempo de vuelo ToF (*time of flight*) en el que los iones se separan en función de su relación m/z tras ser acelerados en un campo eléctrico, llegando a distintos tiempos a un detector situado al final del tubo.

4.13.1.-Preparación de las muestras

Las manchas proteicas de interés observadas en los geles se cortan y trocean en pedazos de aproximadamente 1 mm³. A continuación, se destiñen tras 2 incubaciones de 30 minutos a 37°C en agitación con un tampón compuesto por (NH₄)HCO₃ 25 mM, acetonitrilo 70/30 v/v y HED 50 mM. Seguidamente, los trozos de gel desteñidos se secan a 90°C durante 15 minutos para, posteriormente, realizar su digestión a 60°C durante 1 hora con 15 µl de tripsina 12 ng/µl y (NH₄)HCO₃ 25 mM. La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos a los que contribuyen los grupos carboxilo de lisinas y argininas. La digestión tríptica se detiene acidificando la muestra hasta pH inferior a 2 con ácido trifluoroacético (TFA) 1% v/v. Los péptidos se extraen por sonicación durante 10 minutos, se purifican mediante una cromatografía de fase reversa utilizando puntas Zip Tip[®] (Millipore) según las instrucciones del fabricante. Estas puntas contienen una matriz de C18 donde los péptidos quedan retenidos.

4.13.2.-Análisis de las muestras

La relación m/z de los péptidos procedentes de la cromatografía en fase reversa se determina con un espectrómetro MALDI-ToF Voyager-DE STR de la casa comercial Applied Biosystems. A partir de los datos obtenidos tras 200 emisiones del láser, se genera un espectro del rango indicado en cada caso. Las huellas peptídicas obtenidas se analizan con el programa Data Explorer v4.0 (Applied Biosystems) para obtener la relación m/z de los péptidos más representativos de dicho espectro. Las masas de estos péptidos se comprar con las masas teóricas recogidas en la base de datos UniProKB/Swiss-Prot con el programa Aldente (Tuloup M.H.C. et al., 2003).

4.14.-Análisis de proliferación celular

Las células se cultivan durante 5 días, sembrando 5 placas o pocillos por condición y partiendo del mismo número de células inicialmente en todos los casos. Para cuantificar el número de células se emplea una cámara de Neubauer. A continuación se recogen día tras día una de las placas o pocillos de cada condición y se cuantifican las células viables tiñendo las células con cristal violeta 1% y contando en la cámara de Neubauer aquellas células que se observan al microscopio de campo claro como positivas a la tinción.

4.15.-Sistema de expresión ectópica en cultivos primarios

Para la expresión ectópica de proteína en cultivos primarios de oligodendrocitos de rata, hemos llevado a cabo un sistema de infección viral de los cultivos con partículas lentivirales portadoras de los plásmidos de expresión de los receptores de interés.

Los receptores de interés fueron clonados en el plásmido SIN-PGK-WHV, al que se le añadieron en su secuencia los sitios de reconocimiento para los enzimas de restricción Bst EII y Mlu I. Estos sitios de restricción fueron también añadidos a la secuencia flanqueante de los receptores de interés para proceder a su clonación. Los plásmidos resultantes tras la clonación de los diferentes receptores fueron transfectados (siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la transfección con PEI) en células HEK293T junto con los plásmidos pCMVDR8.92, pMD.2G y pRSV-Rev, necesarios para la formación de partículas lentivirales.

Por cada condición, las células HEK293T se cultivan en 20 placas de 10 cm, con una densidad de 3x10⁶ células por placa. A continuación se produce la co-transfección de todos los plásmidos comentados anteriormente para, tras cambiar los medios de cultivo a las 8 horas, recoger todos los sobrenadantes a las 48 horas. Estos sobrenadantes se filtran con un filtro de 0,45 µm de poro para eliminar restos celulares y se centrifugan durante 10 minutos a 1000 rpm. A continuación se decanta en tubos y se ultracentrífuga a 19000 rpm durante 90 minutos a 4°C. Seguido de esto se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 300 µl de PBS suplementado con 1% de albúmina bovina sérica (BSA) para proceder a su alicuotado y congelación.

Las partículas virales así obtenidas se añaden directamente al medio neurobasal de los cultivos primarios de oligodendrocitos para proceder a su infección, comprobando la eficacia de la misma 72 horas después mediante señal fluorescente (debida a la proteína GFP, cuya secuencia se

50

ha clonado en los plásmidos de expresión SIN-PGK-WHV) y western blot (empleando el epítopo FLAG, presente en el extremo N-terminal de todos los receptores clonado

RESULTADOS

5.-RESULTADOS

5.1.-Interacción de DR6 con proteínas adaptadoras

El receptor de muerte 6, al igual que el resto de receptores de la superfamilia de TNFRs, necesita de la interacción con proteínas adaptadoras para la activación de las diferentes rutas de señalización celular en las que participa. Estas interacciones receptor-proteínas adaptadoras ocurren a través de los dominios intracelulares de los receptores de esta superfamilia, principalmente a través de sus dominios de muerte (DD) y sus sitios de interacción con proteínas TRAF. En el caso del receptor DR6, tan sólo se ha descrito su interacción con TRADD, mientras que estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han sido incapaces de identificar la interacción de DR6 con las principales proteínas TRAF involucradas en la señalización de los TNFRs (TRAF1, TRAF2, TRAF3 y TRAF6). Así mismo, en nuestro laboratorio se ha descrito que el DD no es imprescindible en la señalización de DR6, a pesar de que se ha descrito la interacción de DR6 con TRADD a través de este dominio participando en la ruta de señalización de NF-κB en células HEK293.

Por ello, hemos llevado a cabo un estudio de la interacción de DR6 con la proteína TRADD de forma indirecta, estudiando en diferentes rutas de señalización el efecto de sobreexpresar ambas proteínas en células HeLa mediante transfección transitoria, con el propósito de conocer la participación de esta proteína adaptadora en la señalización del receptor.

5.1.1.-Interacción DR6-TRADD en la ruta de señalización de JNK

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio revelan que DR6 induce la activación de la ruta de señalización de JNK en células HeLa, siendo ésta una de las rutas más importantes en las que el receptor participa. Para conocer la participación de TRADD en la activación de esta ruta de señalización hemos llevado a cabo un ensayo de activación del factor de transcripción AP-1 en células HeLa (la activación de AP-1 se produce principalmente tras su fosforilación por JNK).

Los resultados obtenidos (Figura 5.1) muestran que la sobreexpresión de TRADD es capaz de inducir la activación de esta ruta de señalización, con unos niveles de actividad ligeramente superiores a los mostrados por el receptor TNFR1, aunque inferiores a los mostrados tras la sobreexpresión y activación de DR6. Por otro lado, la co-expresión de DR6 y TRADD induce una activación de esta ruta de señalización mayor que la inducida por la sobreexpresión de DR6 o TRADD por separado cuando se transfecta la misma cantidad de DNA de los plásmidos codificantes de cada

proteína por separado que la cantidad de DNA empleada para cada proteína en la co-transfección. En este caso, se alcanzan unos niveles de activación 7 veces por encima del control negativo del ensayo, frente a las 4 y 3 veces mostradas por DR6 y TRADD, respectivamente. La co-transfección de los plásmidos codificantes de DR6 y TRADD muestra incluso unos niveles de actividad ligeramente superiores a los obtenidos tras la transfección de la misma cantidad de DNA del plásmido codificante de DR6 que la cantidad total empleada en la co-transfección para las dos proteínas.



Activación de AP-1

Figura 5.1. Efecto de la co-expresión de DR6 y TRADD en la activación del factor de transcripción AP-1. Representación gráfica de los resultados del análisis luminométrico de la actividad del factor AP-1 a las 48 horas tras la transfección de células HeLa con 1 µg de los plásmidos codificantes de cada proteína indicada, 0,05 µg del plásmido codificante de GFP (proteína empleada como control de transfección), 0,05 del plásmido de luciferasa de Renilla y 0,4 µg del plásmido p71-Luc (codifica la luciferasa de luciérnaga con sitios de unión al factor de transcripción AP-1). En el caso de la expresión conjunta de DR6 y TRADD, se han utilizado 0,5 µg de DNA plasmídico codificante de cada proteína y, para valorar la actividad resultante de la sobreexpresión de estas proteínas al emplear esta cantidad de DNA plasmídico, se ha han transfectado células con 0,5 µg del plásmido codificante de cada una de las proteínas y 0,5 µg del plásmido pFLAG-CMV-1. Como control negativo del ensayo las células se transfectaron con el plásmido pFLAG-CMV-1 en lugar de los plásmidos codificantes de TRADD y los diferentes receptores.

5.1.2.-Interacción DR6-TRADD en la inducción de muerte celular

La interacción de TRADD con los TNFRs a través de sus DD es el principal mecanismo a través del que estos inducen la activación de la ruta apoptótica. En el caso de DR6, la carencia del DD en la secuencia del receptor no afecta a su capacidad para inducir apoptosis y se desconoce si TRADD interacciona con DR6 para activar esta ruta de señalización. Para conocer si esto ocurre, hemos

realizado un estudio de la inducción de muerte celular en células HeLa que sobreexpresan ambas proteínas.

En la Figura 5.2 se muestran los resultados del análisis citométrico de la población celular hipodiploide inducida tras la sobreexpresión de DR6, TRADD y ambas proteínas conjuntamente. El porcentaje de células hipodiploides es una medida directa de la inducción de muerte celular en cada caso. Tal y como muestran los resultados, la sobreexpresión de TRADD en células HeLa induce una activación de esta ruta similar a la observada en el caso de TNFR1, ambas mayores que la observada tras la activación de DR6 (42,37% y 48,79% frente a 26,05%, respectivamente). Al estudiar la expresión conjunta de TRADD y DR6, los resultados obtenidos muestran que la co-expresión induce unos niveles de muerte celular similares a los observados ante la sobreexpresión de TRADD (mayores que los correspondientes observados para DR6), empleando en la transfección las mismas cantidades de DNA plasmídico codificante de la proteína. En esta ruta de señalización, la sobreexpresión conjunta de DR6 y TRADD no induce una respuesta superior a la mostrada al transfectar la misma cantidad de DNA total exclusivamente con el plásmido codificante de TRADD.



Figura 5.2. Estudio de muerte celular inducida por la co-expresión de DR6 y TRADD. Análisis citométrico de células HeLa transfectadas con 1,3 µg de los plásmidos codificantes de las proteínas indicadas en cada caso y con 0,2 µg del plásmido codificante de la proteína GFP. Las células se analizaron a las 48 horas de transfección mediante su tinción con IP y el uso de citometría de flujo, seleccionando aquellas células positivas para GFP. En los ensayos de co-transfección se emplearon 0,65 µg de cada plásmido indicado en cada caso. La transfección de células HeLa con el plásmido pFLAG-CMV-1 se toma como control negativo del ensayo. Se indica en cada caso el porcentaje celular hipodiploide, localizado en la región C.

Con el fin de confirmar los resultados del ensayo de población hipodiploide, llevamos a cabo un estudio citométrico de los marcadores de muerte celular anexina V y 7-AAD. La anexina V es una proteína de la membrana citoplasmática que aparece unida a la fosfatidilserina en la cara interna de dicha membrana. En los procesos apoptóticos tempranos este fosfolípido pasa a la cara externa de la membrana citoplasmática, lo que puede ser puesto de manifiesto por la unión de anexina V. Por su parte, el fluoróforo 7-AAD atraviesa las membranas celulares y se une al DNA en el núcleo celular, siendo posible su detección únicamente en procesos de apoptosis celular tardía y necrosis.



Figura 5.3. Análisis de marcadores de muerte celular inducida por la interacción DR6-TRADD. Las células HeLa, tras 48 horas de su transfección con los plásmidos codificantes de las proteínas indicadas en cada caso y el plásmido codificante de la proteína GFP, se analizaron mediante citometría de flujo para conocer el porcentaje celular positivo para anexina V y 7-AAD. Se muestra en A) el análisis citométrico, junto con los porcentajes de población celular positivos para cada caso. En B) se muestra la representación gráfica de los resultados anteriores.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de los marcadores anexina V y 7-AAD se exponen en la Figura 5.3, donde se pueden observar los diferentes diagramas de puntos obtenidos

en cada caso (Figura 5.3, panel A) y la cuantificación de los mismos (Figura 5.3, panel B). Estos resultados confirman la inducción de apoptosis tras la sobreexpresión tanto de DR6 como de TRADD, mostrando un aumento de la población celular positiva para anexina V y anexina V+7-AAD, no así en células positivas únicamente para 7-AAD. De igual forma, se observa que en este análisis la inducción de muerte celular por la combinación de DR6 y TRADD es mayor que la observada al expresar ambas proteínas por separado, obteniéndose un porcentaje de células apoptóticas del 32,77% en el caso de DR6-TRADD, frente al 22,4% de DR6 y el 26,83 de TRADD, transfectando la misma cantidad de DNA plasmídico para cada proteína por separado que en la transfección conjunta. En este caso, el porcentaje de células apoptóticas observado en la expresión conjunta de ambas proteínas es similar al resultante tras la sobreexpresión de TRADD empleando una cantidad de DNA total igual que la suma de los plásmidos co-transfectados.

5.2.-Análisis de la estructura primaria de los dominios de DR6

Como se ha comentado previamente, estudios realizados en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que el dominio de muerte de DR6 no participa en la activación de las rutas de señalización intracelulares en las que el receptor está involucrado. Por ello, hemos realizado un análisis de la estructura primaria del receptor, con el objetivo de estudiar las posibles diferencias presentes en su secuencia de aminoácidos que expliquen la falta de actividad de su DD. De igual forma, estudiaremos el resto de la secuencia del receptor para identificar regiones conservadas que puedan tener cierta funcionalidad en los diferentes procesos que DR6 lleva a cabo.

A pesar de que un dominio de muerte está definido por la estructura secundaria y terciaria que adopta la cadena proteica, no tanto por su estructura primaria, existen aminoácidos clave en dicha cadena que han de compartir determinadas características para el mantenimiento de su conformación espacial y para su actividad. El análisis mostrado en la Figura 5.4, panel A revela, al alinear y comparar sus secuencias primarias, el escaso porcentaje de identidad entre los DD de los diferentes DRs, incluido DR6. En este análisis puede observarse cómo ciertos aminoácidos en posiciones concretas sí se conservan en todos los DD analizados (Tyr47, Leu65, Trp53 y Leu65), mientras que en otras posiciones aparecen aminoácidos que, si bien no son idénticos en todos los DD analizados, comparten características similares (Ile5, Ile20, Glu22, Glu44, Leu61, Glu79, Ile81). Por otra parte, el DD de DR6 presenta, en determinadas posiciones, algunos aminoácidos totalmente diferentes a los que se encuentran en posiciones equivalentes de los otros DDs analizados, produciéndose cambios en la polaridad de los aminoácidos presentes en estas posiciones (Gln12, Thr40, Gly57), cambios en la carga que éstos presentan (Gln22, Phe23, Ala33, His68) o cambios en su estructura (Val13, Asn26, Val32).

A)	
DR6	HGIDILKLVAAQVGSQWKDIYQFLCNASEREVAAFSNGYTA-DHERAYAALQHW 53
CD95	NLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNG-VNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNW 59
TNFR1	TLYAVVENVPPLRWKEFVRRLG-LSDHEIDRLELQNGRCLREAQYSMLATW 50
DR3	QLYDVMDAVPARRWKEFVRTLG-LREAEIEAVEVEIGR-FRDQQYEMLKRW 49
DR4	-DPTETLMLFFDKFANIVPFDSWDQLMRQLD-LTKNEIDVVRAGTAG-PGDALYAMLMKW 57
DR5	-DPTETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLG-LMDNEIKVAKAEAAG-HRDTLYTMLIKW 57
	:: :***
DR6	TIR <mark>B</mark> PEASLAQLISALRQ <mark>H</mark> RRNDVVEKIRGL 84
CD95	HQLHG-KKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDIT- 97
TNFR1	RRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDIE 81
DR4	VNKTG-RNASIHTLLDALERMEERHAREKIQDLLVDSGKF 96
DR3	RQQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLR 77
DR5	VNKTG-RDASVHTLLDALETLGERLAKQKIEDHLLSSGKF 96
	: *. :.:.
В)	
DR6DD	HGIDILKLVAAOVGSOWKDIYOFLCNASEREVAAFSNGYTADHERAYAALOHWTIRGPEA 60
EDARDD	VVKTWRHLAESFG-LKRDEIGGMTDGMOLFDRIS-TAGYSIPE 41
p75DD	õpe 29
2	*:::* : : :
DR6DD	SLAQLISALRQHRRNDVVEKIRGL 84
EDARDD	LLTKLVQIERLDAVESLCADI 62
p75DD	HIDSFTHEACPVRALLASW 48

Figura 5.4. Estudio de la estructura primaria del DD de DR6. A) Alineamiento de la estructura primaria de los DD del grupo de DRs. Se compara la secuencia de aminoácidos del DD de DR6 con las de los otros miembros de DRs. Se indica el grado de similitud entre aminoácidos en orden creciente con los símbolos "." ":" y "*". En la secuencia aminoacídica del DD de DR6 se destacan en rojo los aminoácidos que presentan los cambios más significativos en comparación con los demás DD analizados. B) Alineamiento de la estructura primaria de los DD del subgrupo de DR6. Se analizan las secuencias de los DD de los receptores pertenecientes al subgrupo de DRs en los cuales se clasifica DR6, caracterizados todos ellos por inducir una señalización celular atípica. El grado de similitud se indica en orden creciente con los símbolos "." ":" y "*".

