Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo

Alsina, Fernando Cruz

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Alsina, Fernando Cruz. (2015-03-30). Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alsina, Fernando Cruz. "Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Fernando Cruz Alsina

Director de tesis: Gustavo Paratcha

Consejero de Estudios: Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

ÍNDICE

Resumen / abstract..... 4

Publicaciones……..... 8

Hipótesis y objetivos……..... 9

Introducción

Factores neurotróficos: clasificación, vías de señalización, funciones biológicas y regulación de su señalización..... 11

Modelos celulares útiles para el estudio de factores neurotróficos: ganglios de la raíz dorsal e hipocampo..... 17

Capítulo 1: Sprouty 4 como regulador endógeno de las vías de señalización inducidas por la neurotrofina NGF y su receptor TrkA

Introducción..... 30

Resultados..... 31

Discusión..... 52

Capítulo 2: la familia de proteínas Lrig como reguladora de los receptores para factores neurotróficos

Introducción..... 59

a) *Lrig1 como regulador endógeno de la actividad neurotrófica de BDNF y de la actividad de su receptor TrkB*

Resultados..... 63

Discusión..... 88

b) Lrig1, Lrig2 y Lrig3 como reguladores de la actividad neurotrófica de GDNF y Ret

Resultados y discusión..... 94

c) Lrig1 como inhibidor de formas oncogénicas de Ret

Resultados y discusión..... 104

Discusión general..... 108

Conclusiones generales..... 118

Materiales y métodos……..... 121

Glosario..... 133

Referencias bibliográficas.……...……..... 136

Agradecimientos..... 154

Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo

Los factores neurotróficos son proteínas solubles principalmente conocidas por su participación en el mantenimiento, sobrevida, diferenciación y maduración sináptica de diferentes subpoblaciones neuronales. Distintas familias de factores neurotróficos han sido identificadas en el sistema nervioso de mamíferos, entre las que se destacan el grupo de las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3, NT4) y la familia del factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN). Las señales inducidas por estos ligandos involucran la activación de receptores conteniendo una actividad tirosina kinasa intrínseca, un evento de señalización clave para controlar la fisiología celular y orquestar el desarrollo del sistema nervioso. Un fuerte control y regulación de la actividad de los receptores tirosina kinasa (RTK) es crucial para garantizar la homeostasis celular y un apropiado desarrollo neuronal, ya que tanto alteraciones funcionales de estos receptores por mutaciones en los correspondientes genes como fallas en los mecanismos que restringen su activación, podrían contribuir a la patogénesis de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades neurológicas. De esta manera, para evitar errores de señalización que finalmente lleven a comportamientos celulares aberrantes y patologías, los mecanismos celulares han evolucionado para permitir que apropiados niveles de activación de estos receptores sean alcanzados y mantenidos por un período de tiempo compatible con la inducción de una respuesta fisiológica.

El objetivo de la presente tesis consistió en identificar y caracterizar nuevos mecanismos que restringen la activación de receptores para factores neurotróficos en neuronas en desarrollo, como una vía para entender la patogénesis de diferentes enfermedades neurológicas, y así contribuir al desarrollo de nuevas terapias regenerativas.

Inicialmente, identificamos y caracterizamos a la proteína Sprouty4 como un inhibidor endógeno de la señalización y el crecimiento axonal inducidos por NGF y su receptor TrkA en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG).

Por otro lado, nosotros también analizamos el rol de los miembros de la familia de proteínas Lrig – Lrig1, Lrig2 y Lrig3 – como moduladores endógenos del estado de activación de receptores para factores neurotróficos. Las proteínas Lrig pertenecen a una emergente superfamilia de proteínas transmembrana enriquecidas en sistema nervioso que contienen dominios inmunoglobulina (Ig) y repeticiones ricas en leucina (LRR - Leucine-rich repeats). En este sentido, identificamos a Lrig1 como un regulador negativo de la señalización y los efectos biológicos inducidos por BDNF y su receptor TrkB en neuronas hipocampales. Notablemente, hemos determinado que los ratones transgénicos deficientes para *Lrig1* poseen una mayor arborización dendrítica en las neuronas piramidales del hipocampo que correlaciona con defectos en su comportamiento de interacción social, aportando nuevas evidencias de su relevancia fisiológica.

Por último, realizamos experimentos que demuestran que los tres miembros de la familia Lrig, cooperarían para inhibir el crecimiento neurítico inducido por GDNF, controlando el estado de activación de su receptor tirosina kinasa Ret en células neuronales.

De esta manera, en este trabajo de tesis doctoral hemos identificado nuevos determinantes moleculares relevantes para el control de la conectividad y el armado de los circuitos neuronales, a través de la regulación de procesos de crecimiento axonal y dendríticos inducidos por factores neurotróficos en el sistema nervioso central y periférico.

.

Palabras clave: RTK, factores neurotróficos, Lrig, Sprouty4, NGF, BDNF, GDNF, Ret, TrkA, TrkB, hipocampo, ganglios de la raíz dorsal (DRG).

Negative regulation of neurotrophic factor receptor signaling in developing neurons

Neurotrophic factors are soluble proteins mainly known for their roles in the maintenance, survival, differentiation and synaptic maturation of different neuronal subpopulations. Different families of neurotrophic factors have been identified in the mammalian nervous system, including the neurotrophins (NGF, BDNF, NT3, NT4) and the glial cell-line derived neurotrophic factor family ligands (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN). Signaling induced by these ligands involves the activation of receptors containing a tyrosine kinase intrinsic activity, a key event to control cell physiology and orchestrate the development of the nervous system. A tight control and regulation of the activity of receptor tyrosine kinases (RTK) are crucial to ensure proper cell homeostasis and neuronal development, as both functional alterations of these receptors by gene mutations and failures on the mechanisms that restrict their activation may contribute to the pathogenesis of certain types of cancer and neurological diseases. Therefore, to avoid signaling errors that could eventually lead to aberrant and pathological cellular behaviors, the cellular mechanisms have evolved to allow that appropriate signaling thresholds are reached and maintained for a period of time compatible with the induction of a physiological response.

The aim of this thesis was to identify and characterize new mechanisms that restrict the activation of neurotrophic factor receptors in developing neurons, as a way to understand the pathogenesis of some neurological diseases, thus contributing to the development of new regenerative therapies.

First, we identified and characterized Sprouty4 protein as an endogenous inhibitor of TrkA-dependent downstream signaling and NGF-induced axonal growth of primary dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons.

On the other hand, we also analyzed the role of Lrig protein family members – Lrig1, Lrig2 and Lrig3 – as endogenous modulators of neurotrophic factor receptor activation. Lrig proteins belong to a novel superfamily of transmembrane proteins enriched in nervous system containing immunoglobulin-like (Ig) and leucine-rich repeat domains (LRR). Here, we identified Lrig1 as a negative regulator of TrkB signaling and biological effects induced by BDNF in hippocampal neurons. Interestingly, we have determined that *Lrig1*-null transgenic mice have increased dendrite morphogenesis and dendritic arborization of CA1 and CA3 hippocampal pyramidal neurons, suggesting that Lrig1 could increase the repertoire of TrkB signaling outputs to allow hippocampal neurons to sculpt distinctive dendrite patterns. In addition, *Lrig1* ablation was also associated with social motivation/interaction deficits, providing new insights into its physiological importance.

Finally, we conducted a set of experiments showing that the three Lrig family members cooperate to inhibit GDNF-promoted neurite outgrowth by controlling the activation state of the tyrosine kinase receptor Ret in neuronal cells.

In conclusion, in this manuscript we have identified novel molecular determinants, relevant to control connectivity and neural circuits assembly through the regulation of axonal and dendritic growth induced by neurotrophic factors in peripheral and central nervous system.

key words: RTK, Neurotrophic factors, Lrig, Sprouty4, NGF, BDNF, GDNF, Ret, TrkA, TrkB, hippocampus, dorsal root ganglia (DRG).

PUBLICACIONES

- ALSINA FC, Hita FJ, Fontanet PA, Irala D, Hedman H, Ledda F, Paratcha G. (manuscrito listo para ser enviado). The Leucine-rich repeat transmembrane protein Lrig1 restricts hippocampal dendrite complexity modulating neurotrophin-induced TrkB signaling.

- Fontanet PA, Irala D, ALSINA FC, Paratcha G, Ledda F. (2013). Pea3 transcription factor family members, Etv4 and Etv5, mediate retrograde signaling and axonal growth of DRG sensory neurons in response to NGF. **Journal of Neuroscience**. 33(40):15940-51.

- ALSINA FC, Ledda F, Paratcha G. (2012). New insights into the control of neurotrophic growth factor receptor signaling: Implications for nervous system development and repair. **Journal of Neurochemistry**. 10.1111/jnc.12021. 652-661.

- ALSINA FC, Irala D, Fontanet PA, Hita FJ, Ledda F, Paratcha G. (2012) Sprouty4 is a negative modulator of TrkA signaling and neuronal differentiation induced by NGF. **PLoS ONE** 7(2): e32087.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis que nos propusimos contrastar en este trabajo fue que las proteínas Sprouty y Lrig controlan la actividad neurotrófica en poblaciones específicas de neuronas periféricas y centrales en desarrollo, para mantener la homeostasis celular y permitir el establecimiento de apropiados patrones de conectividad neuronal.

El objetivo central de este trabajo de tesis doctoral consistió en identificar y caracterizar nuevos mecanismos modulatorios de la activación de receptores para factores neurotróficos en neuronas en desarrollo, como una vía para entender los procesos que subyacen y regulan el desarrollo normal del sistema nervioso. A su vez, esto podría ayudar a comprender la patogénesis de diferentes enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, y así contribuir al desarrollo de nuevas terapias regenerativas.

Para alcanzar este objetivo general nos propusimos investigar los objetivos específicos listados debajo. Para realizar estos estudios, nos basamos en resultados previos de microarrays de ADN y en los patrones de expresión de las moléculas analizadas.

Objetivos específicos:

- Evaluar el rol de la proteína Sprouty4 en el control de la actividad trófica de NGF y de su receptor TrkA en neuronas sensoriales de ganglios de la raíz dorsal.
- Estudiar el rol de la proteína transmembrana Lrig1 como regulador endógeno de la actividad biológica de BDNF y TrkB en neuronas hipocampales en desarrollo.
- Caracterizar el patrón de expresión de las proteínas Lrig durante el desarrollo de los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Examinar el rol de Lrig1, Lrig2 y Lrig3 como reguladores endógenos de la actividad biológica de GDNF y su receptor Ret en modelos neuronales que responden a este factor neurotrófico.

- Investigar el potencial terapéutico de Lrig1 sobre variantes oncogénicas del receptor tirosina kinasa c-Ret presentes en tumores tiróideos (Ret MEN2A/MEN2B).

Factores neurotróficos: clasificación, vías de señalización, funciones biológicas y regulación de su señalización

Los factores neurotróficos comprenden un conjunto de proteínas secretadas por diversos tejidos que están involucradas en la sobrevida, diferenciación, maduración y plasticidad neuronal. De acuerdo a su estructura, las vías de señalización involucradas y los efectos biológicos inducidos, se los ha clasificado en tres grandes grupos: las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3, NT4/5), los ligandos de la familia de GDNF (GDNF, Neurturina, Artemina, Persefina) [1, 2] y la familia integrada por los ligandos MANF y CDNF. [3]

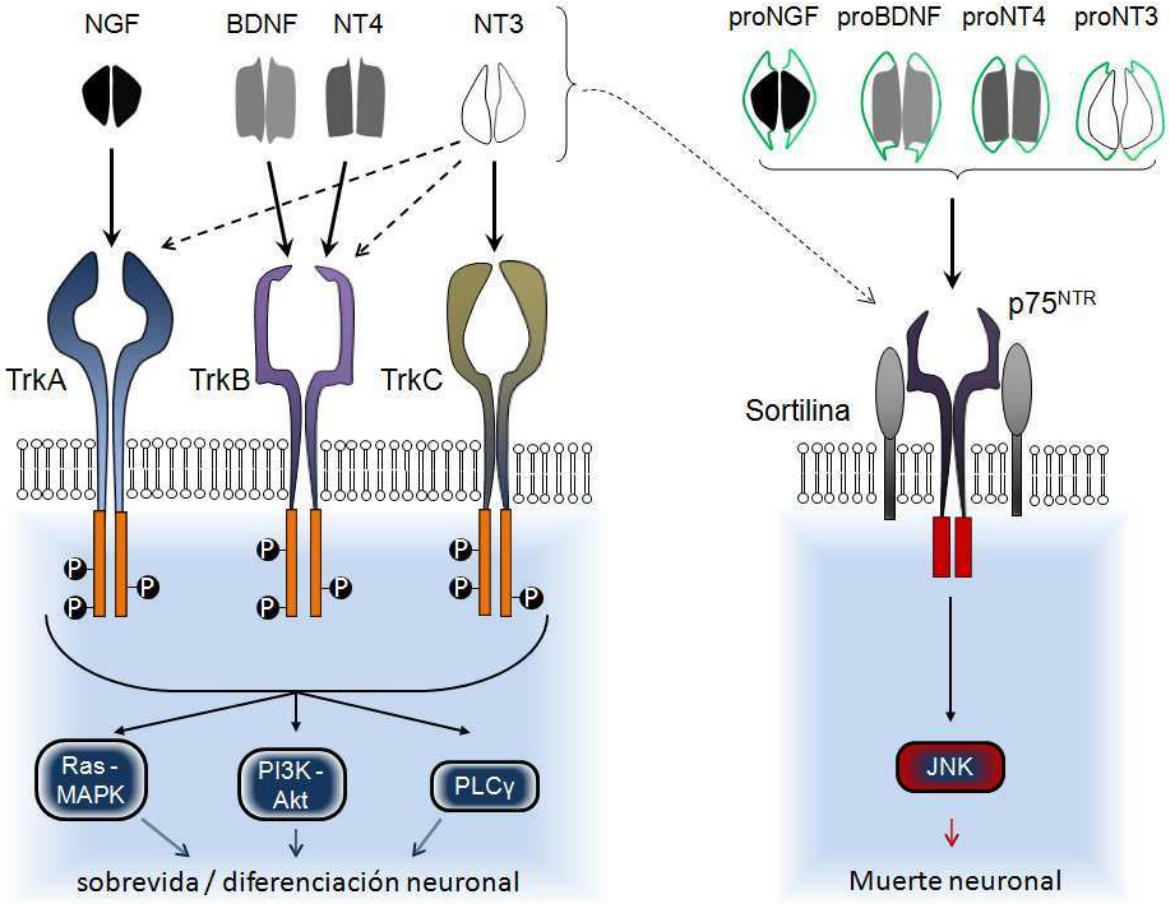
Cada una de las neurotrofinas se une preferencialmente a su receptor de membrana tirosina kinasa Trk. De esta manera, NGF se une a TrkA, BDNF y NT4 a TrkB y NT3 a TrkC. A su vez, el complejo de receptores $p75^{NTR}$-sortilina es capaz de unir a las proneurotrofinas (la versión inmadura no clivada de las neurotrofinas), asociándose con señales negativas de muerte celular (Figura 1A). Sin embargo, cuando TrkA, TrkB o TrkC y $p75^{NTR}$ se encuentran coexpresados, este último aumenta la afinidad de la neurotrofina por su correspondiente receptor Trk, potenciando sus efectos biológicos. [1]

Por otro lado, los ligandos de la familia de GDNF poseen un sistema mixto de receptores. Por un lado, se encuentra el receptor GFRα, el cual está unido a la membrana plasmática a través de un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) y es aquel que une a los ligandos con alta afinidad. Una vez que interactúan con GFRα, estos factores neurotróficos son capaces de unirse y activar a su receptor tirosina kinasa c-Ret (vía canónica) o a la molécula de adhesión neuronal NCAM (receptor alternativo). Tanto Ret como NCAM son los responsables de la transducción de la señal hacia el interior de la célula. Mientras que los cuatros ligandos de la familia de GDNF comparten la señalización a través de c-Ret o NCAM, cada uno tiene un receptor preferencial al que se une con alta

afinidad: GFRα1 para GDNF, GFRα2 para Neurturina (NRTN), GFRα3 para Artemina (ARTN) y GFRα4 para Persefina (PSPN) (Figura 1B). [2]

Con respecto a los ligandos MANF y CDNF, se han descripto sus potentes efectos de sobrevida sobre neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el sistema receptor que señaliza dichos efectos biológicos. [3]

A



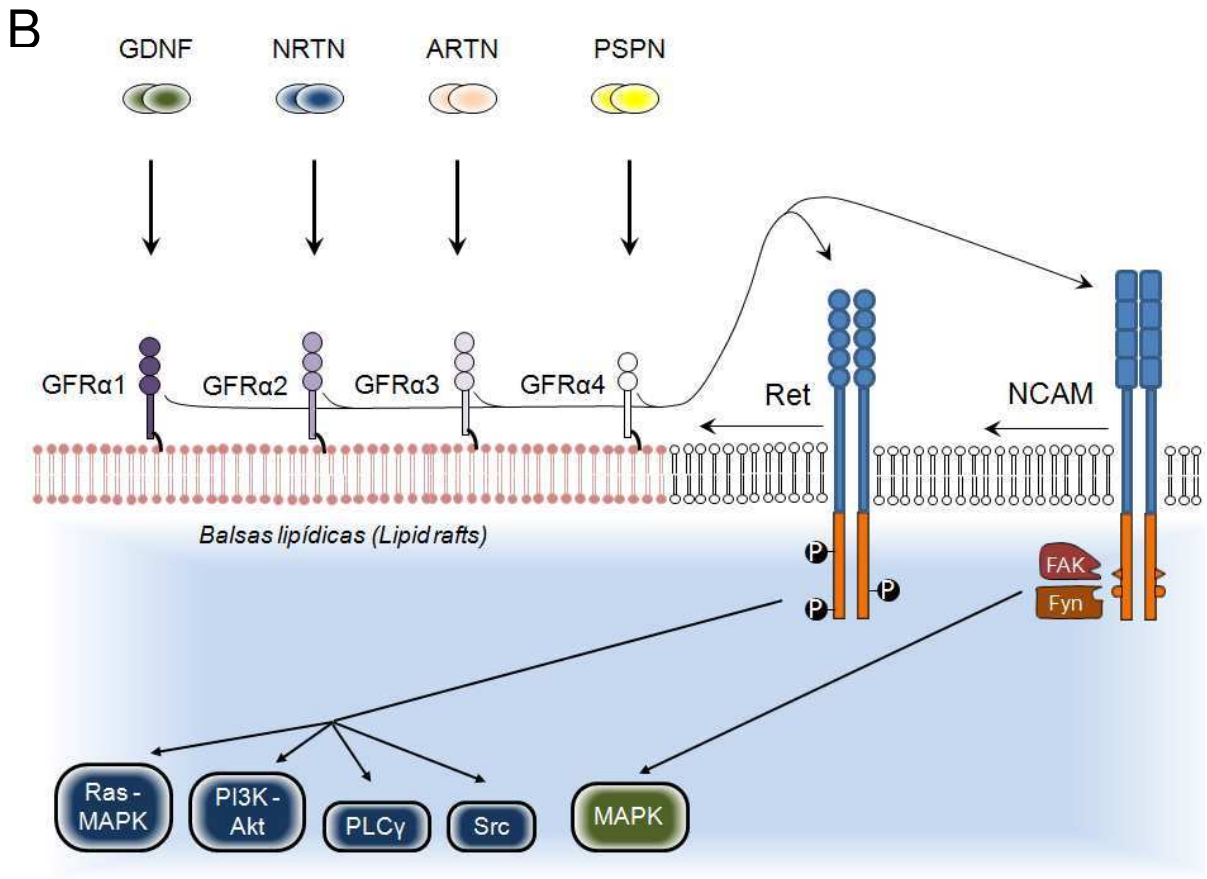


Figura 1. A) Esquema de las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3 y NT4) y sus receptores (TrkA, TrkB y TrkC). En línea continua se indica la afinidad de cada ligando por su receptor, mientras que la línea entrecortada denota menor afinidad. Los receptores Trk poseen un dominio tirosina kinasa intracelular capaz de ser autofosforilado luego de la unión al ligando (P = sitios representativos de fosforilación), evento que gatilla vías de señalización río abajo como las que se indican. A la derecha, se muestra la afinidad de las proneurotrofinas - precursores peptídicos de las neurotrofinas maduras - por el complejo de receptores $p75^{NTR}$-sortilina, con la consecuente señalización intracelular. B) Esquema de los ligandos de la familia de GDNF (GDNF, Neurturina, Artemina y Persefina) y su sistema mixto de receptores: GFRα1-4 y Ret / NCAM. Se indica la localización subcelular de los receptores GFRα en los microdominios de membrana denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*). Luego de la unión al ligando, los receptores Ret o NCAM son reclutados a dichos microdominios. En el caso de Ret este evento produce la dimerización y

transactivación de sus dominios tirosina kinasa - autofosforilación -, con la consecuente activación de las vías de señalización intracelular indicadas.

Los receptores para factores neurotróficos se expresan en distintas subpoblaciones neuronales ya sea del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico, en donde colaboran con la sobrevida, crecimiento y guiado axonal, establecimiento de conexiones neuronales y la determinación del destino celular de ciertas subpoblaciones neuronales sensoriales. [4-8] Si bien estas moléculas participan activamente en estos procesos así como en la plasticidad estructural y en la innervación de los tejidos blancos, ellos requieren en muchos casos de la cooperación de moléculas de guiado axonal y de reguladores endógenos de su actividad trófica. Así, a pesar de que Ret se encuentra expresado en casi la totalidad de las motoneuronas espinales, son también necesarias claves de guiado espaciales de axones motores como el sistema EfrinaA-EphA4 y el regulador endógeno de Ret, Linx, para guiar los axones de un subgrupo de motoneuronas hacia los músculos dorsales de los miembros inferiores. [6, 9] Por lo tanto, estos estudios demuestran la importante función que cumplen los moduladores intrínsecos de la actividad neurotrófica durante el desarrollo del sistema nervioso; los cuales actuando en determinadas subpoblaciones neuronales generan especificidad durante la formación de los circuitos neuronales. Notablemente estos mecanismos también permiten explicar como una misma vía de señalización inducida por un receptor puede controlar múltiples procesos biológicos, aumentando el repertorio de funciones celulares realizadas por un dado factor neurotrófico.

Como se ha mencionado previamente, los factores neurotróficos son capaces de ejercer sus diversos efectos biológicos a través de la activación de receptores de membrana de tipo tirosina quinasa (RTK). [10] Una vez que el ligando interactúa con dicho

receptor, éstos se dimerizan y sus residuos tirosina citoplasmáticos se autofosforilan permitiendo que se recluten una variedad de proteínas adaptadoras con dominios de unión a sitios fosfotirosina, las cuales permiten la transducción de la señal a través de vías de señalización intracelulares tales como Ras-MAPK, PI3K-Akt, PLCγ y Rho GTPasas (*positive signaling*). [1, 11-13] Recientemente, se ha observado que los RTK gatillan otro tipo de cascadas moleculares conocidas como señalización negativa (*negative signaling*), que restringen la intensidad de las señales positivas y permiten mantener la homeostasis celular. A diferencia de las vías de señalización positivas cuyo conocimiento es relativamente amplio, los mecanismos moleculares que atenúan la señalización inducida por los factores neurotróficos se encuentran actualmente bajo intenso estudio. [14, 15] Durante la última década, análisis genéticos del desarrollo así como técnicas bioquímicas y genómicas, han permitido identificar y caracterizar una serie de inhibidores específicos. [16] Estas moléculas modulatorias actúan a diferentes niveles ya sea restringiendo la unión ligando-receptor, atenuando la activación del receptor, regulando su degradación o controlando las vías de señalización específicas río abajo. Algunos de estos inhibidores actúan mediante mecanismos de retroalimentación negativa (*negative-feedback loop*), por lo que tienen la particularidad de ser inducidos por las mismas vías de señalización que luego reprimen. En este sentido, se han descripto pocos inhibidores de RTK para factores neurotróficos que sean inducidos por estos últimos.

Las evidencias permiten inferir que estos mecanismos habrían evolucionado permitiendo evitar errores de señalización que en última instancia pudieran llevar a procesos fisiológicos aberrantes y patológicos. Por lo tanto, una regulación adecuada de la actividad neurotrófica es necesaria para garantizar umbrales de activación precisos en tiempo y espacio compatibles con la fisiología celular [14, 15], ya que tanto alteraciones funcionales de estas proteínas por mutaciones en los correspondientes genes como fallas en los mecanismos que restringen su activación, podrían contribuir a la patogénesis de

ciertos tipos de cáncer y de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson, Alzheimer, Hungtinton y esclerosis lateral amiotrófica. [17-23]

En el caso de regeneración neuronal se ha visto que la axotomía promueve la secreción de factores neurotróficos y la síntesis de sus receptores en los sitios de lesión luego de un daño de los nervios periféricos, y que ello favorece su regeneración. [2, 24-26] Sin embargo, a pesar de numerosos esfuerzos invertidos, las terapias con factores neurotróficos sólo han tenido efectos limitados en promover la regeneración de ciertos tipos de neuronas del sistema nervioso central adulto. [26] Asimismo, cada vez más evidencias sostienen la existencia de barreras neuronales intrínsecas que previenen la regeneración axonal en neuronas del sistema nervioso central. [27] Estudios recientes indican que la deleción dirigida de reguladores negativos para vías de señalización inducidas por receptores de factores neurotróficos, ha permitido que las neuronas ganen potencial regenerativo luego de una lesión neuronal. [28-30] Por lo tanto, estrategias que combinen la administración de factores neurotróficos y la eliminación de la actividad de sus inhibidores endógenos, podrían representar una estrategia prometedora para potenciar la actividad trófica sobre procesos de sobrevida neuronal, regeneración axonal y recuperación funcional luego de una lesión neuronal.

Modelos celulares útiles para el estudio de factores neurotróficos: ganglios de la raíz dorsal e hipocampo

Ganglios de la raíz dorsal (DRG = dorsal root ganglia)

Los ganglios de la raíz dorsal - también llamados ganglios espinales o ganglios raquídeos - son estructuras del sistema nervioso periférico ubicadas entre las vértebras a lo largo de la médula espinal, laterales y adyacentes a la misma. Están involucrados en la percepción de estímulos dolorosos (nocicepción), estímulos mecánicos (mecanorrecepción) y la posición de los músculos (propiocepción). (Figura2) Se componen de distintos tipos celulares, entre los que se destacan neuronas pseudomonopolares, células de la glia tales como células de Schwann y células satélite, y células del teijdo conectivo. Cada neurona emite una proyección que se bifurca contactando y conectando el órgano blanco que inerva - a través de los nervios raquídeos (que incluyen las raíces ventrales de las motoneuronas) - con la médula espinal - a través de las raíces dorsales sensoriales).

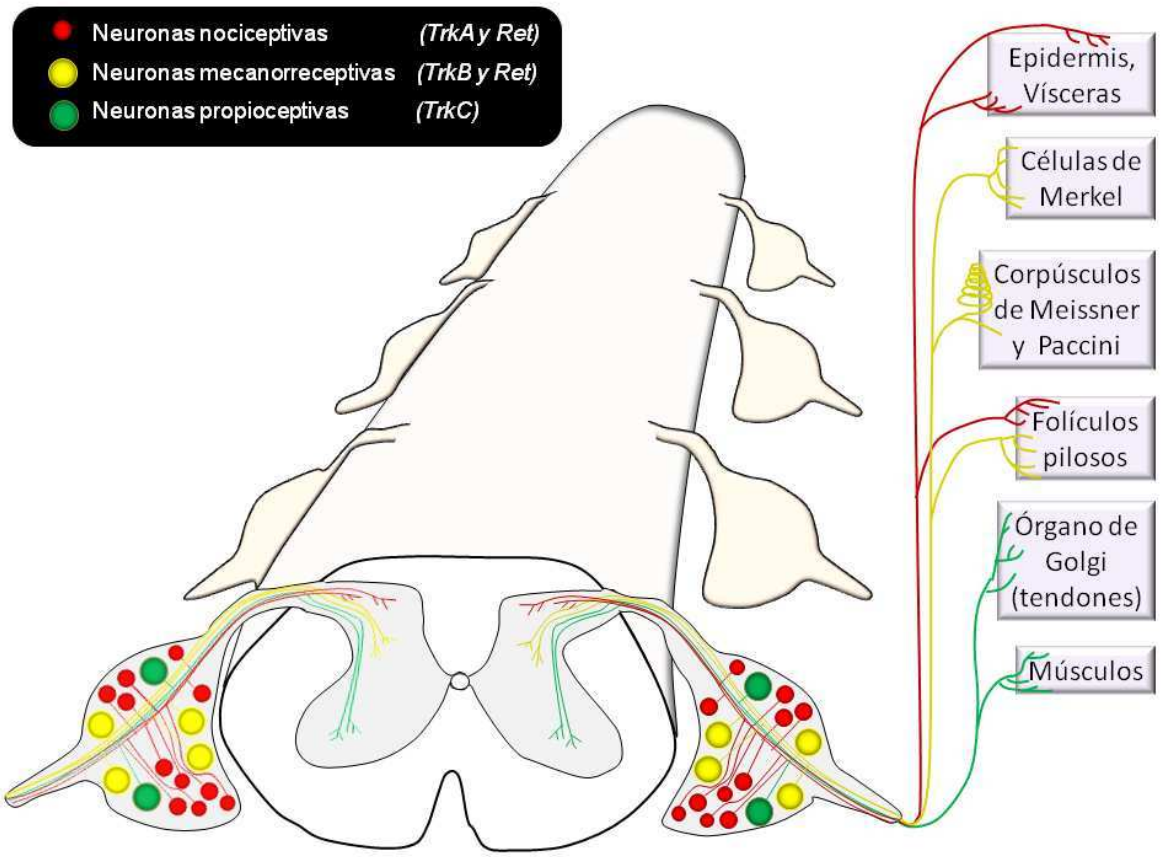


Figura 2. Esquema de la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal (DRG) ubicados en sus laterales (vista frontal y corte coronal). Por cuestiones de simplicidad, no se esquematizaron las vértebras ni las raíces ventrales (motoras) provenientes del asta anterior (ventral) de la médula espinal. Se indican las principales poblaciones neuronales según su función: nociceptivas (rojas), mecanorreceptivas (amarillas) y propioceptivas (verdes). Notar el tamaño celular y el número relativo de cada una de ellas: las nociceptivas se hayan presentes en gran número y poseen un soma neuronal pequeño y pequeño-mediano; las mecanorreceptivas poseen un soma grande, aunque se hayan en menor número; y las propioceptivas, si bien poseen un soma grande, se hayan presentes aún en menor proporción que las anteriores. A su vez, se indica los receptores para factores neurotróficos que expresa cada subpoblación neuronal (ver recuadro negro). A la derecha se enumeran las estructuras blanco que son innervadas por cada población neuronal. [31]

Están formados por un grupo heterogéneo de subpoblaciones neuronales que se diferencian entre sí por su tamaño, función y por los marcadores moleculares que expresan. Se originan a partir de células de la cresta neural que, durante el desarrollo embrionario temprano (entre E8.5 y E11 en ratón), delaminan del tubo neural dorsal y migran ventralmente, coalesciendo a intervalos regulares adyacentes al mismo, en la mitad anterior de cada somito.[31] Durante esta última etapa, comienza una especificación de destino celular dependiente del programa genético liderado por la expresión de determinados factores de transcripción - por ejemplo, neurogenina 1 y 2 -, y de receptores para factores de crecimiento específicos, los cuales se expresan en distintos tejidos y momentos del desarrollo [31, 32]. De esta forma, la identidad neuronal posicional y temporal resulta de la combinatoria de factores intrínsecos y extrínsecos. Sin embargo, para adquirir tipos neuronales únicos es importante, además de los factores de transcripción que se expresan tempranamente junto a los receptores mencionados, la represión de las señales inducidas por ellos. [31, 33]

Los genes que más tempranamente permiten identificar subpoblaciones neuronales parcialmente distintas son los receptores TrkA, TrkB, TrkC y Ret. [34] De esta forma, se ha propuesto que en E10.5 - E11.5 de ratón se pueden identificar al menos 5 tipos distintos de subpoblaciones neuronales. Siguiendo la expresión de estos marcadores desde el desarrollo temprano, es posible confeccionar una organización jerárquica de las distintas subpoblaciones de neuronas sensoriales (Figura 3).

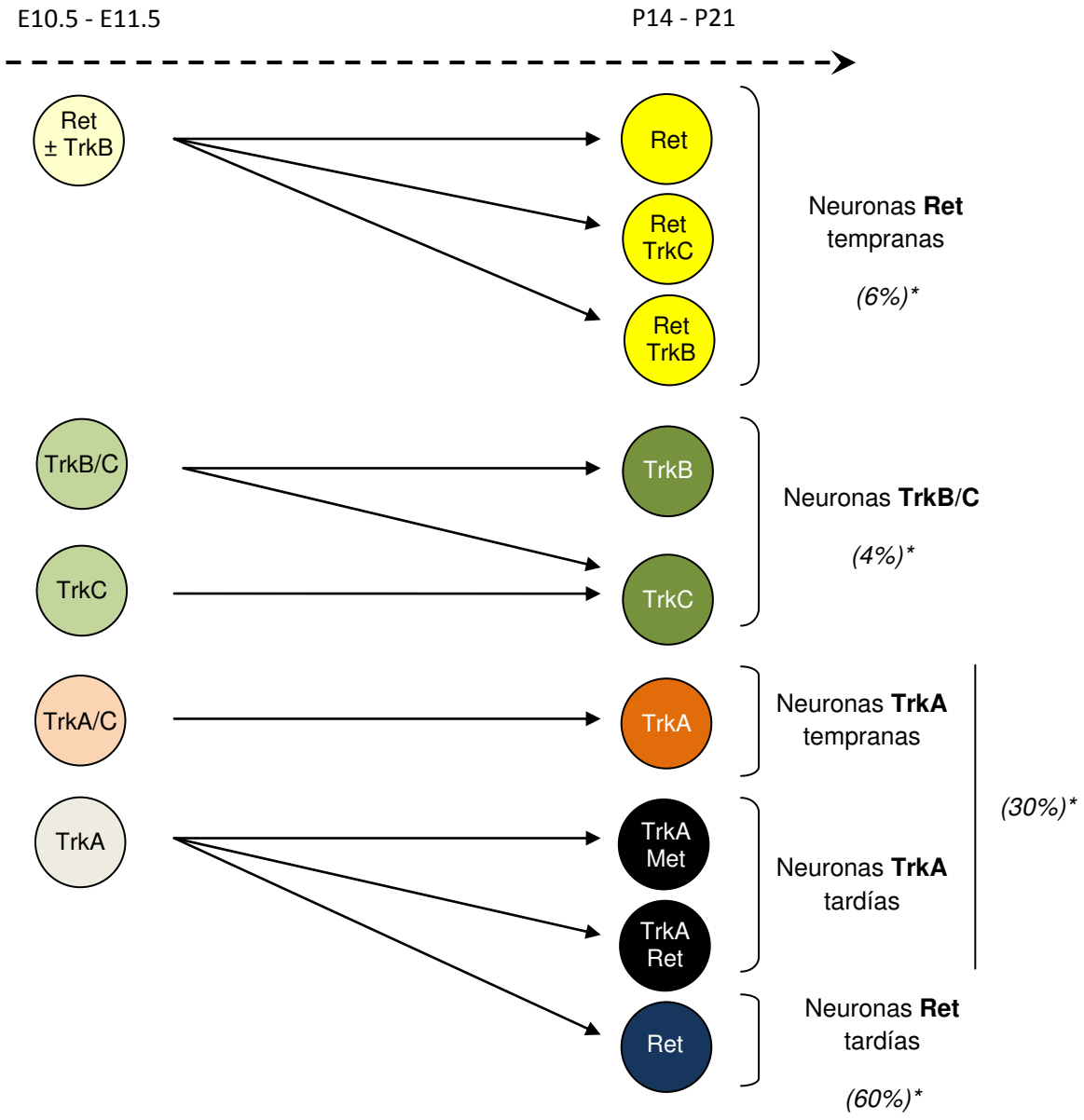


Figura 3. Diversificación neuronal de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratón durante el desarrollo. Se representan los principales linajes neuronales centrado en la expresión de los receptores para factores de crecimiento (Ret, TrkA, TrkB y TrC) desde el desarrollo embrionario temprano (E10.5 - E11.5) hasta la especificación final del destino celular (P14 - P21). E = día embrionario; P = día postnatal; *proporciones relativas aproximadas en los DRG adultos. [33]

Las neuronas Ret tempranas poseen funciones mecanosensoriales; inervan los corpúsculos de Meissner y Paccini y los folículos pilosos, participando en el sentido del tacto. Son células mielinizadas de gran diámetro, positivas para el marcador neurofilamento 200 (NF200) y coexpresan el receptor GFRα2. [34] Por otro lado, las células TrkB y TrkC son también de gran tamaño, mielinizadas y NF200+. Mientras que las TrkC poseen funciones propioceptivas - inervando los músculos y los órganos de Golgi en los tendones -, las TrkB poseen funciones mecanorreceptivas - inervando las células de Merkel y formando terminales nerviosos libres y terminales nerviosos circulares en el folículo piloso. En contraposición, se conoce poco acerca de las neuronas TrkA tempranas, las cuales formarían terminales nerviosos libres y terminales nerviosos circulares en el folículo piloso. [33]

A diferencia de los 3 linajes anteriormente descriptos, las neuronas TrkA tardías y Ret tardías son neuronas no mielinizadas de diámetro pequeño y pequeño-mediano, respectivamente; son positivas para periferina - proteína asociada a neurofilamento. Se desconocen en gran medida las características de las neuronas TrkA+/Ret+ (pertenecientes al linaje TrkA tardío). En cuanto a las neuronas TrkA+/Met+, poseen función de nocicepción respondiendo al dolor provocado por temperatura o estímulos mecánicos. Inervan el estrato espinoso de la epidermis de la piel gruesa a través de terminales nerviosos libres, los folículos pilosos a través de terminales nerviosos circulares y las vísceras. A su vez, la pérdida de expresión del factor de transcripción Runx1 durante el desarrollo embrionario (alrededor de E16.5) da lugar al perfil peptidérgico de estas neuronas - que comienzan a secretar CGRP (calcitonin gene-related peptide) y sustancia P. [33] Por último, las neuronas Ret tardías poseen una función nociceptiva y pruriceptiva. Inervan a través de terminales nerviosos libres el estrato granuloso de la epidermis de la piel gruesa - es decir, una capa más superficial de la

epidermis que las TrkA tardías. Tienen un perfil no peptidérgico IB4+ - debido a la expresión de Runx1 - y, a partir del primer día postnatal, comienzan a extinguir la expresión de TrkA - culminando entre la segunda y tercer semana postnatal. [35]

Una cuestión central en la especificación de los subtipos neuronales no mielinizados involucrados en la nocicepción, es la dinámica de transición de expresión del receptor TrkA a Ret en el linaje de neuronas Ret tardías - que llegan a representar el 60% de neuronas de los DRG adultos, y el 90% de neuronas Ret+. [35] Como se mencionó anteriormente, en el desarrollo embrionario temprano un grupo de neuronas TrkA+ da origen a los linajes TrkA tardías y Ret tardías (Fig.1). Estas últimas inician un proceso gradual de expresión de Ret - y de los correceptores GFRα1, GFRα2 y GFRα3 -, responsable de la extinción de TrkA; inicia alrededor de E16 y culmina en las primeras 2 ó 3 semanas de vida postnatal en el ratón. [8]

La segregación de las células TrkA+ y Ret+ es liderada en gran medida por NGF. Los primeros terminales nerviosos que invervan la piel (E14.5) encuentran distintos niveles de esta neurotrofina de acuerdo a la capa en la que terminan. Las capas superficiales poseerían niveles más altos de NGF, mientras que las inferiores tendrían niveles más bajos. De esta forma, niveles elevados de NGF regularían retrógradamente, a través de su receptor TrkA y la inducción del factor de transcripción Runx1, la expresión de Ret - y los correceptores GFRα1 y GFRα2 - cuya vía de señalización, a su vez, es crítica para adquirir el fenotipo no peptidérgico de estas neuronas: extinción postnatal de TrkA (en la mayoría de las neuronas), mayor tamaño celular, expresión de genes específicos *Trp* y *Mgr* (parcialmente independiente de la señalización de Ret) e innervación de la epidermis. [8] Aunque algunos ensayos *in vitro* mostraron una fuerte dependencia de los ligandos de la familia de GDNF para la sobrevida de estas neuronas [36], estudios *in vivo* más recientes aportaron evidencias a favor de que la vía de

señalización de Ret inducida por estos ligandos no sería necesaria para dicho proceso. [8] De las neuronas Ret+ alrededor del 60% expresan GFRα2, 18% GFRα1 y 13% GFRα3 a P14, mientras que ninguna expresa GFRα4. Las neuronas GFRα2 son aquellas que coexpresan niveles más altos de Ret y cuya expresión se induce más fuertemente en los primeros días postnatales. [8]

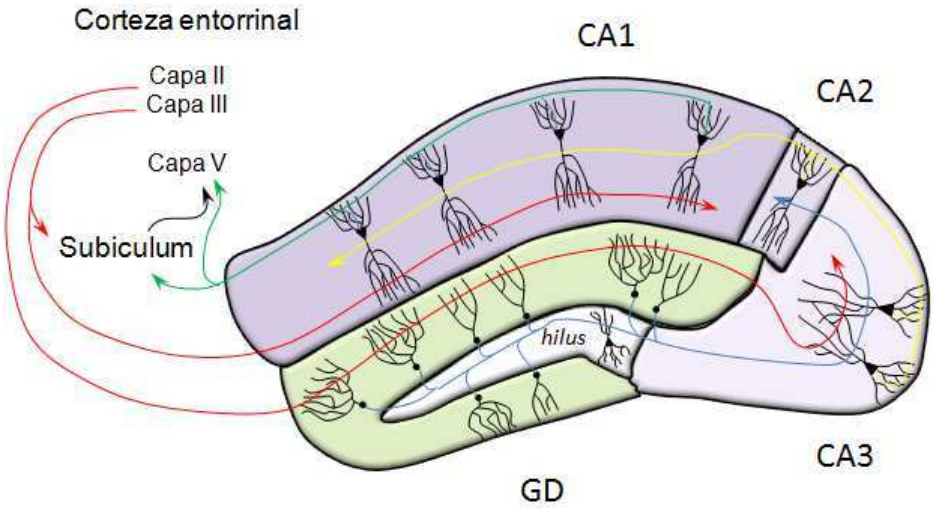
Finalmente, cabe destacar que la señalización inducida por los factores neurotróficos así como la expresión de sus receptores, forman una red regulatoria génica que involucra procesos de retroalimentación positiva y procesos de represión cruzada. Teniendo en cuenta todas las evidencias mencionadas, los DRG conforman un modelo adecuado para comprender no sólo la diversificación neuronal y la especificación de subtipos neuronales característicos, sino también la regulación de las vías de señalización inducidas por factores neurotróficos y sus receptores.

Hipocampo

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central de mamíferos con una forma característica de banana. En roedores está ubicado desde la línea media del cerebro próximo al núcleo septal - zona rostrodorsal -, por encima y detrás del tálamo, hasta el lóbulo temporal - zona caudoventral (Figura 4A). Si bien se encuentran diferencias sustanciales entre el hipocampo de distintas especies, su arquitectura básica se ha mantenido evolutivamente, como lo indican estudios anatómicos e histológicos realizados en rata, mono y humano. Es un área cerebral que se distingue por su organización celular laminar y, al ser una estructura con límites bien definidos, se ha convertido en un excelente modelo para realizar estudios morfológicos y funcionales. [37]

La formación hipocampal está compuesta de 4 regiones: el hipocampo propiamente dicho - que comprende las áreas CA1, CA2 y CA3 -, el giro dentado, el área subicular - subiculum, presubiculum y parasubiculum - y la corteza entorrinal. A diferencia de la neocorteza, en donde abundan las conexiones recíprocas entre regiones, la formación hipocampal forma una vía unidireccional excitatoria. De esta forma, la corteza entorrinal proyecta hacia el giro dentado y CA3 (vía perforante), el giro dentado se conecta con CA3 a través de las fibras musgosas (*mossy fibers*), CA3 con CA1 a través de los colaterales de Schaffer, CA1 con el subiculum y, por último, ambas áreas proyectan hacia la corteza entorrinal (Figura 4A). [37]

A


Corteza entorrinal
CA1
Capa II
Capa III
CA2
Capa V
Subiculum
hilus
CA3
GD

B

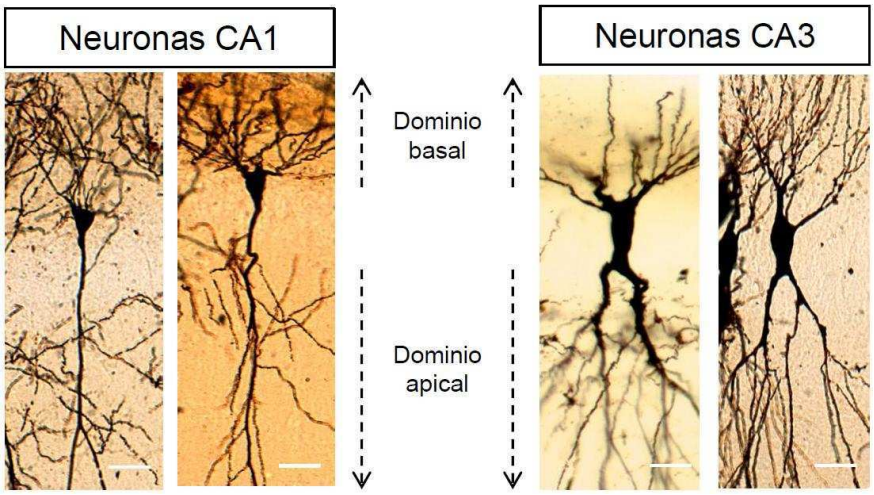

Neuronas CA1
Neuronas CA3
Dominio basal
Dominio apical

Figura 4. A. *Derecha:* vista dorsal y lateral de cerebro de ratón en donde se muestra la anatomía general y localización de ambos hipocampos (azul). La línea punteada indica un plano de corte coronal, a partir del cual puede evidenciarse las zona CA1, CA2, CA3 y giro dentado. *Izquierda:* Fotomicrografía de corte coronal de hipocampo de ratón de día postnatal 40 (P40) teñido con la técnica de Golgi. La línea punteada azul indica la fisura hipocampal (límite entre CA1 y giro dentado) Barra de escala: 500 µm. Debajo se muestra un dibujo esquemático de las distintas subregiones del hipocampo CA1, CA2 y CA3, y giro dentado, junto con las principales conexiones axonales entre ellas. Flecha roja: vía perforante; flecha azul: fibras musgosas; flecha amarilla: colaterales de Schaffer; flecha verde: conexión CA1-subiculum y CA1-corteza entorrinal. B. Fotomicrografía de neuronas CA1 y CA3 de ratón P40 teñidas con la técnica de Golgi. Se indica el dominio dendrítico basal y el dominio dendrítico apical. Notar el menor tamaño del soma de las neuronas de CA1, así como su mayor homogeneidad morfológica. Barra de escala: 30 µm.

Las neuronas del hipocampo y del giro dentado son principalmente glutamatérgicas y sus cuerpos celulares se ubican formando una única capa de somas. Cabe destacar que, aunque en menor número, también se haya presente un grupo heterogéneos de interneuronas GABAérgicas. Desde el punto de vista celular, las regiones CA1, CA2 y CA3 están compuestas en su mayoría por neuronas de tipo piramidal. Poseen un cuerpo celular triangular y un árbol dendrítico que se puede subdividir en una zona basal (más alejada de la fisura hipocampal) y una zona apical (próxima a la fisura hipocampal). Las neuronas de CA2 y CA3 poseen un tamaño mayor que las de CA1 y, a su vez, son más heterogéneas desde el punto de vista de su árbol dendrítico (Figura 4B). Por otro lado, las neuronas CA3, a diferencia de las CA2, poseen racimos de espinas sinápticas -conocidas como excrecencias espinosas (thorny excrescences) - en su porción apical proximal del árbol dendrítico. [37] Por su parte, el giro dentado está compuesto principalmente por

neuronas granulares que, en roedores, presentan sólo dendritas apicales. Es una región del cerebro caracterizada por presentar neurogénesis adulta. [38]

Embriológicamente el hipocampo se origina entre E10 y E18 en ratón y entre E16 y E21 en rata y continúa madurando hasta adquirir su citoarquitectura final en el adulto. [37] La neurogénesis tiene lugar en los últimos días del desarrollo embrionario y, posteriormente, durante las primeras dos semanas postnatales ocurre la mayor proporción de dendritogénesis y crecimiento dendrítico (Figura 5). Sin embargo, el desarrollo global del hipocampo resulta de una sumatoria de procesos que transcurren en paralelo a distintos tiempos. En particular, la neurogénesis de las interneuronas GABAérgicas finaliza en el día embrionario 15 [39], mientras que la producción de neuronas piramidales termina en el día embrionario 18 del hipocampo de ratón. A su vez, los axones de la corteza entorrinal medial y lateral, la principal aferencia excitatoria, arriban a la capa molecular del giro dentado recién a mediados de la primera semana de desarrollo postnatal [40]. Sin embargo, la capa de neuronas granulares del giro dentado se desarrolla en un 80 % durante las primeras semanas postnatales y continúa generando neuronas durante toda la vida del individuo, si bien la tasa de neurogénesis disminuye drásticamente con el envejecimiento.

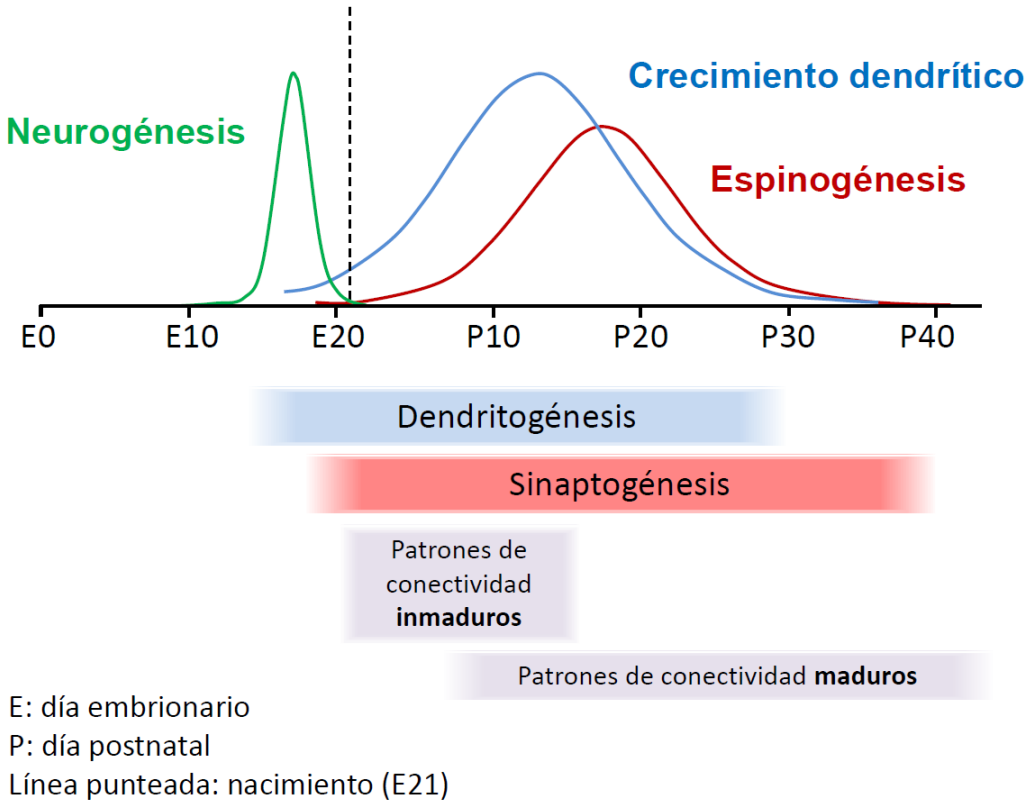


Figura 5. Esquema que muestra la escala temporal de los principales procesos del desarrollo neuronal en el hipocampo de rata. *Adaptado de Yehezkel Ben-Ari et al (2007). Physiol Rev 87: 1215–1284.* [41]

El hipocampo desempeña un rol importante - y ampliamente estudiado - en los procesos de aprendizaje y memoria, aunque tendría otras funciones como por ejemplo la modulación de la respuesta al estrés (conexión inhibitoria con hipotálamo). [37] Recientemente, se ha identificado un rol preferencial de la región CA2 en la formación de memorias sociales, emocionales y temporales, en contraposición al clásico rol de CA1 y CA3 en la formación de memorias espaciales. [42, 43]

Por último, desde el punto de vista de los factores neurotróficos, BDNF es la neurotrofina - junto con su receptor TrkB - que se encuentra más altamente enriquecida

en áreas cerebrales involucradas en aprendizaje y memoria, y en regiones que presentan alta excitabilidad y plasticidad neuronal, tales como el hipocampo y la corteza. Esta neurotrofina controla el desarrollo de la conectividad hipocampal, regulando la diferenciación morfológica, la arborización dendrítica, la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal. [1, 44-49] Notablemente, cambios modestos en los niveles de BDNF o la expresión de la variante polimórfica Val66Met del gen de *bdnf,* correlacionan con alteraciones neuroanatómicas y cambios conductuales relacionados con la estructura hipocampal como por ejemplo déficits cognitivos, ansiedad, depresión y alteraciones en el comportamiento social. [50-54] A su vez, la sobreexpresión de BDNF en hipocampo y corteza entorrinal causan problemas de aprendizaje y aumento en la excitabilidad neuronal. [55]

Estos importantes efectos estructurales, conductuales y cognitivos sugieren que la actividad de esta neurotrofina y de su receptor deben estar precisamente regulados en tiempo y espacio de manera de permitir el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Debido a estas evidencias, nosotros utilizamos la estructura hipocampal para investigar nuevos mecanismos regulatorios de la actividad de BDNF y de su receptor TrkB, de forma tal de dilucidar la relevancia de los mismos para el desarrollo, función y plasticidad hipocampal.

CAPÍTULO 1: Sprouty 4 como regulador endógeno de las vías de señalización inducidas por la neurotrofina NGF y su receptor TrkA

Introducción

Durante los últimos años, las proteínas de la familia Sprouty (Spry 1, 2, 3 y 4) han emergido como reguladores negativos de diversos factores tróficos [56, 57]. Sprouty fue inicialmente descripto como un inhibidor de la bifurcación traqueal estimulada por el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) durante el desarrollo de *Drosophila*. [58,59] Estudios posteriores revelaron que el genoma de mamíferos contiene 4 genes Sprouty que codifican para proteínas de 32-34 KDa. A su vez, se ha reportado que los factores tróficos son capaces de regular la actividad de las proteínas Spry induciendo su expresión y promoviendo su fosforilación en residuos tirosina críticos para su función. [56 59]

Los resultados obtenidos a partir del estudio de las proteínas Sprouty, indican que dichas moléculas inhiben específicamente la vía Ras-MAPK de una variedad de factores tróficos incluyendo FGF [58-60] , BDNF [61] , GDNF [62] , PDGF [63] y VEGF [64] , aunque no afecta la vía de MAPK activada por EGF [65, 66]. El mecanismo molecular por el cual Sprouty antagoniza dicha señalización es aún desconocido, y dependería del contexto celular o del RTK involucrado. Notablemente, se ha reportado que Sprouty2 potencia los efectos biológicos inducidos por EGF, inhibiendo la ubiquitinación y degradación de su receptor EGFR [67-69]. Esto sugiere que el rol de las proteínas Spry en la señalización gatillada por los RTKs es aún controversial ya que podrían modularlos en forma tanto positiva como negativa.

A pesar de la importancia biológica de NGF para el desarrollo y función del sistema nervioso, los mecanismos moleculares que controlan su señalización, a través de su receptor TrkA, no están completamente comprendidos. Evidencias previas han

demostrado que la expresión de Sprouty 4, pero no de Sprouty 1 y 2, podía ser inducida luego del tratamiento con NGF de células PC12 (línea celular de feocromocitoma de rata ampliamente utilizada para ensayos de diferenciación neuronal) [63, 65, 66]. Sin embargo, la contribución funcional de esta proteína para la señalización y efectos biológicos inducidos por NGF no ha sido aún explorada. Por lo tanto, debido a estas evidencias y basados en ensayos previos de *microarrays* sobre células estimuladas con NGF, decidimos investigar si Sprouty 4 podría cumplir un rol importante en el control de la actividad neurotrófica de este ligando.

En este estudio determinamos que Sprouty 4 es una proteína cuya expresión es inducida por TrkA, y que restringe la activación de las vías de MAPK y Rac1 y la diferenciación neuronal (de células PC12 y cultivos primarios de DRG) inducidas por NGF. A nivel molecular, identificamos que la tirosina 53 (Tyr-53) de Spry4 es esencial para su función inhibitoria.

Resultados

Estudios recientes que analizaron los mecanismos que restrigen las vías de señalización inducidas por receptores tirosina kinasa, revelaron la importancia de dicho control a través de mecanismos de retroalimentación negativa, de forma tal de alcanzar umbrales de activación compatibles con respuestas fisiológicas. Basados en este concepto, analizamos si Sprouty4 (Spry4) era capaz de ser inducido en células neuronales tratadas con NGF. A través de ensayos de RT-PCR en tiempo real (RT-PCR cuantitativa / qRT-PCR), observamos un aumento significativo de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de *Spry4* en células PC12 estimuladas con NGF (**Figura 6A, panel izquierdo**). Sin embargo, los ARNm de los otros dos miembros de la familia, Sprouty1 y 2, no fueron detectados en células PC12 en presencia o ausencia de NGF (**Figura 6A,**

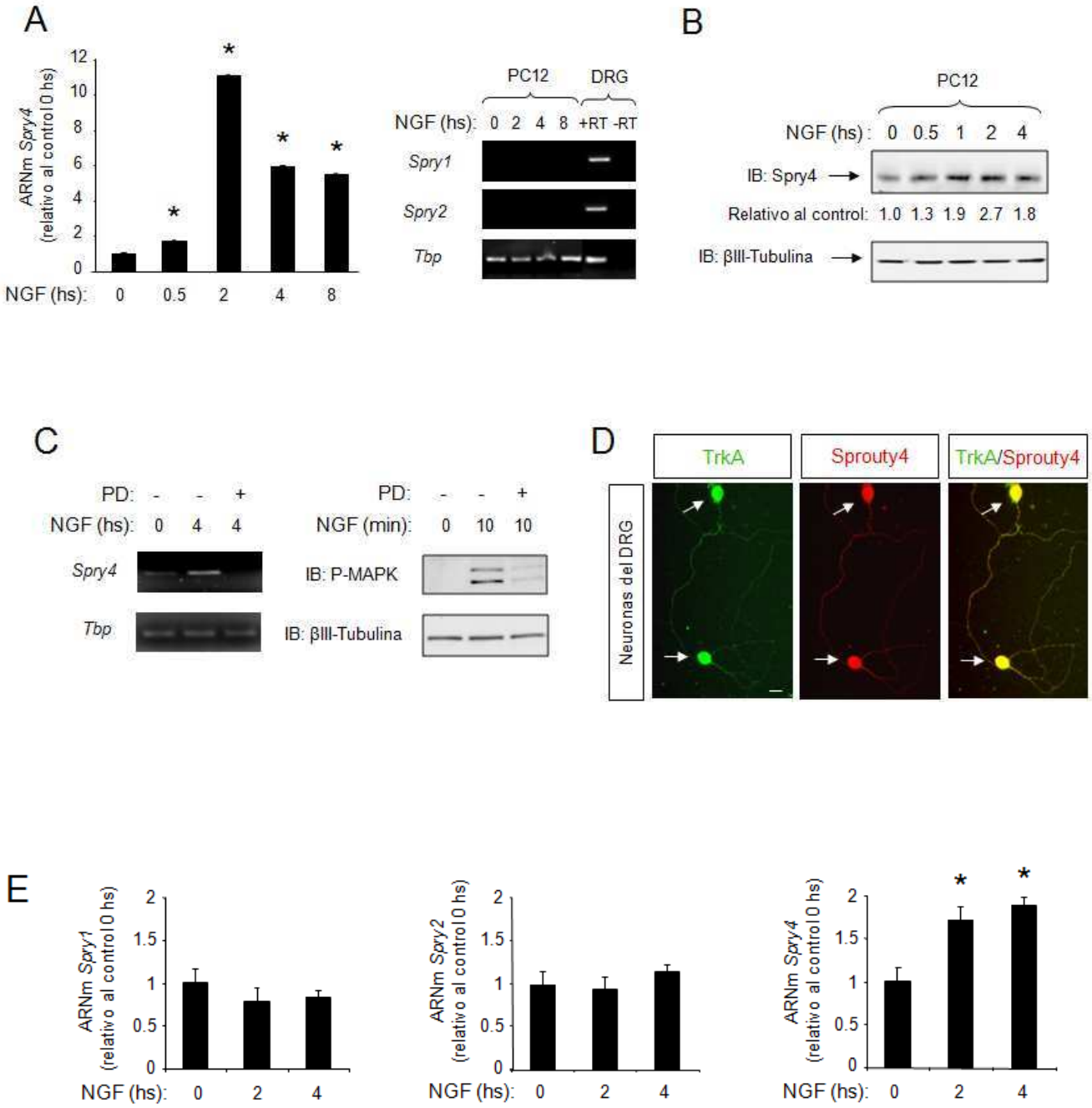
panel derecho). La inducción de la proteína Spry4 fue confirmada a través de western blot de lisados celulares de PC12 estimulados con NGF (**Figura 6B**).

Estudios previos muestran que la activación de la vía de Erk/MAPK inducida por bFGF promueve la expresión de Spry4 en cultivos celulares [65]. Para examinar esta posibilidad, previo a la estimulación con NGF se incubaron células PC12 en ausencia o presencia de PD98059, un inhibidor específico de MEK (molécula directamente involucrada en la vía de Erk/MAPK). Los niveles del ARNm de *Spry4* fueron evaluados por RT-PCR. Como se observa en la **Figura 6C (panel izquierdo)**, el pretratamiento farmacológico con PD98059 inhibió la inducción de Spry4 por NGF, indicando que la vía de MAPK es necesaria para dicho fenómeno. Asimismo, se controló la actividad inhibitoria del fármaco por western blot, analizando la activación de MAPK (P-MAPK) en células PC12 tratadas con NGF (**Figura 6C, panel derecho**).

Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) son estructuras del sistema nervioso periférico ubicados adyacentes a la columna vertebral, cuyas neuronas son altamente dependientes de NGF para su sobrevida y diferenciación durante el desarrollo embrionario [1]. Por lo tanto, para investigar un posible rol fisiológico de Spry4 en la señalización inducida por NGF, analizamos si Spry4 y el receptor TrkA se encontraban coexpresados en las neuronas de esos ganglios. De esta forma, neuronas primarias obtenidas de DRG de rata de E14.5 (día embrionario 14.5) fueron cultivadas y teñidas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Spry4 y anti-TrkA. Dicha tinción reveló una fuerte colocalización entre ambas moléculas (**Figura 6D**).

Usando RT-PCR en tiempo real analizamos el patrón de expresión de los ARNm de *Spry1*, *Spry2* y *Spry4* en células primarias de DRGs estimuladas con NGF. En estos experimentos, sólo detectamos un aumento significativo en la expresión del ARNm de *Spry4* en respuesta a NGF, no así en la de *Spry1* ni *Spry2* (**Figura 6E**). Por lo tanto, esta inducción específica indicaría que Spry4 podría desempeñar un rol fisiológico en el

desarrollo y función de las neuronas de los DRG mediado por el sistema NGF-TrkA. Cabe destacar que el ARNm de *Spry3* no se analizó debido a que un trabajo previo indica la ausencia de su expresión en los DRG. [70]



<u>Figura 6:</u> NGF induce la expresión de Sprouty4 en células neuronales.

A) *Panel izquierdo:* análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Sprouty4 (Spry4)* por PCR en tiempo real en células PC12 tratadas con NGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles del ARNm de *Spry4* fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). Se muestra el promedio ± desvío estándar de determinaciones por triplicado. *p<0,001 contra el grupo control, 0 hs NGF (ANOVA de una vía seguida del test de Dunnett). *Panel derecho:* expresión de los ARNm de *Spry1* y *Spry2* evaluada por RT-PCR (35 ciclos) en células PC12 estimuladas con NGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Como control positivo de expresión se muestra el ARNm de células disociadas ganglios de la raíz dorsal (DRG) de embriones de rata (E14.5), en presencia y ausencia de retrotranscriptasa (RT). Se muestra la expresión del gen constitutivo *Tbp* como control de carga. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

B) Western blot de la expresión de Spry4 en células PC12 tratadas con NGF (50 ng/ml). Se indica el grado de cambio de la proteína Spry4 con respecto al control de carga (niveles de βIII-tubulina).

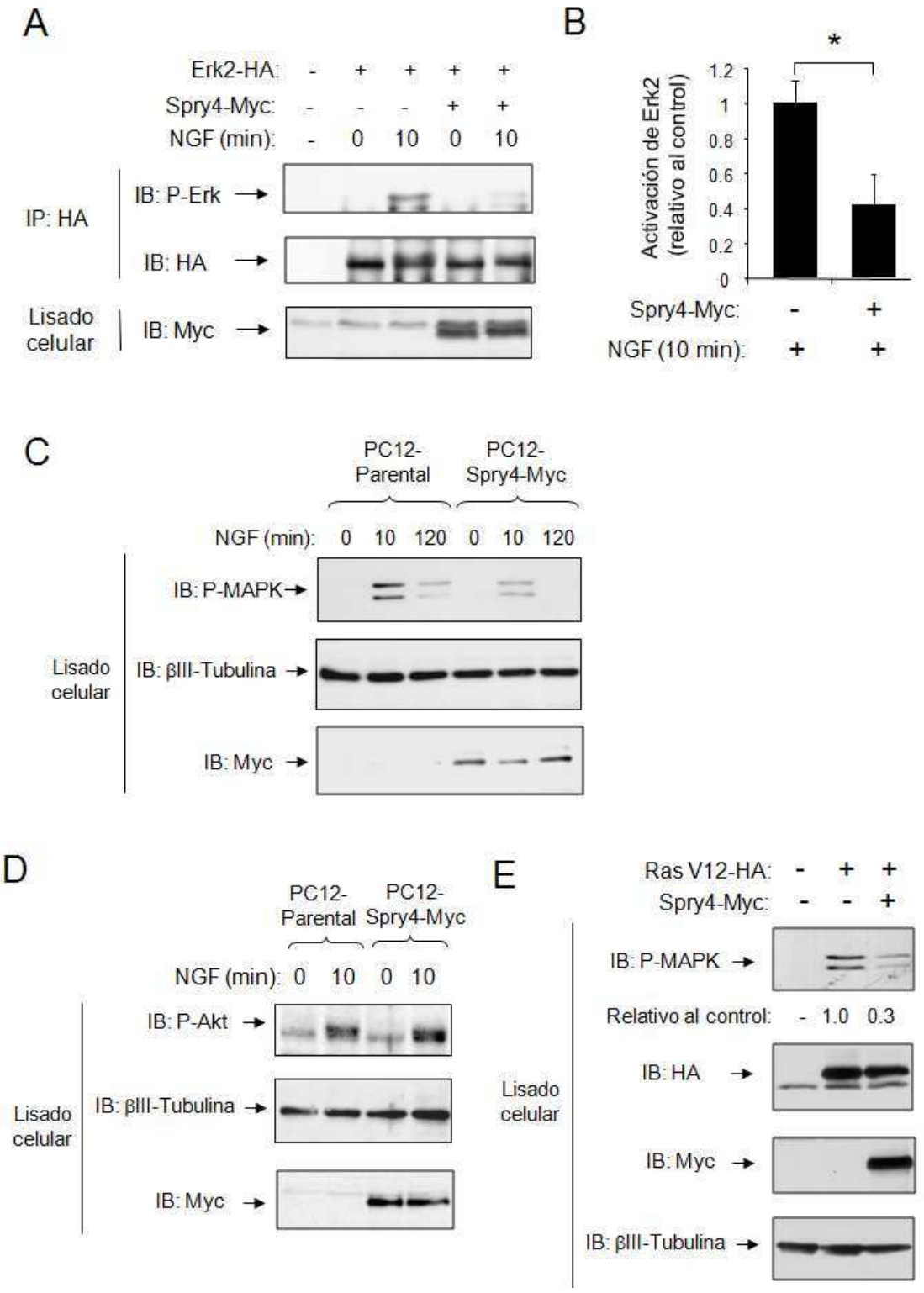
C) Panel izquierdo: expresión del ARNm de *Spry4* examinado por RT-PCR (27 ciclos) en células PC12 tratadas con el inhibidor específico de MEK PD98059 (50μM) y estimuladas con NGF (50 ng/ml). Se muestra como control de carga la expresión de *Tbp*. Panel derecho: se muestra un experimento control realizado en paralelo para verificar la actividad inhibitoria de PD98059 (50 μM) sobre la vía de MAPK a través de un inmunoblot (IB) para P-MAPK de células PC12 estimuladas por 10 minutos con NGF (50 ng/ml). Se reprobó con anticuerpo anti βIII-tubulina como control de carga.

D) Colocalización de Spry4 y TrkA por inmunofluorescencia en neuronas disociadas de DRG obtenidas de embriones de rata (E14.5). Barra de escala: 10 μm.

E) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Spry1*, *Spry2* y *Spry4* por PCR en tiempo real de neuronas de DRG tratadas con NGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de los ARNm de Spry fueron normalizados utilizando la expresión de *Tbp*. Se indican promedios ± desvío estándar de determinaciones por triplicado. *p<0.01 contra el grupo control, 0 hs NGF (ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett).

Para establecer si Spry4 podía modular la señalización activada por NGF-TrkA, investigamos su rol en diferentes vías de señalización inducidas por este sistema ligando-receptor. Como se ha mencionado previamente, TrkA, así como otros RTK, activa una serie de vías de señalización canónicas intracelulares entre las que se encuentran la de Ras-MAPK, PI3K-Akt, PLCγ y GTPasas de la familia Rho como RhoA, cdc42 y Rac1. Por lo tanto, en primer lugar decidimos analizar si Spry4 podía regular una de las vías más estudiadas como es la de Erk/MAPK. Para ello, transfectamos transientemente células PC12 con un plásmido de Erk2 etiquetado con el epítope hemaglutinina HA (Erk2-HA) junto con un vector control o Spry4 etiquetado con Myc (Spry4-Myc). Luego de 36 horas, las células fueron hambreadas (con medio sin suero) y estimuladas con NGF durante 10 minutos. Los niveles de activación de Erk2 (Erk2 fosforilado / P-Erk2) fueron evaluados luego de una inmunoprecipitación con anticuerpos anti HA seguida de inmunblot con un anticuerpo anti-P-MAPK (que reconoce las formas fosforiladas y activadas de Erk1 y Erk2). Las células PC12 transfectadas con Spry4-Myc mostraron una reducción significativa en la activación de Erk2 en comparación con las células control (**Figura 7A y 7B**). Se obtuvieron resultados similares al comparar la activación endógena de MAPK dependiente de NGF en extractos celulares obtenidos a partir de células PC12 parentales y clones que sobreexpresan Spry4 en forma estable (PC12-Spry4) (**Figura 7C**). Por el contrario, Spry4 no redujo la activación de Akt inducida por NGF en los mismos clones (**Figura 7D**), revelando a la vía de Ras-MAPK como un blanco específico de Sprouty4.

De forma tal de explorar a qué nivel Spry4 podría restringir la activación de MAPK, coexpresamos una versión constitutivamente activa de Ras (Ras-V12) junto con Spry4-Myc en células PC12. En este experimento, Spry4 fue capaz de reducir la activación de MAPK independiente de ligando debido al Ras-V12, indicando que la inhibición de Spry4 sobre MAPK ocurre río abajo de Ras (**Figura 7E**).


A
Erk2-HA: - + + + +
Spry4-Myc: - - - + +
NGF (min): - 0 10 0 10
IP: HA
IB: P-Erk
IB: HA
Lisado celular
IB: Myc
B
*
Activación de Erk2 (relativo al control)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Spry4-Myc: - +
NGF (10 min): + +
C
PC12-Parental
PC12-Spry4-Myc
NGF (min): 0 10 120 0 10 120
IB: P-MAPK
Lisado celular
IB: βIII-Tubulina
IB: Myc
D
PC12-Parental
PC12-Spry4-Myc
NGF (min): 0 10 0 10
IB: P-Akt
Lisado celular
IB: βIII-Tubulina
IB: Myc
E
Ras V12-HA: - + +
Spry4-Myc: - - +
IB: P-MAPK
Relativo al control: - 1.0 0.3
IB: HA
Lisado celular
IB: Myc
IB: βIII-Tubulina

<u>Figura 7:</u> Sprouty4 restringe la activación de Erk/MAPK en respuesta a NGF.

A) Se evaluó la actividad de Erk2/MAPK (fosfo-Erk2/MAPK) transfectando transientemente células PC12 con el plásmido de Erk2 etiquetado con HA, junto con un plásmido control o un vector de Spry4 etiquetado con Myc. Luego de 36 hs las células fueron mantenidas en medio sin suero y estimuladas con o sin NGF (50 ng/ml) por 10 minutos. El nivel de activación de Erk2 (P-Erk2) fue evaluado por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti HA seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti P-Erk/MAPK. El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti HA y anti Myc para evaluar los niveles totales de Erk2-HA y Spry4-Myc, respectivamente.

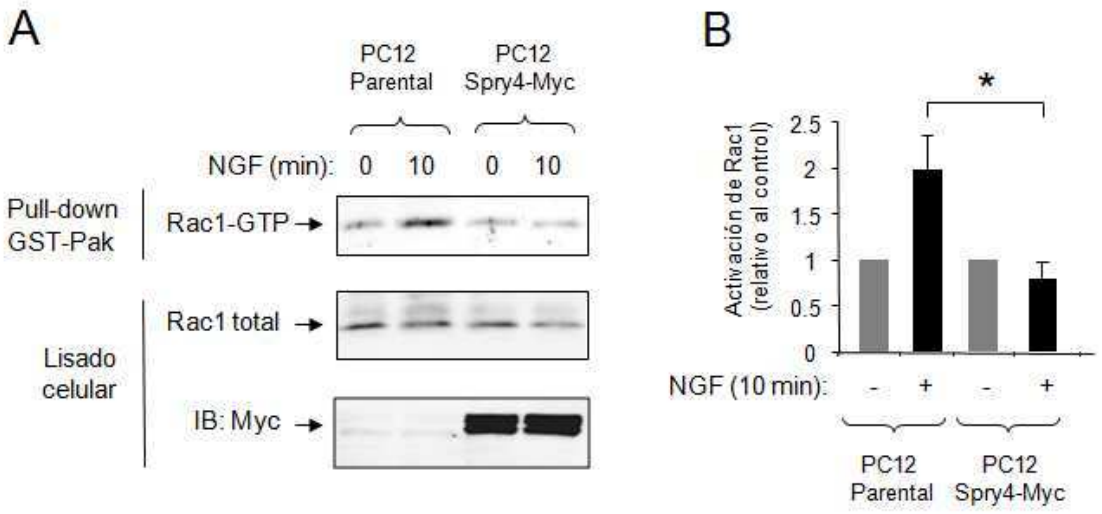
B) Gráfico que muestra la cuantificación de la activación de Erk2/MAPK. El resultado representa promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes. *$p<0.05$ (test de Student).

C) Activación endógena de Erk/MAPK (P-MAPK) por inmunoblot (IB) de lisados celulares de PC12 parentales y clon de PC12 sobreexpresando en forma estable Spry4-Myc (clon S2), tratados con NGF (50 ng/ml). El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti βIII tubulina (como control de carga) y anti Myc (para evaluar los niveles totales de Spry4-Myc).

D) Activación de Akt (P-Akt) por inmunoblot (IB) de lisados celulares de PC12 parentales y PC12 transfectadas establemente con Spry4-Myc (clon S2), tratadas con NGF (50 ng/ml). El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti βIII tubulina (como control de carga) y anti Myc (para evaluar los niveles totales de Spry4-Myc).

E) La activación de Erk/MAPK (P-MAPK) independiente de ligando, fue evaluada transfectando células PC12 en forma transiente con un plásmido de Ras-V12 (Ras constitutivamente activo) etiquetado con HA, junto con un vector control o Spry4-Myc. Luego de 36 hs las células fueron mantenidas en medio sin suero y los niveles de activación de Erk/MAPK (P-MAPK) fueron evaluados por inmunoblot (IB). El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti HA, anti Myc y anti βIII tubulina. Se indica el nivel de P-MAPK normalizado al control de carga (niveles de βIII-tubulina) y Ras-V12.

Las GTPasas de tipo Rho, que incluyen a RhoA, Rac1 y Cdc42 son proteínas críticas en la transducción de las señales de las neurotrofinas al citoesqueleto de actina [71]. En particular, ha sido descripto que el crecimiento neurítico inducido por NGF-TrkA es mediado por la activación de Rac1 [72, 73]. Teniendo en cuenta que previamente ha sido reportado que Spry2 regula la migración de células epiteliales del intestino de rata, inhibiendo específicamente la activación de Rac1 y no así la de GTPasas Cdc42 [74], evaluamos si Spry4 era capaz de regular la activación de Rac1 inducida por NGF. Para ello utilizamos células PC12 parentales y células PC12 que sobreexpresan establemente Spry4-Myc, y medimos el nivel de Rac1 activado (Rac1-GTP) utilizando un ensayo de precipitación por afinidad (*pull-down assay*) con el dominio de unión a Rac1-GTP de la proteína Pak, etiquetado con GST. Como se ha descripto previamente, Rac1 se activó luego de la estimulación por 10 minutos con NGF en células PC12. Sin embargo, la activación de Rac1 fue reducida significativamente en las células PC12-Spry4, indicando que Spry4 regula negativamente la activación de Rac1 inducida por NGF (**Figura 8A, 8B y 8C**). Más aún, esta interacción funcional se ve reforzada por ensayos de coinmunoprecipitación donde observamos la interacción específica de Spry4 y Rac1, lo cual indicaría que ambas moléculas se asocian directamente (**Figura 8D**).



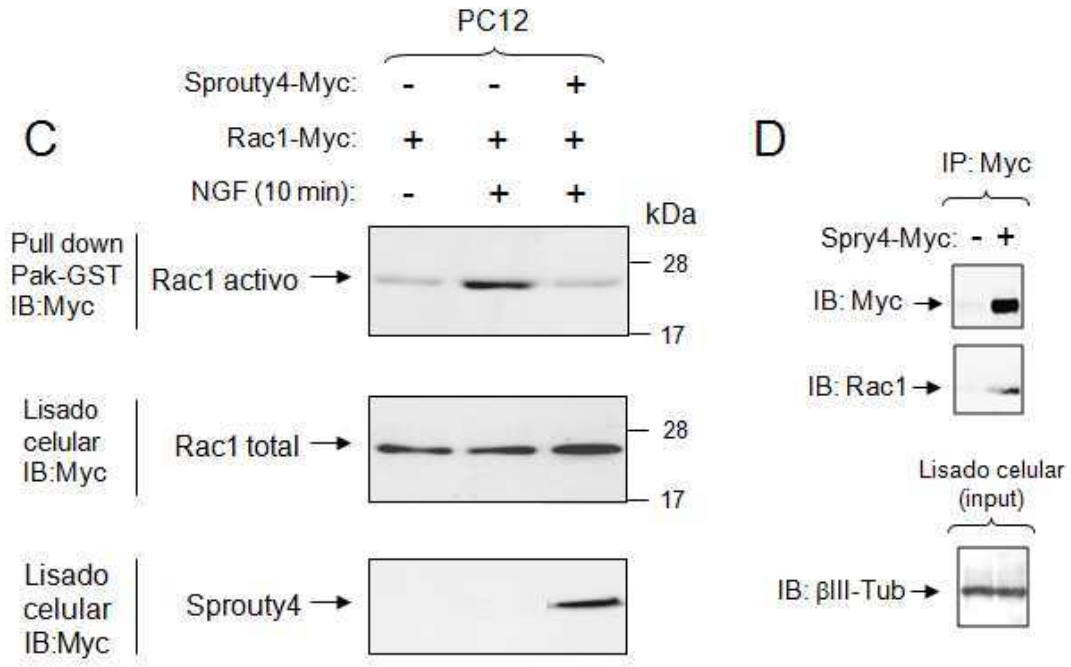


Figura 8: Sprouty4 restringe la activación de Rac1 en respuesta a NGF.

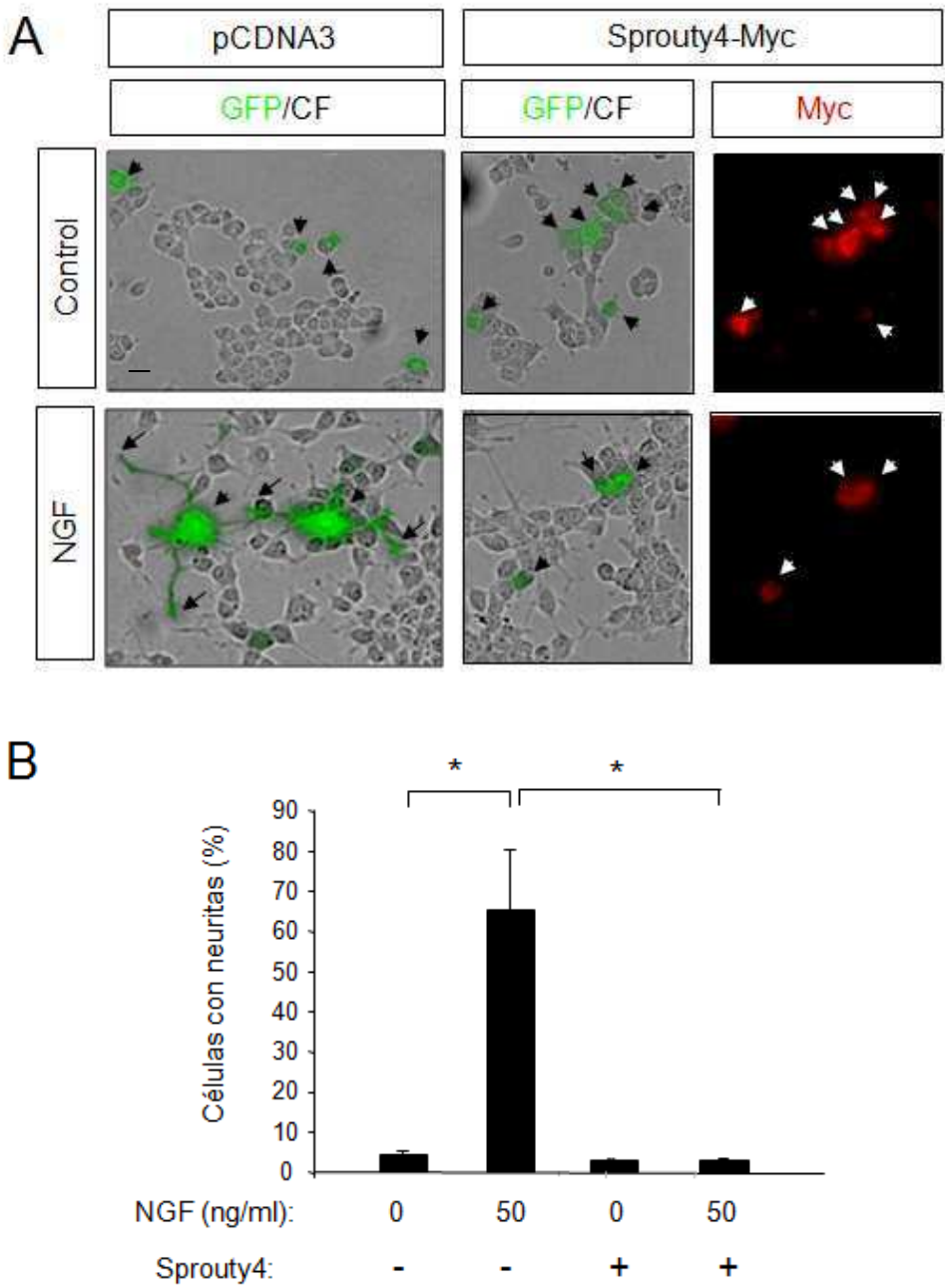
A) Activación de Rac1 (Rac1-GTP) en lisados celulares de células PC12 parentales y clon PC12 que sobreexpresa Spry4 (células PC12-Spry4), estimuladas con NGF (50 ng/ml) por 10 minutos. La activación de Rac1 se evaluó con un ensayo de precipitación por afinidad (pull-down) GST-αPak-GBD, seguido de IB con anticuerpo anti Rac1. Los paneles debajo muestran la expresión de Rac1 total (Rac1-Myc) y Spry4-Myc en el lisado celular.

B) Gráfico que muestra la cuantificación de la activación de Rac1. El resultado representa promedio ± error estándar de tres experimentos independientes. *$p<0.05$ (test de Student).

C) Activación de Rac1 evaluada por transfección transiente de células PC12 con un plásmido de Rac1 etiquetado con Myc (Rac1-Myc), junto con un vector vacío (control) o un plásmido que expresa Spry4-Myc. Luego de 36 hs las células fueron mantenidas en medio sin suero y estimuladas con o sin NGF (50 ng/ml) por 10 minutos. La activación de Rac1 se evaluó con un ensayo de precipitación por afinidad (pull-down) GST-αPak-GBD, seguido de IB con anticuerpo anti-myc para detectar a Rac1. Los paneles debajo muestran la expresión de Rac1 total (Rac1-Myc) y Spry4-Myc en el lisado celular.

D) Coinmunoprecipitación entre Rac1 endógeno y Spry4-Myc transfectado transientemente en células PC12. El panel inferior muestra cantidades similares de βIII-tubulina del material de partida de ambas muestras (input).

Las rutas de señalización activadas por TrkA contribuyen tanto a la sobrevida como a la diferenciación mediada por NGF de varias poblaciones neuronales. [1] Por lo tanto, a continuación decidimos investigar si Spry4 podía modular la diferenciación de células PC12 estimuladas con NGF. Para ello, células PC12 fueron transfectadas con un plásmido control o Spry4-Myc, junto con un vector que contiene la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP = green fluorescence protein). Luego de 48 hs de expresión, las células se estimularon con NGF y se mantuvieron durante 72 hs. Notablemente, la sobreexpresión de Spry4 inhibió significativamente la proporción de células PC12 diferenciadas con NGF (**Figura 9A y 9B**). Para confirmar que todas las células GFP positivas también expresaban Spry4-Myc se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Myc (**Figura 9A**). Asimismo, para excluir la posibilidad de que los efectos observados se debieran a apoptosis - si bien la familia de proteínas Sprouty no está involucrada en esa vía de señalización -, se observó la morfología de los núcleos utilizando tinción con DAPI. Estos resultados demuestran que Spry4 es capaz de restringir la diferenciación morfológica de células PC12 mediada por NGF.

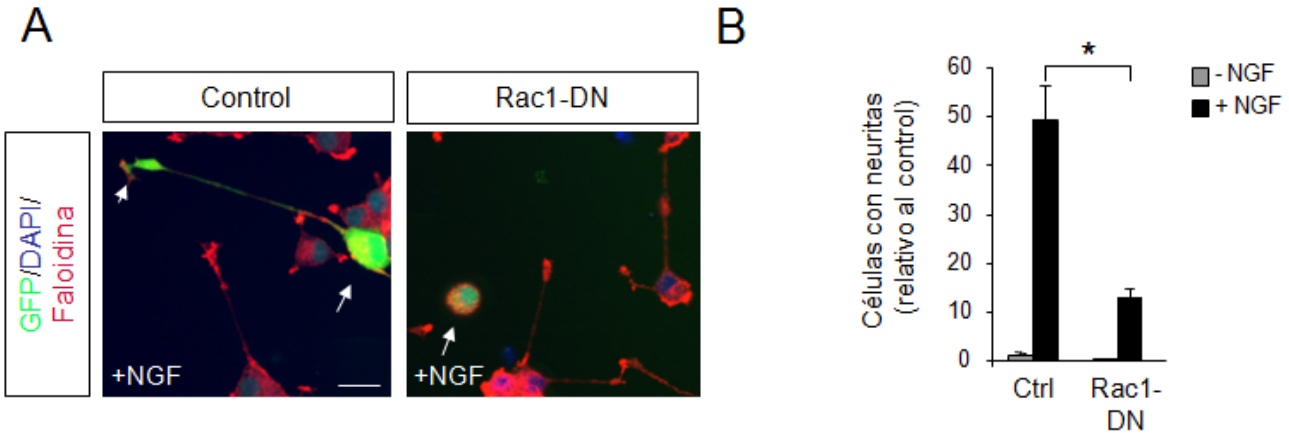


<u>Figura 9:</u> Sprouty4 inhibe la diferenciación morfológica de células PC12 en respuesta a NGF.

A) Fotomicrografías de células PC12 transfectadas transientemente con plásmido control (pCDNA3) o con plásmido Spry4-Myc, junto con un vector de expresión para la proteína verde fluorescente (GFP). Luego de 72 hs del tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti Myc. Las cabezas de flecha indican los cuerpos celulares y las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 10 µm. CF = contraste de fase.

B) Gráfico que muestra la cuantificación del número relativo de células PC12 GFP positivas que poseen neuritas con una longitud mayor o igual a 1,5 veces del diámetro del cuerpo celular, luego de 72 horas de tratamiento con NGF. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado en triplicado. *p<0.001 (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

De forma tal de reforzar la evidencia presentada anteriormente sobre la función inhibitoria de Spry4 en la actividad de Rac1 (Figura 8), exploramos si la expresión ectópica de un dominante negativo de Rac1 (Rac1-DN) era capaz de imitar la acción de Spry4. Efectivamente, la mutante Rac1-DN atenuó la diferenciación morfológica de células PC12 inducida por NGF (**Figura 10A y 10B**), en el mismo sentido en que lo hizo la sobreexpresión de Sprouty4.



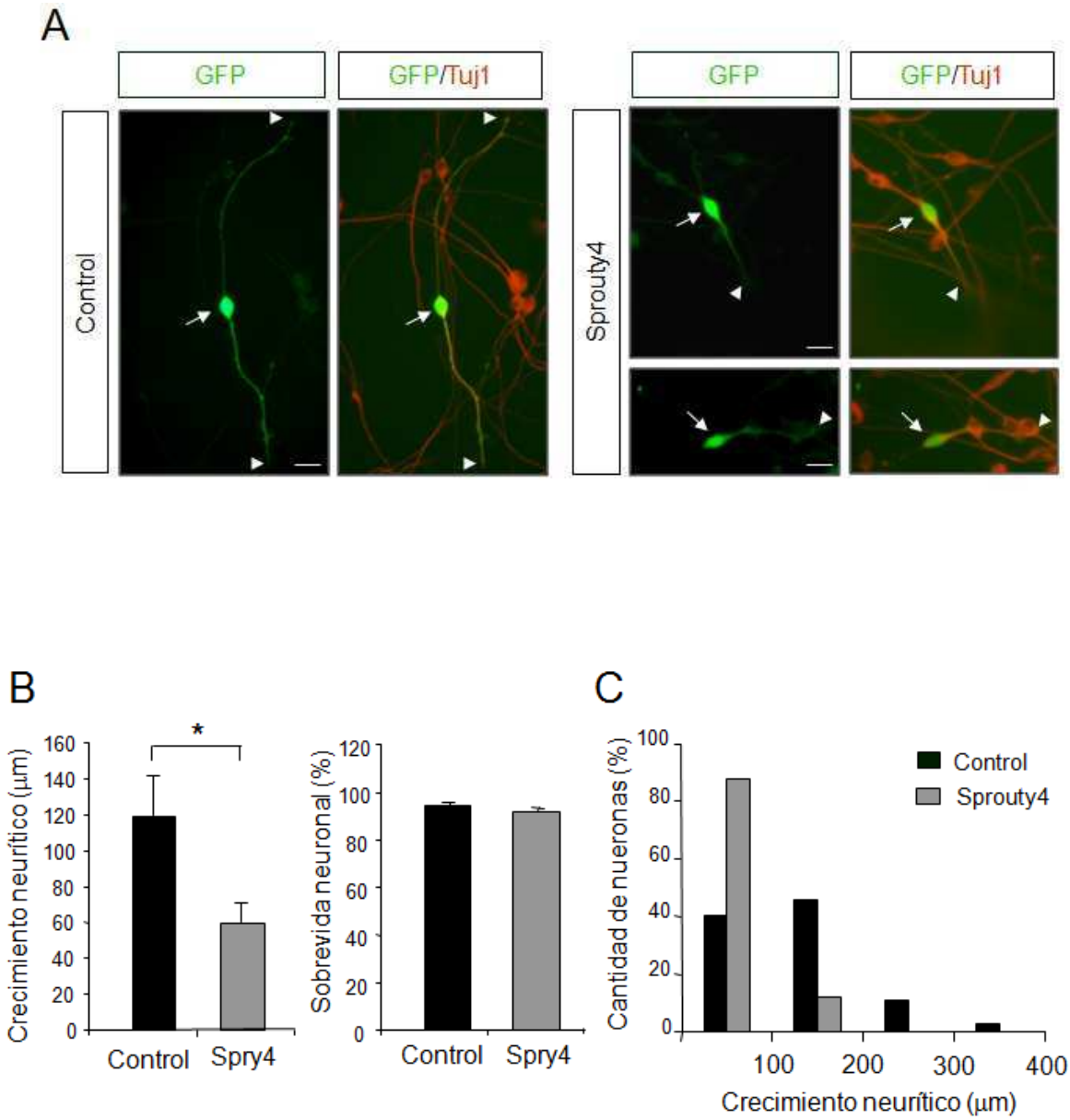
<u>Figura 10:</u> Una molécula de Rac1 que funciona dominante negativo (Rac1-DN) imita los efectos de Spry4 sobre la diferenciación morfológica de PC12 inducida por NGF.

A) Fotomicrografías de células PC12 transfectadas transientemente con plásmido control (pCDNA3) o con plásmido de un dominante negativo para Rac1 (Rac1-DN), junto con un vector de

expresión para la proteína verde fluorescente (GFP). Luego de 72 hs del tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células fueron fijadas y teñidas con faloidina conjugada con rodamina (para teñir el citoesqueleto). La faloidina es un compuesto químico que tiñe la actina polimerizada del citoesqueleto celular. Las cabezas de flecha indican los cuerpos celulares y las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 10 µm.

B) Gráfico que muestra la cuantificación del número relativo de células PC12 GFP positivas que poseen neuritas con una longitud mayor o igual a 1 vez el diámetro del cuerpo celular, luego de 72 horas de tratamiento con NGF. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado en triplicado. *$p<0.001$ (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

A continuación, examinamos el rol de Spry4 en el crecimiento axonal de neuronas primarias de DRG, inducido por NGF. Para ello, neuronas disociadas de DRG de embriones de rata de E14.5 fueron transfectadas con plásmido control o Spry4-Myc junto con un vector que expresa GFP. Al igual que los resultados obtenidos para células PC12, el crecimiento axonal estimulado por NGF fue significativamente reducido en aquellas neuronas transfectadas con Spry4-Myc (**Figura 11A, 11B panel izquierdo y 11C**). No se observaron diferencias en la sobrevida neuronal promovida por NGF entre ambos grupos (**Figura 11B panel derecho**). Estos resultados indican que la inhibición de la señalización de TrkA por Spry4 restringe específicamente la diferenciación neuronal sin afectar la sobrevida neuronal.



<u>Figura 11:</u> Sprouty4 inhibe el crecimiento neurítico de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) en respuesta a NGF.

A) Se cultivaron neuronas disociadas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) en presencia de NGF (50 ng/ml) y se transfectaron con un plásmido control o Spry4-Myc, junto con GFP. Luego de 36 hs en cultivo, las neuronas fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti βIII-tubulina (Tuj1). Barra de escala: 20 µm. Las flechas indican el cuerpo neuronal y las cabezas de flecha indican el extremo de la neurita.

B) *Panel izquierdo:* gráfico que muestra la inhibición del crecimiento neurítico en neuronas de DRG por la expresión exógena de Spry4. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en seis wells por grupo experimental. *$p<0.05$ (test de Student). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. *Panel derecho:* gráfico que muestra la supervivencia de las neuronas de DRG por la expresión del vector control o del vector Spry4. La supervivencia neuronal fue evaluada usando la tinción nuclear con DAPI. Se clasificaron como células apoptóticas aquellas neuronas GFP positivas con tinción nuclear fragmentada o condensada. El resultado refleja la proporción de células GFP positivas con núcleo de morfología normal sobre el total de células transfectadas, y está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

C) Histograma que muestra la distribución de neuronas conteniendo neuritas en distintas categorías de longitud luego de transfectarlas en forma transiente con plásmido control o Spry4-Myc, junto con GFP. Se evaluaron un total de 43 neuronas control y 40 neuronas transfectadas con Spry4-Myc de un experimento representativo. Notar el notable corrimiento hacia la izquierda (neuronas con neurita más corta) en la distribución de las células que recibieron el plásmido de Spry4-Myc.

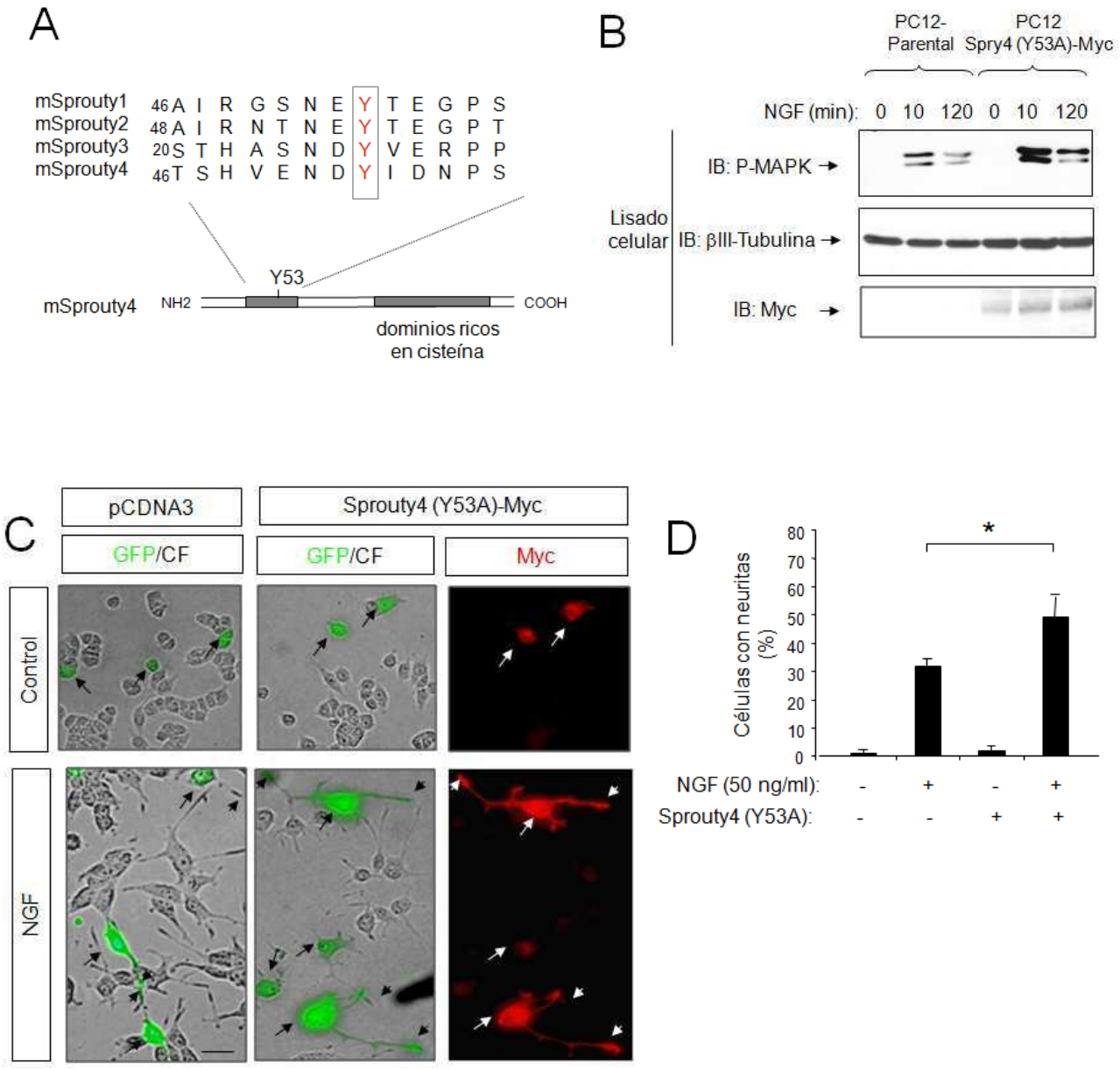
Para comprender mejor el mecanismo por el cual Spry4 inhibe los efectos de NGF, generamos una línea celular de PC12 que expresa una versión mutada de Spry4 en donde la tirosina 53 (Y53) ha sido sustituida por una alanina (PC12-Spry4-Y53A). Esta tirosina se encuentra conservada en los 4 miembros de la familia Sprouty (**Figura 12A**) y se ha reportado que tiene un efecto dominante negativo, favoreciendo la activación de Erk/MAPK dependiente de factor trófico [65]. El rol de esta mutación puntual se evaluó analizando la activación de Erk/MAPK en células PC12 parentales y células PC12-Spry4-Y53A estimuladas con NGF durante 10 y 120 minutos (de forma tal de tomar el punto máximo de activación y un tiempo mayor, respectivamente). Las células que expresaban Spry4-Y53A mostraron un incremento sustancial en la fosforilación de Erk/MAPK, en

comparación con las PC12 parentales, indicando que la sustitución Y53A genera una proteína Spry4 mutante que pierde la habilidad de bloquear dicha vía activada por NGF (**Figura 12B**). Más aún, esta mutación potenció los efectos inducidos por NGF.

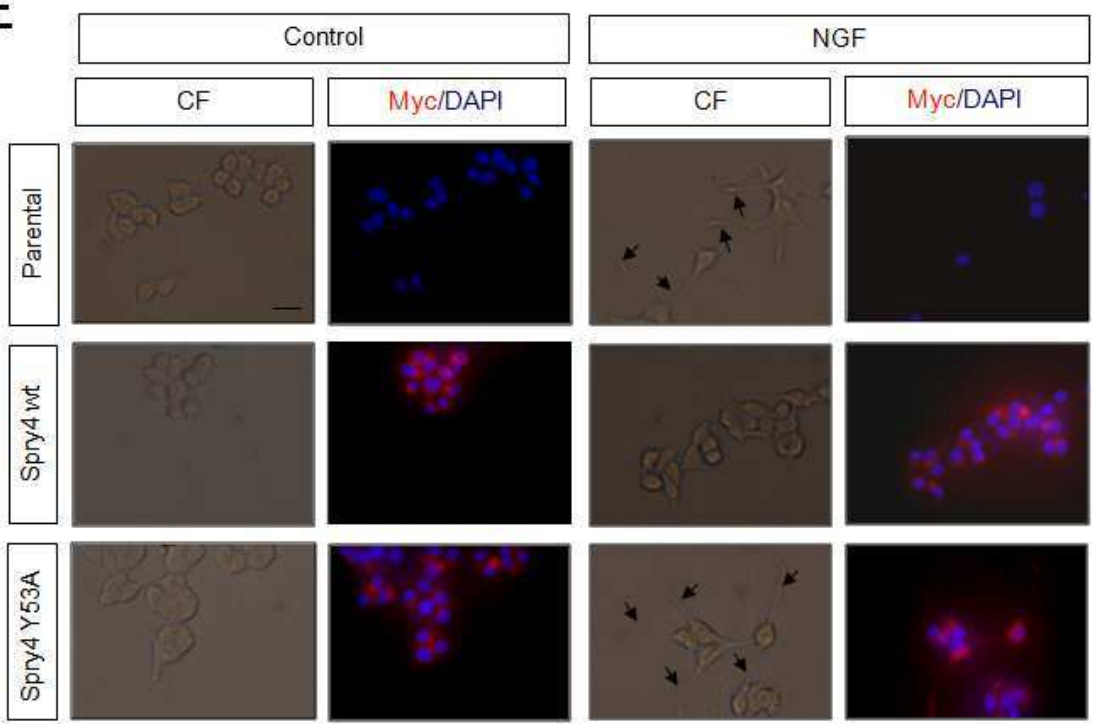
Luego, investigamos el efecto de la proteína mutante Spry4-Y53A en la diferenciación morfológica de células PC12 mediada por NGF. Para ello, transfectamos en forma transiente células PC12 con un plásmido control o Spry4-Y53A-Myc, junto con GFP. Las células se mantuvieron en presencia de NGF durante 72 hs y luego de fijarlas, se tiñeron con un anticuerpo anti-Myc para confirmar que las células GFP positivas expresaban también la versión mutada de Spry4. La sobreexpresión de Spry4-Y53A no sólo no pudo inhibir la diferenciación morfológica inducida por NGF, sino que levemente la potenció (**Figuras 12C y 12D)**, lo cual concuerda con el resultado de activación de MAPK observado en la Figura 7B. Se obtuvo un resultado similar analizando la diferenciación morfológica de un clon que expresa establemente Spry4-Y53A **(Figuras 12E y 12F**).

Dado que la fosforilación de algunos miembros de la familia Sprouty, inducida por factores neurotróficos, es importante para cumplir su función [56], decidimos investigar si la fosforilación en tirosina 53 de Sprouty 4 era un evento clave para su rol inhibitorio. Para ello, transfectamos en forma transiente células PC12 con el plásmido de Spry4-Myc y estimulamos con NGF a distintos tiempos. Luego inmunoprecipitamos Spry4-Myc y evaluamos los niveles de fosforilación por inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (P-tyr). Notablemente, no observamos fosforilación de Spry4 luego del tratamiento con concentraciones saturantes de NGF. La falta de detección de Spry4 fosforilada en tirosina se ensayó sobre los mismos extractos celulares en los cuales el tratamiento con NGF indujo un aumento en la fosforilación en tirosina y activación de su receptor TrkA (**Figura 12G**), demostrando que la falta de fosforilación de Spry4 no se debió a cuestiones experimentales (fallas en la estimulación, preservación de las

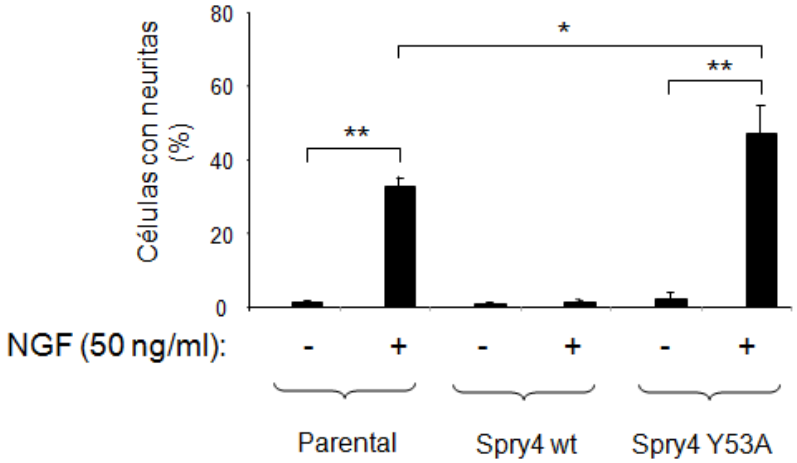
muestras, detección de los niveles de fosfotirosina por western blot). En su conjunto, los resultados obtenidos a partir de los ensayos mostrados en la figura 7 demuestran que la tirosina 53 (Y53) en sí misma es un residuo esencial, requerido para preservar la función biológica de Spry4. Nuestros resultados están de acuerdo con datos previos de la bibliografía que muestran que Spry4 no es fosforilado en tirosina luego del tratamiento con suero y con diferentes factores de crecimientos como por ejemplo EGF, PDGF y FGF [75].



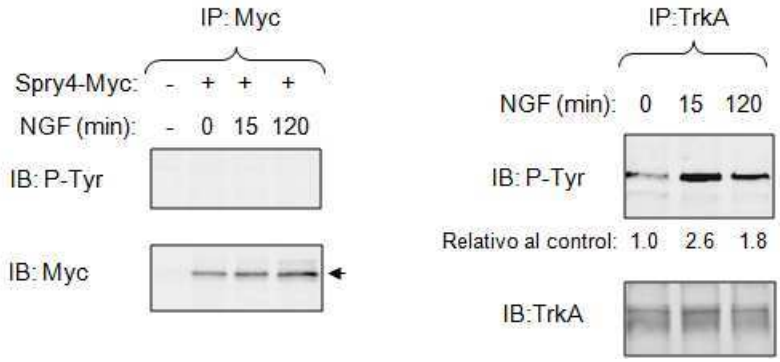
E


Control
NGF
CF
Myc/DAPI
CF
Myc/DAPI
Parental
Spry4 wt
Spry4 Y53A

F


Células con neuritas (%)
80
60
40
20
0
*
**
**
NGF (50 ng/ml):
-
+
-
+
-
+
Parental
Spry4 wt
Spry4 Y53A

G


IP: Myc
Spry4-Myc: - + + +
NGF (min): - 0 15 120
IB: P-Tyr
IB: Myc
IP:TrkA
NGF (min): 0 15 120
IB: P-Tyr
Relativo al control: 1.0 2.6 1.8
IB:TrkA

<u>Figura 12:</u> La tirosina 53 (Y53) es importante para la función inhibitoria de Spry4.

A) Representación esquemática de los dominios estructurales de los miembros de la familia Sprouty en mamíferos. La figura muestra un alineamiento aminoacídico de un motivo conservado ubicado en la mitad del extremo N-terminal de la molécula. Allí se indica en rojo un residuo tirosina (Y) conservado. También se muestra el dominio rico en cisteína en la porción C-terminal.

B) Activación endógena de Erk/MAPK (P-MAPK) por inmunoblot (IB) de lisados celulares de PC12 parentales y PC12 sobreexpresando en forma estable el plásmido para una proteína mutante de Spry4, Spry4-Y53A-Myc (clon S-Y53A-17), tratados con NGF (50 ng/ml). El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti βIII tubulina (como control de carga) y anti Myc (para evaluar los niveles totales de Spry4-Y53A-Myc). El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

C) Fotomicrografías de células PC12 transfectadas transientemente con plásmido control (pCDNA3) o con plásmido Spry4-Y53A-Myc, junto con un vector de expresión de GFP. Luego de 72 hs del tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti Myc. Las cabezas de flecha indican los cuerpos celulares y las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 10 µm. CF = contraste de fase.

D) Gráfico que muestra la cuantificación del número relativo de células PC12 GFP positivas que poseen neuritas con una longitud mayor o igual a 1,5 veces del diámetro del cuerpo celular, luego de 72 horas de tratamiento con NGF. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado en triplicado. *$p<0.05$ (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

E) Fotomicrografías de células PC12 parentales, clon de PC12 sobreexpresando en forma estable Spry4-Myc (clon S2), y clon de PC12 sobreexpresando en forma estable Spry4-Y53A-Myc (clon S-Y53A-17). Luego de 72 hs del tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti Myc y con el colorante nuclear DAPI. Las cabezas de flecha indican los cuerpos celulares y las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 10 µm.

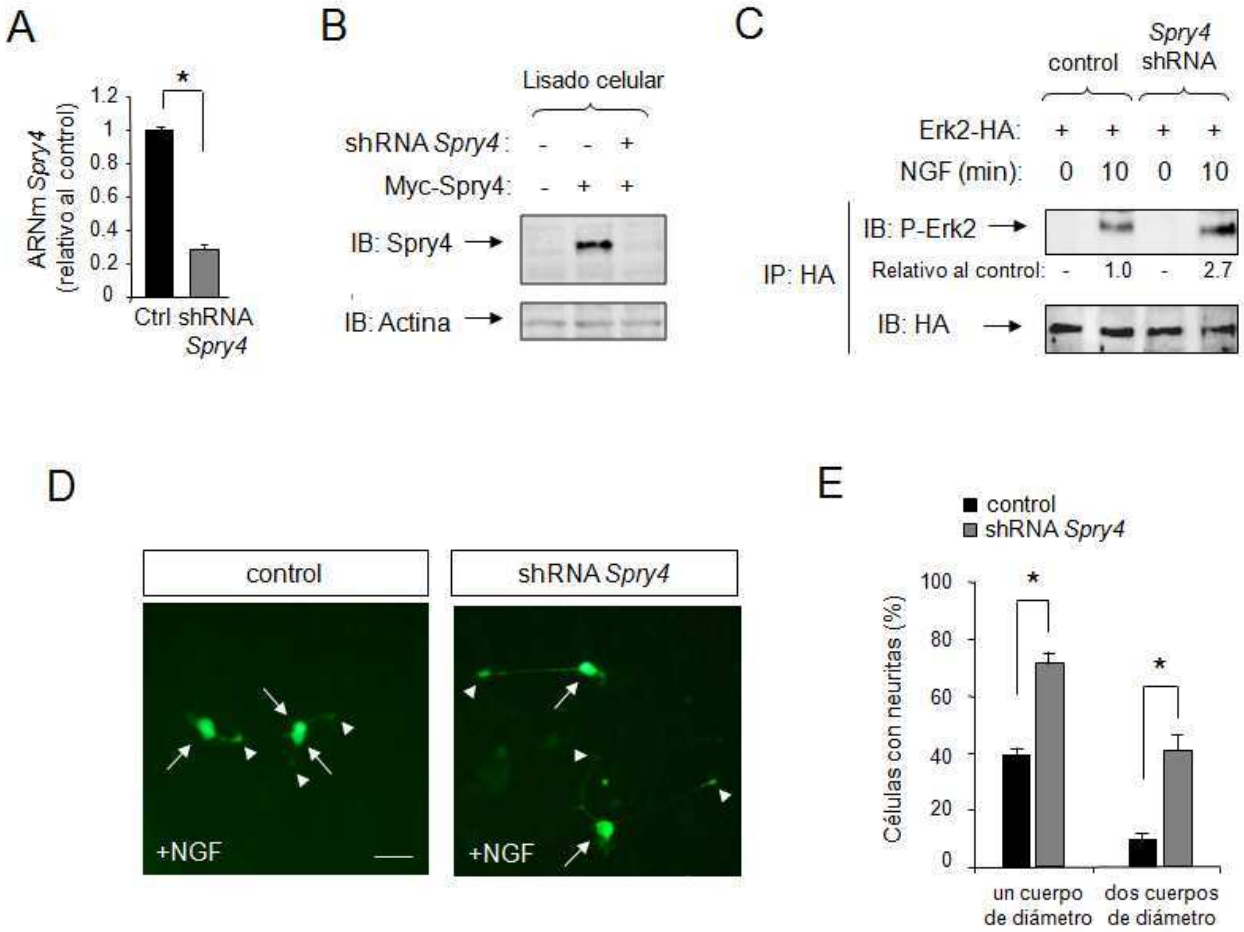
F) Gráfico que muestra la cuantificación del número relativo de células PC12 que poseen neuritas con una longitud mayor o igual a 1,5 veces del diámetro del cuerpo celular, luego de 72 horas de

tratamiento con NGF. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado en triplicado. *p<0.05, **p<0.001 (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

G) *Panel izquierdo:* células PC12 transfectadas con Spry4-Myc fueron tratadas con NGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados, luego fueron lisadas y los extractos celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpo anti Myc seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-fosfotirosina (P-Tyr). El mismo blot fue testeado con anticuerpo anti Myc. El experimento se repitió tres veces con resultados idénticos. *Panel derecho:* los mismos extractos celulares utilizados para ver la fosforilación de Spry4, fueron re-precipitados utilizando un anticuerpo anti TrkA segudio de IB con anticuerpo anti P-Tyr como un control positivo de la estimulación de NGF y la detección de fosfotirosina.

Por último, se realizaron ensayos de pérdida de función para corroborar la función de Spry4 observada en los experimentos de sobreexpresión (ganancia de función). Para ello, se utilizó un plásmido que expresa un shRNA dirigido contra el ARNm de *Spry4* de rata. Previamente, se testearon 4 shRNA, utilizando en última instancia aquel que cumpía su objetivo (datos no mostrados). Este vector shRNA fue capaz de reducir significativamente los niveles endógenos del ARNm de Spry4 (**Figura 13A**) y anuló completamente la expresión ectópica de la proteína en células COS-7 transfectadas con el plásmido de Spry4-Myc (**Figura 13B**). De acuerdo con el rol de Spry4 en el control negativo de la señalización río abajo de TrkA, la pérdida de función de dicha molécula resultó en un incremento sustancial de la activación de MAPK en respuesta a NGF (**Figura 13C**). Del mismo modo, se observó una potenciación significativa de la diferenciación de células PC12 transfectadas con el vector de expresión para el shRNA *Spry4* y estimuladas con NGF durante 24 hs (**Figura 13D y 13E**). Notablemente, el nivel

de diferenciación alcanzado a las 24 hs es el que se obtiene normalmente en células PC12 control recién a las 48-72 hs del tratamiento con NGF.



<u>Figura 13:</u> La pérdida de función de Sprouty4 potencia la activación de MAPK y la diferenciación de células PC12 en respuesta a NGF.

A) Se analizaron los niveles del ARNm de Spry4 por PCR en tiempo real de células PC12 transfectadas con plásmido codificante para un shRNA dirigido contra una secuencia aleatoria (control, Ctrl) o para un shRNA dirigido contra el ARNm de Spry4 de rata. El número de células transfectadas fue enriquecido por tratamiento con puromicina de forma tal de aumentar la población de células que expresan dichos plásmidos. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Los niveles

del ARNm de Spry4 se normalizaron usando la expresión del gen constitutivo Tbp. *p<0,001 (test de Student).

B) Se analizaron los niveles de la proteína Spry4 por inmunoblot (IB) en células COS-7 transfectadas con shRNA contra Spry4 o un vector control, juntos con Spry4-Myc. Se muestran los niveles de actina como control de carga.

C) Se analizó la activación de Erk2/MAPK frente a la pérdida de función de Spry4 en células PC12 tratadas con NGF (50 ng/ml) por 10 minutos. Dicha activación fue evaluada por transfección transiente con el plásmido de Erk2 etiquetado con HA junto con un plásmido control o con el plásmido de shRNA contra Spry4 en células PC12. Luego se realizó la inmunoprecipitación (IP) contra HA seguida de IB contra un anticuerpo específico que reconoce las formas fosforiladas de Erk/MAPK. Se muestra el mismo blot reprobado con anticuerpo anti HA. Los números debajo de las calles están normalizados a los niveles totales de Erk2-HA.

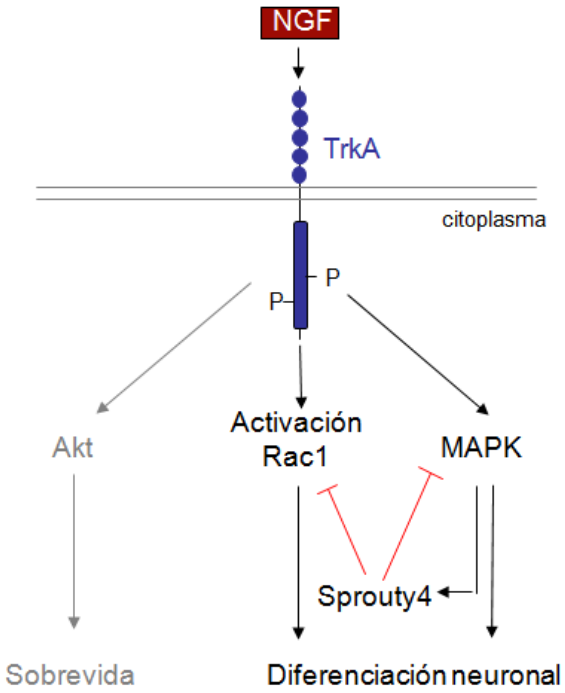
D) Diferenciación morfológica de células PC12 transfectadas con un shRNA contra secuencia aleatoria (control) o shRNA contra Spry4 clonados en el vector retroviral pGFP-V-RS, y tratadas con NGF (50 ng/ml) por 24 hs.

E) El gráfico muestra la cuantificación del número relativo de células GFP positivas que poseen neuritas mayores a 1 ó 2 cuerpos celulares (CB = cell body) de diámetro, en las diferentes condiciones experimentales. El resultado está presentado como el promedio ± desvío estándar de un experimento representativo realizado por cuadriplicado. *p<0,001 (test de Student).

Discusión

En este estudio identificamos a *Sprouty4* (*Spry4*) como un gen regulado por NGF que restringe algunas vías de señalización inducidas por dicha neurotrofina como son la vía de Erk/MAPK y la de Rac1, pero sin modificar la vía de PI3k-Akt. A nivel molecular, identificamos a la Tyr-53 de Spry4 como un determinante esencial para esta actividad inhibitoria. Asimismo, describimos que Spry4 regula negativamente la diferenciación

morfológica inducida por NGF de células PC12 y de neuronas primarias sensoriales del ganglio de la raíz dorsal. Por lo tanto, proponemos que Spry4 actúa río abajo de TrkA a través de un mecanismo de retroalimentación negativa para regular la diferenciación neuronal, inhibiendo la vía de señalización Erk/MAPK y la activación de Rac1 (**Figura 14**).



<u>Figura 14:</u> modelo que describe el rol de Sprouty4 en la la señalización del receptor TrkA inducida por NGF y sus efectos biológicos. La señalización NGF-TrkA induce la expresión de Sprouty4 a través de la vía de MAPK. Luego, Sprouty 4 actuando a través de un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe específicamente a la vía de MAPK y la activación de Rac1 restringiendo, por lo tanto, la diferenciación de células PC12 y de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG).

Las células PC12 y las neuronas sensoriales han probado ser buenos modelos para investigar el crecimiento neurítico inducido por NGF y FGF. Mientras que en el presente

trabajo nosotros demostramos que Spry4 es un antagonista endógeno de la diferenciación neuronal inducida por NGF, estudios previos han propuesto a Spry2 y Spry4 como los reguladores críticos de la activación de Erk/MAPK relacionada a la diferenciación neuronal en el contexto de FGF [65, 76].

Los receptores de alta afinidad de TrkA (para NGF), TrkB (para BDNF y NT4) y TrkC (para NT3) se expresan en distintas poblaciones neuronales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) donde controlan el desarrollo axonal, la innervación a los tejidos blanco y la sobrevida neuronal mediada por neurotrofinas. En particular, TrkA se encuentra expresado en un 80% de las neuronas de los DRG durante la tercera semana de desarrollo embrionario en roedores, y su proporción cae a un 40% postnatalmente [77]. Dado que nuestros resultados indican que Spry4 está involucrado en la diferenciación de la subpoblación neuronal TrkA positiva, queda abierta la pregunta de si otros miembros de la familia Spry podrían estar modulando la diferenciación de otras neuronas de los DRG que expresan TrkB o TrkC. El hecho de que Spry2 y Spry3 han sido reportados como moléculas que controlan la señalización inducida por BDNF en el sistema nervioso central, sugiere que ellos también podrían tener una función análoga modulando la diferenciación de otras poblaciones neuronales de los DRG por dicho ligando [61, 78].

Como se ha mencionado, las proteínas Spry han mostrado atenuar la activación de Erk/MAPK inducida por una variedad de factores tróficos incluyendo a FGF, HGF, VEGF, BDNF y GDNF. Sin embargo, todavía son controversiales los puntos moleculares en los cuales las proteínas Spry "desconectan" la señalización inducida por los RTK [79]. Por consiguiente, aún cuando muchos reportes concluyeron que Spry funcionaría río abajo de los RTK pero río arriba de Ras [63, 80-82], otros estudios mostraron que Spry podría inhibir la señalización de los RTK al nivel de Raf1 [83, 84].

En particular, Spry4 en ratón inhibe la activación de Erk/MAPK independiente de Ras inducida por VEGF, al nivel de Raf1 [64, 84]. En nuestro estudio, utilizamos un plásmido que expresa un Ras constitutivamente activo (V12 Ras) y encontramos que Spry4 fue capaz de bloquear la activación de Erk/MAPK dependiente de Ras, indicando que en nuestro sistema Spry4 estaría actuando río abajo de Ras, probablemente al nivel de Raf1.

Como ha sido observado anteriormente con la señalización inducida por FGF y GDNF [62, 65], la sobreexpresión del dominante negativo de Spry4 (Spry4-Y53A) aumentó la activación de Erk/MAPK y la diferenciación celular en respuesta a NGF (Figura 12). Esto sugiere que el mutante de Spry4 podría estar inhibiendo otras proteínas Sprouty, formando homo y/o heterodímeros con ellas. Notablemente, se han visto diferencias claras en la fosforilación de tirosinas de las proteínas Spry por determinados factores de crecimiento. Es así como Spry1 es fosforilado en tirosina por FGF y PDGF, y Spry2 por FGF y EGF. Sin embargo, Spry4 no es fosforilado en tirosina en respuesta a ninguno de estos factores [75]. Consistentemente con estos resultados, no fuimos capaces de detectar fosforilación en tirosina de Spry4 en respuesta a NGF. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la Tyr-53 en sí misma, pero no su fosforilación, es requerida para la actividad inhibitoria de Spry4 en la señalización de NGF.

Las moléculas regulatorias que controlan el crecimiento neurítico y las señales que determinan cuándo y dónde los axones y dendritas deben crecer están aún poco comprendidas. En este sentido, Gross *et al* (2001) reportaron que la sobreexpresión de Spry1 y Spry2 en células PC12 bloqueó el crecimiento neurítico y puntos de bifurcación inducidos por NGF [63]. Sin embargo, estos autores fallaron en detectar la expresión de Spry1 y Spry2 en estas células, aún después del tratamiento con NGF. Esto sugeriría que Spry1 y Spry2 no estarían fisiológicamente involucrados en la diferenciación morfológica de células PC12, y que la expresión de otros miembros de la familia Spry estaría inducida

por NGF para controlar el crecimiento neurítico. Aquí, caracterizamos a Spry4 como un inhibidor fisiológico de la elongación neurítica de células PC12 y neuronas primarias de DRG inducida por NGF. La expresión endógena de Spry4 fue rápida y fuertemente inducida en células PC12 y neuronas de DRG luego del tratamiento con NGF (Figura 6). En contraste, no pudimos detectar la inducción de los ARNm de Spry1 y Spry2 luego de dicha estimulación.

En nuestro trabajo, demostramos que Spry4 restringe el crecimiento neurítico inducido por NGF sin afectar la sobrevida. De acuerdo con esto, Spry4 fue capaz de bloquear las vías de Erk/MAPK y Rac1 pero no la de Akt, en respuesta a NGF. Varios reportes confirmaron el rol de otros Spry en el control del crecimiento neurítico y los puntos de bifurcación inducido por factores neurotróficos tales como FGF, BDNF y GDNF [61, 62, 65, 78]. En estos estudios, los autores también han relacionado los efectos inhibitorios de Spry2 con la vía de Erk/MAPK. Sin embargo, Gross *et al* ha reportado que en neuronas diferenciadas del sistema nervioso central, la sobreexpresión de Spry2 favoreció la apoptosis neuronal, mientras que su pérdida de función tuvo un efecto neuroprotector [61]. Esto sugiere que la muerte celular por apoptosis podría darse por la inhibición de la vía PI3K-Akt, involucrada en la sobrevida neuronal. Edwin *et al* reportaron que Spry2 requiere la fosfatasa supresora de tumores, PTEN, para inhibir la activación de Akt inducida por EGF. Sin embargo, este fenómeno está relacionado con efectos anti-proliferativos y no apoptóticos. Por lo tanto, no ha sido aún demostrada una relación clara entre la apoptosis y la inhibición de Akt por Spry2. El hecho de que esta molécula antagoniza la activación de Akt y la proliferación celular en respuesta a EGF, es consistente con el incremento observado en el número de neuronas producido por la pérdida de Spry en *Drosophila* [59]. Más recientemente, Panagiotaki *et al* (2010) encontraron que Spry3 también inhibe la morfogénesis axonal *in vivo* y previene la

formación de filopodios en neuronas de la médula espinal, inhibiendo la vía de señalización por Ca^{2+} activada por BDNF [78]. Notablemente, Spry3 actúa como un inhibidor muy débil de la vía Erk/MAPK activada por la señalización BDNF-TrkB. Por lo tanto, las proteínas Spry parecen comportarse como moduladores específicos de diferentes cascadas de RTK y no como inhibidores generales de la vía de MAPK inducida por estos receptores.

El crecimiento neurítico es una marca establecida de la diferenciación neuronal que requiere la acción coordinada de diferentes vías de señalización. Consistentemente con esto, se ha reportado que el crecimiento neurítico inducido por NGF requiere una activación sostenida de MAPK así como una activación de Rac1, la cual juega un rol clave regulando los cambios de citoesqueleto. Nosotros observamos que la inhibición de la señalización de TrkA por Spry4 también induce una reducción concomitante de la activación de Rac1. En su conjunto nuestros resultados proveen un marco adecuado para la comprensión del modo de acción de Spry en la señalización y los efectos biológicos inducidos por neurotrofinas. Los trabajos de los últimos años han revelado que los blancos de Spry son más diversos de lo asumido originalmente [64, 74, 78, 85, 86]. Relacionado a esto, la presente inhibición de Rac1 por Spry4 también contribuye a destacar la versatilidad de los miembros de la familia Spry para regular diversas vías de señalización inducidas por factores tróficos.

Por último, nuestros hallazgos indican que modulando la función de Spry4, el sistema NGF-TrkA puede regular las vías de señalización de Rac1 y Erk/MAPK necesarias para el crecimiento neurítico. La regulación precisa de la señalización inducida por las neurotrofinas es crucial para el desarrollo normal del sistema nervioso en donde el crecimiento neurítico es un proceso esencial que subyace a la formación de patrones de conectividad neuronal altamente específicos. Se ha especulado que las anormalidades en

la formación y extensión de las neuritas podrían causar la desorganización de la red neuronal y eventualmente llevar a desórdenes neuronales. Por consiguiente, la expresión anormal de las proteínas Spry en diferentes tipos neuronales, bloqueando la señalización inducida por los factores neurotróficos, podría estar asociado a enfermedades neurológicas [87]. Notablemente, mutaciones en el gen *Spred1*, que codifica para una proteína estructural y funcionalmente relacionada a Sprouty, ha sido identificada en patologías caracterizadas por macroencefalía y retraso mental [88, 89]. Una caracterización más detallada de los mecanismos por los cuales las proteínas Sprouty son reguladas en las neuronas podría contribuir al entendimiento de las causas que subyacen a muchas enfermedades neurodegenerativas y síndromes neurológicos.

CAPÍTULO 2: la familia de proteínas Lrig como reguladora de los receptores para factores neurotróficos

Introducción

Los receptores de neurotrofinas Trk poseen en su porción extracelular 3 dominios con repeticiones ricas en leucina (LRR=leucine-rich repeat) y 2 dominios tipo inmunoglobulina (Ig). Ambos, son típicos dominios de interacción proteína-proteína encontrados en proteínas con diversa estructura y función [90]. Debido a las diversas funciones en las que están involucrados los receptores Trk y su importancia en el desarrollo, se ha realizado una búsqueda estructural de proteínas transmembrana con dominios LRR e Ig en su porción extracelular, y se las ha agrupado en una superfamilia denominada LIG o LRRIG (LRR and Ig domain-containing proteins) que incluye a Lrig1-3, Lingo 1-4, Amigo1-3, ISLR1-2, Slitrk1-6, NGL1-3, SALM1-5, NLRR1-3, entre otros [91]. Estas proteínas, junto con otras que también tienen dominios LRR como la familia LRRTM, se encuentran enriquecidas en sistema nervioso y algunas de ellas son capaces de interaccionar físicamente con receptores para factores neurotróficos y regular su actividad en diferentes tipos celulares [9, 90]. La evidencia acumulada hasta el momento indicaría que los miembros de la familia LIG pueden potenciar o atenuar la actividad de los RTK en forma temporo-espacial, permitiendo un control preciso de las vías de señalización del crecimiento axonal y de la conectividad neuronal inducida por factores neurotróficos [9, 62, 93]. Más aún, estudios recientes han mostrado que proteínas conteniendo dominios LRR son capaces de regular el guiado axonal, el crecimiento dendrítico, la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal [94-96].

En particular, la proteína Lrig1 (leucine-rich repeats and Immunoglobulin-like domains 1), miembro de esta superfamilia de proteínas LIG, contiene 15 dominios LRR y

3 dominios tipo inmunoglobulina en su región extracelular. [97] En un trabajo publicado por Suzuki *et al* se observó que el ratón transgénico deficiente para dicha proteína desarrollaba afecciones en la piel de la cola y la región facial muy similares a la psoriasis. [98] Notablemente, se ha visto que los miembros del sistema EGF-ErbB están involucrados en esta enfermedad. Este hecho sumado a la similitud estructural entre Lrig1 y kekkon1, un inhibidor del EGFR descripto en *Drosophila melanogaster* [99, 100], llevó a la predicción de que Lrig1 podría cumplir un rol similar en mamíferos [97, 101]. Posteriormente, dos grupos de investigadores reportaron que dicha proteína efectivamente puede actuar como regulador negativo de los receptores de ErbB/EGF [102, 103]. A pesar de que tanto kekkon1 como Lrig1 son capaces de interactuar e inhibir al EGFR, su mecanismo de acción difiere sustancialmente. Mientras que la interacción de kekkon1 con EGFR interfiere con la unión al ligando y su posterior activación [99, 100], Lrig1 promueve el reclutamiento de Cbl, una proteína ubiquitina-ligasa E3 que promueve la ubiquitinación y degradación del complejo EGFR-Lrig1 [102, 103]. De esta forma, Lrig1 se ha postulado como un gen supresor de tumores para muchos tipos de cáncer humano [104-107].

Por otro lado, se ha observado que Lrig1 también es capaz de interactuar y desestabilizar al RTK Met (receptor del HGF), en un mecanismo independiente de Cbl, sin importar el estado de activación del receptor [108]. Más recientemente, nuestro laboratorio reportó que Lrig1 es capaz de interactuar con el RTK Ret, inhibir la activación inducida por su ligando GDNF, evitar su reclutamiento a los dominios de membrana conocidos como lipid rafts y regular negativamente el crecimiento neurítico de células neuronales [109]. Por lo tanto, todas estas evidencias indican que Lrig1 funciona como un inhibidor general de RTK.

Con respecto a los otros dos miembros de la familia Lrig, Lrig2 y Lrig3, también se los ha asociado al desarrollo de procesos tumorales en humanos [110-112], aunque su

función y mecanismo de acción son menos conocidos. Lrig2 parecería tener funciones opuestas a Lrig1 en cuanto a su función supresora de tumores. La pérdida de función de Lrig2 en células de glioma produce la pérdida de EGFR mediada por EGF, una menor activación de la señalización río abajo y una disminución en la proliferación celular [113]. Asimismo, la expresión citoplasmática de Lrig2 sería un factor de prognosis de menor sobrevida en pacientes con oligodendroglioma [114].

Por su parte, Lrig3 estaría involucrado en la formación de la cresta neural en *Xenopus*, a través de un mecanismo inhibitorio de la señalización inducida por FGF pero favoreciendo la señalización por Wnt [115]. En mamíferos, se ha visto que Lrig3 participa en el desarrollo del oído interno a través de un mecanismo co-represivo mutuo entre dicha proteína y netrina1 [116]. Si bien Lrig3 es capaz de interaccionar con receptores de ErbB *in vitro*, esta interacción no parecería cumplir un rol en la morfogénesis del oído interno dependiente de Lrig3 [117]. Sin embargo, estudios posteriores *in vitro* indican que Lrig1 y Lrig3 pueden interaccionar y tendrían funciones opuestas, favoreciendo o inhibiendo la estabilización del receptor de ErbB [118].

En base a estas evidencias, las proteínas de la familia Lrig parecerían ser moléculas muy versátiles capaces de inhibir o potenciar distintos RTK y vías de señalización, a través de diversos mecanismos de acción. Análisis *in vivo* de estos genes en el oído interno indican que estas proteínas pueden estar coexpresadas en el mismo tejido y que cumplirían funciones tanto redundantes como independientes unas de otras [119].

A pesar de las importantes funciones biológicas que cumplen una gran cantidad de proteínas con dominios ricos en leucina (LRR) durante el establecimiento de la conectividad neuronal, la contribución de las proteínas Lrig para el desarrollo y función del sistema nervioso aún no ha sido investigada.

Los RTK participan activamente durante el armado de la conectividad neuronal [1]**.** En este sentido, las proteínas Lrig han sido descriptas como proteínas transmembrana capaces de asociarse con diversos RTK para modular su función trófica durante el desarrollo neuronal. Teniendo en cuenta todas estas evidencias, nos propusimos estudiar posibles funciones de las proteínas Lrig1, Lrig2 y Lrig3 en el control de la actividad neurotróficas y de los procesos neuronales que subyacen al establecimiento de los circuitos neuronales.

Por lo tanto, en este capítulo evaluamos:

(I) **Un posible rol de Lrig1 como un antagonista de la función de BDNF y de la actividad de su receptor TrkB**. Esto se basa en los patrones temporales de expresión de Lrig1 durante el desarrollo hipocampal, al momento en que ocurre el desarrollo dendrítico de esta estructura cerebral.

(II) Trabajos previos de nuestro grupo determinaron que Lrig1 es un inhibidor endógeno del RTK Ret y de las funciones biológicas de su ligando GDNF [109]. Basado además en la prominente expresión de Lrig1, Lrig2 y Lrig3 durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del los ganglios de la raíz dorsal (DRG), nosotros decidimos estudiar **el rol de las proteínas Lrig1, Lrig2 y Lrig3 sobre la activación del receptor Ret inducida por GDNF** y la contribución de estas proteínas para el desarrollo y función de esta estructura del sistema nervioso periférico.

(III) Adicionalmente exploramos el potencial terapéutico de **Lrig1 como un inhibidor de variantes oncogénicas del receptor tirosina kinasa Ret presentes en tumores tiróideos (Ret MEN2A y Ret MEN2B).**

a) Lrig1 como regulador endógeno de la actividad neurotrófica de BDNF y de la actividad de su receptor TrkB

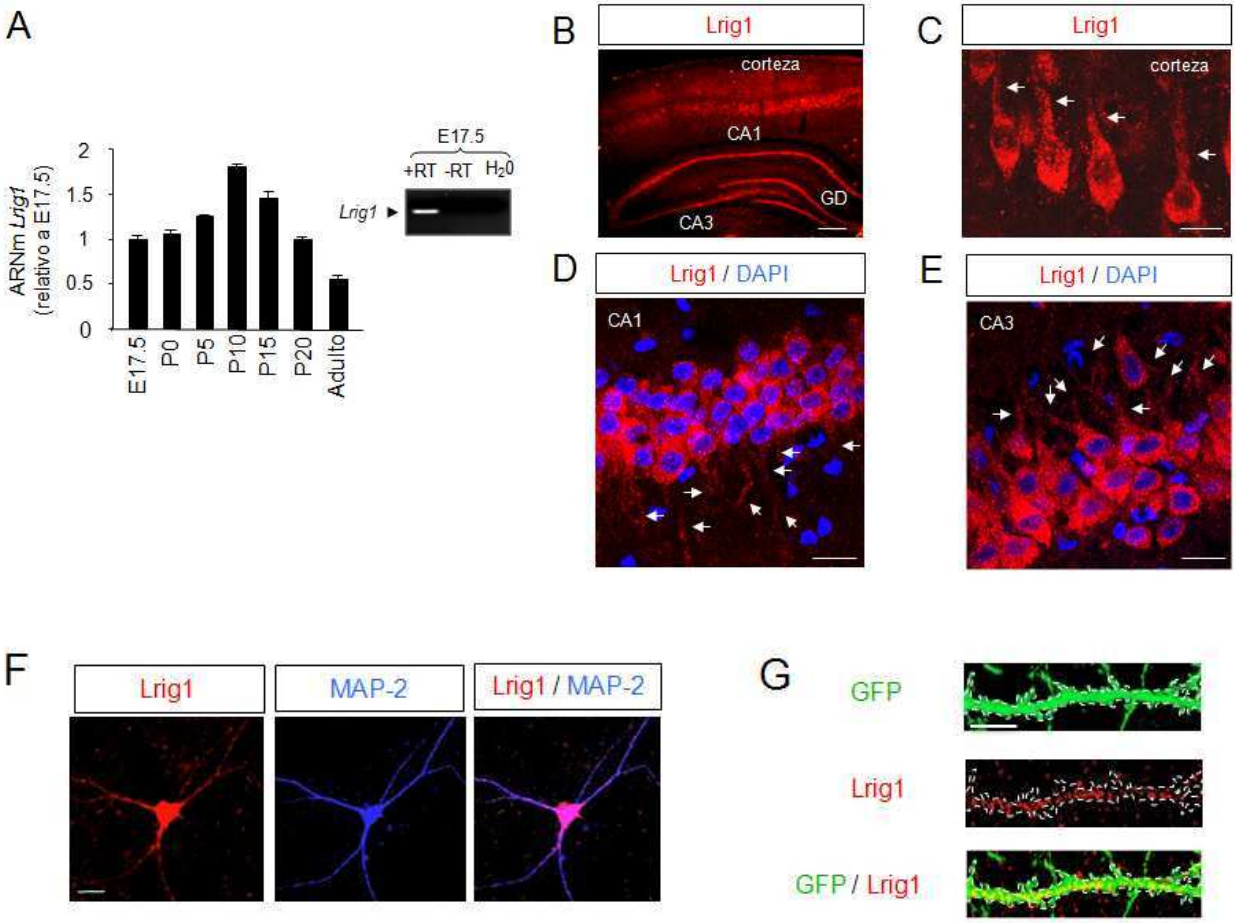
Resultados

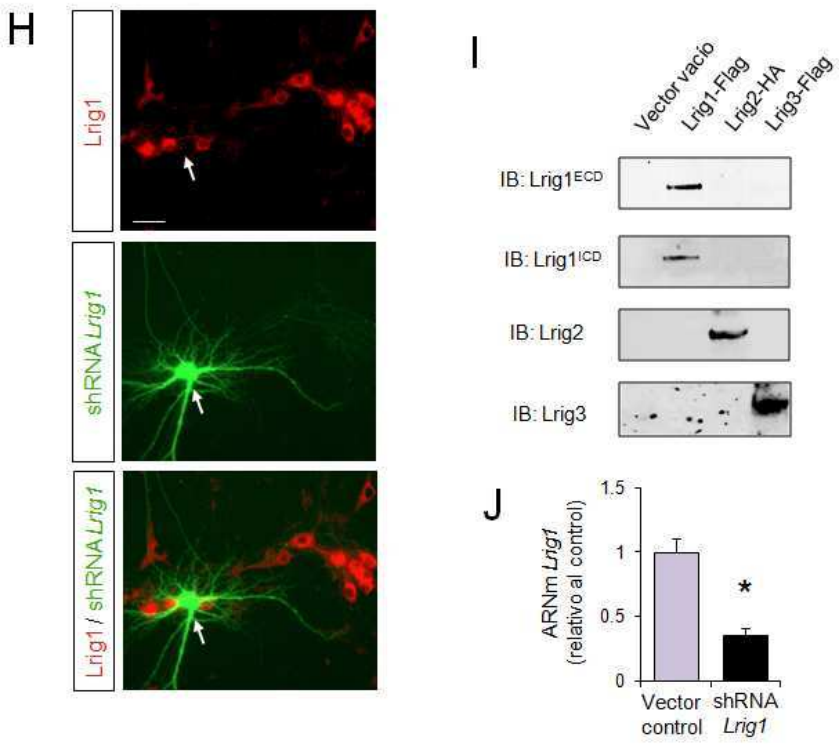
En primer lugar, comenzamos analizando por RT-PCR en tiempo real la expresión del ARNm de *Lrig1* en tejido hipocampal de rata a distintos estadios del desarrollo (**Figura 15A**). En estos ensayos, detectamos un aumento significativo de su expresión en la primera y segunda semana postnatal, el principal periodo de desarrollo de la arborización dendrítica hipocampal y sinaptogénesis en roedores. En particular, el pico de expresión fue a día postnatal 10 (P10).

Para determinar los tipos celulares que expresan Lrig1 analizamos por inmunofluorescencia la localización de esta proteína en secciones coronales de cerebro de rata de día postnatal 15 (P15). Esta tinción reveló que Lrig1 se expresa específicamente en neuronas granulares del giro dentado y en neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. También observamos expresión en las neuronas piramidales de la corteza (**Figura 15B**). Notablemente, Lrig1 parecería estar principalmente localizado en el soma neuronal y en la porción proximal de la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA1, CA3 y corticales (**Figura 15C-E**). En neuronas primarias hipocampales maduras la localización de Lrig1 se halló tanto en el soma como en la primera porción de las dendritas primarias, corroborado por el marcador neuronal específico de dendritas MAP-2 (**Figura 15F**). A su vez, se observó expresión de Lrig1 en dendritas de menor calibre (secundarias, terciarias, etc) en neuronas hipocampales cultivadas durante 18 días in vitro (DIV 18) (**Figura 15G**).

La especificidad del anticuerpo utilizado para la inmunofluorescencia fue controlada a través de la disminución en la tinción endógena de Lrig1 de ratón en aquellas neuronas

hipocampales primarias murinas transfectadas con un shRNA dirigido contra dicho ARNm (clonado en un vector pGFP-V-RS); y a través de western blot de extractos celulares en donde se sobreexpresó a cada uno de los miembros de la familia Lrig (**Figura 15H y 15I**). La secuencia de ARN de interferencia dirigida contra el ARNm de *Lrig1* (nucleótidos 1494-1512) contenida en el plásmido de shRNA utilizado, fue empleada y validada en un trabajo previo del laboratorio [109]. Adicionalmente, controlamos la especificidad de nuestro plásmido de shRNA, midiendo por RT-PCR en tiempo real los niveles del ARNm de *Lrig1* en células MN1 (que expresan endógenamente Lrig1) transfectadas con dicho shRNA (**Figura 15J**).





<u>Figura 15:</u> Expresión y localización somatodendrítica de Lrig1 durante el desarrollo de neuronas hipocampales.

A) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Lrig1* durante el desarrollo del hipocampo de rata a través de una RT-PCR en tiempo real. Los niveles del ARNm fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). El inserto de la derecha muestra una RT-PCR con la expresión de *Lrig1* en hipocampos de rata de día embrionario 17.5 (E17.5) y muestra control sin la transcriptasa reversa (-RT).

B) Inmunofluorescencia que muestra la localización de Lrig1 (en rojo) en secciones coronales de cerebro de rata de día postnatal 15 (P15). El anticuerpo anti-Lrig1 marca específicamente las regiones CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo, así como una región de la corteza cerebral. Barra de escala: 400 µm.

C-E) Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Lrig1 (en rojo) de la región de la corteza cerebral marcada con un asterisco en la fig. B (C) a mayor magnificación, y de las regiones CA1 (D) y CA3 (E) del hipocampo. Las imágenes fueron captadas por microscopía confocal. Las flechas muestran la tinción positiva en la dendrita apical de las neuronas piramidales de las áreas mencionadas. En

el caso de CA1 y CA3 se muestra la tinción con el marcador nuclear DAPI para identificar con mayor claridad los somas neuronales. Barra de escala: 20 µm.

F) Localización de Lrig1 (en rojo) y el marcador somatodendrítico neuronal MAP-2 (en azul) por inmunofluorescencia de neuronas disociadas de hipocampo de rata luego de 12 días *in vitro* (DIV 12). Barra de escala: 20 µm.

G) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran un patrón punteado en la tinción de Lrig1 en el cuerpo de una dendrita secundaria y terciaria (bifurcación a la derecha) de neuronas hipocampales de rata transfectadas con GFP a DIV 18, captadas con microscopía confocal. Barra de escala: 10 µm.

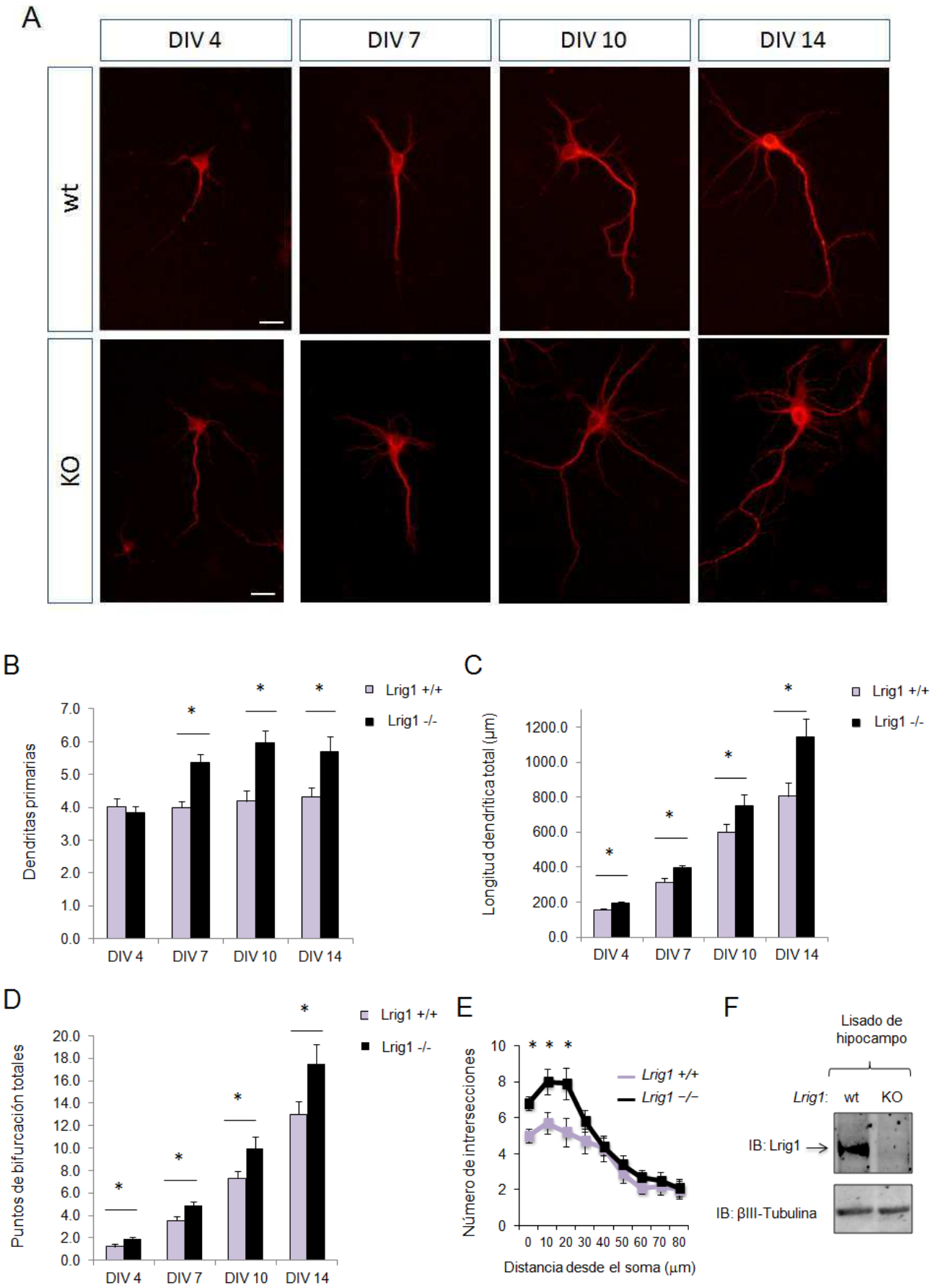
H) Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Lrig1 (en rojo) de neuronas hipocampales primarias transfectadas con un vector que expresa un shRNA dirigido contra el ARNm de *Lrig1* y la proteína verde fluorescente GFP (Lrig1-shRNA-GFP). Notar la pérdida de tinción de Lrig1 en la célula transfectada con el shRNA (indicada con la flecha), pero no en las células vecinas. Barra de escala: 20 µm.

I) La especificidad de los anticuerpos utilizados se realizó a través de western blot de extractos de células COS-7 transfectadas con un plásmido de Lrig1 etiquetado con flag (Lrig1-flag), Lrig2 etiquetado con HA (Lrig2-HA) o Lrig3 etiquetado con flag (Lrig3-flag). El mismo blot se testeó con los siguientes anticuerpos: anti-Lrig1 que reconoce el dominio extracelular ($Lrig1^{ECD}$), anti-Lrig1 que reconoce el dominio intracelular ($Lrig1^{ICD}$), anti-Lrig2 y anti-Lrig3.

J) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Lrig1* por RT-PCR en tiempo real de células MN1 transfectadas con un vector control o shRNA dirigido contra dicho ARNm (shRNA Lrig1). Las células transfectadas fueron enriquecidas con un tratamiento de puromicina de forma tal de aumentar la población celular que expresaba los vectores mencionados. Los niveles del ARNm fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). Se muestra el promedio ± error estándar de determinaciones por triplicado. *$p<0,001$ test de Student.

Para evaluar el rol de Lrig1 en el desarrollo de las neuronas hipocampales, analizamos cultivos primarios de ratones Lrig1$^{+/+}$ (wt) y Lrig1$^{-/-}$ (KO) de día postnatal 0 (P0). Las neuronas fueron mantenidas durante 4, 7, 10 y 14 días *in vitro* (DIV 4, 7, 10 y 14) y teñidas con el marcador dendrítico MAP-2 (**Figura 16A**). Luego evaluamos el número de dendritas primarias (**Figura 16B**), el crecimiento dendrítico total (**Figura 16C**) y el número de puntos de bifurcación (**Figura 16D**) en cada uno de los casos. De esta forma, observamos que las neuronas provenientes de los animales deficientes para Lrig1 presentaron un aumento en todos los parámetros dendríticos. Para evaluar la complejidad global e integral del árbol dendrítico realizamos el análisis de Sholl a DIV7. Este análisis consiste en dibujar círculos concéntricos alrededor del cuerpo celular a distintas distancias y medir la cantidad de cruces de las dendritas en cada círculo [120]. Notablemente, observamos que las neuronas hipocampales proveniente de animales Lrig1 KO exhibían un aumento significativo en la complejidad del árbol dendrítico, particularmente en la región proximal (**Figura 16E**).

Los ratones transgénicos empleados en estos experimentos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Håkan Hedman (Universidad de Umeå, Suecia). A través de western blot validamos la ausencia de expresión de la proteína Lrig1 en tejido hipocampal proveniente de ratones deficientes para dicho gen (**Figura 16F**).


A
DIV 4
DIV 7
DIV 10
DIV 14
wt
KO
B
Dendritas primarias
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-
DIV 4
DIV 7
DIV 10
DIV 14
C
Longitud dendrítica total (µm)
D
Puntos de bifurcación totales
E
Número de intersecciones
Distancia desde el soma (µm)
Lrig1 +/+
Lrig1 −/−
F
Lisado de hipocampo
Lrig1: wt KO
IB: Lrig1
IB: βIII-Tubulina

<u>Figura 16:</u> La pérdida de expresión de Lrig1 potencia la complejidad dendrítica de neuronas hipocampales.

A) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de ratones wt (Lrig1$^{+/+}$) y de ratones deficientes para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) cultivadas durante 4, 7, 10 y 14 días *in vitro* (DIV) y teñidas con MAP-2. Barra de escala: 15 µm. Notar la mayor arborización dendrítica de las neuronas de los ratones KO en cada uno de los estadíos analizados (DIVs).

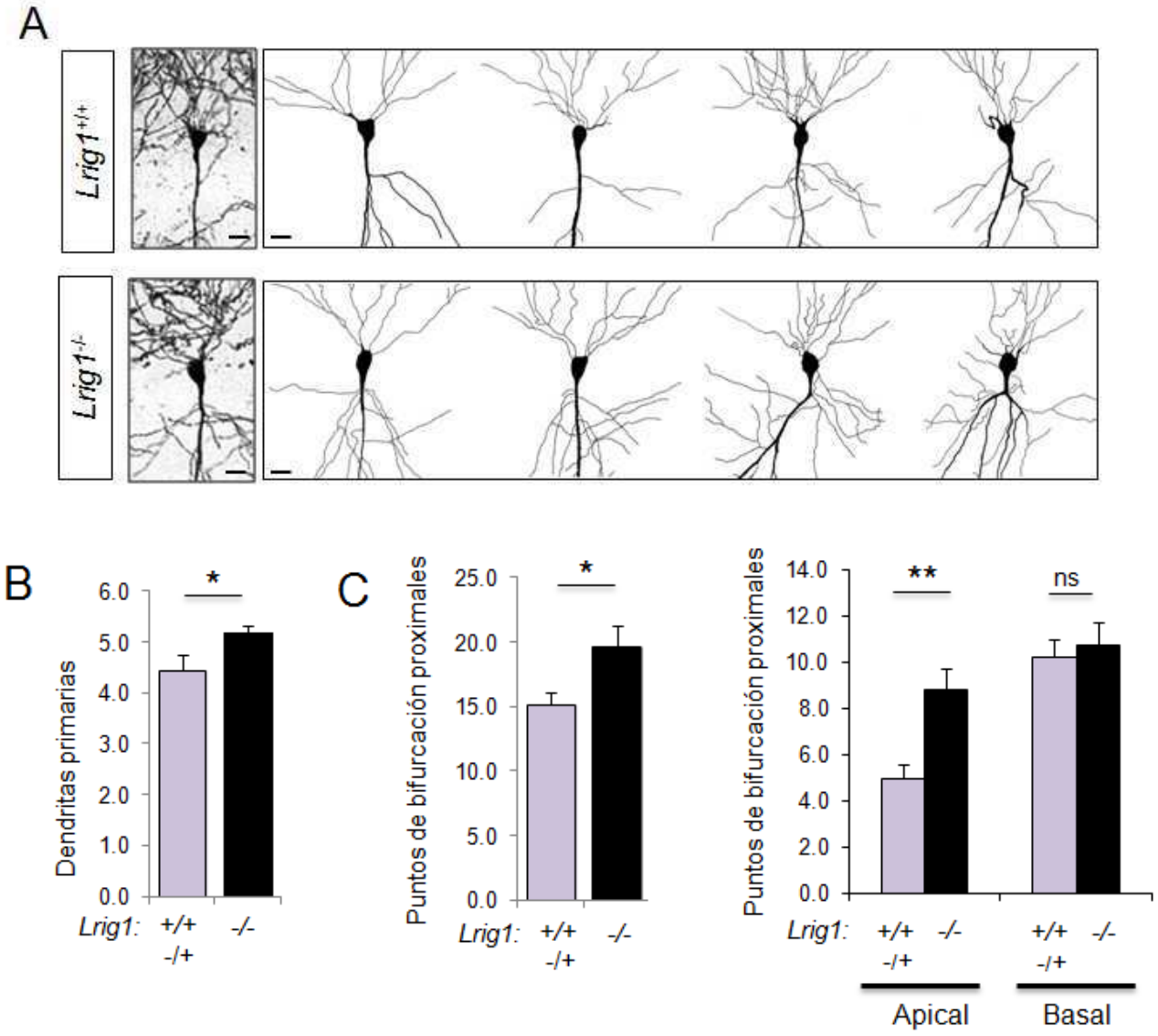
B-D) Cuantificación del número de dendritas primarias (B), longitud dendrítica total (C) y puntos totales de bifurcación (D) de neuronas hipocampales de ratones wt (Lrig1$^{+/+}$) y de ratones deficientes para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) tratadas como se mencionó en el panel A. Se muestra el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en dos réplicas. Se analizaron un total de 30 neuronas por condición experimental. *$p<0,05$ test de Student.

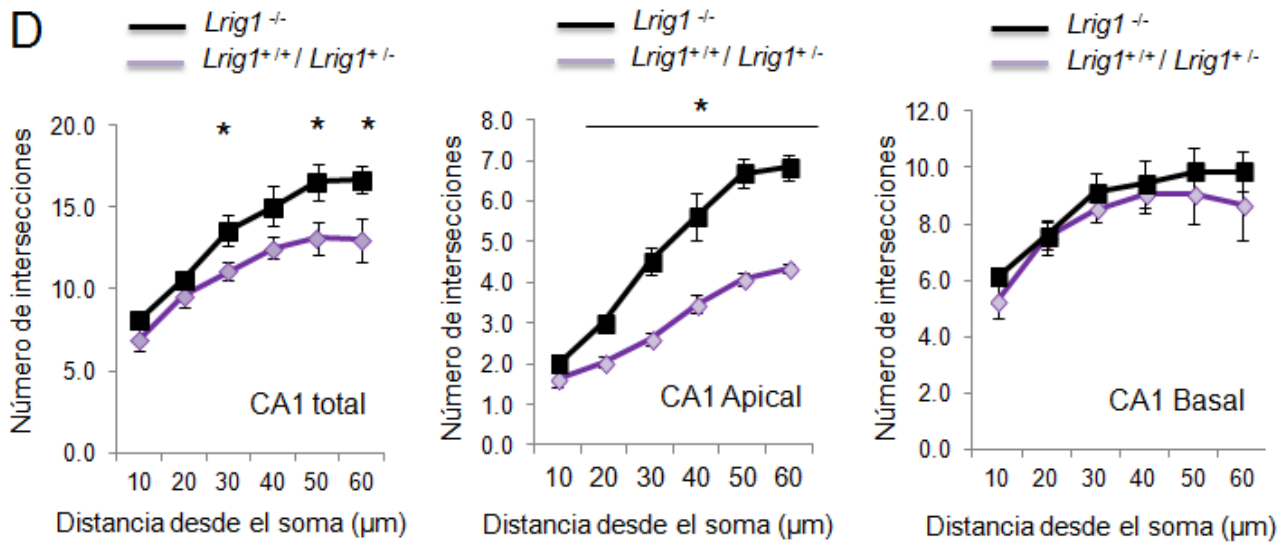
E) Análisis de Sholl del árbol dendrítico de neuronas hipocampales de ratones wt (Lrig1$^{+/+}$) y de ratones deficientes para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) cultivadas durante 7 días *in vitro* (DIV 7) y teñidas con MAP-2. Se muestra el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en dos réplicas. Se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental. *$p<0,05$ test de Student.

F) Extractos de tejido de hipocampo de ratón wt (Lrig1$^{+/+}$) y de ratón KO para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de 5 semanas de edad testeados con anticuerpo anti-Lrig1. En el panel inferior se muestra inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-βIII tubulina como control de carga.

Para evaluar si los resultados obtenidos *in vitro* tenían relevancia *in vivo*, evaluamos la arborización dendrítica de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en cortes histológicos obtenidos a partir de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$, teñidos por la técnica de Golgi. Las anormalidades morfológicas dendríticas observadas en los ensayos *in vitro* de ratones deficientes para Lrig1, se corroboraron *in vivo* (**Figura 17A**). El número de dendritas primarias y puntos de bifurcación proximales fueron significativamente más altos en las neuronas de los ratones KO de 4-5 semanas de edad en comparación con sus

compañeros de camada wt (**Figura 17B**). Más áun, el análisis de Sholl demostró diferencias significativas en la arborización dendrítica proximal en las neuronas deficientes para Lrig1, caracterizada por una complejidad mayor específicamente en el dominio apical, no así en el basal (**Figura 17C**). Los puntos de bifurcación dendríticos también fueron significativamente más altos en la zona apical en comparación con la basal, reforzando el fenotipo dendrítico apical en los ratones KO para Lrig1 (**Figura 17B**). Resultados similares fueron observados para las neuronas piramidales del área CA3 (**Figura 18**).





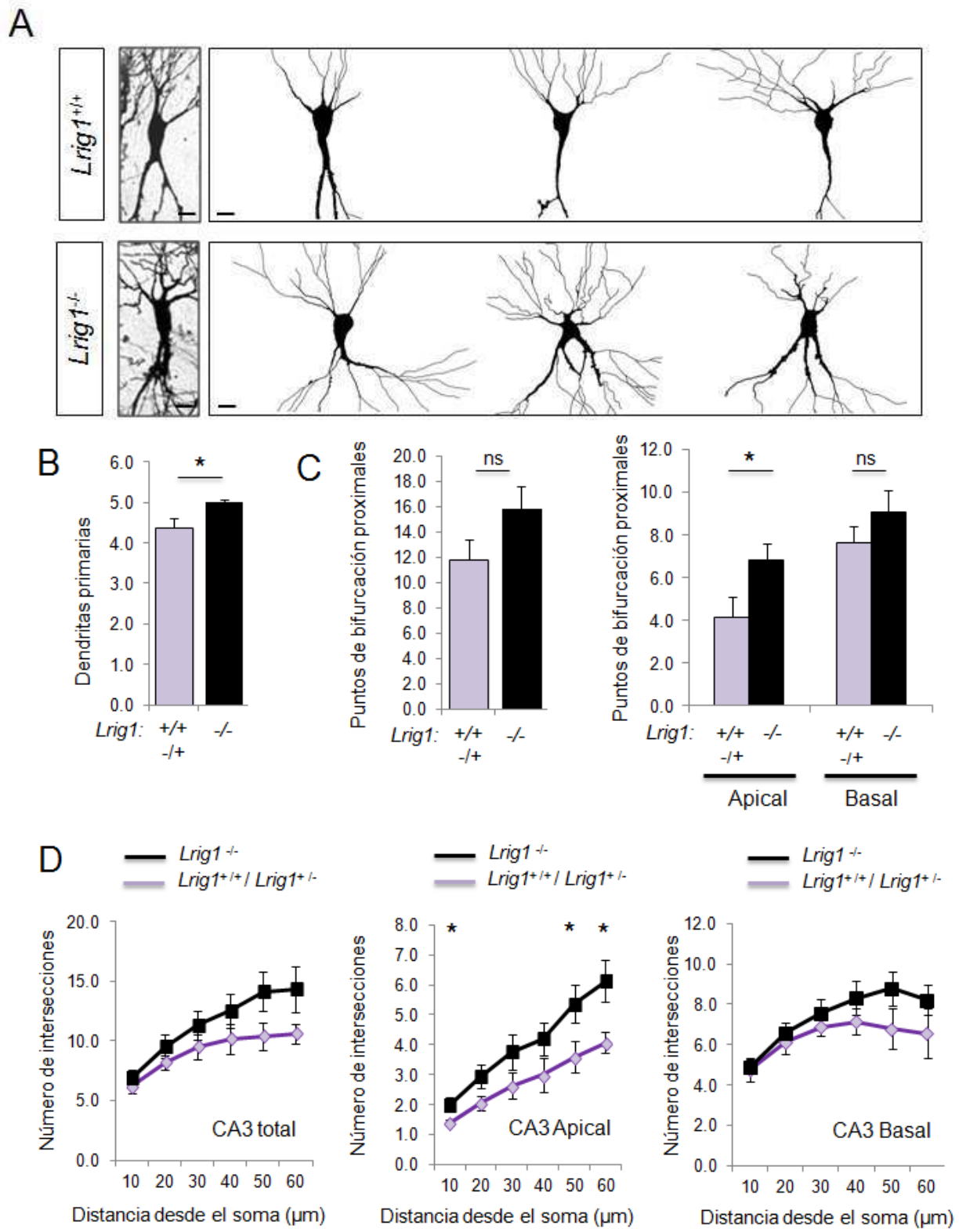
<u>Figura 17:</u> Lrig1 controla el desarrollo de la arborización dendrítica apical de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

A) Imágenes representativas de la región proximal de una neurona piramidal del área CA1 del hipocampo teñida con la técnica de Golgi, de un ratón wt (Lrig1$^{+/+}$) y de un ratón deficiente para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de 4 semanas de edad y de la misma camada. A su derecha, se muestran como ejemplo otras 4 neuronas de ratones wt y KO, dibujadas a partir de las imágenes originales. Notar la mayor arborización apical en las neuronas de los ratones Lrig1$^{-/-}$.Barra de escala: 15 µm.

B) Cuantificación del número de dendritas primarias de neuronas hipocampales del área CA1 de ratones wt/heterocigotas y ratones KO (deficientes para Lrig1) de 4-5 semanas de edad, teñidas con la técnica de Golgi. Se muestra el promedio ± error estándar proveniente de 4 ratones de ambas condiciones experimentales (60 neuronas por condición experimental). * p=0,03 test de Student.

C) Cuantificación de los puntos de bifurcación proximales (hasta 60 µm desde el soma) (izquierda) y discriminados en región basal y apical (derecha) de las mismas neuronas indicadas en el panel B. *p=0,04; **p<0,008; ns = no significativo; test de Student.

D) Análisis de Sholl del árbol dendrítico proximal (hasta 60 µm desde el soma) (izquierda) y discriminado en región apical (medio) y basal (derecha) de las mismas neuronas indicadas en el panel B. *p<0,05; ns = no significativo; test de Student.



<u>Figura 18:</u> Lrig1 controla el desarrollo de la arborización dendrítica apical de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo.

A) Imágenes representativas de la región proximal de una neurona piramidal del área CA3 del hipocampo teñida con la técnica de Golgi, de un ratón wt (Lrig1$^{+/+}$) y de un ratón deficiente para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de 4 semanas de edad y de la misma camada. A su derecha, se muestran como ejemplo otras 3 neuronas de ratones wt y KO, dibujadas a partir de las imágenes originales. Notar la mayor arborización apical en las neuronas de los ratones Lrig1$^{-/-}$.Barra de escala: 15 µm.

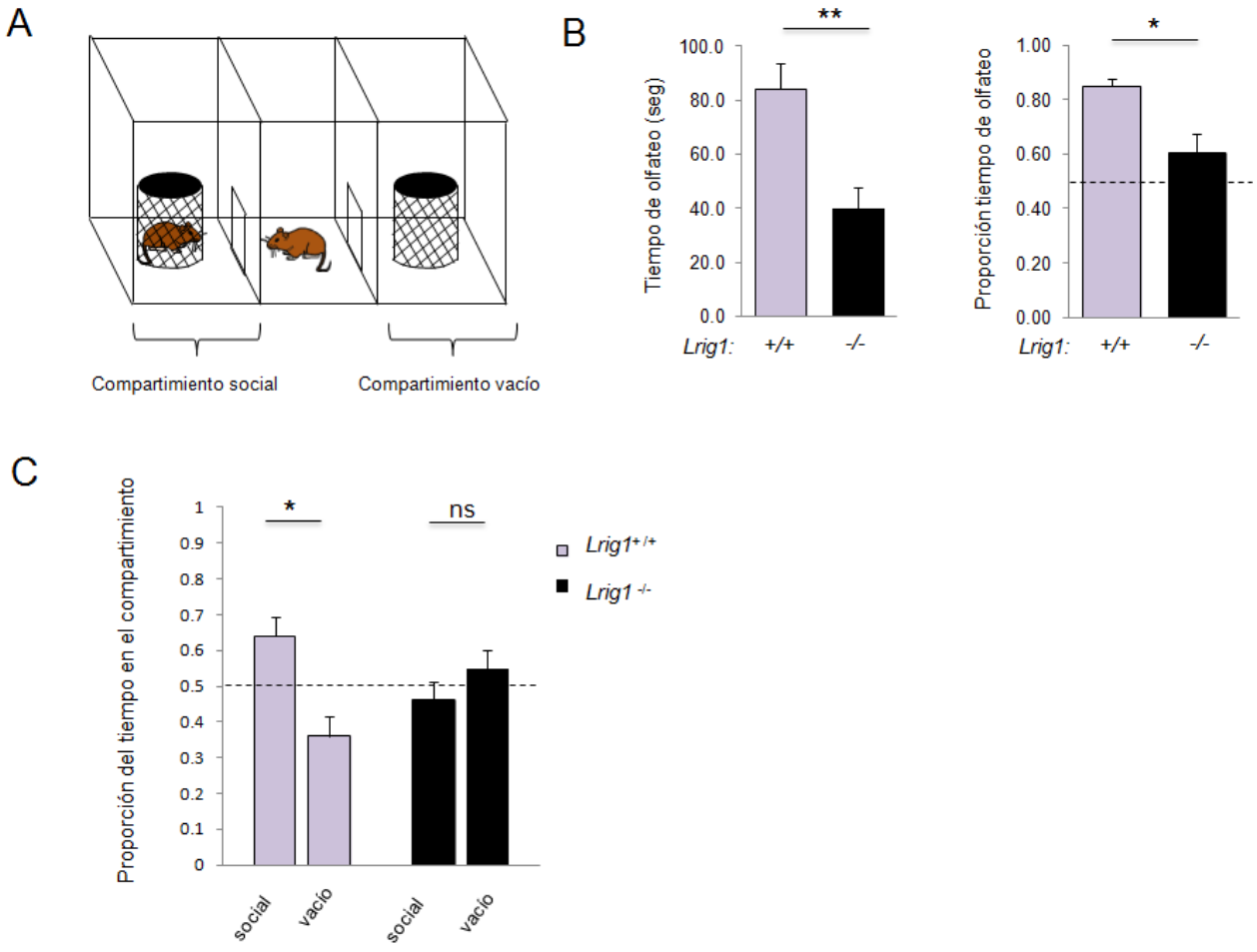
B) Cuantificación del número de dendritas primarias de neuronas hipocampales del área CA3 de ratones wt/heterocigotas y ratones KO (deficientes para Lrig1) de 4-5 semanas de edad, teñidas con la técnica de Golgi. Se muestra el promedio ± error estándar proveniente de 4 ratones de ambas condiciones experimentales (40 neuronas por condición experimental). * p=0,03 test de Student.

C) Cuantificación de los puntos de bifurcación proximales (hasta 60 µm desde el soma) (izquierda) y discriminados en región basal y apical (derecha) de las mismas neuronas indicadas en el panel B. *p=0,04; ns = no significativo; test de Student.

D) Análisis de Sholl del árbol dendrítico proximal (hasta 60 µm desde el soma) (izquierda) y discriminado en región apical (medio) y basal (derecha) de las mismas neuronas indicadas en el panel B. *p<0,05; ns = no significativo; test de Student.

El tamaño y la morfología del árbol dendrítico son determinantes claves de las propiedades funcionales de las neuronas. Muchos desórdenes psiquiátricos y del neurodesarrollo se deben principalmente a anormalidad estructurales de las dendritas y sus conexiones. [121, 122] Por ejemplo, el retraso mental y los trasfornos del espectro autista se consideran enfermedades genéticas usualmente asociadas a un crecimiento dendrítico exacerbado o falta de podado (*pruning*) dendrítico durante el desarrollo, y caracterizadas por defectos en el comportamiento social. [123] Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí presentados y al hecho de que los ratones deficientes para *Lrig1* tendían a estar

aislados de sus compañeros de camada dentro de la caja, decidimos evaluar si estos ratones presentaban comportamientos sociales alterados. Para medir la interacción social, ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ fueron sometidos al test social de 3 cámaras. Luego de la habituación, el ratón es colocado en el compartimiento del medio y se les permite elegir libremente visitar una recámara que contiene encerrado a un ratón extraño de la misma edad y con el cual no tuvo contacto previo, o una recámara con el contenedor vacío (**Figura 19A**). Como era de esperarse, los ratones wt exhibieron un típico comportamiento de acercamiento y olfateo al ratón extraño. Sin embargo, los ratones deficientes para Lrig1 presentaron profundos defectos en este tipo de comportamiento, reflejado por el hecho de que no sólo pasan la misma proporción de tiempo en ambos compartimientos sino también que olfatean significativamente menos el contenedor con el ratón extraño (**Figura 19B y 19C**).



<u>Figura 19:</u> Los ratones deficientes para Lrig1 presentan defectos en el comportamiento de interacción social.

A) Esquema representativo del dispositivo de 3 compartimientos utilizado para el test de interacción social. Luego de la habituación, el ratón testeado se coloca en la recámara del medio y se le permite durante 10 minutos circular libremente por todos los compartimientos. En uno de ellos se encuentra encerrado en un contenedor un ratón extraño (estímulo social) con el cual nunca tuvo contacto y de la misma edad y sexo, mientras que en la otra recámara el contenedor está vacío. Se registró el tiempo que el ratón testeado estuvo en ambos compartimientos, así como el tiempo de aproximación y olfateo del estímulo social.

B) Cuantificación del tiempo total de olfateo del ratón extraño (izquierda) y la proporción de olfateo con respecto al contenedor vacío (derecha), de ratones Lrig1$^{+/+}$ (n=7) y Lrig1$^{-/-}$ (n=6) en el dipositivo descripto en el panel A. ** p=0,003 test de Student; * p=0,03 test de Student.

C). Cuantificación de la proporción del tiempo pasado en cada compartimiento, de ratones Lrig1$^{+/+}$ (n=7) y Lrig1$^{-/-}$ (n=6) en el dipositivo descripto en el panel A. * p=0,03 test de Student pareado; ns = no significativo.

A lo largo del desarrollo, muchos factores extrínsecos controlan el crecimiento dendrítico y su ramificación, activando vías de señalización específicas que modulan la expresión génica y el citoesqueleto [124]. BDNF es uno de los factores extrínsecos más estudiados que regulan el crecimiento dendrítico, la morfología de la ramificación y la densidad de espinas dendríticas en desarrollo [125-130]. En neuronas piramidales esta neurotrofina es capaz de aumentar el número de dendritas primarias y los puntos de bifurcación cerca del cuerpo celular [126, 131-134]. Por otro lado, como hemos mencionado, Lrig1 es una proteína asociada a varios RTK que regula múltiples vías de señalización activadas por los receptores para factores tróficos [16]. Por lo tanto, estas observaciones nos llevaron a preguntarnos si el incremento en la complejidad dendrítica producida por la

pérdida de expresión de Lrig1 en las neuronas hipocampales, era el resultado de una mayor capacidad de respuesta a BDNF. Para ello, analizamos el grado de colocalización entre Lrig1 y TrkB, el receptor de BDNF, en las neuronas hipocampales. Notablemente, la localización de Lrig1 mostrada por inmunofluorescencia en secciones coronales de cerebro de rata (**Figura 15B**) es consistente con el patrón de expresión de TrkB en giro dentado y CA1-CA3 del hipocampo, descripto en trabajos previos [135-137]. Tinciones *in vitro* de TrkB realizadas por otro grupo de investigación han revelado que este receptor se expresa en casi todas las neuronas de hipocampo cultivadas y está localizado principalmente en el soma y las dendritas [138]. A su vez, nuestros resultados indican que tanto Lrig1 como TrkB se expresan en la zona de cuerpos neuronales del hipocampo (**Figura 20A, panel superior**); y más de un 95% de las neuronas TrkB positivas de cultivos de células hipocampales teñidas por inmunofluorescencia, coexpresan Lrig1 (**Figura 20A, panel inferior**). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que ambas proteínas colocalizan fuertemente en el compartimento somatodendrítico de las neuronas del hipocampo, sugiriendo un posible rol de Lrig1 en el control de la señalización inducida por TrkB.

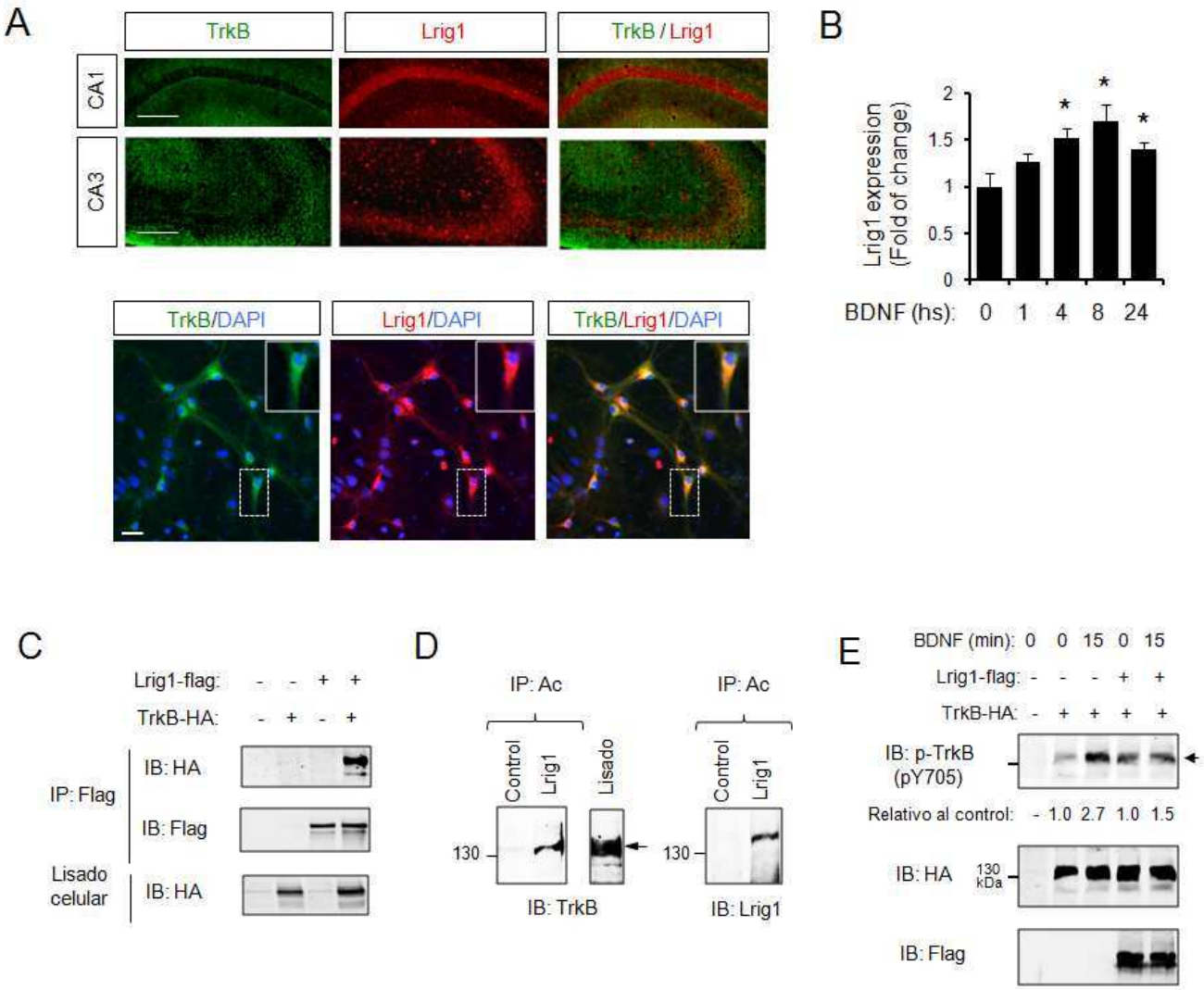
Basados en resultados previos del laboratorio que han identificado a Lrig1 como una proteína involucrada en un mecanismo de retroregulación negativa del receptor Ret [109], y dada la importancia ya mencionada de dichos mecanismos para mantener la fisiología celular analizamos si la expresión del gen de *Lrig1* era inducida luego de la estimulación de neuronas hipocampales con BDNF. El análisis de RT-PCR en tiempo real reveló un aumento significativo en el ARNm de *Lrig1* en cultivos primarios hipocampales luego de la estimulación con BDNF (**Figura 20B**). Estos ensayos demuestran que Lrig1 es un gen inducible por BDNF y que su inducción permitiría regular la homeostasis neuronal manteniendo los niveles activados de TrkB dentro de ciertos límites compatibles con respuestas fisiológicas. Luego, examinamos la posibilidad de que Lrig1 interactúe

físicamente con TrkB. Para ello, transfectamos células COS-7 con un plásmido que codifica para TrkB (etiquetado con HA), en ausencia o presencia de un plásmido que codifica para Lrig1 (etiquetado con flag) y realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-flag. Notablemente, TrkB-HA fue coinmunoprecipitado específicamente por el anticuerpo anti-flag sólo en las células que coexpresaban ambos plásmidos y no en las que expresaban cada uno de los plásmidos por separado, lo cual indica que Lrig1 es capaz de interactuar físicamente con TrkB (**Figura 20C**).

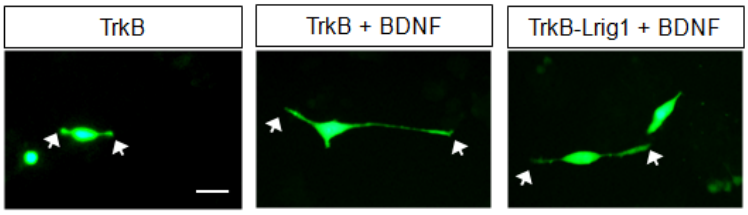
Para determinar si la interacción entre Lrig1 y TrkB era capaz de ocurrir cuando estas proteínas se encuentran expresadas en niveles fisiológicos, Lrig1 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-TrkB o con anticuerpo control, a partir de extractos de tejido de hipocampos de ratas de 15 días de edad postnatal (P15). Estos ensayos revelaron que TrkB podía ser coinmunoprecipitado específicamente con anticuerpo anti-Lrig1 (**Figura 20D**), demostrando que Lrig1 y TrkB pueden interactuar endógenamente en forma específica en el hipocampo.

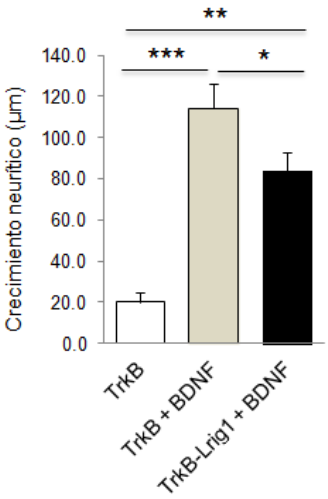
Para investigar si Lrig1 puede regular la activación del receptor TrkB, se transfectaron células HEK sobreexpresando el plásmido de TrkB-HA en la presencia o ausencia de Lrig1-flag. Luego, las células se hambrearon (es decir, se pusieron en un medio libre de suero), se trataron con o sin BDNF durante 15 minutos y se lisaron. La actividad de TrkB fue medida en los extractos celulares con un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de TrkB en la tirosina 705 (Y705), la cual está ubicada dentro del *loop* de activación del dominio kinasa del receptor. De esta forma, las células que expresaban Lrig1 mostraron una reducción sustancial en la fosforilación de TrkB inducida por BDNF (**Figura 20E**), indicando que Lrig1 no sólo es capaz de interactuar con TrkB sino también inhibir su activación dependiente de ligando. A continuación, decidimos investigar si Lrig1 era capaz de regular los efectos biológicos de BDNF. Para ello, utilizamos células PC12 cotransfectadas transientemente con TrkB-HA y GFP, en

presencia o ausencia del vector de expresión de Lrig1-flag. Luego se las trató con BDNF durante 48 hs y se analizó la diferenciación morfológica midiendo el largo de las prolongaciones celulares. Las células transfectadas con el plásmido de Lrig1 presentaron prolongaciones más cortas que las que no lo tenían, indicando que esta proteína es capaz de restringir la diferenciación morfológica inducida por BDNF (**Figura 20F**).



F





<u>Figura 20:</u> Lrig1 es inducido por BDNF y es capaz de interactuar con TrkB y restringir su activación.

A) Arriba: Inmunofluorescencia de TrkB (en verde) y Lrig1 (en rojo) en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratón P13. Notar la expresión de Lrig1 en la zona de los somas neuronales, donde también se expresa TrkB. Barra de escala: 200 µm. Abajo: Expresión de Lrig1 (en rojo) y TrkB (en verde) en neuronas hipocampales primarias de rata. En los recuadros se muestra una imagen de magnificación mayor en donde se puede apreciar la colocalización entre ambas moléculas. Barra de escala: 30 µm.

B) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Lrig1* por RT-PCR en tiempo real de cultivos hipocampales de rata de 10 días *in vitro* (DIV 10), tratados con BDNF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles del ARNm de *Lrig1* fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). Se muestra el promedio ± error estándar de determinaciones hechas por triplicado. *$p<0,05$ contra el grupo control, 0 hs BDNF (ANOVA de una vía seguida del test de Dunnett).

C) Coinmunoprecipitación entre Lrig1-flag y TrkB-HA en células COS-7. Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpo anti-flag seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti HA. El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-flag como se muestra debajo. El panel

inferior muestra la expresión del TrkB-HA en el lisado total, a través de inmunoblot con anticuerpo anti-HA.

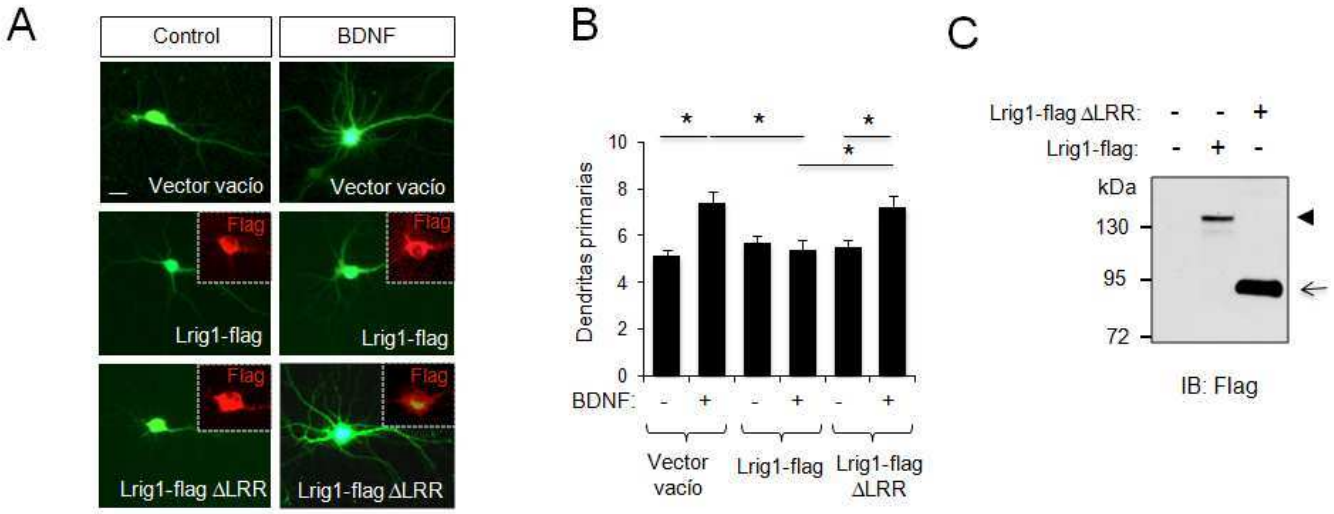
D) Interacción *ex vivo* de Lrig1 y TrkB: Coinmunoprecipitación entre Lrig1 y TrkB con los niveles de expresión endógena de ambas proteínas a partir de extractos de hipocampos de rata de día postnatal 15 (P15). La muestra fue igualmente dividida en dos partes y luego se realizó una IP con un anticuerpo control (anti-HA) o anti-Lrig1 seguido de IB con anticuerpo anti-TrkB (panel derecho). El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-Lrig1 (panel izquierdo). También se incluyó como control la expresión de TrkB en una alícuota del material de partida (lisado). La flecha indica la banda de TrkB coinmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Lrig1.

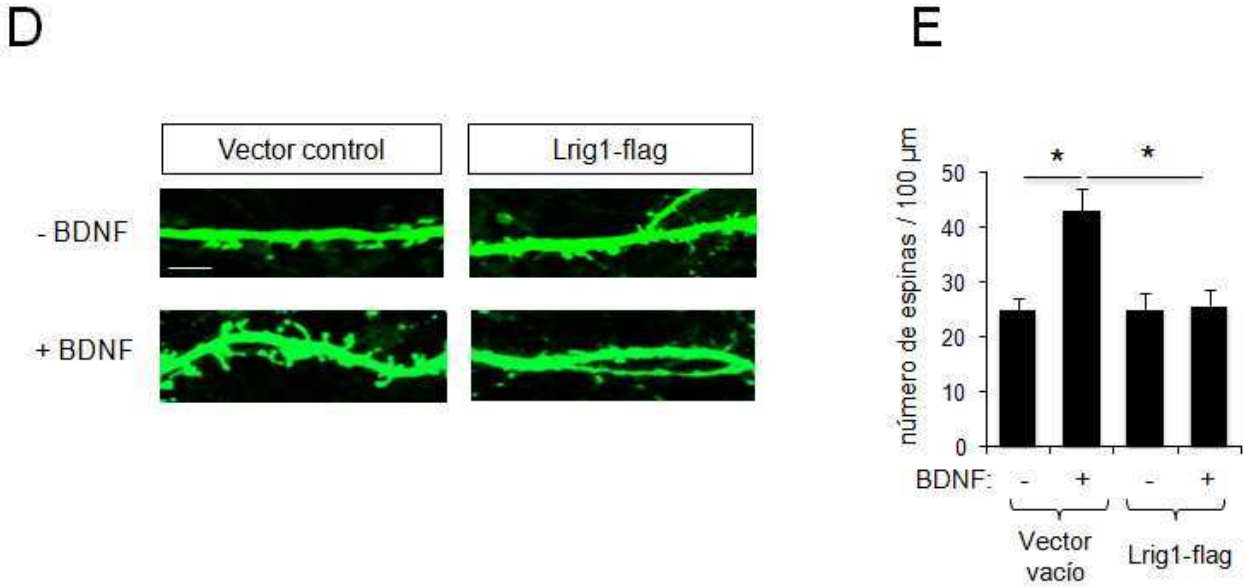
E) La activación de TrkB (P-TrkB) dependiente de ligando fue evaluada transfectando transientemente células HEK con un plásmido de TrkB-HA junto con un vector control o Lrig1-flag. Luego de 36 hs las células fueron hambreadas (con medio sin suero) y estimuladas con o sin BDNF (30 ng/ml) durante 15 minutos. El nivel de activación de TrkB (P-TrkB) fue evaluado en lisados celulares totales a través de IB con un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de TrkB en tirosina 705 (pY705). El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-HA y anti-flag. Los números debajo del blot indican el nivel de cambio de P-TrkB relativo al TrkB total (anti-HA). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes adicionales.

F) *Panel derecho:* fotomicrografías representativas de células PC12 cotransfectadas transientemente con el plásmido de GFP y TrkB-HA, junto con un vector control (pCDNA3) o Lrig1-flag. Luego de 36 hs las células fueron hambreadas (con medio sin suero) y estimuladas con o sin BDNF (30 ng/ml) durante 48 hs. Las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 10 µm. *Panel izquierdo:* gráfico que muestra la cuantificación de la longitud de las prolongaciones celulares de las células GFP positivas. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en 2 réplicas. Se contaron más de 25 células por condición experimental. *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$ (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls).

Reportes previos han establecido que BDNF y su receptor TrkB inducen la complejidad dendrítica proximal principalmente caracterizada por un aumento en la cantidad de dendritas primarias y secundarias y un incremento de las espinas dendríticas [127, 132, 133]. Para estudiar el rol de Lrig1 en el desarrollo dendrítico mediado por BDNF, realizamos ensayos de ganancia de función sobreexpresando Lrig1-flag en cultivos de neuronas hipocampales. Para ello, neuronas hipocampales disociadas de 8 días *in vitro* (DIV 8) fueron transfectadas con un plásmido control (vector vacío) o Lrig1-flag, en combinación con un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente GFP. Luego de la transfección, las neuronas se cultivaron en ausencia o presencia de BDNF durante 72 hs y se analizó su desarrollo dendrítico (DIV 11 final). En las neuronas sobreexpresando Lrig1, el BDNF falló en promover los cambios morfológicos dendríticos evidenciado por el número de dendritas primarias. Sin embargo, una versión mutante de Lrig1 que carece de los dominios ricos en leucina (Lrig1-flag ΔLRR), perdió la habilidad de bloquear la formación de dendritas primarias inducida por BDNF (**Figura 21A y 21B**), por lo cual este dominio sería necesario para la función inhibitoria de Lrig1. A continuación, realizamos un western blot de células trasnfectadas con el plásmido que codifica para Lrig1-flag y para Lrig1-flag ΔLRR, para corroborar que este último resultado no haya sido generado por una expresión diferencial de ambas proteínas Lrig1. Como puede observarse, el plásmido de Lrig1-flag ΔLRR tiene una expresión aún mayor que el plásmido de Lrig1-flag (**Figura 21C**).

A su vez, la sobreexpresión de Lrig1 fue capaz de restringir la formación de espinas dendríticas inducida por BDNF en las neuronas hipocampales (**Figura 21D y 21E**), apoyando el rol de Lrig1 como inhibidor endógeno del desarrollo dendrítico inducido por esta neurotrofina.


A
Control
BDNF
Vector vacío
Vector vacío
Flag
Lrig1-flag
Lrig1-flag
Lrig1-flag ΔLRR
Lrig1-flag ΔLRR
B
Dendritas primarias
BDNF:
Vector vacío
Lrig1-flag
Lrig1-flag ΔLRR
C
Lrig1-flag ΔLRR:
Lrig1-flag:
kDa
130
95
72
IB: Flag


D
Vector control
Lrig1-flag
- BDNF
+ BDNF
E
número de espinas / 100 µm
BDNF:
Vector vacío
Lrig1-flag

<u>Figura 21:</u> La sobreexpresión de Lrig1 restringe tanto el desarrollo dendrítico como la densidad de espinas dendríticas de neuronas hipocampales en respuesta a BDNF.

A) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de rata transfectadas a DIV 8 con un vector vacío, Lrig1-flag o ΔLRR Lrig1-flag, junto con un plásmido de GFP. Al día siguiente de la transfección (DIV 9), las neuronas fueron cultivadas en ausencia o presencia de BDNF (30 ng/ml) durante 48 hs. (DIV 11 final). Se muestra inmunofluorescencia de flag para controlar la expresión de Lrig1 y Lrig1-flag ΔLRR. Barra de escala: 15 µm. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

B) Cuantificación del número de dendritas primarias de neuronas hipocampales tratadas como se indica en el panel C. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en 2 réplicas. Se contaron entre 32 neuronas por condición experimental. *$p<0,01$ (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls).

C) Western blot, con anticuerpo anti-flag, de extractos de células COS-7 sobreexpresando Lrig1-flag y Lrig1-flag ΔLRR, como control de los niveles de expresión de ambos plásmidos.

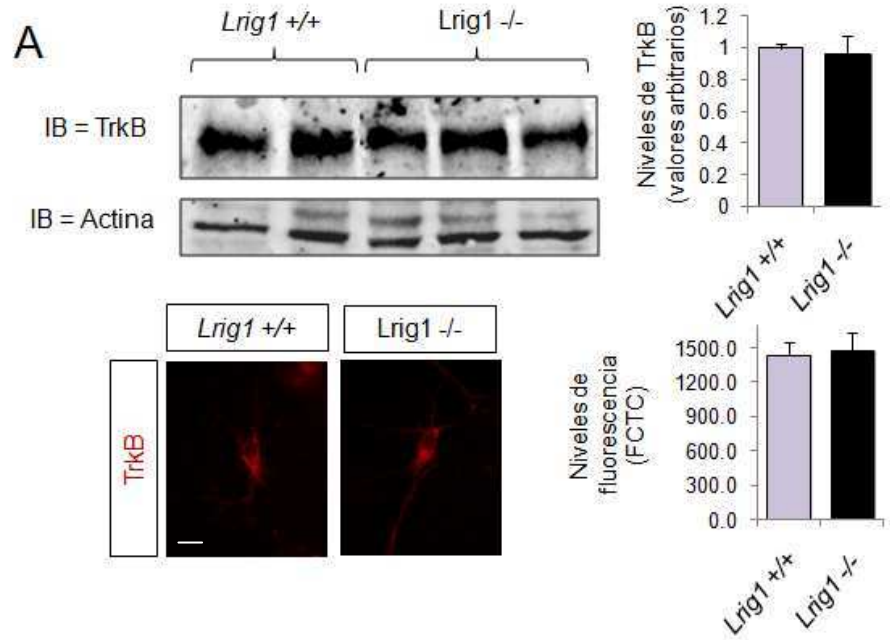
D) Imágenes representativas de microscopía confocal de dendritas de neuronas hipocampales de rata transfectadas a DIV 15 un vector control o Lrig1-flag, junto con un plásmido de GFP. Al día siguiente de la transfección (DIV 16), las neuronas fueron cultivadas en ausencia o presencia de BDNF (30 ng/ml) durante 48 hs. (DIV 18 final). Barra de escala: 5 µm.

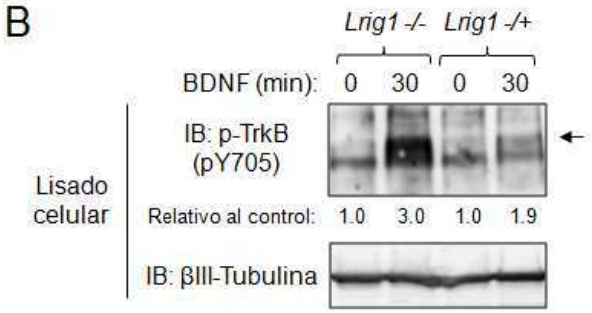
E) Cuantificación del número de espinas dendríticas cada 100 µm de dendrita de neuronas hipocampales tratadas como se indica en el panel F. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en 2 réplicas. Se contaron 20 dendritas de neuronas distintas por condición experimental. *$p<0,01$ (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls).

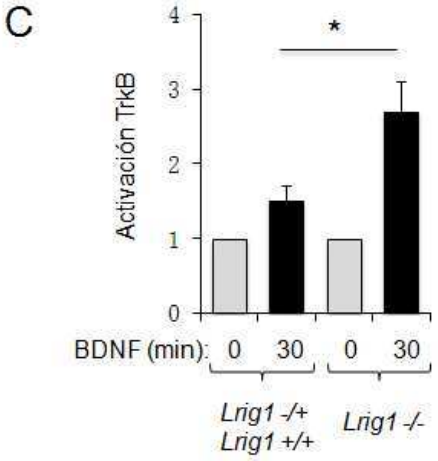
Dado que, como hemos mencionado, Lrig1 fue inicialmente descripto como un regulador del EGFR, actuando a través de un mecanismo de degradación, decidimos evaluar los niveles de TrkB en los ratones Lrig1 wt y KO. Para ello, realizamos extractos

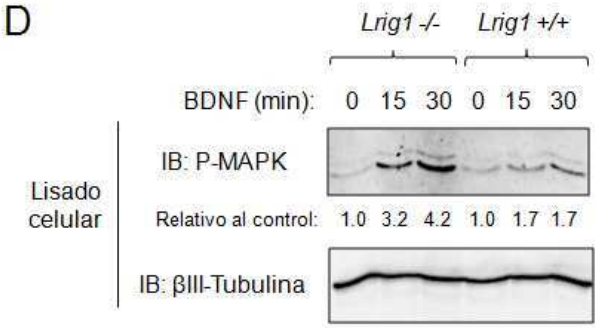
celulares de hipocampo de ratones de 5 semanas e inmunofluorescencia de células hipocampales disociadas. En ambos casos, los niveles de TrkB observados fueron similares entre los ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ (**Figura 22A**). Para analizar si Lrig1 era capaz de modular la señalización de TrkB inducida por BDNF examinamos la fosforilación de TrkB y MAPK, una de las moléculas efectoras que señalizan río abajo de este receptor, en cultivos hipocampales de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ tratados con la neurotrofina BDNF. Consistentemente con el rol de Lrig1 como inhibidor de la función de TrkB, se observó una potenciación significativa tanto en la fosforilación en tirosina de dicho receptor (**Figura 22B y 22C**) como en la activación de MAPK (**Figura 22D y 22E**) en los extractos de neuronas hipocampales deficientes para Lrig1 que fueron tratadas con BDNF.

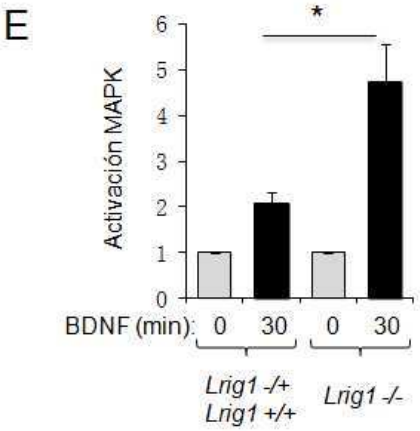
A continuación decidimos investigar si la pérdida de expresión de Lrig1 también afectaba la respuesta biológica de neuronas hipocampales a BDNF. De acuerdo con el rol de Lrig1 como un regulador negativo de la activación de TrkB inducida por neurotrofina, se observó una potenciación en el desarrollo dendrítico de neuronas hipocampales primarias transfectadas en DIV 4 con el shRNA Lrig1, y estimuladas con BDNF durante 72 hs (**Figura 22F**). Notablemente, tanto los puntos de bifurcación dendríticos como el número de dendritas primarias y secundarias de las neuronas hipocampales tratadas con BDNF fueron incrementados en las neuronas que expresaban el shRNA (**Figura 22G-J**). Estos resultados muestran una potenciación de los efectos dendritogénicos de BDNF en las neuronas deficientes para Lrig1. Es decir, nuestros resultados proveen evidencias de un nuevo mecanismo regulatorio que permite un refinamiento de los efectos de BDNF sobre las neuronas hipocampales.

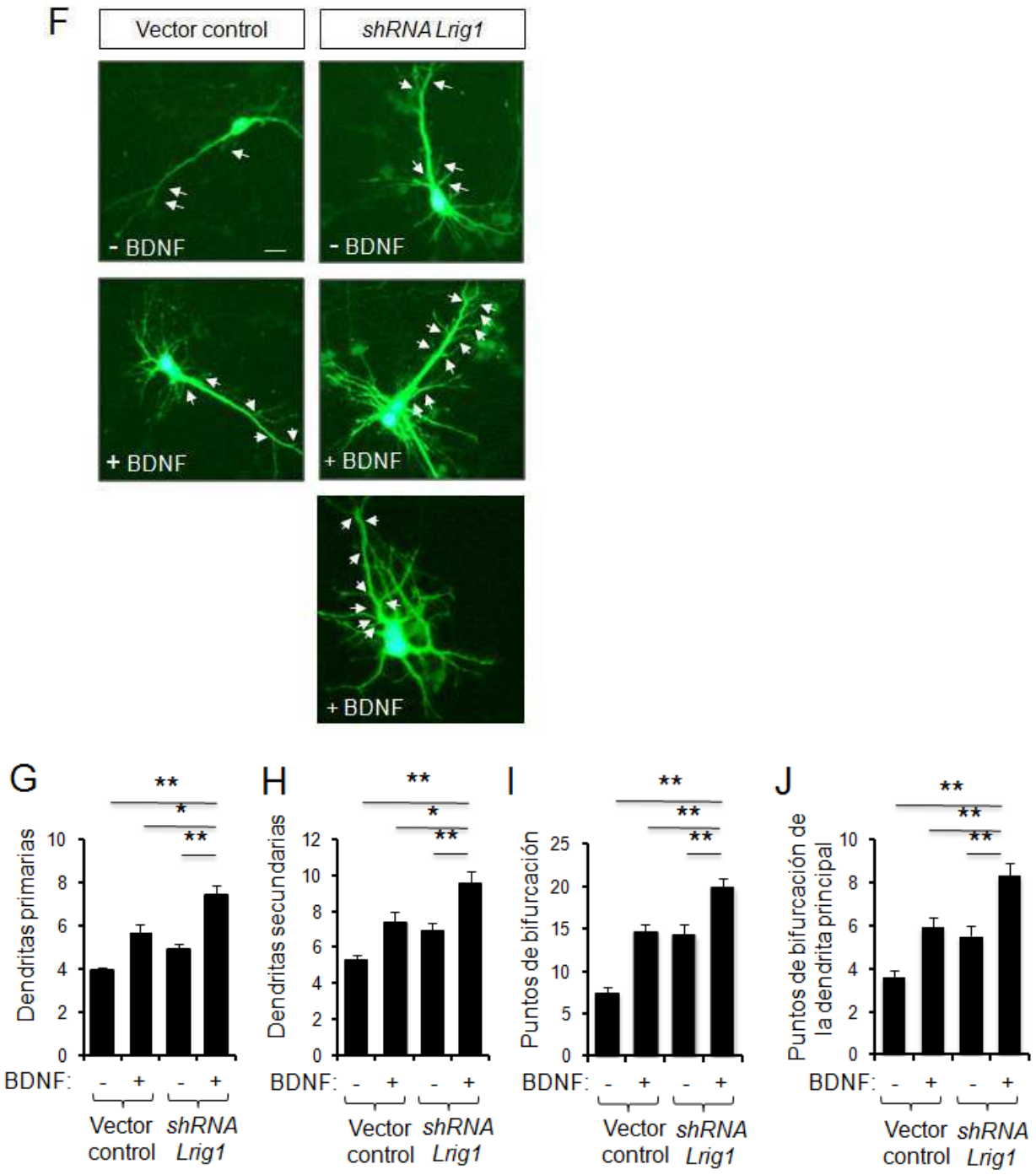

A
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-
IB = TrkB
IB = Actina
Niveles de TrkB (valores arbitrarios)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-
TrkB
Niveles de fluorescencia (FCTC)
1500.0
1200.0
900.0
600.0
300.0
0.0
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-


B
Lrig1 -/-
Lrig1 -/+
BDNF (min): 0 30 0 30
IB: p-TrkB (pY705)
Lisado celular
Relativo al control: 1.0 3.0 1.0 1.9
IB: βIII-Tubulina


C
*
Activación TrkB
4
3
2
1
0
BDNF (min): 0 30 0 30
Lrig1 -/+
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-


D
Lrig1 -/-
Lrig1 +/+
BDNF (min): 0 15 30 0 15 30
IB: P-MAPK
Lisado celular
Relativo al control: 1.0 3.2 4.2 1.0 1.7 1.7
IB: βIII-Tubulina


E
*
Activación MAPK
6
5
4
3
2
1
0
BDNF (min): 0 30 0 30
Lrig1 -/+
Lrig1 +/+
Lrig1 -/-



<u>Figura 22:</u> La pérdida de expresión de Lrig1 favorece la señalización y el desarrollo dendrítico inducidos por TrkB de neuronas hipocampales primarias en respuesta a BDNF.

A) Arriba: Inmunoblot (IB) que muestra los niveles totales de TrkB en extractos celulares de hipocampo de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ de 5-6 semanas de edad. Se muestra IB con anticuerpo

anti-actina como control de carga. A la derecha se encuentra un gráfico que muestra la cuantificación de dichos niveles. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar (n=2 para los wt, y n=3 para los KO).

Abajo: inmunofluorescencia neuronas hipocampales de cultivos disociados de ratones P0 Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$. Notar que los niveles en membrana de TrkB son similares en ambos casos. Barra de escala: 10 µm. A la derecha se encuentra un gráfico que muestra la cuantificación de dichos niveles. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar (n=21 para ambas condiciones experimentales). FCTC = fluorescencia celular total corregida.

B) Inmunoblot (IB) que muestra los niveles de activación de TrkB (P-TrkB) en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de ratón heterocigota (Lrig1$^{+/-}$) y de ratón deficiente para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de la misma camada, tratados con o sin BDNF (30 ng/ml) por 30 minutos. En el panel inferior se muestra inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-βIII tubulina como control de carga. Los números debajo del blot indican el nivel de cambio de P-TrkB relativo a βIII tubulina. La flecha indica la banda de TrkB activado.

C) Gráfico que muestra la activación relativa de TrkB (P-TrkB) con respecto al grupo control no estimulado en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de ratones wt/heterocigota (Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{+/-}$) y de ratones deficientes para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de la misma camada, tratados con o sin BDNF (30 ng/ml) por 30 minutos. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 4 experimentos independientes. *$p<0,05$ (test de Student).

D) Inmunoblot (IB) que muestra los niveles de activación de MAPK (P-MAPK) en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de ratón wt (Lrig1$^{+/+}$) y de ratón deficiente para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de la misma camada, tratados con o sin BDNF (30 ng/ml) durante los tiempos indicados. En el panel inferior se muestra inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-βIII tubulina como control de carga. Los números debajo del blot indican el nivel de cambio de P-TrkB relativo a βIII tubulina.

E) Gráfico que muestra la activación relativa de MAPK (P-MAPK) con respecto al grupo control no estimulado en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de ratones wt/heterocigota (Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{+/-}$) y de ratones deficientes para Lrig1 (Lrig1$^{-/-}$) de la misma camada,

tratados con o sin BDNF (30 ng/ml) por 30 minutos. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 4 experimentos independientes. *p<0,05 (test de Student).

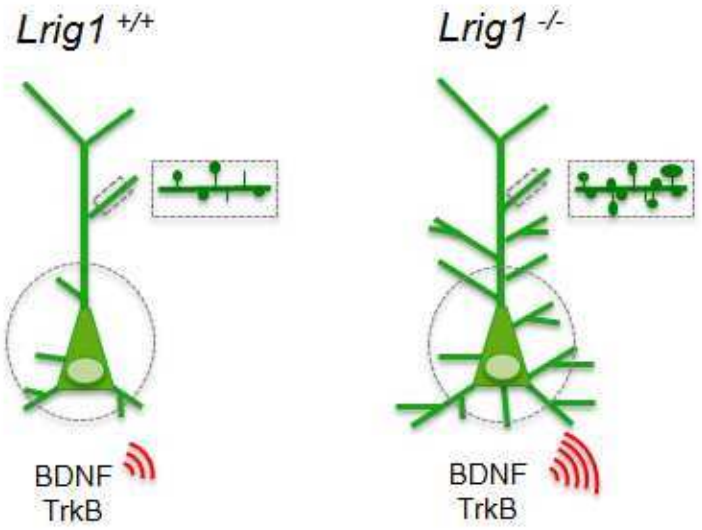
F) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de ratón transfectadas a DIV 4 con un vector vacío junto con GFP o un plásmido que expresa un shRNA dirigido contra el ARNm de *Lrig1* y la proteína verde fluorescente GFP (Lrig1-shRNA-GFP). Al día siguiente de la transfección (DIV 5), las neuronas fueron cultivadas en ausencia o presencia de BDNF (25 ng/ml) durante 48 hs. (DIV 7 final). Las flechas indican los puntos de bifurcación a lo largo de la dendrita principal. Barra de escala: 10 µm.

G-J) Cuantificación del número de dendritas primarias (G), dendritas secundarias (H), putos de bifurcación totales (I) y puntos de bifurcación de la dendrita principal (J) de neuronas hipocampales tratadas como se indica en el panel E. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en 2 réplicas. Se contaron un total de 30 neuronas por condición experimental. *p<0,01; **p<0,001 (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls).

Discusión

La forma en que las neuronas desarrollan sus variadas morfologías dendríticas típicas de cada tipo neuronal, es un proceso extremadamente complejo y altamente regulado. El desarrollo del árbol dendrítico estaría determinado por la relación de factores extracelulares, moduladores intrínsecos y la actividad eléctrica. [139,140] En comparación con numerosas moléculas identificadas que promueven el crecimiento y arborización dendríticos generalizados, se conoce poco acerca de los moduladores intrínsecos que esculpen los distintos patrones de morfologías dendríticas. En este estudio, nosotros hemos identificado a Lrig1 como un nuevo inhibidor intrínseco del desarrollo de la arborización dendrítica hipocampal, regulando negativamente la señalización inducida por

el sistema BDNF-TrkB (**Figura 23**). Las evidencias que apoyan esta observación son numerosas. En primer lugar, Lrig1 es capaz de interactuar con TrkB y la señalización de este receptor (MAPK) es potenciada en neuronas hipocampales primarias de ratones deficientes para Lrig1, tratadas con BDNF. En segundo lugar, la pérdida de expresión de Lrig1 en neuronas transfectadas con un shRNA dirigido contra su ARNm, potencia la formación de dendritas primarias y secundarias y los puntos de bifurcación, inducido por BDNF. En tercer lugar, la sobreexpresión de Lrig1 en neuronas hipocampales bloquea la formación de dendritas primarias y secundarias así como la formación de espinas dendríticas, inducidas por BDNF.



<u>Figura 23:</u> Modelo que resume la función de Lrig1 como un regulador fisiológico del desarrollo dendrítico hipocampal.

Nuestros resultados indican el rol *in vivo* de Lrig1 en el control de la dendritogénesis apical de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, y la función biológica *in vitro* como un inhibidor endógeno de la arborización dendrítica proximal y la formación de espinas dendrítica inducidas por BDNF.

Cada vez más evidencias indican que la marca distintiva de un subgrupo de desórdenes cognitivos y del desarrollo radica en la alteración del crecimiento y

arborización axonal y dendrítica. [141] La morfología axonal y dendrítica es regulada tanto por factores promotores como inhibidores de dichos procesos. BDNF y NT4 son dos factores externos que promueven el desarrollo y la plasticidad del árbol dendrítico y de las espinas, razón por la cual se ha invertido mucho trabajo y esfuerzo para desentrañar los mecanismos que controlan las vías de señalización activadas por su receptor TrkB. [1, 125, 142, 143] Reportes previos han mostrado que el crecimiento y ramificación de la región proximal de la arborización dendrítica promovida por BDNF requiere de la inducción transcripcional de la guanina desaminasa Cipina (*Cypin*) dependiente de MAPK-CREB, y de la activación de la Rho GTPasa Cdc42 dependiente de Cdk5. [131, 132] A su vez, la endocitosis y la señalización endosomal es un mecanismo celular crucial que une la señalización de Trk inducida por las neurotrofinas con la arborización dendrítica. [144] En este sentido, dos estudios recientes han identificado dos proteínas endosomales, Rab11 y NHE6, involucradas en el control de la señalización de TrkB necesaria para el desarrollo de circuitos neuronales. [133, 145]

A pesar de que se ha descripto extensivamente el efecto de muchos factores extrínsecos e intrínsecos en la arborización dendrítica, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares que dirigen la morfogénesis de las dendritas y la complejidad de sus dominios específicos dentro de una misma neurona. [123] Nuestros ensayos *in vivo* demuestran que la pérdida de expresión de Lrig1 aumenta preferencialmente la complejidad dendrítica proximal del dominio apical de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. Por lo tanto, estos resultados contribuyen a comprender el mecanismo molecular involucrado en la morfogénesis apical en contraposición a la basal, durante el desarrollo de estas neuronas. A pesar de que la función *in vivo* de las proteínas de la familia Lrig aún no está completamente dilucidada, evidencias fisiológicas indicarían que estos genes poseen funciones redundantes e independientes durante el desarrollo como

se ha mencionado previamente. [117] De esta forma, la contribución funcional de Lrig2 y Lrig3 durante el desarrollo dendrítico hipocampal aún queda por ser explorada.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que trabajos previos han mostrado que Lrig1 es un inhibidor endógeno de Met, el receptor de HGF y, a su vez, la señalización inducida por este sistema de receptor-ligando es capaz de promover el crecimiento dendrítico y los puntos de bifurcación de neuronas piramidales. [146, 147] Por lo tanto, estas evidencias abren la posibilidad de que la potenciada complejidad dendrítica observada en las neuronas deficientes para Lrig1 se deba también en parte a un aumento en la señalización inducida por Met.

Otra implicancia que sugieren nuestros resultados es que Lrig1 podría influenciar indirectamente el número de sinapsis, empobreciendo la arborización dendrítica y/o reduciendo tanto la expresión como el tráfico de proteínas sinápticas asociadas a vesículas de transporte y receptores de neurotransmisores, inducido por neurotrofinas. Se necesitarán más experimentos para elucidar posibles alteraciones sinápticas adicionales en las neuronas deficientes para Lrig1. Se piensa que las neurotrofinas podrían jugar un rol importante en el desarrollo de desórdenes cognitivos, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades del neurodesarrollo. [16, 17, 123] En este sentido, nosotros hemos demostrado que los ratones deficientes para *Lrig1* poseen serveros defectos de interacción social, lo cual es una marca distintiva de patologías tales como retraso mental o los desórdenes del espectro autista. Por lo tanto, nuestros descubrimientos podrían contribuir al entendimiento de cómo la arborización dendrítica está afectada en este tipo de condiciones patológicas.

Previamente, se ha postulado que TrkB regula distintos modos de crecimiento dendrítico a través de la acción diferencial de isoformas alternativas de este receptor. [148] De esta forma, su ARNm es capaz de sufrir splicing alternativo, dando lugar a la versión completa y a la versión truncada T1, que carece del dominio tirosina kinasa intracelular.

Notablemente, TrkB T1 se expresa en hipocampo y es capaz de disminuir el crecimiento dendrítico a través de la inhibición de la señalización inducida por la versión completa TrkB. [149] Sin embargo, es preciso puntualizar algunas diferencias con respecto a nuestros resultados. En primer lugar, mientras que TrkB T1 ejerce su efecto en el dominio distal del árbol dendrítico [149], lrig1 restringe el crecimiento dendrítico inducido por BDNF en la región proximal. Por otro lado, TrkB T1 posee un perfil de expresión que alcanza sus valores máximos recién al final del período de dendritogénesis (es decir, después de P15) [148]. Contrariamente, Lrig1 se expresa fuertemente durante las primeras dos semanas postnatales, que coincide con niveles altos de expresión de la versión completa de TrkB. Por último, los ratones deficientes para *TrkB T1* no poseen transmisión sináptica basal o LTP de CA1 alterados, ni anormalidades comportamentales en tareas dependiente de memoria [150]. En contraposición, la evidencia aquí presentada indica que los ratones deficientes para *Lrig1* poseen defectos comportamentales de interacción social.

Ya hemos mencionado el importante y reciente rol que se le atribuye a proteínas transmembrana con dominios LRR enriquecidas en sistema nervioso. Actuando como moléculas de adhesión, algunas de estas moléculas como los miembros de la familia Amigo o las proteínas Slitrk, SALMs, NGLs, TrkC y LRRTMs, influencian el crecimiento, guiado y fasciculación axonal, la selección de la estructura blanco y la formación de sinapsis. [95, 151-154] Notablemente, estas moléculas actúan como organizadores sinápticos que controlan el balance excitatorio-inhibitorio en el cerebro. [95] En el caso de TrkC su actividad sinaptogénica, única entre los receptores Trk, requiere los dominios LRR pero es independiente de su domino de unión a la neurotrofina NT3. [155] De la misma forma, los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*) de *Drosophila* utilizan sus dominios LRR funcionando como señales repulsivas que inhiben localmente la innervación de axones de motoneuronas al tejido blanco, o como receptores de neurotrofinas. [156] Recientemente, se ha sugerido en *C. elegans* el rol específico de una proteína con dominios LRR, DMA-1, en

la morfogénesis dendrítica promoviendo el crecimiento y ramificación del árbol dendrítico. [157] Esta proteína, actuando como una molécula de adhesión celular, es capaz de mediar la interacción local entre células necesaria para el desarrollo de patrones dendríticos complejos. [158]

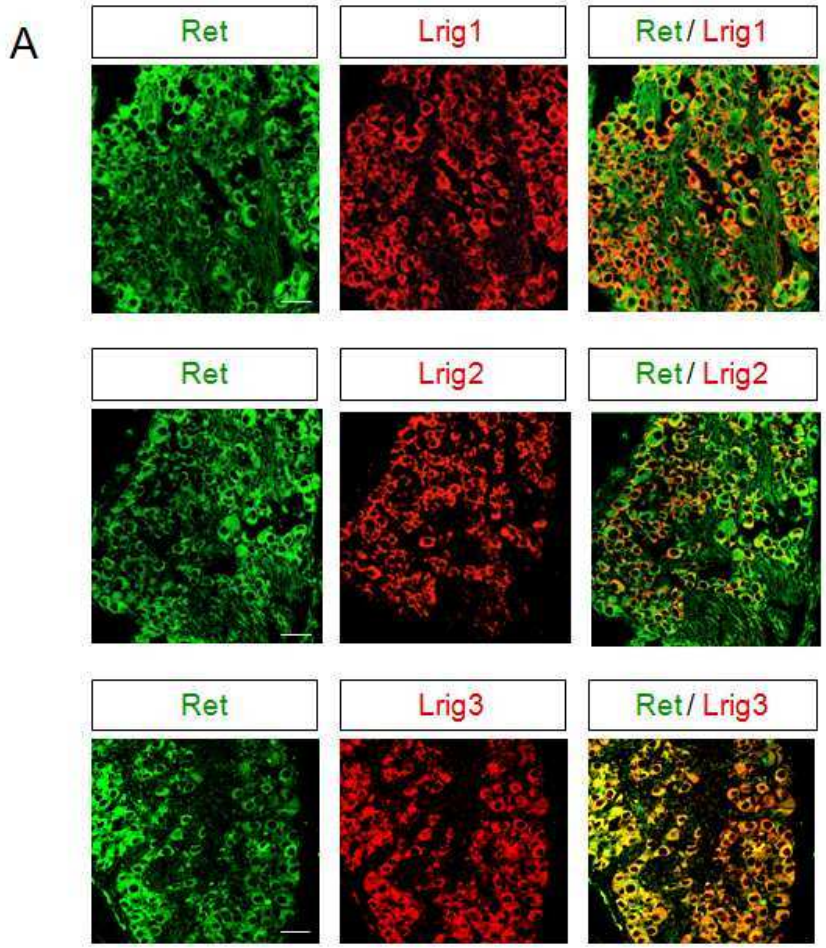
Por otro lado, otras moléculas con dominios LRR como Lrig1, Lingo1, Linx y algunos miembros de la familia Slitrk han sido caracterizados como moduladores célula específicos de la señalización inducida para factores tróficos. En particular, estas proteínas interactúan físicamente con los RTK y atenúan o potencian la señalización activada por los receptores de factores neurotróficos en una manera controlada en espacio y tiempo. [14] Por lo tanto, se ha propuesto que este tipo de moléculas regulatorias que contienen dominios LRR podrían haber evolucionado no sólo evitando errores de señalización que podrían llevar a procesos fisiológicos aberrantes, sino también aumentando el repertorio de efectos biológicos inducidos por dichas vías. Esto permite comprender cómo un número limitado de factores neurotróficos y receptores pueden controlar la complejidad de conexiones y plasticidad neuronales. En este trabajo nosotros identificamos a Lrig1 como una de estas moléculas regulatorias con dominios LRR involucrada en el desarrollo morfológico del árbol dendrítico apical de las neuronas hipocampales. Este nuevo mecanismo de Lrig1 en el desarrollo hipocampal expande considerablemente las funciones de esta molécula y representa una nueva forma de regular los efectos inducidos por neurotrofinas en diferentes áreas del sistema nervioso.

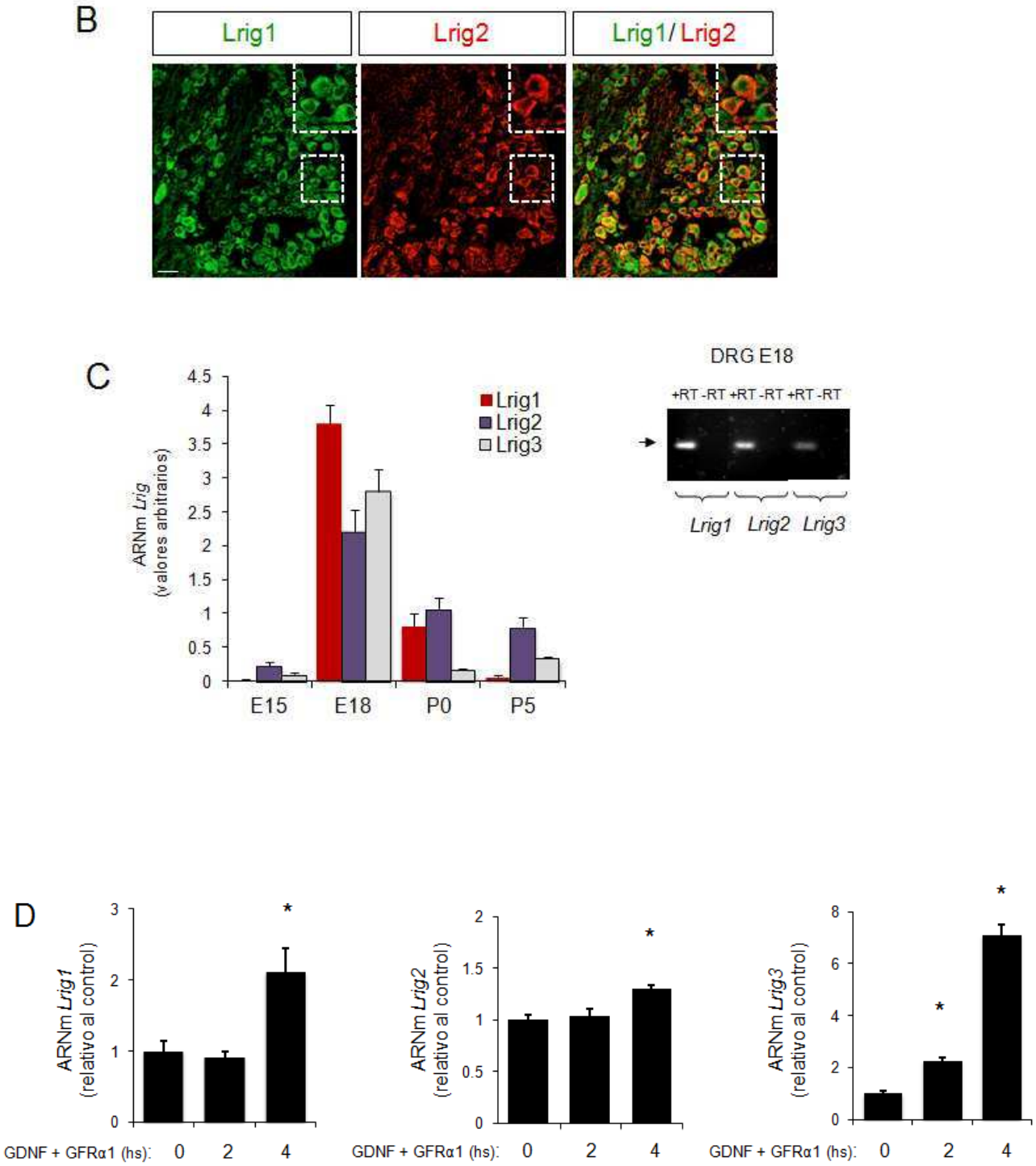
b) Lrig1, Lrig2 y Lrig3 como reguladores del sistema GDNF-Ret

Resultados previos del laboratorio han demostrado que la proteína transmembrana Lrig1 es capaz de interactuar físicamente con Ret restringir las señales neurotróficas de GDNF [109]. En mamíferos se han identificado 3 genes parálogos pertenecientes a la familia Lrig: Lrig1, Lrig2 y Lrig3. A diferencia de Lrig1, no existen evidencias claras de la función y el mecanismo de acción de los otros miembros de la familia. Basados en el rol de Lrig1 como inhibidor endógeno de Ret, nosotros decidimos evaluar si los otros miembros de esta familia, Lrig2 y Lrig3, también podían modular la activida de dicho receptor y sus efectos biológicos en células neuronales.

Como ya se ha mencionado, las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) requieren de factores neurotróficos para su sobrevida y diferenciación. A partir de los últimos días del desarrollo embrionario en roedores gran proporción de sus neuronas comienzan a depender del soporte trófico de GDNF y expresan el receptor Ret. Por lo tanto, realizamos inmunofluorescencias para Lrig1, Lrig2 y Lrig3 de forma tal de observar su localización en cortes de tejido de DRG de ratón postnatal 0 (P0). Esta tinción reveló que los tres miembros de la familia Lrig se coexpresan con Ret en las neuronas sensoriales de los DRG (**Figura 24A**). Debido a la amplia expresión de Lrig1 y Lrig2 en estos ganglios, y a su fuerte colocalización con Ret en neuronas sensoriales, nosotros decidimos evaluar el grado de colocalización entre ambas moléculas por inmunofluorescencia. Notablemente, esta tinción reveló que Lrig1 y Lrig2 parecerían estar presentes en la misma subpoblación neuronal (**Figura 24B**). En estos momentos estamos realizando las tinciones entre Lrig1 y Lrig3, para corroborar que ambas proteínas también colocalizan en subpoblaciones neuronales similares. A continuación, analizamos por RT-PCR en tiempo real la expresión del ARNm de *Lrig1, Lrig2 y Lrig3* en tejido obtenido de ganglios de la raíz dorsal de rata a distintos estadios del desarrollo. En estos ensayos,

detectamos un aumento significativo de la expresión de estas moléculas principalmente en E18 y P0. (**Figura 24C**). Basados en el concepto de que Lrig1 es un inhibidor endógeno de Ret que funciona a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, nos propusimos evaluar si la estimulación con GDNF y GFRα1 era capaz de inducir la expresión de Lrig1, Lrig2 y Lrig3 en cultivos de ganglios de la raíz dorsal de rata de día embrionario 20 (E20). La estimulación conjunta de GDNF y GFRα1 permite estimular en *trans* a todas las población neuronales Ret positivias, independientemente del coreceptor GFR que expresen. A través de ensayos de RT-PCR en tiempo real, observamos un aumento significativo de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los tres miembros de la familia Lrig (**Figura 24D**).




B
Lrig1
Lrig2
Lrig1/ Lrig2
C
ARNm Lrig
(valores arbitrarios)
Lrig1
Lrig2
Lrig3
E15
E18
P0
P5
DRG E18
+RT -RT +RT -RT +RT -RT
Lrig1 Lrig2 Lrig3
D
ARNm Lrig1
(relativo al control)
ARNm Lrig2
(relativo al control)
ARNm Lrig3
(relativo al control)
GDNF + GFRα1 (hs): 0 2 4

<u>Figura 24:</u> Lrig1, Lrig2 y Lrig3 se expresan en neuronas Ret positivas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG).

A) Inmunofluorescencia captada con microscopía confocal que muestra la localización de Lrig1 (en rojo, *línea superior*), Lrig2 (en rojo, *línea media*), Lrig3 (en rojo, *línea inferior*) y Ret (en verde) en secciones de DRG de ratón de día postnatal 0 (P0). Barra de escala: 50 µm.

B) Inmunofluorescencia captada por microscopía confocal que muestra la localización de Lrig1 (en verde) y Lrig2 (en rojo) en secciones de DRG de ratón de día postnatal 0 (P0). El recuadro muestra una región aumentada de la imagen original en donde se puede observar células en las que colocalizan Lrig1 y Lrig2. Barra de escala: 50 µm.

C) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Lrig1*, *Lrig2* y *Lrig3* durante el desarrollo de los ganglios de la raíz dorsal de rata a través de PCR en tiempo real. Los niveles del ARNm de *Lrig1*, *Lrig2* y *Lrig3* fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). Se muestra el promedio ± desvío estándar de determinaciones por triplicado. El inserto de la derecha muestra una RT-PCR con la expresión de *Lrig1, Lrig2 y Lri3* en ganglios de la raíz dorsal de rata de día embrionario 18 (E18) y muestra control sin la transcriptasa reversa (-RT).

D) Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Lrig1*, *Lrig2* y *Lrig3* por PCR en tiempo real de neuronas de DRG E20 tratadas con GDNF (50 ng/ml) + GFRα1 (150 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de los ARNm de los Lrig fueron normalizados utilizando la expresión de *Tbp*. Se indican promedios ± desvío estándar de determinaciones por triplicado. *$p<0.01$ contra el grupo control, 0 hs GDNF (ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett).

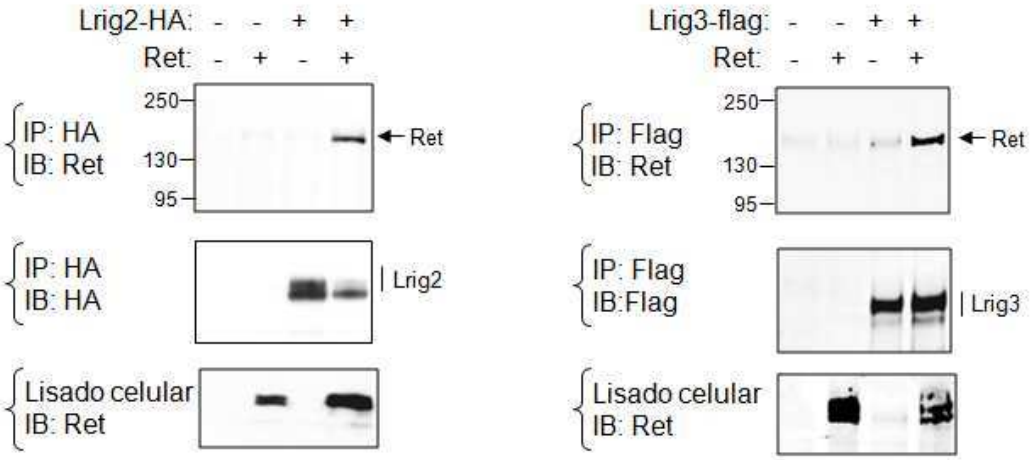
En base a estos resultados y considerando que Lrig1 interactúa con Ret, decidimos evaluar la posibilidad de que los otros dos miembros de la familia también puedan interactuar físicamente con dicho receptor. Para ello, transfectamos células COS-7 con un plásmido que codifica para Lrig2 (etiquetado con HA) o Lrig3 (etiquetado con flag) en ausencia o presencia de un plásmido que codifica para Ret, y luego realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA o anti-flag, respectivamente. En efecto, Ret

fue coinmunoprecipitado específicamente en ambos casos sólo en las células que coexpresaban ambos plásmidos y no en las que expresaban los plásmidos por separado; lo cual indica que tanto Lrig2 como Lrig3 son capaces de interactuar con Ret (**Figura 25A**).

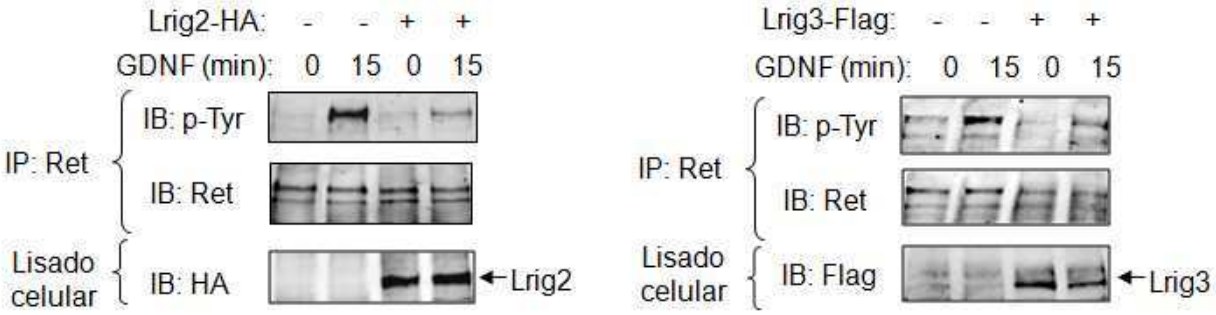
Para investigar si Lrig2 y Lrig3 podían regular la activación de Ret, se transfectaron células MN1 - línea celular murina derivada de motoneuronas que expresa niveles endógenos de dicho receptor - con un vector control o con el plásmido de expresión de Lrig2-HA o Lrig3-flag. Previamente a su estimulación, las células fueron hambreadas en medio libre de suero. En estos ensayos las células fueron tratadas por 15 min con GDNF, lisadas y los extractos celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico anti-Ret seguido de un western blot con anticuerpo anti-fosfotirosina (P-tyr). Las células que expresaban Lrig2 y Lrig3 mostraron una reducción significativa en la fosforilación de Ret inducida por GDNF (**Figura 25B y 25C**). Más aún, ambas proteínas fueron capaces de inhibir la activación de MAPK en respuesta a dicho ligando (**Figura 25D y 25E**). Estos resultados indican que Lrig2 y Lrig3 no sólo son capaces de interactuar con dicho receptor sino también inhibir su activación dependiente de ligando y su señalización río abajo.

Luego investigamos si estas moléculas transmembrana eran capaces de regular los efectos biológicos en respuesta a GDNF. Para ello utilizamos células MN1 transfectadas transientemente con Lrig2-HA o Lrig3-flag junto con GFP. Cumplidas las 48 hs luego de la transfección, las células se hambrearon (con medio sin suero), se estimularon con o sin GDNF durante 72 hs y se analizó la diferenciación morfológica midiendo la proporción de células diferenciadas. El análisis de este ensayo reveló que la sobreexpresión de Lrig2 o Lrig3 disminuyó la proporción de células diferenciadas, indicando que estas proteínas son capaces de restringir la diferenciación morfológica inducida por GDNF (**Figura 25F y 25G**).

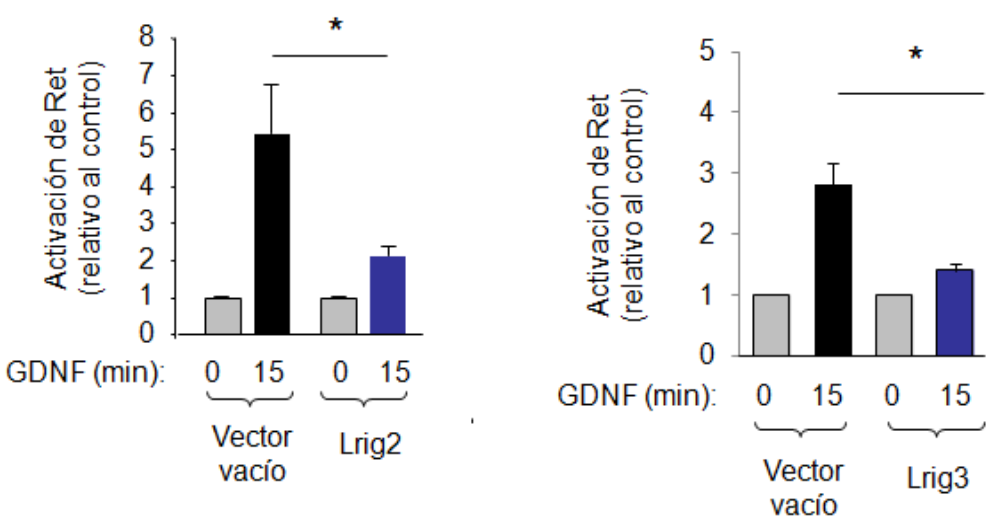
A


Lrig2-HA: - - + +
Ret: - + - +
IP: HA
IB: Ret
250
130
95
Ret
IP: HA
IB: HA
Lrig2
Lisado celular
IB: Ret
Lrig3-flag: - - + +
Ret: - + - +
IP: Flag
IB: Ret
250
130
95
Ret
IP: Flag
IB:Flag
Lrig3
Lisado celular
IB: Ret

B


Lrig2-HA: - - + +
GDNF (min): 0 15 0 15
IP: Ret
IB: p-Tyr
IB: Ret
Lisado celular
IB: HA
Lrig2
Lrig3-Flag: - - + +
GDNF (min): 0 15 0 15
IP: Ret
IB: p-Tyr
IB: Ret
Lisado celular
IB: Flag
Lrig3

C


Activación de Ret (relativo al control)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
GDNF (min): 0 15 0 15
Vector vacío
Lrig2
Activación de Ret (relativo al control)
0
1
2
3
4
5
*
GDNF (min): 0 15 0 15
Vector vacío
Lrig3

D

Erk2-HA: + + + + + +
Lrig3-flag: - - - - + +
Lrig2-HA: - - + + - -
GDNF (min): 0 15 0 15 0 15

IP: HA
IB: p-Erk
Fold: 1.0 3.0 1.0 0.9 1.0 1.4
IB: HA

Lisado celular
IB: HA ← Lrig2
IB: Flag ← Lrig3

E

Activación de Erk (relativo al control)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
GDNF (min): 0 15 0 15 0 15
Vector vacío
Lrig2
Lrig3

F

Control
GDNF+GFRα1
Vector vacío
Lrig2

Control
GDNF+GFRα1
Vector vacío
Lrig3

G

Células diferenciadas (relativo al control)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0
*
*
Ctrl
GDNF+ GFRα1
Ctrl
GDNF+ GFRα1
Vector vacío
Lrig2

Células diferenciadas (relativo al control)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
*
*
Ctrl
GDNF+ GFRα1
Ctrl
GDNF+ GFRα1
Vector vacío
Lrig3

<u>Figura 25:</u> Lrig2 y Lrig3 interactúan con Ret, y son capaces de restringir su activación, la señalización río abajo y los efectos biológicos inducidos por GDNF.

A) Coinmunoprecipitación entre Lrig2-HA (*panel izquierdo*) o Lrig3-flag (*panel derecho*) y Ret en células COS-7. Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpo anti-HA o anti-flag seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti Ret. El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-HA o anti-flag como se muestra debajo. El panel inferior muestra la expresión de Ret en el lisado total, a través de inmunoblot con anticuerpo anti-Ret. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

B) La activación de Ret dependiente de ligando fue evaluada transfectando transientemente células MN1 con un plásmido de Lrig2-HA (*panel izquierdo*) o Lrig3-flag (*panel derecho*). Luego de 36 hs las células fueron hambreadas (con medio sin suero) y estimuladas con o sin GDNF (50 ng/ml) durante 15 minutos. Los lisados totales fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpos anti-Ret seguido de IB con anticuerpos anti-fosfotirosina (P-Tyr). El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-Ret para ver los niveles totales del receptor. El panel inferior muestra el control de expresión de los plásmidos transfectados a través de IB con anticuerpos anti-HA o anti-flag. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes adicionales.

C) Gráfico que muestra la cuantificación de la activación relativa de Ret (cociente de la densidad óptica entre las bandas P-Tyr y Ret) de células MN1 tratadas como se indica en el panel B. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. *$p<0,05$ (test de Student).

D) La activación de Erk/MAPK (P-Erk/P-MAPK) dependiente de ligando fue evaluada transfectando transientemente células MN1 con un plásmido de Erk2-HA junto con Lrig2-HA o Lrig3-flag. Luego de 36 hs las células fueron hambreadas (con medio sin suero) y estimuladas con o sin GDNF (50 ng/ml) durante 15 minutos. Los lisados totales fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpos anti-HA seguido de IB con anticuerpos anti-P-MAPK. El mismo blot fue reprobado con anticuerpo anti-HA para ver los niveles totales de Erk2. El panel inferior muestra el control de expresión de los plásmidos transfectados a través de IB con anticuerpos anti-HA o anti-flag. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes adicionales.

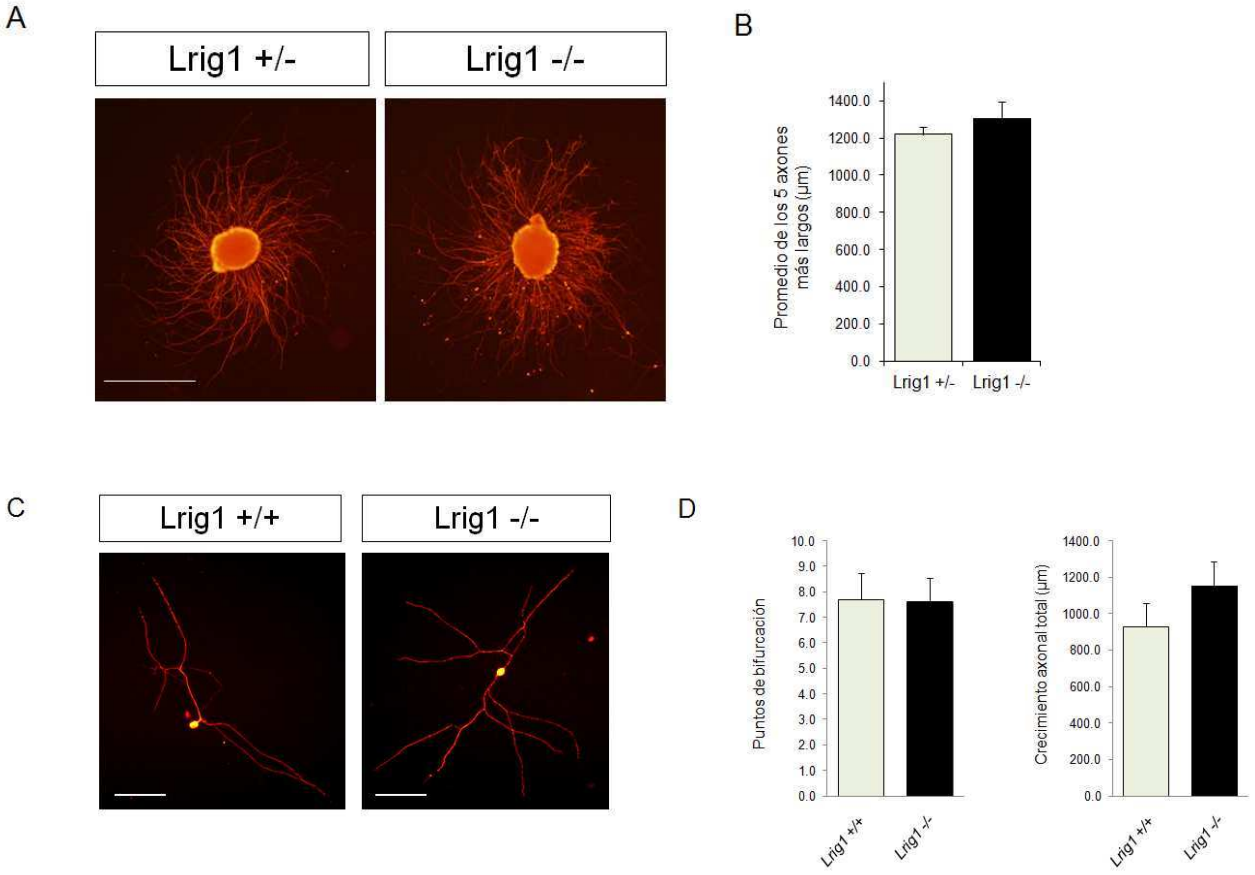
E) Gráfico que muestra la cuantificación de la activación relativa de Erk2 (cociente de la densidad óptica entre las bandas P-Erk2 y Erk2) de células MN1 tratadas como se indica en el panel D. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0,05 (test de Student).

F) Fotomicrografías de un experimento representativo de células MN1 transfectadas transientemente con plásmido control (pCDNA3), con plásmido Lrig2-HA o Lrig3-flag, junto con un vector de expresión para la proteína verde fluorescente (GFP) y tratadas con GDNF (50 ng/ml) durante 72 hs. Las flechas indican el extremo de la prolongaciones celulares. Barra de escala: 25 µm.

G) Gráfico que muestra la cuantificación del número relativo de células MN1 GFP positivas que poseen neuritas con una longitud mayor o igual a 2 veces el diámetro del cuerpo celular luego del tratamiento que se describe en el panel G. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de un experimento representativo realizado en triplicado. *p<0,01 (ANOVA de una vía seguido del test Newman Keuls).

Por último, para comenzar a estudiar en un sistema más fisiológico el rol de la familia de proteínas Lrig en la regulación de los efectos biológicos inducidos por Ret, cultivamos explantos de ganglios de la raíz dorsal lumbares de ratones Lrig$^{+/-}$ y Lrig1$^{-/-}$ recién nacidos (P0) en presencia de GDNF y, luego de dos días, analizamos la longitud de las 5 neuritas más largas, medidas desde el borde del explanto. Notablemente, no encontramos diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (**Figura 26A y 26B**). Con el mismo objetivo, realizamos cultivos disociados de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de ratones Lrig$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ P0 en presencia de GDNF y NTRN, de forma tal de estimular a la mayor cantidad de neuronas Ret positivas. Luego de 24 hs analizamos los puntos de bifurcación y el largo axonal total. Nuevamente, no se detectaron diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (**Figura 26C**

y 26D). Estas evidencias, junto al hecho de que los 3 miembros de la familia Lrig parecerían expresarse en las mismas subpoblaciones neuronales, indicaría que podría existir redundancia genética en su rol inhibitorio de Ret. Experimentos adicionales que involucren el análisis de ratones transgénicos deficientes para las proteínas Lrig2 y Lrig3, y más aún, dobles o triples KO para dichas moléculas, permitirán dilucidar el rol de estas proteínas en el desarrollo y conectividad neuronal de los ganglios de la raíz dorsal y en las señales inducidas por GDNF en estas neuronas sensoriales periféricas. Asimismo, esto permitirá analizar el grado de redundancia genética o independencia en las funciones biológicas de los miembros de la famlia Lrig en el sistema nervioso.



<u>Figura 26:</u> La pérdida de expresión de Lrig1 no induce mayor crecimiento axonal en neuronas y explantos de ganglios de la raíz dorsal.

A) Inmunofluorescencia de βIII-tubulina (en rojo) de explantos de un ganglio de la raíz dorsal (DRG) lumbar representativo de un ratón heterocigota (*Lrig1*$^{+/-}$) y de un ratón KO para Lrig1 (*Lrig1*$^{-/-}$), cultivados con GDNF (50 ng/ml) y GFRα1 soluble (150 ng/ml) durante 40 hs. Barra de escala: 500 µm.

B) Gráfico que muestra el promedio de las 5 neuritas más largas por explanto de DRG. Se contaron 7 explantos para la condición heterocigota y 6 para la condición KO (en ambos casos provenientes de dos animales distintos).

C) Inmunofluorescencia de βIII-tubulina (en rojo) que muestra una neurona representativa de cultivos de ganglios de la raíz dorsal de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ P0, cultivados con GDNF (25 ng/ml) y NTRN (25 ng/ml) durante 24 hs. Barra de escala: 100 µm.

D) Gráfico que muestra el número de bifurcaciones y el crecimiento axonal total de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ P0, cultivados bajos las condiciones descriptas en el panel C. Se contaron un total de 30 neuronas para cada condición experimental.

<u>c) Lrig1 como inhibidor de formas oncogénicas de Ret</u>

Las neoplasias endócrinas múltiples de tipo 2 (MEN2) son un grupo de enfermedades humanas caracterizadas por un desarrollo aberrante de la cresta neural, estructura involucrada en la formación del sistema nervioso entérico, el sistema nervioso simpático y los ganglios de la raíz dorsal, entre otros. Según las características clínicas que se presentan, estas neoplasias se clasifican en tres desórdenes de cresta neural heredados de forma autosómica dominante: MEN tipo 2A (MEN 2A), MEN tipo 2B (MEN 2B) y el carcinoma tiroideo medular familiar (FMTC). La evidencia indica que mutaciones alélicas germinales en el gen *Ret* dan cuenta de este tipo de desórdenes. [159]

Como hemos mencionado previamente, un trabajo previo del laboratorio ha demostrado que Lrig1 es capaz de interactuar con Ret e inhibir su activación en respuesta a su ligando GDNF. Por lo tanto, nos preguntamos si Lrig1 también podría ser capaz de inhibir, en forma ligando independiente, versiones mutadas de Ret constitutivamente activas responsables de la neoplasia endócrina múltiple tipo 2A (RM2A = Ret Men 2A) y tipo 2B (RM2A = Ret Men 2A). Para ello, en primer lugar transfectamos células COS-7 con un plásmido que codifica para las versiones mutadas de Ret, RM2A o RM2B, en ausencia o presencia del plásmido que codifica para Lrig1-flag. Luego realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-flag seguido de inmunoblot con anticuerpos anti-Ret (que también reconocen las versiones mutadas). De esta forma, tanto RM2A como RM2B fueron coinmunoprecipitados específicamente en las células que coexpresaban esta proteína junto con Lrig1, y no en las que lo expresaban en forma separada (**Figura 27A y 27B**).

A continuación evaluamos la activación de estas versiones mutadas del receptor en presencia o ausencia de Lrig1. De esta forma, transfectamos células COS-7 con RM2A o RM2B y Lrig1. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico anti-Ret seguido de inmunoblot con anticuerpo anti-fosfotirosina. Las células que expresaban Lrig1 mostraron una reducción significativa en la fosforilación de RM2A (**Figura 27C y 27D**) y RM2B (**Figura 27E y 27F**).

Estos resultados indican que Lrig1 es capaz de interactuar con versiones mutadas de Ret, RM2A y RM2B, y restringir su estado de activación en una manera ligando independiente. Ensayos biológicos y en contextos más fisiológicos permitirán clarificar si estos fenómenos observados *in vitro* pueden ocurrir *in vivo*, y si podrán ser usados potencialmente en la clínica como una herramienta terapéutica para las neoplasias endócrinas múltiples.

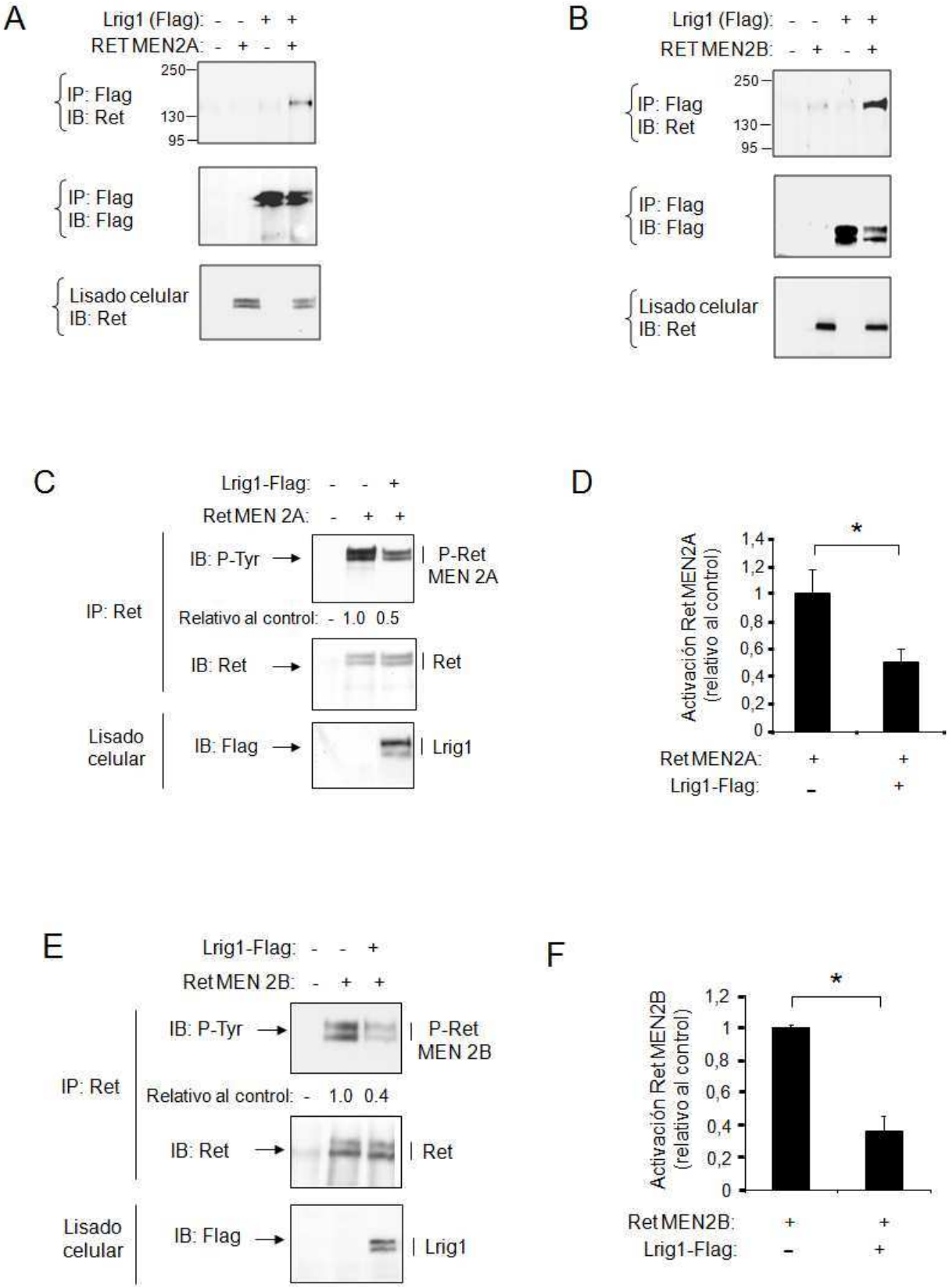

A
Lrig1 (Flag): - - + +
RET MEN2A: - + - +
250
130
95
IP: Flag
IB: Ret
IP: Flag
IB: Flag
Lisado celular
IB: Ret
B
Lrig1 (Flag): - - + +
RET MEN2B: - + - +
250
130
95
IP: Flag
IB: Ret
IP: Flag
IB: Flag
Lisado celular
IB: Ret
C
Lrig1-Flag: - - +
Ret MEN 2A: - + +
IB: P-Tyr
P-Ret
MEN 2A
IP: Ret
Relativo al control: - 1.0 0.5
IB: Ret
Ret
Lisado
celular
IB: Flag
Lrig1
D
Activación Ret MEN2A
(relativo al control)
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
Ret MEN2A: + +
Lrig1-Flag: - +
E
Lrig1-Flag: - - +
Ret MEN 2B: - + +
IB: P-Tyr
P-Ret
MEN 2B
IP: Ret
Relativo al control: - 1.0 0.4
IB: Ret
Ret
Lisado
celular
IB: Flag
Lrig1
F
Activación Ret MEN2B
(relativo al control)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
Ret MEN2B: + +
Lrig1-Flag: - +

Figura 27: Lrig1 interactúa con RM2A y RM2B y atenúa su activación constitutiva.

A y B) Coinmunoprecipitación entre RM2A (A) o RM2B (B) y Lrig1-flag transfectado transientemente en células COS-7. Los extractos celulares fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-flag seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-Ret. Debajo se muestra el mismo blot reprobado con anticuerpo anti-flag. El panel inferior muestra la expresión de Ret en extractos de lisado total. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

C y E) Western blot representativo que muestra la activación de RM2A (C) o RM2B (E) en ausencia o presencia de Lrig1 en células COS-7 transfectadas transientemente con dichas moléculas. Los extractos celulares fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-Ret seguido de IB con anticuerpo anti-fosfotirosina (P-Tyr). Los números debajo del blot indican el grado de cambio de RM2A (C) o RM2B (E) fosforilado (P-Tyr) con respecto a su nivel total (Ret). El panel inferior muestra los niveles de Lrig1-flag en extractos de lisado total. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

D y F) Gráfico que muestra la activación relativa de RM2A (D) o RM2B (F) en presencia o ausencia de Lrig1 según el tratamiento explicado en la figura C/E respectivamente. El resultado representa promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes. *$p<0,05$ (test de Student).

DISCUSIÓN GENERAL

Importancia biológica de la regulación trófica

La activación de los RTKs por sus respectivos factores tróficos se encuentra entre las señales críticas que están implicadas en la morfogénesis, induciendo vías de señalización que controlan procesos celulares tales como la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la sobrevida. [160] Por lo tanto, para evitar errores de señalización que finalmente conduzcan a un comportamiento celular aberrante y a enfermedades, los mecanismos celulares han evolucionado para garantizar que se alcancen umbrales adecuados de señalización en tiempo y espacio. La elucidación de los mecanismos que controlan la activación de los RTK es aún visto en la actualidad como uno de los principales desafíos de la biomedicina.

La señalización inducida por factores neurotróficos, a través de sus receptores RTK, desempeñan papeles críticos en el desarrollo del sistema nervioso, en la sobrevida y el mantenimiento de subpoblaciones específicas de neuronas diferenciadas. Mientras que la sobreactivación de la señalización inducida por RTKs - debido a alteraciones en los mecanismos de desactivación de estas vías - se asocia con el desarrollo de procesos tumorales y cáncer, también es posible que las alteraciones en dichos mecanismos de control puedan contribuir a la patogénesis de enfermedades del neurodesarrollo y a trastornos neurodegenerativos. [14]

Reguladores de la actividad neurotrófica como moduladores claves del desarrollo neuronal y barreras antirregenerativas

Un importante regulador de señales neurotróficas y que, por lo tanto, ha sido considerada una molécula regenerativa es la fosfatasa PTEN - un conocido inhibidor de diferentes vías de señalización inducidas por factores neurotróficos como PI3K-Akt-mTOR. Los individuos con mutaciones en el gen *PTEN* muestran trastornos cerebrales que incluyen macrocefalia, convulsiones y retraso mental. [161] Notablemente, se han reportado mutaciones de PTEN en personas con trastornos del espectro autista. [162-164] Un estudio anterior mostró que deleciones de *PTEN* en el sistema nervioso central del ratón pueden ser la base de la macrocefalia y comportamientos anormales que recuerda a ciertas características de trastornos del espectro autista humanos. [165]

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que PTEN, es parte de un nuevo mecanismo de señalización intracelular que conecta dos vías en las neuronas del sistema nervioso central: la señalización apoptótica inducida por proneurotrofinas y $p75^{NTR}$, y la señalización de sobrevida inducida por neurotrofinas y Trk. En este estudio, los autores demuestran que en las neuronas el proNGF induce PTEN a través de $p75^{NTR}$ para suprimir la señalización de sobrevida mediada por Trk-PI3K-Akt inducida por neurotrofinas maduras. [166] Este mecanismo podría explicar la asociación de las proneurotrofinas-$p75^{NTR}$ con patologías neuronales como la neurodegeneración observada en la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la interacción entre proneurotrofinas, $p75^{NTR}$ y PTEN proveería un nuevo blanco como vía de señalización para neuroprotección y tratamientos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, un trabajo posterior ha mostrado que la deleción de PTEN potencia la habilidad regenerativa de las neuronas corticoespinales adultas en respuesta a una lesión de médula espinal. [29] Sin embargo, a pesar del robusto crecimiento regenerativo de los axones corticoespinales

observado en los ratones deficientes para dicha molécula, muchos axones aún fallaron en crecer en la región lesionada.

Por otro lado, es sabido que la administración de factores neurotróficos en sitios lesionados pueden promover un cierto grado de regeneración axonal en ciertos tipos neuronales [167] y que la sobreexpresión de TrkB puede inducir el crecimiento de axones corticoespinales en un injerto que expresa BDNF luego de una lesión subcortical. [168] Por lo tanto, la combinación de la administración de BDNF junto con la inhibición de la actividad de PTEN podría ser la clave para estimular el crecimiento de un mayor número de axones lesionados y así promover una recuperación funcional. Como la vía de MAPK ha sido reportada ser crítica para el crecimiento y regeneración axonal inducidos por neurotrofinas en diferentes modelos de lesión [168], sería interesante explorar si deleciones dirigidas de inhibidores de MAPK como Sprouty o Spred, pueden también potenciar la regeneración axonal inducida por factores neurotróficos. En este sentido, se ha observado recientemente que los ratones deficientes para *Sprouty4* poseen una respuesta inflamatoria reducida así como menor astrogliocis y mayor sobrevida neuronal, luego de un daño de médula espinal; y que estos efectos serían mediados por un aumento en la señalización de FGF [30].

Las proneurotrofinas, es decir, la versión no clivada de los precursores de neurotrofinas, pueden ser secretados y sólo unirse al complejo de receptores $p75^{NTR}$ - sortilina para inducir muerte neuronal durante el desarrollo y en condiciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer (AD) y lesiones de médula espinal. [169, 170] En este sentido, muchos reportes han mostrado que un reducido soporte trófico contribuye a la patogénesis de desórdenes degenerativos como la enfermedad de Alzheimer, Hungtinton, Parkinson y la esclerosis amiotrófica lateral. [17] En particular, deleciones dirigidas al receptor de GDNF, Ret, en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo produce una

progresiva y tardía pérdida de estas células en la *substantia nigra* , degeneración de los terminales nerviosos dopaminérgicos del estriado y una reducción en los niveles de liberación evocada de dopamina. [18] Estas observaciones indican que los ratones transgénicos condicionales para Ret podrían ser considerados como un modelo interesante para estudiar patologías relacionadas a la enfermedad de Parkinson temprana. Experimentos posteriores establecieron, como se ha mencionado, que la ablación de la expresión de BDNF en neuronas piramidales corticales, causa una degeneración dendrítica asociada a la edad seguida de una pérdida de las neuronas espinosas gabaérgicas medianas, lo cual imita la degeneración estriatal en la enfermedad de Hungtinton. [19] Por otro lado, se estableció una conexión molecular que correlaciona la deprivación de NGF con síntomas de la enfermedad de Alzheimer, utilizando un modelo de ratón transgénico donde anticuerpos anti-NGF, que neutralizan esta neurotrofina, son expresados tanto a nivel periférico como dentro del sistema nervioso central. [20] Notablemente, este modelo genera patologías tipo Alzheimer incluyendo las placas de péptido β amiloide, pérdida de neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal, ovillos de proteína tau hiperfosforilada y déficits de memoria dependientes de hipocampo. [21]

El rol fisiológico de las proteínas de la familia LIG y Spry-Spred durante el desarrollo hace posible que puedan contribuir a ciertas patologías humanas. En este sentido, mutaciones en el gen relacionado a Spry, *Spred1*, han sido implicadas en patologías caracterizadas por macrocefalia y retraso mental. [171] Por lo tanto, una mayor caracterización de los mecanismos por los cuales Spry controla la fisiología neuronal podría colaborar para comprender la patogénesis de muchos síndromes neurológicos.

Por otro lado, Lrig1 ha sido postulado como un gen supresor de tumores de muchos tipos de cáncer humano. [104-107] En contraste con lo que ha sido descripto para Lrig1, la pérdida de expresión de Lrig2 por ARN de interferencia inhibe tanto la activación del

EGFR como el crecimiento de células de glioblastoma, sugiriendo a Lrig2 como un gen blanco atractivo para la terapia de glioma. [113, 114]

En el sistema nervioso central, una proteína de la superfamilia LIG, Lingo1, es un regulador negativo clave de la mielinización [28, 172] Muchos estudios han mostrado un rol perjudicial de Lingo1 durante el desarrollo del sistema nervioso. [173] En uno de estos estudios, Inoue *et al* demostraron que antagonistas de Lingo1 mejoran la sobrevida, el crecimiento y la función de neuronas dopaminérgicas utilizando modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson. Este efecto neuroprotectivo involucra la activación de la vía de señalización EGFR-Akt a través de la inhibición directa de la unión de Lingo1 con el EGFR. [174]

Slitrk es otra subfamilia de las proteínas estructuralmente relacionadas pertenecientes a la superfamilia LIG. [92] Análisis de secuencia revelaron que el dominio extracelular de los Slitrk es similar al factor repulsivo Slit y que algunas regiones del dominio intracelular presentan un alto grado de homología con los receptores Trk; de ahí el nombre de esta familia de proteínas. Existen 6 miembros Slitrk (Slitrk 1-6) y todos ellos se encuentran altamente expresados en el tejido nervioso. [92, 96] Estudios previos indican que los Slitrk funcionan modulando la señalización inducida por neurotrofinas. En particular, la expresión ectópica de cada uno de los miembros de esta familia en células PC12 tratads con NGF produce una reducción en el número de neuritas en comparación con el control, indicando que Slitrk representa un regulador negativo de la señalización inducida por TrkA. [92] Evidencia adicional que apoya un rol modulatorio de Slitrk en la señalización neurotrófica, es el hecho de que la expresión de los ARNm de *BDNF* y *NT3* como sus receptores *TrkB* y *TrkC* se encontraron disminuidos en el oido interno de los ratones transgénicos deficientes para Slitrk6. Esto indica que dicha molécula actúa como un regulador positivo de TrkB y TrkC. [93] Estos resultados sugieren que el rol de los Slitrk

en el control de la señalización en respuesta a neurotrofinas no está del todo claro, debido a que podrían regularlo tanto en forma positiva como negativa. Es posible que los efectos modulatorios de las proteínas Slitrk en la señalización inducida por Trk dependa del receptor específico del que se trate o del contexto en que se encuentra el mismo. Estudios futuros permitirán revelar cómo cada miembro de la familia Slitrk modula la acción de las neurotrofinas así como la relevancia fisiológica de este control en el desarrollo del sistema nervioso.

Utilizando ensayos de búsqueda a través de *microarrays* de genoma completo para aislar moduladores de receptores para factores neurotróficos involucrados en el control de las proyecciones axonales de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), Mandai y sus colegas identificaron a Linx (Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing axon extension protein), otro integrante de la superfamilia LIG. [9] Esta proteína se expresa específicamente en poblaciones de neuronas sensoriales de los DRG y de motoneuronas de la médula espinal. Es capaz de interactuar físicamente con los receptores Trk y Ret y potenciar la señalización inducida por neurotrofinas y GDNF, respectivamente. Los defectos en la proyección axonal en el ratón transgénico deficiente para Linx se asemejan a aquellos encontrados en los ratones deficientes para NGF, TrkA y Ret, revelando una significancia fisiológica de Linx en la modulación de estadios específicos de crecimiento, guiado e innervación al blanco de neuronas sensoriales y motoneuronas en respuesta a factores neurotróficos. El mecanismo por el cual Linx es capaz de modular la señalización de TrkA y Ret ligando dependiente en las neuronas en desarrollo, permanece aún desconocido.

Colectivamente todos estos resultados demuestran que los miembros de la superfamilia LIG pueden potenciar o atenuar la actividad de los RTK en una forma controlada temporalmente para proveer una precisión en la señalización inducida por

factores neurotróficos en procesoso tales como crecimiento neuronal y conectividad. Muchos estudios establecen que la señalización y los efectos inducidos por factores neurotróficos pueden ser modificadas en base al momento y la ubicación de la estimulación. [175, 176] Por lo tanto, es interesante determinar si los miembros de la superfamilia LIG expresados en neuronas sensoriales y motoneuronas son capaces de modular el transporte retrógrado de endosomas de señalización conteniendo complejos de unión receptor-factor neurotrófico. Al mismo tiempo, estos estudios podrían revelar si la modulación axonal distal de los receptores Trk y Ret por miembros de la superfamilia LIG, podría representar un mecanismo fisiológico que controle la sobrevida, la extensión axonal y la innervación al tejido blanco.

Una pregunta central en la neurobiología del desarrollo es cómo los axones de una población neuronal específica logran una especificidad de conexión con el blanco durante la formación de los circuitos neuronales. La cooperación entre factores neurotróficos y claves de guiado es un mecanismo que confiere especificidad durante dicho proceso. Estudios recientes también ilustran que moduladores intrínsecos célula-específicos de la señalización de receptores para factores neurotróficos es otro mecanismo fundamental que controla el crecimiento axonal, ramificación y la innervación al tejido blanco durante el desarrollo del sistema nervioso. Uno de estos estudios demostró que muchos moduladores pertenecientes a la superfamilia LIG se expresan en poblaciones neuronales sensoriales y motoras no solapadas, evidenciando la posibilidad de que las diferentes proteínas pertenecientes a esta familia codifiquen especificidad al blanco durante el ensamblaje de los circuitos neuronales. [9] Por lo tanto, dependiendo del contexto celular, cada una de estas moléculas podría favorecer la multiplicidad de eventos de señalización y respuestas activadas por los receptores Trk y Ret en diferentes poblaciones neuronales. A su vez, estudios extensivos han demostrado que los mecanismos de retroalimentación

positiva y negativa son eventos de señalización que evolucionaron proveyendo un efectivo control de los fenómenos biológicos inducidos por factores neurotróficos como la sobrevida, el crecimiento neurítico, el guiado axonal y la selección del blanco. [9, 16, 109, 177, 178] Otro concepto derivado de estos estudios es que los receptores para factores neurotróficos están extremadamente regulados a través de una acción coordinada de muchas moléculas inhibidoras que funcionan a múltiples niveles en la cascada de señalización y a diferentes tiempos luego de la unión al ligando. La comprensión actual de los mecanismos utilizados por los ya identificados reguladores de receptores para factores neurotróficos, está aún en una etapa temprana (**Figura 28**). El mayor conocimiento de los blancos moleculares y relevancia fisiológica de estos moduladores de RTK, contribuirá a la identificación de marcadores supresores de tumores y a diseñar terapias más eficientes para enfermedades humanas. Este conocimiento podría ser usado para maximizar el potencial terapéutico y para reducir efectos secundarios ante la administración de factores neurotróficos.

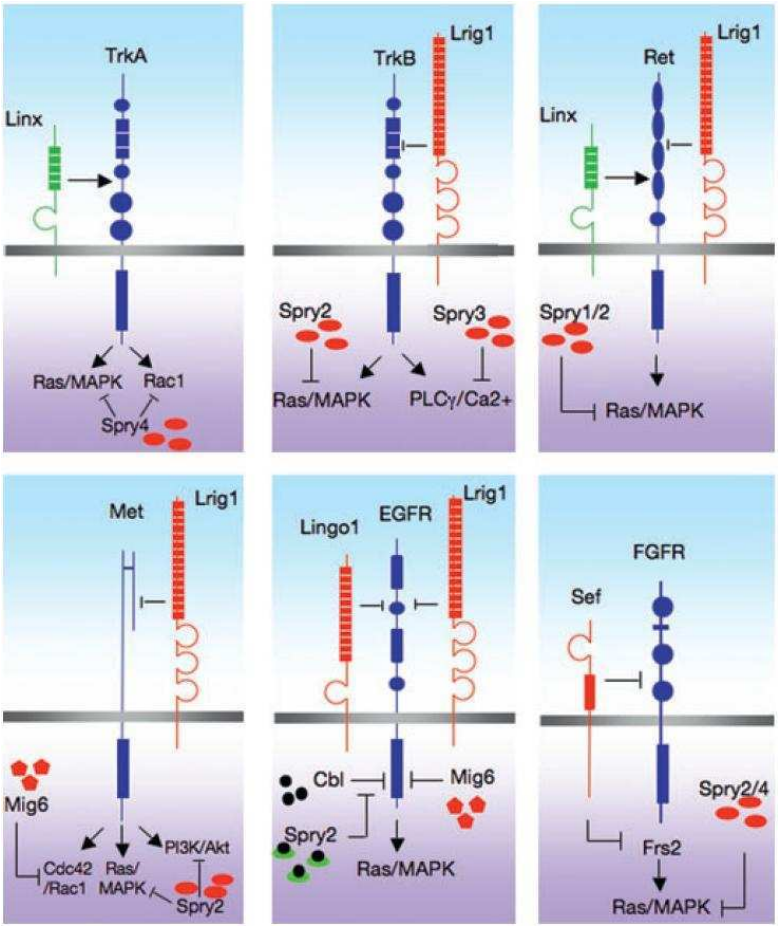


Figura 28: Mecanismos de retroalimentación negativa y positiva en la modulación de la señalización de receptores para factores tróficos. Los reguladores negativos se muestran en rojo mientras que los positivos, en verde. La figura ilustra diferentes moléculas modulatorias negativas que actúan a distintos niveles luego de la unión ligando-receptor, restringiendo dicha unión, atenuando la activación del receptor, controlando específicamente las vías de señalización río abajo y regulando la degradación del receptor.

Los factores neurotróficos han surgido como agentes terapéuticos prometedores ya que son moléculas capaces de modificar el curso de una enfermedad, razón por la cual algunas de ellas están siendo actualmente usadas en ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. [179] Permiten que las neuronas dañadas puedan crecer nuevamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndolos en los mediadores más

potentes de la sobrevida neuronal identificados hasta la fecha. Sin embargo, la entrega de factores neurotróficos sólo ha tenido efectos limitados en la promoción de la regeneración de ciertos tipos de axones del sistema nervios central.

En particular, el requerimiento fisiológico de la señalización GDNF-Ret para la sobrevida, mantenimiento y regeneración del sistema dopaminérgico exige estudios adicionales para la optimización de los ensayos clínicos con GDNF en marcha para la enfermedad de Parkinson, usando activadores o inhibidores/atenuadores de inhibidores endógenos de la señalización de Ret. Focalizarse en los moduladores endógenos de la señalización inducida por los ligandos de la familia de GDNF (GFL), como por ejemplo Spry y Lrig, podría ser de interés clínico maximizando el poder terapéutico de estos factores neurotróficos en las neuronas dopaminérgicas en proceso degenerativo. [180] Al mismo tiempo, una caracterización adicional de moléculas interactoras de estos moduladores endógenos de RTK podría contribuir a entender las causas que subyacen a ciertos tipos de tumores cerebrales y muchos síndromes neurológicos y enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo de tesis doctoral nosotros hemos identificado y caracterizado los mecanismos de acción de nuevas moléculas regulatorias de la actividad neurotrófica tanto en neuronas del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico. De esta forma, hemos ampliado el espectro de moléculas reguladoras de RTK de factores neurotróficos, permitiendo una mayor comprensión del preciso balance de la fisiología celular durante el desarrollo del sistema nervioso.

En el primer capítulo describimos un nuevo mecanismo que restringe la señalización y las respuestas biológicas inducidas por la neurotrofina NGF y su receptor TrkA en neuronas sensoriales del DRG y en células PC12. Más precisamente nosotros demostramos que Sprouty4 es un gen inducido por NGF que inhibe el crecimiento axonal mediado por TrkA actuando a través de un mecanismo dual que involucra el bloqueo de la vía de Ras-MAPK y la simultánea inhibición de la activación de Rac1 en respuesta a NGF. Notablemente, estos datos resaltan la versatilidad de las proteínas Sprouty para regular diferentes rutas de señalización intracelulares inducidas por factores tróficos.

En el segundo capítulo, nosotros identificamos a la proteína Lrig1 como un regulador fisiológico del tamaño y morfología dendrítica de neuronas piramidales del hipocampo en desarrollo. En particular, nuestros hallazgos indican que Lrig1 es un inhibidor fisiológico de la morfogénesis y ramificación dendrítica así como de la plasticidad funcional, como lo demuestran los severos defectos de interacción social manifestados en los ratones *Lrig1*$^{-/-}$. Más aún, nuestros datos revelaron un inesperado rol de Lrig1 en el control de la arborización dendrítica proximal a través de la inhibición de la actividad neurotrófica de BDNF y su receptor TrkB; y sugieren que Lrig1 funcionaría regulando los niveles de activación de TrkB, permitiendo así que las neuronas hipocampales desarrollen

y establezcan distintivos patrones de arborización dendrítica.

En el segundo capítulo, a su vez, nosotros hemos estudiado si, al igual que Lrig1, los otros dos miembros de la familia, Lrig2 y Lrig3, son capaces de inhibir la señalización de GDNF y de su receptor Ret en células neuronales. Hasta el momento, los resultados de estos ensayos permitieron concluir que los tres miembros de la familia de proteínas Lrig interactúan y funcionan como reguladores negativos del receptor Ret, restringiendo así las respuestas biológicas de GDNF. En neuronas derivadas del ganglio de la raíz dorsal, la pérdida de la expression de Lrig1 no es suficiente para potenciar las respuestas de crecimiento axonal inducidas por los ligandos de GDNF, revelando cierta redundancia functional entre Lrig1 y los otros miembros de esta familia de proteínas. La alta colocalización de cada uno de los Lrig con Ret y la fuerte coexpresión de Lrig1 con Lrig2 (y posiblemente Lrig1 con Lrig3) en una gran cantidad de neuronas sensoriales del DRG, sugieren la existencia de mecanismos de redundancia funcional. Análisis adicionales en neuronas sensoriales obtenidas a partir de ratones doble knockouts para Lrig1/Lrig2 y/o Lrig1/Lrig3, o inclusive triple KO, podrían permitirnos confirmar la relevancia biológica de estas proteínas regulatorias en la respuesta de crecimiento axonal inducida por los ligandos de la familia de GDNF. Además, estos resultados abren la posibilidad de que Lrig1, Lrig2 y Lrig3 puedan representar potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de ciertos procesos neurodegenerativos y de daño neuronal en los cuales GDNF posee prometedores efectos terapéuticos.

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que estos reguladores endógenos cumplen una función clave durante el desarrollo y armado de la conectividad neuronal, controlando procesos de crecimiento axonal, arborización dendrítica y de plasticidad estructural y funcional. A su vez, debido a que el crecimiento axonal y la organización dendrítica representan marcadores distintivos de un grupo de incapacidades intelectuales

y de alteraciones del desarrollo, la identificación de este tipo de moduladores de la arborización dendritica, de la plasticidad funcional y de la actividad neurotrófica, podrían también ayudarnos a entender las causas que originan ciertos desórdenes cognitivos y enfermedades del desarrollo neuronal.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo nos han permitido ampliar el espectro de moléculas reguladoras de RTK para factores neurotróficos, y evidenciar a la vez la necesidad y la importancia que tienen este tipo de moléculas para mantener un balance adecuado y preciso de la fisiología y homeostasis celular durante el desarrollo del sistema nervioso. Futuros ensayos permitirán determinar si los reguladores identificados en este trabajo de tesis representan nuevos blancos terapéuticos y herramientas clínicas útiles para el tratamiento de procesos neurodegenerativos, de daño neuronal y de diferentes desórdenes del sistema nervioso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración de ética (tratamiento de los animales)

Los experimentos con animales fueron aprobados por Stockholms Norra djurförsöksetiska nämnd (Dnr: 360/06) y por el comité de ética y cuidado animal institucional de la Facultad de Medicina (CICUAL-UBA), número de permiso ético: 25473/2010.

Proteínas recombinantes, líneas celulares y ratones

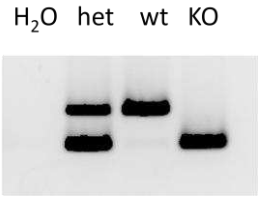
Las células COS-7 y HEK-293T se cultivaron en Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS = fetal bovine serum). [109] MN1 es una línea celular inmortalizada derivada de motoneurona de ratón (que expresa Ret, GFRα1 y Lrig1 endógenamente) y se cultivó en DMEM suplementado con 7,5% de FBS y Hepes. [109, 181] Las células PC12 es una línea celular de rata derivada de feocromocitoma (que expresa endógenamente TrkA) y se cultivó en DMEM suplementado con 10% FBS y 5% de suero de caballo. Los clones PC12-Spry4 (clon 2) y PC12-Spry4-Y53A (clon 17) se generaron transfectando establemente células PC12 con un plásmido de Spry4-Myc o Spry4-Y53A-Myc (ambos de ratón), respectivamente. Pak-CRIB se produjo y purificó usando *E.coli* BL21, como se describió previamente. [73]

El NGF fue adquirido de Promega. El BDNF y GDNF fueron adquiridos de R&D Systems (Abingdon, Reino Unido).

Los ratones deficientes para *Lrig1* serán próximamente descriptos en un futuro trabajo por Lindquist, Hedman, *et al* (datos no publicados). Brevemente, el exón 1 de *Lrig1*, se delecionó a través de recombinaciones homólogas mediadas por la recombinasa

Cre. El alelo mutante de Lrig1 se cruzó dentro de una cepa pura de ratones sv129 por más de 7 generaciones.

Los ratones trasngénicos se genotiparon con la siguiente secuencia de primers específicos: Lrig1KO-reverse: CTCCAGAATCACGCTCACT; Lrig1KO-foward: GCTAAGCGTTTTCAGTCCCAGA; Lrig1 wt-foward: CTGTGAGTATCGCCTTTGCT. De esta forma se obtiene una banda de 250 pb para la banda wt y 160 pb para la banda KO como se muestra en la siguiente figura esquemática:



RT-PCR

Se analizó la expresión del ARNm de *Spry1, Spry2, Spry4, Lrig1, Lrig2, Lrig3* y del gen constitutivo *Tbp* (TATA binding protein). El ARN total se aisló a partir de las células indicadas (PC12, hipocampos de ratas de diferentes etapas embrionarias y postnatales, o DRG) utilizando las columnas de RNA-easy (Quiagen). El ADN copia (ADNc) se sintetizó usando la transcriptasa reversa Multiscribe y hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). El ADNc fue amplificado utilizando los siguientes conjuntos de primers: *Tbp*: foward, 5´-GGG GAG CTG TGA TGT GAA GT-3´; reverse, 5´- CCA GGA AAT AAT TCT GGC TCA-3´; *Spry1* de rata: forward, 5´-AAC AGT GTG GCA AGT GCA AA-3 ; reverse, 5´-CAC AGG TAT CTG GAG CAG CA-3´; *Spry2* de rata: forward, 5´-TGG CAA GTG CAA GTG TAA GG-3´; reverse, 5´-ACC ATC GCG TAC AAC AGT GA-3´; *Spry4* de rata: forward, 5´-GCC CAT TGA CCA GAT GAA GAC-3´; reverse, 5´-TCC AGT GGC TTA CAG TGG AC-3´; *Lrig1* de rata: forward, 5´-CTG CGT GTA AGG GAA CTC AAC-3´; reverse, 5´- GAT

AGA CCA TCA AAC GCT CCA-3´. *Lrig2* de rata: forward, 5´- ACG ACA CAG CAG ACC ACA AC-3´; reverse, 5´- CAG AGT AGC ATT GGG CAT GA-3´; *Lrig3* de rata: forward, 5´- GGC TCC GAC GTG AGT TTT AC-3´; reverse, 5´- GTC TTT CTT CCA AGC GAA CG-3´;

La PCR en tiempo real se realizó utilizando el SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen) en un sistema de detección de secuencias ABI7500 (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µl. Los nucleótidos, la ADN polimerasa Taq, y buffer estaban incluidos en la mezcla LightCycler-DNA master SYBR Green mix (Invitrogen).

Transfección de células, plásmidos y tratamientos farmacológicos

Las células COS-7, HEK-293T y MN1 fueron transfectadas con Polyethylenmine-PEI (Polysciences). Las PC12 fueron tranfectadas con Fugene-6 (actualmente Xtreme gene) (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los cultivos primarios de DRG/hipocampo fueron transfectados con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 150 µl del medio en que se cultivan estas células + 100 µl de DMEM:F12/neurobasal conteniendo 1 µg de ADN plasmídico total por well en placas de 24 wells, respectivamente. Para los experimentos de pérdida de expresión, las neuronas hipocampales fueron transfectadas con 1 µg del vector shRNA Lrig1 que expresa la proteína verde fluorescente GFP (vector pGFP-V-RS). Para los experimentos de sobreexpresión, las neuronas hipocampales se cotransfectaron con Lrig1 etiquetado con flag (Lrig1-flag) (0,9 µg) y un vector de expresión para GFP (0,1 µg).

Los plásmidos del Sprouty4 wt (etiquetado con 6 secuencias Myc) y el dominante negativo (Sprouty4-Y53A) fueron gentilmente cedidos por el Dr. Akihiko Yoshimura (Universidad Kyushu, Fukuoka, Japón). El plásmido que codifica para el Erk2-HA fue

cedido amablemente por el Dr. José María Rojas (Instituto de Salud Carlo III, Madrid, España). El plásmido que codifica para el dominio de unión a GTPsa (GBD) de PAK etiquetado con GST (PAK-GBD) fue cedido gentilmente por la Dra. Hollis T. Cline (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos). El plásmido que codifica para la versión constitutivamente activa de Ras (Ras-V12-HA) fue amablemente cedido por el Dr. White E. y el Dr. Chen J. (The Cancer Institute of New Jersey, NJ, Estados Unidos). Los plásmidos de Lrig2 etiquetado con HA (Lrig2-HA) y shRNA-Lrig1-GFP fueron adquiridos de Cellogenetics, Inc. El vector retroviral pRetro-U6G shRNA fue utilizado para la expresión del shRNA-Lrig1 dirigido el *Lrig1* de ratón. [109] El plásmido con el ADNc de Lrig1-flag se ha descrito previamente. [97] El plásmido que codifica para el ADNc para la forma mutada de Lrig1-flag que carece de los dominios de repetición ricos en leucina (ΔLRR Lrig1-flag) fue gentilmente proporcionado por el Dr. Y. Yarden (Instituto Weizmann, Israel). [103] El plásmido de Lrig3-flag fue proporcionado amablemente por Lisa Goodrich (Harvard Medical School, EE.UU). [117] El ADNc que codifica para TrkB-HA se ha descrito previamente. [182] El plásmido que codifica para GFP se obtuvo de Clontech. Los plásmidos de RM2A y RM2B fueron gentilmente cedidos por el Dr. M. Saarma y el Dr. M Santoro.

El pretatamiento con el inhibidor específico de MEK, PD98059 (50 µM) se hizo 30 minutos antes a 37 ºC antes de la estimulación con NGF.

Cultivo primario de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG)

Se prepararon neuronas de los ganglios de raíz dorsal (DRG) de día embrionario 14,5 (E14.5) de ratas Wistar (Escuela de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires), como se describe anteriormente. Brevemente, los ganglios se disociaron con tripsina (2,5%) y colagenasa (01%), y se sembró en placas recubiertas de poli-ornitina y

laminina. Las neuronas se mantuvieron en DMEM: medio F12 suplementado con glutamina 2 mM, 0,35% de albúmina de suero bovino, 60 unidades/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomicina y NGF (50 ng/ml).

Cultivo primario de neuronas de hipocampo

Neuronas de hipocampo de rata de día embrionario (E) 17,5 se disociaron por trituración y se cultivaron en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), penicilina, estreptomicina, y Glutamax (Gibco) como se describió previamente. [183]

Neuronas de hipocampo de ratón se prepararon a partir del día postnatal 0 (P0) de animales recién nacidos. Brevemente, después de la digestión con 45U de papaína y 0,05% de DNAsa en solución salina equilibrada de Hank (Gibco) a 37 º C durante 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de DMEM 10% de FBS. Luego, los hipocampos se trituraron mecánicamente y las neuronas disociadas fueron sembradas en placas de 24 wells recubiertas con poli-D-lisina (10 µg/ml). Dos horas más tarde, el medio fue reemplazado por medio Neurobasal suplementado con B27 (Gibco), penicilina, estreptomicina, y Glutamax (Gibco) como se describió previamente. [183] Para la transfección de cultivos primarios, las neuronas del hipocampo se sembraron en placas de 24 wells a una densidad de $1x10^5$ células por well. Los cultivos se hicieron crecer durante diferentes días *in vitro* antes de la transfección.

Explantos de ganglios de la raíz dorsal (DRG)

Se disectaron ganglios de la raíz dorsal de la zona lumbar de ratones recién nacidos (P0). Se cortaron sus nervios y se los colocó en wells con couting de poli-D-lisina y

laminina en el medio ya descripto para células disociadas, sólo que en lugar de NGF se los cultivó con GDNF (50 ng/ml).

Evaluación de la morfología dendrítica y la densidad de la espinas dendríticas

El axón fue identificado y excluido en base a la ausencia de la inmunotinción para MAP-2. Se adquirieron fotos de neuronas disociadas utilizando un microscopio Olympus IX-81 y se realizaron medidas de complejidad dendrítica en células neuronales que muestraban una morfología de tipo piramidal, conteniendo una dendrita principal gruesa y varias dendritas finas. La complejidad del árbol dendrítico se analizó mediante el plug-in del análisis de Sholl para el programa NeuronJ. El análisis de Sholl se realizó con anillos de intervalos de 10 µm entre sí a partir del soma. Las dendritas menos de 3 µm de longitud no se contaron. Para la densidad de espinas dendríticas, las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000, utilizando un objetivo de 60X. Se realizó una proyección de varios planos (Z stacks) para cada neurona y luego se contó el número de espinas en segmentos de 100 µm de longitud de dendrita por cada neurona.

Lisados totales de células, inmunoprecipitación y Western Blot

Las células se lisaron a 4 º C en un buffer que contiene 0,5% de Triton X-100, 1% octilglucósido, e inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados fueron centrifugados y se analizaron mediante inmunoprecipitación y Western blot como se ha descrito previamente. [183] Los blots fueron escaneados en un Storm 845 PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences) y las cuantificaciones se realizaron con el software ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences). Los números debajo de las bandas indican el radio de

veces de inducción con respecto al control normalizado a los niveles totales de la proteína analizada. Los anticuerpos se obtuvieron de diversas fuentes como se detalla a continuación: anti-fosfotirosina (P-Tyr), anti-Actina, anti-Myc, anti-Spry4 (H-100) y anti-fosfoTrkB (P-Tyr 705 TrkB) de Santa Cruz Biotechnology, anti-Rac1 y anti-TrkB de BD Biosciences Pharmingen, anti-Lrig1 dominio extracelular (policlonal de conejo) fue cedido por Satoshi Itami (Universidad de Osaka, Osaka, Japón) [98, 109], anti-Lrig2 y anti-Lrig3 fueron cedidos por el Dr. H. Hedman (Universidad de Umeå, Suecia), anti-TrkA, anti-TrkB y anti-Ret y anti-Lrig1 dominio intracelular de RnD Systems, anti-HA de Roche, anti-fosfoMAPK (Thr-202/Tyr-204 P-MAPK) y anti-fosfoAkt (Ser 473 P-Akt) de New England Biolabs, anti-ßIII-tubulina de Promega, y anti-MAP-2, anti-S100ß y anti-Flag (M2) de Sigma.

Determinación de la activación de Rac1 por ensayos de precipitación por afinidad (Pull down assays)

Para detectar el Rac1-GTP activo, se realizó el ensayo de pulldown utilizando GST-Pak-CRIB, que se une específicamente a Rac1 activo (forma unida a GTP). La intensidad de la banda en el inmunoblot fue cuantificada, y los niveles de Rac-GTP se normalizaron a la cantidad total de Rac1.

Inmunofluorescencia y microscopía

Secciones de criostato de cerebro de rata P15 y ganglios de la raíz dorsal de ratón P0 fueron bloqueadas con 10% de suero de burro, y se incubaron con anticuerpo anti-Lrig1 dominio extracelular (policlonal de conejo) (dilución 1/1000) y anti-Lrig1, anti-Lrig2 y anti-Lrig3, respectivamente. Las neuronas disociadas (obtenidas a partir de DRG E14,5 de rata; de hipocampo E17,5 de rata; o de hipocampo P0 de ratón) y cultivadas por

diferentes días *in vitro* fueron fijadas con paraformaldehido (PFA) al 4%, se bloquearon con 10% de suero de burro y luego fueron incubadas con los anticuerpos que se indican en cada ensayo: anti-TrkA (dilución 1/200, RnD), anti-Sprouty4 (dilución 1/100, Santa Cruz), anti-Lrig1 dominio extracelular (policlonal de conejo) (dilución 1/1000) [98, 185, 186], anti-TrkB (dilución 1/200, BD Biosciences) [187], anti-MAP2 (dilución 1/1000, Sigma) y anti-ßIII-tubulina (dilución 1/5000, Promega). Los anticuerpos secundarios fueron de Jackson ImmunoResearch. Las fotografías se obtuvieron usando un microscopio invertido Olympus IX-81. La especificidad de los anticuerpos se controló por wester blot (en los casos indicados) y por tinción negativa de las células y tejidos circundantes.

Ensayos de crecimiento neurítico

Para los ensayos de diferenciación de células PC12, las células fueron transfectadas utilizando Fugene 6 (actualmente Xtreme Gene, Roche) en medio completo. Al día siguiente, las células se sembraron en wells recubiertos con poli-D-lisina en placas de 24 wells y se cultivaron en medio DMEM suplementado con NGF (50 ng / ml). Después del tiempo indicado (48 ó 72 hs), las células fueron fijadas con 4% paraformaldehido (PFA) y se tiñeron con los anticuerpos mencionados. Se cuantificó el número de células que llevan neuritas más largas que 1,5 ó 2 veces el cuerpo de las célula (según el caso) en relación con el número total de células contadas (para los ensayos con NGF), o el largo de las prolongaciones de cada célula diferenciada (para los ensayos con BDNF) en al menos 10 campos aleatorios de tres wells diferentes en cada experimento. La diferenciación de células PC12 se evaluó en tres experimentos independientes. Las imágenes se obtuvieron usando un IX-81 microscopio invertido Olympus.

Los ensayos de diferenciación con células MN1 se hicieron de forma similar, sólo que loso pocillos fueron recubiertos con colágeno en lugar de poli-D-lisina.

Los ensayos de crecimiento neurítico para neuronas de DRG se realizaron en cultivos disociados primarios de rata E14,5. Los cultivos primarios se prepararon como se ha descrito anteriormente (véase más arriba). Las neuronas fueron transfectadas con y se cultivaron en presencia de NGF (50 ng /ml) durante 36 hs. Luego, las células fueron fijadas con PFA al 4% y se tiñeron con anti-βIII tubulina para identificar células neuronales. La supervivencia neuronal se evaluó usando la tinción nuclear 49,69-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen). Las neuronas positivas para GFP que contenían tinción nuclear fragmentada o condensada se anotaron como células apoptóticas y no se computaron en los ensayos de diferenciación. La cuantificación de la longitud de las neuritas se realizó usando el software NIH ImageJ (con el plug-in NeuroJ).

Ensayos de pérdida de expresión con shRNA

El shRNA Sprouty4 de rata (29 mer) y los plásmidos de control negativo (scramble) fueron adquiridos de Origene (Rockville, MD, EE.UU.) y se utilizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. El vector retroviral pGFP-V-RS se utilizó para la expresión del shRNA dirigido contra el ARNm de *Spry4* de rata. La secuencia del shRNA Spry4 es 5´-GTG CAA GGT ATC TTC TAC CAC TGT ACT AA-3´, y corresponde a los nucleótidos 610-638 del ARNm de *Spry4* de rata. La especificidad de la disminución en la expresión de *Spry4* fue confirmada por PCR en tiempo real y por Western blot.

El vector de expresión shRNA-Lrig1-GFP de ratón fue adquirido de Cellogenetics, Inc. El vector retroviral pRetro-U6G shRNA fue utilizado para la expresión del shRNA Lrig1 dirigido contra el ARNm de *Lrig1* de ratón. La secuencia blanco del shRNA Lrig1 es 5'-TCA GTC ACA TTG CTG AAG G-3', y corresponde a los nucleótidos 1494-1512 del ARNm Lrig1 de ratón. Esta región no era homóloga a Lrig2, Lrig3 u otros genes conocidos

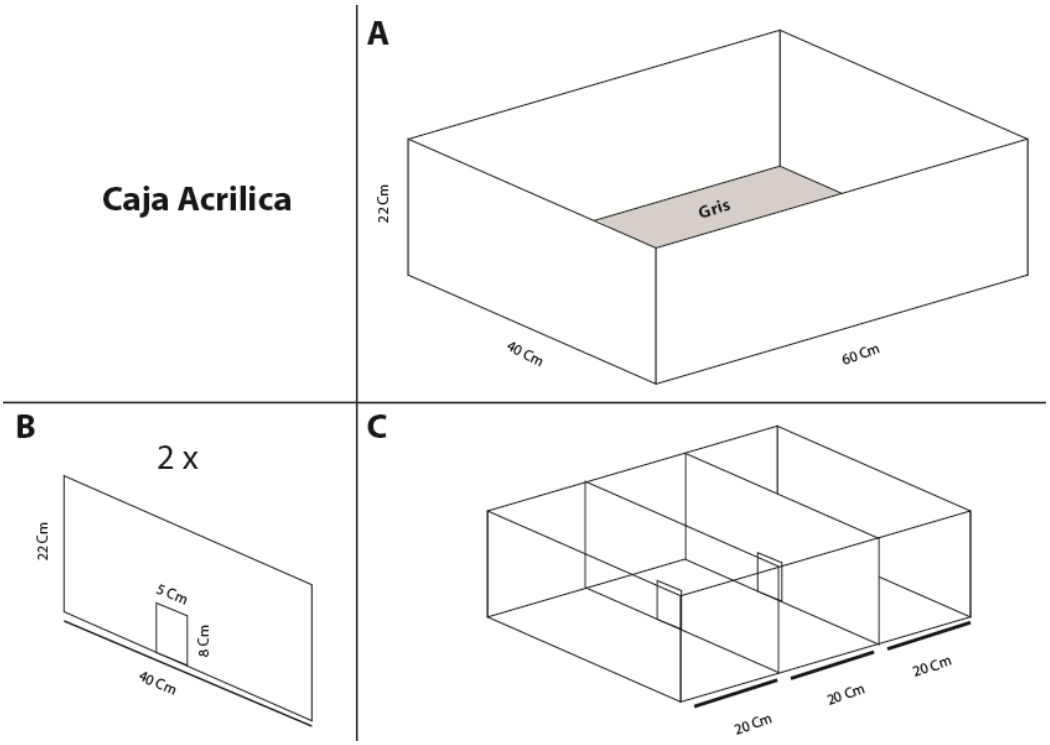
determinados por una búsqueda BLAST. La especificidad de la pérdida de expresión de *Lrig1* fue confirmada por PCR en tiempo real e inmunofluorescencia.

Tinción de Golgi

Brevemente, los cerebros de los ratones se colocaron en solución fijadora (formalina 10%) y se almacenaron en oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, se transfirieron a una solución de dicromato de potasio al 3% y se almacenaron a temperatura ambiente durante 4 días. Por último, fueron transferidos en una solución de nitrato de plata 2% durante 24 hs. Los cerebros se cortaron en secciones de 100 µm de espesor en un vibrátomo. Se recogieron las secciones de cerebro que contenían hipocampo en una solución de gelatina al 0,3%, se secaron a temperatura ambiente, se deshidrataron en alcohol y se aclararon con xileno. Finalmente, se montaron en portaobjetos gelatinizados 0,3%. Se tomaron imágenes de campo claro en un microscopio Zeiss Axiophot y se evaluó la complejidad proximal y ramificación dendríticas (análisis de Sholl) de los dominios apical y basal en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo teñidas.

Test de comportamiento de interacción social

Este ensayo se realizó en una caja de acrílico, que está subdividida en 3 compartimientos conectados entre sí (ver las dimensiones en el esquema debajo).



Brevemente, los animales fueron colocados en el ambiente donde el ensayo iba a ser realizado, al menos 30 minutos antes de comenzar el mismo.

Luego de una habituación de 5 minutos, en la cual el ratón es capaz de circular e inspeccionar libremente todos los compartimientos, el mismo es encerrado momentáneamente en el compartimiento del medio. Luego, se coloca dentro de uno de los contenedores (presentes ya en la habituación) a un ratón extraño de la misma edad y con el cual nunca tuvo contacto previo, mientras que en la otra recámara el contenedor se deja vacío. A partir de ese momento se permite que el ratón testeado recorra nuevamente los compartimientos durante 10 minutos. La sesión fue filmada para su posterior análisis. Se registró el tiempo total pasado en cada recámara y el tiempo de olfateo del contenedor con el estímulo social y del contenedor vacío.

Estadística

Los datos se presentaron como promedio ± error estándar o desvío estándar, y los valores p de significancia se indican en cada caso. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism 5.0. En los casos señalados se realizó test de Student o el análisis de ANOVA seguido del post-test Dunnett, Bonferroni o Newman Keuls.

GLOSARIO

ARTN (Artemin; Artemina)

BDNF (Brain Derived Growth Factor; Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro)

CDNF (Cerebral dopamine neurotrophic factor; Factor neurotrófico dopaminérgico cerebral)

DRG (Dorsal root ganglia; ganglios de la raíz dorsal)

EGF (Epidermal Growth Factor; Factor de Crecimiento Epidérmico)

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)

Erk (Extracellular Signal Regulated Kinase; Quinasa Reguladora de la Señal Extracelular)

FGF (Fibroblast Growth Factor; Factor de Crecimiento Fibroblástico)

GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor; Factor neurotrófico derivado de células gliales)

GFRα1 (GDNF family receptors alpha1; Receptor de la familia de GDNF alfa1)

GFRα2 (GDNF family receptors alpha2; Receptor de la familia de GDNF alfa2)

GFRα3 (GDNF family receptors alpha3; Receptor de la familia de GDNF alfa3)

GFRα4 (GDNF family receptors alpha4; Receptor de la familia de GDNF alfa4)

GFP (green fluorescent protein; proteína verde fluorescente)

MANF	(Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor ; Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos)
MAPK	(Mitogen activated protein kinase; Proteína kinasa activada por Mitógenos)
MEK	(MAPK/Erk-kinase; kinasa MAPK/Erk)
NGF	(Nerve Growth Factor; Factor de Crecimiento Nervioso)
NRTN	(Neurturin; Neurturina)
NT-3	(Neurotrophin 3; Neurotrofina 3)
NT-4	(Neurotrophin 4; Neurotrofina 4)
Lrig1	(Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 1)
Lrig2	(Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 2)
Lrig3	(Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 3)
$p75^{NTR}$	(Low-Affinity p75 Neurotrophin Receptor; Receptor de baja afinidad del neurotrofinas)
PDGF	(platelet derived growth factor; factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PI3K	(Phosphoinositide 3-kinase; Fosfoinositol 3-kinasa)
PLCγ	(Phospholipases C-gamma; Fosfolipasa C-gamma)
PSPN	(Persephin; Persefina)

PTEN	(Phosphatase and tensin homolog protein; Proteína fosfatasa homóloga de tensina)
Spry1	(Sprouty 1)
Spry2	(Sprouty 2)
Spry4	(Sprouty 4)
Ras	(Rat Sarcoma; Sarcoma de Rata)
RET	(RET "rearranged during transfection" proto-oncogene)
RTK	(Receptor tyrosine kinase; Receptor tirosina kinasa)
TrkA	(Tropomyosin receptor kinase A; Receptor kinasa A de tropomiosina)
TrkB	(Tropomyosin receptor kinase B; Receptor kinasa B de tropomiosina)
TrkC	(Tropomyosin receptor kinase C; Receptor kinasa C de tropomiosina)
VEGF	(Vascular endothelial growth factor; Factor de crecimiento endotelial vascular)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Reichardt L. F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361, 1545-1564.

[2] Paratcha G. and Ledda F. (2008) GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons. Trends Neurosci. 31, 384-391.

[3] Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen V, Andressoo J, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*. Nature 448:73–77.

[4] Garces A., Haase G., Airaksinen M. S., Livet J., Filippi P. and deLapeyriere O. (2000) GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. J. Neurosci. 20, 4992-5000.

[5] Patel T. D., Kramer I., Kucera J., Niederkofler V., Jessell T. M., Arber S. and Snider W. D. (2003) Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. Neuron 38, 403-416.

[6] Kramer E. R., Knott L., Su F., Dessaud E., Krull C. E., Helmbacher F. and Klein R. (2006) Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. Neuron 50, 35-47.

[7] Wickramasinghe S. R., Alvania R. S., Ramanan N., Wood J. N., Mandai K. and Ginty D. D. (2008) Serum response factor mediates NGFdependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. Neuron 58, 532-545.

[8] Luo W, Wickramasinghe SR, Savitt JM, Griffin JW, Dawson TM, Ginty DD. (2007) A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. Neuron 54, 739–754.

[9] Mandai K., Guo T., St Hillaire C., Meabon J. S., Kanning K. C., Bothwell M. and Ginty D. D. (2009) LIG family receptor tyrosine kinase-associated proteins modulate growth factor signals during neural development. Neuron 63, 614–627.

[10] Saltiel, A.R and Ohmichi, M. Pleiotropic signaling from receptor tyrosine kinases. Curr. Opin Neurobiol 3, 352-359 (1993).

[11] Airaksinen M. S. and Saarma M. (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat. Rev. Neurosci. 3, 383–394.

[12] Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. Annu Rev Neurosci 26: 299-330.

[13] Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem 72: 609-642.

[14] Ledda, F and Paratcha, G. (2007). Negative regulation of receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: A developing field. Biomarker Insights 2 :45-58.

[15] Dikic I, Giordano S (2003). Negative receptor signalling. Curr Opin Cell Biol 15: 128 135.

[16] Alsina, F.C., Ledda, F., and Paratcha, G. (2012). New insights into the control of neurotrophic growth factor receptor signaling: implications for nervous system development and repair. Journal of neurochemistry 123, 652-661.

[17] Dawbarn D. and Allen S. J. (2003) Neurotrophins and neurodegeneration. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 29, 211–230.

[18] Kramer E. R., Aron L., Ramakers G. M., Seitz S., Zhuang X., Beyer K., Smidt M. P. and Klein R. (2007) Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. PLoS Biol. 5, e39.

[19] Baquet Z. C., Gorski J. A. and Jones K. R. (2004) Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. J. Neurosci. 24, 4250–4258.

[20] Ruberti F., Capsoni S., Comparini A., Di Daniel E., Franzot J., Gonfloni S., Rossi G., Berardi N. and Cattaneo A. (2000) Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals

severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. J. Neurosci. 20, 2589-2601

[21] Cattaneo A., Capsoni S. and Paoletti F. (2008) Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 15, 255-283.

[22] Bjorklund, A and Lindvall, O. Parkinson disease gene therapy moves towards the clinic. Nature Medicine 6(11).,1207-8 (2000).

[23] Levy, Y.S., Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E and Offen, D. Therapeutic potential of neurotrophic factors in neurodegenerative diseases. BioDrugs 19(2) 92-127 (2005).

[24] Shen H., Chung J. M. and Chung K. (1999) Expression of neurotrophin mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve injury. Brain Res. Mol. Brain Res. 64, 186-192.

[25] Tanabe K., Bonilla I., Winkles J. A. and Strittmatter S. M. (2003) Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. J. Neurosci. 23, 9675-9686.

[26] Gordon T. (2009) The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. Neurosurg. Focus 26, E3.

[27] Sun F. and He Z. (2010) Neuronal intrinsic barriers for axon regeneration in the adult CNS. Curr. Opin. Neurobiol. 20, 510-518.

[28] Mi S., Hu B., Hahm K., Luo Y., Kam Hui E. S., Yuan Q., Wong W. M., Wang L., Su H., Chu T. H., Guo J., Zhang W., So K. F., Pepinsky B., Shao Z., Graff C., Garber E., Jung V., Wu E. X. and Wu W. (2007) LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Nat Med 13, 1228-1233.

[29] Liu K., Lu Y., Lee J. K. et al. (2010) PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. Nat. Neurosci. 13, 1075-1081.

[30] Goldshmit Y, Frisca F, Kaslin J, Pinto AR, Tang JKY, Pébay A, Pinkas-Kramarski R, Currie PD (2014, aceptado en prensa). Decreased anti-regenerative effects after spinal cord injury in spry4-/- mice. Neuroscience.

[31] Marmigere F, and Ernfors P. (2007) Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. Nat. Rev. Neurosci. 8, 114–127.

[32] Benn SC, Costigan M, Tate S, Fitzgerald M, Woolf CJ. (2001) Developmental Expression of the TTX-Resistant Voltage-Gated Sodium Channels Nav1.8 (SNS) and Nav1.9 (SNS2) in Primary Sensory Neurons. Journal of Neurosci. 21(16):6077–6085.

[33] Lallemend F and Ernfors P. (2012) Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. Trends in Neuroscience 35, 6, 373-381.

[34] Luo W, Enomoto H, Rice FL, Milbrandt J, Ginty DD. (2009) Molecular identification of rapidly adapting mechanoreceptors and their developmental dependence on ret signaling. Neuron 64, 841–856.

[35] Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian ASh, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD. (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. Neuron 19, 849–861.

[36] Baudet C, Mikaels A, Westphal H, Johansen J, Johansen TE, and Ernfors P. (2000) Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron subpopulations, and their collaboration with neurotrophins. Development 127, 4335-4344.

[37] Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keefe J (2007). The Hippocampus Book. Oxford University Press.

[38] Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FG (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. Physiol Rev 94: 991–1026.

[39] Soriano E, Cobas A, Fairén A (1986). Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. Brain Res. 395(1):88-92.

[40] Fricke R, Cowan WM (1977). An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural afferents to the dentate gyrus of the rat. J Comp Neurol. 15;173(2):231-50.

[41] Ben-Ari Y, Gaiarsa J, Tyzio R, Khazipov R (2007). GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. Physiol Rev 87: 1215–1284.

[42] Hitti FL, Siegelbaum SA (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. Nature 508, 88–92.

[43] Mankin EA, Diehl GW, Sparks FT, Leutgeb S, Leutgeb JK (2014). Hippocampal CA2 Activity Patterns Change over Time to a Larger Extent than between Spatial Contexts. Neuron 85, 190–201.

[44] Magarinos AM, Li CJ, Gal TJ, Bath KG, Jing D, Lee FS (2011). Effect of brain derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. Hippocampus 21, 253-264.

[45] Bramham CR (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. Curr Opin Neurobiol. 18(5):524-31.

[46] Cohen S, Greenberg ME (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 24:183-209.

[47] Lu Y, Christian K, Lu B (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? Neurobiol Learn Mem. 89(3):312-23.

[48] Schinder AF, Poo M (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity Trends Neurosci. 23, 639–645.

[49] Bekinschtein P, Cammarota M, Medina J.H (2014). BDNF and memory processing. Neuropharmacology 76, 677–683.

[50] Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. Proc Natl Acad Sci. 21;96(26):15239-44.

[51] Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 112(2):257-69.

[52] Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. Science 314(5796):140-3.

[53] Castrén E, Rantamäki T (2008). Neurotrophins in depression and antidepressant effects. Novartis Found Symp. 289:43-52.

[54] Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ (2009). Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. Neuropharmacology. 56 Suppl 1:73-82.

[55] Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE (1999). Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. Neuroscience.93(4):1491-506.

[56] Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD (2006) Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. Trends Cell Biol 16: 45-54.

[57] Cabrita M. A. and Christofori G. (2008) Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. Angiogenesis 11, 53–62.

[58] Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA (1998). Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. Cell 92: 253–263.

[59] Kramer S., Okabe M., Hacohen N., Krasnow M. A. and Hiromi Y. (1999) Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. Development 126, 2515–2525.

[60] Impagnatiello MA, Weitzer S, Gannon G, Compagni A, Cotten M, et al. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. J Cell Biol 152: 1087-1098.

[61] Gross I, Armant O, Benosman S, de Aguilar JL, Freund JN, et al. (2007) Sprouty2 inhibits BDNF-induced signaling and modulates neuronal differentiation and survival. Cell Death Differ 14: 1802-1812.

[62] Ishida M, Ichihara M, Mii S, Jijiwa M, Asai N, et al. (2007) Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase. Cancer Sci 98: 815-821.

[63] Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD (2001) Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. J Biol Chem 276: 46460-46468.

[64] Ayada T, Taniguchi K, Okamoto F, Kato R, Komune S, et al. (2009) Sprouty4 negatively regulates protein kinase C activation by inhibiting phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis. Oncogene 28: 1076-1088.

[65] Sasaki A, Taketomi T, Wakioka T, Kato R, Yoshimura A (2001) Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. J Biol Chem 276: 36804–36808.

[66] Haglund K., Schmidt M. H., Wong E. S., Guy G. R. and Dikic I. (2005) Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation. EMBO Rep. 6, 635–641.

[67] Wong ES, Lim J, Low BC, Chen Q, Guy GR (2001) Evidence for direct interaction between Sprouty and Cbl. J Biol Chem 276: 5866–5875.

[68] Egan JE, Hall AB, Yatsula BA, Bar-Sagi D (2002) The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 6041–6046.

[69] Rubin C, Litvak V, Medvedovsky H, Zwang Y, Lev S, et al. (2003) Sprouty finetunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. Curr Biol 13: 297–307.

[70] Hausott B, Vallant N, Auer M, Yang L, Dai F, Brand-Saberi B, Klimaschewski L. (2009) Sprouty2 down-regulation promotes axon growth by adult sensory neurons. Mol Cell Neurosci 42: 328–340.

[71] Vetter IR, Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science 294: 1299–1304.

[72] Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G (2002) Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. J Biol Chem 277: 35840–35846.

[73] Fard SS, Kele J, Vilar M, Paratcha G, Ledda F (2010) Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. PLoS One 5: e9647.

[74] Poppleton HM, Edwin F, Jaggar L, Ray R, Johnson LR, et al. (2004) Sprouty regulates cell migration by inhibiting the activation of Rac1 GTPase. Biochem Biophys Res Commun 323: 98–103.

[75] Mason JM, Morrison DJ, Bassit B, Dimri M, Band H, et al. (2004) Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop. Mol Biol Cell 15: 2176–2188.

[76] Lao DH, Chandramouli S, Yusoff P, Fong CW, Saw TY, et al. (2006) A Src homology 3-binding sequence on the C terminus of Sprouty2 is necessary for inhibition of the Ras/ERK pathway downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. J Biol Chem 281: 29993–30000.

[77] Ernsberger U (2009) Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. Cell Tissue Res 336: 349–384.

[78] Panagiotaki N, Dajas-Bailador F, Amaya E, Papalopulu N, Dorey K (2010) Characterisation of a new regulator of BDNF signalling, Sprouty3, involved in axonal morphogenesis in vivo. Development 137: 4005–4015.

[79] Li X, Wheldon L, Heath JK (2003) Sprouty: a controversial role in receptor tyrosine kinase signalling pathways. Biochem Soc Trans 31: 1445–1446.

[80] Lee SH, Schloss DJ, Jarvis L, Krasnow MA, Swain JL (2001) Inhibition of angiogenesis by a mouse sprouty protein. J Biol Chem 276: 4128–4133.

[81] Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. Nat Cell Biol 4: 850–858.

[82] Leeksma OC, Van Achterberg TA, Tsumura Y, Toshima J, Eldering E, et al. (2002) Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. Eur J Biochem 269: 2546–2556.

[83] Yusoff P, Lao DH, Ong SH, Wong ES, Lim J, et al. (2002) Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. J Biol Chem 277: 3195–3201.

[84] Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, et al. (2003) Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. Nat Cell Biol 5: 427–432.

[85] Akbulut S, Reddi AL, Aggarwal P, Ambardekar C, Canciani B, et al. (2010) Sprouty proteins inhibit receptor-mediated activation of phosphatidylinositolspecific phospholipase C. Mol Biol Cell 21: 3487–3496.

[86] Tsumura Y, Toshima J, Leeksma OC, Ohashi K, Mizuno K (2005) Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. Biochem J 387: 627–637.

[87] Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. Annu Rev Neurosci 24: 1217–1281.

[88] Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, et al. (2007) Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1- like phenotype. Nat Genet 39: 1120–1126

[89] Spurlock G, Bennett E, Chuzhanova N, Thomas N, Jim HP, et al. (2009) SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. J Med Genet 46: 431–437.

[90] Chen, Y., Aulia, S., Li, L and Tang, B.L. AMIGO and friends: An emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. Brain Res Review 51, 265-274 (2006).

[91] Homma S, Shimada T, Hikake T, Yaginuma H, Expression pattern of LRR and Ig domain-containing protein (LRRIG protein) in the early mouse embryo. Gene Expr Patterns. 2009; 9(1):1-26.

[92] Aruga J. and Mikoshiba K. (2003) Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. Mol. Cell. Neurosci. 24, 117‑129.

[93] Katayama K., Zine A., Ota M., Matsumoto Y., Inoue T., Fritzsch B. and Aruga J. (2009) Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice. PLoS ONE 4, e7786.

[94] Chen, Y., Hor, H.H., and Tang, B.L. (2012). AMIGO is expressed in multiple brain cell types and may regulate dendritic growth and neuronal survival. J Cell Physiol 227, 2217-2229.

[95] de Wit, J., Hong, W., Luo, L., and Ghosh, A. (2011). Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits. Annu Rev Cell Dev Biol 27, 697-729.

[96] Proenca, C.C., Gao, K.P., Shmelkov, S.V., Rafii, S., and Lee, F.S. (2011). Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. Trends Neurosci 34, 143-153.

[97] Nilsson, J., Vallbo, C., Guo, D., Golovleva, I., Hallberg, B., Henriksson, R., and Hedman, H. (2001). Cloning, characterization, and expression of human LIG1. Biochem Biophys Res Commun 284, 1155-1161.

[98] Suzuki, Y., Miura, H., Tanemura, A., Kobayashi, K., Kondoh, G., Sano, S., Ozawa, K., Inui, S., Nakata, A., Takagi, T., Tohyama, M., Yoshikawa, K., Itami, S. (2002). Targeted disruption of LIG-1 gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia. FEBS Lett 521, 67-71.

[99] Ghiglione C., Carraway K. L., 3rd, Amundadottir L. T., Boswell R. E., Perrimon N. and Duffy J. B. (1999) The transmembrane molecule kekkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the Drosophila EGF receptor during oogenesis. Cell 96, 847‑856.

[100] Ghiglione C., Amundadottir L., Andresdottir M., Bilder D., Diamonti J. A., Noselli S., Perrimon N. and Carraway I. K. (2003) Mechanism of inhibition of the Drosophila and mammalian EGF receptors by the transmembrane protein Kekkon 1. Development 130, 4483‑4493.

[101] Hedman H., Nilsson J., Guo D. and Henriksson R. (2002) Is LRIG1 a tumour suppressor gene at chromosome 3p14.3? Acta Oncol. 41, 352‑354.

[102] Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L., Sweeney, C. The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. J Biol Chem. 5;279(45):47050-6 (2004).

[103] Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G, Hedman, H., Wides, R and Yarden, Y. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. EMBO J. 18;23(16):3270-81 (2004).

[104] Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, Higginbotham JN, Juchheim A, Prasad N, Levy SE, Guo Y, Shyr Y, Aronow BJ, Haigis KM, Franklin JL, Coffey RJ (2012) The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. Cell 149: 146–158.

[105] Wong V. W., Stange D. E., Page M. E. et al. (2012) Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. Nat. Cell Biol. 14, 401-408.

[106] Krig S. R., Frietze S., Simion C. et al. (2011) Lrig1 is an estrogenregulated growth suppressor and correlates with longer relapse-free survival in ERalpha-positive breast cancer. Mol. Cancer Res. 9, 1406-1417.

[107] Ye F., Gao Q., Xu T. et al. (2009) Upregulation of LRIG1 suppresses malignant glioma cell growth by attenuating EGFR activity. J. Neurooncol. 94, 183-194.

[108] Shattuck D. L., Miller J. K., Laederich M., Funes M., Petersen H., Carraway K. L., 3rd and Sweeney C. (2007) LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. Mol. Cell. