

Tesina de Grado | Licenciatura en Bioquímica  
Montevideo | Uruguay  
Agosto 2013

---

# Producción de proBDNF/BDNF recombinante

---

Patricia Inés Calcagno Rodríguez

Orientador: Dr. Luis Barbeito  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República  
Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo



## RESUMEN

Esta tesina de grado tiene como objetivo principal la producción de proBDNF (del inglés *pro-Brain Derived Neurotrophic Factor*) recombinante humano en *E. Coli*. Para obtener dicha neurotrofina se utilizó la metodología previamente puesta a punto en el Laboratorio de Neurodegeneración del Institut Pasteur de Montevideo, para la expresión de otra proteína homóloga, perteneciente a la familia de las neurotrofinas: el NGF (del inglés *Nerve Growth Factor*).

En primer lugar, se procedió a diseñar el plásmido conteniendo el gen que codifica para la proneurotrofina precursora del factor de interés (proBDNF). Se utilizó un plásmido pET-22b(+) conteniendo una cola de histidina (His Tag) de manera de facilitar la purificación. Una vez obtenidos los plásmidos con el gen que codifica para proBDNF se transformaron bacterias (*E. Coli* de la cepa BL21) competentes con éstos y se verificó la presencia, en dichas células, de los plásmidos con el inserto mediante una minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina. Una vez verificada la presencia del plásmido con el inserto en las bacterias, se procedió a la expresión de proBDNF. Luego se realizó el análisis de las fracciones solubles e insolubles con lo cual se logró comprobar que dicha proneurotrofina se expresa de forma insoluble (cuerpos de inclusión).

Posteriormente se procedió a la purificación del proBDNF. Para esto se utilizó el protocolo previamente optimizado para la obtención de NGF recombinante, siguiendo pasos de desnaturalización y renaturalización necesarios para la obtención de la estructura nativa del proBDNF a partir de los cuerpos de inclusión. Una vez renaturalizada, la proneurotrofina se purificó mediante cromatografía de afinidad de metales quelantes utilizando una columna formada por una matriz con ligandos quelantes inmovilizados y cargados con iones metálicos de transición (Níquel, en este caso) los cuales se unen de manera no covalente a ciertos aminoácidos como histidina. Dado que la proteína de interés contiene una cola de histidinas (His-Tag) en su extremo carboxilo terminal esta va a permanecer unida a la columna. La elución del proBDNF se realizó mediante la adición de Imidazol a la columna; este compuesto tiene el grupo funcional de la histidina que compite por los puntos de unión metálicos de la matriz, permitiendo así la liberación de la proteína unida. Una vez finalizada la purificación de proBDNF se realizó una diálisis con la muestra de interés para poder retirar los trazos de imidazol. Para verificar la obtención de proBDNF se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se procedió a analizar la banda de interés (de peso molecular cercano al del proBDNF) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. También se verificó la presencia de la neurotrofina de interés mediante un Western-Blot utilizando anticuerpos anti-BDNF. Posteriormente correspondería realizar una digestión con tripsina para obtener, a partir de la proneurotrofina, el BDNF. También sería necesario realizar una serie de bio-ensayos para comprobar la actividad biológica del BDNF recombinante.

Dado que esta producción de dicha neurotrofina humana recombinante no ha sido publicada anteriormente se espera que en un futuro cercano estos resultados deriven en producciones bibliográficas y/o técnicas.

# ÍNDICE

1. Introducción .....	6
1.1 Neurotrofinas .....	6
1.1.1 Generalidades .....	6
1.1.2 Síntesis y secreción de las neurotrofinas.....	6
1.2 Receptores.....	8
1.2.1 Generalidades .....	8
1.2.2 Receptores de neurotrofinas y especificidad del ligando .....	9
1.2.3 Familia de receptores Trk .....	10
1.2.4 Empalme alternativo de los receptores Trk.....	10
1.2.5 Señalización mediada por Tirosina Quinasa .....	12
1.2.6 Receptor de neurotrofinas p75 .....	13
1.2.7 Variantes de empalme y receptores homólogos .....	14
1.2.8 Señalización por p75 <sup>NTR</sup> .....	15
1.2.9 Promiscuidad del ligando p75 <sup>NTR</sup> .....	17
1.3 BDNF y proBDNF .....	17
1.3.1 Generalidades .....	17
1.3.2 ProBDNF .....	18
1.3.3 Control de la expresión dependiente de actividad .....	19
1.3.4 Transcripción.....	19
1.3.5 Procesamiento y tráfico.....	20
1.3.6 Secreción.....	21
1.3.7 Unión del BDNF a sus receptores y funciones que desencadenan .....	23
1.4 BDNF y su rol en patologías humanas.....	24
1.4.1 Dolor neuropático .....	24
1.4.2 Obesidad.....	25
1.4.3 Accidente Cerebro Vascular.....	26
1.4.4 Enfermedad de Alzheimer .....	26
1.4.5 Enfermedad de Parkinson .....	26
1.4.6 Enfermedad de Huntington .....	26
1.4.7 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) .....	27

1.4.8 Depresión.....	27
1.4.9 Memoria .....	27
1.5 Desafío tecnológico para la expresión de BDNF .....	28
1.6 Posibles aplicaciones del BDNF recombinante .....	28
2. Objetivos .....	30
2.1 Objetivo principal.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. Materiales y Métodos.....	31
3.1 Obtención del plásmido con el inserto de interés .....	31
3.2 Preparación de bacterias BL21 quimiocompetentes .....	31
3.3 Transformación de bacterias con el plásmido de interés .....	31
3.4 Extracción y purificación de ADN plasmídico de las bacterias .....	32
3.5 Análisis de las secuencias .....	34
3.6 Adaptación del protocolo para la expresión de proBDNF recombinante .....	34
3.7 Extracción y caracterización de fracciones proteicas soluble e insoluble .....	37
3.8 Cromatografía.....	38
3.8.1 Cromatografía de afinidad.....	38
3.8.2 Cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC, del inglés Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) .....	39
3.9 Electroforesis .....	43
3.9.1 Generalidades .....	43
3.9.2 Electroforesis en gel de agarosa .....	43
3.9.3 Electroforesis SDS-PAGE .....	45
3.10 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	47
3.10.1 Generalidades de espectrometría de masas .....	47
3.10.2 Identificación proteica por espectrometría de masas basada en geles de electroforesis.....	49
3.11 Western Blotting .....	50
3.12 Dot Blot.....	58
3.13 Cuantificación de proteínas.....	59
4. Resultados y Discusión.....	62
4.1 Diseño del plásmido .....	62
4.2 Optimización de codones .....	63

<b>4.3 Secuenciación del plásmido.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4 Producción de proBDNF recombinante.....</b>	<b>69</b>
<b>4.5 Purificación y plegado del proBDNF.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6 Control de calidad por SDS PAGE y espectrometría de masas .....</b>	<b>73</b>
<b>4.7 Control de calidad por SDS PAGE y “western blotting” .....</b>	<b>75</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>80</b>
<b>7. Agradecimientos.....</b>	<b>92</b>

# 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1 - Neurotrofinas

### 1.1.1 - Generalidades

El BDNF es una proteína perteneciente a la familia de las neurotrofinas. Estas constituyen una de las familias de factores de crecimiento asociados con desarrollo neuronal y mantenimiento funcional más caracterizados y estudiados [1, 2]. A diferencia de los factores de crecimiento convencionales, la transducción de señales de las neurotrofinas difiere en que los ligandos activan sus receptores en la sinapsis y necesitan ser transportados de forma retrógrada al soma celular para poder ejercer cambios en la expresión génica [3].

Las neurotrofinas consisten en pequeñas proteínas secretadas y diméricas. Se generan como precursores llamados proneurotrofinas que presentan una función diferente a la de la especie madura, obtenida luego del procesamiento proteolítico [4]. Los miembros de esta familia son: NGF (nerve growth factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (neurotrophin 3), NT-4/5 (neurotrophin 4/5) y neurotrofina 6 (sólo presente en los peces teleósteos); y se pueden encontrar en el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y otros tejidos.

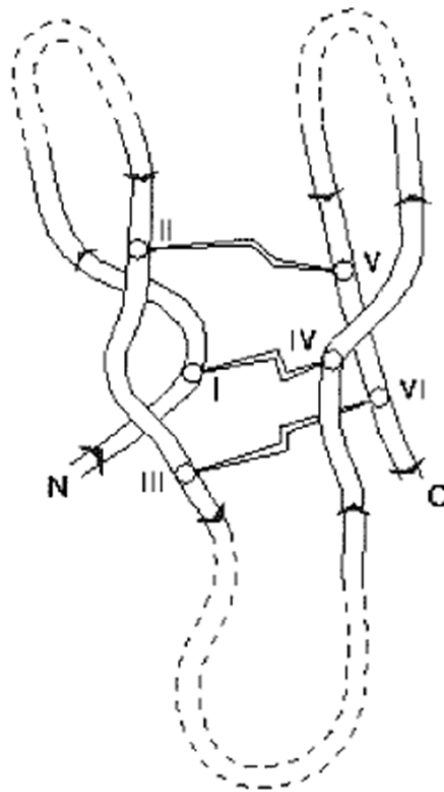
En cuanto a su función, a nivel celular, los efectos biológicos de las neurotrofinas son muy diversos, específicos para cada tipo celular y muchas veces paradójicos. Aunque inicialmente fueron identificadas como factores de crecimiento, las neurotrofinas median una gran variedad de funciones biológicas incluyendo supervivencia, diferenciación, detención del ciclo celular, neurodegeneración, neuroprotección, apoptosis y modulación de la plasticidad sináptica [5]. Estas proteínas ejercen sus funciones a través de su unión a dos tipos de receptores transmembrana proteicos: receptores tirosina quinasas de la familia Trk (TrkA, TrkB o TrkC) y el receptor p75, miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor*) [6].

En cuanto a sus propiedades, las neurotrofinas procesadas existen en solución como homodímeros unidos de forma no-covalente [7, 8] y presentan puntos isoeléctricos muy bajos, una propiedad algo inusual para proteínas secretadas, lo cual puede limitar su rango de acción. La característica estructural de la proteína es un arreglo característico de puentes disulfuro conocido como “nudo de cisteínas” [9], posteriormente identificado en otras proteínas secretadas como los factores de crecimiento derivados de plaquetas y los factores de crecimiento transformantes  $\beta$ s (TGF- $\beta$ s) [10]. Desde el punto de vista genético, las secuencias de las neurotrofinas son altamente conservadas en los mamíferos, con la excepción de la NT4/5; y, en vertebrados superiores, estos factores neurotróficos derivan de 4 genes [11], con cinco genes que codifican para tres receptores no relacionados entre sí, responsables de los efectos de señalización [12].

### 1.1.2 - Síntesis y secreción de las neurotrofinas

Todas las neurotrofinas de mamíferos son sintetizadas como proneurotrofinas las cuales tienen, aproximadamente, un tamaño de 30-35kDa [13]. Estos precursores son clivados por

furina, pro-convertasas y metaloproteasas (MMPs) para formar las neurotrofinas maduras, todas las cuales forman homodímeros unidos no covalentemente, con cada monómero pesando aproximadamente entre 12 y 13 kDa [13]. Todas las estructuras de neurotrofinas de mamíferos han sido obtenidas por cristalografía de rayos X, y debido a la formación característica de una horquilla doble formada por dos puentes disulfuro, penetrados por un tercer puente disulfuro (ver figura 1), son consideradas miembros de la superfamilia del nudo de cisteína [14].

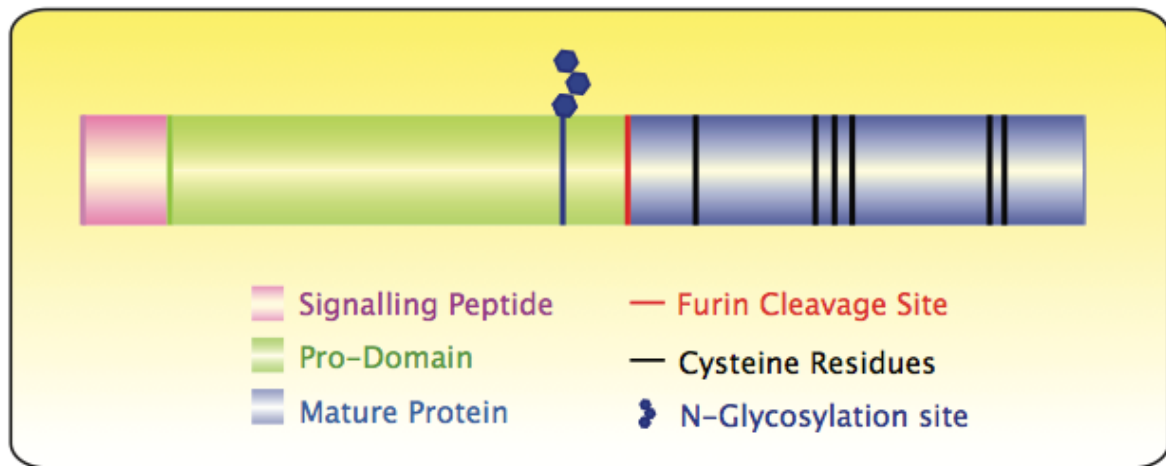


**Figura 1 - Vista esquemática de la estructura de BDNF, región del nudo de cisteínas.** El esquema muestra el nudo de cisteínas, formado por los tres puentes disulfuro intracatenarios. (Extraído de Sunasara et al., 1999).

Luego de su síntesis en el retículo endoplásmico, las proneurotrofinas deben plegarse correctamente, y deben ser guiadas a la vía secretora adecuada, regulada o constitutiva, y luego ser transportadas al compartimento celular apropiado [15]. En la mayoría de las células no neuronales, las neurotrofinas son secretadas a través de la vía constitutiva, donde los compartimientos de vesículas intracelulares se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática para liberarlas en el espacio extracelular [13]. En la mayoría de las poblaciones neuronales, las neurotrofinas son cargadas en gránulos secretorios que son, posteriormente, transportados a dendritas y espinas para ser liberados de forma post-sináptica [16]. Sin embargo, las neurotrofinas también pueden ser cargadas en vesículas y marcadas para transporte anterógrado hacia las terminales axonales, donde experimentan secreción extracelular dependiente de estímulos [15]. Finalmente hay tres destinos conocidos para las proneurotrofinas intracelulares: clivaje intracelular seguido de secreción; secreción seguida de clivaje extracelular; o excreción sin clivaje extracelular [2].

Tradicionalmente, las proneurotrofinas eran consideradas como precursores inactivos, sin actividad biológica significativa [17]. Sin embargo, hallazgos de grandes cantidades de proNGF y proBDNF que escapan al clivaje en ciertos tejidos postuló la posibilidad de que estas formas no clivadas de neurotrofinas tengan funciones biológicas [13].

Recientemente el proNGF y el proBDNF han surgido como potentes inductores de apoptosis [15, 18].



**Figura 2 - Esquema de la secuencia de las formas procesada y no procesada de las neurotrofinas.** Con la excepción de NT4/5, las secuencias de las neurotrofinas son altamente conservadas en mamíferos. Son sintetizadas como pre-pro-proteínas glicosiladas que sufren un clivaje proteolítico. El prodominio puede ser clivado intracelularmente por furina o extracelularmente por metaloproteasas (MMPs) y plasmina. Tanto los promotores procesados como los no procesados forman dímeros estables en solución. La característica estructural de las neurotrofinas es el motivo del nudo de cisteínas, el cual contiene a varios residuos de cisteína conservados dentro de la entidad madura. (Extraído de Matusica, 2008).

## 1.2 - Receptores

### 1.2.1 - Generalidades

Las neurotrofinas se unen a dos tipos principales de receptores presentes en la superficie celular: la quinasa relacionada a tropomiosina (Trk, del inglés *Tropomyosin Related Kinase*), perteneciente a la familia de los receptores tirosina quinasa [19, 20], y el receptor para neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>), miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) [21]. P75<sup>NTR</sup> fue el primer receptor de NGF en ser identificado [22, 23], y el primer receptor Trk fue descubierto, originalmente, como un rearreglo de tropomiosina no-muscular, y luego como una tirosina quinasa desconocida [24]. A dicha tirosina quinasa se la llamó TrkA y posteriormente fue identificada como un receptor de NGF [25, 26]. Poco tiempo después se identificaron, gracias a su similitud con TrkA, las tirosinas quinasa TrkB y TrkC [27-29].

Muchas veces ambos tipos de receptores son co-expresados por la misma célula. En estos casos la función de dichas moléculas puede variar significativamente ya que las señales generadas por cualquiera de los receptores son capaces de incrementar u oponerse a las



señales del otro [30]. De esta forma, los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> existen en una compleja relación paradójica, actuando para fomentar el apoyo o la supresión de las acciones del otro, en algunas ocasiones, así como también compartiendo y potenciando las afinidades de unión para múltiples neurotrofinas, en otras. Para complicar este sistema de dos receptores aún más, p75<sup>NTR</sup> también se asocia con otros receptores en una variedad de funciones que no siempre se encuentran asociadas a la acción de las neurotrofinas.

### 1.2.2 - Receptores de neurotrofinas y especificidad del ligando

La afinidad de ligando de las neurotrofinas y su especificidad es muy compleja debido al uso de sistemas multi-receptor. Además de que los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> tienen propiedades de señalización características, p75<sup>NTR</sup> tiene también la habilidad de modular y alterar la especificidad de ligando de los receptores Trk [31]. A pesar de que TrkA es capaz de unir NGF y NT-3, la co-expresión de p75<sup>NTR</sup> y TrkA restringe la señalización específica de NGF vía TrkA [32]. TrkB tiene la habilidad de unirse a BDNF, NT-3 y NT-4/5 [33], sin embargo, en presencia de p75<sup>NTR</sup>, sólo el BDNF es capaz de ejercer una respuesta funcional [34]. En contraste, TrkC sólo exhibe afinidad de unión por NT-3, pero muestra un descenso en su especificidad absoluta por NT-3 en presencia de p75<sup>NTR</sup> [35]. Además, estudios recientes acerca de la relación estructura-función de los receptores Trk indican que cuando son co-expresados con p75<sup>NTR</sup> los dominios extracelulares del receptor Trk se ven alterados para ofrecer sitios de anclaje adicionales para los ligandos de neurotrofinas [36]. Diversos estudios demostraron que el proNGF se une a p75<sup>NTR</sup> con una afinidad mayor que el NGF maduro y es un potente inductor de la apoptosis. Posteriormente se descubrió que el proNGF se une únicamente a p75<sup>NTR</sup> y sortilina, pero no a TrkA, y por esto han sugerido que el proNGF es un ligando apoptótico que es específico para p75<sup>NTR</sup> solo o en asociación con sortilina.

El receptor sortilina, que interactúa con p75<sup>NTR</sup>, representa al miembro más reciente de la familia de receptores de neurotrofinas. Este es un receptor tipo I de aproximadamente 95kDa, que guarda una gran homología con la proteína Vps-10p (proteína de sorting de la levadura vacuolar proteína 10), con un único dominio transmembrana, y una corta cola citoplasmática con un C terminal homólogo al del manosa 6-fosfato (M6P-R)/receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina II (IGF-II, del inglés *insulin-like growth factor-II receptor*) [37]. En la sortilina madura, un propéptido N-terminal (amino-terminal) de 44 residuos fue clivado y descartado, y resultados recientes demuestran que el clivaje del propéptido mediado por furina condiciona a la sortilina para la unión al ligando [38]. La familia de receptores Vps-10p está involucrada en el tráfico de carga desde la red trans-golgi (TGN) hacia los compartimientos endocíticos y lisosomales, y más del 90% de la sortilina se encuentra en compartimientos intracelulares [39]. La sortilina se expresa en una gran variedad de tejidos pero es más abundante en el sistema nervioso central, desde el desarrollo hasta la adultez [40].

La sortilina se une a moléculas de proNGF [41], y proBDNF [18], en presencia de p75<sup>NTR</sup> con gran afinidad, llevando a la apoptosis neuronal.

A pesar de que tanto el p75<sup>NTR</sup> como la sortilina son requeridos para la transducción de la señal apoptótica inducida por proNGF y proBDNF, la sortilina también se une a proNGF [41] y al

proBDNF [42] en ausencia de p75<sup>NTR</sup>. La habilidad de bloquear el envío de BDNF desde la red trans-golgi a gránulos secretorios con una simple sustitución en su prodominio (BDNF-V66M) sugiere que una región específica del prodominio puede ser requerida para la secreción eficiente y regulada del proBDNF desde las neuronas [42]. Es así que la sortilina no sólo funciona como un correceptor de p75<sup>NTR</sup> en la señalización apoptótica, sino que también parece ser crucial en la regulación adecuada de la guía para el movimiento intracelular de las recientemente sintetizadas proneurotrofinas.

Es así que las neurotrofinas utilizan tres clases de receptores distintos para dictar y regular respuestas biológicas opuestas, de supervivencia y muerte. A continuación se estudiarán en mayor profundidad dos de los principales receptores y sus vías de señalización: los receptores Trk y el receptor p75<sup>NTR</sup>.

### **1.2.3 - Familia de receptores Trk**

El proto-oncogen *trk* codifica para tres tipos de tirosina quinasas altamente relacionadas: TrkA, TrkB y TrkC [19, 43]; y también para numerosas variantes de empalme de cada Trk [19].

Los receptores Trk son típicos receptores tirosina quinasas que poseen una estructura tripartita conteniendo un dominio extracelular compuesto por tres motivos ricos en leucina, flanqueados por dos agrupaciones de cisteína, dos dominios similares al dominio de tipo C2 de las inmunoglobulinas (Ig-C2), un único dominio transmembrana, y una cola citoplasmática que contiene diez tirosinas conservadas, cuyo propósito es el inicio de las cascadas de señalización [19, 44].

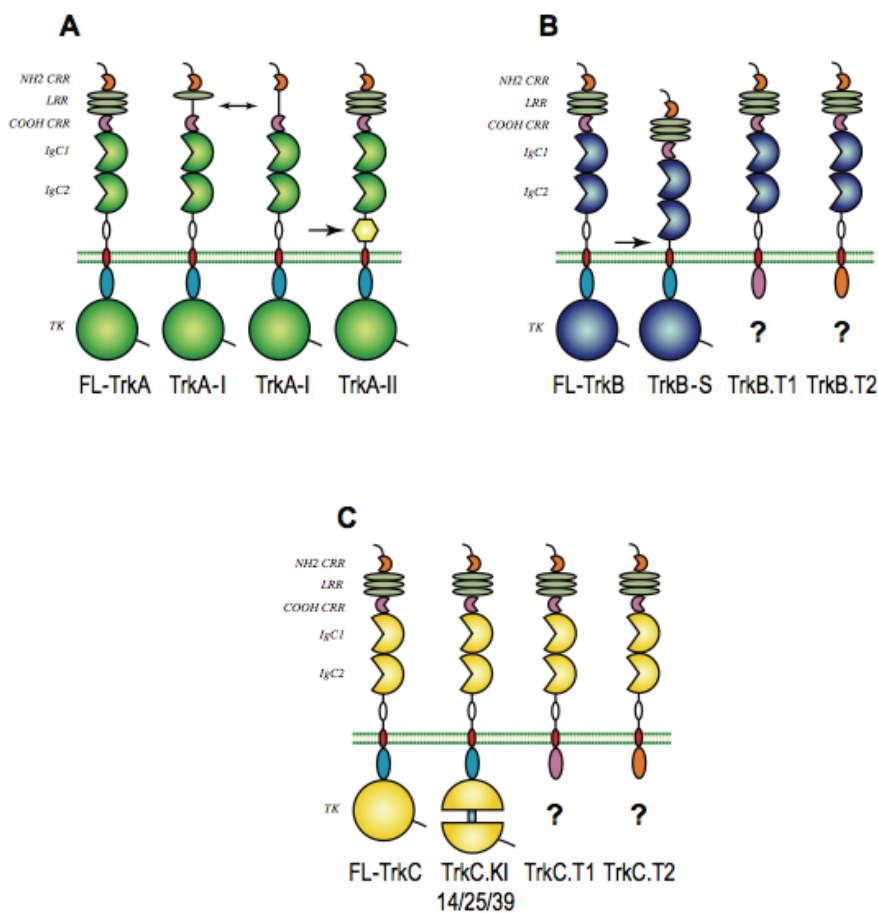
La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk ocurre, principalmente, a través de los dominios Ig-C2, siendo el dominio más cercano a la región transmembrana el que cumple el rol principal en esta función [45, 46]. Los motivos ricos en leucina y las agrupaciones de cisteína también pueden estar involucrados en este proceso [47]. La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk provoca la dimerización alostérica del receptor, seguida por la activación de la quinasa [48]. Esto conlleva al reclutamiento de proteínas de señalización como resultado de la fosforilación, por acción de la quinasa, de varios residuos de tirosina conservados evolutivamente, presentes en el horquilla de activación citoplasmática, incluyendo Y670, Y674 e Y675 [49]. La fosforilación de los otros residuos promueve la señalización mediante la creación de sitios de anclaje para un gran número de proteínas adaptadoras que acoplan estos receptores a cascadas de señalización intracelulares [49, 50], y a componentes del motor citoplasmático para el transporte axonal [51].

Otra función importante de los dominios Ig-C2 es la prevención de la dimerización espontánea del receptor Trk mediante la estabilización de la forma monomérica del mismo; esto evita que ocurra una activación en ausencia de las neurotrofinas [52].

### **1.2.4 - Empalme alternativo de los receptores Trk**

Todos los genes que codifican para los receptores *trk* de las neurotrofinas son naturalmente expresados como múltiples isoformas de proteínas, generadas a través del empalme alternativo de los transcritos primarios de sus genes. Variantes de empalme han sido

descriptas para los tres receptores Trk. Estos receptores tienen, por ejemplo, deleciones en el dominio extracelular o están truncados en el dominio intracelular, incluyendo el dominio tirosina quinasa (para Trks humanos, [53]). Se descubrió que variantes de inserto del dominio extracelular de TrkA y TrkB pueden influenciar la especificidad de ligando; en particular, una variante de empalme de TrkB a la que le faltaba el exón 9 en el dominio extracelular mostró una interacción disminuida con NT4/5 y NT3 [54]. De forma similar, una variante de TrkA ha sido descrita con una especificidad aumentada por NGF y una especificidad disminuida por NT3 [55]. Variantes de empalme de TrkC, y especialmente de TrkB, que carecen del dominio tirosina quinasa son expresadas en altos niveles en el cerebro adulto [56]. Sin embargo, sus roles biológicos continúan poco claros. Las isoformas truncadas del receptor TrkB, designadas T1 y T2, contienen dominios intracelulares cortos (de 23 y 21 aminoácidos; [56, 57]), son sobre-expresadas durante el desarrollo postnatal temprano y predominan sobre el TrkB completo (FL, del inglés *full length*) en el cerebro adulto [58]. Estos receptores truncados muchas veces son expresados en células no neuronales que no expresan el receptor TrkB completo [56]. Ellas internalizan BDNF y pueden restringir su disponibilidad [59]. Las variantes de empalme truncadas de Trk muchas veces son consideradas como moduladores dominantes negativos de la señalización por Trk, y hay muchas evidencias de que esta modulación negativa ocurre en sistemas reconstituidos [60, 61].



**Figura 3 - Representación esquemática de las isoformas estructurales de Trk.** El receptor Trk puede encontrarse en su forma completa (FL, del inglés *full length*) o como variantes que surgen del empalme alternativo. **Parte A-** Dos isoformas diferentes de TrkA han sido descritas y llamadas TrkA-I y TrkA-II. Tres isoformas de TrkA-I (se observan dos) han sido aisladas, las cuales llevan una delección total o parcial de la región rica en cisteínas en la matriz extracelular. TrkA-II difiere de TrkA-I en que contiene una inserción extracelular de seis aminoácidos cerca del dominio transmembrana. **Parte B-** Los transcritos de TrkA y TrkB son empalmados alternativamente en un pequeño exón en su dominio extracelular, creando la isoforma proteica correspondiente, llamada TrkA/B-S. El empalme alternativo del dominio intracelular del transcritos de TrkB resulta en isoformas con dominios tirosina quinasa trancos (TrkB-T1 y TrkB-T2). **Parte C-** Las isoformas con los dominios tirosina quinasa trancos, TrkB-T1 y TrkB-T2, también existen para el receptor TrkC. También han sido descritas isoformas con una inserción de péptido tirosina quinasa para el receptor TrkC. (Extraído de Matusica, 2008).

### 1.2.5 - Señalización mediada por Tirosina Quinasa

Las vías de señalización activadas por neurotrofinas a través de los receptores Trk resultan en destinos neuronales críticos como supervivencia neuronal, diferenciación, arborización dendrítica, formación de sinapsis, plasticidad neuronal y crecimiento axonal, entre otros [4, 49, 62, 63].

La unión de neurotrofinas a los receptores Trk conlleva a la dimerización y fosforilación de los receptores, reclutamiento de varios adaptadores y enzimas, y a la activación de varias vías de señalización [64, 65]. Las respuestas específicas para cada neurotrofina se alcanzan a través de la combinación única de los sitios de anclaje del receptor Trk, el reclutamiento de diferentes adaptadores y enzimas citoplasmáticas, y el tráfico regulado del receptor [66]. En el dominio citoplasmático de los receptores Trk hay hasta 10 residuos de tirosina [67] que son fosforilados (incluyendo las tirosinas Y490, Y670, Y674, Y675 e Y785) en respuesta a las neurotrofinas y actúan como los principales sitios de anclaje para la unión de proteínas adaptadoras y enzimas [68, 69].

Las vías de señalización más conocidas, activadas por los receptores Trk en respuesta a las neurotrofinas, son las vías de supervivencia y diferenciación Shc-Ras-MAPK, Rap-MAPK, PI3K-Akt, y PLC $\gamma$ -PKC [49, 70].

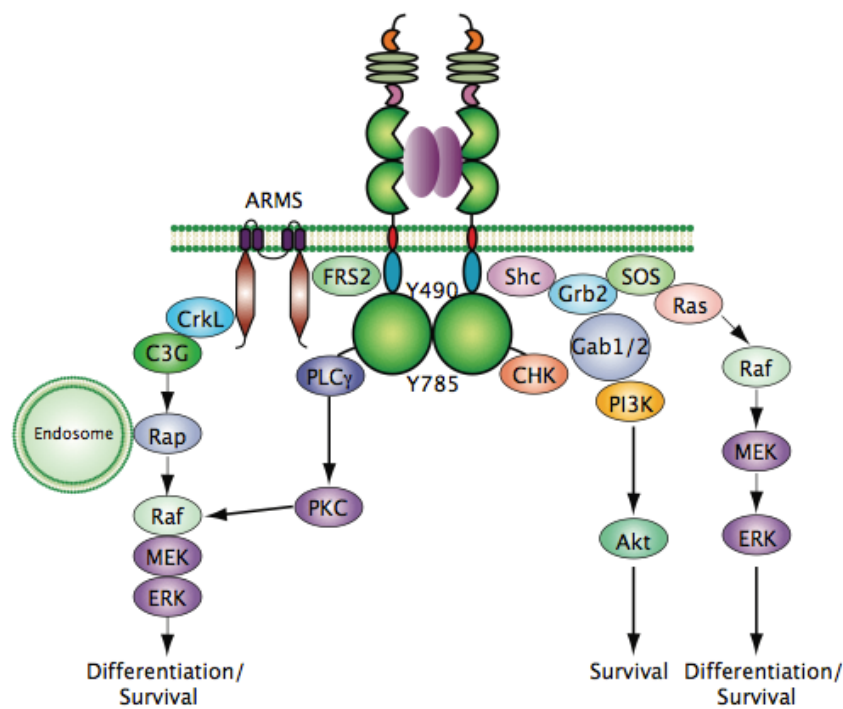
La regulación transcripcional de la supervivencia y diferenciación neuronal ocurre por medio de cuatro cascadas principales que incluyen formas transitorias o prolongadas de quinasas extracelulares reguladas por señales y/o proteína quinasas activadas por mitógenos (ERK/MAPK) a través de la pequeña GTPasa Ras [71]. La activación transitoria involucra la activación proteica vía Shc-Grb2-GEF/SOS-Ras-B-Raf/Raf-1-MAPK [72]. La activación prolongada de la tirosina quinasa ERK/MAPK necesita a los adaptadores adicionales CrkII/CrkL, GEF-C3G y las GTPasas Rap1/B-Raf [73, 74], pero puede también incluir interacciones con el adaptador del receptor de fibroblasto sustrato-2 (FRS2) [72] y ARMS [75]. Además, la activación sostenida, pero no transitoria, de las vías ERK/MAPK requiere la internalización endosomal del receptor Trk [74, 76].

La tercera cascada de señalización, crucial para la supervivencia de las neuronas, es la vía fosfoinositido-3-quinasa/serina/treonina proteína quinasa Akt (PI3K-Akt), la cual involucra Shc en asociación con Grb2/Gab1 [77-79]. Además, la fosforilación de Akt también puede activar la

respuesta pro-supervivencia de NF- $\kappa$ B [80] o regular el crecimiento axonal y el ramificado a través de la inactivación de GSK-3 $\beta$  [81].

La cuarta respuesta de supervivencia y diferenciación involucra la activación de fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la cual resulta en la generación de inositol trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG), y dispara varias vías de proteína quinasa C (PKC) [82, 83].

A su vez los PKCs involucran la mencionada cascada de supervivencia y diferenciación Raf-MEK-ERK1 [83]. Se ha demostrado que la señalización por PLC $\gamma$  juega un rol importante en la plasticidad sináptica mediada por BDNF [84].



**Figura 4 - Vías de señalización mediadas por los receptores Trk.** La unión de neurotrofinas a los receptores Trk conlleva a su activación y al reclutamiento de diferentes proteínas que se asocian con residuos específicos de fosfotirosina del dominio citoplásmico de dichos receptores. Numerosas interacciones tirosina quinasa disparan la activación de las vías de señalización, como por ejemplo las vías Shc-Ras-MAPK, Rap-MAPK, PI3K-Akt, y PLC $\gamma$ -PKC, las cuales resultan en supervivencia, crecimiento de neuritas, expresión génica, y plasticidad sináptica. Algunos de estos efectores están, además, asociados con compartimientos endosomales para señalización de largo alcance. (Extraído de Matusica, 2008).

### 1.2.6 - Receptor de neurotrofinas p75

Este receptor de neurotrofinas fue descubierto al expresar una proteína transmembrana capaz de unirse al NGF, cuando se trataba de identificar a los receptores de dicho factor neurotrófico [85]. Durante muchos años se creyó que el p75<sup>NTR</sup> sólo era un receptor de baja afinidad para el NGF, pero diversos estudios han demostrado que es capaz de unirse a todas las neurotrofinas de mamíferos (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5) con una afinidad similar [86]. Inicialmente, cuando fue descubierto y clonado, el p75<sup>NTR</sup> representó un nuevo tipo de receptor, pero desde

entonces se han descubierto un gran número de receptores de citoquinas estructuralmente relacionados; el mejor caracterizado de estos es la familia de receptores de factores de necrosis tumoral (TNF) [5].

Un miembro típico de la familia de receptores TNF es el p75<sup>NTR</sup>. Este contiene cuatro dominios extracelulares ricos en cisteína, únicos y cortos dominios transmembrana ricos en serina y en treonina, y un dominio citoplasmático, de aproximadamente 80 aminoácidos, pequeño y poco conservado (también conocido como el dominio de la “muerte”) (Figura 5) [21, 87]. Debido a la presencia del “dominio de la muerte”, la muerte celular y la apoptosis mediada por la señalización a través de p75<sup>NTR</sup> recibió considerable atención [88]. La muerte celular y la apoptosis inducida por p75<sup>NTR</sup> fue demostrada en neuronas sensoriales [89], oligodendrocitos [90], cultivos de neuronas simpáticas neonatales [91], neuronas motoras [92], y poblaciones neuronales con actividad del receptor Trk no existente o reducida [93].

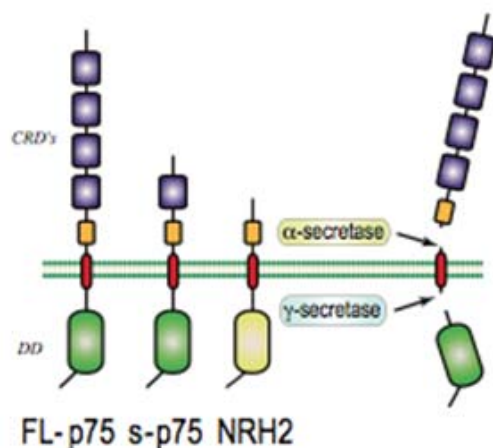
Luego del descubrimiento de los receptores Trk como los componentes de señalización del complejo receptor de las neurotrofinas [26], el p75<sup>NTR</sup> fue relegado al rol de una proteína de unión capaz de modificar la unión y la señalización de los receptores Trk. Durante muchos años, se creyó que el dominio de “muerte” intracelular del p75<sup>NTR</sup> carecía de una función enzimática intrínseca, inducible por el ligando; pero ya hace algunos años se descubrió el rol la señalización inducida por p75<sup>NTR</sup> en el reclutamiento de interactores y adaptadores citosólicos involucrados en la supervivencia [94], apoptosis [88, 91], crecimiento axonal [95], colapso axonal y detención del ciclo celular [96].

Investigaciones recientes han revelado que el dominio intracelular de p75<sup>NTR</sup> contiene dos residuos tirosina quinasa, Y337 e Y336, los cuales sufren fosforilación luego de la unión con NGF [97]. Además, el p75<sup>NTR</sup> con la tirosina fosforilada activa Ras a través del mismo adaptador de proteínas que los receptores Trk [97].

### **1.2.7 - Variantes de empalme y receptores homólogos**

El gen p75 también es expresado en múltiples isoformas de dicho receptor. La variante de empalme alternativo llamada short p75 (s-p75) (Figura 5), contiene un marco de lectura abierto que se traduce en una forma natural del receptor, con un exón III empalmado que codifica para los dominios ricos en cisteína 2, 3 y 4, los cuales son esenciales para la unión de neurotrofinas [98, 99]. A pesar de que la variante s-p75 no se une a ninguna de las neurotrofinas, comparte un dominio intracelular idéntico, y es posible que se una a alguna de las proteínas de señalización intracelular e interactores del p75<sup>NTR</sup> [100].

Un gen estructuralmente relacionado con p75<sup>NTR</sup> codifica para el receptor homólogo de neurotrofinas (NRH, del inglés *Neurotrophin Receptor Homologue*) [101]. NRH es homólogo al p75<sup>NTR</sup>, con una gran similitud en las secuencias transmembrana, yuxtamembrana y regiones del dominio de muerte (Figura 5) [102]. NRH1 y NRH2 han sido identificados [101], sin embargo, sólo se ha encontrado al NRH2 en los genomas de mamíferos [102]. Recientemente se ha identificado al NRH2 en ratas y se le ha denominado alternativamente PLAIDD (del inglés *p75-like Apoptosis Inducing Death Domain Protein*) [103] y también NRADD (del inglés *Neurotrophin Receptor Alike Death Domain Protein*) [104].



**Figura 5 - Representación esquemática de las isoformas estructurales de p75<sup>NTR</sup>.** Para p75<sup>NTR</sup> se ha descrito una isoforma proteica que carece de los dominios ricos en cisteína 2, 3 y 4 (s-p75<sup>NTR</sup>) debido al empalme alternativo del exón III de p75<sup>NTR</sup>-FL. El homólogo de p75<sup>NTR</sup>, NRH2 también está presente en mamíferos. El p75<sup>NTR</sup> también sufre clivaje medidado por las metaloproteinasas α-secretasa y γ-secretasa para producir una pieza de ectodominio y un fragmento de dominios transmembrana y citoplasmático con capacidad de señalización. (Extraído de Matusica, 2008).

### 1.2.8 - Señalización por p75<sup>NTR</sup>

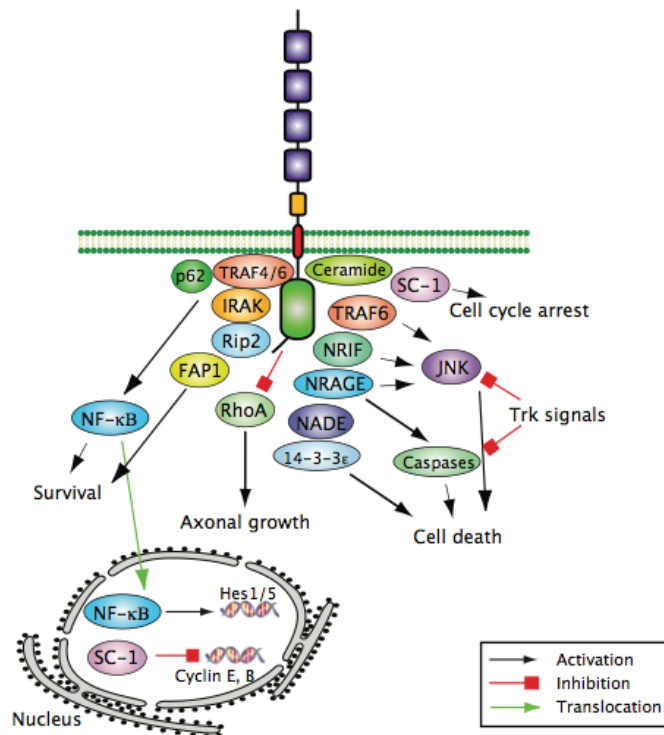
A diferencia de los roles tróficos conocidos de los receptores Trk, la multifuncionalidad de p75<sup>NTR</sup> dificulta la formulación de un único modelo para explicar la señalización mediada por dicha molécula. Esta complejidad surge del hecho de que el p75<sup>NTR</sup> se encuentra involucrado en funciones que varían desde trofismo hasta muerte celular programada, y además muchas de sus acciones se encuentran integradas con otros receptores y múltiples ligandos que logran mediar interacciones sinérgicas y antagónicas. Es así que se necesita un esquema de la señalización por p75<sup>NTR</sup> para ilustrar la complejidad de las vías de señalización (Figura 6).

Como se cree que el p75<sup>NTR</sup> se encuentra principalmente involucrado en la señalización de la muerte a través de interactores proteicos, sus vías apoptóticas son las más estudiadas [105-108]. Estas pueden ser disparadas por neurotrofinas, proneurotrofinas y ligandos alternativos para p75<sup>NTR</sup> [109]. Una función principal del dominio intracelular de p75<sup>NTR</sup> (p75<sup>ICD</sup>) parece ser la producción de ceramidas [110, 111], las cuales están involucradas en casi todos los mecanismos apoptóticos [108]. La producción elevada o aumentada de ceramidas bajo la activación de p75<sup>NTR</sup> resulta en la sobre-expresión de múltiples proteínas apoptóticas [107].

El ejecutor de muerte celular asociado a p75<sup>NTR</sup> (NADE) [112], el factor de interacción del receptor de neurotrofinas (NRIF) [113], el factor asociado al receptor TNF (TRAF6), el factor nuclear kB (NF-kB), y el homólogo de MAGE interactor del receptor de neurotrofinas (NRAGE) [96] han sido identificados como los principales interactores asociados con las cascadas de señalización de muerte. Sin embargo, todas las vías de señalización apoptóticas parecen converger en la activación de la Jun quinasa (JNK) [108], la proteína supresora de tumores p53 [114], y varias caspasas [48, 107]. El NRIF y el NRAGE, en colaboración con el factor de células de Schwann 1 (SC-1) también están involucrados en la detención del ciclo celular, mediante la regulación de los niveles de ciclinas E y R a partir de la activación de NGF [115].

En contraste con la elevada producción de ceramidas resultante de la continua activación del receptor, los pulsos cortos de producción de ceramidas activan a PI3-K, la cual, subsecuentemente, produce efectos tróficos (extensión de neuritas y supervivencia) a través de la activación de Akt o de RhoA-Ras-Raf-Erk1/2 [108]. Sin embargo, la producción continua de ceramidas en esa vía tiene una influencia negativa en las vías Akt/Erk1/2, bloqueando los efectos tróficos [116]. Una vía de pro-supervivencia asociada con la unión de NGF a  $p75^{\text{NTR}}$  utiliza NF- $\kappa$ B, la cual influencia la transcripción génica mediada a través de TRAF6, p62, quinasa asociada al receptor de interleuquina 1 (IRAK) y la proteína 2 que interactúa con el receptor (RIP2) [117].

En un escenario alternativo NF- $\kappa$ B tiene la habilidad de translocarse al núcleo y disparar la expresión de Hes1/5 para influenciar el crecimiento dendrítico [118]. La unión del ligando también puede iniciar el clivaje de  $p75^{\text{NTR}}$ , y el  $p75^{\text{ICD}}$  resultante también se ha visto involucrado en la translocación nuclear [119]. Al igual que los receptores Trk,  $p75^{\text{NTR}}$  puede, además, modular la transmisión sináptica y la plasticidad en neuronas maduras [120, 121].



**Figura 6 - Vías de señalización mediadas por  $p75^{\text{NTR}}$ .** La unión de neurotrofinas maduras o de proneurotrofinas a  $p75^{\text{NTR}}$  dispara la activación de múltiples vías de señalización a través de diferentes adaptadores que resultan en diversas, y a veces paradójicas, consecuencias como supervivencia, apoptosis, crecimiento axonal, colapso axonal y detención del ciclo celular. Las proteínas adaptadoras involucradas en la señalización mediada por  $p75^{\text{NTR}}$  incluyen las vías inducidas por ceramidas de NRIF, NRAGE, TRAF6, NADE que convergen en JNK y en varias caspasas que conducen a la apoptosis. Estos efectos pueden ser bloqueados por las señales de Trk. SC-1 induce la detención del ciclo celular a través de la regulación nuclear de las ciclinas E y B. Importantes señales de supervivencia son transducidas a través de TRAF4/6, P62, IRAK y RIP2, que conllevan a NF- $\kappa$ B. La activación de  $p75^{\text{NTR}}$  ocasiona la disociación de RhoA del receptor lo cual conduce al crecimiento axonal. La translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo modula el crecimiento dendrítico a través de la expresión de Hes1/5. (Extraído de Matusica, 2008).



### 1.2.9 - Promiscuidad del ligando p75<sup>NTR</sup>

El p75<sup>NTR</sup>, además de ser una molécula importante para la unión, internalización y tráfico de neurotrofinas, es capaz de unirse de forma directa o indirecta a una gran cantidad de proteínas, incluidas las lectinas, patógenos y toxinas [122], algunas de las cuales, como la neurotoxina del tétanos (TeNT), tienen la habilidad de entrar a neuronas específicas y viajar de forma transneuronal a lo largo de poblaciones de células conectadas a través del sistema nervioso [123, 124]. Es así que la unión específica a p75<sup>NTR</sup> no sólo actúa en el tráfico de las neurotrofinas, sino que presenta un sistema de transporte explícito para la entrada de proteínas foráneas.

## 1.3 - BDNF y proBDNF

### 1.3.1 - Generalidades

En 1982, treinta años después del descubrimiento de la primera neurotrofina (NGF), Yves Barde y Hans Thoenen lograron purificar del cerebro de cerdo otro factor que presentaba propiedades promotoras del crecimiento neuronal, y lo llamaron Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) [125]. El eventual clonado del gen, siete años después, reveló una gran homología con el NGF, presentando 51 aminoácidos idénticos. Esta similitud también sugería que el BDNF se encontraba en la naturaleza como un homodímero.

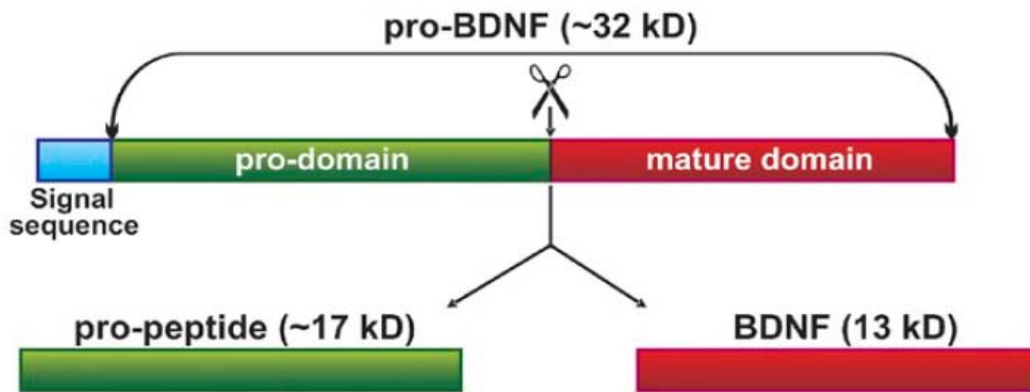
El BDNF, al igual que otros miembros de la familia de las neurotrofinas, es sintetizado como una pre-proforma que consiste de 247 aminoácidos. El proBDNF es empaquetado en vesículas secretoras [126] y luego liberado de la neurona a través de secreción constitutiva o mediante una liberación dependiente de actividad [127].

Existen dos formas de BDNF extracelular: proBDNF y BDNF “maduro” (llamado BDNF). Luego de la liberación del proBDNF de la neurona, su prodominio es clivado proteolíticamente por plasmina o por metaloproteasas, dando lugar al BDNF maduro [13, 128] (Figura 7). Evidencias recientes sugieren que la forma madura de BDNF es predominante y de gran relevancia fisiológica en el sistema nervioso central (SNC) adulto [129, 130]. La proteína BDNF está ampliamente distribuida a través del cerebro adulto en casi todas las áreas corticales, así como también en muchas regiones subcorticales y de la médula espinal.

El BDNF, al igual que las demás neurotrofinas, se une a dos receptores de distinta clase: el receptor de quinasa relacionada a tropomiosina de tipo B, el cual es un receptor tirosina quinasa de la familia de las quinasas relacionadas a tropomiosina [131], y el receptor p75, el cual es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral [132]. El TrkB es el receptor principal para el BDNF en el cerebro adulto, debido a su gran patrón de expresión y elevada afinidad de unión para BDNF.

Muchas evidencias sostienen que el BDNF es esencial para el mantenimiento de los procesos fisiológicos del cerebro adulto normal, intacto. El BDNF tiene un rol importante en la modulación de la arborización dendrítica y en la morfología de las espinas dendrítica [133, 134], así como también en la plasticidad sináptica y en la potenciación a largo plazo (LTP, del

inglés *Long Term Potentiation*) [135]. De esta forma, el BDNF influye en el aprendizaje y la memoria [136, 137]. Esta proteína también modula las funciones metabólicas hipotalámicas en el cerebro adulto; y puede tener gran potencial terapéutico en aquellos desórdenes que afectan el SNC como la enfermedad de Alzheimer, accidentes cerebro vasculares y depresión, así como también en desórdenes metabólicos, como se verá posteriormente.



**Figura 7 - Esquema del clivaje del proBDNF y sus dominios.** En la imagen se encuentra esquematizada la secuencia del proBDNF con cada uno de sus dominios (prodominio, dominio maduro y secuencia señal), el sitio de clivaje y los productos de este proceso. Se encuentran especificados los pesos moleculares de cada especie. (Extraído de Diene et al., 2012).

### 1.3.2 - ProBDNF

Durante décadas se creyó que las proneurotrofinas carecían de actividad biológica, pero este dogma cambió cuando Lee y colaboradores [13] reportaron que el proNGF interactuaba preferencialmente con  $p75^{NTR}$  en lugar de con los receptores Trk. Esta interacción conducía a la apoptosis de las neuronas periféricas, un efecto opuesto a la acción pro-supervivencia del NGF maduro. Desde entonces, los efectos pro-apoptóticos del proNGF y del proBDNF mediados por  $p75^{NTR}$  han sido demostrados en un gran número de modelos [13, 15, 138]. Es así que el clivaje proteolítico de las proneurotrofinas se considera un importante paso regulatorio para dirigir las funciones de las neurotrofinas, las cuales son llevadas a cabo a través de los receptores  $p75^{NTR}$  (proneurotrofinas) y Trk (neurotrofinas maduras) [2, 31].

El proBDNF es secretado como un dímero de aproximadamente 60kDa [139, 140] y es glicosilado en células de mamíferos. Esta proneurotrofina tiene una elevada afinidad por los receptores  $p75^{NTR}$  y sortilina, a través de los cuales ejerce sus funciones [18]. El clivaje del proBDNF ocurre intracelularmente por acción de serina proteasas como PC1/3 y/o por furina, o extracelularmente por proteínas extracelulares como plasmina, activada por el activador de tejido plasminógeno (tPA), y/o por MMPs. Existen diversos reportes que sugieren que el clivaje de proBDNF en el sistema nervioso es regulado de forma específica y depende del contexto celular.

Cabe destacar que se conoce poco acerca de la función del proBDNF cuando se compara con los numerosos reportes de los mecanismos de acción del BDNF maduro [2]. Experimentos *in*

*vitro* han demostrado que el proBDNF promueve la apoptosis de neuronas simpáticas y del prosencéfalo basal [18, 141]. Además, se ha descubierto que la aplicación de proBDNF exógeno facilita la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *Long Term Depression*), a través de la interacción con p75<sup>NTR</sup> [142]. Esto sugiere que el proBDNF puede ejercer múltiples acciones biológicas en el sistema nervioso.

Diversos estudios han demostrado que la función del proBDNF en el sistema nervioso no se encuentra limitada a la promoción de la apoptosis y la consolidación de la LTD, y que este precursor afecta, de forma específica para cada tipo celular, al crecimiento dendrítico, crecimiento de espinas y supervivencia de neuronas del SNC. También se cree que el proBDNF y el clivaje proteolítico del mismo puede jugar un rol importante en la regulación de la señalización de BDNF en la arquitectura del sistema nervioso, y así en las acciones que esta neurotrofina desencadena [143].

### **1.3.3 - Control de la expresión dependiente de actividad**

Una característica importante del BDNF es que su expresión es regulada por la actividad neuronal. Hoy en día se sabe que una gran variedad de estímulos fisiológicos pueden alterar la expresión del BDNF. Por ejemplo, la entrada visual controla la expresión del BDNF en la corteza visual, en el núcleo superiasmático y en la amígdala la expresión de BDNF es regulada por el ritmo circadiano, el miedo, etcétera. El aprendizaje y el ejercicio también pueden potenciar la expresión de BDNF en el hipocampo; y además, los niveles de BDNF también se ven afectados en una variedad de condiciones patológicas asociadas con la actividad neuronal alterada en el cerebro, incluyendo convulsiones, enfermedad de Alzheimer, depresión y estrés. Además de la regulación de la expresión génica del BDNF, estudios recientes demuestran que la actividad neuronal también controla muchos procesos celulares del BDNF, incluyendo el tráfico intracelular, la secreción del BDNF y el clivaje del proBDNF [144].

### **1.3.4 - Transcripción**

La estructura genómica del BDNF es bastante compleja. En ratas, hay al menos cuatro promotores que controlan cuatro cortos exones 5'. Cada exón 5' es empalmado alternativamente a otro exón 3' común (exón V) que codifica para la proteína pre-proBDNF. En humanos, un estudio reciente reportó siete promotores y ocho exones con el exón VIII siendo el exón común que codifica para el pre-proBDNF. Aún no se sabe por qué la naturaleza ha diseñado múltiples transcritos de BDNF que codifican exactamente para la misma proteína. Evidencias recientes indican que estos transcritos están distribuidos en diferentes regiones del cerebro, diferentes tipos celulares, y hasta en diferentes partes de las células (soma vs. dendritas). Por ejemplo, el transcripto del exón III sólo es detectado en somas celulares, mientras que el transcripto del exón IV está presente tanto en cuerpos celulares como en procesos dendríticos de las neuronas de la corteza visual.

Nuevas evidencias sugieren que los promotores de BDNF están involucrados diferencialmente en varios desórdenes psiquiátricos y neurológicos. La transcripción conducida por el promotor II puede ser suprimida por un silenciador neuronal, y esta supresión es removida por la proteína huntingtin, la cual se une y secuestra al silenciador en el citosol de neuronas

corticales. Esto es importante para la supervivencia de las neuronas corticales que se proyectan al striatum. En la enfermedad de Huntington, el mutante huntingtin ya no puede unirse al silenciador, resultando en la translocación del silenciador al núcleo y la supresión del promotor II de BDNF. Otro ejemplo importante de la regulación específica del promotor de BDNF involucra a MeCP2, que es un represor transcripcional Metil-CpG-dependiente que se une al ADN metilado del promotor III de BDNF. La despolarización neuronal disocia MeCP2 del promotor III, conllevando a la expresión del transcrito del exón III en neuronas hipocámpales. Una mutación en MeCP2, la cual ocurre en el 80% de los pacientes con síndrome de Rett, elimina esta forma de regulación dependiente de actividad. El promotor IV ha sido implicado en el estrés y es el principal blanco de los receptores glucocorticales y mineralocorticales.

De todos los promotores, el promotor III es el que ha recibido más atención debido a que este es el que está regulado, de forma más efectiva, por actividad neuronal en la amígdala, hipocampo y corteza. Un incremento en la transcripción originada por el promotor III ha sido asociado con LTP y memoria. Trabajos tempranos han demostrado que la expresión de BDNF era dependiente de un aumento en el calcio intracelular y que la aplicación de  $K^+$  elevado a cultivos de neuronas corticales promovía selectivamente la expresión del exón III. En base a estas observaciones, se vio que tres elementos en el promotor III estaban involucrados en la expresión dependiente de calcio del BDNF: la secuencia que responde a  $Ca^{2+}$  1 (CaRE1) que une el factor de transcripción de respuesta a  $Ca^{2+}$  (CaRF), el E-Box que une al factor estimulante corriente arriba (USF), y el clásico elemento de respuesta a AMPc (CRE), que se une a CREB. Además, la transcripción a través del promotor III es regulada por NF-kB y MeCP2. En conclusión, la transcripción del exón III de BDNF está fuertemente regulada por varios mecanismos que acoplan la actividad neuronal con la transcripción génica [144].

### 1.3.5 - Procesamiento y tráfico

Al igual que en todas las neurotrofinas, el mRNA de BDNF es traducido a una proteína precursora, pre-proBDNF, la cual entra al lumen del retículo endoplásmico (ER) a través de su "pre" secuencia N-terminal (péptido señal). Luego de la remoción de la pre-secuencia por acción de peptidasas señal en el ER, la proteína es plegada en la red trans-Golgi y luego empacada en vesículas secretoras. Una vez que está correctamente plegado, el proBDNF es enviado a una de dos vías secretoras principales, la constitutiva (ejemplo, liberación espontánea) o la regulada (ejemplo, liberación en respuesta a estímulos). Las vesículas que contienen al BDNF son guiadas al compartimiento subcelular apropiado. En las dendritas y espinas neuronales, el BDNF parece ser almacenando en un tipo especial de gránulos secretorios que carecen de cromogranina A (CGA, del inglés *Chromogranin A*), un marcador de vesículas con core denso (LDCV, del inglés *Large Dense Core Vesicles*). En contraste, las LDCVs convencionales que contienen BDNF se han encontrado en axones y en terminales, posiblemente a través de transporte axonal anterógrado. Las células no neuronales, como fibroblastos y células de Schwann, secretan neurotrofinas de forma constitutiva, mientras que las principales neuronas y células neuroendócrinas secretan neurotrofinas en respuesta a la despolarización y a un aumento en el calcio intracelular.

El tráfico dendrítico y la localización sináptica de BDNF parecen ser influenciados por su propio prodominio. Este se vio implicado en un estudio que examinaba un SNP (del inglés *Single-Nucleotide Polymorphism*) en la pro-región del gen que codificaba para el BDNF humano. Este SNP, localizado en el nucleótido 196, producía una sustitución valina a metionina en el aminoácido 66 (Val66Met). En cultivos de neuronas hipocampales, el val-BDNF marcado con fluorescencia se encontraba distribuido en el cuerpo celular, así como en dendritas. Una fracción de val-BDNF también se encontraba localizada en sinapsis, como lo reveló la co-localización con marcadores sinápticos. En contraste, el met-BDNF estaba raramente localizado en dendritas distales y ausente en las sinapsis. Estos resultados sugirieron que el prodominio, particularmente aquel correspondiente a la región que contiene a Val66, era crítico para el tráfico dendrítico y para la localización sináptica de BDNF.

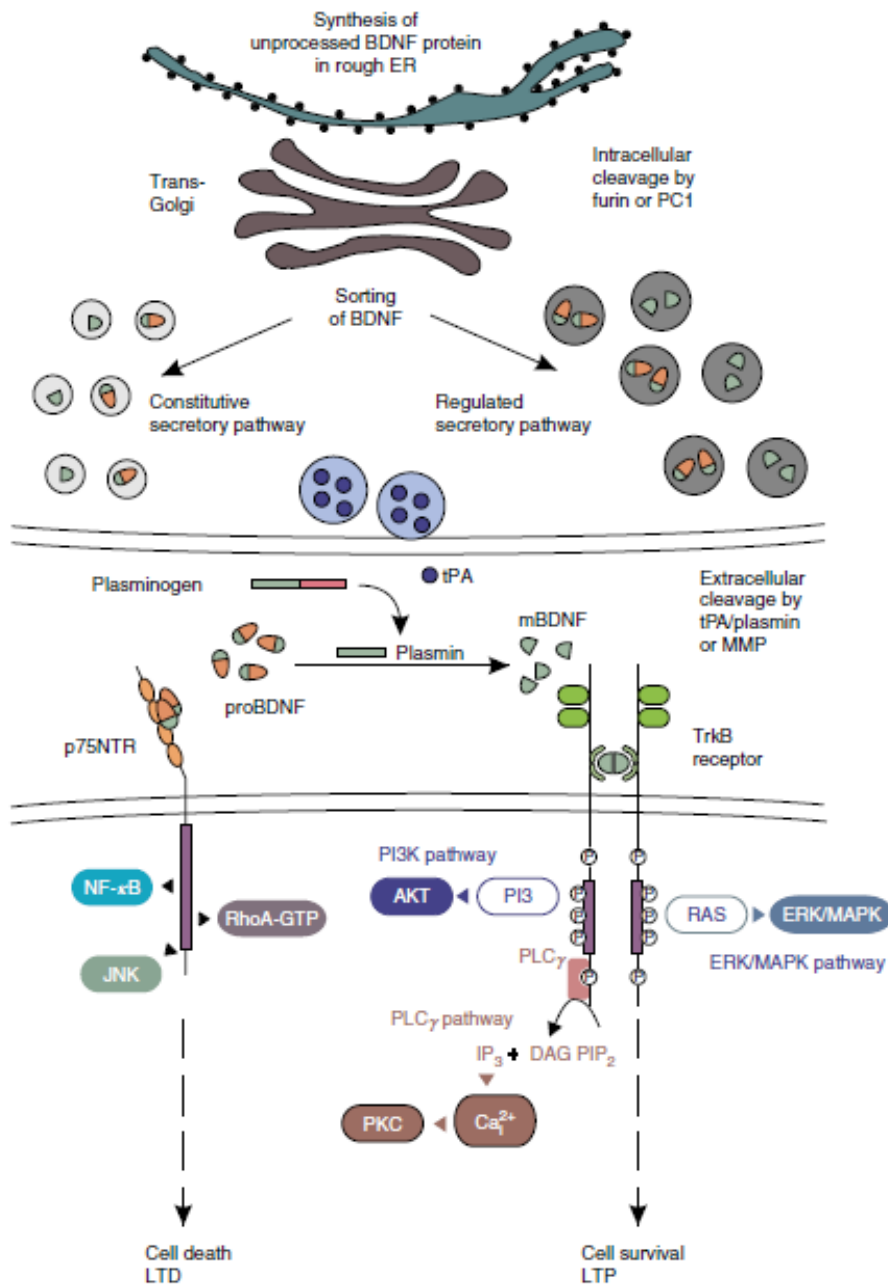
Una visión que se mantuvo por mucho tiempo era aquella que establecía que las proneurotrofinas, principalmente el proNGF y el proBDNF, eran procesadas por proteasas intracelulares incluyendo la serina proteasa furina en la red trans-Golgi, y por la prohormona convertasa (PC1/3) en gránulos secretorios. Estudios recientes han demostrado que una gran fracción de BDNF en el cerebro es secretado como proforma, la cual es convertida a mBDNF por acción de proteasas extracelulares incluyendo plasmina o metaloproteinasas (MMP3 o MMP7). Dado que el proBDNF y el mBDNF presentan acciones biológicas diferentes y opuestas a través de distintos receptores, el clivaje proteolítico ha surgido como un nuevo mecanismo que determina la función del BDNF. De interés particular es el activador de plasminógeno de tejidos (tPA), una proteasa extracelular que convierte al zymógeno plasminógeno inactivo en plasmina. tPA es secretado de las terminales axonales en respuesta a la actividad neuronal. Es así que es posible que la actividad neuronal pueda controlar la conversión de proBDNF a mBDNF mediante la activación de la secreción de tPA [144].

### **1.3.6 - Secreción**

El BDNF es, posiblemente, la única neurotrofina secretada en respuesta a la actividad neuronal. De hecho, la mayoría del BDNF es enviado a la vía secretora regulada, más que a la constitutiva. Diversos experimentos utilizando BDNF marcado con GFP revelaron que el BDNF puede ser secretado de sitios pre o postsinápticos. La cantidad de BDNF secretado depende del patrón de actividad neuronal.

Estudios del SNP Val66Met han traído atención al rol del prodominio en la secreción dependiente de actividad del BDNF. En neuronas transfectadas con met-BDNF, la secreción inducida por despolarización fue selectivamente impedida mientras la secreción constitutiva permanecía normal. Estudios posteriores demostraron que el proBDNF estaba co-localizado con el correceptor de neurotrofinas sortilina, intracelularmente, en gránulos secretorios, y que la sortilina interactuaba específicamente con el prodominio en la región cercana a Val66Met. Increíblemente, la inhibición de la interacción entre el prodominio y la sortilina intracelular atenúa la secreción de BDNF inducida por la despolarización, sugiriendo que esta interacción es crítica para la secreción regulada. Sin embargo, la sortilina puede interactuar con el prodominio de otra neurotrofina incapaz de tener una secreción regulada, haciendo que sea menos probable la existencia de un mecanismo de “sorting” específico. Por otro lado, un

motivo de “sorting” que interactúa con un receptor de “sorting” muy conocido, la carboxipeptidasa E (CPE), ha sido recientemente identificado en el dominio maduro del BDNF, pero no del NGF. Esta interacción es esencial para guiar al proBDNF hacia las vesículas de la vía regulada para la secreción dependiente de actividad. Dado que el prodominio promueve el plegado adecuado de las neurotrofinas, es posible que la interacción entre el prodominio y la sortilina mantengan al proBDNF en una configuración correcta, exponiendo el dominio maduro al receptor de “sorting” CPE, el cual envía al proBDNF hacia la vía de secreción regulada [144].



**Figura 8 - Síntesis, tráfico y señalización mediada por receptores de BDNF.** Inicialmente sintetizado en el retículo endoplásmico (ER, del inglés *Endoplasmic Reticulum*) como una proteína precursora, el proBDNF es correctamente plegado en el ER y en la red de Golgi, y empaquetado en vesículas secretoras. Posteriormente, el BDNF es enviado a la vía secretora constitutiva o regulada, y transportado al sitio de liberación apropiado. El prodominio puede ser clivado intracelularmente por furina o por proteína convertasas, resultando en la secreción del BDNF maduro

(mBDNF). Alternativamente, el proBDNF puede ser secretado y clivado extracelularmente por la cascada de tPA/plasmina o por metaloproteinasas para dar origen al mBDNF. Una vez secretado, el proBDNF y el mBDNF llevan a cabo diversas, y a veces opuestas, acciones biológicas a través de dos sistemas de señalización por receptores. El mBDNF se une a TrkB, lo cual conduce a la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio tirosina quinasa. Consecuentemente, tres mayores cascadas de señalización pueden ser activadas por mBDNF-TrkB, incluyendo la vía PI3K, la vía ERK/MAPK, y la vía PLC $\gamma$ . Por otra parte, el proBDNF se une a p75<sup>NTR</sup> resultando en la activación de varias moléculas de señalización, incluyendo NF- $\kappa$ B, JNK y RhoA. (Extraído de Woo & Lu).

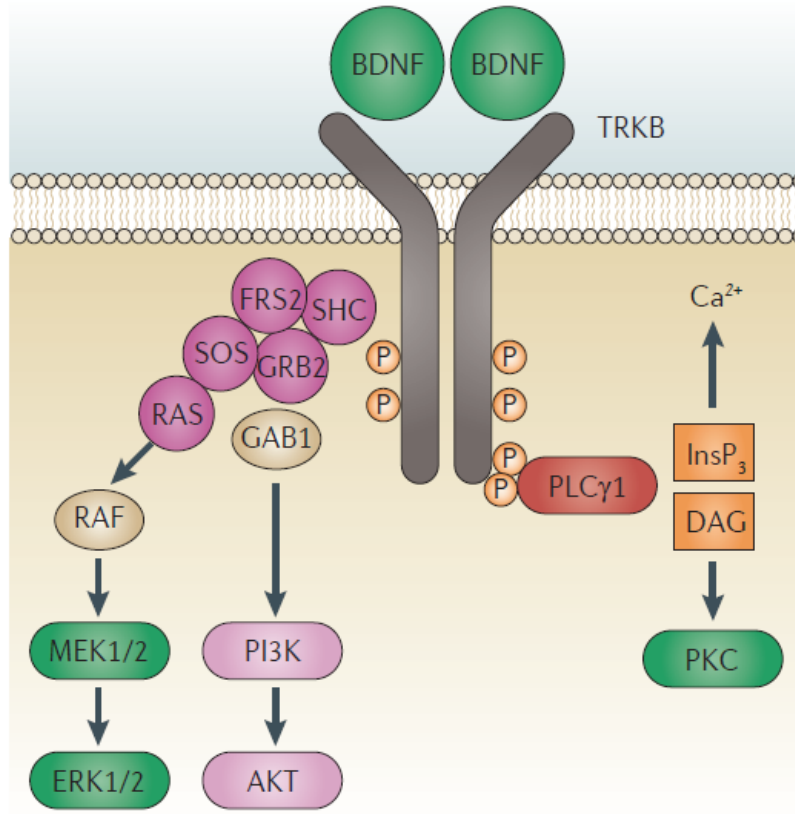
### 1.3.7 - Unión del BDNF a sus receptores y funciones que desencadenan

Como se mencionó anteriormente, el BDNF se une con elevada especificidad al receptor de quinasa relacionada a la tropomiosina de tipo B (TrkB) y al receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75. Al igual que BDNF, TrkB se encuentra ampliamente expresado en todo el cerebro adulto, incluyendo la corteza, hipocampo y múltiples núcleos del encéfalo y de la médula espinal [145]; mientras que la expresión de p75 en la adultez, se encuentra principalmente restringida a las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y a algunas neuronas corticales [146]. Es importante destacar que el BDNF maduro se une con mayor afinidad a TrkB, mientras que el proBDNF se une con mayor afinidad a p75. Esta distinción en la unión de las isoformas de BDNF es importante debido a que TrkB apoya principalmente la supervivencia neuronal y la expresión de varios genes funcionales, incluyendo las quinases extracelulares reguladas por señales (ERKs) y la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) [48]. Contrario a esto, la activación separada de p75<sup>NTR</sup> tiene como consecuencia la señalización pro-apoptótica [147]. De forma similar, la unión de neurotrofinas a TrkA o TrkC, pero no a TrkB, puede promover la muerte neuronal bajo ciertas circunstancias. Además, las formas truncas de TrkB (T1 o T2), las cuales carecen del componente tirosina quinasa del receptor, pueden encontrarse en neuronas y células gliales [148], y pueden contribuir a la regulación de la función del BDNF [149].

La unión del BDNF al TrkB transmembrana lleva a la dimerización y autofosforilación de los sitios de tirosina que se encuentran adjuntos al dominio citoplasmático C-terminal (carboxilo-terminal); esto, a su vez, activa varias proteínas adaptadoras, incluyendo la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB, del inglés *Polypyrimidine Tract-Binding Protein*) y el dominio de homología a Src 2 (SH2, del inglés *Src Homology Domain 2*) [48]. La activación de PTB y SH2 provoca la fosforilación de la PI3K, MEK-ERK, la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) y CREB [49]. La vía MEK-ERK está implicada en el mantenimiento del crecimiento de neuritas, diferenciación celular y supervivencia neuronal durante el desarrollo. La señalización MEK-ERK continúa el mantenimiento de la plasticidad sináptica, y la estructura y funcionalidad neuronal en el cerebro adulto. La activación por PI3K estimula Akt, y así logra potenciar la supervivencia celular [48]. La activación de PLC $\gamma$ 1 resulta en la generación de inositol (1, 4, 5) trifosfato (InsP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG), lo cual ocasiona la movilización de las reservas de calcio y la activación de proteína quinases dependientes de calcio que influyen la plasticidad sináptica.

Otro mecanismo de señalización que utilizan las neurotrofinas se da por la unión de las mismas a los receptores Trk, y en este caso son internalizadas a través de endocitosis mediada por clatrina generando un “endosoma de señalización” [150, 151]. Este endosoma, que contiene en su interior al receptor fosforilado y moléculas de señalización asociadas, es transportado al soma celular donde puede afectar funciones como el ensamblaje de la sinapsis [150, 152].

Finalmente, la liberación local de BDNF también es capaz de inducir rápidos efectos en la sinapsis a través de la alteración de los canales iónicos [153].



**Figura 9 - Vías de señalización activadas por la unión de BDNF a TrkB.** Esquema completo de las cascadas de señalización activadas por la unión de BDNF a TrkB. Para cada vía se muestran las moléculas que participan. (Extraído de Nagahara & Tuszynski, 2011).

#### 1.4 - BDNF y su rol en patologías humanas

Múltiples poblaciones neuronales en el cerebro expresan TrkB, por lo que es muy probable que diversos grupos neuronales sean sensibles a alteraciones en los niveles de BDNF. Es así que esta proteína, al igual que el NGF, ha sido asociada a varias patologías como dolor neuropático, obesidad, epilepsia, accidentes cerebro vasculares; a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, del inglés *Amiotrophic Lateral Sclerosis*); y enfermedades neuropsiquiátricas como depresión y desorden bipolar. A continuación se estudia en mayor profundidad la relación del BDNF con estas patologías.

##### 1.4.1 - Dolor neuropático

Hoy en día hay evidencias importantes de que dos neurotrofinas, NGF y BDNF, actúan como grandes mediadores y moduladores del dolor en una gran variedad de circunstancias, y de que



ambas moléculas se encuentran muy relacionadas en su contribución al dolor crónico y neuropático.

La contribución del NGF a esta patología ha sido destacada por recientes observaciones que demuestran que todos los casos de insensibilidad congénita al dolor (HSAN IV) son causados por distintos tipos de mutaciones (de tipo frameshifts, nonsense, splice o missense) en el receptor de NGF de alta afinidad, TrkA, ya sean que estas se den en el dominio extracelular de unión a NGF, o en el dominio intracelular de señal-transducción [154]. Dichas mutaciones afectan la unión NGF-TrkA, y así las posteriores funciones que se desencadenarían a partir de la interacción. Dado que el sistema nociceptivo periférico necesita de NGF para sobrevivir durante su desarrollo, este será directamente afectado por las mutaciones, lo cual se verá reflejado en una pérdida de sensibilidad al dolor. A pesar de esto, el NGF continúa jugando un papel importante en el procesamiento del dolor luego del desarrollo, ya que una vez que los nociceptores aferentes primarios pierden su dependencia absoluta a la neurotrofina, luego del período postnatal, éstos continúan expresando los receptores de NGF en la vida adulta, y dicho factor neurotrófico continúa ejerciendo profundos efectos biológicos en los receptores mencionados, tanto en humanos como en animales [154].

Actualmente está claro que el NGF es regulado en muchas condiciones de dolor crónico, particularmente en tejidos inflamados, y que actúa como un mediador periférico del dolor. Una forma en que el NGF modula el dolor es, como se mencionó anteriormente, a través de una segunda neurotrofina, BDNF. Esta neurotrofina es liberada de las terminales espinales de nociceptores cuando estos son activados; allí, el BDNF, parece actuar como un modulador, alterando la efectividad de las señales nociceptivas centrales. Otras dos neurotrofinas, NT-3 y NT-4/5, parecen jugar roles relativamente modestos en el procesamiento del dolor [154].

Experimentos electrofisiológicos y comportamentales han demostrado que la inhibición de la transducción de señales a partir de la BDNF inhibe la hiperalgesia en el dolor crónico. Es así que dicha proteína podría ser un nuevo blanco terapéutico para esta patología [155].

#### **1.4.2 - Obesidad**

El BDNF es altamente expresado en el hipotálamo ventromedial, el cual regula el apetito [156]. Es así que esta proteína puede regular el consumo de alimentos e intervenir en el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Se ha observado que la privación de alimentos reduce la expresión de BDNF hipotalámico, y que infusiones intraventriculares de BDNF suprimen el apetito, resultando en pérdida o ganancia de peso [157]. Mutaciones de novo en BDNF o TrkB han sido asociadas con obesidad en niños, además de déficits cognitivos [158, 159]. En pacientes con diabetes de tipo II los niveles de BDNF en plasma son más bajos que los encontrados en individuos sanos [160]. Por esto se cree que el BDNF puede tener importancia en la regulación de la glucosa y en diabetes, pudiendo ser útil en terapias contra esta enfermedad.

### **1.4.3 - Accidente Cerebro Vascular**

Los accidentes cerebro vasculares son el desorden más común del sistema nervioso y afectan a la corteza cerebral causando degeneración neuronal y muerte [161]. Teniendo en cuenta la amplia expresión de TrkB en la corteza cerebral, se han realizado estudios para determinar si BDNF puede aminorar la pérdida de neuronas corticales causada por la isquemia. Se ha demostrado así que el BDNF puede ser utilizado como un agente neuro-protector [162] cuando es administrado a horas de la isquemia, o como medio para estimular el crecimiento axonal y facilitar funciones sinápticas en distintos sistemas luego de retrasos más prolongados (días del accidente). Estos descubrimientos traen la posibilidad de que el BDNF pueda ser utilizado en el tratamiento de accidentes cerebro vasculares, aunque en estos casos se necesitaría en grandes cantidades y habría que determinar los efectos adversos de su administración.

### **1.4.4 - Enfermedad de Alzheimer**

La Enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida progresiva de sinapsis y de neuronas, lo cual ocurre en diversos circuitos corticales, comenzando en la corteza y en el hipocampo [163, 164]. Este circuito neuronal es esencial para la memoria de corto plazo, y la pérdida de esta función es el síntoma inicial de la enfermedad de Alzheimer. El BDNF normalmente se produce en la corteza y en el hipocampo, en adultos [165]. El BDNF producido en la corteza es transportado de forma anterógrada al hipocampo donde su liberación, dependiente de actividad, puede tener un rol en la función del circuito de la memoria [166, 167]. En Alzheimer, los niveles de BDNF en la corteza y en el hipocampo descienden [168]. Varios estudios se llevaron a cabo en diversos modelos animales de dicha enfermedad para determinar el efecto terapéutico del BDNF en la corteza [169]. En muchos casos se obtuvieron resultados favorables observándose una mejora en el aprendizaje y en la memoria y disminución de muerte celular en la corteza cerebral tras la administración de BDNF [169].

### **1.4.5 - Enfermedad de Parkinson**

La Enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo que afecta las funciones motoras y habilidades cognitivas debido a la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas que proyectan desde la sustancia nigra hasta el estriado [170]. Ciertos estudios han demostrado que el BDNF estimula la supervivencia de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra [171]. En ciertos modelos animales el tratamiento con BDNF logró prevenir la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra luego de una lesión inducida [172, 173]. Además, la infusión de la proteína BDNF indujo efectos anatómicos y comportamentales beneficiosos en primates al reducir la pérdida celular y estimular la reinervación estriatal [174], por lo que el BDNF podría ser un agente útil en el tratamiento de Parkinson en humanos.

### **1.4.6 - Enfermedad de Huntington**

La Enfermedad de Huntington es una enfermedad autosómica dominante y neurodegenerativa, causada por la expansión de triplicados CAG repetidos en el gen que

codifica para la proteína huntingtina (HTT). Esto le confiere una ganancia de función tóxica [175]. Esta enfermedad comienza a manifestarse en la edad adulta y es caracterizada por la degeneración de neuronas en el estriado causando movimientos involuntarios, impedimento cognitivo, etcétera [176]. Los niveles de BDNF disminuyen en el estriado y corteza cerebral de pacientes con Huntington [177] dado que el transporte de BDNF de la corteza al estriado está impedido [178]. El tratamiento con la proteína BDNF en el estriado de ratón HTT mutante aumentó la supervivencia de ciertas neuronas estriatales y mejoró las funciones motoras [179]. BDNF también redujo la pérdida de interneuronas estriatales en ratas luego de lesiones excitotóxicas del estriado [180], por lo que la terapia con BDNF sería un candidato razonable para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

#### **1.4.7 - Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS)**

ALS o esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una atrofia progresiva de motoneuronas, lo cual lleva a una debilidad generalizada y falla respiratoria en un período relativamente corto (2 años, aproximadamente) [181]. En modelos animales, el BDNF logró prevenir la degeneración de neuronas espinales motoras y corticoespinales [182], por lo que la neurotrofina de interés podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de ALS.

#### **1.4.8 - Depresión**

En casos de depresión y otros desórdenes psiquiátricos se han encontrado alteraciones en la expresión de BDNF. Polimorfismos humanos en el gen *bdnf* se encuentran ligados a la incidencia de desórdenes de personalidad, incluyendo el desorden bipolar [183, 184]. Pacientes que sufren de depresión presentan reducciones específicas en volumen hipocampal [185] y en niveles hipocampales [186] de BDNF. Drogas antidepresivas han demostrado normalizar los niveles de BDNF y revertir la reducción hipocampal [187]. Los niveles de BDNF también son elevados en el área hipocampal de pacientes tratados con antidepresivos [188]. Dado que BDNF es importante en el mantenimiento de la morfología dendrítica hipocampal [134] y funciones sinápticas es posible que contribuya a revertir el efecto de atrofia hipocampal.

#### **1.4.9 - Memoria**

Diversos polimorfismos de BDNF evidencian un rol de esta proteína en la memoria humana. Uno de estos polimorfismos es el Val66Met en la secuencia de proBDNF [189]. Esta mutación resulta en una disrupción del empaquetamiento de BDNF en gránulos de secreción, provocando una disminución en la liberación de BDNF [137]. La variante Val/Met se asocia a dificultades en la memoria episódica así como también a una reducción de actividad hipocampal (demostrado por MRI) [137]. En individuos ancianos se han observado disminuciones en los niveles de BDNF ligadas a un descenso del volumen hipocampal y memoria espacial [190]. El polimorfismo Val66Met también ha sido asociado con esquizofrenia [191] y con desórdenes de personalidad. En conjunto, todos estos descubrimientos revelan un rol importante del BDNF en memoria humana y en desórdenes cerebrales, por lo que se lo considera para posibles terapias.

Considerando la importancia de BDNF en las patologías mencionadas la obtención de esta molécula recombinante permitiría el desarrollo de experimentos, en diferentes modelos, para evaluar la potencialidad terapéutica de dicha proteína. Eso significaría el desarrollo de terapias alternativas y menos invasivas para ciertas afecciones que hoy en día no tienen cura, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

### **1.5 - Desafío tecnológico para la expresión de BDNF**

Desde el punto de vista estructural, el BDNF, al igual que las demás neurotrofinas, se caracteriza por presentar un motivo denominado nudo de cisteínas. Este, como se mencionó anteriormente, está formado por dos enlaces disulfuro que conforman una estructura en forma de anillo atravesada por un tercer enlace [6]. Dicho arreglo, en conjunto con el clivaje del péptido señal y prodominio, es esencial para que la proteína sea biológicamente activa. Esto puede dificultar la obtención de la proteína activa *in-vitro*. A pesar de ello, la producción de BDNF recombinante se ha llevado a cabo con relativo éxito en diversos sistemas de expresión como *E. Coli*, células de insectos y células de mamíferos.

Los rendimientos de producción de BDNF recombinante en *E.Coli* son mayores a los reportados en otros sistemas de expresión, como células de insecto o células de mamíferos [192]. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta la ventaja que implica la no formación de cuerpos de inclusión, característicos de la expresión en *E.Coli*. Estos son una porción celular insoluble e inactiva que contiene a la proteína recombinante, y se forman debido a la ausencia de chaperonas moleculares en sistemas procariontes de expresión. La presencia de enlaces disulfuro en la proteína a expresar también contribuye a la agregación y, en estos casos, se requiere un proceso de solubilización y renaturalización para obtener a la proteína biológicamente activa [193]. Otra ventaja de los sistemas más complejos de expresión es que permiten prescindir de enzimas de corte para la eliminación del prodominio, ya que dichas células son capaces de secretar la configuración madura de la proteína. Además se cuenta con la mejora en el procesamiento post-traducciona l de la proteína.

En este caso, el sistema de expresión que se utilizó para la producción fue *E. Coli*. Entre las ventajas que ofrece el uso de este sistema se encuentran su simplicidad, rapidez y bajos costos. A pesar de ello, los diferentes intentos en este sistema no han podido evitar la formación de cuerpos de inclusión, hecho que necesariamente implica su desnaturalización y posterior renaturalización en un sistema buffer-redox, buscando así la correcta formación del nudo de cisteínas, y la adquisición de la estructura nativa. En favor de ello, el BDNF fue expresado como precursor (proBDNF), pues el prodominio, en su papel de chaperona intramolecular, desempeña un rol preponderante en el plegamiento de la porción madura. Como consecuencia, el protocolo debió tener en cuenta la eliminación del prodominio por clivaje proteolítico una vez que el precursor es sido purificado.

### **1.6 - Posibles aplicaciones del BDNF recombinante**

El BDNF es un factor neurotrófico que ejerce poderosos efectos, principalmente en el sistema nervioso central y periférico. Teniendo esto en cuenta cabe destacar el gran potencial biotecnológico que tendría el desarrollo de BDNF recombinante, puesto que esta proteína

puede utilizarse para el desarrollo de fármacos en contra de una gran cantidad de enfermedades en las que BDNF juega un rol importante. El acceso a dicha proteína también permitiría estudiar más a fondo las limitaciones que su aplicación terapéutica presenta hoy en día para tratar de superarlas.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo principal**

Esta tesina de grado tiene como objetivo principal la producción de proBDNF recombinante humano en *E. Coli*. Para obtener dicha neurotrofina se utiliza la metodología empleada, y previamente puesta a punto en el Laboratorio de Neurodegeneración del Institut Pasteur de Montevideo, para la expresión de otra proteína perteneciente a la familia de las neurotrofinas: NGF.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- Diseño para la construcción del plásmido con el inserto de interés y obtención de bacterias *E. Coli* de la cepa BL21 genéticamente modificadas.
- Puesta a punto de un protocolo para la producción de proBDNF humano recombinante.
- Producción de la proteína recombinante de interés en estado de pureza.

## 3- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 - Obtención del plásmido con el inserto de interés

Con el fin de obtener el plásmido con el inserto de interés para la transformación de bacterias *E. Coli*, y la posterior obtención de la proteína recombinante proBDNF se contrataron los servicios de la empresa GenScript.

Inicialmente se procedió al diseño del plásmido conteniendo el gen que codifica para la proneurotrofina precursora del factor de interés (proBDNF). Para esto se decidió utilizar el vector plasmídico pET-22b(+), conteniendo una cola de histidina (His-Tag) de manera de facilitar la purificación. Este vector contiene además resistencia al antibiótico Ampicilina, por lo que esta característica fue la que se utilizó como marcador de selección al momento de la transformación. El gen de interés se colocó en el vector utilizado de forma que la cola de histidina se expresara en el extremo C-terminal de la proteína.

Además de la construcción del plásmido con el gen de interés la empresa GenScript también se ocupó de realizar la optimización de codones para la expresión en *E. Coli*.

### 3.2 - Preparación de bacterias BL21 quimiocompetentes

Con el fin de transformar bacterias para introducir el plásmido con el inserto de interés (gen de proBDNF) fue necesario preparar bacterias quimiocompetentes. Para esto se inoculó un precultivo de 3mL de medio LB (Luria-Bertani) con bacterias BL21 (obtenidas de la cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias). Se incubó a 37°C durante 6 a 8 horas, con agitación. Luego se inocularon 250mL de medio LB con 2,5mL del precultivo mencionado y se incubó a 37°C, con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica, a 600nm, que se encontrara entre 0,5 y 0,8. Se centrifugó el inóculo a 3000g durante 10 minutos a 4°C y, posteriormente, se descartó el medio de cultivo. El resto del procedimiento para la obtención de las células competentes se realizó en hielo.

Se resuspendió el pellet remanente en 100mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> de concentración 0,1M. El contacto de las células con CaCl<sub>2</sub>, a bajas temperaturas, mejora su competencia ya que el ion Ca<sup>2+</sup> tiene la capacidad de abrir poros en la pared bacteriana permitiendo que ADN exógeno ingrese a la célula (competencia inducida). Una vez resuspendidas, las células se centrifugaron a 3000g durante 10 minutos a 4°C. Se volvió a resuspender el pellet en 100mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M y se centrifugó, nuevamente, a 3000g durante 10 minutos a 4°C. Luego se incubó el pellet a 4°C durante una hora.

Se centrifugaron las células a 3000g durante 10 minutos, a 4°C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 3mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1M 20% glicerol. Lo restante se alícuotó de a 50µL y se conservó a -80°C.

### 3.3 - Transformación de bacterias con el plásmido de interés

El método utilizado para que las bacterias BL21 quimiocompetentes, producidas previamente, incorporaran el plásmido con el inserto de interés fue shock térmico. Se incubaron en hielo

durante 10 minutos 50µL de bacterias BL21 quimiocompetentes con 2µL del plásmido de interés conteniendo el gen que codifica para proBDNF (provisto por la empresa GenScript). Luego, se realizó un shock térmico a 42°C por 90 segundos, y nuevamente se incubaron en hielo por 2 minutos. Se agregaron 900 µL de medio LB, se agitó a 200 rpm a 37°C durante una hora. Una vez finalizado este período se plaquearon 250µL y 700µL de las bacterias transformadas en dos placas LB-Agar-Ampi y se colocaron a 37°C, durante toda la noche.

### **3.4 - Extracción y purificación de ADN plasmídico de las bacterias**

En este caso se realizó la extracción y purificación de ADN plasmídico de bacterias BL21 crecidas en medio de cultivo LB, previamente transformadas con el plásmido que contiene el inserto de interés. Esto se hizo con el fin de determinar y verificar que dicho plásmido contiene el gen que codifica para el proBDNF con una cola de histidina (del inglés *His Tag*) en el extremo C-terminal. Para poder realizar dicha verificación fue necesario tener el ADN plasmídico purificado para que este se pueda secuenciar posteriormente y, a partir de dicha secuencia, determinar la presencia del gen de proBDNF con el His Tag. Esto será fundamental para realizar la purificación por cromatografía de afinidad.

El kit que se utilizó fue el *AxyPrep Plasmid Miniprep*, de Axygen Bioscience. Este se basa en una lisis SDS-alcalina modificada de células bacterianas, en combinación con la unión selectiva del plásmido de ADN a una columna Miniprep especial. Cada columna tiene una capacidad de unión de al menos 20µg y el protocolo provee un método simple y confiable para alcanzar el rápido aislamiento de ADN altamente purificado. El protocolo ha sido optimizado para cultivos bacterianos crecidos en medio 2xYT y LB, como el que se utiliza en este caso. Cada columna puede procesar hasta 4mL de cultivo bacteriano crecido en LB o hasta 2mL de cultivo crecido en medio enriquecido. El ADN plasmídico purificado es eluido en un pequeño volumen con buffer Tris eluente o agua desionizada, y puede ser utilizado inmediatamente para aplicaciones de rutina, tales como secuenciación de ADN, digestión con enzimas de restricción, transcripción *in vitro*, ligación y transformación [194].

Para el uso del Kit *AxyPrep Plasmid Miniprep* se colectaron de 1 a 4mL de medio de cultivo LB, crecido a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó dicho cultivo crecido a 12000g durante un minuto para decantar las bacterias y se retiró con la pipeta lo más que se pudo del sobrenadante.

Se resuspendió el pellet bacteriano mediante el agregado de 250µL de buffer S1 y se vortexeó. Es importante asegurarse de que las bacterias se encuentran completamente resuspendidas antes de continuar con el proceso. Al buffer S1 también se lo denomina “buffer de resuspensión” ya que se utiliza para ayudar a la resuspensión de las bacterias debido a los compuestos que contiene. Algunos de los componentes de este buffer son: Tris, para darle a la solución un pH alcalino (pH 8,0); y EDTA (quelante de iones divalentes necesarios, como cofactores para la acción de nucleasas) que impide la degradación del ADN. Así esta primera solución sirve para lavar el medio. También contiene RNAsa A, la cual es agregada antes de comenzar a utilizar el kit. Esto se realiza con el fin de eliminar la interferencia de ARN, el cual es de rápida renaturalización, por lo que puede contaminar la muestra de ADN plasmídico.



Luego se agregaron 250µL de buffer S2, se mezcló suavemente por inversión del tubo, de 4 a 6 veces. En este caso la mezcla no se llevó a cabo por vortexeo dado que esto puede causar la rotura del ADN bacteriano genómico y resultar en la contaminación del ADN plasmídico. El buffer S2 es un buffer de lisis que se utiliza para la lisis celular ya que dicha solución contiene NaOH (que provoca la lisis celular) y SDS, que es un detergente aniónico que solubiliza los componentes membranosos que quedaron como remanentes de la lisis.

Se dejó reposar no más de 5 minutos a temperatura ambiente y luego se le agregaron 350µL de buffer S3; se mezcló suavemente, por inversión, de 6 a 8 veces, y se centrifugó a 12000g por 10 minutos, para lavar el lisado. En este paso no se debe vortexear la mezcla ya que esto podría contaminar el ADN plasmídico con el ADN genómico. Al buffer S3 también se lo conoce como “buffer de neutralización” ya que contiene acetato de potasio (pH 4,8) cuyo pH ácido neutraliza la muestra provocando así la renaturalización del ADN plasmídico y la precipitación del ADN genómico, proteínas y otros restos celulares remanentes. Es así que este paso de la purificación del ADN plasmídico corresponde a la solubilización diferencial del ADN. Luego de esta instancia lo que precipitó queda en el fondo y el ADN plasmídico en el sobrenadante.

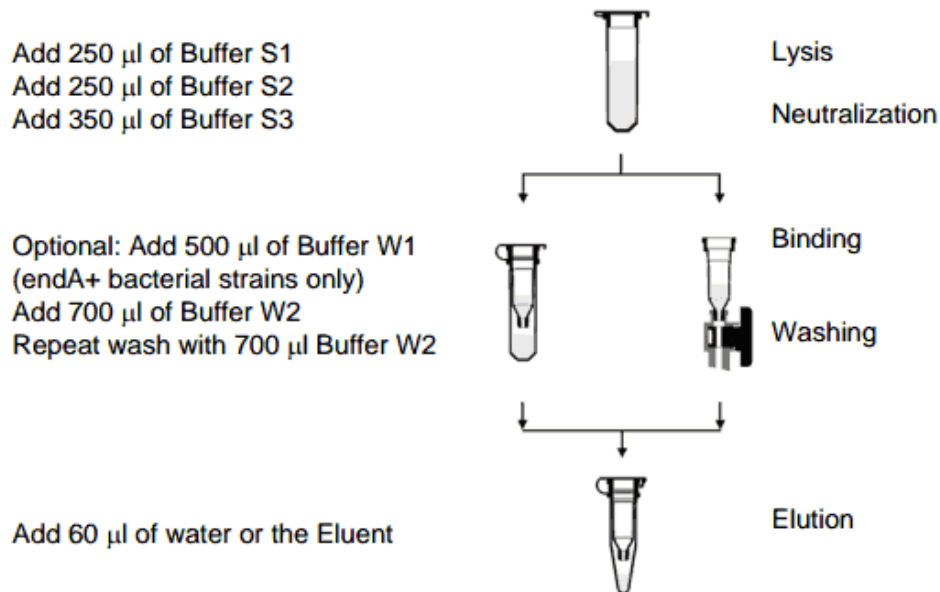
Se colocó una columna Miniprep en un tubo de Microfuga, destapado, de 2mL. Se recuperó el sobrenadante limpio del paso anterior y se transfirió a la columna de Miniprep; esta se colocó, junto con el tubo Microfuga de 2mL, en una microcentrífuga y se centrifugó a 12000g durante un minuto. Luego se agregaron 700µL de buffer W2 a cada columna de Miniprep y se centrifugaron a 12000g durante 1 minuto. El buffer W2 contiene etanol (previamente agregado) por lo que este paso se utiliza para solubilizar las sales y precipitar el plásmido.

Posteriormente se descartó el filtrado del tubo de Microfuga de 2mL. Se colocó la columna de Miniprep nuevamente en el tubo de Microfuga de 2mL y se centrifugó a 12000g durante un minuto.

Se transfirió la columna Miniprep a un tubo de Microfuga limpio de 1,5 mL. A este se le agregaron 70µL de eluente (agua deionizada) al centro de la membrana, para eluir el plásmido purificado. Se dejó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g durante un minuto. Lo que quedó en el tubo de Microfuga de 1,5 mL fue el plásmido purificado [194].

Se verificó la pureza del ADN plasmídico obtenido utilizando el Nanodrop™ (Thermo Scientific spectrophotometer) para medir la concentración.

A continuación (Figura 10) se observa un esquema del proceso, con los pasos necesarios, para la extracción y purificación del ADN plasmídico.



**Figura 10** - Esquema de los pasos a seguir en la purificación y extracción de ADN plasmídico utilizando el kit Axyprep Plasmid Miniprep de Axygen Biosciences. (Extraído de Axyprep Plasmid Miniprep, Axygen Biosciences).

### 3.5 - Análisis de secuencias

Como herramientas bioinformáticas, para analizar las secuencias de los plásmidos obtenidas, se emplearon los programas Chromas Lite, y Bioedit. El primero de los mismos se utilizó para un análisis inicial de las secuencias, obtención del cromatograma correspondiente y comparación con la información perteneciente a la base de datos, como el NCBI, a fin de determinar la presencia del gen de interés. El segundo programa se utilizó para el alineamiento de las secuencias obtenidas, en comparación con la supuesta secuencia del gen que codifica para proBDNF.

### 3.6 - Adaptación del protocolo para la expresión de proBDNF recombinante

Para llevar a cabo la síntesis de la proteína de interés (proBDNF/BDNF) se utilizó la metodología previamente puesta a punto en el laboratorio de Neurodegeneración del Institut Pasteur de Montevideo para la producción de NGF. Dado que se han alterado algunos detalles del mismo, a fin de adaptarlo para la expresión de proBDNF, se analizarán todos sus pasos a continuación.

Como paso inicial, se crecieron los transformantes seleccionados de *E. Coli* de la cepa BL21, para el plásmido pET-22b(+) que contiene el gen que codifica para el proBDNF humano, en medio LB a 37°C. Una vez que se alcanzó una  $DO_{600nm}$  de, aproximadamente, 0,6, se agregó 1mL de IPTG 1M (de Sigma, preparado en el momento y filtrado por un filtro de 0,22 $\mu$ m, millex GP, Millipore) para inducir la expresión de la proteína de interés. Se incubó durante 4 horas a 37°C, con agitación. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 4000g, durante 20 minutos, y luego se recogió el pellet resultante. Este fue pesado (masa inicial de 1,417 gramos)

y luego almacenado a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es importante determinar la masa del pellet dado que los volúmenes de los buffers utilizados dependen de esta.

Al día siguiente se continuó con el protocolo, para lo cual fue necesario derretir el pellet previamente congelado y resuspenderlo en un buffer de lisis que permita la lisis celular. Este buffer se encuentra compuesto por Tris 50mM, NaCl e inhibidor de proteasas (un cuarto para 15mL de buffer, una pastilla para 100mL). Se agregaron aproximadamente 7mL de dicho buffer (depende de la masa inicial del pellet) y se vortexeó hasta que el pellet quedó completamente resuspendido. Nuevamente, se congeló el pellet a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento durante toda la noche.

Al tercer día se derritió el pellet nuevamente y se le agregó 1 espátula de lisozima. Se agitó la mezcla y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. La lisozima es una enzima que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano [195]. De esta forma logra lisar bacterias, principalmente las gram positivas, como las BL21 que se utilizan en este caso. Luego de la incubación con lisozima se le agregó DNAsa (10,5 $\mu\text{L}$  para 7mL de buffer de lisis) para degradar específicamente el ADN presente y facilitar la extracción y purificación proteica. Se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, para permitir que actúe la enzima.

Finalizado este período, se sometió a la muestra a un sonicado. En este caso fueron 6 pulsos de 20 segundos cada uno, con un 50% de amplitud, y descansos de 1 minuto entre cada pulso. Para sonicar se utiliza una maquinaria denominada sonicador (en este caso Branson Digital Sonifier). El funcionamiento del mismo se basa en que una corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido. Los ultrasonidos generan, a su vez, vibraciones en el material objetivo por lo que se utiliza, en este caso, para romper las membranas celulares y conseguir la liberación del contenido celular, producto de la intensa agitación producida. También se pueden llegar a destruir estructuras subcelulares o solubilizar complejos proteicos variando la frecuencia, intensidad y energía aplicada. Para evitar la desnaturalización de las proteínas provocada por el sobrecalentamiento, la sonicación se debe aplicar en frío.

Luego de dicho proceso se le agregaron 150 $\mu\text{L}$  de una solución de Tritón al 2%, se vortexeó para mezclar los componentes y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. El Tritón X-100 es un detergente no iónico, que se utiliza como auxiliar de disolución para proteínas integrales de membrana (las que atraviesan la bicapa lipídica) en medios acuosos. En este caso se utilizó una concentración baja del mismo (al 2%) para tratar de no contaminar la muestra, ya que esto alteraría la determinación de trazas en espectrometría de masas de la disolución resultante.

Para continuar con el proceso de obtención del proBDNF fue necesario centrifugar lo incubado a una velocidad de 12000rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 45 minutos. Se recuperó el sobrenadante (elementos solubles remanentes) y se lavó el pellet con 10mL de buffer de lisis. Se vortexeó esta mezcla hasta observarse un desprendimiento del pellet y luego se centrifugó, nuevamente, a 12000rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Este proceso se repitió 2 veces más, a fin de haber realizado 3 lavados completos del pellet. Finalmente se descartó el sobrenadante de

manera que lo que quedó fue un pellet que equivale a la fracción insoluble o cuerpos de inclusión, donde se espera hallar el proBDNF.

A estos se los resuspendió en 5mL de una solución de Urea 8M para poder disolverlos y desnaturalizarlos. Dado que la resuspensión es difícil se utilizó primero el vórtex, para facilitar la disolución en Urea, luego una pipeta Pasteur, para disminuir el tamaño de los fragmentos del pellet, y finalmente se filtró la solución por jeringas (BD Plastipak) de distinto calibre hasta que el tamaño de los fragmentos fue casi despreciable.

A la solución obtenida se le agregaron 0,154g de DTT (del inglés, *dithiothreitol*; 154mg para 10mL de buffer de lisis) y se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir que dicho reactivo actúe. El DTT es una pequeña molécula redox que, debido a su gran potencial como agente reductor, se usa frecuentemente para reducir los puentes disulfuro de proteínas y, en general, para prevenir la formación de enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares entre residuos de cisteína de las proteínas. Dado que en este caso las proteínas ya fueron sometidas a una desnaturalización, gracias a la acción de la solución de Urea 8M, el DTT podrá acceder a algunos puentes disulfuro que en condiciones normales no podría, y así será capaz de reducirlos [196]. Finalizada la incubación se procedió a la acidificación de la muestra con una solución de HCl puro hasta obtener un pH final de 4 y se procedió a colocar la muestra acidificada en una membrana de diálisis de celulosa regenerada (Spectrumlabs, Spectra/Por®, Biotech Regenerated Cellulose Membrane), cortada a medida (0,79mL/cm). Luego se comenzó con una de tres diálisis sucesivas, con un buffer que contiene Urea 8M, EDTA 5mM y pH 4. Estas diálisis permiten retirar los restos de DTT de la muestra, permitiendo así la posterior renaturalización con la formación de nuevos puentes disulfuro.

La renaturalización y adquisición de la estructura nativa del proBDNF se realizó empleando un buffer de renaturalización, pH 9,3, que contiene EDTA 5mM, Tris 100mM, y L-arginina 1M y glutatión reducido (5mM) y oxidado (1mM) como componentes básicos. En este caso la L-arginina se utilizó como agente supresor de la agregación (facilita la solubilización de los cuerpos de inclusión) y el glutatión reducido y oxidado fue necesario para crear el sistema buffer-redox que se requiere para la correcta renaturalización de la proteína. Estas condiciones permiten la formación del nudo de cisteínas (característico de las neurotrofinas) y así la obtención de la estructura nativa del proBDNF. Para armar el sistema de renaturalización se utilizó una bomba peristáltica (Masterflex L/S, Cole Parmer, model 7518-10) conectada a la muestra de interés y al matraz conteniendo el buffer de renaturalización. Se dejó durante toda la noche a 4°C, a una velocidad mínima de aproximadamente 0,1mL/minuto, a fin de que cada gota de la muestra recuperada se mezclara uniformemente con el buffer de renaturalización, para que los componentes del mismo actúen de forma óptima sobre la proteína de interés.

Una vez que se obtuvo la muestra renaturalizada, fue necesario concentrarla y llevarla a un volumen menor, uno que fuera adecuado para la purificación por columna. Para este fin se utilizó un cassette de concentración Pellicon XL filter, de Millipore. Este contiene en su interior una membrana de celulosa regenerada que permite la concentración de la proteína de la muestra, debido a su peso molecular, y el descarte de aquello que es de desecho. En este sistema también se utilizó la bomba peristáltica para el pasaje de la muestra por el cassette de

concentración. Se permitió la concentración de la muestra hasta obtener un volumen final de 125mL.

Posteriormente se realizaron 3 diálisis sucesivas con un buffer compuesto por Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 20mM, Imidazol 20mM, NaCl 0,5M y pH que varía de 8, a 7,6 y finalmente a un valor final de 7,4 en la última diálisis. Este pH es igual al del buffer de unión (binding buffer), por lo que permite preparar a la muestra para su purificación.

Es así que, una vez renaturalizada, la neurotrofina mencionada se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad de metales quelantes.

### **3.7 - Extracción y caracterización de fracciones proteicas soluble e insoluble**

Para poder determinar la solubilidad del proBDNF, se decidió realizar un fraccionamiento.

Para comenzar con dicho procedimiento fue necesario inocular un precultivo de 3mL de medio LB con una colonia de bacterias transformadas con el plásmido que contiene el inserto de interés y 3 $\mu\text{L}$  de Ampicilina (100mg/mL). Se incubó a 37°C durante toda la noche. Se inocularon 50mL de medio LB con 300 $\mu\text{L}$  del precultivo anterior y 50 $\mu\text{L}$  de Ampicilina. Se incubó a 37°C, con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica, a 600nm, de un valor entre 0,5 y 0,8. Se recogió 1mL de muestra de fracción no inducida, se la centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm, a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet sobre papel. Este se almacenó a -20°C.

Luego se indujo la expresión proteica agregando 50 $\mu\text{L}$  de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) 1M. Se incubó a 37°C, con agitación, durante cuatro horas. Luego se recogió 1mL de muestra de fracción inducida. Se lo centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm, a una temperatura de 4°C. Se almacenó a -20°C para análisis posteriores.

Se sometió al resto de la muestra (precultivo inducido) al mismo tratamiento con la excepción del último paso (almacenaje a -20°C). Se secó el pellet sobre papel y se resuspendió, a 4°C, en un volumen de buffer Tris-HCl 20mM, pH 8, adecuado a su masa (ej.- 5mL de buffer para 1g de sedimento). Luego se le agregó un volumen adecuado (ej.- 555,5 $\mu\text{L}$  de solución de lisozima para 1g de sedimento) de una solución compuesta por lisozima fresca (stock 2mg/mL) en EDTA 0,1M, pH 8,0. Se sonicó dicha mezcla con microtip, a una amplitud de 45%, durante 6 ciclos de 20 segundos (sonicador Branson Digital Sonifier), con un minuto de descanso entre cada uno.

Se centrifugó la muestra por 30 minutos a 14000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804R) y se recuperó el sobrenadante. Este representa la fracción soluble.

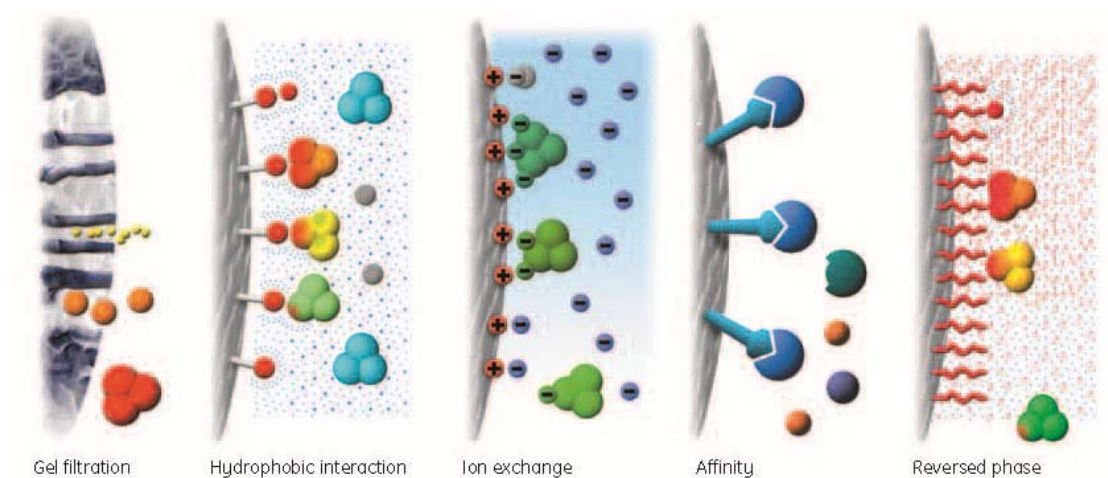
El pellet remanente se lavó (con cuidado de no remover lo insoluble) en el mismo volumen, calculado previamente, de buffer Tris-HCl 20mM, pH 8 que al comienzo del proceso. Se centrifugó durante 20 minutos a 14000 rpm. Finalmente se resuspendió el pellet en un volumen de Urea 8M igual al volumen obtenido de la fracción soluble. Esto representa la fracción insoluble.

Todas las muestras recogidas fueron posteriormente analizadas mediante una electroforesis SDS-PAGE.

### 3.8 - Cromatografía

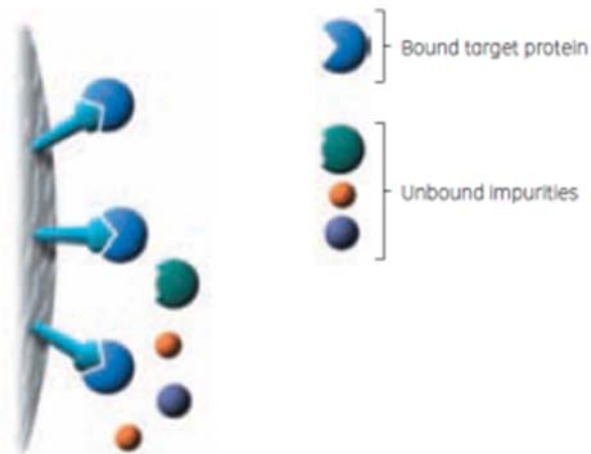
#### 3.8.1 - Cromatografía de afinidad

Los métodos cromatográficos son aquellos que separan de acuerdo a las diferencias entre las propiedades de la proteína que será purificada (proteína de interés) y las propiedades de otras sustancias en la muestra. Estos métodos pueden separar las proteínas según distintas propiedades, como pueden ser la carga de la misma, el tamaño, la hidrofobicidad, el punto isoelectrico, reconocimiento de un ligando específico, la unión de ion metálico, etcétera (Figura 11).



**Figura 11 - Principios de separación en purificaciones cromatográficas.** Esquema de las bases de separación para cromatografía de gel filtración, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, afinidad y fase reversa. (Adaptado de Recombinant Protein Purification Handbook).

En este caso en particular, la purificación del proBDNF obtenido luego de la renaturalización, y una serie de diálisis sucesivas (a fin de ajustar el pH), se realizó por cromatografía de afinidad. Este tipo de cromatografía es el primer paso más común en la purificación cuando la proteína de interés está marcada con afinidad, y se trata de una técnica cromatográfica que separa proteínas en base a una interacción reversible entre la proteína de interés (o grupo de proteínas) y un ligando específico unido a una matriz cromatográfica (Figura 12) [197].



**Figura 12** - Descripción esquemática de los principios de la cromatografía de afinidad. (Extraído de *Strategies for Protein Purification Handbook*).

La interacción puede ser bioespecífica, por ejemplo, anticuerpos unidos a proteína A o un receptor unido a una hormona, o no-bioespecífica, por ejemplo, una proteína unida a una sustancia de tinción o proteínas marcadas con histidina unidas a iones metálicos (como en cromatografía de afinidad de ion metálico inmobilizado) por lo que este tipo de cromatografía ofrece gran selectividad, alta resolución y una capacidad entre intermedia y alta [198].

Normalmente la cromatografía de afinidad es utilizada como paso inicial de purificación, seguido de un segundo paso de purificación para remover las impurezas remanentes o agregadas. Sin embargo, algunas veces, puede ser utilizada como una purificación de un solo paso debido a su alta selectividad o en instancias en las que se aceptan algunas impurezas. En este caso en particular, esta técnica cromatográfica fue el único paso de purificación utilizado para obtener el proBDNF puro.

En la cromatografía de afinidad, la proteína de interés se encuentra específica y reversiblemente unida por una sustancia de unión complementaria (ligando). La muestra es aplicada bajo condiciones que favorecen la unión específica al ligando. El material no unido es lavado fuera de la columna, y la proteína de interés unida es recuperada mediante el cambio de condiciones hacia aquellas que favorecen la elución. La elución se lleva a cabo específicamente, utilizando un ligando competitivo, o no específicamente, por ejemplo, cambiando el pH, fuerza iónica o polaridad. La proteína de interés es eluída de forma concentrada y pura [198].

### **3.8.2 - Cromatografía de afinidad de ion metálico inmobilizado (IMAC, del inglés *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*)**

En este caso se decidió utilizar un tipo particular de cromatografía de afinidad, conocido como IMAC (del inglés *Immobilized metal ion affinity chromatography*). Esta es una técnica cromatográfica que se basa en la interacción de proteínas que contienen residuos de histidina (o Trp y Cys) en su superficie con iones metálicos divalentes (por ejemplo  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ )

que se encuentran inmovilizados por medio de un ligando quelante. Las proteínas marcadas con Histidina, como el proBDNF marcado que se desea purificar, tienen una afinidad extra alta en IMAC debido a los múltiples (6 a 10) residuos de dicho aminoácido, y son usualmente los que se unen más fuertemente de entre todas las proteínas en una muestra cruda (ej. Lisado bacterial), mientras que las demás proteínas celulares no se unirán o lo harán débilmente [198].

En este caso, para la purificación de la proteína proBDNF por IMAC se utilizó una columna HisTrap FF, de 1mL (Figura 13). Este tipo de columnas son hechas con polipropileno biocompatible por lo que no interactúa con biomoléculas, lo cual las hace adecuadas para la purificación de proteínas

Además ya se encuentra preparada para su uso dado que está preempaquetada con una matriz de Níquel Sepharosa precargado (con iones  $\text{Ni}^{2+}$ ), la cual consiste de  $90\mu\text{m}$  de perlas de agarosa altamente reticuladas con un grupo quelante inmovilizado. Este Ni Sepharosa 6 Fast Flow se une selectivamente a proteínas que presenten ciertos residuos formadores de complejos expuestos en su superficie. La presencia de histidinas adicionales, como es lo que ocurre cuando una proteína está marcada con una cola de histidinas (este caso en particular), aumentan la afinidad por los iones  $\text{Ni}^{2+}$  (ion preferido para purificación de proteínas con His Tag) y generalmente hacen que la proteína marcada con histidinas sea la que se une más fuertemente entre otras proteínas que estén presentes en la muestra (ejemplo, en un extracto de *E. Coli*). Esto hace que esta columna sea ideal para purificaciones por cromatografía de afinidad IMAC de proteínas recombinantes marcadas con una cola de Histidinas [198].

Para este caso particular, se decidió operar la columna con el sistema cromatográfico ÄKTA, en particular el ÄKTApurifier (Figura 13), que utiliza el software UNICORN™. Se decidió utilizar un sistema cromatográfico automático dado que estos permiten mejorar la calidad y reproducibilidad de las separaciones proteicas. Además estos sistemas ofrecen mayor control que los manuales sobre la purificación debido a la habilidad de monitorear automáticamente el progreso de la purificación, y también permiten realizar un gradiente de elución controlado, lo cual permite obtener separaciones de alta resolución [197].



**Figura 13 – Imágenes de maquinaria utilizada en cromatografía de afinidad.** A la izquierda, imágenes de columnas HisTrap FF, de 1mL y de 5mL. A la derecha, imagen del sistema cromatográfico ÄKTApurifier. (Extraído de Strategies for Protein Purification Handbook).



Previo a su uso, las soluciones utilizadas, como los buffers de unión y elución, el agua y el etanol 20% fueron filtrados por filtros de 0,22µm y degaseadas.

Para llevar a cabo la purificación IMAC se comenzó por bombear la columna con agua destilada, previamente filtrada y degaseada. Luego se removió la tapa de la columna, se conectó a una bomba peristáltica (utilizando el adaptador provisto) y se cerró, goteando agua dentro de la columna, cuidando de que a esta no le entre aire. Se removió la otra tapa, correspondiente a la salida de la columna, y se lavó la misma utilizando de 3 a 5 volúmenes de agua destilada (también previamente filtrada y degaseada).

Luego se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de buffer de unión (del inglés binding buffer), con una velocidad de flujo de 1mL/min. El buffer de unión tiene un pH de 7,4; 0,5mM de NaCl, 20mM de fosfato de sodio y 20mM de Imidazol. Es conveniente que este buffer en particular contenga una baja concentración de imidazol con el fin de minimizar la unión de proteínas de la muestra. Por esta misma razón es también importante incluir imidazol en la muestra (en general, a la misma concentración que en el buffer de unión). A concentraciones más elevadas el imidazol también puede disminuir la unión de las proteínas marcadas con histidina. Es así que la concentración de imidazol debe ser optimizada para asegurar el mejor balance de alta pureza (baja unión de proteínas de la muestra) y alto rendimiento (fuerte unión de la proteína de interés, marcada con histidina). Este buffer de unión, junto con la muestra, también contiene sales (0,5-1,0M NaCl) dado que estas eliminan los efectos del intercambio iónico.

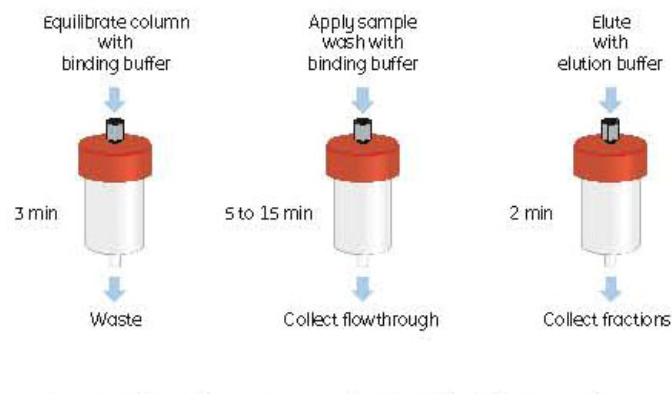
Luego de equilibrar la columna se aplicó la muestra, previamente preparada con el pH del buffer de unión, a la columna utilizando la bomba peristáltica.

Una vez que toda la muestra pasó por la columna se procedió a lavar la misma con buffer de unión, agregándole entre 15 y 20 volúmenes de columna del mismo.

Para comenzar con la elución, se transfirió la columna al sistema cromatográfico ÄKTA. Se eluyó la muestra con el agregado de 20 volúmenes de columna de buffer de elución, utilizando un gradiente lineal de concentración de imidazol. En este caso la composición del buffer de elución fue la siguiente: pH 7,4; 20mM de fosfato de sodio, 0,5M de NaCl y 500mM de Imidazol. El gradiente de dicha sustancia estaba formado por concentraciones de imidazol que variaban desde 100mM hasta 500mM (concentración del buffer de elución) y se creó inicialmente sólo con buffer de unión y el agregado paulatino de buffer de elución, lo cual iba aumentando linealmente la concentración de imidazol. Por lo general, el gradiente de elución genera dos picos, uno temprano correspondiente a proteínas naturalmente unidas en el lisado y uno posterior correspondiente a la proteína marcada con histidina, la cual tiene una mayor afinidad por el medio [199].

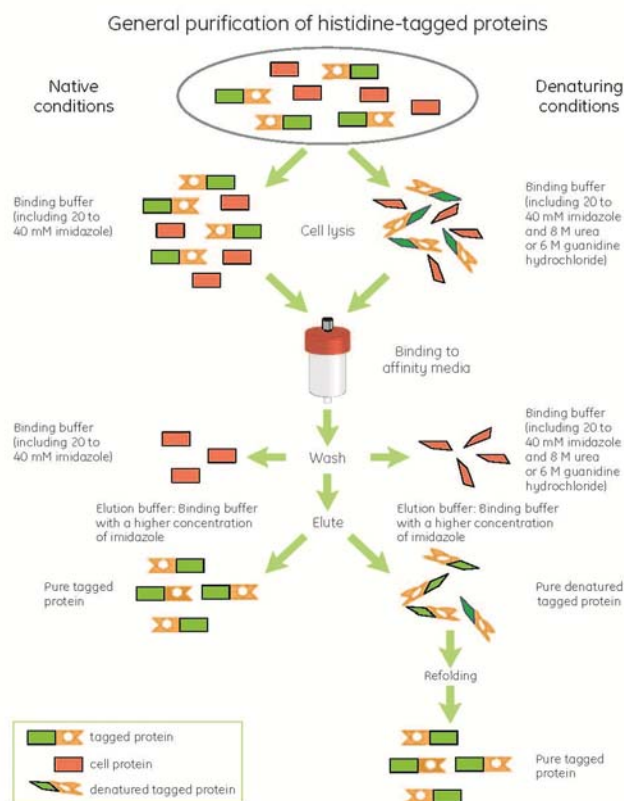
Las fracciones de elución se colectaron en volúmenes de aproximadamente 0.5mL. A las mismas se les retiró el imidazol mediante una diálisis realizada durante toda la noche. Se las concentró al día siguiente, utilizando el sistema de filtrado por centrifugación Amicon ultra 15 (Millipore), y se les midió la concentración final utilizando el Nanodrop™ (Thermo Scientific spectrophotometer). Posteriormente se analizaron las muestras por SDS-PAGE.

A continuación (Figura 14) se muestra un esquema de los pasos previamente explicados para la purificación por IMAC en la columna utilizada:



**Figura 14 - Esquema de los pasos de cromatografía de afinidad con el uso de la columna HisTrapFF.** El primer paso es equilibrar la columna con el buffer de unión. El segundo paso es aplicar la muestra y lavarla con buffer de unión, colectando lo no-unido. Finalmente se eluye la muestra de interés con el buffer de elución y se colectan las fracciones de interés. (Extraído de Recombinant Protein Purification Handbook).

La Figura 15 muestra un esquema de los pasos necesarios para la purificación de proteínas marcadas con cola de Histidina, en dos condiciones diferentes (condiciones nativas, condiciones de denaturalización) [197].



**Figura 15 - Esquema general de los pasos necesarios para la purificación de proteínas marcadas con cola de histidina.** A la izquierda se encuentran los pasos a seguir para la purificación de proteínas marcadas en condiciones

nativas (este caso) y a la derecha para las mismas proteínas en condiciones desnaturalizantes. (Extraído de Recombinant Protein Purification Handbook).

## **3.9 - Electroforesis**

### **3.9.1 - Generalidades**

Se denomina electroforesis al proceso de mover moléculas cargadas en solución mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de la mezcla. Dado que las moléculas en un campo eléctrico se mueven con una velocidad dependiente de su carga, forma, y tamaño, las electroforesis han sido extensamente desarrolladas para separaciones moleculares. Como herramienta analítica, la electroforesis es simple y relativamente rápida. Se usa principalmente para análisis de purificación de moléculas de gran tamaño como proteínas y ácidos nucleicos, pero también puede aplicarse a moléculas cargadas más simples, incluyendo azúcares cargados, aminoácidos, péptidos, nucleótidos e iones simples.

La electroforesis de macromoléculas normalmente se lleva a cabo mediante la aplicación de una fina capa de muestra a una solución estabilizada por una matriz porosa. Bajo la influencia de un voltaje aplicado, diferentes especies de moléculas en la muestra se mueven a través de la matriz a diferentes velocidades. Al final de la separación, las diferentes especies son detectadas como bandas en diferentes posiciones de la matriz. Una matriz es requerida debido a que la corriente eléctrica que pasa por la solución electroforética genera calor, lo cual causa la difusión y mezcla de las bandas en ausencia de un medio estabilizador. La matriz puede estar compuesta por un gran número de materiales diferentes, incluyendo papel, acetato de celulosa, o geles compuestos por poliacrilamida, agarosa o almidón. En los geles de poliacrilamida y agarosa, la matriz también actúa como un entramado tamaño-selectivo en la separación. Al final de la corrida, las moléculas separadas pueden ser detectadas en posición en el gel mediante una tinción o auto-radiografía, cuantificadas por escaneo con un densitómetro, y el gel puede ser secado para almacenaje permanente.

En este caso en particular se utilizaron dos tipos de electroforesis para el análisis de distintas muestras. Por un lado, para verificar la presencia de ADN plasmídico puro se utilizó una electroforesis en gel de agarosa; y por otro lado, para el análisis de muestras proteicas, principalmente de aquellas que contenían la proteína de interés (proBDNF), en distintas etapas del proceso de producción de la misma, se utilizó electroforesis SDS-PAGE [200].

### **3.9.2 - Electroforesis en gel de agarosa**

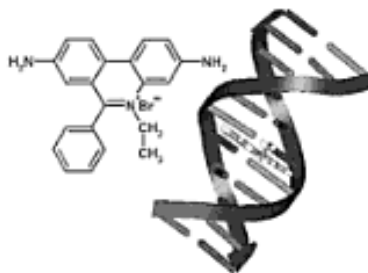
Para poder verificar la presencia del ADN plasmídico purificado (obtenido luego del uso del kit *Axyprep Plasmid Miniprep*, de Axygen Bioscience) conteniendo el inserto de interés, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Dado que los poros en un gel de agarosa son grandes, la agarosa se utiliza para separar macromoléculas como ácidos nucleicos, grandes proteínas y complejos proteicos. Muchos

tipos de agarosa pueden separar ácidos nucleicos de 50 a 30000 pares de bases, razón por la cual se utilizó esta técnica para la detección de ADN plasmídico con el inserto de interés [200].

La electroforesis es un método de separación de sustancias basado en la velocidad de movilidad cuando se está bajo la influencia de un campo eléctrico. La agarosa es un polisacárido altamente purificado derivado del agar. Normalmente se compra como un polvo seco. Para obtener un gel de agarosa este polvo se mezcla con una solución buffer adecuada y se disuelve cuando dicha solución del polvo es calentada hasta una temperatura cercana a la de ebullición; se mantiene líquida hasta que la temperatura disminuye a 40°C, cuando gelifica. Durante la electroforesis, el gel es sumergido en una bandeja que contiene la solución buffer, un electrodo positivo y uno negativo. El ADN a ser analizado es forzado a través de los poros del gel por acción de la corriente eléctrica. Bajo un campo eléctrico, el ADN, que se encuentra naturalmente cargado negativamente debido a su esqueleto de azúcar-fosfato, se moverá hacia el electrodo positivo y lejos del electrodo negativo. La velocidad de movilidad del ADN en la electroforesis depende de varios factores, incluyendo: la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa en el gel y, principalmente, el tamaño de las moléculas de ADN. Las moléculas de ADN más pequeñas se mueven a través de la agarosa más rápido que las moléculas más grandes.

El ADN por sí mismo no es visible en un gel de agarosa, por lo que fue visualizado mediante el uso de una tinción que se une al ADN. Generalmente, los ácidos nucleicos son teñidos con bromuro de etidio, una tinción que fluoresce débilmente libre en solución pero exhibe una fuerte fluorescencia naranja cuando se une a ácidos nucleicos y es excitado mediante luz UV. Este es un agente intercalante de ácidos nucleicos, por lo que se une a los mismos intercalándose entre sus bases nitrogenadas [201]. Aproximadamente de 10 a 50ng de ADN de doble hebra puede ser detectado con bromuro de etidio en un transiluminador UV de 300nm. Los geles fluorescentes deben ser fotografiados para tener un registro de la separación.



**Figura 16** - Estructura de la molécula de bromuro de etidio y cómo se intercala entre las bases nitrogenadas. (Extraído de Roca et al., 2003).

Los geles de agarosa son relativamente frágiles y deben ser manejados con cuidado. Estos geles son hidrocoloides, que se mantienen juntos por acción de los puentes de hidrógeno y de enlaces hidrofóbicos. Un gel de agarosa siempre debe ser manejado con algún soporte para todo el gel, como una bandeja o una espátula, ya que el gel se romperá si se dobla demasiado [200].

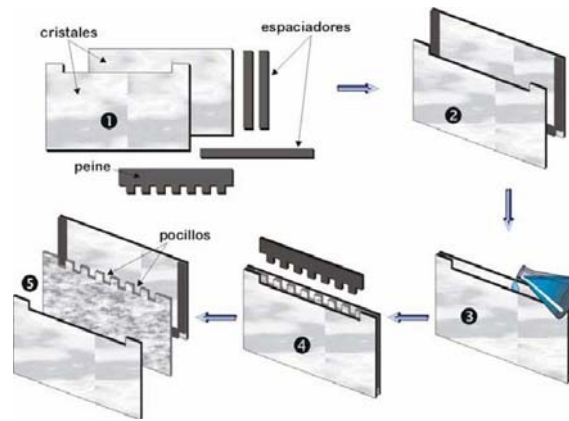
En este caso en particular, para obtener el gel de agarosa 1% se disolvió agarosa en un buffer Tris-ácido bórico-EDTA (Tris 890mM; ácido bórico 890mM; EDTA 20mM pH 8; TBE), calentándolo, y se agregaron 3µL de bromuro de etidio 10mg/mL cada 100mL de gel, para la visualización posterior de los ácidos nucleicos bajo luz UV. Se sembraron 5µL del marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) y en los demás carriles se sembró una mezcla que contenía 2µL de plásmido (cada uno), 3µL de agua miliQ (ultrapura) y 1µL de buffer de carga (LB DNA 6x, conteniendo azul de bromofenol y glicerol). El buffer de corrida utilizado también fue TBE 1x y la electroforesis se realizó a 100V el tiempo necesario para separar los fragmentos de ADN. Finalmente se visualizaron las bandas en un transiluminador UV (G:BOX, Syngene).

### 3.9.3 - Electroforesis SDS-PAGE

El análisis de las fracciones obtenidas por fraccionamiento celular, cromatografía de afinidad y las diferentes muestras obtenidas en distintas etapas del proceso de expresión, renaturalización y purificación de la proteína de interés se realizó por SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, sigla que proviene del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Esta es una técnica que permite la separación de proteínas de distinto peso molecular para su análisis.

Las muestras a correr en la SDS PAGE son antes calentadas a 95°C por 5 minutos en buffer de muestra que contiene beta mercaptoetanol y SDS, entre otros componentes. El mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro presentes, que son los que mantienen la estructura terciaria de la proteína. El SDS ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}^+$ ) es un detergente aniónico que se une fuertemente a la proteína y la desnaturaliza. Es así que cada proteína de la muestra es completamente desnaturalizada por este tratamiento y se abre adoptando una estructura con forma de vara que tiene una serie de moléculas negativamente cargadas por SDS a lo largo de toda la cadena polipeptídica. En promedio, una molécula de SDS se une cada dos aminoácidos, es así que la carga nativa original de la molécula queda completamente rodeada por las moléculas de SDS. El buffer de la muestra también contiene una tinta rastreadora ionizable, en este caso azul de bromofenol, que permite que la corrida electroforética sea monitoreada, y glicerol, que le otorga densidad a la solución de muestra, permitiendo así que esta se estabilice más fácilmente en el buffer de electroforesis, hacia el fondo, una vez sembrada en el pocillo de carga [202].

Una vez finalizado el montaje del aparato para el armado del gel (Figura 17), se procede a verter las soluciones correspondientes para la formación del mismo.



**Figura 17 – Armado del gel de electroforesis SDS-PAGE.** Esquema donde se muestran los pasos que llevan al armado del gel. Se requiere de espaciadores, que le dan el espesor al gel (1,5 mm) y dos vidrios, los cuales son montados en un soporte. Luego de preparar la solución de acrilamida, esta se vierte en el espacio formado por los vidrios. Se coloca el peine, para que este forme los pocillos y se deja reposar hasta que el gel se encuentra completamente polimerizado.

Cuando el principal gel separador (restringe la movilidad de las muestras debido a su porosidad y es el encargado de separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular) ha sido vertido entre las placas de vidrio y se permitió su polimerización, un gel concentrador (encargado de compactar las muestras para que ingresen de forma homogénea al gel separador), en menor cantidad, es vertido sobre el gel separador y es dentro de este gel que los pocillos se forman al introducir un peine, y las proteínas son inyectadas.

Una vez que todas muestras y el marcador de peso molecular son sembrados en los pocillos correspondientes, una corriente eléctrica pasa a través del gel. Cuando las muestras proteicas pasaron por el gel concentrador y entraron en el gel separador, los complejos proteína-SDS cargados negativamente continúan moviéndose hacia el ánodo, y como tienen la misma carga por unidad de longitud viajan dentro del gel separador, bajo el campo eléctrico aplicado, con la misma movilidad. Sin embargo, a medida que pasan a través del gel separador las proteínas se separan por su tamaño, gracias a las propiedades de malla del gel. De esta forma, cuanto más pequeña sea la proteína, más fácil le será pasar a través de los poros del gel, mientras que las proteínas más grandes serán sucesivamente retardadas por la resistencia friccional, gracias al efecto de malla del gel. Dado que el azul de bromofenol es una molécula pequeña no es retardada en la malla del gel y así logra indicar el frente electroforético. Cuando la tinta mencionada llega al fondo del gel la corriente eléctrica se apaga y el gel es retirado de las placas de vidrio, colocado en una solución de tinción apropiada por unas horas, y luego lavado con una solución de desteñido (del inglés, *Destain*) durante la noche. La solución Destain remueve la tinta no unida del gel, dejando a las proteínas teñidas visibles como bandas azules en un fondo claro [202].

Para este caso particular el porcentaje del gel separador utilizado fue de 12%, porcentaje que depende del tamaño de la proteína de interés; el porcentaje del gel concentrador (preparado posteriormente) fue de 5% y en ambos geles se agregó en último lugar el persulfato de amonio y el TEMED ya que son los agentes que inician la polimerización. Las proporciones de los componentes se indican en Tabla 1.

Las muestras se prepararon con buffer de carga o de la muestra que tenía la siguiente composición: 25% beta-mercaptoetanol, 2.5% SDS, 50% glicerol, 0.125 M buffer Tris HCl pH 6.8, 0.1 mg/mL Azul de Bromofenol; y el marcador de peso molecular utilizado fue Prestain ladder plus #SM 1811 de Fermentas, USA. Se realizó la corrida a 100V utilizando buffer Tris glicina SDS (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3; TGS). La tinción del gel se llevó a cabo con el colorante Coomassie Brilliant Blue, de Sigma, y el desteñido del mismo con una solución Destain compuesta por 40% de Etanol 95% y 10% de ácido acético glacial (99%).

**Tabla 1** - Gel de poliacrilamida. Proporciones de los componentes utilizados.

	Gel separador (resolving) 12%	Gel concentrador (stacking) 5%
H <sub>2</sub> O	3,3 mL	2,7 mL
30% mix de acrilamida	4,0 mL	0,67 mL
Buffer 1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
Buffer 1,0M Tris-HCl pH 6,8	-	0,5 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,04 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0,1 mL	0,04 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL
Volumen Total	10 mL	4 mL

### 3.10 - Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Para verificar la obtención de proBDNF se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se procedió a analizar las bandas de interés (de peso molecular cercano al del proBDNF) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization-Time Of Flight/Time Of Flight*).

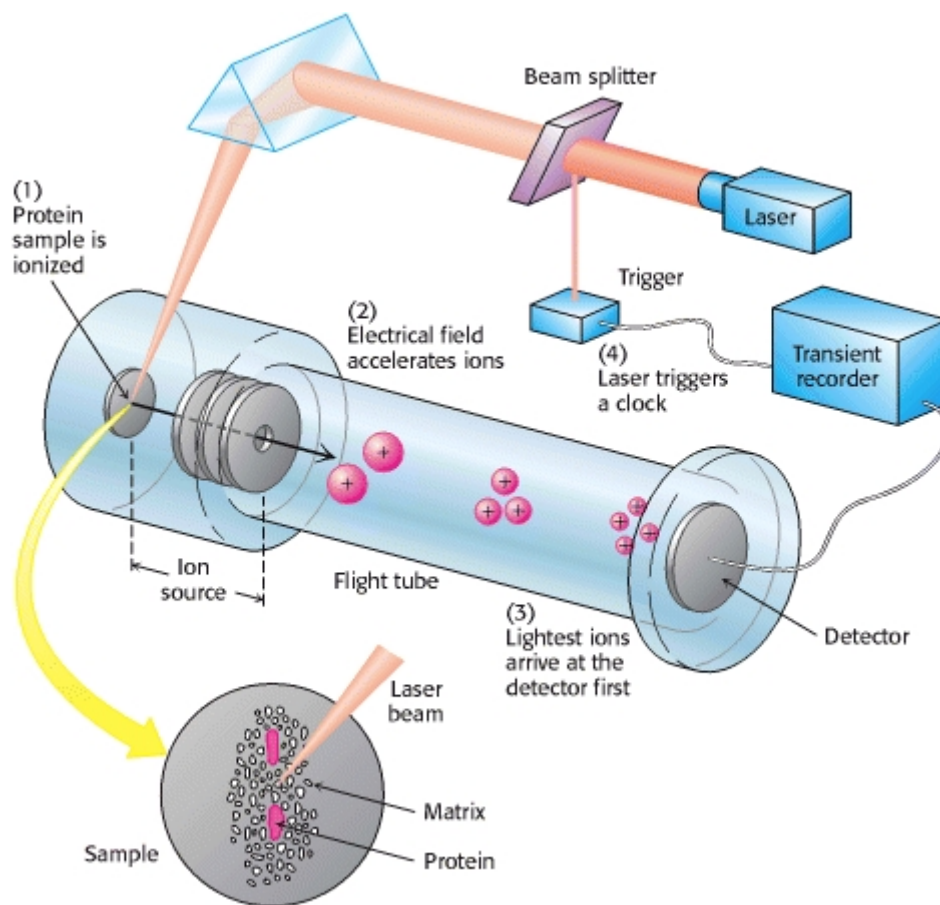
#### 3.10.1 - Generalidades de espectrometría de masas

La espectrometría de masas ha sido una técnica analítica de gran importancia, inicialmente en química orgánica y luego, gracias a la introducción de ciertas técnicas, en la proteómica.

Los espectrómetros de masa se encargan de medir masas. En proteómica, la masa proporciona información importante acerca de la identidad de la proteína, sus modificaciones químicas, y su estructura. Cada espectrómetro de masa tiene, para cumplir su función, tres componentes principales: una fuente, un analizador, y un detector. Dado que los espectrómetros de masa miden la masa de especies cargadas, la fuente debe ser capaz de producir iones, el analizador debe ser capaz de separar estos iones basándose en su masa (o, mejor dicho, relación masa-carga), y el detector debe ser capaz de detectar partículas cargadas y luego amplificar la respuesta para la obtención de una señal medible [203].

En los comienzos, la baja volatilidad de las proteínas impedía su análisis mediante espectrometría de masas, pero, recientemente, esta dificultad ha sido eludida mediante la introducción de técnicas para la dispersión efectiva a fase gaseosa de proteínas y otras

macromoléculas. Estos métodos se denominan Desorción-Ionización láser asistida por una matriz (MALDI, del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization*) y espectrometría electrospray; y permitieron la vaporización e ionización de biomoléculas relativamente grandes y no volátiles, como proteínas y péptidos. En la espectrometría MALDI, la que se utilizó en este caso, los iones proteicos son generados y luego acelerados a lo largo de un campo eléctrico. Ellos viajan a través del tubo de vuelo (del inglés *flight tube*), con los iones más pequeños viajando más rápido y llegando primero al detector. Así, el tiempo de vuelo (TOF, del inglés *time of flight*) en un campo eléctrico es una medida de la masa (más precisamente, la relación masa/carga). Pequeñas cantidades de biomoléculas, tan pequeñas como pocos picomoles (pmol) hasta femtomoles (fmol), pueden ser analizadas de esta manera [204].



**Figura 18 – Esquema del funcionamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF.** (1) La muestra proteica, embebida en una matriz apropiada, es ionizada mediante la aplicación de un rayo láser. (2) Un campo eléctrico acelera los iones formados a través del tubo de vuelo hacia el detector. (3) Los iones más livianos llegan primero. (4) El pulso de láser ionizante también dispara un reloj que mide el tiempo de vuelo (TOF) para los iones. (Extraído de Berg et al., 2002).



### 3.10.2 - Identificación proteica por espectrometría de masas basada en geles de electroforesis

Dado que, en este caso en particular, lo que se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF fueron bandas de un gel de electroforesis teñido con Coomassie, previo al análisis con el espectrómetro fue necesario preparar las muestras a analizar (remover la tinción, etcétera). Para esto se siguió un protocolo de digestión in-gel para MALDI-TOF mass fingerprinting adaptado de Jensen y colaboradores, en el que lo primero que se hizo fue extraer los péptidos del gel [205].

Para esto se cortaron las bandas de interés (tres en este caso). Luego se las colocó, a cada una, en un eppendorf y se las lavó con 200µL de un buffer compuesto en 50% por 0,2M bicarbonato de amonio, pH8, y 50% por acetonitrilo puro. La incubación duró aproximadamente 30 minutos, bajo agitación y a 30°C. Finalizado este período se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso. Luego se agregó acetonitrilo puro para deshidratar el gel, se agitó por unos minutos y se lo retiró. El paso de deshidratación del gel es necesario dado que la muestra debe estar lo más seca posible para que la enzima (tripsina) pueda actuar sobre ella y así la eficiencia de la digestión sea óptima. Las bandas se dejaron secar completamente bajo una corriente de nitrógeno o en el "speed back". Todos estos pasos deben realizarse en una cámara de flujo laminar y manejar las muestras con extremo cuidado a modo de minimizar la contaminación de las mismas con keratinas exógenas (pelo, piel, corrientes de aire, ropa de lana, etcétera) dado que la presencia de estas puede enmascarar las señales obtenidas [205].

Una vez que las bandas de interés del gel fueron extraídas del mismo y deshidratadas se procedió a la digestión de las proteínas de interés con tripsina. Para esto fue necesario, inicialmente, descongelar la tripsina a utilizar (normalmente se encuentra almacenada en alícuotas, a -20°C, en una concentración de 0,5µg/µL y 2 µL por tubo). A cada tubo que contenía 2µL tripsina Promega 0,5µg/µL se le agregaron 30µL de buffer bicarbonato de amonio 50 mM, para obtener una solución adecuada para el tratamiento de las muestras. A cada banda de interés, ya deshidratada, se le agregaron 10 µL de la solución mencionada, a fin de rehidratar las muestras. Se esperaron unos minutos a que el gel se hidrate y luego se adicionó suficiente buffer bicarbonato de amonio (50 mM pH 8.3) como para cubrir completamente el gel. Se dejaron incubando las muestras con este buffer durante toda la noche, a 37°C, para que ocurra la reacción de digestión.

El siguiente paso fue la extracción de los péptidos del gel. Para esto fue necesario detener la digestión de las proteínas a analizar mediante la adición de una solución 1% de TFA (ácido trifluoroacético). Se recuperó el sobrenadante y se guardó con el tip correspondiente. Luego se cubrió cada muestra (gel) con una solución de 0.1%TFA/60%Acetonitrilo y se agitó por una hora. Nuevamente se recogió el sobrenadante, guardándolo con su tip, y se cubrió cada muestra con la solución de 0.1%TFA/60%Acetonitrilo; se agitó durante una hora más.

Posteriormente se procedió a la concentración de las muestras y el retiro del acetonitrilo presente en estas. Para esto, los sobrenadantes recuperados se concentraron por un método de secado en vacío, en el speed vac (normalmente lleva 20 minutos evaporar todo el

acetonitrilo pero sin que se seque la muestra por completo). Este último procedimiento es crucial para el siguiente paso cromatográfico ya que logra reducir el volumen de las muestras a uno aceptable para dicho fin y remueve totalmente el acetonitrilo presente en las muestras, evitando así que este interfiera en la fijación de los péptidos al medio cromatográfico hidrofóbico [205].

Una vez concentradas las muestras, se procedió al desalado de las mismas utilizando microcolumnas de fase reversa C18 (tips de pipeta OMIX, Varian). La elución de los péptidos de la microcolumna se realizó directamente en la placa de las muestras del espectrómetro de masas con 3µL de solución de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en una solución con 60% de acetonitrilo acuoso, conteniendo 0.2% de TFA).

El espectro de masa de las mezclas de las digestiones se adquirió en un instrumento 4800 MALDI-TOF/TOF (de Applied Biosystems) utilizado en modo reflector, y fueron calibradas externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (de Applied Biosystems). Se llevaron a cabo experimentos de disociación por colisión inducida MS/MS de péptidos seleccionados.

Las proteínas fueron identificadas por la base de datos NCBI nr buscando valores m/z de péptidos utilizando el programa MASCOT y aplicando los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masa monoisotópica, 0,05 Da; tolerancia de masa de fragmentos, 0,25 Da; oxidación de metionina, como posibles modificaciones y se permite un clivaje triptico perdido.

### **3.11 - Western Blotting**

El término “blotting” hace referencia a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su subsecuente detección en la superficie de la membrana. El Western blotting (también conocido como inmunoblotting, debido a que utiliza un anticuerpo para la detección específica de su antígeno) fue introducido por Towbin et al. en 1979 [206] y hoy en día es una técnica de rutina para los análisis de proteínas. La especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo permite la identificación de una única proteína específica dentro de una mezcla proteica compleja, por lo que se utiliza comúnmente para la identificación positiva de una proteína en una mezcla compleja, y para la obtención de datos cualitativos y semicuantitativos acerca de la proteína de interés [207].

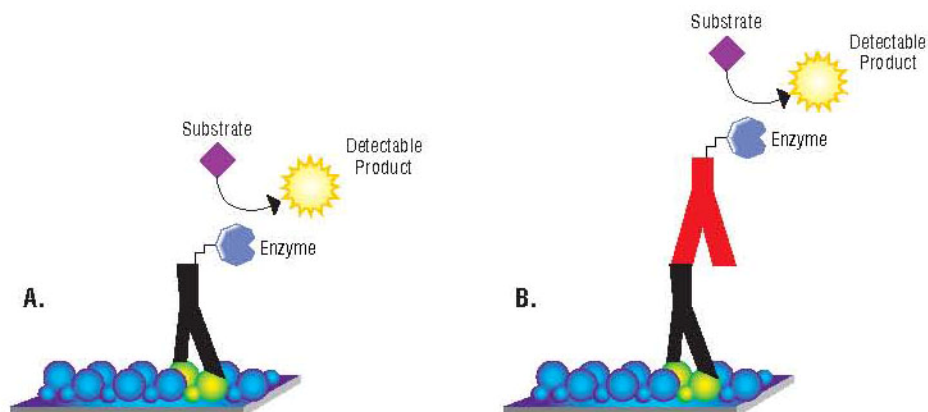
En este caso en particular se utilizó este método para verificar la obtención de proBDNF a partir de una segunda producción de la proteína y posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Como control positivo se utilizó la muestra de proBDNF obtenida a partir de la primera producción y purificación, en la cual la presencia de la proteína de interés fue verificada mediante un análisis de espectrometría de masas. Como control negativo se decidió sembrar una muestra de proBDNF pero sin adición de anticuerpo primario, de manera de que se logre verificar la no reactividad del anticuerpo secundario en condiciones en las que no se encuentra su sustrato.

Según el método de detección que se utilice para determinar la presencia de la proteína de interés, al western blot se lo puede clasificar en directo o indirecto. Con un método de detección directa, el anticuerpo primario (anticuerpo capaz de detectar la proteína de interés)

que se utiliza para la detección de un antígeno en el blot también se encuentra marcado con una enzima o con una tinción fluorescente (Figura 19, parte A).

En el método de detección indirecta, un anticuerpo primario es añadido primero, para su unión al antígeno o proteína de interés. Luego se añade un segundo anticuerpo que es dirigido contra el fragmento constante Fc de la gama-globulina del anticuerpo primario, por lo que permite su unión al mismo. Este segundo anticuerpo, también llamado “anticuerpo secundario”, contiene un método de detección (Figura 19, parte B). Originalmente, el marcado con iodina radiactiva era utilizado, pero ahora los métodos enzimáticos son los que más se usan; en estos la enzima se conjuga covalentemente al anticuerpo. Hay varias enzimas que se utilizan (ureasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano), y cada una puede ser detectada de varias maneras. Las reacciones de color son las más populares, pero los procesos quimioluminiscentes están comenzando a ganar popularidad debido a su alta sensibilidad y rápidos resultados [208].

En este caso, el método que se utilizó fue el de detección indirecta con quimioluminiscencia, dado que ofrece muchas ventajas con respecto al método directo. Entre las ventajas que presenta está el aumento de la sensibilidad debido a que cada anticuerpo primario contiene varios epítopes que pueden ser reconocidos por el anticuerpo secundario, permitiendo así una amplificación de la señal. Además, una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados están comercialmente disponibles, y ya que muchos anticuerpos primarios pueden ser producidos en una especie y el mismo anticuerpo secundario marcado puede ser utilizado para la detección, es muy versátil. Otra ventaja es que la inmunoreactividad del anticuerpo primario no se ve afectada por el marcado y diversos marcadores de visualización pueden ser utilizados con el mismo anticuerpo primario.

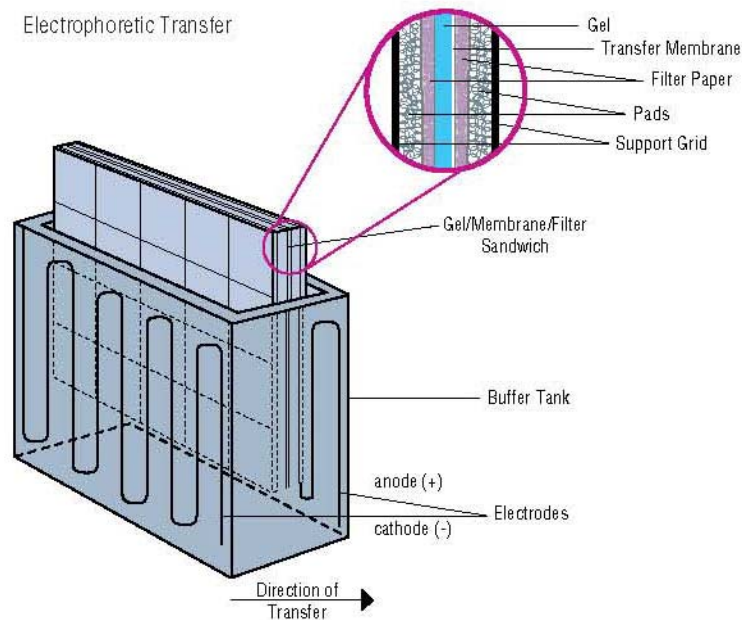


**Figura 19 - Diferencias entre el método de detección directa (parte A) y detección indirecta (parte B).** Parte A- En el método de detección directa, un anticuerpo primario marcado se une al antígeno que se encuentra en la membrana y reacciona con el sustrato, originando una señal detectable. Parte B- En el método de detección indirecta, un anticuerpo primario no-marcado se une al antígeno. Luego, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario y reacciona con el sustrato. (Extraído de Western Blotting, Handbook and Troubleshooting Guide).

El primer paso en un western blot es la separación de las macromoléculas de la muestra utilizando una electroforesis en gel. Luego de este procedimiento (electroforesis), las

moléculas separadas son transferidas o “blotteadas” en una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o, en este caso, PVDF (del inglés *Polyvinylidene Fluoride*, de la marca Hybond). Esta membrana Hybond™-P es una membrana hidrofóbica de polivinilideno difluorido optimizada para su uso en transferencias y/o aplicaciones de Western blot. Presenta una capacidad de unión de proteínas de  $125\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y es químicamente estable como para permitir el uso de un rango de solventes para destinción rápida. Previo a su uso, Hybond™-P debe ser embebida durante un minuto en metanol 100%, con el fin de activarla, y luego sumergida en agua destilada.

Para llevar a cabo la transferencia de las proteínas a la membrana mencionada existen una gran variedad de métodos, incluyendo transferencia por difusión, transferencia por capilaridad, transferencia convencional acelerada por calor, transferencia por vacuum blotting (blotting por vacío) y electroelución. Para proteínas, el método de transferencia más común, y el que se utilizó en este caso, fue la electroelución o la transferencia electroforética, la cual es muy rápida y eficiente. Este método utiliza la movilidad electroforética de proteínas para transferirlas desde el gel a la matriz. La transferencia electroforética de proteínas incluye colocar un gel de poliacrilamida, conteniendo proteínas, en contacto directo con una membrana de PVDF, en este caso, u otro apoyo adecuado para la unión de proteínas, y colocar esto entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora (Figura 20). Cuando se le aplica un campo eléctrico, las proteínas se mueven fuera del gel de poliacrilamida y hacia la superficie de la membrana donde las mismas se adhieren fuertemente. La membrana resultante es una copia del patrón proteico que se encontraba en el gel de poliacrilamida [207].



**Figura 20** - Esquema de armado del sistema para la transferencia electroforética. (Extraído de Western Blotting, Handbook and Troubleshooting Guide).

La eficiencia de la transferencia puede variar dramáticamente entre proteínas, dependiendo de la habilidad de la proteína de migrar fuera del gel, y su propensión a unirse a la membrana bajo determinadas circunstancias. La eficiencia de la transferencia depende de varios factores tales como la composición del gel, si este se encuentra en contacto directo con la membrana o no, la posición de los electrodos, el tiempo de transferencia, el tamaño y composición de las proteínas, la fuerza del campo, y la presencia de detergentes. Generalmente se obtiene una óptima transferencia de proteínas con el uso de buffers de baja fuerza iónica y una corriente eléctrica baja. Para este caso en particular, luego de la electroforesis SDS-PAGE, se realizó la transferencia durante una hora y media, a una corriente de 300mA, a 4°C. El buffer de transferencia utilizado tenía una composición de 300mL de EtOH 95%, 150mL de Tris-Glicina 10x, 1050mL de agua destilada y 1,5 gramos de SDS.

En esta instancia, antes de proceder con el Western Blot, es aconsejable verificar la eficiencia de la transferencia. Para esto se tiñen todas las proteínas de la membrana con una tinción reversible. La tinción de Ponceau S, o rojo de Ponceau (0,2 % rojo *Ponceau*, 3 % ácido tricloroacético, en H<sub>2</sub>O), es la más utilizada para la tinción de proteínas en una membrana y fue la que se utilizó en este caso. Una vez comprobada la eficiencia de la transferencia, se lavaron los restos del colorante sumergiendo la membrana en agua destilada y posteriormente en TBS-*Tween* (Tris 0,02 M, NaCl 0,15 M, 0,1% *Tween*<sup>®</sup>-20, en H<sub>2</sub>O destilada ajustando el pH a 7,6) hasta observar el desvanecimiento de toda la tinción utilizada.

El siguiente paso en esta técnica es el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos. Esto significa bloquear los sitios no reactivos de la membrana con el fin de reducir la cantidad de uniones inespecíficas de proteínas durante los siguientes pasos del ensayo. Se han utilizado una gran variedad de buffers de bloqueo, desde leche o suero normal hasta proteínas altamente purificadas, para bloquear sitios no reactivos de la membrana. El buffer de bloqueo debe mejorar la sensibilidad del ensayo mediante la reducción de la interferencia del "background" (ruido de fondo); pero dado que no todos los buffers de bloqueo son compatibles con todos los sistemas existe una gran variedad de bloqueadores disponibles, tanto en solución salina tamponada con Tris (TBS, del inglés *Tris Buffered Saline*) como en solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*). La opción adecuada de bloqueo para un determinado blot depende del antígeno mismo que se utilice, y del tipo de enzima conjugada a ser utilizada. Por ejemplo, con aplicaciones que usan un conjugado de fosfatasa alcalina, dado que el PBS interfiere con la misma, se debe utilizar un buffer de bloqueo en TBS. El buffer de bloqueo ideal se unirá a todos los potenciales sitios de interacción inespecífica, eliminando el background sin alterar o enmascarar el epítipo de unión del anticuerpo [207].

En este caso en particular el buffer de bloqueo que se utilizó fue una solución de TBS conteniendo 0,1% *Tween*<sup>®</sup>-20 y 5% de leche descremada en polvo (5% de leche descremada en TBS-*Tween*). Inmediatamente luego de la transferencia, se colocó la membrana en esta solución y se dejó bloqueando durante 1 hora, a temperatura ambiente, con agitación.

Una vez finalizado el bloqueo de la membrana se procedió a la incubación de la misma con el anticuerpo primario. La elección de este anticuerpo para un western blot depende del

antígeno que se desea detectar y de los anticuerpos que se encuentran disponibles para ese antígeno. Estos anticuerpos pueden ser diseñados específicamente para reconocer el antígeno de interés o se los puede comprar, dado que un gran número de anticuerpos primarios se encuentran comercialmente disponibles. Para un western blotting se pueden utilizar anticuerpos monoclonales, los cuales son valiosos por su especificidad, pureza y consistencia (menor background); o policlonales, los cuales son más económicos, su producción es más rápida y, por lo general, tienen una alta afinidad por el antígeno [207]. En este caso, dado que el antígeno a detectar es la proteína proBDNF, se decidió buscar un anticuerpo comercial que lograra detectar la proteína de interés. El anticuerpo primario que se utilizó fue el anti-BDNF (un epítipo presente en el BDNF estará también presente en su precursor) policlonal de conejo (ab6201), provisto por la empresa Abcam.

En general, los anticuerpos (tanto primario como secundario) que se utilizan para western blotting se usan en soluciones diluidas, que abarcan desde diluciones de 1/100 a 1/500.000, partiendo, en general, de soluciones stock de 1mg/mL. La dilución óptima para un determinado anticuerpo con un sistema de detección en particular puede ser determinada experimentalmente realizando un Dot Blot (sección 3.12). Los sistemas de detección más sensibles requieren el uso de menor cantidad de anticuerpo, lo cual puede resultar en ahorros sustanciales en los costos de anticuerpos, y permitir que un suministro limitado de anticuerpo se utilice para más experimentos. También produce un beneficio adicional que es la reducción de background debido a que una cantidad limitada de anticuerpo muestra elevada especificidad por el blanco (proteína de interés) con la mayor afinidad. Por lo general, los anticuerpos son diluidos en el buffer de lavado que contiene el agente de bloqueo. La presencia de una pequeña cantidad de agente de bloqueo y detergente en el diluyente del anticuerpo ayuda a minimizar el background. En este caso, el anticuerpo primario dirigido contra el proBDNF se diluyó (concentración inicial 1,0mg/mL) en la solución de bloqueo previamente utilizada, hasta obtener una concentración 1/200 (5µg/mL).

Para la incubación con el anticuerpo primario primero se retiró la membrana de la solución de bloqueo, se cortó cuidadosamente el último carril, y se colocaron ambos trozos sobre un parafilm, previamente ajustado a una superficie plana. Se embebió la membrana principal, que contenía la proteína de interés, con la dilución del anticuerpo primario, cuidando que toda la superficie de la misma estuviera en contacto con la solución; la membrana correspondiente al último carril fue el control negativo, por lo que fue embebida con solución de bloqueo, a fin de determinar la eficiencia de la técnica y de la detección del anticuerpo secundario. La incubación con el anticuerpo primario duró toda la noche, y se hizo a 4°C (en cámara fría).

Una vez finalizada la incubación se retiraron las membranas de la cámara fría, y se procedió a la realización de los lavados. Ocasionalmente, estos se llevan a cabo en un buffer fisiológico como TBS o PBS, sin aditivos. Comúnmente, un detergente como 0.1% Tween®-20 es añadido al buffer con el fin de ayudar a remover el material unido inespecíficamente y disminuir el background. En este caso, el buffer de lavado utilizado fue una solución de TBS-Tween. Los pasos de lavado son necesarios para remover los agentes o reactivos no unidos y reducir el background, resultando así en un aumento de la relación señal-ruído. Lavados insuficientes harán que el background sea alto (mucho contaminación), mientras que lavados excesivos

pueden resultar en una disminución de la sensibilidad a causa de la elución del anticuerpo y/o antígeno del blot. En este caso las membranas se lavaron rápidamente con TBS-Tween, a fin de retirar inicialmente el exceso de anticuerpo primario, y luego se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con TBS-Tween, con agitación, a temperatura ambiente.

Una vez que culminan los lavados, el siguiente paso en el western blot fue la incubación con el anticuerpo secundario.

La elección de anticuerpo secundario depende de la especie animal a la que corresponda el anticuerpo primario (especie en la cual se generó, especie huésped). Por ejemplo, si el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal de ratón, el anticuerpo secundario deberá ser un anticuerpo anti-ratón, obtenido de un huésped que no sea un ratón. La especie huésped del anticuerpo secundario, por lo general, no afectará el experimento. En este caso se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo (anti-rabbit) dado que el anticuerpo primario era un anticuerpo de conejo.

La elección de anticuerpo secundario también depende del tipo de marcado que se desea. Diferentes marcadores pueden ser conjugados con anticuerpos. En el pasado era muy común el uso de radioisótopos, pero son muy caros, tienen una vida media muy corta y requieren de un manejo especial. Alternativamente están las etiquetas o marcados con biotina, fluoróforos y enzimas. El uso de los fluoróforos requiere menos pasos; sin embargo, se necesita de un equipo especial para detectar la fluorescencia. Además, se debe tomar una fotografía si se necesita un registro permanente de los resultados. Los marcados enzimáticos son los que se utilizan más comúnmente y, aunque requieren pasos extras, pueden ser también extremadamente sensibles [207].

La fosfatasa alcalina (AP, del inglés *alkaline phosphatase*) y peroxidasa de rábano (HRP) son dos enzimas que se utilizan extensivamente como marcadores para la detección proteica. Un arreglo de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes está disponible para su uso con cualquiera de estas enzimas.

En la Tabla 2 se observa una comparación de las características de las dos enzimas:

**Tabla 2** - Comparación de las características de las enzimas HRP y AP. (Extraído de Western Blotting, Handbook and Troubleshooting Guide).

	<b>Horseradish Peroxidase</b>	<b>Alkaline Phosphatase</b>
<b>Size</b>	40 kDa	140 kDa
<b>Price</b>	Relatively Inexpensive	Relatively Expensive
<b>Stability (Storage)</b>	Stable at < 0°C	Unstable at < 0°C
<b>Number of Substrates</b>	Many	Few
<b>Kinetics</b>	Rapid	Slower
<b>pH optimum</b>	5-7	8-10

En este caso en particular la enzima que se conjugó al anticuerpo secundario, para la detección del anticuerpo primario unido a la proteína de interés (proBDNF), fue la HRP.

La peroxidasa de rábano es una proteína de 40.000 Dalton que cataliza la oxidación de sustratos mediante peróxido de hidrógeno, resultando en un producto coloreado o fluorescente, o en la liberación de luz como un byproducto. La HRP funciona óptimamente a un pH cercano al neutro y puede ser inhibida mediante cianuros, sulfuros y azidas. Los conjugados anticuerpo-HRP son superiores a los conjugados anticuerpo-AP (como se observa en la Tabla 2) con respecto a las actividades específicas de tanto la enzima como el anticuerpo. Además, su alta tasa de cambio, buena estabilidad, bajo costo y amplia disponibilidad de sustratos hacen que HRP sea la enzima de elección para la mayoría de las aplicaciones [207].

En este caso, la dilución del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (ab6721, de Abcam, Cambridge) que se utilizó fue de 1/3000 por lo que se utilizaron 2999 $\mu$ L de solución de bloqueo (solución TBS-Tween y 5% de leche descremada) y 1 $\mu$ L del anticuerpo secundario. Para la incubación de las membranas (control negativo y la que contiene la proteína de interés) con el anticuerpo secundario se repitió el proceso previamente mencionado para el anticuerpo primario, en el que se colocaron las membranas en un parafilm extendido y fijado sobre una superficie plana, y se embebieron las membranas con la dilución del anticuerpo secundario, preparada momentos antes de su uso. El período de incubación con este anticuerpo fue de una hora, a temperatura ambiente.

Finalizado esto se procedió al lavado de las membranas, a fin de retirar el exceso de anticuerpo secundario. Se realizaron 6 lavados sucesivos, de 10 minutos cada uno, con TBS-Tween 1x.

El siguiente paso es el revelado de la membrana, en este caso en particular se utilizó un sistema ECL (del inglés *Enhance Chemiluminescence*). El sistema de western blot ECL (Figura 21) es el sistema de inmunodetección quimioluminiscente más utilizado en el mundo. Este sistema ECL utiliza anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP para una detección muy precisa de proteínas de los western blots, basada en el luminol [209].

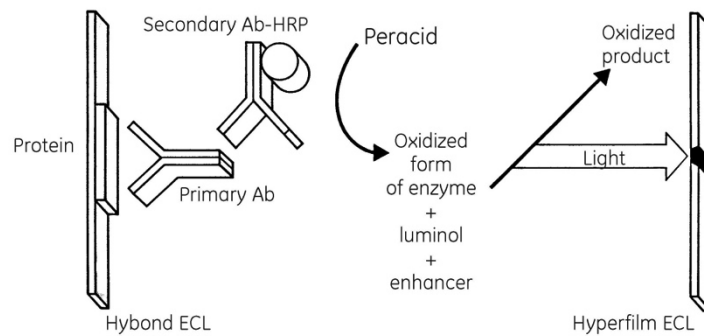
Se puede definir luminiscencia como la emisión de luz resultante de la disipación de energía proveniente de una sustancia en estado excitado. En la quimioluminiscencia la excitación es efectuada por una reacción química. Las reacciones químicas de Cydic Diacylhydrazides, como el luminol, han sido muy utilizadas en análisis químicos y uno de los sistemas más comprendidos es el de la oxidación del luminol catalizada por HRP/peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas. Inmediatamente luego de la oxidación, el luminol está en un estado excitado que luego decae al estado basal por medio de una vía que emite luz [209]. Ya que la oxidación del luminol es catalizada por HRP, y el HRP es conjugado con la proteína de interés en la membrana, la cantidad y localización de la luz de la que HRP cataliza la emisión, se relaciona directamente con la localización y la cantidad de proteína en la membrana [210].

Dado que en muchos ensayos luminiscentes, la luz emitida es de baja intensidad y de corta duración se utiliza una versión mejorada de la reacción quimioluminiscente [210]. Esta quimioluminiscencia mejorada se alcanza realizando la oxidación del luminol por acción de HRP, en la presencia de potenciadores químicos como fenoles modificados. Estos logran incrementar la intensidad de la luz emitida aproximadamente 1000 veces, y además alteran la cinética de la reacción de forma tal que la emisión lumínica se extiende el tiempo y aumenta



su intensidad. Esto permite la detección de una proteína en un nivel de 1 a 10pg. La luz producida por esta reacción quimioluminiscente mejorada llega a su pico luego de 5 a 20 minutos y decae poco tiempo después, con una vida media de aproximadamente 60 minutos. La máxima emisión de luz, que ocurre cuando el agente luminol potenciado se degrada, ocurre a una longitud de onda de 428nm, la cual puede ser detectada por una corta exposición a un film auto-radiográfico sensible a la luz azul [209].

A continuación se muestra un esquema de la reacción que ocurre en el sistema ECL de western blot:

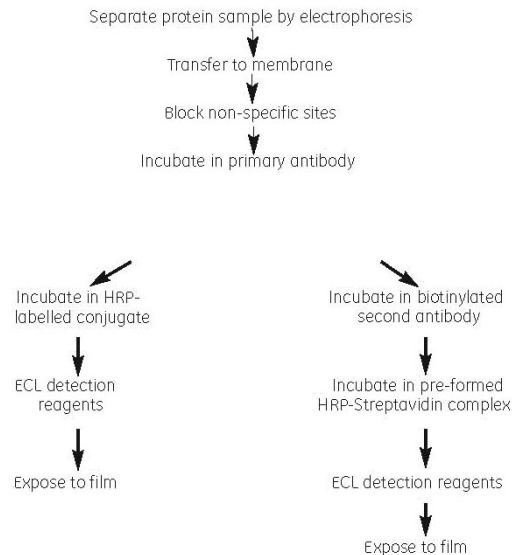


**Figura 21** - Principios del sistema ECL de western blot. (Extraído de Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system).

En este caso, el sustrato quimioluminiscente utilizado fue el ECL de *Viva Science* y se incubó a las membranas con el mismo durante 1 minuto. Esta operación se realizó en un cuarto oscuro.

Para revelar se colocó la membrana dentro de un protector plástico en un cassette de revelado (Amersham Hypercassette) junto con una placa fotográfica (Kodak), y se variaron los tiempos de exposición para obtener una buena relación señal/background. Por último se reveló la placa utilizando una máquina de revelado automático (Amersham Hyperprocessor).

En la siguiente figura (Figura 22) se esquematizan los pasos de un western blot ECL:



**Figura 22** - Esquema de los pasos a seguir en un ensayo Western Blot ECL. (Extraído de Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system).

### 3.12 - Dot Blot

El Dot Blot es un ensayo rápido y simple que puede ser utilizado para la detección, análisis e identificación de proteínas así como también para determinar la eficacia de los anticuerpos utilizados y del sistema de detección. Es similar al western blot pero difiere en que las muestras proteicas no son separadas electroforéticamente sino que son “manchadas” en templados circulares directamente en la membrana o en el papel sustrato.

Esta técnica es utilizada dado que ofrece importantes ahorros en tiempo. Sin embargo, no ofrece información sobre el tamaño de la biomolécula blanco. Además, si dos moléculas de diferentes tamaños son detectadas, se seguirá viendo como un solo punto. Por lo tanto el dot blot sólo puede confirmar la presencia o ausencia de una biomolécula o biomoléculas que pueden ser detectadas por las sondas de ADN o, en este caso, por el anticuerpo específico.

Este método también es utilizado para estimar semi-cuantitativamente la concentración de proteínas en un preparado crudo si se tiene la proteína purificada y un anticuerpo específico para la misma. En este caso en particular el método se utilizó para determinar la concentración inicial adecuada del anticuerpo primario para la detección de la proteína de interés en el western blot. Se utilizaron los mismos anticuerpos (primario y secundario) que en el western blot.

El procedimiento utilizado, tomado de Abcam, fue el siguiente:

En la membrana de PVDF (Hybond™-P) se dibujaron 3 círculos con lápiz para indicar la región en la que se sembrarían las muestras. Se colocó a la misma en metanol 100% durante un minuto, a fin de activarla, se lavó con agua destilada y se dejó secar. Se sembraron 2µL de las muestras deseadas en la membrana, en el centro de los círculos previamente marcados. Las muestras se aplicaron lentamente, cuidando de minimizar el área de penetración de la solución.

Para poder comprobar la efectividad de dos diluciones del anticuerpo primario, en este caso se sembró dos veces una muestra del pico de elución de la cromatografía de afinidad que se analizó por MALDI-TOF, ya que se sabe que esta muestra contenía proBDNF. Como control negativo se utilizó otra proteína, PHRN DL4 (0.31mg/mL).

Luego se dejó secar la membrana. Se bloquearon los sitios no específicos embebiendo la membrana en una solución de TBS-Tween con 3% de BSA durante 1 hora, a temperatura ambiente. La incubación se lleva a cabo en una placa de Petri.

Posteriormente se incubó con diluciones 1/200 (5µg/mL) y 1/500 (2µg/mL) del anticuerpo primario anti-BDNF policlonal de conejo (ab6201, de Abcam) disuelto en la solución de BSA/TBS-Tween (0.1% BSA en TBS-Tween) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se hicieron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1/3000 del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (ab6721, de Abcam, Cambridge, UK).

Se realizaron tres lavados de 15 minutos con TBS-Tween y luego un último lavado de 5 minutos con TBS.

Se incubó con el sustrato quimioluminiscente (ECL, *Viva Science*) mencionado en la técnica western blot, por un minuto. Se retiró el exceso de solución de la superficie y se expuso al film de rayos X en el cuarto oscuro. Se probó con diferentes tiempos de exposición hasta que se encontró la impresión más adecuada.

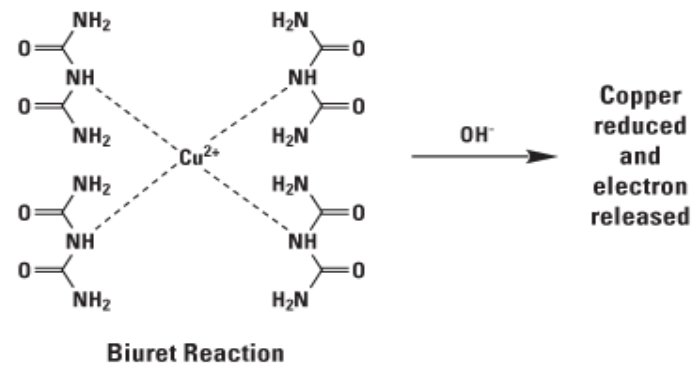
### **3.13 - Cuantificación de proteínas**

La concentración final de la proteína de interés se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Este es un método espectrofotométrico indirecto, inicialmente descrito por Smith y colaboradores en 1985, que desde entonces se ha convertido en el método más popular para detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales [211]. Una de sus ventajas, es que, a diferencia de otros métodos disponibles en esa época (Ensayos de Bradford y Lowry), el ensayo proteico BCA es compatible con muestras que contienen hasta 5% de detergentes.

Este ensayo proteico combina la reacción de Biuret, inducida por proteínas, con la detección colorimétrica del catión cuproso resultante ( $\text{Cu}^+$ ) por el BCA.

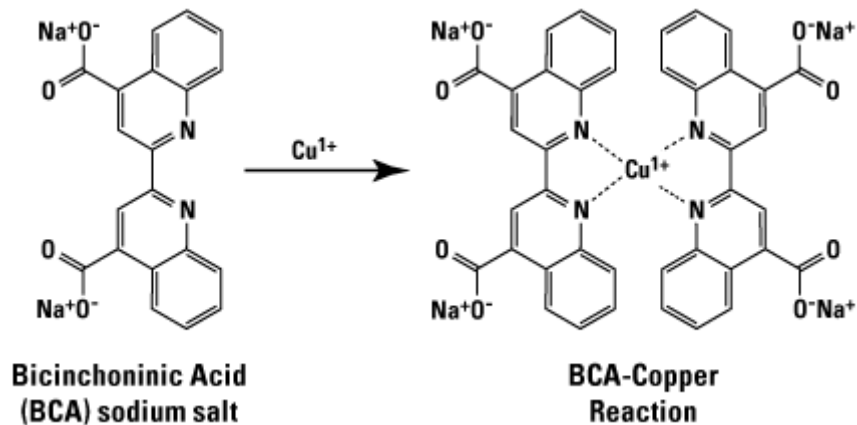
La reacción de Biuret (Figura 23) se basa en la formación de un complejo quelado coloreado entre compuestos que contienen tres o más aminoácidos con iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ), en un ambiente alcalino que contiene tartrato de potasio de sodio. Se conoce con el nombre de reacción de Biuret porque el complejo formado entre las proteínas y el cobre es químicamente similar a un complejo tetradentado, de color azul claro, que se forma con el compuesto orgánico Biuret ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ) y el ion cúprico. De esta forma la similitud entre la estructura del compuesto Biuret y los polipéptidos es lo que permite que éstos últimos formen un complejo coordinado coloreado con el ion cúprico, al igual que ocurre con el compuesto original y el ion mencionado. El complejo de color azul-violáceo absorbe luz a una longitud de

onda de 540nm y tiene una intensidad de color que es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos que participan en la reacción, por lo que se utiliza como base para la determinación cuantitativa de la concentración proteica.



**Figura 23 - Reacción de Biuret.** (Extraído de Protein Assay Handbook).

Luego de la reacción de Biuret ocurre la quelación del BCA con el ion cuproso (Figura 24), la cual resulta en un color púrpura intenso. El producto púrpura que resulta de la reacción se forma a partir de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo BCA/cobre es soluble en agua y presenta una absorbancia lineal muy fuerte a 562nm, con incremento de la concentración proteica. El color púrpura puede ser medido a cualquier longitud de onda entre 550nm y 570nm con mínima pérdida de señal. El agente BCA es aproximadamente 100 veces más sensible que el agente Biuret [212, 213].



**Figura 24 - Reacción de BCA con ion cuproso.** Las dos moléculas de BCA se unen a cada molécula de cobre que fue reducida por una reacción de Biuret mediada por péptidos. (Extraído de Protein Assay Handbook).

La reacción que lleva a la formación de color por BCA, como resultado de la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$ , es particularmente influenciada por la presencia de tres aminoácidos en las proteínas: Cisteína/cistina, tirosina y triptófano. Aparentemente estos aminoácidos estimulan la reducción del cobre independientemente de la reacción de Biuret, causando así la formación de un quelado  $\text{BCA-Cu}^+$  coloreado. En otras palabras, la cadena del péptido (y así la cantidad de

proteína total) es el principal contribuidor a la reducción del cobre en la reacción de Biuret y desarrollo de color en el ensayo con BCA.

La tasa de formación de color del BCA es dependiente de la temperatura de incubación. Consecuentemente, la clave para obtener resultados precisos con el método de BCA es ensayar estándares de muestras desconocidas simultáneamente para que ambos reciban idéntico tiempo de incubación y temperatura. Asumiendo que el ensayo se lleva a cabo de esta forma, las características del mismo le permiten a uno agilizar el desarrollo o esperar más tiempo por el desarrollo de color deseado [212, 213].

Una de las ventajas que posee este método de cuantificación de proteínas, en comparación a otros (como el de Lowry), es que presenta escasas interferencias con compuestos presentes en el buffer o que se encuentren en las muestras como son un rango de detergentes y agentes desnaturalizantes como urea y cloruro de guanidinio [202].

Para proceder con este método se preparó una mezcla de soluciones de ácido bicinconínico y sulfato cúprico (50:1). Se utilizaron una serie de diluciones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida (31,25µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL y 2000µg/mL) para realizar una curva de calibración que permitió estimar la concentración de las muestras problema. Todo se realizó por duplicado y se normalizó respecto al blanco (buffer utilizado para obtener los extractos). Se sembraron 10µL de todas las muestras a cuantificar en una placa de 96 pocillos, se agregaron 200µL del reactivo a cada muestra, luego se incubó 30 minutos a 37°C y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro que permite leer placas, a una longitud de onda de 570nm.

## 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 - Diseño del plásmido

Para diseñar el plásmido se buscó en bases de datos informáticas (GenBank) la secuencia del gen que codifica para el proBDNF humano; la escogida fue la correspondiente al código NM\_001143805.1 (NCBI reference sequence) del GenBank, y se encuentra en la forma de cDNA, siendo la siguiente:

```
ATGACCATCCTTTTCTTACTATGGTTATTTTCACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCATGAAAGAAG
CAAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGT
GAATGGGCCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTGAAACACGTGATAGAAG
AGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAAAACAATAAGGACGCAGACTTGTACAC
GTCCAGGGTGTGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTCTTCTTTCTGCTGGAGGAATACAA
AAATTACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTCCGGCGCCACTCTGACCCTGCCCGCCGAGGGG
AGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCGGCAGACAAAAAGACTGCAGTGGACAT
GTCGGGCGGGACGGTCACAGTCTTGAAAAGGTCCCTGTATCAAAAGGCCAACTGAAGCAATACTTCT
ACGAGACCAAGTGCAATCCCATGGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCATTG
GAACTCCCAGTGCCGAACTACCCAGTCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTG
GCTGGCGATTATAAGGATAGACACTTCTTGTGTATGTACATTGACCATTAAAAGGGGAAGATAG
```

Dicha secuencia fue enviada a la empresa GenScript para que la insertara en el vector correspondiente. En este caso, el que se decidió utilizar fue el vector plasmídico pET-22b(+), de la empresa Novagen.

Una de las razones por las que se escogió este vector es debido a que su secuencia codifica para un His Tag (cola de histidina), el cual puede ser de gran utilidad para la purificación de la neurotrofina de interés. Esta cola de histidinas se expresará en el extremo C-terminal del proBDNF, lo cual permitirá que este sea purificado mediante cromatografía de afinidad, y luego clivado cuando se desee; pero para que esto último ocurra, y la proteína pueda separarse fácilmente del His Tag, es necesario que entre el inserto y la secuencia de la cola de histidinas haya algún sitio para el clivaje con proteasas, como puede ser el sitio de corte para la enzima TEV. Esta es una proteasa de cisteína sitio específica que se encuentra en el Tobacco Etch Virus (TEV) y que se emplea principalmente para la remoción de péptidos fusionados a las proteínas que se expresan de forma recombinante (o “tags” de afinidad) de proteínas purificadas, gracias a que presenta una elevada especificidad y alta tasa de actividad. Dado que el vector pET-22b(+) no contiene en su secuencia un sitio TEV fue necesario añadir uno. Como el sitio mencionado es uno de reconocimiento específico para dicha enzima, sólo admite ciertas secuencias características. En este caso, se utilizó la siguiente secuencia de reconocimiento de TEV: Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser (ENLYFQS). Este es el sitio de reconocimiento óptimo para esta enzima y el clivaje ocurre entre los residuos Gln y Ser [214].

Teniendo esto en cuenta, el lugar donde se decidió colocar el inserto fue entre los sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI (CATATG, posición 288) y Sall (GTCGAC, posición

179). Inmediatamente luego del sitio de Sall se colocó la secuencia de corte para TEV (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser) y luego el His Tag (de posición 140 a 157). La figura 25 muestra el mapa de restricción del vector plasmídico pET-22b(+), con los sitios entre los que se ubicó al inserto que codifica para la proteína de interés marcados en rojo.

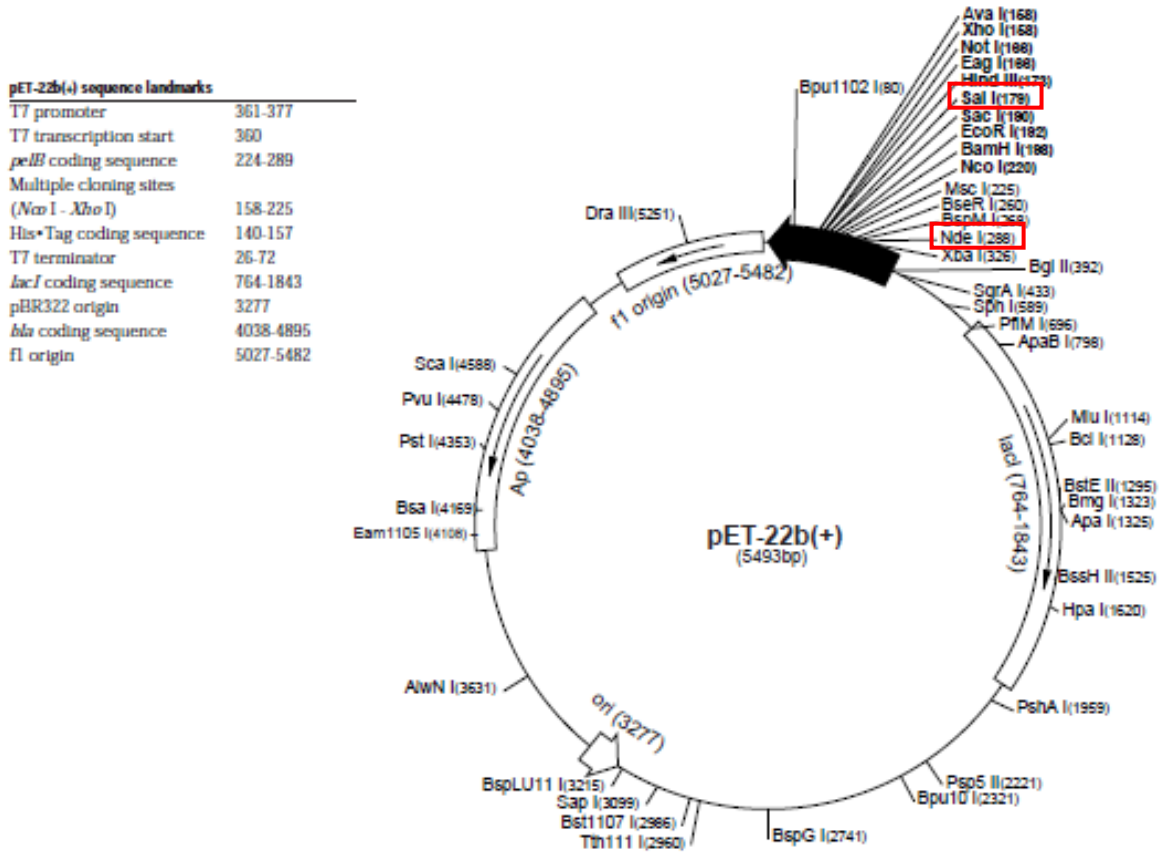


Figura 25 - Mapa del vector plasmídico pET-22b. Marcado en rojo se encuentra delimitado el sitio donde se insertó el gen que codifica para el proBDNF. (Extraído de Novagen).

#### 4.2 - Optimización de codones

Además de ubicar el inserto en el sitio de interés y agregarle un sitio TEV al mismo, de forma que la proteína se exprese con una cola de histidina y una secuencia de reconocimiento de proteasas en el extremo C-terminal, se realizó la optimización de codones para facilitar la expresión en *E. Coli*.

Se empleó un algoritmo llamado OptimumGene™ el cual considera la mayor cantidad posible de factores que regulan e influyen en los niveles de expresión génica y, en base a esto, logra producir el único gen capaz de alcanzar el máximo nivel de expresión posible. En este caso, el gen nativo utiliza codones raros en tándem que pueden reducir la eficiencia de la traducción o hasta comprometer la maquinaria traduccional; por lo que GenScript, con el uso del algoritmo mencionado, logró aumentar el uso de codones sesgados (del inglés *Codon Usage Bias*) en *E. Coli* mediante la mejora de ciertos parámetros, como el CAI. Esta medida es conocida como

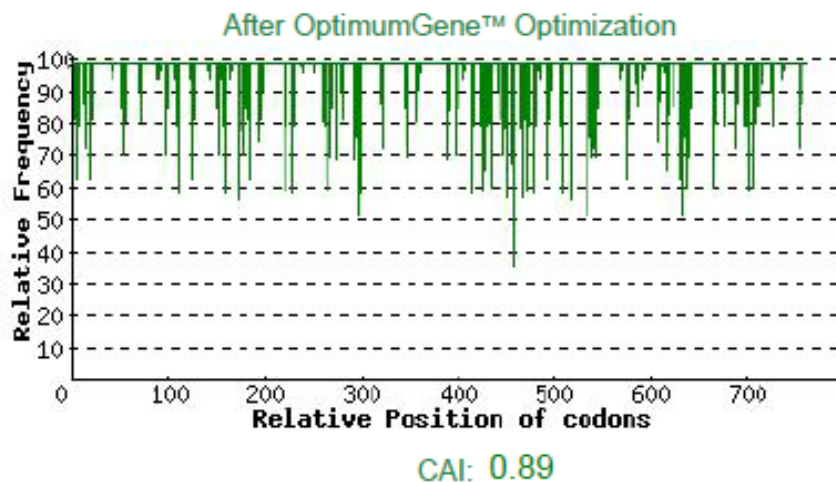
“Índice de adaptación de codones” (CAI, del inglés *Codon Adaptation Index*) y se define como la media geométrica de los valores de adaptabilidad relativa de codones individuales. La adaptabilidad relativa de un codón es la relación entre la frecuencia observada de ese codón y la frecuencia del codón más abundante para el mismo aminoácido. El codón más abundante se calcula para un set, tomado como referencia, de genes altamente expresados, como pueden ser los genes que codifican para las proteínas ribosomales, por ejemplo [215]. El CAI se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$CAI = \exp \left( \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \log(w_i(l)) \right)$$

Para cada aminoácido, la adaptabilidad relativa (importancia) de cada uno de sus codones, en CAI, es computado como la relación entre la frecuencia observada del codón  $f_i$  y la frecuencia del codón sinónimo  $f_j$  para ese aminoácido [216].

$$w_i = \frac{f_i}{\max(f_j)} \quad i, j \in [\text{synonymous codons for amino acid}]$$

El valor del CAI varía entre 0 y 1. Un CAI de 1,0 se considera un valor perfecto en el organismo de expresión deseado (*E. Coli* en este caso), mientras que un CAI mayor que 0,8 se considera bueno, en cuanto a niveles de expresión génica elevados. Para este caso en particular, la empresa GenScript logró mejorar el valor del CAI, obteniendo uno de 0,89. Esto se ve ilustrado en la figura 26, donde se muestra gráficamente la mejora del CAI luego de la optimización con el algoritmo OptimumGene™:

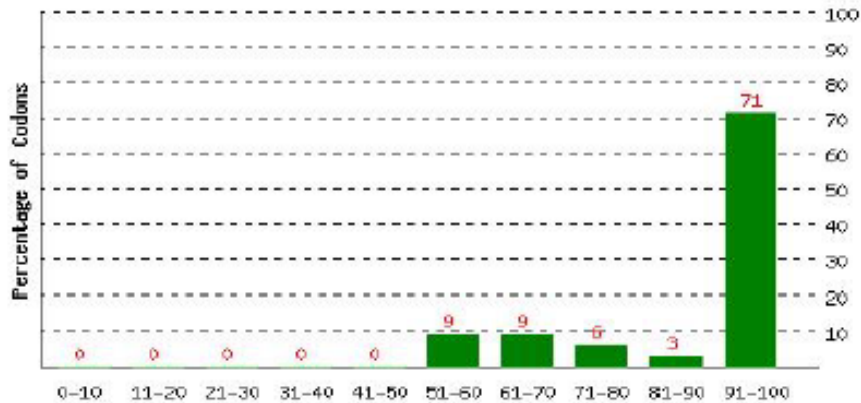


**Figura 26** - Distribución de la frecuencia de uso de codones a lo largo de la secuencia génica de interés. (Resultado aportado por GenScript).

En la siguiente figura también se pueden observar los resultados de la optimización, en función de la frecuencia de codones óptimos utilizados.



### After OptimumGene™ Optimization

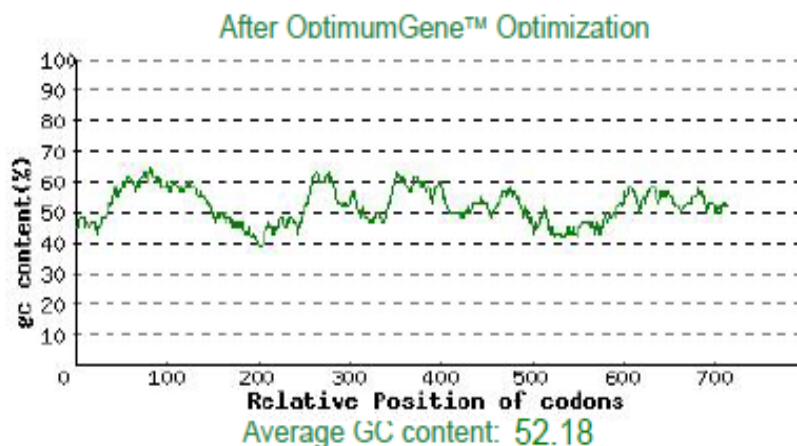


**Figura 27** - Gráfica que muestra el porcentaje de distribución de los codones en grupos de codones de calidad computada. (Resultado aportado por GenScript).

El gráfico observado evidencia la función del algoritmo al haber una elevada frecuencia en el uso de codones óptimos para *E. Coli* (se usan en un 71% de los codones más abundantes para el organismo de expresión).

El mismo algoritmo, con el fin de mejorar la expresión en *E. Coli*, también se utilizó para ajustar el contenido de GC (guanina-citosina) del gen de interés y para optimizar los picos desfavorables, con el fin de prolongar la vida media de los ARNm. Esto es de suma importancia, ya que el contenido de GC determina la estabilidad del ADN de interés (y posterior ARN) al ser estas las bases nitrogenadas que contienen 3 enlaces de hidrógeno entre ellas (el par AT está unido por dos enlaces de hidrógeno).

En la figura 28 se esquematiza el ajuste del contenido de GC para el gen de interés, luego de la optimización. El rango ideal para el porcentaje de contenido de GC se encuentra entre 30 y 70%.



**Figura 28** - Gráfica de porcentaje de contenido en GC en función de la posición relativa de codones, luego de la optimización. (Resultado aportado por GenScript).

En este caso los picos desfavorables fueron removidos. El contenido GC promedio final, luego de la aplicación del algoritmo OptimumGene™, fue de 52,18%, lo cual se encuentra dentro del rango ideal.

Además, para facilitar la traducción, se destruyeron las estructuras en forma de horquillas (estructuras “Stem-Loop”) que impactan la unión ribosomal y estabilidad del ARNm; a su vez se analizaron y modificaron los sitios cis- negativos.

Finalmente, la secuencia obtenida luego de la optimización, con una longitud de 771pb y un contenido en GC de 52,18%, fue la siguiente:

CAT

```
ATGACGATCCTGTTCCCTGACGATGGTGATTAGCTATTTTGGTTGCATGAAAGCAGCCCCGATGAAAGAAGCCAAC
ATTTCGCGGCCAGGGTGGTCTGGCATATCCGGGTGTCCGTACCCATGGTACGCTGGAAAGCGTGAACGGTCCGAAA
GCAGGTTACGTTGGTCTGACCTCGCTGGCAGATACGTTTGAACACGTTATTGAAGAACTGCTGGATGAAGACCAG
AAAGTCCGTCCGAATGAAGAAAACAATAAAGATGCCGACCTGTACACCTCTCGCGTTATGCTGAGCTCTCAAGTC
CCGCTGGAAACCGCCGCTGCTGTTCCCTGCTGGAAGAATATAAAAACTACCTGGATGCGGCCAATATGAGCATGCGT
GTGCGTGCACCATTCTGATCCGGCACGTGCGGGTGAACGTGTCAGTGTGCGACAGTATCTCCGAATGGGTTACCGCA
GCTGATAAGAAAACCGCTGTTGACATGTCAGGCGGTACCGTGACGGTCTGGAAAAAGTCCCGGTGTCGAAAGGC
CAGCTGAAAACAATACTTCTACGAAACCAAATGCAACCCGATGGGTTATACGAAAGAAGGCTGTCGTGGTATTGAT
AAACGCCACTGGAATAGTCAGTGTGTCGACACGCAATCCTACGTGCGCGCTGACCATGGATTCCAAAAACGC
ATCGGCTGGCGTTTCATTCGCATCGACACCTCCTGTGTGTGTACCCTGACCATCAAACGCGGTGCTGAAAACCTG
TATTTCCAGAGC
```

GTCGAC

En color celeste se encuentran señaladas las secuencias que flanquean el inserto, correspondientes a los sitios de corte de las enzimas de restricción NdeI (CAT) y Sall (GTCGAC).

La secuencia proteica que corresponde a la traducción de la secuencia optimizada fue la siguiente:

```
MTILFLTMVISYFGCMKAAPMKEANIRGQGLAYPGVTRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLA
DTFEHVIEELLEDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDA
NMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQY
FYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCT
LTIKRGFENLYFQS
```

Esta secuencia corresponde a la proteína de interés (proBDNF) con el sitio de reconocimiento para TEV (marcado en rojo) en uno de los extremos.

Se verificó la correspondencia de la secuencia proteica optimizada con la del proBDNF sometiendo a la primera a una comparación con las secuencias proteicas presentes en bases de datos informáticas (GenBank), realizando una búsqueda BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) proteica o BLASTP. Como era de esperarse, se obtuvo un 97% de

concordancia con el BDNF humano, por lo que se pudo proceder con la expresión de dicha proteína.

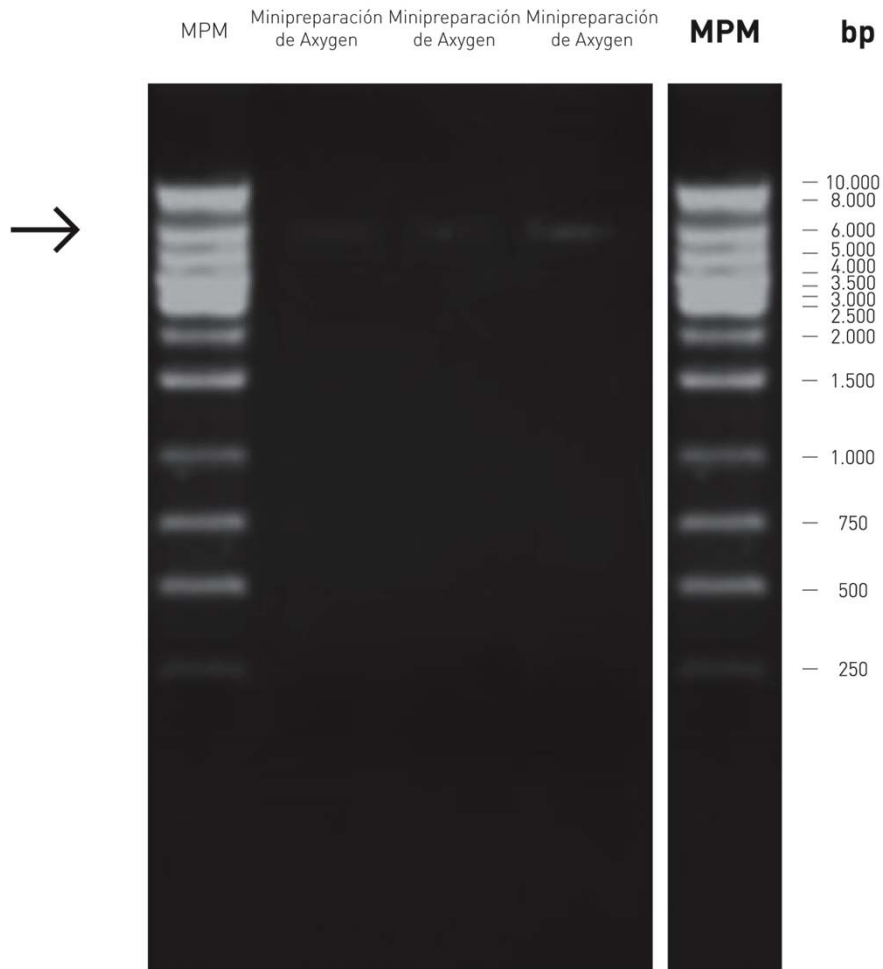
### **4.3 - Secuenciación del plásmido**

Una vez obtenido el plásmido con el inserto de interés, optimizado para la expresión en *E. Coli*, fue necesario verificar la presencia del gen que codifica para proBDNF en dicho vector. Para esto se debió obtener la secuencia del mismo para compararla, utilizando herramientas informáticas, con las secuencias obtenidas a partir del análisis realizado por la empresa GenScript.

Para dicho fin hubo que transformar bacterias competentes con el plásmido de interés. En este caso se transformaron bacterias *E.Coli* quimiocompetentes, de la cepa BL21, utilizando la técnica de shock térmico tal como fue descrita en la sección *Materiales y Métodos*. Dado que el plásmido utilizado, pET-22b(+), contiene un gen que le confiere resistencia al antibiótico Ampicilina fue esta la cualidad que se utilizó como marcador de selección. De esta forma, permitió diferenciar a aquellas bacterias que incorporaron el plásmido de las que no debido a que las últimas, al no tener la resistencia al antibiótico mencionado, fueron incapaces de sobrevivir y formar colonias en el medio en el que fueron plaqueadas (LB-Ampi-Agar).

Una vez obtenidas las colonias de *E.Coli* BL21 que incorporaron el plásmido con el inserto de interés se sometió a las mismas a una minipreparación alcalina para poder extraer el ADN plasmídico y purificarlo, para su análisis posterior. En este caso se “picaron” algunas de las colonias de clones transformantes y se sometieron al tratamiento estipulado en el kit de *Axygen AxyPrep Plasmid Miniprep Spin Protocol* para la extracción y purificación del ADN plasmídico de las bacterias. Una vez finalizado dicho proceso, se determinó la pureza del plásmido midiendo la concentración del mismo con el Nanodrop™ (Thermo Scientific spectrophotometer).

Para poder visualizar el ADN plasmídico puro obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el resultado de la minipreparación. Una vez finalizada la electroforesis se escaneó el gel obtenido (Scanner SnapScan 1236, AGFA, Figura 29).

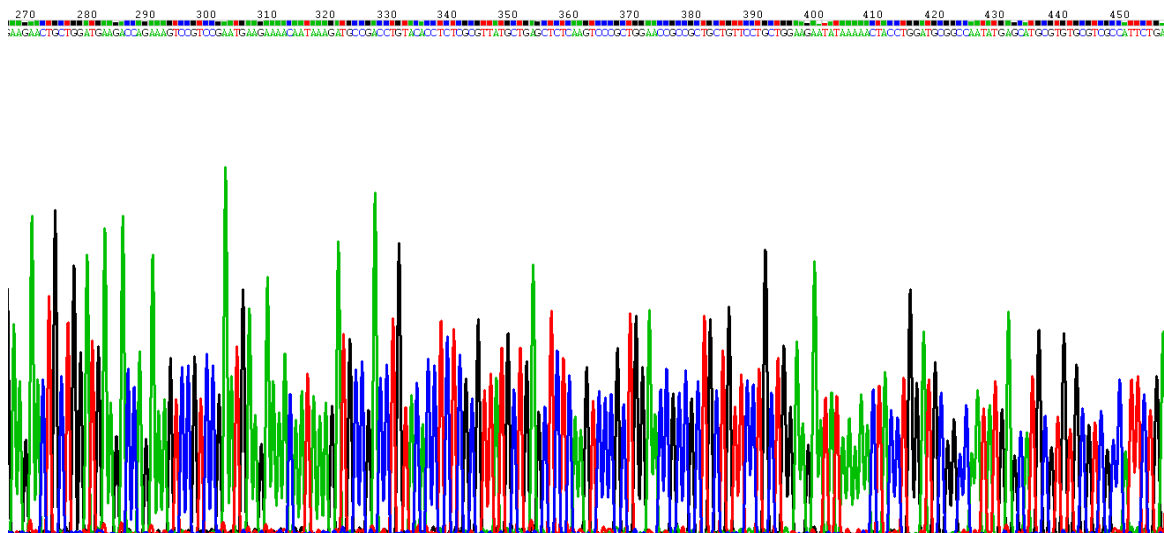


**Figura 29 - Análisis de las muestras obtenidas de la minipreparación de Axygen.** A la izquierda, gel de agarosa en bromuro de etidio revelado bajo luz UV con el respectivo marcador de peso molecular (MPM GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). A la derecha, referencia del marcador de peso molecular utilizado con los valores de pesos moleculares expresados en pares de bases (bp). La flecha indica el peso molecular esperado para el plásmido que contiene el inserto de interés.

En la figura 29 se observa en el primer carril el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA (Thermo Scientific). En los tres carriles siguientes, donde fueron sembradas muestras de lo obtenido a partir del kit miniprep de Axygen, se observa una única banda en cada pocillo, las tres correspondientes a un peso molecular aproximado de 6000pb. Dado que el vector, sin el inserto, tiene 5493pb y el inserto optimizado contiene 771pb, sumadas estas cantidades se llega a un total de 6264pb totales (para el vector plasmídico que contiene el inserto de interés). Este valor es muy cercano a la banda del marcador de peso molecular que corresponde a 6000pb (señalada con una flecha), por lo que se asume que las bandas observadas (a la misma altura en los carriles 2, 3 y 4; y también muy cerca de la banda del marcador de 6000pb) corresponden al plásmido pET-22b(+) conteniendo el gen de interés. Al no observarse otras bandas en ninguno de los carriles sembrados con el resultado de la minipreparación se asume que el ADN mencionado fue purificado correctamente, por lo que se pudo analizar mediante secuenciación.

La secuenciación del ADN plasmídico purificado fue llevada a cabo por el servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo utilizando los oligonucleótidos para T7. Para esto se suplementó a la misma con 3µL del ADN obtenido, con una concentración de 138,8ng/µL (según el Nanodrop™).

Los cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación fueron analizados utilizando los programas Chromas Lite y BioEdit Sequence Alignment Editor (Figura 30).



**Figura 30 - Análisis informático de las secuencias obtenidas.** Cromatograma obtenido a partir del análisis de una de las secuencias obtenidas, correspondiente al gen de proBDNF. Se utilizó el programa Chromas Lite.

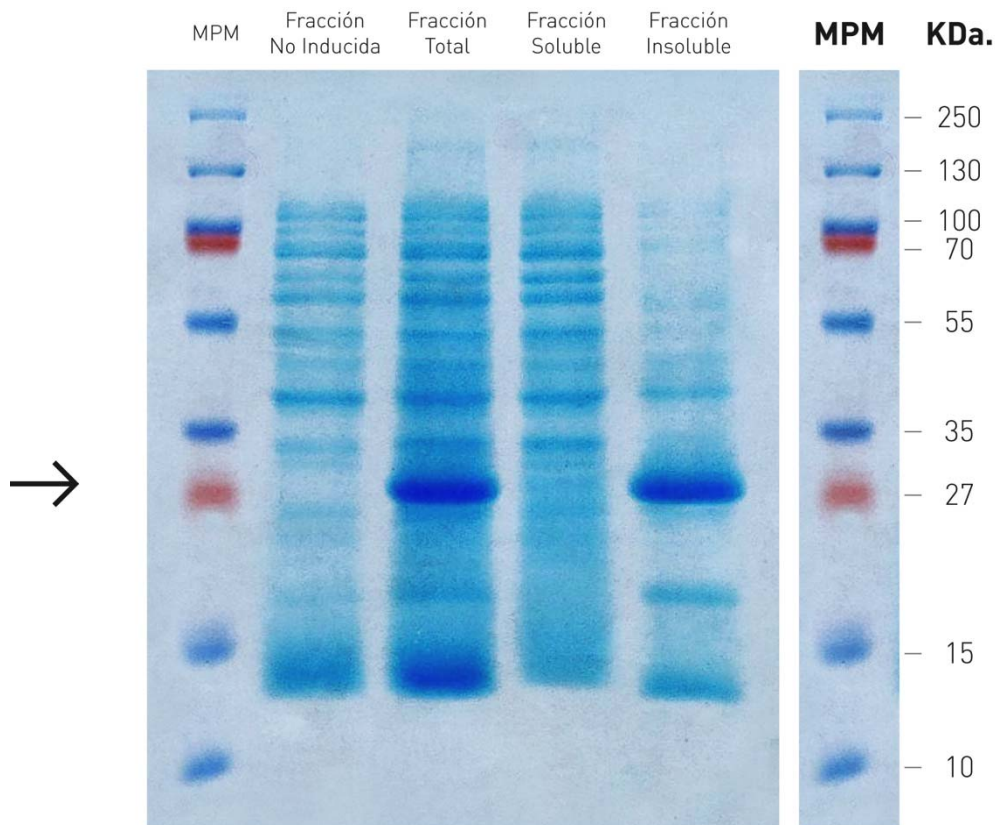
Se alineó la secuencia obtenida con la optimizada por la empresa GenScript, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Se obtuvo un alineamiento prácticamente perfecto y se comprobó que no existían mutaciones apreciables que pudieran afectar la expresión de la proteína.

Además se las analizó con el programa Chromas Lite para determinar la presencia de la secuencia correspondiente a la cola de histidinas en el extremo C-terminal; y luego se realizó una búsqueda BLAST de nucleótidos, para verificar que dicha secuencia era, de hecho, la que codificaba para la proteína de interés. Ambos hechos fueron verificados mediante el análisis realizado, lo cual permitió continuar con la expresión del proBDNF a partir del plásmido obtenido.

#### **4.4 - Producción de proBDNF recombinante**

La expresión de proBDNF se llevó a cabo en bacterias *E. Coli* quimiocompetentes de la cepa BL21, y luego se realizó un fraccionamiento, para obtener las fracciones solubles y no solubles. Posteriormente se analizaron dichas fracciones por electroforesis SDS PAGE para determinar en cuál de ellas se encontraba la proteína de interés.

A partir del escaneado del gel de SDS PAGE resultante se obtuvo la siguiente figura:



**Figura 31 - Análisis de las fracciones soluble e insoluble.** Fotografía del gel de electroforesis SDS PAGE para el análisis de las fracciones sin inducir, total, soluble e insoluble, respectivamente; y el respectivo marcador de peso molecular (Prestain ladder plus #SM 1811, Fermentas) con la referencia de pesos moleculares expresados en kDa (derecha). La flecha indica el Peso Molecular esperado para el proBDNF.

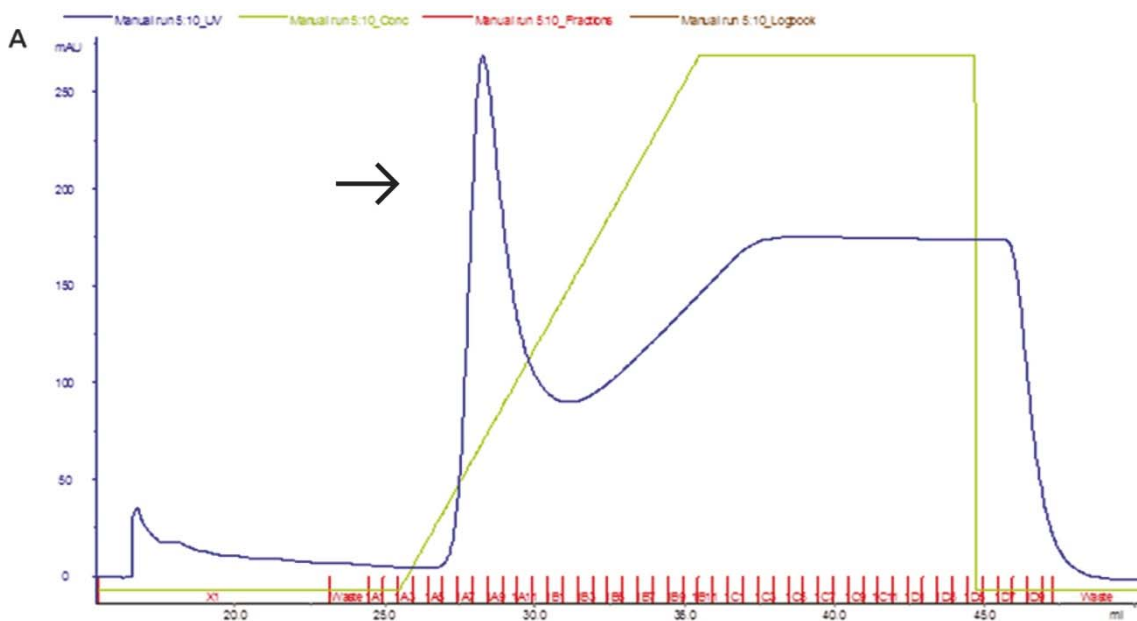
En la figura 31 se observa que en los carriles correspondientes a la fracción sin inducir y a la fracción soluble no se logran apreciar bandas muy prominentes; mientras que para los carriles correspondientes a la fracción inducida y a la fracción insoluble sí. En estos casos se observa una banda de una intensidad significativamente mayor a las demás, que se encuentra a una altura correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 27kDa (según comparación con marcador de peso molecular), en ambos casos. Dado que el peso de la proteína proBDNF es de aproximadamente 32kDa [13, 139] se verificó, mediante el análisis de este gel, que dicha proteína no se expresa en forma soluble (al no observarse en esa fracción dicha banda ni ninguna de peso molecular aproximado) sino que, al igual que el proNGF, se expresa de forma insoluble, como cuerpos de inclusión. Las demás bandas observadas corresponden a otras proteínas que se encuentran en menor cantidad, como pueden ser algunas proteínas de *E. Coli*.

Estos resultados concordaron con lo esperado, por lo que se pudo proseguir de la misma forma que para el proNGF, utilizando el protocolo previamente puesto a punto para dicha proneurotrofina.

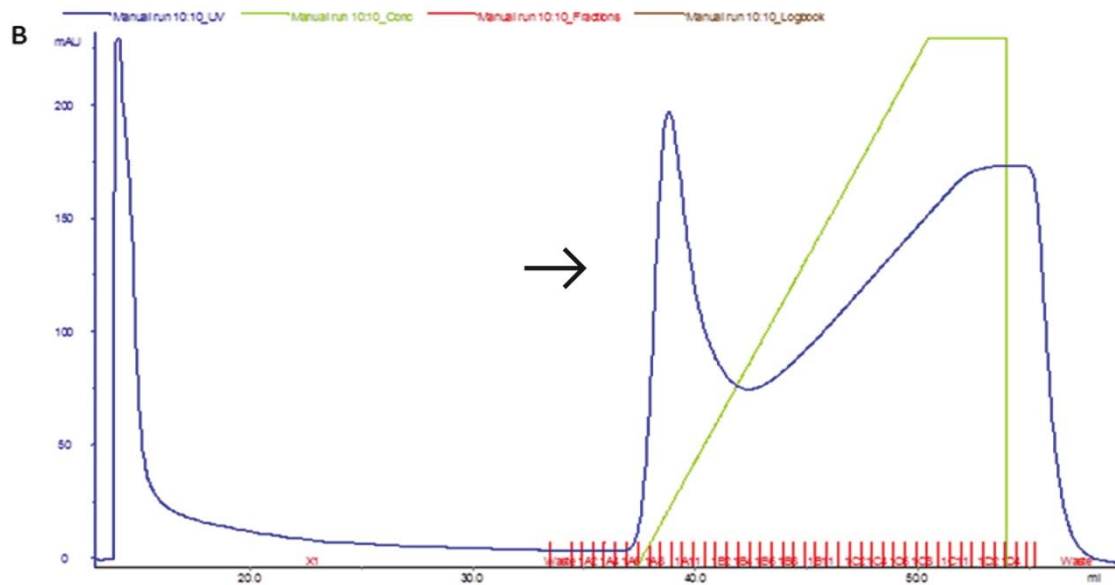
#### 4.5 - Purificación y plegado del proBDNF

Una vez aplicado el protocolo mencionado, habiendo seguido los pasos de desnaturalización y renaturalización necesarios para la obtención de la estructura nativa del proBDNF a partir de los cuerpos de inclusión, se procedió a la purificación de la proneurotrofina de interés mediante cromatografía de afinidad de metales quelantes (IMAC). Para esto se utilizó una columna formada por una matriz con ligandos quelantes inmovilizados y cargados con iones metálicos de transición (Níquel, en este caso) los cuales mantienen centros de unión libres siendo capaces de unirse de manera no covalente a ciertos aminoácidos como histidina. Dado que la proteína de interés contiene una cola de histidinas (His Tag) en su extremo C-terminal esta va a permanecer unida a la columna, facilitando de esta forma su purificación. La elución del proBDNF se realizó mediante la adición de Imidazol a la columna; este compuesto tiene el grupo funcional de la histidina, por lo que competirá con dicho residuo por los puntos de unión metálicos de la matriz, permitiendo así la liberación de la proteína unida. Una vez finalizada la purificación de proBDNF se realizó una diálisis con la muestra de interés para poder retirar los trazos de imidazol.

Se realizaron dos producciones de proBDNF utilizando el mismo protocolo; en la figura 32 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de cada purificación.







**Figura 32 - Análisis de la obtención de proBDNF puro por IMAC.** Cromatogramas de la elución de proBDNF realizada con el sistema cromatográfico ÄKTApurifier, utilizando el software UNICORN™ y una columna HisTrap FF, de 1mL. Las flechas señalan los picos de elución del proBDNF. **Parte A** – Cromatograma de elución de la primera producción de proBDNF. **Parte B** – Cromatograma de elución de la segunda producción de proBDNF.

Las partes A y B de esta figura corresponden a los cromatogramas de elución de la primera y segunda producción de proBDNF, respectivamente. En ambos casos el gráfico azul corresponde a la absorbancia medida a 280nm en función del volumen de elución. Dado que las proteínas en solución absorben luz ultravioleta, presentando un pico de absorbancia a longitudes de onda de entre 280nm y 200nm, se asume que la absorbancia medida en este caso sería debida, principalmente, a la presencia de proteínas en la muestra. En general los enlaces peptídicos son los responsables del pico de absorbancia a una longitud de onda de 200nm mientras que los aminoácidos con anillos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y los puentes disulfuro son las estructuras cuyo máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 280nm, en el espectro UV. Es así que, debido a la presencia de residuos aromáticos y de gran cantidad de puentes disulfuro presentes en la estructura del proBDNF, se espera observar un pico importante, a 280nm, que corresponda a la elución de dicha proteína purificada.

El gráfico verde corresponde al gradiente de concentración del imidazol en función del volumen de elución. En este caso el gradiente de imidazol variaba de una concentración de 20mM (100% buffer de unión) hasta una de 500mM (100% buffer de elución). Debido a la naturaleza de un gradiente, se observa un aumento gradual en la pendiente del mismo hasta que se alcanza la máxima concentración de imidazol posible (500mM y 100% de buffer de elución), lográndose allí la elución completa de las proteínas retenidas en la columna. Las marcas rojas ubicadas en la parte inferior de cada cromatograma corresponden a los números de las fracciones recogidas, teniendo cada una un volumen de 0,5mL. Estas fueron colectadas una vez que comenzó el gradiente de concentración de imidazol, por lo que aquellos picos



medidos a 280nm que se encuentren antes de dicho punto corresponden a aquellas proteínas o solutos no retenidos en la columna y son, por esto, los que eluyen con mayor facilidad, antes del agregado del buffer de elución.

En ambos casos, los picos que se observan a 280nm, señalados por las flechas, corresponden a los picos de elución de las proteínas mayoritarias (principalmente proBDNF); para la primera producción el pico se extendió desde la fracción 1A6 hasta la 1B2 inclusive, mientras que, para la segunda producción, la elución de proBDNF comprendió desde la fracción 1A7 a la 1B3 inclusive. Al comparar los gráficos azules con los verdes se observa que la proneurotrofina va desprendiéndose de la matriz de níquel de la columna debido a la competencia del imidazol, la cual es mayor al aumentar el gradiente (aumento en la pendiente del gráfico verde). Antes de llegar a la máxima concentración del gradiente de imidazol ya eluyó todo el proBDNF por lo que se observa un descenso en los picos de interés en ambos cromatogramas. Para la primera producción de proBDNF (parte A), se observa que la proteína eluyó al 27,9% de buffer de elución, lo que corresponde a una concentración de 139,5mM de imidazol; mientras que, para la segunda producción (parte B) el proBDNF eluyó al 22% de buffer de elución, correspondiendo a una concentración de 110mM de imidazol. El otro pico medido a 280nm, que se observa en ambos cromatogramas una vez que se alcanzó la máxima concentración de imidazol, corresponde a la absorbancia a esta longitud de onda de los anillos aromáticos que presenta dicho compuesto. Esta medida puede interferir con la elución de la proteína de interés.

Una vez finalizada la elución se analizaron las fracciones colectadas correspondientes a los picos de elución de la proteína de interés. Se determinó la concentración proteica para lo recolectado de cada producción utilizando el Nanodrop™. Los valores obtenidos fueron 0,40mg/mL y 0,25mg/mL para la primera y segunda producción de proBDNF, respectivamente.

#### **4.6 - Control de calidad por SDS PAGE y espectrometría de masas**

Para verificar la presencia de proBDNF en las fracciones recolectadas, obtenidas por IMAC, se realizó una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; Figura 33, Parte A) y se procedió a analizar las bandas de interés (de peso molecular cercano al del proBDNF) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Figura 33, Parte B).



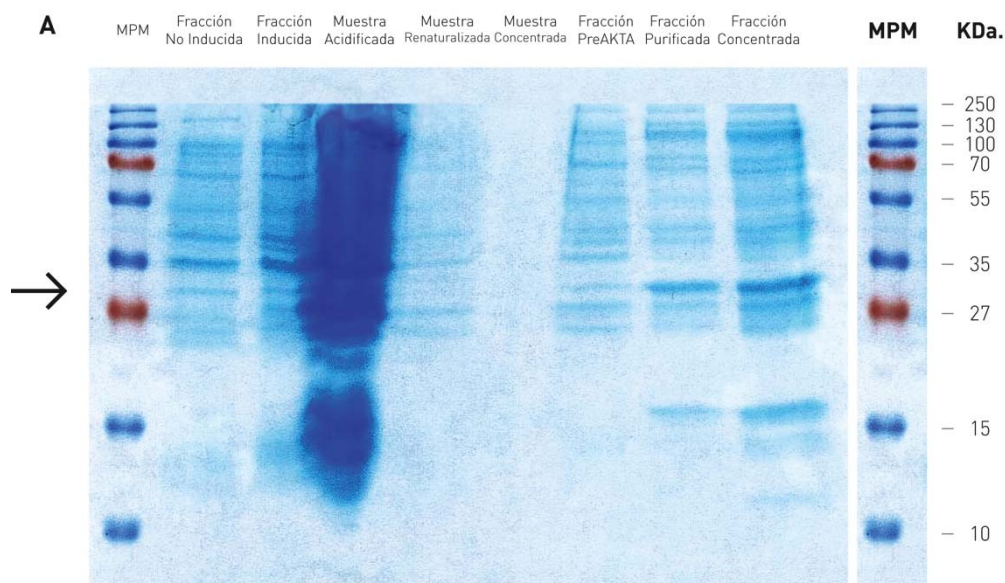
correspondiente al pico de elución de dicha proteína, en la primera producción. En este caso sólo se observaron bandas apreciables en el carril correspondiente a las fracciones del pico de elución. A partir de esto se confirmó la presencia de la proteína purificada en dicha fracción. Dado que se observaron claramente tres bandas correspondientes a diferentes pesos moleculares se decidió escindirlas para analizarlas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y determinar, de esta forma, cuál sería la correspondiente la proteína de interés. Las bandas a analizar correspondían a pesos moleculares de 100kDa, 28kDa y 17kDa, según comparación con el marcador de peso molecular utilizado.

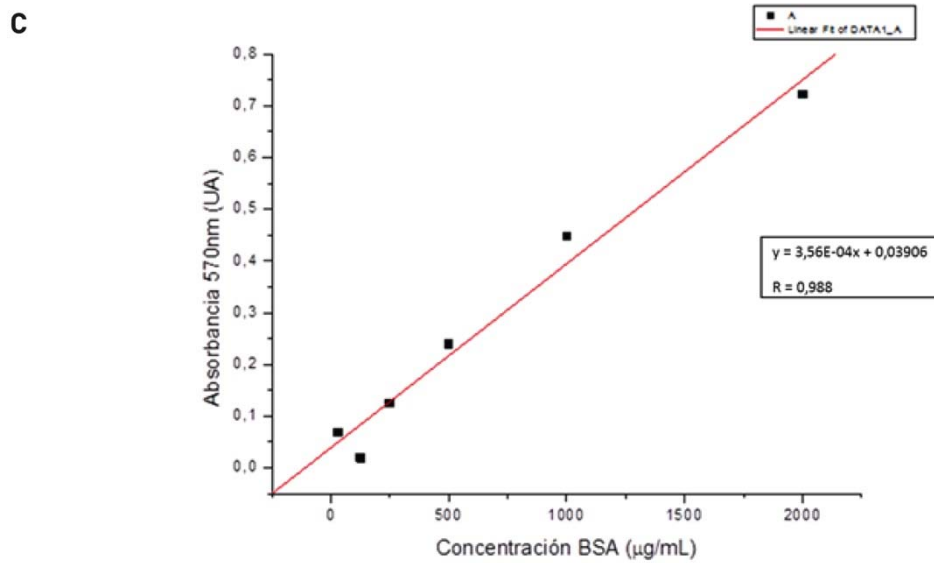
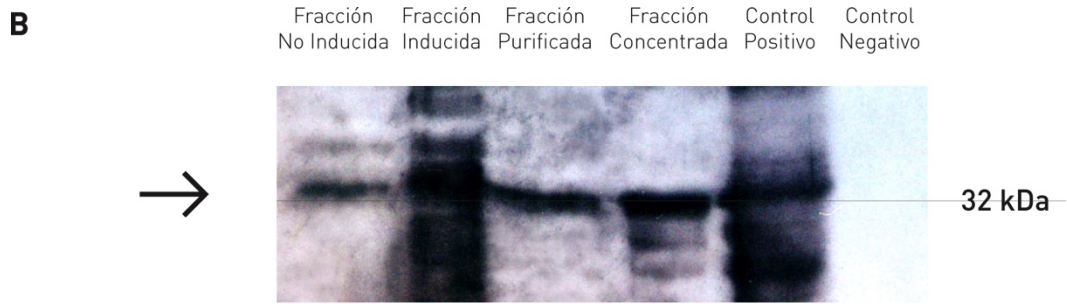
Dicho análisis confirmó la obtención de proBDNF humano, “brain-derived neurotrophic factor isoform a preproprotein” de *Homo sapiens*, por lo cual los resultados obtenidos fueron favorables. En la parte B de la figura 33 se observa el espectro de masas para la banda que corresponde al proBDNF. En este caso fue de la de 28kDa, tal como era de esperarse al ser este el peso molecular más cercano al de la proneurotrofina (32kDa) [13, 139]. Mediante el análisis por espectrometría de masas de las demás bandas, de 100 y 17kDa, se llegó a la conclusión de que las mismas correspondían a la proteína “oxoglutarate dehydrogenase” de *Escherichia coli* y a la proteína “rplM gene product” de *Escherichia coli*, respectivamente. Todos estos resultados fueron obtenidos a partir del análisis de sus respectivos espectros de masas utilizando la técnica MALDI-TOF/TOF, y el motor de búsqueda Mascot. La identificación de las proteínas correspondientes a las tres bandas se consideró estadísticamente significativa.

#### 4.7 - Control de calidad por SDS PAGE y “western blotting”

Una vez verificada la obtención de proBDNF a partir del protocolo utilizado se procedió al análisis electroforético de cada uno de sus pasos, con el fin de determinar la eficacia de la purificación. Además se verificó la obtención de proBDNF en una segunda producción mediante la técnica western blot; y, posteriormente, se determinó la concentración de las proteínas de interés (proBDNF de primera y segunda producción) utilizando la técnica de BCA.

En la figura 34 se observan imágenes de lo obtenido a partir de los análisis mencionados.





**Figura 34 - Análisis por SDS-PAGE, western blotting y cuantificación proteica de la producción de proBDNF. Parte A-** Fotografía del gel de electroforesis SDS PAGE para el análisis de muestras obtenidas a lo largo del protocolo de producción (fracciones no inducida, inducida, acidificada, renaturalizada, concentrada, preAKTA, purificada, y concentrada final) y su respectivo marcador de peso molecular (Prestain ladder plus #SM 1811, Fermentas) con la referencia de los pesos moleculares expresados en kDa (derecha). La flecha indica el peso molecular esperado para el proBDNF. **Parte B-** Fotografía del análisis por western blot para verificar la presencia de proBDNF en la segunda producción. Las fracciones analizadas fueron la no inducida, inducida, purificada y concentrada. Como control positivo se utilizó la muestra de proBDNF analizada por MALDI-TOF y como control negativo se decidió no incubar dicho carril con el anticuerpo primario. La flecha señala las bandas correspondientes al proBDNF. **Parte C-** Curva de calibración construida con concentraciones estándar de BSA de 31,25µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL y 2000µg/mL para la cuantificación de proteínas por BCA. Los valores de absorbancia se midieron a 570nm.

En la parte A de la figura se observa una fotografía del análisis por electroforesis SDS PAGE de diferentes muestras recolectadas en distintas etapas del proceso de producción de la proteína. En los dos carriles siguientes a la posición del marcador de peso molecular se sembraron las fracciones no inducidas e inducida, respectivamente. En ambos casos se observan una serie de bandas de pesos moleculares diferentes, correspondientes a una gran variedad de proteínas presentes en *E. Coli*, el huésped utilizado. En el siguiente carril se observa el patrón de bandas correspondiente a la muestra acidificada, a pH 4. En este caso se ve un corrimiento (“smear”),

el cual se debe a la condición de la fracción sembrada. De cualquier forma se puede apreciar una banda más nítida que las demás, correspondiente a un valor de peso molecular cercano a 27kDa, según la comparación con el marcador de peso molecular utilizado. Se cree que esta banda correspondería a la proteína de interés, contenida en los cuerpos de inclusión, bajo una forma insoluble. En el carril donde se sembró la muestra renaturalizada se observa un patrón de bandas muy tenue, donde se puede observar una banda débil, correspondiente a un peso molecular de 27kDa, que probablemente sea proBDNF [13, 139]. Para el caso de la fracción concentrada no se observan bandas, probablemente debido a la baja concentración de la muestra sembrada o pérdida de la misma durante la electroforesis. En el caso de la fracción previa a la purificación (preAKTA), se observa un patrón de bandas tenues y definidas, todas con intensidad similar. Finalmente, en los últimos carriles, correspondientes a las fracciones del pico de elución de proBDNF y a la fracción de su posterior concentración, se observa un patrón muy similar para ambos casos, donde la banda más prominente es la que se encuentra cercana a un valor de peso molecular de 27kDa, por lo que se asume que corresponde al proBDNF. En el último carril la banda mencionada presenta mayor intensidad debido a que, en ese caso, la muestra sembrada está concentrada con respecto a la anterior. Es así que a partir de este análisis electroforético se concluye que logró obtenerse una proteína de peso molecular similar al del proBDNF, bastante pura, la cual puede apreciarse mediante este análisis luego de su purificación, pero difícilmente sea posible en etapas previas. El análisis realizado no permite identificar con certeza la proteína obtenida, razón por la cual se aplicaron otras técnicas para dicho fin.

En la parte B de la figura 34 se observa una imagen obtenida a partir del análisis mediante western blotting. Esta técnica, como se mencionó anteriormente (*Materiales y métodos*, sección 3.11) es muy específica ya que utiliza anticuerpos y, en este caso, se usó para verificar la obtención de proBDNF a partir de la segunda producción de dicha proteína, asumida a partir del análisis mediante SDS PAGE, ya que este último sólo permite determinar la presencia de una proteína con un peso molecular similar, pero no la identificación de la misma.

Previo al western blot se realizó un Dot Blot a fin de determinar qué concentración de anticuerpo primario sería la más adecuada para esta técnica. Para este caso en particular, dado que no se observaron “dots” en concentraciones más bajas de dicho anticuerpo, se decidió utilizar una dilución de 1/200 del anticuerpo anti-BDNF (Abcam). La proteína utilizada en este caso fue una muestra de proBDNF previamente analizado por espectrometría de masas.

Para el western blot se utilizó como control positivo la muestra de proBDNF obtenido a partir de la primera producción, e identificado por espectrometría de masas. Como control negativo de la técnica se decidió dejar un carril sin incubar con el anticuerpo primario, con el fin de determinar la eficiencia de la técnica y de la detección y especificidad del anticuerpo secundario.

En la parte B de la figura 34 se puede observar una banda muy definida señalada con una flecha, del mismo peso molecular (aproximadamente 32kDa) para todos los carriles sembrados, excepto para el último. Esto concuerda con lo esperado ya que dicho carril corresponde al control negativo, por lo que la técnica se realizó sin fallas y el anticuerpo

secundario es específico en su detección. Dado que la banda observada se encuentra a la misma altura que aquella en el control positivo se logró verificar la presencia de proBDNF. Como en los carriles correspondientes a aquellas fracciones purificadas (post IMAC) la banda mencionada es la única que se observa se verificó, además, la obtención de la proteína de interés más purificada que en las etapas previas. Las demás bandas observadas para los casos de la fracción inducida y del control positivo pudieron deberse a interacciones inespecíficas con otras proteínas del extracto celular o a la degradación del proBDNF, respectivamente.

Una vez verificada la presencia del proBDNF a partir de cada una de las producciones del mismo se procedió a cuantificarlo. Para esto se utilizó el método del BCA, descrito en la sección 3.13 de *Materiales y Métodos*. En la parte C de la figura 34 se observa la gráfica correspondiente a la curva de calibración de BSA, utilizada para determinar la concentración de las proteínas de interés. Aplicando la fórmula de la gráfica se obtuvo, para cada caso, la concentración final del proBDNF purificado y concentrado de cada producción. Los valores obtenidos fueron los siguientes: 0,89 mg/mL y 1,48 mg/mL para la proteína resultante de la primera y la segunda producción, respectivamente; los cuales son muy buenos ya que corresponden a un buen rendimiento en dicha producción según la bibliografía [192].

En conclusión, se ha logrado cumplir con los principales objetivos planteados al obtenerse un buen rendimiento en la producción de proBDNF humano recombinante con el protocolo utilizado.

## 5- CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado se lograron cumplir todos los objetivos, tanto el principal como los específicos.

En primer lugar, se logró llevar a cabo, de forma satisfactoria, la construcción del plásmido pET-22b conteniendo el gen que codifica para la proteína proBDNF. Con esta construcción se transformaron bacterias *E. Coli* de la cepa BL21. La modificación genética de dichas bacterias se analizó mediante minipreparación con lisis alcalina y posterior secuenciación.

A partir de dichas bacterias genéticamente modificadas se logró expresar, plegar y obtener la proteína proBDNF humano recombinante, aplicando el protocolo previamente utilizado para la producción de una proteína homóloga (proNGF). La obtención de la proteína de interés verificó la correcta puesta a punto del protocolo para la producción de proBDNF, validando de esta forma los cambios que se realizaron para la obtención particular de dicha proneurotrofina.

Finalmente se logró verificar, mediante controles de calidad con análisis como espectrometría de masas, SDS PAGE y western blot, la obtención de la proteína de interés en estado de pureza (alcanzada mediante IMAC). Una vez identificado, el proBDNF se cuantificó mediante la técnica BCA, con lo cual se concluyó que se obtuvieron buenos rendimientos, en comparación con datos previamente reportados.

En conclusión, se logró poner a punto un nuevo protocolo que permite obtener buenos rendimientos para la producción de proBDNF humano recombinante, utilizando a *E. Coli* como sistema de expresión.

A pesar de que este trabajo finalizó con la obtención de proBDNF humano recombinante en estado de pureza, se podría complementar con la aplicación de dos acciones suplementarias:

- 1- La digestión del proBDNF con la enzima TEV, para la remoción de la cola de histidina, y con la enzima Tripsina, para el clivaje del prodominio y la obtención del BDNF maduro. Luego de este paso podría purificarse dicha neurotrofina mediante cromatografía FPLC.
- 2- La realización de bioensayos que permitan determinar la actividad biológica del proBDNF y del BDNF obtenido. Para dichos bioensayos podrían utilizarse cultivos neuronales, como ser neuronas motoras para el caso del proBDNF (este induce la apoptosis en dichas células) o neuronas embrionarias para el caso del BDNF (este es necesario para la supervivencia de dichas células).

## 6- BIBLIOGRAFÍA

1. Thoenen, H. and M. Sendtner, *Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches*. Nat Neurosci, 2002. **5 Suppl**: p. 1046-50.
2. Lu, B., P.T. Pang, and N.H. Woo, *The yin and yang of neurotrophin action*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6(8)**: p. 603-14.
3. Howe, C.L. and W.C. Mobley, *Long-distance retrograde neurotrophic signaling*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15(1)**: p. 40-8.
4. Schweigreiter, R., *The dual nature of neurotrophins*. Bioessays, 2006. **28(6)**: p. 583-94.
5. Chao, M.V., *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4(4)**: p. 299-309.
6. Bibel, M. and Y.A. Barde, *Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system*. Genes Dev, 2000. **14(23)**: p. 2919-37.
7. Barde, Y.A., *The nerve growth factor family*. Prog Growth Factor Res, 1990. **2(4)**: p. 237-48.
8. Ibanez, C.F., *Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors*. Trends Neurosci, 1998. **21(10)**: p. 438-44.
9. McDonald, N.Q., et al., *New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor*. Nature, 1991. **354(6352)**: p. 411-4.
10. McDonald, N.Q. and W.A. Hendrickson, *A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif*. Cell, 1993. **73(3)**: p. 421-4.
11. Hallbook, F., *Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families*. Curr Opin Neurobiol, 1999. **9(5)**: p. 616-21.
12. Bronfman, F.C. and M. Fainzilber, *Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out?* EMBO Rep, 2004. **5(9)**: p. 867-71.
13. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. Science, 2001. **294(5548)**: p. 1945-8.
14. Lu, B., *Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation*. Neuron, 2003. **39(5)**: p. 735-8.
15. Harrington, A.W., et al., *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101(16)**: p. 6226-30.
16. Fahnstock, M., et al., *The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor*. J Neurochem, 2004. **89(3)**: p. 581-92.
17. Hempstead, B.L., et al., *Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation*. Neuron, 1992. **9(5)**: p. 883-96.
18. Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin*. J Neurosci, 2005. **25(22)**: p. 5455-63.
19. Barbacid, M., *The Trk family of neurotrophin receptors*. J Neurobiol, 1994. **25(11)**: p. 1386-403.
20. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: mediators of neurotrophin action*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11(3)**: p. 272-80.
21. Barker, P.A., *p75NTR: A study in contrasts*. Cell Death Differ, 1998. **5(5)**: p. 346-56.



22. Chao, M.V., et al., *Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor*. Science, 1986. **232**(4749): p. 518-21.
23. Radeke, M.J., et al., *Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor*. Nature, 1987. **325**(6105): p. 593-7.
24. Martin-Zanca, D., S.H. Hughes, and M. Barbacid, *A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences*. Nature, 1986. **319**(6056): p. 743-8.
25. Martin-Zanca, D., et al., *Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(1): p. 24-33.
26. Kaplan, D.R., et al., *The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor*. Science, 1991. **252**(5005): p. 554-8.
27. Klein, R., et al., *trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3701-9.
28. Hempstead, B.L., et al., *High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor*. Nature, 1991. **350**(6320): p. 678-83.
29. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, *trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3*. Cell, 1991. **66**(5): p. 967-79.
30. Segal, R.A., *Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 299-330.
31. Hempstead, B.L., *The many faces of p75<sup>NTR</sup>*. Curr Opin Neurobiol, 2002. **12**(3): p. 260-7.
32. Mischel, P.S., et al., *The extracellular domain of p75<sup>NTR</sup> is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11294-301.
33. Bothwell, M., *Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors*. Annu Rev Neurosci, 1995. **18**: p. 223-53.
34. Bibel, M., E. Hoppe, and Y.A. Barde, *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75<sup>NTR</sup>*. EMBO J, 1999. **18**(3): p. 616-22.
35. Yuen, E.C. and W.C. Mobley, *Early BDNF, NT-3, and NT-4 signaling events*. Exp Neurol, 1999. **159**(1): p. 297-308.
36. Zaccaro, M.C., et al., *p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31023-9.
37. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
38. Munck Petersen, C., et al., *Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding*. EMBO J, 1999. **18**(3): p. 595-604.
39. Nielsen, M.S., et al., *The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein*. EMBO J, 2001. **20**(9): p. 2180-90.
40. Barker, P.A., *p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: novel partners and new insights*. Neuron, 2004. **42**(4): p. 529-33.
41. Nykjaer, A., et al., *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death*. Nature, 2004. **427**(6977): p. 843-8.

42. Chen, Z.Y., et al., *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6156-66.
43. Eide, F.F., D.H. Lowenstein, and L.F. Reichardt, *Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease*. Exp Neurol, 1993. **121**(2): p. 200-14.
44. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Signal transduction by the neurotrophin receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 213-21.
45. Perez, P., et al., *NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains*. Mol Cell Neurosci, 1995. **6**(2): p. 97-105.
46. Urfer, R., et al., *High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5829-40.
47. MacDonald, J.I. and S.O. Meakin, *Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells*. Mol Cell Neurosci, 1996. **7**(5): p. 371-90.
48. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 381-91.
49. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 609-42.
50. Lee, F.S., et al., *The uniqueness of being a neurotrophin receptor*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 281-6.
51. Yano, H., et al., *Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor*. J Neurosci, 2001. **21**(3): p. RC125.
52. Arevalo, J.C., et al., *TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 5908-16.
53. Shelton, D.L., et al., *Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins*. J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 2): p. 477-91.
54. Strohmaier, C., et al., *A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor*. EMBO J, 1996. **15**(13): p. 3332-7.
55. Clary, D.O. and L.F. Reichardt, *An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11133-7.
56. Klein, R., et al., *The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain*. Cell, 1990. **61**(4): p. 647-56.
57. Middlemas, D.S., R.A. Lindberg, and T. Hunter, *trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(1): p. 143-53.
58. Fryer, R.H., et al., *Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain*. J Comp Neurol, 1996. **374**(1): p. 21-40.
59. Biffo, S., et al., *Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development*. Development, 1995. **121**(8): p. 2461-70.
60. Eide, F.F., et al., *Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling*. J Neurosci, 1996. **16**(10): p. 3123-9.

61. Ninkina, N., et al., *Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6385-93.
62. Kaplan, D.R. and R.M. Stephens, *Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor*. J Neurobiol, 1994. **25**(11): p. 1404-17.
63. Arevalo, J.C. and S.H. Wu, *Neurotrophin signaling: many exciting surprises!* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(13): p. 1523-37.
64. Bhattacharyya, A., et al., *Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system*. J Neurosci, 1997. **17**(18): p. 7007-16.
65. Senger, D.L. and R.B. Campenot, *Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures*. J Cell Biol, 1997. **138**(2): p. 411-21.
66. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Signal transduction by target-derived neurotrophins*. Nat Neurosci, 2001. **4**(10): p. 963-4.
67. Stephens, R.M., et al., *Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses*. Neuron, 1994. **12**(3): p. 691-705.
68. Inagaki, N., H. Thoenen, and D. Lindholm, *TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(6): p. 1125-33.
69. Zirrgiebel, U., et al., *Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival*. J Neurochem, 1995. **65**(5): p. 2241-50.
70. Heumann, R., *Neurotrophin signalling*. Curr Opin Neurobiol, 1994. **4**(5): p. 668-79.
71. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. Cell, 1995. **80**(2): p. 179-85.
72. Kao, S., et al., *Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18169-77.
73. York, R.D., et al., *Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 622-6.
74. Wu, C., C.F. Lai, and W.C. Mobley, *Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes*. J Neurosci, 2001. **21**(15): p. 5406-16.
75. Kong, H., et al., *An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors*. J Neurosci, 2001. **21**(1): p. 176-85.
76. York, R.D., et al., *Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 8069-83.
77. Holgado-Madruga, M., et al., *Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12419-24.
78. Atwal, J.K., et al., *The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 265-77.

79. Encinas, M., et al., *Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuriteogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y*. J Neurochem, 1999. **73**(4): p. 1409-21.
80. Foehr, E.D., et al., *NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells*. J Neurosci, 2000. **20**(20): p. 7556-63.
81. Zhou, F.Q., et al., *NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC*. Neuron, 2004. **42**(6): p. 897-912.
82. Vetter, M.L., et al., *Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5650-4.
83. Corbit, K.C., D.A. Foster, and M.R. Rosner, *Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4209-18.
84. Kang, H.J. and E.M. Schuman, *Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus*. J Physiol Paris, 1995. **89**(1): p. 11-22.
85. Johnson, D., et al., *Expression and structure of the human NGF receptor*. Cell, 1986. **47**(4): p. 545-54.
86. Chao, M.V. and B.L. Hempstead, *p75 and Trk: a two-receptor system*. Trends Neurosci, 1995. **18**(7): p. 321-6.
87. Liepinsh, E., et al., *NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor*. EMBO J, 1997. **16**(16): p. 4999-5005.
88. Rabizadeh, S., et al., *Expression of the low-affinity nerve growth factor receptor enhances beta-amyloid peptide toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10703-6.
89. Barrett, G.L. and P.F. Bartlett, *The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6501-5.
90. Casaccia-Bonnel, P., et al., *Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 716-9.
91. Bamji, S.X., et al., *The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 911-23.
92. Sedel, F., C. Bechade, and A. Triller, *Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(11): p. 3904-12.
93. Davey, F. and A.M. Davies, *TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons*. Curr Biol, 1998. **8**(16): p. 915-8.
94. DeFreitas, M.F., P.S. McQuillen, and C.J. Shatz, *A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5121-9.
95. Bentley, C.A. and K.F. Lee, *p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development*. J Neurosci, 2000. **20**(20): p. 7706-15.

96. Salehi, A.H., et al., *NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis*. *Neuron*, 2000. **27**(2): p. 279-88.
97. Blochl, A., L. Blumenstein, and M.R. Ahmadian, *Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75*. *Eur J Neurosci*, 2004. **20**(9): p. 2321-35.
98. Lee, K.F., et al., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. *Cell*, 1992. **69**(5): p. 737-49.
99. von Schack, D., et al., *Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(10): p. 977-8.
100. Dechant, G., *Molecular interactions between neurotrophin receptors*. *Cell Tissue Res*, 2001. **305**(2): p. 229-38.
101. Hutson, L.D. and M. Bothwell, *Expression and function of Xenopus laevis p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms*. *J Neurobiol*, 2001. **49**(2): p. 79-98.
102. Kanning, K.C., et al., *Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability*. *J Neurosci*, 2003. **23**(13): p. 5425-36.
103. Frankowski, H., et al., *PLAIDD, a type II death domain protein that interacts with p75 neurotrophin receptor*. *Neuromolecular Med*, 2002. **1**(3): p. 153-70.
104. Wang, X., et al., *NRADD, a novel membrane protein with a death domain involved in mediating apoptosis in response to ER stress*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(5): p. 580-91.
105. Miller, F.D. and D.R. Kaplan, *Life and death decisions: a biological role for the p75 neurotrophin receptor*. *Cell Death Differ*, 1998. **5**(5): p. 343-5.
106. Miller, F.D. and D.R. Kaplan, *Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(8): p. 1045-53.
107. Roux, P.P. and P.A. Barker, *Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor*. *Prog Neurobiol*, 2002. **67**(3): p. 203-33.
108. Blochl, A. and R. Blochl, *A cell-biological model of p75NTR signaling*. *J Neurochem*, 2007. **102**(2): p. 289-305.
109. Schor, N.F., *The p75 neurotrophin receptor in human development and disease*. *Prog Neurobiol*, 2005. **77**(3): p. 201-14.
110. Brann, A.B., et al., *Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons*. *J Neurosci*, 1999. **19**(19): p. 8199-206.
111. Lievremont, J.P., et al., *The p75(NTR)-induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15466-72.
112. Mukai, J., et al., *NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(23): p. 17566-70.

113. Casademunt, E., et al., *The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death*. EMBO J, 1999. **18**(21): p. 6050-61.
114. Aloyz, R.S., et al., *p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors*. J Cell Biol, 1998. **143**(6): p. 1691-703.
115. Chittka, A., et al., *The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E*. J Cell Biol, 2004. **164**(7): p. 985-96.
116. Brann, A.B., et al., *Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9812-8.
117. Khursigara, G., J.R. Orlinick, and M.V. Chao, *Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2597-600.
118. Salama-Cohen, P., et al., *NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 339-47.
119. Frade, J.M., *Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding*. J Neurosci, 2005. **25**(6): p. 1407-11.
120. Rosch, H., et al., *The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(20): p. 7362-7.
121. Zagrebelsky, M., et al., *The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(43): p. 9989-99.
122. Butowt, R. and C.S. von Bartheld, *Connecting the dots: trafficking of neurotrophins, lectins and diverse pathogens by binding to the neurotrophin receptor p75NTR*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(4): p. 673-80.
123. Lalli, G., et al., *The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons*. Trends Microbiol, 2003. **11**(9): p. 431-7.
124. von Bartheld, C.S., *Axonal transport and neuronal transcytosis of trophic factors, tracers, and pathogens*. J Neurobiol, 2004. **58**(2): p. 295-314.
125. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. **1**(5): p. 549-53.
126. Mowla, S.J., et al., *Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12660-6.
127. Mowla, S.J., et al., *Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(6): p. 2069-80.
128. Nikolettou, V., et al., *Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not*. Nature, 2010. **467**(7311): p. 59-63.
129. Rauskolb, S., et al., *Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth*. J Neurosci, 2010. **30**(5): p. 1739-49.
130. Matsumoto, T., et al., *Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF*. Nat Neurosci, 2008. **11**(2): p. 131-3.

131. Soppet, D., et al., *The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor*. Cell, 1991. **65**(5): p. 895-903.
132. Carter, B.D., et al., *Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75*. Science, 1996. **272**(5261): p. 542-5.
133. Tanaka, J., et al., *Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines*. Science, 2008. **319**(5870): p. 1683-7.
134. Horch, H.W. and L.C. Katz, *BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons*. Nat Neurosci, 2002. **5**(11): p. 1177-84.
135. Figurov, A., et al., *Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 706-9.
136. Yamada, K., M. Mizuno, and T. Nabeshima, *Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory*. Life Sci, 2002. **70**(7): p. 735-44.
137. Egan, M.F., et al., *The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function*. Cell, 2003. **112**(2): p. 257-69.
138. Beattie, M.S., et al., *ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 375-86.
139. Kolbeck, R., S. Jungbluth, and Y.A. Barde, *Characterisation of neurotrophin dimers and monomers*. Eur J Biochem, 1994. **225**(3): p. 995-1003.
140. Heymach, J.V., Jr. and E.M. Shooter, *The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12297-304.
141. Kenchappa, R.S., et al., *Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons*. Neuron, 2006. **50**(2): p. 219-32.
142. Woo, N.H., et al., *Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression*. Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 1069-77.
143. Koshimizu, H., et al., *Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival*. Mol Brain, 2009. **2**: p. 27.
144. Woo, N.H., *BDNF in synaptic plasticity and memory*. p. 135-143.
145. Yan, Q., et al., *Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat*. J Comp Neurol, 1997. **378**(1): p. 135-57.
146. Lu, B., et al., *Expression of NGF and NGF receptor mRNAs in the developing brain: evidence for local delivery and action of NGF*. Exp Neurol, 1989. **104**(3): p. 191-9.
147. Koshimizu, H., et al., *Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons*. Neurosci Lett, 2010. **473**(3): p. 229-32.
148. Armanini, M.P., et al., *Truncated and catalytic isoforms of trkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(6): p. 1403-9.
149. Ohira, K., et al., *Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(2): p. 406-16.
150. Zheng, J., et al., *Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13280-8.

151. Howe, C.L., et al., *NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway*. *Neuron*, 2001. **32**(5): p. 801-14.
152. Sharma, N., et al., *Long-distance control of synapse assembly by target-derived NGF*. *Neuron*, 2010. **67**(3): p. 422-34.
153. Kafitz, K.W., et al., *Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors*. *Nature*, 1999. **401**(6756): p. 918-21.
154. Pezet, S. and S.B. McMahon, *Neurotrophins: mediators and modulators of pain*. *Annu Rev Neurosci*, 2006. **29**: p. 507-38.
155. Pezet, S., M. Malcangio, and S.B. McMahon, *BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways?* *Brain Res Brain Res Rev*, 2002. **40**(1-3): p. 240-9.
156. Xu, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(7): p. 736-42.
157. Pellemounter, M.A., M.J. Cullen, and C.L. Wellman, *Characteristics of BDNF-induced weight loss*. *Exp Neurol*, 1995. **131**(2): p. 229-38.
158. Gray, J., et al., *Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3366-71.
159. Yeo, G.S., et al., *A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(11): p. 1187-9.
160. Fujinami, A., et al., *Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship to glucose metabolism and biomarkers of insulin resistance*. *Clin Biochem*, 2008. **41**(10-11): p. 812-7.
161. Doyle, K.P., R.P. Simon, and M.P. Stenzel-Poore, *Mechanisms of ischemic brain damage*. *Neuropharmacology*, 2008. **55**(3): p. 310-8.
162. Ferrer, I., et al., *Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat*. *Acta Neuropathol*, 2001. **101**(3): p. 229-38.
163. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathol*, 1991. **82**(4): p. 239-59.
164. Masliah, E., et al., *Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 1994. **174**(1): p. 67-72.
165. Yan, Q., et al., *Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system*. *Neuroscience*, 1997. **78**(2): p. 431-48.
166. Altar, C.A., et al., *Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 856-60.
167. Kovalchuk, Y., et al., *Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation*. *Science*, 2002. **295**(5560): p. 1729-34.
168. Connor, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. **49**(1-2): p. 71-81.
169. Nagahara, A.H., et al., *Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease*. *Nat Med*, 2009. **15**(3): p. 331-7.
170. Olanow, C.W. and W.G. Tatton, *Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. *Annu Rev Neurosci*, 1999. **22**: p. 123-44.



171. Hyman, C., et al., *BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra*. *Nature*, 1991. **350**(6315): p. 230-2.
172. Levivier, M., et al., *Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease*. *J Neurosci*, 1995. **15**(12): p. 7810-20.
173. Frim, D.M., et al., *Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 5104-8.
174. Tsukahara, T., et al., *Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys*. *Neurosurgery*, 1995. **37**(4): p. 733-9; discussion 739-41.
175. Orr, H.T. and H.Y. Zoghbi, *Trinucleotide repeat disorders*. *Annu Rev Neurosci*, 2007. **30**: p. 575-621.
176. Walker, F.O., *Huntington's disease*. *Lancet*, 2007. **369**(9557): p. 218-28.
177. Zuccato, C., et al., *Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease*. *Science*, 2001. **293**(5529): p. 493-8.
178. Gauthier, L.R., et al., *Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules*. *Cell*, 2004. **118**(1): p. 127-38.
179. Canals, J.M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease*. *J Neurosci*, 2004. **24**(35): p. 7727-39.
180. Kells, A.P., R.A. Henry, and B. Connor, *AAV-BDNF mediated attenuation of quinolinic acid-induced neuropathology and motor function impairment*. *Gene Ther*, 2008. **15**(13): p. 966-77.
181. Wijesekera, L.C. and P.N. Leigh, *Amyotrophic lateral sclerosis*. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 3.
182. Giehl, K.M. and W. Tetzlaff, *BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo*. *Eur J Neurosci*, 1996. **8**(6): p. 1167-75.
183. Schumacher, J., et al., *Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression*. *Biol Psychiatry*, 2005. **58**(4): p. 307-14.
184. Post, R.M., *Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications*. *J Psychiatr Res*, 2007. **41**(12): p. 979-90.
185. Campbell, S., et al., *Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis*. *Am J Psychiatry*, 2004. **161**(4): p. 598-607.
186. Dwivedi, Y., et al., *Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects*. *Arch Gen Psychiatry*, 2003. **60**(8): p. 804-15.
187. Vermetten, E., et al., *Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder*. *Biol Psychiatry*, 2003. **54**(7): p. 693-702.
188. Chen, B., et al., *Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication*. *Biol Psychiatry*, 2001. **50**(4): p. 260-5.

189. Shimizu, E., K. Hashimoto, and M. Iyo, *Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004. **126B**(1): p. 122-3.
190. Erickson, K.I., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume.* J Neurosci, 2010. **30**(15): p. 5368-75.
191. Rybakowski, J.K., *BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia.* Pharmacogenomics, 2008. **9**(11): p. 1589-93.
192. Fukuzono, S., K. Fujimori, and N. Shimizu, *Production of biologically active mature brain-derived neurotrophic factor in Escherichia coli.* Biosci Biotechnol Biochem, 1995. **59**(9): p. 1727-31.
193. Rudolph, R. and H. Lilie, *In vitro folding of inclusion body proteins.* FASEB J, 1996. **10**(1): p. 49-56.
194. *Axyprep Plasmid Miniprep Kit.* Axygen Biosciences. p. 4-5.
195. Garrett, R. and C.M. Grisham, *Biochemistry.* 2005, Thomson/Brooks/Cole: Belmont, CA. p. 467-469.
196. Cleland, W.W., *Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups.* Biochemistry, 1964. **3**: p. 480-2.
197. *Recombinant Protein Purification Handbook, Principles and Methods.* GE Healthcare.
198. *Strategies for Protein Purification Handbook.* GE Healthcare.
199. *Instructions 11-0008-88 AF, His Trap affinity columns.* GE Healthcare.
200. *Protein Electrophoresis, Technical Manual.* Amersham Biosciences.
201. Roca, P. and e-libro Corp, *Bioquímica [ técnicas y métodos, in Serie base.* 2003, Helice,: Madrid. p. 9-347 p.
202. Walker, J.M., *The protein protocols handbook.* 2nd ed. ed. 2002, Totowa, N.J.: Humana ; Oxford : Blackwell.
203. Alzate, O., *Neuroproteomics,* in *Frontiers in neuroscience.* 2010, CRC Press: Boca Raton. p. xix, 322 p., [12] p. of plates.
204. Berg, J.M., et al., *Biochemistry,* in *NCBI Bookshelf.* 2002, W.H. Freeman,: New York.
205. Humana Press., *Methods in molecular biology.* Humana Press: Clifton, N.J.
206. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
207. *Western Blotting, Handbook and Troubleshooting Guide.* Pierce.
208. Scopes, R.K., *Protein purification : principles and practice.* 3rd ed. Springer advanced texts in chemistry. 1994, New York: Springer-Verlag. xix, 380 p.
209. *Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system.* GE Healthcare.
210. Thorpe, G.H., et al., *Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays.* Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1335-41.
211. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
212. Krohn, R.I., *The colorimetric detection and quantitation of total protein.* Curr Protoc Cell Biol, 2002. **Appendix 3**: p. Appendix 3H.

213. Legler, G., et al., *On the chemical basis of the Lowry protein determination*. Anal Biochem, 1985. **150**(2): p. 278-87.
214. Kapust, R.B., et al., *The P1' specificity of tobacco etch virus protease*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(5): p. 949-55.
215. Behura, S.K. and D.W. Severson, *Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2013. **88**(1): p. 49-61.
216. Sharp, P.M. and W.H. Li, *The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(3): p. 1281-95.

## **7- AGRADECIMIENTOS**

A Luis, por haberme permitido realizar la pasantía en su laboratorio.

A los integrantes del Laboratorio de Neurodegeneración, en especial a Andrés y Valentina por guiarme en la producción de neurotrofinas.

A Madelón, por ayudarme con el análisis por espectrometría de masas.

A mi familia y amigos.

A Luciana, por su ayuda y compañía, tanto en el laboratorio como fuera de él.

A Belén, por acompañarme durante toda la carrera.

A Diego, por su contribución a este trabajo y por su apoyo incondicional en esta etapa.