De igual forma, hemos llevado a cabo el alineamiento y comparación de las secuencias aminoacídicas de los DD de los receptores del subgrupo de DRs al que pertenece DR6 (Figura 5.4, panel B). Los resultados de este análisis muestran que los aminoácidos de la secuencia del DD de DR6 que aparecían cambiados en comparación con los otros DD no se comparten en los dos receptores de este subgrupo, con la excepción del residuo Val32. Sin embargo, se puede observar que las estructuras primarias de los DD del receptor EDAR y del receptor p75 presentan grandes deleciones en su secuencia de aminoácidos que no aparecen en el DD de DR6 ni en los DD de los demás DRs.



Figura 5.5: Análisis de la estructura primaria del DR6 de diferentes especies. Se analiza la secuencia de aminoácidos de DR6 humano junto con la de otros mamíferos (ratón y vaca), aves (gallo, gorrión) y peces (pez cebra). En color verde se muestran los 4 CRDs de la región extracelular de DR6, en rosa el dominio transmembrana, en azul los dos dominios de unión a TRAFs, en gris el DD y en color rojo se muestra la cola citoplasmática del receptor. Los grados de similitud se indican en orden creciente con los símbolos "." ":" y "*".

Los cambios en la secuencia aminoacídica del DD de DR6 encontrados en los análisis de la Figura 5.4, podrían explicar la falta de funcionalidad de este dominio encontrada en los estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Estos mismos estudios también confirman que la cola citoplasmática del receptor participa activamente en la señalización, siendo imprescindible la conservación de esta región intracelular para mantener la capacidad de transducción de señales del receptor. En el extremo C-terminal de esta cola citoplasmática se ha descrito un posible dominio CARD (de *Caspase Activation and Recruitment Domain*), aunque no se ha confirmado, mientras que en lo que resta de región intracelular de DR6 solamente hay descritos dos posibles sitios de unión a proteínas TRAF situados en la parte del receptor comprendida entre el dominio transmembrana y el DD. Por tanto, el siguiente paso dado en nuestro estudio ha sido llevar a cabo un análisis del grado de conservación de la estructura primaria de DR6 en diferentes especies animales, con el fin de corroborar la importancia evolutiva de la región C-terminal del dominio intracelular del receptor, así como del resto de regiones intracelulares y extracelulares que puedan tener determinada importancia biológica.

Por ello, hemos llevamos a cabo un análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de los receptores de las especies mostradas en la Figura 5.5, con representantes de mamíferos, aves, peces y anfibios. Se puede observar cómo la secuencia proteica de los CRDs, en la región extracelular, se encuentra muy conservada en las diferentes especies analizadas, resaltando la importancia que tienen estos dominios en la interacción receptor-receptor y receptor-ligando. Centrando la atención en la región intracelular del receptor, podemos comprobar el alto grado de conservación de toda esta región en las especies estudiadas, destacando que no solo el DD tiene un alto grado de conservación sino que, además de los sitios de unión a proteínas TRAF, la parte correspondiente a la denominada cola citoplasmática de DR6 se encuentra muy conservada evolutivamente; en especial los últimos 100 aminoácidos de esta región, que coinciden con el sitio donde se localizaría el dominio CARD-L.

CardLikeDomainDR6	STSSGSSALSRNGSFITKEKKDTVLRQVRLDPCDLQPIFDDMLHFLNPEELRVIEEIPQA	60
PYDandCARD	HFIDQHRAALIARVTNVEWLLD-ALYGKVLTDEQYQAVRAEPTN	43
ApoptosisAssociated	HFIDQHRAALIARVTNVEWLLD-ALYGKVLTDEQYQAVRAEPTN	43
CARDprotein14	LRQAKVLCQLDEEEVLHSPRL	41
CARDprotein11	RQCKVIDEQDEDEVLNAPML	41
HumanCARDProtein4	QLLKSNRELLVTHIRNTQCLVDNLLKNDYFSAEDAEIVCACPTQ	44
RIP2	QWIQSKREDIVNQMTEACLNQSLDALLSRDLIMKEDYELVSTKPTR	46
CARDprotein6	IERERKKLLEILQHD-PDSILDTLTSRRLISEEEYETLENVTDL	43
NLRfamilyprotein4	FIKDNSRALIQRMGMTVIKQITDDLFVWNVLNREEVNIICCEKVE	45
iCARDprotein	LKEKRKQFIRSVGEGTINGLLGELLETRVLSQEEIEIVKCENAT	44
Apaf1	SYIMDHMISDGFLTISEEEKVRNEPTQ	43
Caspase2	MQRYHQEALKKNRVMLARELVLKELMEHMIEKDIITIEMVEMIQAKSGS	49
	: : :	
CardLikeDomainDR6	EDKLDRLFEIIGVKSQEASQTLLDSVYSHLPDLL 94	
PYDandCARD	PSKMRKLFSFTPAWNWTCKDLLLQALRESQSY-LVEDLE 81	
ApoptosisAssociated	PSKMRKLFSFTPAWNWTCKDLLLQALRESQSY-LVEDLE 81	
CARDprotein14	TNSAMRAGHLLDLLKTRGKNGAIAFLESLKFHNPDVYTLVTGLQPD 87	
CARDprotein11	PSKINRAGRLLDILHTKGQRGYVVFLESLEFYYPELYKLVTGKEPT 87	
HumanCARDProtein4	PDKVRKILDLVQSKGEEVSEFFLYLLQ-QLADAYVDLRPWLL 85	
RIP2	TSKVRQLLDTTDIQGEEFAKVIVQKLKDNKQMGLQPYPEIL 87	
CARDprotein6	LKKSRKLLILVQKKGEATCQHFLKCLFSTFPQLAA 78	
NLRfamilyprotein4	QDAARGIIHMILKKGSESCNLFLKSLKEWNYPLFQDL 82	
iCARDprotein	VMDKARALLDSVIRKGAPACQICITYICEEDSHLAGTL 82	
Apaf1	QQRAAMLIKMILKKDNDSYVSFYNALLHEGYKDLAALLHDGIP 86	
Caspase2	FSQNVEFLNLLPKRGPNAFSAFCEALQETKQQHLAEMILKT 90	
_		

Figura 5.6. Análisis comparativo de diferentes dominios CARD. Mediante alineamiento de la secuencia de aminoácidos de dominios CARD procedentes de diferentes proteínas se estudia la similitud de la secuencia de la cola citoplasmática de DR6 con éstos. Los grados de similitud se indican en orden creciente con los símbolos "." ":" y "*".

Con el fin de corroborar la presencia de un dominio CARD o CARD-L en la estructura de DR6, hemos realizado una comparación de las secuencias de diferentes dominios CARD y la secuencia de la cola citoplasmática de DR6 para comprobar el grado de identidad entre ellas. Los resultados de este análisis, mostrados en la Figura 5.6, revelan que, mientras los dominios CARD de las proteínas estudiadas guardan un alto grado de identidad entre sí, esto no ocurre en el caso de la cola citoplasmática de DR6.

5.3.-Estudio de la funcionalidad de los dominios intracelulares de DR6

En los receptores pertenecientes al grupo de DRs, el dominio de muerte interacciona con proteínas adaptadoras, tales como FADD o TRADD, para iniciar la cascada de señalización que activa la ruta apoptótica. Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, el DD de DR6 carece de funcionalidad tanto en esta ruta de señalización como en las rutas de activación de JNK y NF-κB. Los resultados obtenidos tras el análisis de la estructura primaria de DR6 muestran que varias regiones intracelulares del receptor tienen un alto grado de conservación entre especies, lo que sugiere la conservación de su funcionalidad, aunque no hemos podido confirmar la presencia de nuevos dominios en la estructura del receptor. Por tanto, nuestro siguiente paso a dar en la caracterización de DR6 ha sido estudiar la funcionalidad de las regiones intracelulares de DR6 en las que hemos encontrado un alto grado de conservación.



Figura 5.7. Receptores empleados en el estudio de la región intracelular de DR6 involucrada en la activación de la cascada de activación. Representación esquemática del receptor DR6 junto con una serie de receptores mutados derivados de éste, que presentan diferentes deleciones en sus regiones intracelulares. En la región extracelular se muestran los 4 CRDs y los posibles sitios de glicosilación del receptor (N-glicosilaciones: triángulos rojos; O-glicosilaciones: triángulos verdes). En la región intracelular aparecen los dos posibles sitios de unión a TRAFs, el DD y la cola citoplasmática de DR6. Las regiones delecionadas aparecen en color tenue.

5.3.1.-Generación de receptores mutantes

Para afrontar el estudio de la región intracelular de DR6 y definir en ella las diferentes partes responsables de la activación de cada una de las rutas de señalización en las que el receptor participa, hemos generado una serie de receptores mutantes derivados del receptor DR6 humano, los cuales presentan diferentes deleciones en la secuencia citoplasmática del receptor. Un estudio funcional de estos receptores tras su activación indicará los dominios del receptor implicados en su señalización. Los nuevos receptores mutantes aparecen recogidos en la Figura 5.7.



Figura 5.8. Conformación tridimensional del receptor DR6 y receptores mutantes. La estructura tridimensional obtenida es una predicción obtenida a partir de la secuencia aminoacídica del receptor DR6 silvestre y de los receptores mutantes indicados en cada caso. Las diferentes regiones y dominios de los receptores se muestran en colores, siguiendo la leyenda que aparece en la figura. Las hélices y flechas indican las predicciones de hélices α y hojas β obtenidas.

Las deleciones obtenidas en los receptores mutantes afectan en mayor o menor medida a todas las regiones presentes en el dominio intracelular de DR6 (motivos de unión a proteínas TRAFs, DD y cola citoplasmática), estando en algunos casos varias de estas regiones afectadas. Por ello, hemos llevado a cabo un estudio de predicción estructural del receptor DR6 y de los receptores mutantes generados para comprobar en qué medida se puede estar produciendo un cambio en la conformación espacial del receptor que pueda afectar a los resultados obtenidos tras el análisis de estos receptores. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 5.8, donde se observan las predicciones estructurales de los receptores DR6 humano, DR6 Δ 501-580, DR6 Δ 379-489 y DR6 Δ 562, obtenidas mediante el uso del software libre l-Tasser. Aunque se pueden observar diferencias generales entre las estructuras conformacionales de los receptores, cabe destacar la predicción de la estructura del receptor DR6 Δ 379-489, en donde se observa que la disposición de la cola citoplasmática del receptor está mucho más próxima al dominio transmembrana, incluso plegándose sobre él. Aunque las estructuras de la Figura 5.8 son predicciones algorítmicas y no resultados reales, pueden ser útiles en la interpretación de los resultados del estudio funcional de los receptores mutantes generados.



Figura 5.9. Análisis de la expresión de los receptores mutantes generados. Se analizan mediante western blot los extractos de células HEK293 tras 48 horas de su co-transfección con 1,8 μg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso y 0,2 μg del plásmido codificante de la proteína verde fluorescente GFP, empleada como control de transfección. Todos los receptores presentan en su región N-terminal el epítopo FLAG, utilizado para su identificación (señal roja). En verde se observa la señal correspondiente a β-actina, usada como control de carga.

El análisis de la capacidad de transducción de señales de estos nuevos receptores mutantes se llevó a cabo mediante activación por sobreexpresión ectópica de los mismos en las líneas celulares HEK293 y HeLa, células que presentan una baja expresión constitutiva de DR6 pero que permiten el análisis de las rutas de señalización activadas por el receptor. Como paso previo al estudio funcional de los receptores mutantes en estos modelos celulares, comprobamos la correcta expresión de los mismos en las dos líneas celulares (Figura 5.9), al igual que su correcta localización en la membrana celular (Figura 5.10). Tomando como referencia la expresión y localización del receptor DR6 silvestre, los resultados muestran que todos los receptores se expresan y localizan de forma similar al receptor silvestre. Cabe destacar que al estudiar la expresión de DR6 mediante western blot se observan 2-3 bandas, que probablemente corresponden a los diferentes estados de glicosilación que los receptores pueden presentar.



Figura 5.10. Análisis de la localización celular de los receptores mutantes generados. Se muestran imágenes de microscopía confocal de células HEK293 tras 48 horas de su co-transfección con 1,8 μg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso y 0,2 μg del plásmido codificante de la proteína verde fluorescente GFP, empleada como control de transfección. Mediante inmunocitoquímica se puede observar la localización de los receptores empleando anticuerpos anti-FLAG (señal roja) y mediante tinción con DAPI se localizan los núcleos celulares (señal azul). La proteína GFP se emplea para definir la localización de la membrana celular (señal verde). En todos los casos se muestran las imágenes correspondientes a cada señal y la combinación de todas ellas.

5.3.2.-Análisis funcional de las regiones intracelulares de DR6

El estudio funcional de las diferentes partes de la región intracelular de DR6 se ha basado en la capacidad de los receptores mutantes (ver Figura 5.7) para activar las rutas de señalización de JNK, NF-ĸB o inducir la muerte celular. Estas rutas de señalización fueron previamente estudiadas en nuestro laboratorio, llegando a la conclusión de que el DD de DR6 no participa directamente en la activación de ninguna de ellas. Por tanto, en el presente estudio, analizaremos la funcionalidad de los dominios restantes de la región intracelular de DR6.

5.3.2.1.-Capacidad de activación de la ruta de señalización de JNK

La ruta de señalización de JNK es uno de los principales mecanismos moleculares en los que DR6 participa tras su activación, siendo descrita la participación del receptor a través de esta ruta en diversos procesos biológicos, como la diferenciación celular en el sistema inmunológico o la regulación del sistema vascular cerebral embrionario.

La capacidad de los receptores truncados (Figura 5.7) para inducir la activación de esta ruta de señalización se estudió en células HEK293 y HeLa siguiendo dos estrategias diferentes, debido a las particularidades específicas de cada línea celular. Así, en las células HeLa se llevó a cabo un estudio de la activación de JNK midiendo la activación del factor de transcripción AP-1. En las células HEK293, sin embargo, no se produce la fosforilación de AP-1 por JNK, por lo que es necesario emplear otra metodología. Debido a esto, en esta línea celular se ha estudiado la actividad de JNK midiendo su capacidad para fosforilar la proteína cJun en una reacción "in vitro".

En las células HEK293, la fosforilación de cJun tras la activación de los diferentes receptores mutantes estudiados indica el estado de activación de la ruta de JNK. En esta línea celular, los resultados obtenidos (Figura 5.11) muestran que la actividad que presenta DR6 silvestre se mantiene en el caso del receptor DR6 Δ501-580, cuya deleción sólo afecta al extremo N-terminal de la cola citoplasmática. Sin embargo, los receptores DR6 Δ562 y DR6 Δ646, con deleciones en el extremo C-terminal de la cola citoplasmática, son incapaces de mantener los niveles de actividad mostrados por el receptor silvestre. Los resultados obtenidos muestran también que el receptor DR6 Δ379-552, que presenta una región intracelular formada por los últimos 104 residuos de la cola citoplasmática, es incapaz de inducir una activación de esta ruta de señalización. Por otro lado, el receptor DR6 Δ379-489, cuya región intracelular está formada casi exclusivamente por la cola citoplasmática, tampoco muestra señal de actividad de JNK. Por su parte, el receptor DR6 Δ426-489, que presenta una región intracelular carente de DD, muestra unos niveles de actividad

similares a los del receptor DR6, algo que igualmente ocurre en el caso del receptor DR6 Δ426-552, receptor que además de perder la mayor parte del DD ha perdido los primeros 80 aminoácidos del extremo N-terminal de la cola citoplasmática pero que conserva los sitios de unión a TRAFs.



Figura 5.11. Estudio de la activación de la ruta de señalización de JNK por parte de los receptores mutantes en HEK293. A)Análisis western blot de la fosforilación de la proteína cJun como medida directa de la activación de JNK. Las células HEK293 se co-transfectan con 1,5 µg de los plásmidos codificantes de los diferentes receptores indicados en cada caso, 0,4 µg del plásmido pJNK, codificante de la proteína JNK con un epítopo HA, y 0,1 µg del plásmido codificante de GFP, empleada como control de transfección. Tras 48 horas de transfección se procede a la inmunoprecipitación de HA-JNK para llevar a cabo la fosforilación de cJun mediante reacción in vitro, tras lo cual se identifica mediante western blot esta fosforilación en la serina 73 de la proteína empleando el anticuerpo anti p-cJun. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A.

La actividad del factor AP-1 en células HeLa tras la transfección de los plásmidos codificantes de los diferentes receptores analizados se muestra en la Figura 5.12, en donde se puede comprobar cómo la actividad relativa resultante tras la activación del receptor DR6 silvestre es de más de 4 veces la actividad del control negativo, algo que también muestra el receptor DR6 Δ 501-580, carente de los 80 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la cola citoplasmática de DR6, pero con el resto de la región intracelular del receptor intacta. Sin embargo, las deleciones que afectan a la región C-terminal de dicha cola citoplasmática producen la pérdida total de la capacidad de activación de esta ruta de señalización, tal y como muestran los resultados obtenidos

al estudiar los receptores DR6 Δ 562 y DR6 Δ 646. Continuando con el estudio de esta ruta de señalización, llevamos a cabo el análisis de los receptores DR6 Δ 379-552 y DR6 Δ 379-489, los cuales carecen de los dominios de unión a proteínas TRAF y del DD pero el primero presenta los últimos 104 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática, mientras que el segundo presenta ésta en su totalidad. Los resultados muestran que en ambos casos no se produce la activación AP-1. Por su parte, los receptores mutados que presentan deleciones en el DD pero mantienen bien la cola citoplasmática completa (DR6 Δ 426-489) o al menos lo últimos 104 aminoácidos del extremo C-terminal de ésta (DR6 Δ 426-552) presentan unos niveles de actividad similares a los observados en el caso del receptor silvestre, reafirmando que el DD de DR6 no participa en la activación de esta ruta de señalización.



Actividad de AP-1

Figura 5.12. Estudio de la activación de la ruta de señalización de JNK en células HeLa por de los receptores DR6 mutados. Análisis luminométrico de la señal de luz emitida por los extractos de células HeLa después de 48 horas de cotransfección con 1 μg de los plásmidos de los receptores indicados en cada caso así como con 0,05 μg del plásmido de GFP (proteína empleada como control de transfección), 0,05 μg del plásmido de luciferasa de Renilla y 0,4 μg del plásmido p71-Luc (codifica la luciferasa de luciérnaga con sitios de unión al factor de transcripción AP-1).

Los resultados obtenidos tras la sobreexpresión de los receptores estudiados y el análisis de los diferentes extractos de células HEK293 (Figura 5.11) y de células HeLa (Figura 5.12) muestran un patrón de activación similar. En ambas líneas celulares, el receptor DR6 Δ 501-580, que carece de los primeros 80 aminoácidos de la cola citoplasmática de DR6, presenta unos niveles de actividad similares al receptor DR6 silvestre. Sin embargo, los receptores que han perdido la región C-terminal de la cola citoplasmática (DR6 Δ 562 y DR6 Δ 646) no son capaces de inducir la activación de JNK en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Por otra parte, tampoco presentan actividad
los receptores cuya región intracelular está formada exclusivamente por la cola citoplasmática de DR6 (DR6 Δ379-522 y DR6 Δ379-489). Finalmente, los receptores DR6 Δ426-489 y DR6 Δ426-552 presentan una capacidad inductora de esta ruta de señalización similar a DR6; siendo su característica común que ambos presentan un DD truncado y que mantienen intactas la región comprendida entre el dominio transmembrana y el DD (donde se encuentran los dominios de interacción con TRAFs) y los últimos 75 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática.

5.3.2.2.-Capacidad de activación de la ruta de señalización de NF-кВ

Otra de las rutas de señalización en las que se ha descrito la participación de DR6 es la que conlleva la activación de NF-κB, participando de esta forma DR6 en procesos de diferenciación celular y estando controlada, al mismo tiempo, la expresión del receptor por este factor de transcripción.

Por ello, decidimos estudiar también qué región citoplasmática del receptor participa en la iniciación de esta ruta de señalización, siguiendo una estrategia similar a la llevada a cabo en el estudio de la ruta de activación de JNK descrito anteriormente. Al igual que entonces, para conocer los dominios o sub-regiones intracelulares de DR6 que están implicados en la activación de NF-κB, estudiamos la capacidad activadora de los receptores mutados presentados en la Figura 5.7 y analizamos sus resultados en comparación con la actividad del receptor DR6 silvestre.

En la Figura 5.13, panel A se puede observar cómo la actividad de NF-κB inducida por DR6 en la línea celular HEK293 es unas 5 veces superior a la actividad del control negativo del ensayo. De forma similar, aunque con un nivel de activación ligeramente más bajo, el receptor DR6 Δ501-580, que presenta una deleción de los primeros 80 aminoácidos del extremo N-terminal de la cola citoplasmática, es capaz de inducir la activación de esta ruta de señalización. Por su parte, los receptores mutados que presentan el extremo C-terminal de su cola citoplasmática truncado (DR6 Δ562 y DR6 Δ646) son incapaces de alcanzar los niveles de activación de DR6. En el caso de los receptores DR6 Δ379-552 y DR6 Δ379-489, se produce la activación de NF-κB con unos niveles de actividad ligeramente superiores a los obtenidos en el caso del receptor DR6 silvestre. Al igual que estos dos últimos receptores, el receptor DR6 Δ426-489 es capaz de inducir la activación de esta ruta de señalización, aunque en este caso no se observa un nivel de actividad tan elevado. Sin embargo, el receptor DR6 Δ426-552, que carece del DD y los primeros 80 aminoácidos de la cola citoplasmática, muestra una ausencia de actividad para esta ruta de señalización.



Figura 5.13. Estudio de la capacidad de activación de la ruta de señalización de NF-κB a través de diferentes regiones intracelulares de DR6. Análisis luminométrico de la activación de NF-κB en células HEK293 (A) y HeLa (B). Las células fueron co-transfectadas con los plásmidos codificantes de cada uno de los receptores indicados (1,5 µg en células HEK293 y 1 µg en células HeLa) además de con 0,05 µg de los plásmidos pEGFP, codificante de la proteína verde fluorescente (empleada como control de transfección), 0,05 µg del plásmido codificante de la luciferasa de *Renilla*, y 0,4 µg del plásmido p73 NF-κB luc, codificante de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de sitios de unión de NF-κB. Tras 48 horas de transfección las células son lisadas y la señal luminiscente es medida como indicación del nivel de actividad de NF-κB en cada caso.

DR6 ∆646

DR6 4379-522 DR6 4379-489 DR6 4426-489 DR6 4426-522

1

0

pFLAG-CMV-1

DR6

DR6 4501-580

DR6 4562

68

En la línea celular HeLa (Figura 5.13, panel B), los resultados son similares a los obtenidos en las células HEK293, siendo la actividad relativa de NF-κB al activar DR6 unas 3 veces mayor que la del control negativo. Al igual que en la anterior línea celular, el receptor DR6 Δ501-580 induce la activación de esta ruta de señalización, pero esta capacidad inductora se pierde en el caso de los receptores DR6 Δ 562 y DR6 Δ 646, que presentan deleciones en el extremo C-terminal de la cola citoplasmática. Los receptores DR6 Δ379-552 y DR6 Δ379-489, al igual que ocurría en células HEK293, presentan unos niveles de actividad similares a los mostrados por DR6, siendo unos receptores que carecen de DD pero en los que la cola citoplasmática se mantiene intacta. Tal y como se muestra, el receptor DR6 Δ 426-489, que si bien carece de DD presenta los últimos 112 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática y que contiene los 2 sitios de unión a TRAFs, induce la activación de esta ruta de señalización. Pero, al igual que ocurría en células HEK293, el nivel de actividad registrado es menor que los dos receptores anteriores. Por último, el receptor DR6 Δ426-552, que presenta los motivos de unión a TRAFs y el extremo C-terminal de la cola citoplasmática pero carece de DD y de 80 aminoácidos en el extremo N-terminal de la cola citoplasmática, es incapaz de inducir la activación de NF-κB, al igual que ocurría tras la expresión de este receptor en la línea celular HEK293.

5.3.2.3.-Capacidad de inducción de muerte celular

La última ruta de señalización analizada en este estudio funcional de la región intracelular de DR6 es la ruta apoptótica, estando descrita la capacidad del receptor para activar esta ruta tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, los mecanismos de inducción de muerte celular que son activados por DR6 son diferentes dependiendo de las condiciones y de las células en las que DR6 se activa, cursando a través de la activación de diferentes caspasas (caspasa3, caspasa 6) e incluso a través de la activación de la ruta apoptótica mitocondrial.

Para el estudio de esta ruta de señalización hemos empleado los mismos modelos celulares que en los anteriores apartados de la caracterización funcional de la región intracelular de DR6, es decir, las células HEK293 y HeLa. Estudios previos demuestran que DR6 induce la activación de esta ruta de señalización en ambas líneas celulares, aunque la capacidad de inducir muerte celular de DR6 es inferior a la observada tras la activación de otros DRs, tales como TNFR1. Es en esta ruta, sin embargo, es donde mayor interés muestra la falta de funcionalidad del DD de DR6, al ser este dominio el mediador de la interacción entre los DRs y las proteínas adaptadoras TRADD y FADD para el inicio de la cascada de activación que conduce a la apoptosis celular. Así pues, empleando los receptores mutantes descritos en la Figura 5.7, llevamos a cabo el análisis de la implicación de las distintas partes de la región intracelular de DR6 en la inducción de muerte celular. Para ello hemos llevado a cabo un análisis del porcentaje de la población celular hipodiploide inducida tras la activación de cada receptor como medida directa de muerte celular apoptótica.



Figura 5.14. Análisis de la capacidad de los receptores DR6 mutados para inducir muerte celular en HEK293. Se cuantifica y muestra el porcentaje de células hipodiploides inducidas por los diferentes receptores indicados en cada caso, localizadas en la región C del histograma. Se analizaron las células por citometría de flujo siguiendo un protocolo de tinción del DNA mediante IP, tras 48 horas de transfección con 1,8 µg de los plásmidos codificantes de cada uno de los receptores indicados y 0,2 µg del plásmido codificante de la proteína verde fluorescente GFP. El porcentaje de células hipodiploides es una medida directa de la fragmentación nuclear causada por la muerte celular apoptótica.

Los resultados obtenidos en células HEK293 (Figura 5.14) muestran que el receptor DR6 es capaz de inducir un porcentaje de células hipodiploides del 24,65%, menor que el mostrado en el caso del receptor TNFR1 (control positivo del ensayo) pero el doble que el control negativo. En cuanto a los receptores mutantes estudiados, el receptor DR6 Δ 501-580 (que tiene delecionados los primeros 80 aminoácidos del extremo N-terminal de la cola citoplasmática) induce un porcentaje de células hipodiploides semejante al observado para DR6. Por otra parte, el receptor DR6 Δ 562, que no contiene los últimos 94 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática, y el receptor DR6 Δ 646, que carece de los últimos 10 aminoácidos del mismo extremo, pierden la capacidad de inducción de apoptosis mostrada por DR6 silvestre, con un

porcentaje de células hipodiploides entorno al 14%. Por último, los receptores DR6 Δ 379-552 (que únicamente presenta en su región intracelular los últimos 104 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática), el receptor Δ 379-489 (que carece de los motivos de unión a proteínas TRAFs y el DD pero mantiene intacta la cola citoplasmática), el receptor DR6 Δ 426-489 (que presenta un DD truncado) y el receptor DR6 Δ 426-552 (que ha perdido el DD y el extremo N-terminal de la cola citoplasmática, pero conserva los últimos 104 aminoácidos C-terminales de ésta y los dos sitios de unión a TRAFs) inducen la activación de apoptosis en células HEK293, observándose unos porcentajes de población hipodiploide del 21,07%, 24,06%, 20,4% y 31,85%, respectivamente.



Figura 5.15. Análisis de la capacidad de los receptores DR6 mutados para inducir muerte celular en células HeLa. Se muestra la cuantificación del porcentaje de células hipodiploides inducidas por los diferentes receptores indicados en cada caso, localizadas en la región C. Se analizaron las células por citometría de flujo siguiendo un protocolo de tinción del DNA mediante IP, tras 48 horas de transfección con 1,3 µg de los plásmidos codificantes de cada uno de los receptores indicados y 0,2 µg del plásmido codificante de la proteína verde fluorescente GFP. El porcentaje de células hipodiploides es una medida directa de la fragmentación nuclear causada por la muerte celular apoptótica.

En células HeLa, la inducción de apoptosis medida según el porcentaje de células hipodiploides (Figura 5.15) presenta unos resultados similares a los observados en el estudio de los diferentes receptores en la línea celular HEK293, observándose un porcentaje de células hipodiploides del 29,43% en el caso de DR6, en comparación con el 8,83% observado para el control

negativo. Por su parte, el receptor DR6 Δ 501-580, al igual que ocurría en células HEK293, es capaz de activar la ruta apoptótica en células HeLa, aunque induce un porcentaje de células hipodiploides menor que DR6 (21,26%). En cuanto los receptores DR6 Δ 562 y DR6 Δ 646 (ambos con deleciones en el extremo C-terminal de la cola citoplasmática) se observan unos porcentajes de población hipodiploide de 4,39% y 8,18% respectivamente, siendo por lo tanto ambos receptores incapaces de activar esta ruta de señalización, como ocurre en células HEK293. El análisis de los receptores que mantienen intacto el extremo C-terminal de la cola citoplasmática pero presentan deleciones en diferentes partes de la región intracelular de DR6, incluido el DD (DR6 Δ 379-552, DR6 Δ 426-489 y DR6 Δ 426-552) muestra que (como ocurre en las células HEK293) mantienen la capacidad apoptótica de DR6 silvestre, observándose unos porcentajes de 20,95%, 26,07% y 27,44% respectivamente. Por último, el receptor DR6 Δ 379-489 es igualmente capaz de inducir la activación de la ruta apoptótica, aunque el porcentaje de células hipodiploides observado es menor que el obtenido para DR6 (16,58% frente a 29,43%).

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en los estudios de población hipodiploide antes descritos y conocer de qué forma los diferentes receptores mutantes inducen el mecanismo de muerte celular en ambos modelos celulares analizados, llevamos a cabo un estudio de los marcadores de muerte celular anexina V y 7-AAD/ioduro de propidio. El IP ha sido empleado en el análisis de células HEK293 en lugar de 7-AAD por razones técnicas, siendo igualmente un marcador de necrosis y, en combinación con anexina V, de apoptosis tardía.

Así pues, en células HEK293 realizamos el análisis de anexina V e IP con los receptores mutantes mostrados en la Figura 5.7, además de analizar DR6 silvestre y el receptor TNFR1 como controles positivos del ensayo. En la Figura 5.16 se muestran los resultados de este análisis, en donde se puede observar que los receptores que han perdido la integridad del extremo C-terminal de la cola citoplasmática pierden su capacidad de inducir muerte celular, mientras que el resto de receptores, con deleciones que afectan al resto de regiones citosólicas del receptor, mantienen la actividad mostrada por DR6 en esta ruta de señalización, confirmando los resultados obtenidos en el análisis de población hipodiploide realizado anteriormente. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de muerte celular por parte de los receptores antes mencionados aumenta principalmente el porcentaje de células positivas para IP, indicando, por tanto, que la muerte celular observada en células HEK293 presenta características de necrosis celular.



Figura 5.16. Análisis de marcadores de muerte celular en células HEK293 transfectadas con receptores DR6 mutados. **A)** Análisis citométrico de los marcadores de muerte celular Anexina V e IP en células HeLa co-transfectadas con 1,8 µg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso y con 0,2 µg del plásmido de la proteína verde fluorescente GFP. El análisis fue realizado tras 48 horas de transfección. **B)** Representación gráfica de la cuantificación del análisis citométrico.

Paralelamente, en la línea celular HeLa llevamos a cabo el análisis de anexina V y 7-AAD tras la sobreexpresión y activación de los mismos receptores mutados que en células HEK293, mostrando los resultados de este análisis citométrico en la Figura 5.17. Se puede comprobar que, al igual que en la línea celular HEK293, el estudio de los marcadores anexina V y 7-AAD avala los resultados obtenidos tras el estudio de población hipodiploide. Sin embargo, a diferencia de lo observado en este ensayo llevado a cabo en células HEK293, la inducción de muerte celular



observada en HeLa aumenta el porcentaje de células positivas para anexina V por encima de las células positivas para 7-AAD, característica propia de la inducción de apoptosis celular.

Figura 5.17: Análisis de marcadores de muerte celular en células HeLa transfectadas con receptores DR6 mutados. A) Análisis citométrico de los marcadores de muerte celular Anexina V y 7-ADD en células HeLa co-transfectadas con 1,3 µg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso y con 0,2 µg del plásmido de la proteína verde fluorescente GFP. El análisis fue realizado tras 48 horas de transfección. **B**) Representación gráfica de la cuantificación del análisis citométrico.

Así pues, los ensayos de anexina V y 7-AAD en células HEKR293 y HeLa confirman los resultados obtenidos en los análisis de población hipodiploide llevados a cabo anteriormente,

mostrando que los receptores DR6 Δ562 y DR6 Δ646 (que carecen, respectivamente, de los últimos 104 y 10 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática) son incapaces de inducir la muerte celular. Estos ensayos también confirman que el resto de receptores mutados estudiados presentan unos niveles de inducción de muerte celular similares a los mostrados por el receptor DR6 silvestre en ambas líneas celulares, incluido el receptor DR6 Δ379-489, que carece de DD y de sitios de unión a proteínas TRAF. Sin embargo, los ensayos de anexina V y 7-AAD indican que los mecanismos por los que se induce la muerte celular tras la activación de los receptores analizados podrían ser diferentes en las células HEK293 y en las células HeLa.

5.4.-Estudio del procesamiento de DR6

La función principal de los TNFRs es la transducción de señales mediante la activación de diferentes cascadas de señalización a través de sus dominios intracelulares. Sin embargo, varios miembros de esta superfamilia también participan en diferentes procesos en los que es la región extracelular del receptor, mediante su truncamiento de la membrana plasmática, la que toma un papel protagonista. En el caso de DR6, la región extracelular del receptor también es procesada y liberada al medio extracelular, siendo descrito su papel como mediadora en procesos de diferenciación linfocitaria. Así mismo, la fracción extracelular de DR6 escindida es detectable en suero y ha sido propuesta como un posible biomarcador tumoral, correlacionándose su aumento con la presencia de determinados tumores.



Figura 5.18. Seguimiento de la expresión y procesamiento de DR6 tras la transfección transitoria en células HEK293. Análisis western blot de extractos celulares (**panel A**) y medios de cultivo concentrados (**panel B**) para el estudio de la expresión y procesamiento de DR6, respectivamente. En ambos casos las células HEK293 han sido transfectadas con 1,8 µg del plásmido codificante de DR6 humano y 0,2 µg del plásmido pEGFP (empleado como control de transfección). A continuación se han lisado, o recogido sus medios de cultivo, a las horas indicadas en cada caso. La señal del receptor corresponde a la mostrada con el anticuerpo anti FLAG, epítopo que presenta DR6 en su región N-terminal.

Para llevar a cabo este estudio, hemos concentrado y analizado los medios de cultivo en los cuales hemos cultivado células HEK293 previamente transfectadas con el plásmido de expresión del receptor. En esta línea celular y en las condiciones experimentales en las que hemos trabajado, la expresión del receptor y su procesamiento ocurren de forma paralela, alcanzándose un máximo

de expresión y de presencia de fracción procesada en los medios de cultivo a las 48 horas posteriores a la transfección (Figura 5.18).

El procesamiento de muchas proteínas extracelulares es inducible mediante tratamiento con PMA, tal y como ocurre con TNF α o RANKL, aunque esta inducción se produce de forma inespecífica, pudiendo afectar a mecanismos de procesamiento que cursan a través de rutas moleculares diferentes. En el caso de DR6, tal y como se observa en la Figura 5.19, el tratamiento con PMA induce un ligero aumento del procesamiento de receptor de forma progresiva desde que se produce la transfección celular hasta el máximo de expresión y procesamiento registrado a las 48 horas.



18 B) 16 14 Proteína Relativa 12 10 Sin Trat 8 +PMA 6 Δ 2 0 14h 24h 2h 48h

Figura 5.19. Efecto del tratamiento con PMA en la expresión de DR6. A) Análisis western blot de extractos de células HEK293 transfectadas con 1,8 µg del plásmido codificante de DR6 y 0,2 µg del plásmido codificante de la proteína GFP (empleada como control de transfección). Las células se analizaron tras su transfección a las horas indicadas en cada caso, siendo cultivadas tanto en ausencia como en presencia de 25µg/µl de PMA (*). La señal verde corresponde a la obtenida con el anticuerpo anti FLAG, epítopo que se ha añadido a la región N-terminal de la secuencia DR6, mientras que la señal roja corresponde a la obtenida con el anticuerpo anti actina, proteína empleada como control de carga. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A.

El procesamiento de muchas proteínas extracelulares es inducible mediante tratamiento con PMA, tal y como ocurre con TNF α o RANKL, aunque esta inducción se produce de forma inespecífica, pudiendo afectar a mecanismos de procesamiento que cursan a través de rutas moleculares diferentes. En el caso de DR6, tal y como se observa en la Figura 5.19, el tratamiento con PMA induce un ligero aumento del procesamiento de receptor de forma progresiva desde que se produce la transfección celular hasta el máximo de expresión y procesamiento registrado a las 48 horas.

Estudios previos en nuestro laboratorio confirmaron la implicación de las metaloproteasas de matriz (MMPs) en el procesamiento de DR6, observándose una disminución de la fracción procesada en los medios de cultivos al tratar las células con inhibidores de dichas proteasa. Sin embargo, en estos estudios se comprobó que los tratamientos con inhibidores de furina, proteína implicada en la activación de las MMPs, no producen una disminución del procesamiento del receptor. Para descartar la posibilidad de un mecanismo proteolítico alternativo en el que las MMPs no estén implicadas, hemos analizado posibles efectos secundarios que los inhibidores de furina pudieran causar en el modelo celular empleado en nuestros estudios de procesamiento. Así, como se puede observar en la Figura 5.20, los tratamientos con inhibidor de furina II en células HEK293 inducen un aumento de la expresión de DR6 de forma progresiva según se aumenta la concentración del inhibidor.



Figura 5.20. Efecto de los tratamientos con el inhibidor de furina II en el procesamiento de DR6. A) Análisis western blot de extractos celulares de HEK293 tras 48 de transfección con 1,8 µg del plásmido codificante de DR6 y 0,2 µg del plásmido pEGFP (se emplea la proteína verde fluorescente como control de transfección). Las células han sido cultivadas tras su transfección con las diferentes concentraciones de inhibidor de furina II indicadas. La señal roja corresponde a la del anticuerpo anti FLAG, epítopo que presenta el receptor DR6 transfectado. B) Cuantificación de A.

Así mismo, en nuestro laboratorio se han realizado estudios previos centrados en el procesamiento de DR6 que han puesto de manifiesto que la región espaciadora del receptor, comprendida entre los CRDs y el dominio transmembrana, juega un importante papel en este

RESULTADOS

mecanismo. Concretamente, la región comprendida entre los aminoácidos 239 y 345 se ha identificado como necesaria para que dicho procesamiento ocurra. Además, la región espaciadora de DR6 presenta múltiples sitios de unión a oligosacáridos, unidos tanto mediante enlaces tipo N como enlaces tipo O, habiendo sido descrita en nuestro laboratorio la inhibición de la glicosilación de DR6 como un mecanismo que impide el procesamiento del receptor, aunque sin detallar en qué medida afecta uno u otro tipo de glicosilaciones. El estado de glicosilación de DR6 puede comprenderse al observar la Figura 5.21, donde medios concentrados en los que se han cultivado células HEK293 transfectadas con el plásmido codificante de DR6 han sido tratados con distintas desglicosidasas que afectan a cada tipo de glicosidación: PNGasa F, que hidroliza enlaces tipo N, y O-glicosidasa/Neuraminidasa, que hidroliza enlaces tipo O. Se observa cómo los tratamientos con desglicosidasas que afectan a los enlaces N-glicosídicos producen una mayor disminución del tamaño molecular relativo de la fracción de DR6 procesada, lo cual concuerda con la presencia de un mayor número de N-glicosilaciones en la secuencia extracelular de DR6.



Figura 5.21. Análisis del estado de glicosilación de la fracción procesada de DR6. Análisis western blot de medios de cultivo en los que se han cultivado células HEK293 transfectadas con 1,8 µg del plásmido codificante de DR6 y 0,2 µg del plásmido codificante de GFP, proteína fluorescente empleada como control de transfección. Tras 8 horas de transfección se sustituyeron los medios de cultivo por medios libres de suero, que posteriormente fueron recogidos y concentrados mediante filtración. A continuación se trataron los medios concentrados durante 1 hora con las desglicosidasas indicadas en cada caso.

Teniendo en cuenta estos resultados, hemos procedido al estudio de la región comprendida entre los aminoácidos 239 y 345 de la región espaciadora de DR6 con el fin de acotar la región en la cual se produce la escisión de la parte extracelular del receptor, estudiando también en qué medida afectan al procesamiento las diferentes glicosilaciones que DR6 presenta en todo su dominio extracelular.

5.4.1.-Identificación de los sitios de procesamiento extracelulares de DR6

Para llevar a cabo la identificación del sitio de escisión del receptor DR6 dentro de su región espaciadora seguimos una metodología basada en la generación de receptores mutados derivados del receptor DR6 humano. Estos receptores han sido diseñados presentando deleciones de mayor o menor tamaño que afectan a diferentes partes de la región espaciadora de DR6. Debido a la presencia de los diferentes sitios de N- y O-glicosidación que el receptor tiene en su región extracelular, los receptores mutados han sido diseñados para que también se vean afectadas de diferente modo dichas glicosilaciones (Figura 5.22).



Figura 5.22. Receptores mutantes generados para el estudio del procesamiento de DR6. Representación esquemática del receptor DR6 y de los diferentes receptores generados que presentan diferentes deleciones en su región extracelular. En la región extracelular se muestran los 4 CRDs del receptor seguidos de la región espaciadora. En esta parte del receptor también se muestran los sitios de N- y O-glicosilación del receptor (triángulos rojos y verdes, respectivamente). A continuación del dominio transmembrana se indican los 2 sitios de unión a TRAFs, el DD y, por último, la cola citoplasmática. Las regiones delecionadas se muestran en color tenue.

Tras la clonación de los receptores mutados presentados en la Figura 5.22 en sus correspondientes plásmidos de expresión, se comprobó que todos ellos son correctamente expresados por las células HEK293. Los resultados mostrados en la Figura 5.23 indican que todos los receptores se expresan con normalidad en el modelo celular del estudio y, en cuanto al tamaño molecular relativo observado en el análisis western blot de la figura, se puede observar cómo la pérdida de los sitios de unión a cadenas glicosídicas tiene un efecto mucho mayor que la pérdida

de aminoácidos de la cadena proteica. Así pues, el receptor DR6 Δ 293-345, que presenta todos los sitios de unión a cadenas N-glicosídicas intactos, y el receptor DR6 Δ 211-255, que sólo pierde uno de los sitios de N-glicosidación, aparecen con un peso molecular mayor que el resto de mutantes analizados, a pesar de sufrir deleciones similares en su cadena de aminoácidos. El receptor DR6 Δ 239-292, que mantiene intactos todos los sitios de O-glicosilación excepto dos, no muestra un peso molecular mucho mayor que el receptor DR6 Δ 211-292, el cual carece de todos los sitios de glicosilación que DR6 presenta en su región espaciadora.



Figura 5.23. Expresión de los receptores mutados generados para el estudio del procesamiento de DR6 en células HEK293. Análisis western blot de extractos de células HEK283 co-transfectadas con 1,8 µg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso así como con 0,2 µg del plásmido codificante de la proteína verde fluorescente GFP. Las células son recogidas, lisadas y analizadas 48 horas después de su transfección. La señal verde observada es la obtenida con el anticuerpo anti FLAG, epítopo que poseen todos los receptores, y la señal roja es la obtenida con el anticuerpo anti actina, proteína empleada como control de carga en el ensayo.

Además de comprobar la correcta expresión de los nuevos receptores generados, para el estudio del procesamiento de DR6 es esencial que estos receptores se localicen correctamente en la membrana celular, ya que es aquí donde se produce el procesamiento del receptor. El análisis por microscopía confocal mostrado en la Figura 5.24 permite ver que la localización de los receptores mutados coincide con la membrana celular de las células HEK293, tal y como ocurre con el receptor DR6 silvestre. Como excepción, el receptor DR6 Δ 239, que será empleado como control en ensayos posteriores, se localiza intracelularmente pero no en la membrana celular, puesto que este receptor sólo presenta una fracción de la región extracelular de DR6 y carece del dominio transmembrana del receptor.



Una vez comprobada la correcta expresión y localización de los receptores mutados hemos procedido al análisis de los medios de cultivo de las células HEK293 en las que han sido transfectados los correspondientes plásmidos que los codifican. De esta forma, tal y como aparece en la Figura 5.25, hemos comprobado cómo los receptores DR6 Δ293-345 y DR6 Δ239-292 sufren un procesamiento similar al observado en el caso del receptor silvestre, apareciendo una fracción procesada en los medios. El tamaño molecular observado para la fracción procesada de DR6 Δ293-345 es similar a la que se observa en el caso de DR6, mientras que para el receptor DR6 Δ239-292 la fracción procesada aparece con un menor tamaño, similar a la observada en el caso del receptor

presente en todos los receptores.

obtenida con el anticuerpo anti FLAG, que se une a dicho epítopo,

RESULTADOS

DR6 $\Delta 239$. Estos dos receptores presentan deleciones complementarias respecto a la región delecionada en el receptor DR6 $\Delta 239$ -345, cuyo procesamiento había sido estudiado previamente en nuestro laboratorio y que, tal y como aparece en la Figura 5.25, no sufre un proceso de escisión extracelular. De este modo, a pesar de ser receptores que carecen de una parte de la región identificada como necesaria para que se produzca el procesamiento de DR6, la conservación parcial de esta región permite el procesamiento de ambos receptores mutantes. Por otra parte, el receptor DR6 $\Delta 211$ -292, que carece de la región en la que se localizan todos los sitios de glicosilación de la región espaciadora de DR6 pero conserva el extremo C-terminal de esta región, no es procesado. Por último, el receptor DR6 $\Delta 211$ -255, que presenta una deleción que afecta a todos los sitios de N-glicosilación del extremo N-terminal de la región espaciadora de DR6 pero mantiene 4 sitios de N-glicosilación y el extremo C-terminal de esta región, es procesado extracelularmente.



Figura 5.25: Estudio del procesamiento de receptores DR6 mutados con diferentes deleciones en su región extracelular. Análisis western blot de los medios de cultivo concentrados donde se han cultivado células HEK293 transfectadas con 1,8 μg de los plásmidos codificantes de los receptores indicados en cada caso y 0,2 μg del plásmido codificante de GFP, empleado como control de transfección. Tras 8 horas de transfección se han cambiado los medios de cultivo por medios libres de suero, para luego ser recogidos, centrifugados y filtrados empleando filtros de membrana con poros de 3KDa. La señal roja corresponde a la del anticuerpo anti FLAG, epítopo que presentan todos los receptores analizados. El receptor DR6 Δ239 ha sido empleado como control de procesamiento, pues carece de dominio de unión a membrana y es liberado directamente al medio extracelular.

Como siguiente paso en el estudio de la fracción procesada de DR6 llevamos a cabo un análisis del estado de glicosilación de las fracciones solubles de los receptores DR6 Δ 293-345 y DR6 Δ 239-292 presentes en los medios de cultivo de células HEK293, en las que se expresan estos receptores. En la Figura 5.26 se observa que el tratamiento conjunto con N- y O-desglicosidasas de los medios de cultivo en los que están presentes las fracciones procesadas de ambos receptores resulta en una disminución del tamaño molecular relativo de dichas fracciones, indicando que ambas se encuentran glicosiladas, al igual que ocurría con la fracción procesada del receptor DR6 silvestre. La mayor diferencia de movilidad electroforética, y por tanto en el tamaño molecular, se observa en el caso del receptor DR6 Δ 293-345, lo que corresponde con un mayor número de enlaces glicosídicos en su región extracelular no delecionada.



Figura 5.26: Estado de glicosilación de la fracción procesada de receptores mutados en la región extracelular de DR6. Análisis western blot de los medios de cultivo en los que han crecido células HEK293 transfectadas con 1,8 µg de los plásmidos de expresión de los receptores mutantes indicados en cada caso y 0,2 µg del plásmido pEGFP, utilizando la expresión de la proteína fluorescente GFP como control de transfección. Después de 8 horas de transfección se cambian los medios de cultivo por medios libres de suero, se recogen a las 48 horas y se concentran mediante filtración en filtros con poros de 3 kDa. Se compara la fracción procesada de los receptores, correspondiente a la señal del anticuerpo anti FLAG, con las mismas tras su tratamiento durante 1 hora con una combinación de desglicosilasas formada por PNG-asa, O-glicosidasa/neuraminidasa.

5.5.-Estudio de la inhibición de la expresión de DR6

El estudio de DR6 descrito en la presente Tesis Doctoral ha sido llevado a cabo mediante la sobreexpresión y activación del receptor en células cuya expresión constitutiva de DR6 es baja, con el fin de activar las rutas de señalización en las que participa. Sin embargo, hay varias líneas celulares tumorales en las que la expresión constitutiva de DR6 es significativamente alta, tal y como se ha descrito anteriormente en nuestro laboratorio, lo cual contradice su funcionalidad como receptor apoptótico. Por ello, hemos planteado un estudio centrado en la inhibición de la expresión de DR6 en líneas celulares tumorales que presentan una alta expresión del receptor con el fin de conocer su funcionalidad en estas células.

En la realización de este estudio hemos empleado dos modelos celulares basándonos en su alta expresión constitutiva del receptor, destacando en este aspecto la línea celular A549, derivada de adenocarcinoma de pulmón, y la línea celular PC3, procedente de adenocarcinoma de próstata. En la Figura 5.27 se puede observar los niveles de expresión de DR6 que estas dos líneas celulares presentan en comparación con otras líneas celulares analizadas.



Expresión de DR6

La inhibición de la expresión de DR6 se ha conseguido empleando una metodología basada en el uso de shRNA ("short hairpin RNA"), un RNA interferente con gran estabilidad molecular que puede ser expresado de forma estable tras su integración en el genoma celular. En el presente estudio, la integración genómica del shRNA se ha llevado a cabo mediante la infección celular con partículas lentivirales portadoras de los plásmidos pGIPZ, que portan en su secuencia los diferentes shRNAs y todas las características necesarias para dicha integración genómica. Para lograr el silenciamiento génico de DR6 hemos elegimos dos shRNAs diferentes que afectan a dos regiones distintas del receptor, shRNA2 (cuya secuencia interfiere con entre los nucleótidos 694 y 712 de la secuencia de DR6) y shRNA8 (que interfiere con los nucleótidos comprendidos entre la posición 2478 y 2496 de la secuencia de DR6). Además, hemos realizado una infección conjunta con ambos shRNA para valorar un posible efecto aditivo en la inhibición de la expresión de DR6, mientras que hemos utilizado en plásmido de expresión pGIPZ sin secuencia de shRNA como control negativo de inhibición. La expresión estable de los diferentes shRNAs utilizados, y por tanto la generación de nuevas líneas celulares, fue confirmada mediante análisis de la fluorescencia de las mismas, debido a que junto a los propios shRNAs también se inserta en el genoma celular la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente GFP.

Figura 5.27. Análisis de la expresión del mRNA de DR6 en diferentes líneas celulares. Se han cuantificado por PCR cuantitativa los niveles de mRNA de DR6 extraído de diferentes líneas celulares. Se ha tomado la expresión de DR6 en células HEK293 como referencia.

5.5.1.-Establecimiento de líneas celulares estables A549 DR6^{Neg}

Las líneas celulares obtenidas tras la infección de células A549 con las partículas lentivirales portadoras de los plásmidos codificantes de los diferentes shRNAs empleados han sido denominadas A549 DR6^{Neg}.

Para comprobar la integración genómica de los RNAs intereferentes en estas líneas celulares hemos llevado a cabo el estudio de la expresión de la proteína GFP, integrada en el genoma junto a la secuencia de los diferentes shRNAs, mediante análisis citométrico de la fluorescencia debida a la expresión de esta proteína. En la Figura 5.28 se muestra el resultado de este análisis, donde se puede comprobar que, a diferencia de la línea celular A549 original, la expresión de GFP se mantiene estable después de 20 divisiones celulares tras la infección con partículas lentivirales en las células que expresan shRNA2 (A549 shRNA2), en las que expresan shRNA8 (A549 shRNA8), en las que expresan conjuntamente shRNA2 y shRNA8 (A549 shRNA2+8) y en las células que han sido infectadas con el vector de expresión de los diferentes shRNAs pero sin secuencia de RNA interferente (A549 shRNAC).



Figura 5.28. Estudio de la generación y estabilidad de las líneas celulares A549 DR6^{Neg}. Análisis citométrico de la fluorescencia verde de las células A549 y de las direrentes líneas celulares A549 DR6^{Neg} indicadas en cada caso. Las células fueron analizadas después de realizar 10, 15 y 20 pases celulares tras la infección con los plásmidos portadores de la secuencia de los diferentes shRNAs empleados y de la secuencia de expresión de la proteína verde fluorescente GFP.

En análisis de la inhibición en la expresión de DR6 inducida por los diferentes shRNAs en las líneas celulares A549 DR6^{Neg} se ha llevado a cabo mediante PCR cuantitativa, mostrando los resultados de este análisis en la Figura 5.29. Se puede observar que, tras 10 divisiones celulares

después de la infección lentiviral, la expresión de DR6 en células A549 shRNA2 es del 50%, en comparación con la expresión de DR6 en células A549, mientras que en células A549 shRNA8 y shRNA2+8 la expresión de DR6 es de aproximadamente el 25%. Sin embargo, el seguimiento temporal de la inhibición del receptor, realizando análisis después de 15 divisiones celulares desde la infección celular, muestra que la inhibición de DR6 no se mantiene de forma estable, mostrando unos niveles de inhibición en torno al 50% para A549 shRNA2 y A549 shRNA2+8 y del 60% para shRNA8 tras 20 ciclos celulares. Cabe destacar también que las células A549 shRNAC, generadas como control de infección y carentes de RNA interferente, muestran una expresión de DR6 incrementada con respecto a la expresión del receptor en la línea celular A549.



Figura 5.29. Análisis de la inhibición de la expresión de DR6 en las líneas celulares A549 DR6^{Neg}. Representación gráfica de la cuantificación por PCR cuentitativa de los niveles de mRNA de DR6 en las células A549 y en las diferentes líneas celulares A549 DR6^{Neg} indicadas. El análisis se llevó a cabo tras 10, 15 y 20 pases celulares desde la infección de las células A549 con los plásmidos de integración en el genoma de los correspondientes shRNAs. La expresión del mRNA en células A549 se tomo como 100% de expresión.

Debido al incremento en la expresión de DR6 mostrado por las células control A549 shRNAC y a la débil e inestable inhibición lograda por los diferentes shRNA ensayados, consideramos oportuno no continuar con los estudios de inhibición de DR6 empleando las líneas celulares derivadas de células A549.

5.5.2.-Establecimiento de líneas celulares PC3 DR6^{Neg}

Las células PC3 fueron sometidas a la misma metodología que hemos descrito en células A549 para la integración genómica de los diferentes shRNAs anteriormente mencionados. En este

RESULTADOS

caso, las líneas celulares en las que hemos incorporado los diferentes RNAs interferentes han sido denominadas PC3 DR6^{Neg}.

El primer paso a dar en el estudio de las diferentes líneas celulares PC3 DR6^{Neg} ha sido la comprobación de la integración estable de los shRNAs empleados en el genoma celular. Para ello, hemos estudiado la expresión de la proteína GFP, cuya secuencia se encuentra presente en el fragmento plasmídico que se integra en el genoma celular junto a la secuencia de cada shRNA empleado en cada caso. De tal forma, mediante el análisis citométrico mostrado en la Figura 5.30, se puede observar que la fluorescencia causada por la expresión de GFP aparece en las células PC3 DR6^{Neg}, manteniéndose estable 20 divisiones celulares después del proceso de infección celular. De igual modo se puede observar tras este análisis que la línea celular A549 no presenta fluorescencia alguna.



Figura 5.30. Estudio de la estabilidad genómica de las líneas celulares PC3 DR6^{Neg}. Análisis citométrico de la fluorescencia verde en células A549 y A549 DR6^{Neg} tras 20 ciclos celulares. La fluorescencia observada se debe a la expresión de la proteína GFP, cuya secuencia se integra en el genoma celular, al igual que la secuencia de los diferentes shRNAs indicados en cada caso, tras la infección lentiviral.

A continuación, estudiamos la inhibición de la expresión de DR6 en las células PC3 DR6^{Neg} mediante PCR cuantitativa, analizando los niveles de expresión del receptor a lo largo de sucesivas divisiones celulares. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 5.31, donde se puede observar que la expresión de todos los shRNA en células PC3 induce una inhibición de la expresión de DR6 del 80% aproximadamente. Esta inhibición se registra de una forma similar a lo largo de los diferentes ciclos celulares estudiados, manteniéndose después de 20 divisiones celulares en unos

valores de 70% de inhibición causada por shRNA2, 80% de inhibición causada por shRNA8 y 70% de inhibición causada por la expresión conjunta de shRNA2 y shRNA8 (shRNA2+8). De igual forma, estos análisis muestran que la expresión de DR6 en la línea celular PC3 shRNAC, empleada como control negativo del ensayo de inhibición, presenta unos niveles de expresión del receptor similares a los mostrados por la línea celular A549.

Estos resultados indican que, a diferencia de lo observado en las células A549 DR6^{Neg}, las células PC3 DR6^{Neg} presentan una inhibición estable de la expresión de DR6, conseguida mediante la integración en su DNA genómico de la secuencia codificante para cada uno de los shRNAs seleccionados.



Figura 5.31. Estudio de la inhibición de la expresión de DR6 en las líneas celulares PC3 DR6^{Neg}. Representación gráfica de los resultados de PCR cuantitativa obtenidos tras el análisis de la cantidad de mRNA de DR6 presente en células PC3 y de las líneas estables que presentan una inhibición de la expresión de DR6. Se toma como referencia de 100% de expresión los niveles de mRNA presentes en células PC3. El estudio de la estabilidad de la integración genómica se ha realizado tomando medidas en los sucesivos ciclos celulares indicados.

5.5.3.-Efecto de la inhibición de DR6 en la biología celular

Una vez establecidas las diferentes líneas celulares PC3 DR6^{Neg} hemos procedido a estudiar las posibles diferencias que estas nuevas líneas celulares pudiesen presentar en comparación con la línea celular PC3, de la cual derivan. Debido a que las principales rutas de señalización en las que DR6 participa implican la activación de factores de transcripción y/o la inducción de muerte celular, los estudios realizados se centrarán en el análisis de posibles cambios en la expresión proteica y en la supervivencia celular. Para estudiar los cambios a nivel proteico inducidos por la inhibición de la expresión de DR6, hemos realizamos un estudio proteómico mediante electroforesis bidimensional e identificación proteica mediante espectrometría de masas MALDI-ToF, comparando el proteoma de la línea celular PC3 con el de las líneas celulares PC3 shRNA2+8 y PC3 shRNAC. Los resultados del estudio proteómico, mostrados en la Figura 5.31, nos permiten identificar algunas diferencias visibles en los proteinogramas de las tres líneas celulares analizadas, de entre los cuales destacaremos la correspondiente al patrón de la mancha 1. El análisis de esta mancha revela que esta variación corresponde a la isoforma 7 de la proteína CFLAR/cFLIP, inhibidor de caspasa 8 y FADD (*CASP8 and FADD-Like Apoptosis Regulator*), viéndose esta proteína disminuida en la muestra correspondiente a las células PC3 shRNA2+8 frente a las células control PC3 shRNAC y la línea celular PC3.



Figura 5.31. Identificación de los cambios proteicos en células PC3 DR6^{Neg}. Los lisados celulares de células PC3, PC3 shRNAC y shRNA2+8 fueron analizados mediante electroforesis bidimensional y tinción con azul de Comassie para identificar los cambios en las proteínas presentes en cada caso. A) Proteinogramas de los lisados celulares de PC3, PC3 shRNAC y PC3 shRNA2+8. Se indica en cada caso los cambios en proteínas detectados al comparar los proteinogramas entre sí mediante recuadros numerados. B) Identificación por MALDI-TOF de la proteína CFLAR. La mancha 1 fue digerida con tripsina y analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniéndose la huella peptídica que se muestra en un rango de 749 a 4001 Da y que ha sido identificada como perteneciente a la proteína CFLAR/cFLIP por el programa Aldente.

Por otro lado, puesto que DR6 es un receptor capaz de activar la ruta de muerte celular, llevamos a cabo un estudio de la supervivencia celular en cultivos de células PC3 DR6^{Neg} para conocer en qué medida afecta la inhibición del receptor en una línea celular con una alta expresión constitutiva del mismo. Como medida de la supervivencia celular hemos realizado un ensayo de proliferación de las células PC3 y las líneas celulares PC3 DR6^{Neg}, cuantificando el número de células vivas observadas tras sucesivas divisiones celulares. Tal y como se observa en la Figura 5.32, las líneas celulares PC3 shRNA2, PC3 shRNA8 y PC3 shRNA2+8 presentan un mayor número de células viables que las células control PC3 shRNAC y la línea celular PC3, observándose un aumento en el número de células vivas día tras día durante los 5 días de duración del estudio realizado.



Figura 5.32. Estudio de supervivencia celular en células PC3 DR6^{Neg}. Representación gráfica de la evolución proliferativa de las líneas celulares PC3 y las diferentes líneas que presentan una inhibición de la expresión de DR6. Las células PC3, PC3 shRNAC, PC3 shRNA2, PC3 shRNA8 y PC3 shRNA2+8 fueron cultivadas durante 5 días partiendo del mismo número de células iniciales en cada caso y posteriormente fueron cuantificadas las células vivas presentes en cada condición mediante medida directa realizada mediante microscopía de campo claro y tinción con azul violeta.

5.6.-Modelos celulares para el estudio de DR6 en el sistema neurológico

Estudios recientes han revelado que DR6 presenta un importante papel en el desarrollo y la regulación del sistema neurológico, activando diferentes rutas de señalización, incluida la inducción de apoptosis, en varios tipos celulares de este sistema. Por ello, el uso de un modelo celular neuronal para llevar a cabo el estudio funcional de DR6 se presenta como una buena opción para conocer mejor los mecanismos de señalización del receptor, complementando los estudios realizados en otros modelos celulares, como los realizados en células HEK293 y HeLa presentados en esta Tesis Doctoral.

5.6.1.-Células PC12

La falta de una línea celular estable neurológica ha hecho que el primer modelo celular que hemos analizado para llevar a cabo nuestros estudios sea la línea celular PC12, la cual es un línea celular adenohipofisaria de rata que sufre una diferenciación neuronal mediante tratamiento con el factor de crecimiento neural (NGF). Esta línea celular inmortalizada se cultiva con relativa facilidad y puede ser sometida a diferentes estudios mediante transfección, al igual que las células HEK293 y HeLa. Por otro lado, DR6 induce una señalización celular en células de rata similar a la observada en células humanas, haciendo posible, incluso, el estudio de DR6 humano en células murinas.



Figura 5.33. Análisis de la diferenciación neuronal de células PC12 para su uso como modelo celular en el estudio de DR6. Las células PC12 se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de NGF durante los tiempos indicados en cada caso para inducir su diferenciación neuronal. A) Análisis morfológico de la diferenciación de células PC12. Imágenes de microscopía de campo claro de células PC12 en cultivo tomadas a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento con NGF. B) Expresión de DR6 durante la diferenciación de células PC12. Análisis de los niveles de mRNA de DR6 mediante PCR cuantitativa realizada con el mRNA de células PC12 extraído a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento con NGF. C) Expresión de Mafk durante la diferenciación de células PC12. Análisis de los niveles de mRNA de Mafk mediante PCR cuantitativa realizada como en B.

Para poder emplear células PC12 diferenciadas como modelo celular en el estudio de DR6 llevamos a cabo una caracterización de esta línea celular, comenzando por estudiar los niveles de expresión de DR6 en estas células. Para ello estudiamos los niveles de mRNA de DR6 en células PC12 sin diferenciar y a lo largo del proceso de diferenciación neuronal mediante tratamiento con NGF (Figura 5.33). Los resultados de este análisis muestran que, aunque la expresión de DR6 en las células sin diferenciar es baja, los niveles de mRNA de DR6 aumentan progresivamente durante el tratamiento con NGF hasta alcanzar, después de una semana de tratamiento, un máximo con más de 6 veces los niveles observados en células sin tratar (Figura 5.33, panel B). Para comprobar que el aumento en los niveles de mRNA de DR6 corresponde con la progresión del proceso de diferenciación hemos estudiado, paralelamente, la expresión de la proteína Mafk, empleada como marcador neuronal (Figura 5.33, panel C). Al comparar los resultados obtenidos tras la cuantificación del mRNA de DR6 y Mafk durante el tratamiento de células PC12 con NGF se puede comprobar que el aumento en la expresión de DR6 se corresponde con el proceso de diferenciación neuronal.

5.6.2.-Cultivos primarios neuronales

Continuando con la búsqueda de un modelo celular para realizar los estudios de caracterización de la señalización de DR6 en el sistema neurológico y validar los resultados obtenidos en células HEK293 y HeLa, hemos diseñado una metodología para la sobreexpresión de receptores en cultivos primarios de oligodendrocitos de rata mediante infección lentiviral, sistema que ha sido satisfactoriamente empleado anteriormente en otros estudios del receptor. Para reproducir en estos cultivos primarios los estudios de caracterización de las regiones intracelulares de DR6 implicadas en la señalización del receptor, hemos clonado los receptores mutantes DR6 $\Delta 562$ (carece del extremo C-terminal de la cola citoplasmática y es incapaz de activar rutas de señalización en HEK293 y HeLa) y DR6 Δ426-552 (carece de DD y extremo N-terminal de la cola citoplasmática pero presenta unos niveles de actividad similares a los de DR6), además del receptor DR6 humano, en los plásmidos lentivirales SIN-PGK-WHV, cedidos por la Dra. Ruth Luthie-Carter. Todos los receptores han sido clonados con las mismas características que los clonados en el plásmidos pFLAG-CMV-1, empleados anteriormente en esta Tesis Doctoral. Por tanto, presentan la señal de localización en membrana plasmática de la pre-protripsina y el epítopo FLAG para su empleo en posteriores estudios, además de clonar junto a ellos la secuencia de la proteína fluorescente GFP como control de infección. Como control de la expresión de los receptores tras el proceso de infección hemos empleado el plásmido SIN-PGK-FLAG HSP 104-WHS, que expresa la proteína HSP con un epítopo FLAG y cuya funcionalidad ha sido comprobada anteriormente en el laboratorio de la Dra. Luthie-Carter.

Tras la clonación de los diferentes receptores en los plásmidos de expresión y el empaquetamiento de éstos en partículas lentivirales llevamos a cabo la infección de cultivos primarios de oligodendrocitos de rata PO, células que han sido empleadas en anteriores estudios de DR6. La infección y expresión de los plásmidos fue confirmada por la señal fluorescente debida a la expresión de la proteína GFP, aunque no ha sido posible confirmar la expresión de los receptores ni de la proteína HSP con las diferentes cantidades de partículas lentivirales empleadas (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

6.-DISCUSIÓN

A pesar de cumplirse 18 años desde su identificación por el grupo de Pan y col., el receptor de muerte DR6 continúa siendo uno de los miembros de la TNFRSF peor caracterizado. En este sentido, aunque se conoce la participación del receptor en la activación de rutas de señalización normalmente asociadas con los TNFRs (apoptosis, activación de NF-κB y activación de MAPKs), apenas se han caracterizado los procesos moleculares y las proteínas que participan en las cascadas de señalización activadas por DR6. Durante más de 10 años no se había encontrado ningún ligando que interaccionase con DR6 hasta que Nikolaev y col. mostraron la interacción del péptido N-APP con el receptor. Sin embargo, varios estudios posteriores revelaron la activación del receptor de forma independiente de N-APP, proponiéndose nuevos candidatos como ligandos de DR6. En el lado positivo, en estas casi dos décadas de investigación se han descrito varios procesos biológicos en diferentes tipos celulares en los que DR6 presenta un papel central o participa de forma cooperativa con otros receptores y proteínas, siendo la capacidad del receptor para activar diferentes caspasas y su participación en la regulación celular los más importantes.

6.1.-Interacción con proteínas adaptadoras

En el presente trabajo hemos estudiado la funcionalidad de la interacción de DR6 con la proteína TRADD, siendo ésta la única proteína adaptadora cuya capacidad de unión a DR6 ha sido descrita hasta la fecha (Pan, Bauer et al. 1998). Esta interacción DR6-TRADD es la responsable de la activación de la ruta de NF-κB, pero no se ha descrito su relación con la activación de las MAPKs o la inducción de apoptosis (Hu, Du et al. 2014).

En cuanto a la capacidad de DR6-TRADD para activar las MAPKs, nuestros estudios se centraron en el estudio de JNK/AP-1, por ser la MAPK más importante en la señalización de DR6, y de la apoptosis. Los resultados obtenidos muestran que tanto DR6 como TRADD son capaces de activar ambas rutas de señalización mediante su sobreexpresión, de forma dependiente de la cantidad de DNA transfectado. Por su parte, la sobreexpresión conjunta del receptor y TRADD induce una activación de ambas rutas de forma similar o superior a la mostrada tras la sobreexpresión de DR6 o TRADD por separado. El estudio de marcadores de muerte celular llevado a cabo revela que tanto DR6 como TRADD inducen una respuesta apoptótica tardía en esta línea celular, siendo la apoptosis causada por la expresión conjunta de DR6 y TRADD también similar o mayor que la de cada proteína por separado. Estos resultados indican que DR6 y TRADD participan en la misma ruta de señalización, tanto para la activación de JNK como la inducción de apoptosis,

puesto que si cada proteína participase en ambos procesos a través de rutas independientes, los niveles de actividad observados serían inferiores a los mostrados por cada proteína por separado. Este método para conocer la participación de dos proteínas en la misma ruta se ha llevado a cabo para conocer, por ejemplo, la interacción entre DR6 y la proteína APP descrita por Olsen y col.

Por tanto, TRADD no solo interacciona con el dominio intracelular de DR6 y participa en la activación de la ruta de NF-κB, sino que nuestros resultados indican que también participa en las rutas de señalización de DR6 que llevan a la activación de JNK y la inducción de apoptosis. Esto sugiere que la proteína TRADD forma parte de los diferentes complejos de señalización que se forman en torno a DR6 para la activación de una u otra ruta de señalización. Según Huan y col., la unión de TRADD con DR6, tras la activación de éste, se produce mediante la interacción de los DD presentes en ambas proteínas. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos observado la activación de las rutas de señalización de DR6 en ausencia del DD del receptor, lo que sugiere que TRADD pueda estar interaccionando con DR6 a través de otra región intracelular del receptor en ausencia del DD, o que TRADD se une al receptor a través de otra proteína adaptadora intermediaria que no interacciona con el DD.

6.2.-Funcionalidad de las regiones intracelulares de DR6

Teniendo en cuenta los estudios previos que muestran la falta de actividad del DD de DR6, nos hemos planteado la posibilidad de que esta región del receptor presente alguna anomalía o mutación en su secuencia que le impida comportarse funcionalmente como los DD de otros DRs. Para estudiar esta posibilidad, hemos realizado un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos del DD de DR6 y las secuencias de los DD de otros receptores de la TNFRSF (Apartado 5.2). Este análisis reveló que la estructura primaria del DD de DR6 comparte pocos aminoácidos con las estructuras correspondientes de los DD de los DRs CD95, TNFR1, DR3, DR4 y DR5, todos ellos con un DD funcional. Se han definido 6 posiciones concretas en la secuencia de los DD para su correcta funcionalidad, de las que DR6 tan solo presenta 3. Sin embargo, estos aminoácidos tampoco se conservan en otros DRs, por lo que no es suficiente para explicar la falta de funcionalidad del DD de DR6. Nuestros resultados muestran que otros aminoácidos sí están presentes en todos los DD analizados o son sustituidos por aminoácidos del mismo tipo, lo cual estaría relacionado con el mantenimiento de una estructura secundaria y terciaria compartida. Por su parte, DR6 presenta mutaciones que afectan a las características de los aminoácidos en posiciones muy compartidas por los otros receptores, pudiendo considerarse esto un factor en contra de la conservación de una estructura compartida. En comparación con las secuencias de los DD de EDAR y p75^{NTR}, receptores que junto con DR6 pertenecen al subgrupo de DRs reguladores, no se observa la conservación de los aminoácidos que aparecían mutados en el análisis anterior, aunque los DD de estos receptores presentan grandes deleciones que los diferencia del resto de DRs. Este subgrupo presenta un papel regulador a nivel celular más importante que su capacidad apoptótica, lo cual podría estar relacionado con una falta de funcionalidad de sus DD.

Por otro lado, también hemos realizado un análisis de la conservación evolutiva de la estructura primaria de DR6, comparando la secuencia del receptor humano con las de diferentes especies de vertebrados. El objetivo de este análisis es la identificación de regiones conservadas dentro de la estructura de DR6 que puedan tener una determinada funcionalidad en todas las especies que se expresa DR6. De este modo, hemos encontrado una gran conservación de la secuencia del DD de DR6 en las especies analizadas, de forma similar a lo descrito por Bridgham y col., pero el análisis de la secuencia completa de DR6 revela que, además del DD, hay otras regiones del receptor muy conservadas evolutivamente, pudiendo ser necesarias para la funcionalidad del receptor. En este sentido cabe destacar la cola citoplasmática, que ya había sido relacionada con los procesos de señalización por nuestro grupo de investigación. En los 100 últimos aa de esta cola citoplasmática, Saito y col. han definido un dominio CARD-L (datos sin publicar), que no hemos podido confirmar mediante comparación de su secuencia con los CARD-L de diferentes proteínas ni mediante la búsqueda en esta región de dominios proteicos conservados, búsqueda que se llevó a cabo empleado diferentes servidores y bases de datos informáticos (Expassy Prosite y SMART, datos no mostrados).

El siguiente paso a dar en la caracterización funcional de las regiones intracelulares de DR6 fue comprobar la importancia de la presencia de cada región en la señalización del receptor. La deleción del DD había sido estudiada anteriormente en nuestro grupo comprobando que la pérdida de este dominio resultaba en un receptor completamente funcional, a diferencia de lo que ocurría cuando se delecionaba la cola citoplasmática. Teniendo en cuenta el alto grado de conservación evolutiva de estas regiones, y considerando los resultados previos, generamos una serie de receptores mutantes derivados de DR6 humano, con deleciones que afectan a las 3 principales regiones intracelulares del receptor: los motivos de unión a TRAF, el DD y la cola citoplasmática. Estos nuevos receptores, con una correcta expresión y localización en membrana celular, son estudiados posteriormente para conocer su capacidad para activar las rutas de señalización de JNK, NF-ĸB y muerte celular en células HEK293 y HeLa. Estas líneas celulares han sido empleadas para el estudio de DR6 tanto en nuestro grupo como en otros laboratorios debido a su facilidad de transfección y a que en ellas se produce la activación de las diferentes rutas de señalización del receptor. Por otro lado, para conseguir la activación de los receptores hemos forzado su trimerización por sobreexpresión, debido a la falta de consenso en cuanto al ligando de DR6 y la falta de disponibilidad de anticuerpos específicos que induzcan su activación.

Regiones implicadas en la activación de JNK: Los resultados obtenidos tras el estudio de los receptores mutantes mostraron resultados similares en las dos líneas celulares estudiadas, sugiriendo que el receptor activa esta ruta de señalización en ambas líneas a través de la misma región citosólica. Según los resultados obtenidos, los aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática de DR6 son imprescindibles para inducir la activación de la ruta de señalización, observándose una pérdida de actividad en aquellos receptores que presentan un truncamiento en esta región (DR6 Δ 562 y DR6 Δ 646). Tal y como se había descrito previamente, hemos confirmado que el DD, e incluso, según los nuevos resultados del presente estudio, los primeros 80 aa del extremo amino terminal de la cola citoplasmática, no son necesarios para la actividad de DR6 en esta ruta de señalización, tal y como muestra el análisis de los receptores DR6 Δ 426-489 y DR6 Δ 562, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados muestran que ni los últimos 104 aa del extremo carboxilo terminal de la cola citoplasmática, ni ésta en su totalidad (receptores DR6 Δ379-522 y DR6 Δ379-489), son suficientes por sí solos para mantener los niveles de actividad del receptor silvestre, algo que sí se observa en el receptor que presenta el extremo C-terminal de la cola citoplasmática y la región que contiene los 2 motivos de unión a TRAFs (DR6 Δ426-552). Estos resultados indican que el extremo C-terminal de la cola citoplasmática, si bien es imprescindible, no es suficiente por sí solo para activar la ruta de señalización de JNK, necesitando para ello la región del receptor que comprende los 2 motivos de unión a TRAF. Esto podría sugerir una posible unión de DR6 con alguna de las proteínas TRAF, a pesar de no haber sido capaces de corroborar esto en nuestro laboratorio.

Regiones implicadas en la activación de NF-κB: en la ruta de activación de NF-κB, al igual que ocurría en la ruta de JNK, los resultados de actividad obtenidos son semejantes en las dos líneas celulares estudiadas, por lo que se puede concluir que en células HEK293 y HeLa están implicadas las mismas regiones intracelulares en la activación de ruta de NF-κB. A pesar de que ambas líneas celulares puedan activar esta ruta de señalización a través de una región en común, sugiriendo la formación de un complejo de señalización similar, en los ensayos realizados durante esta Tesis Doctoral puede comprobarse cómo la actividad de NF-κB asociada a DR6 es mayor en células HeLa que en HEK293. Nuestros resultados indican que los últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática son también imprescindibles para la activación de esta ruta de señalización, no así sus primeros 80 aa cercanos al extremo N-terminal, aunque la pérdida de éstos induce una menor activación de la ruta en ambas líneas celulares. En este sentido, y en contra de lo que ocurría en la ruta de JNK, los receptores que presentan un dominio intracelular constituido únicamente por la cola citoplasmática de DR6, en su totalidad o tan solo los últimos 104 aminoácidos del extremo C-terminal, son capaces de activar la ruta de NF-κB, con los mismos niveles que el receptor silvestre. Sin embargo, los resultados de actividad del receptor DR6 Δ426-552, cuyo dominio intracelular está formado por la región donde se localizan los motivos de unión a TRAF y los últimos 104 aa de la cola citoplasmática, contradicen los anteriores resultados, pues este receptor no muestra actividad en esta ruta de señalización. Por otro lado, la pérdida del DD no impide que los receptores sean capaces de activar NF-kB, aunque sí se observa una ligera disminución de los niveles de actividad en su ausencia. El conjunto de estos resultados nos indica que los aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática de DR6 son necesarios para la activación de la ruta de señalización de NF-kB, mientras que la región comprendida en el extremo N-terminal de la cola citoplasmática y el DD, aunque no son necesarios para la activación de esta ruta, presentan una función potenciadora. La unión de TRADD con el DD podría potenciar la formación del complejo de señalización necesario para iniciar la activación de la ruta, al igual que podría ocurrir con otras proteínas adaptadoras no descritas aún a través de la cola citoplasmática. Otra hipótesis, que explicaría esta pérdida de actividad al delecionar el DD y el extremo N-terminal de la cola citoplasmática, pero también la falta de funcionalidad del receptor DR6 Δ 426-552, sería la disposición espacial y el plegamiento de la región C-terminal de la cola citoplasmática en receptores truncados. Hemos llevado a cabo un análisis predictivo de la conformación estructural de algunos de los receptores mutantes que hemos generado empleando el programa iTASSER, pudiendo observar diferencias en el plegamiento de sus regiones intracelulares (Figura 5.8). En el caso del receptor DR6 Δ426-552, la estructura tridimensional obtenida presenta una conformación general totalmente diferente al receptor silvestre u otros receptores mutantes (datos no mostrados), por lo que no podemos confirmar si la disposición espacial de la cola citoplasmática en este receptor puede estar afectando a su capacidad activadora, siendo necesario realizar una predicción estructural empleando parámetros más ajustados.

Regiones implicadas en la inducción de muerte celular: Uno de los principales procesos celulares que llevan a cabo los DRs es su capacidad para inducir apoptosis mediante la interacción de sus DD con proteínas adaptadoras iniciadoras, como FADD o TRADD. Sin embargo, estudios

98
previos llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que en células HeLa, DR6 es capaz de activar esta ruta de señalización en ausencia de su DD. En estos estudios previos, DR6 no causaba la activación de la ruta apoptótica en células HEK293, a diferencia de lo observado en los estudios de Zeng y col. y los resultados presentados en esta Tesis Doctoral. Esta controversia en cuanto a la capacidad apoptótica de DR6 en células HEK293 puede estar causada por la inusual ruta de inducción de apoptosis que DR6 activa, estando implicada la vía mitocondrial pero sin la participación de caspasa 8. Así pues, la falta de apoptosis observada en estas células ante la activación del receptor se había relacionado con la inhibición de la actividad de Bax debida a la expresión de los oncogenes E1A y E1B en células HEK293 (la proteína E1B-19k secuestra e inhibe a Bax), siendo Bax una de las proteínas a través de las cuales DR6 desencadena los procesos apoptóticos en determinadas células. Los ensayos de muerte celular llevados a cabo en este presente trabajo han sido realizados seleccionando sólo las células transfectadas que presentan una mayor expresión de DR6 y los resultados muestran que la muerte celular inducida por la expresión de DR6 en HEK293 es mucho menor que la causada por el receptor TNFR1 y cursa con la inducción de apoptosis pero con una mayor respuesta necrótica, tal y como revela el análisis de los marcadores anexina V y IP. En células HeLa, sin embargo, la activación de DR6 induce una respuesta apoptótica temprana/tardía, pero no necrótica. Estos resultados podrían respaldar la teoría de que la ruta apoptótica de DR6 está inhibida en células HEK293 por el secuestro de Bax, siendo necesarios altos niveles de expresión del receptor para contrarrestar esta inhibición y/o activar una ruta de señalización alternativa con características necroptóticas. En cuanto a las regiones intracelulares de DR6 implicadas en la inducción de muerte celular, los resultados obtenidos indican que en ambas líneas celulares la región C-terminal de la cola citoplasmática muestra una función principal en esta ruta de señalización, lo que se hace evidente ante la falta de funcionalidad de los receptores que carecen de ella. En ambos modelos celulares, la presencia única del extremo C-terminal de la cola citoplasmática de DR6 es suficiente para inducir la muerte celular, tal y como demuestran los estudios del receptor DR6 Δ379-552. La cola citoplasmática completa es también capaz de inducir la muerte celular por sí sola en ambos tipos celulares. En este caso, el receptor DR6 Δ379-489 muestra una menor capacidad apoptótica que el receptor DR6 en células HeLa, aunque el análisis de marcadores de muerte celular muestra una respuesta con valores similares para ambos receptores. Así pues, estos resultados también indican que la región que comprende los sitios de unión a proteínas TRAF no participa en la activación de esta ruta de señalización.

Considerando los resultados obtenidos en conjunto, podemos concluir que la región del extremo C-terminal del receptor, donde se localiza la cola citoplasmática y se ha sugerido la

presencia de un dominio CARD-L, es imprescindible para que DR6 sea capaz de activar las 3 rutas más importantes en la señalización de los TNFRs. En esta región del receptor, la secuencia de aminoácidos presenta un patrón que correspondería con la formación de varias hojas β (UniProtKB-075509). La deleción de los últimos 20 aminoácidos de la cola citoplasmática afecta directamente a la última de estas hojas β y es suficiente para impedir que el receptor active cualquiera de las rutas de señalización analizadas. Sería necesario profundizar en el estudio de estos últimos aminoácidos de DR6 para conocer si presentan algún residuo clave implicado en la interacción del receptor con proteínas adaptadoras que formen parte del complejo de señalización (tal y como ocurre con el receptor TNFR2 y proteínas TRAF (Cabal-Hierro, Artime et al. 2014)), o si su pérdida afecta a la conformación de lo que parece ser un nuevo dominio en esta región de la cola citoplasmática del receptor. Estos estudios servirían también para concluir si este nuevo dominio es en realidad un CARD-L o se trata de un dominio proteico diferente.

6.3.-Regiones extracelulares y procesamiento de DR6

Además de la activación de rutas de señalización intracelulares, DR6 también se caracteriza por sufrir un procesamiento proteolítico en su región extracelular, mediado, según DeRosa y col., por la metaloproteasa de matriz MMP-14. Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral aportan nueva información sobre el desarrollo de este proceso y la región del receptor en la que ocurre, siendo estos estudios realizados en células HEK293, en las que se había observado con anterioridad el procesamiento del receptor.

Nuestros estudios muestran que el truncamiento de DR6 es un proceso rápido que ocurre al mismo tiempo que el receptor es expresado, siendo, por tanto, un mecanismo de regulación de DR6 no relacionado con altos niveles de expresión del receptor. En los ensayos llevados a cabo, hemos inducido la expresión del receptor mediante transfección ectópica, consiguiendo unos niveles máximos de expresión a las 48 horas después de la transfección, decayendo progresivamente a continuación. La fracción procesada del receptor aparece en los medios de cultivo presentando un patrón temporal similar. Nuestros resultados también muestran que el procesamiento de DR6 es inducido por tratamientos con el éster de forbol PMA, principalmente en las primeras horas después de la transfección del receptor, algo característico de estos tratamientos (Hayashida, Bartlett et al. 2010). Aunque el procesamiento inducido por PMA no es específico, suele relacionarse con una activación de diferentes miembros de la familia de proteasas ADAM, lo que podría significar la participación de otras proteasas adicionales en el procesamiento de DR6. Esta hipótesis coincide con los resultados previos en los que se había observado procesamiento del receptor en presencia tanto de inhibidores específicos de MMP14 como de inhibidores generales de las MMPs. En estos estudios previos, se había considerado que las MMP no participaban en el procesamiento de DR6 en células HEK293, pues tratamientos con el inhibidor de furina II, un inhibidor general de MMPs, no afectaba a este mecanismo. Sin embargo, nuestros resultados muestran que una inhibición de furina induce una mayor presencia de DR6 en los extractos celulares, lo cual puede explicarse por un aumento en la expresión del receptor, pero también por una menor liberación de su región extracelular, lo que respaldaría el papel de las MMPs en el procesamiento de DR6.

En nuestro laboratorio se ha descrito anteriormente que la deleción de la región espaciadora de DR6 (deleción entre los aminoácidos 239 y 345) impide que el receptor se procese, sugiriendo que en algún punto de esta región se produce el corte proteolítico del receptor. Por otro lado, también había sido demostrada la importancia de las glicosilaciones en el procesamiento del receptor, siendo éste inhibido mediante tratamientos celulares con tunicamicina (inhibidor de glicosilaciones). Esto podría plantear que la falta de procesamiento del receptor carente de región espaciadora pueda deberse a la pérdida de gran parte de su estado glicosilado. Nuestros resultados muestran que las fracciones solubles de DR6 liberadas en los medios de cultivo presentan un estado altamente glicosilado, conteniendo tanto N- como O-glicosilaciones, lo que indica que el procesamiento de DR6 ocurre dentro de la región espaciadora. Para identificar en qué parte de esta región ocurre el corte proteolítico del dominio extracelular del receptor, hemos generado una serie de receptores mutantes derivados de DR6 que presentan diferentes deleciones en esta región. El estado N- y O-glicosilado de la fracción soluble de DR6 silvestre sugiere que el corte proteolítico puede ocurrir en la región situada entre el último de los residuos a través de los que se unen estas cadenas glicosídicas y el dominio transmembrana. Sin embargo, el receptor mutante DR6 Δ293-345, carente de esta región, sufre un procesamiento similar al receptor silvestre. Para confirmar que el sitio de escisión se encuentra en la región comprendida entre los aminoácidos 238 y 294, analizamos un receptor que presenta esta deleción (DR6 Δ239-293) observando, contrariamente a lo esperado, que es igualmente capaz de procesarse. Además, las fracciones solubles de estos dos receptores mutantes tienen tamaños moleculares diferentes y ambas están glicosiladas. Estos hechos indican que DR6 presenta, al menos, dos sitios de escisión proteolítica dentro de su región espaciadora, a través de los cuales se produce la liberación al medio extracelular de diferentes formas solubles del receptor y con diferente estado de glicosilación. Esto, a su vez, apoya la hipótesis de que pueda haber más de un mecanismo interviniendo en el procesamiento del receptor. En cuanto a la participación de las diferentes glicosilaciones de DR6 en su procesamiento,

los resultados obtenidos tras el análisis del receptor DR6 $\Delta 211$ -292 indican que la pérdida de todos los sitios de glicosilación de la región espaciadora evita que DR6 sea procesado, aunque esté presente la región donde hemos descrito la localización de al menos uno de los sitios de escisión. Por otro lado, nuestros resultados indican que las cadenas glicosídicas participan en el mecanismo de procesamiento independientemente de su tipo, pues tanto el receptor DR6 $\Delta 239$ -292, que carece de todos los sitios de N-glicosilaciones pero mantiene las O-glicosilaciones, como el receptor DR6 $\Delta 211$ -255, carente de los sitios de unión a O-glicosilaciones pero con 3 sitios de Nglicosilaciones, sufren el procesamiento de sus regiones extracelulares.



Figura 6.1: Funcionalidad de las regiones del receptor DR6. Los diferentes dominios de DR6 participan en diferentes procesos que se resumen a continuación. En la región extracelular, los CRDs son los responsables de la interacción receptor-ligando con otras proteínas extracelulares, mientras que la región espaciadora participa en la localización en membrana del receptor y en su procesamiento. El extremo amino terminal de esta región acumula la mayor parte de glicosilaciones del receptor y presenta, al menos, un sitio de escisión proteolítica, localizándose otro (u otros) de estos sitios en su extremo carboxilo terminal, carente de glicosilaciones. En cuanto a la fracción citosólica, aunque no se ha descrito la interacción de DR6 con proteínas TRAF, la región en la que se localizan los dos sitios de unión a estas proteínas participan en la activación de la ruta de JNK, mientras que el DD y el extremo N-terminal de la cola citoplasmática participan en la activación numa mayor importancia funcional es la comprendida entre los últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal de la cola citoplasmática, dentro de lo que se ha sugerido como un dominio CARDL, pues esta región es imprescindible tanto en la activación de JNK y NF-κB como en la inducción de muerte celular.

6.4.-Nuevos modelos celulares para el estudio de DR6

Con la intención de complementar los estudios llevados a cabo en este trabajo en células HEK293 y HeLa, nos hemos planteado el análisis de nuevos modelos celulares que puedan aportar información adicional acerca de los mecanismos moleculares en los que DR6 participa. Considerando que DR6 participa en diferentes procesos dependiendo del tipo celular en el que se exprese, el uso de uno u otro modelo celular podría depender del proceso funcional a estudiar.

En determinadas células tumorales, DR6 presenta unos altos niveles de expresión, lo que contradice la capacidad del receptor para inducir muerte celular. En estas células, la ruta apoptótica de DR6 parece estar inhibida o contrarrestada de alguna forma. Para conocer los detalles de la señalización de DR6 en estas células tumorales, hemos realizado un silenciamiento de la expresión del receptor en dos líneas celulares donde su expresión es particularmente alta: células A549 y células PC3. Para poder conseguir un modelo celular de trabajo, hemos generado, a partir de ellas, líneas celulares que presentan una inhibición de DR6 estable mediante un sistema de shRNAs. Mientras que en células A549 la generación de estas líneas celulares estables ha fracasado, en las líneas derivadas de PC3 (PC3^{Neg}) observamos en torno al 80% de inhibición de la expresión del receptor, lo que permitiría su uso en estudios posteriores. En cuanto a los análisis llevados a cabo en estas células, la inhibición de DR6 induce un descenso de los niveles proteicos de la proteína CFLAR/c-FLIP. Esta proteína es un inhibidor apoptótico que compite con caspasa 8 por su unión al complejo DISC, presentando una estructura similar a la caspasa pero sin dominio catalítico, por lo que permanece unida al complejo de señalización e impide la activación de la pro-caspasa 8 (Scaffidi, Schmitz et al. 1999). Estos resultados, junto con el hecho de que la apoptosis inducida por DR6 es independiente de caspasa 8, podrían indicar que DR6 induce la expresión de inhibidores apoptóticos, como CFLAR, siendo una posible explicación a la evasión de apoptosis en células tumorales con una alta expresión del receptor. Se ha descrito la expresión de CFLAR inducida por la activación de la ruta NF-ĸB, pudiendo ser este el mecanismo empleado por DR6 para inducir su expresión (Bai, Liu et al. 2004). Por otro lado, las células PC3^{Neg} presentan una mayor proliferación y/o supervivencia celular, lo que podría indicar que, a pesar de todo, DR6 está ejerciendo un control de la población celular, bien mediante la inducción de apoptosis a través de vías independientes de caspasa 8, o bien mediante otros mecanismos moleculares, siendo necesario realizar estudios adicionales que lo aclaren. Por tanto, estas células derivadas de la línea PC3 podrían ser empleadas para estudios de activación de NF-ĸB, pero no de inducción de apoptosis.

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia que DR6 presenta en el desarrollo y regulación del sistema inmune, nos hemos planteado el estudio de modelos celulares neuronales que permitan la caracterización funcional del receptor en estas células de forma similar a como ha sido analizada en HEK293 y HeLa. En las células nerviosas, DR6 es capaz de inducir la activación de caspasa 3 y caspasa 6, por lo que estos modelos celulares pueden ser de gran utilidad en el estudio

de la ruta apoptótica del receptor. El primer modelo celular que nos planteamos para su estudio es la diferenciación neuronal de la línea celular PC12. Estas células presenta la facilidad para su uso de ser una línea celular establecida y, aunque derivan de un feocromocitoma adrenal de rata, puede inducirse su diferenciación a un fenotipo neuronal mediante tratamiento con NGF. La funcionalidad del DR6 humano en células murinas ha sido estudiada anteriormente sin que esto signifique un cambio en la señalización del receptor, por lo que sería viable el estudio de receptores mutantes derivados de DR6 humano en estas células. Nuestros resultados muestran que durante la diferenciación neuronal de las células PC12 se produce un aumento progresivo de los niveles de expresión de DR6 desde el comienzo de los tratamientos con NGF, por lo que, teniendo en cuenta que las células diferenciadas son capaces de crecer en estado senescente durante al menos 2 semanas pero no se observa un incremento en la muerte celular, el aumento de expresión de DR6 observado parece no estar relacionado con procesos apoptóticos. Por otro lado, se ha descrito la participación de diferentes caspasas en los procesos de diferenciación de células PC12 de forma no apoptótica (Mogi and Kondo 2015). Entre estas caspasas se encuentra caspasa 3, la cual puede ser activada por DR6 en neuronas. Sería necesario profundizar en el estudio del papel de DR6 en la diferenciación de las células PC12 para conocer si la expresión creciente del receptor participa directamente en este proceso mediante la activación de diferentes rutas de señalización o, si por el contrario, es una consecuencia indirecta adquirida durante la diferenciación.

Otro modelo celular propuesto para llevar a cabo la caracterización funcional de DR6 en células del sistema nervioso es el uso de cultivos primarios neuronales, en los que se consigue la expresión ectópica del receptor mediante infección viral. Este modelo celular ya ha sido empleado por el grupo de Mi y col. para inducir la sobreexpresión de DR6 en oligondrocitos de rata, resultando en la activación de la ruta apoptótica dependiente de caspasa 3. En nuestro trabajo hemos empleado cultivos primarios neuronales de rata P0, teniendo en cuenta que en este estadío la expresión de DR6 en estas células presenta unos niveles bajos. Para la infección de estas células hemos empleado vectores lentivirales auto-inactivados (SIN, *Self-Inactivating vectors*), en donde hemos clonado los receptores mutantes empleados para la caracterización funcional de DR6 en células HEK293 y HeLa, que están bajo regulación del promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) murina. A pesar de no haber podido obtener resultados de expresión de los receptores sobreexpresados en los cultivos primarios neuronales mediante este método, hemos confirmado la funcionalidad del mismo, siendo necesario continuar con su puesta a punto para posteriormente poder realizar los análisis de la sobreexpresión de los diferentes receptores mutantes de DR6 en estudios futuros.

CONCLUSIONS

7.-CONCLUSIONS

- 1. The adaptor protein TRADD is implicated in the DR6-mediated activation of JNK pathway as well as on the induction of apoptosis in HeLa cells.
- 2. Comparison of the nucleotide sequence coding for the death domain (DD) of DR6 to that of the DD of receptors of the TNFRSF which function in the immune response (TNFR1, Fas, DR3, DR4 and DR5) shows that the DD of DR6 presents several mutations on its primary structure which change the class, polarity and charge of specific high-conserved aminoacids within that domain.
- 3. Opposite to other receptors of the TNFRSF, the intracellular region of DR6 contains a long cytoplasmic tail which appears essential for its activity. In particular, the last 10 aminoacids of this C-terminus cytoplasmic tail, which are high conserved on vertebrates, are essential for DR6 to trigger the JNK, NF-κB and cell death pathways.
- 4. Shedding of DR6 occurs through at least two cleavage sites localized on the stalk region of the receptor. This shedding releases to the extracellular media soluble forms of DR6 with different glycosylation states.
- 5. Glycosylation of the most N-terminal aminoacids of the stalk region are necessary for the shedding of DR6, regardless of whether these are O or N glycosylated.
- 6. DR6 has an antiproliferative role in tumoral PC3 cells. Cell death is these cells might be inhibited by an increased expression of cFLIP protein in response to the overexpression of the receptor in this cell line.
- Neuronal differentiation of PC12 cells by NGF treatment induces the overexpression of DR6 in a process which appears coincident with the expression of the neuronal marker Mafk.

BIBLIOGRAFÍA

8.-BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, B. B., T. E. Eessalu, et al. (1985). "Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon." <u>Nature</u> **318**(6047): 665-667.
- Aggarwal, B. B., W. J. Henzel, et al. (1985). "Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line." J Biol Chem **260**(4): 2334-2344.
- Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, et al. (1985). "Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization." J Biol Chem **260**(4): 2345-2354.
- Aggarwal, B. B., B. Moffat, et al. (1984). "Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization." J Biol Chem **259**(1): 686-691.
- Ashe, P. C. and M. D. Berry (2003). "Apoptotic signaling cascades." <u>Prog Neuropsychopharmacol</u> <u>Biol Psychiatry</u> 27(2): 199-214.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." <u>Science</u> **281**(5381): 1305-1308.
- Bai, S., H. Liu, et al. (2004). "NF-kappaB-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis." <u>Arthritis Rheum</u> 50(12): 3844-3855.
- Ban, J. O., Y. S. Jung, et al. (2014). "(E)-2,4-Bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal inhibits tumor growth via suppression of NF-kappaB and induction of death receptor 6." <u>Apoptosis</u> 19(1): 165-178.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, et al. (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptorhuman TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." <u>Cell</u> **73**(3): 431-445.
- Barathan, M., K. Gopal, et al. (2015). "Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes." <u>Apoptosis</u> **20**(4): 466-480.
- Barua, A., A. Yellapa, et al. (2012). "Expression of death receptor 6 by ovarian tumors in laying hens, a preclinical model of spontaneous ovarian cancer." <u>Transl Oncol</u> **5**(4): 260-268.
- Benschop, R., T. Wei, et al. (2009). "Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFRrelated death receptor-6, DR6." <u>Adv Exp Med Biol</u> **647**: 186-194.
- Bhardwaj, A. and B. B. Aggarwal (2003). "Receptor-mediated choreography of life and death." <u>J Clin</u> <u>Immunol</u> **23**(5): 317-332.
- Bilecova-Rabajdova, M., P. Urban, et al. (2014). "Breast carcinoma progression and tumour vascular markers related to apoptotic mechanisms." <u>Dis Markers</u> **2014**: 156034.

- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." <u>Trends Biochem Sci</u> **27**(1): 19-26.
- Bogoyevitch, M. A. and B. Kobe (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **70**(4): 1061-1095.
- Bogoyevitch, M. A., K. R. Ngoei, et al. (2010). "c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1804**(3): 463-475.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." <u>Trends Immunol</u> **25**(6): 280-288.
- Borradaile, N. M. and J. G. Pickering (2010). "Polyploidy impairs human aortic endothelial cell function and is prevented by nicotinamide phosphoribosyltransferase." <u>Am J Physiol Cell</u> <u>Physiol</u> 298(1): C66-74.
- Brancho, D., N. Tanaka, et al. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." <u>Genes Dev</u> **17**(16): 1969-1978.
- Bridgham, J. T., J. Bobe, et al. (2001). "Conservation of death receptor-6 in avian and piscine vertebrates." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **284**(5): 1109-1115.
- Brockhaus, M., H. J. Schoenfeld, et al. (1990). "Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 87(8): 3127-3131.
- Buckanovich, R. J., D. Sasaroli, et al. (2007). "Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer." J Clin Oncol **25**(7): 852-861.
- Cabal-Hierro, L., N. Artime, et al. (2014). "A TRAF2 binding independent region of TNFR2 is responsible for TRAF2 depletion and enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1." <u>Oncotarget</u> 5(1): 224-236.
- Cabal-Hierro, L., M. Rodriguez, et al. (2014). "TRAF-mediated modulation of NF-kB AND JNK activation by TNFR2." <u>Cell Signal</u> **26**(12): 2658-2666.
- Cao, S., Z. Zeng, et al. (2013). "Pravastatin slows the progression of heart failure by inhibiting the c-Jun N-terminal kinase-mediated intrinsic apoptotic signaling pathway." <u>Mol Med Rep</u> 8(4): 1163-1168.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **75**(1): 50-83.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **72**(9): 3666-3670.
- Carvalho, J. R., L. Filipe, et al. (2010). "Detailed analysis of expression and promoter methylation status of apoptosis-related genes in prostate cancer." <u>Apoptosis</u> **15**(8): 956-965.

- Croft, M. (2014). "The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions." <u>Semin Immunol</u> **26**(3): 183-190.
- Croft, M., C. A. Benedict, et al. (2013). "Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies." <u>Nat</u> <u>Rev Drug Discov</u> **12**(2): 147-168.
- Cullen, S. P. and S. J. Martin (2015). "Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **39**: 26-34.
- Chan, F. K. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." <u>Ann Rheum Dis</u> **59 Suppl 1**: i50-53.
- Chan, F. K. (2007). "Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling." <u>Cytokine</u> **37**(2): 101-107.
- Chan, F. K., H. J. Chun, et al. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." <u>Science</u> **288**(5475): 2351-2354.
- Chen, Y. R. and T. H. Tan (2000). "The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review)." Int J Oncol **16**(4): 651-662.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, et al. (2002). "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." J Cell Sci **115**(Pt 4): 679-688.
- Das, S., J. Cho, et al. (2005). "Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner." J Biol Chem 280(25): 23748-23757.
- De Miguel, D., A. Gallego-Lleyda, et al. (2016). "TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-small cell lung cancer cells." <u>Nanotechnology</u> 27(18): 185101.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." Oncogene 22(53): 8543-8567.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, et al. (2003). "The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily." <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **14**(3-4): 193-209.
- DeRosa, D. C., P. J. Ryan, et al. (2008). "Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development." <u>Cancer Immunol Immunother</u> **57**(6): 777-787.
- Drutskaya, M. S., G. A. Efimov, et al. (2010). "Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer." <u>IUBMB Life</u> 62(4): 283-289.
- Fares, F., N. Azzam, et al. (2014). "Benzene-poly-carboxylic acid complex, a novel anti-cancer agent induces apoptosis in human breast cancer cells." <u>PLoS One</u> **9**(2): e85156.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, et al. (2007). "RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die." <u>Cell Death Differ</u> **14**(3): 400-410.

- Fey, D., D. R. Croucher, et al. (2012). "Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades." <u>Front Physiol</u> **3**: 355.
- Galluzzi, L., A. Lopez-Soto, et al. (2016). "Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis." <u>Immunity</u> **44**(2): 221-231.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." <u>Cell Death Differ</u> 19(1): 107-120.
- Gantke, T., S. Sriskantharajah, et al. (2012). "IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway." Immunol Rev 246(1): 168-182.
- Ghavami, S., M. Hashemi, et al. (2009). "Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes." J Med Genet **46**(8): 497-510.
- Gilmore, T. D. and F. S. Wolenski (2012). "NF-kappaB: where did it come from and why?" <u>Immunol</u> <u>Rev</u> 246(1): 14-35.
- Gong, Y., P. Cao, et al. (2008). "Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex." <u>Nature</u> **454**(7205): 789-793.
- Goswami, S. and N. Sharma-Walia (2016). "Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer." <u>Oncotarget</u>.
- Gray, P. W., B. B. Aggarwal, et al. (1984). "Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity." <u>Nature</u> **312**(5996): 721-724.
- Green, D. R. and F. Llambi (2015). "Cell Death Signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol 7(12).
- Gruss, H. J. and S. K. Dower (1995). "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas." <u>Blood</u> **85**(12): 3378-3404.
- Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2009). "Life and death by death receptors." <u>FASEB J</u> 23(6): 1625-1637.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." <u>EMBO J</u> **15**(11): 2760-2770.
- Hakozaki, A., M. Yoda, et al. (2010). "Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages." J Immunol **184**(5): 2442-2448.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." <u>Science</u> **265**(5173): 808-811.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." <u>Cell</u> **144**(5): 646-674.

- Hayashida, K., A. H. Bartlett, et al. (2010). "Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding." <u>Anat Rec (Hoboken)</u> **293**(6): 925-937.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." <u>Cell</u> **132**(3): 344-362.
- He, M. X. and Y. W. He (2013). "CFLAR/c-FLIPL: a star in the autophagy, apoptosis and necroptosis alliance." <u>Autophagy</u> **9**(5): 791-793.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." <u>Immunology</u> **115**(1): 1-20.
- Holland, P. M. (2014). "Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL?" <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **25**(2): 185-193.
- Hu, R., Q. Du, et al. (2014). "Agonist antibody activates death receptor 6 downstream signaling involving TRADD recruitment." <u>FEBS Lett</u> **588**(3): 401-407.
- Hu, Y., X. Lee, et al. (2013). "A DR6/p75(NTR) complex is responsible for beta-amyloid-induced cortical neuron death." <u>Cell Death Dis</u> **4**: e579.
- Huang, G., X. Lee, et al. (2013). "Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis." <u>Cell Death Dis</u> **4**: e841.
- Huang, Y., A. de Reynies, et al. (2010). "Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type." <u>Blood</u> **115**(6): 1226-1237.
- Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structurefunction relationship(s)." <u>Microsc Res Tech</u> **50**(3): 184-195.
- lyer, A., J. van Scheppingen, et al. (2013). "Developmental patterns of DR6 in normal human hippocampus and in Down syndrome." J Neurodev Disord **5**(1): 10.
- Jo, M., M. H. Park, et al. (2012). "Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **258**(1): 72-81.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." <u>Science</u> **298**(5600): 1911-1912.
- Kai, K., K. Nasu, et al. (2013). "Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis." <u>Am J Reprod Immunol</u> **70**(6): 485-496.
- Kallop, D. Y., W. J. Meilandt, et al. (2014). "A death receptor 6-amyloid precursor protein pathway regulates synapse density in the mature CNS but does not contribute to Alzheimer's disease-related pathophysiology in murine models." <u>J Neurosci</u> **34**(19): 6425-6437.

- Kamata, H., Y. Tsuchiya, et al. (2010). "IkappaBbeta is a positive and negative regulator of NFkappaB activity during inflammation." <u>Cell Res</u> **20**(11): 1178-1180.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." <u>Nature</u> **441**(7092): 431-436.
- Karin, M. and E. Gallagher (2005). "From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance." <u>IUBMB Life</u> **57**(4-5): 283-295.
- Karlsson, C., T. Dehne, et al. (2010). "Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis." <u>Osteoarthritis Cartilage</u> **18**(4): 581-592.
- Kasof, G. M., J. J. Lu, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB." <u>Oncogene</u> 20(55): 7965-7975.
- Keller, N., J. Mares, et al. (2009). "Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation." <u>Structure</u> **17**(3): 438-448.
- Khalil, E., M. R. Digby, et al. (2011). "Acute involution in the tammar wallaby: identification of genes and putative novel milk proteins implicated in mammary gland function." <u>Genomics</u> 97(6): 372-378.
- Kim, J. Y., M. Morgan, et al. (2011). "TNFalpha induced noncanonical NF-kappaB activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2." J Cell Sci **124**(Pt 4): 647-656.
- Klima, M., A. Brouckova, et al. (2011). "T-cell activation triggers death receptor-6 expression in a NF-kappaB and NF-AT dependent manner." <u>Mol Immunol</u> **48**(12-13): 1439-1447.
- Klima, M., J. Zajedova, et al. (2009). "Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1793**(10): 1579-1587.
- Kollipara, P. S., H. S. Jeong, et al. (2013). "(E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal has an antiproliferative effect on NSCLC cells induced by p38 MAPK-mediated suppression of NFkappaB and up-regulation of TNFRSF10B (DR5)." <u>Br J Pharmacol</u> 168(6): 1471-1484.
- Krishna, M. and H. Narang (2008). "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple." <u>Cell Mol Life Sci</u> **65**(22): 3525-3544.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." <u>Cell Death Differ</u> **16**(1): 3-11.
- Kuester, M., S. Kemmerzehl, et al. (2011). "The crystal structure of death receptor 6 (DR6): a potential receptor of the amyloid precursor protein (APP)." J Mol Biol **409**(2): 189-201.
- Kumar, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." <u>Cell Death Differ</u> 14(1): 32-43.
- Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease." <u>Annu</u> <u>Rev Cell Dev Biol</u> **28**: 137-161.

- Lantz, M., U. Gullberg, et al. (1990). "Characterization in vitro of a human tumor necrosis factorbinding protein. A soluble form of a tumor necrosis factor receptor." <u>J Clin Invest</u> 86(5): 1396-1402.
- Lavoie, H. and M. Therrien (2015). "Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling." <u>Nat Rev</u> <u>Mol Cell Biol</u> **16**(5): 281-298.
- Lee, H. L., S. H. Park, et al. (2015). "Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice." Oncotarget **6**(9): 7280-7292.
- Lee, U. S., J. O. Ban, et al. (2012). "Growth Inhibitory Effect of (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-Butenal Diacetate through Induction of Apoptotic Cell Death by Increasing DR3 Expression in Human Lung Cancer Cells." <u>Biomol Ther (Seoul)</u> **20**(6): 538-543.
- Lee, Y., Y. J. Kim, et al. (2016). "MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction." <u>Front Plant Sci</u> 7: 80.
- Lin, Y., L. Bai, et al. (2010). "The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy." <u>Expert Opin Ther Targets</u> **14**(1): 45-55.
- Liu, J., J. G. Heuer, et al. (2002). "Accelerated onset and increased severity of acute graft-versushost disease following adoptive transfer of DR6-deficient T cells." <u>J Immunol</u> 169(7): 3993-3998.
- Liu, J., S. Na, et al. (2001). "Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6deficient mice." Immunity **15**(1): 23-34.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." <u>Cell</u> **104**(4): 487-501.
- Magis, C., A. M. van der Sloot, et al. (2012). "An improved understanding of TNFL/TNFR interactions using structure-based classifications." <u>Trends Biochem Sci</u> **37**(9): 353-363.
- Mai, T., X. Wang, et al. (2004). "Androgen receptor coregulator ARA267-alpha interacts with death receptor-6 revealed by the yeast two-hybrid." <u>Sci China C Life Sci</u> **47**(5): 442-448.
- Marik, S. A., O. Olsen, et al. (2013). "Death receptor 6 regulates adult experience-dependent cortical plasticity." <u>J Neurosci</u> **33**(38): 14998-15003.
- Matesanz-Isabel, J., J. Sintes, et al. (2011). "New B-cell CD molecules." Immunol Lett **134**(2): 104-112.
- Mbanwi, A. N. and T. H. Watts (2014). "Costimulatory TNFR family members in control of viral infection: outstanding questions." <u>Semin Immunol</u> **26**(3): 210-219.
- Mi, S. (2008). "Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration." <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **19**(3-4): 245-251.

- Mi, S., X. Lee, et al. (2011). "Death receptor 6 negatively regulates oligodendrocyte survival, maturation and myelination." <u>Nat Med</u> **17**(7): 816-821.
- Mirzaei, M. R., A. Najafi, et al. (2014). "Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines." <u>Tumour Biol</u> **35**(10): 9999-10009.
- Mitchell, S., J. Vargas, et al. (2016). "Signaling via the NFkappaB system." <u>Wiley Interdiscip Rev Syst</u> <u>Biol Med</u> 8(3): 227-241.
- Mizukami, Y., K. Yoshioka, et al. (1997). "A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion." <u>J Biol Chem</u> **272**(26): 16657-16662.
- Mogi, M. and A. Kondo (2015). "Activation of caspase-8 and caspase-9 are required for PC12 cells differentiation." <u>J Immunoassay Immunochem</u> **36**(5): 547-558.
- Morrison, D. K. and R. J. Davis (2003). "Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals." <u>Annu Rev Cell Dev Biol **19**</u>: 91-118.
- Muntane, J. (2011). "Harnessing tumor necrosis factor receptors to enhance antitumor activities of drugs." <u>Chem Res Toxicol</u> **24**(10): 1610-1616.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, et al. (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." <u>Nature</u> **457**(7232): 981-989.
- Nikoletopoulou, V., M. Markaki, et al. (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1833**(12): 3448-3459.
- O'Malley, W. E., B. Achinstein, et al. (1963). "Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. Iii. Repeated Response of Sarcoma 37, in Tolerant Mice, to Serratia Marcescens Endotoxin." <u>Cancer Res</u> 23: 890-895.
- Olsen, O., D. Y. Kallop, et al. (2014). "Genetic analysis reveals that amyloid precursor protein and death receptor 6 function in the same pathway to control axonal pruning independent of beta-secretase." J Neurosci **34**(19): 6438-6447.
- Pan, G., J. H. Bauer, et al. (1998). "Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor." <u>FEBS Lett</u> **431**(3): 351-356.
- Park, H. A., P. Licznerski, et al. (2015). "Bcl-xL is necessary for neurite outgrowth in hippocampal neurons." <u>Antioxid Redox Signal</u> **22**(2): 93-108.
- Park, K. J., C. A. Grosso, et al. (2010). "p75NTR-dependent, myelin-mediated axonal degeneration regulates neural connectivity in the adult brain." <u>Nat Neurosci</u> **13**(5): 559-566.
- Pennica, D., G. E. Nedwin, et al. (1984). "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." <u>Nature</u> **312**(5996): 724-729.
- Pineda, G., C. K. Ea, et al. (2007). "Ubiquitination and TRAF signaling." Adv Exp Med Biol 597: 80-92.

- Ponomarev, S. Y. and J. Audie (2011). "Computational prediction and analysis of the DR6-NAPP interaction." <u>Proteins</u> **79**(5): 1376-1395.
- Popko, B. (2011). "Downregulating DR6 to drive remyelination." Nat Med 17(7): 779-780.
- Prabowo, A. S., A. M. Iyer, et al. (2015). "Expression of neurodegenerative disease-related proteins and caspase-3 in glioneuronal tumours." <u>Neuropathol Appl Neurobiol</u> **41**(2): e1-e15.
- Qiu, C. W., B. Sheng, et al. (2012). "A new therapy for the reduction of axon and neuron loss and promotion of axon and oligodendrocyte regeneration through inhibition of death receptor 6 pathway after ischemic cerebral stroke." <u>Med Hypotheses</u> **79**(6): 853-855.
- Rauert, H., A. Wicovsky, et al. (2010). "Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)." J Biol Chem **285**(10): 7394-7404.
- Reis, C. R., A. H. van Assen, et al. (2011). "Unraveling the binding mechanism of trivalent tumor necrosis factor ligands and their receptors." <u>Mol Cell Proteomics</u> **10**(1): M110 002808.
- Rickert, R. C., J. Jellusova, et al. (2011). "Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease." <u>Immunol Rev</u> **244**(1): 115-133.
- Riley, J. S., A. Malik, et al. (2015). "DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes." <u>Cell Death Dis</u> **6**: e1866.
- Ru, H., L. Zhao, et al. (2012). "S-SAD phasing study of death receptor 6 and its solution conformation revealed by SAXS." <u>Acta Crystallogr D Biol Crystallogr</u> **68**(Pt 5): 521-530.
- Ryseck, R. P. and R. Bravo (1991). "c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins." <u>Oncogene</u> **6**(4): 533-542.
- Sabio, G. and R. J. Davis (2014). "TNF and MAP kinase signalling pathways." <u>Semin Immunol</u> **26**(3): 237-245.
- Saito, K., Inoue, M., Koshiba, S., Kigawa, T., Yokoyama, S. (2005). "Solution structure of the carboxylterminal CARD-like domain in human TNFR-related death receptor-6."
- Santonocito, M., M. R. Guglielmino, et al. (2013). "The apoptotic transcriptome of the human MII oocyte: characterization and age-related changes." <u>Apoptosis</u> **18**(2): 201-211.
- Sasaroli, D., P. A. Gimotty, et al. (2011). "Novel surface targets and serum biomarkers from the ovarian cancer vasculature." <u>Cancer Biol Ther</u> **12**(3): 169-180.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." J Biol Chem **274**(3): 1541-1548.
- Schaer, D. A., D. Hirschhorn-Cymerman, et al. (2014). "Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy." J Immunother Cancer 2: 7.

- Schmidt, C. S., J. Liu, et al. (2003). "Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6." J Exp Med **197**(1): 51-62.
- Schmidt, C. S., J. Zhao, et al. (2005). "Resistance to myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by death receptor 6-deficient mice." J Immunol **175**(4): 2286-2292.
- Sedger, L. M. and M. F. McDermott (2014). "TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future." <u>Cytokine Growth Factor</u> <u>Rev</u> **25**(4): 453-472.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." <u>Cell</u> **47**(6): 921-928.
- Senftleben, U., Y. Cao, et al. (2001). "Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway." <u>Science</u> **293**(5534): 1495-1499.
- Senftleben, U., Z. W. Li, et al. (2001). "IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalphainduced apoptosis." <u>Immunity</u> **14**(3): 217-230.
- Sessler, T., S. Healy, et al. (2013). "Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling." <u>Pharmacol Ther</u> **140**(2): 186-199.
- Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." <u>Nat Cell Biol</u> **4**(5): E131-136.
- Shear, M. J. T., F.C. (1943). "Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrage producing fraction from Serratia arcenses (Bacillus prodigiosus) culture filtrate." <u>J Natl Cancer Inst</u> 4: 81-97.
- Simon, D. J., R. M. Weimer, et al. (2012). "A caspase cascade regulating developmental axon degeneration." <u>J Neurosci</u> **32**(49): 17540-17553.
- Slebioda, T. J., T. F. Rowley, et al. (2011). "Triggering of TNFRSF25 promotes CD8(+) T-cell responses and anti-tumor immunity." <u>Eur J Immunol</u> **41**(9): 2606-2611.
- Sturm, O. E., R. Orton, et al. (2010). "The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier." <u>Sci Signal</u> **3**(153): ra90.
- Sui, X., N. Kong, et al. (2014). "p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents." <u>Cancer Lett</u> **344**(2): 174-179.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res 21(1): 71-85.
- Takaesu, G., S. Kishida, et al. (2000). "TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway." <u>Mol Cell</u> 5(4): 649-658.

- Tam, E. M., C. J. Morrison, et al. (2004). "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **101**(18): 6917-6922.
- Tam, S. J., D. L. Richmond, et al. (2012). "Death receptors DR6 and TROY regulate brain vascular development." <u>Dev Cell</u> 22(2): 403-417.
- Twohig, J. P., S. M. Cuff, et al. (2011). "The role of tumor necrosis factor receptor superfamily members in mammalian brain development, function and homeostasis." <u>Rev Neurosci</u> **22**(5): 509-533.
- Urban, P., M. B. Rabajdova, et al. (2014). "Vascular marker expression during the development of various types of gynaecological malignancy." <u>Tumour Biol</u> **35**(11): 11229-11235.
- Vallabhapurapu, S. and M. Karin (2009). "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system." <u>Annu Rev Immunol</u> **27**: 693-733.
- Venkataraman, C., K. Justen, et al. (2006). "Death receptor-6 regulates the development of pulmonary eosinophilia and airway inflammation in a mouse model of asthma." <u>Immunol Lett</u> **106**(1): 42-47.
- Vince, J. E., D. Pantaki, et al. (2009). "TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf-{kappa}b and to prevent tnf-induced apoptosis." J Biol Chem **284**(51): 35906-35915.
- Wang, X., S. Yeh, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel androgen receptor coregulator ARA267-alpha in prostate cancer cells." J Biol Chem **276**(44): 40417-40423.
- Wang, Y., D. Zhao, et al. (2015). "Death Receptor 6 and Caspase-6 Regulate Prion Peptide-Induced Axonal Degeneration in Rat Spinal Neurons." J Mol Neurosci **56**(4): 966-976.
- Wang, Z., C. Fan, et al. (2014). "S5a binds to death receptor-6 to induce THP-1 monocytes to differentiate through the activation of the NF-kappaB pathway." <u>J Cell Sci</u> 127(Pt 15): 3257-3268.
- Weskamp, G., J. Schlondorff, et al. (2004). "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)." J Biol Chem **279**(6): 4241-4249.
- Wiens, G. D. and G. W. Glenney (2011). "Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies." <u>Dev Comp Immunol</u> **35**(12): 1324-1335.
- Williams, T. W. and G. A. Granger (1968). "Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species." <u>Nature</u> **219**(5158): 1076-1077.
- Wu, C. J., D. B. Conze, et al. (2006). "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." <u>Nat Cell Biol</u> **8**(4): 398-406.

- Xu, K., O. Olsen, et al. (2015). "The crystal structure of DR6 in complex with the amyloid precursor protein provides insight into death receptor activation." <u>Genes Dev</u> **29**(8): 785-790.
- Xu, Y., D. Wang, et al. (2015). "Beta amyloid-induced upregulation of death receptor 6 accelerates the toxic effect of N-terminal fragment of amyloid precursor protein." <u>Neurobiol Aging</u> 36(1): 157-168.
- Yan, M., Z. Zhang, et al. (2002). "Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice." <u>Curr Biol</u> **12**(5): 409-413.
- Yang, K., C. Mooney, et al. (2012). "DR6 as a diagnostic and predictive biomarker in adult sarcoma." <u>PLoS One</u> **7**(5): e36525.
- Yang, Y., Y. Zhang, et al. (2016). "Chronic stress regulates NG2(+) cell maturation and myelination in the prefrontal cortex through induction of death receptor 6." <u>Exp Neurol</u> **277**: 202-214.
- Zarnegar, B. J., Y. Wang, et al. (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." <u>Nat Immunol</u> **9**(12): 1371-1378.
- Zeng, L., T. Li, et al. (2012). "Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein." J Biol Chem **287**(34): 29125-29133.
- Zhang, D., X. Cao, et al. (2015). "MiR-210 inhibits NF-kappaB signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis." <u>Sci Rep</u> **5**: 12775.
- Zhao, H., M. Yan, et al. (2001). "Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice." J Exp Med **194**(10): 1441-1448.
- Zhou, Y., J. C. Xu, et al. (2015). "Role of death receptors in the regulation of hepatocyte proliferation and apoptosis during rat liver regeneration." <u>Genet Mol Res</u> **14**(4): 14066-14075.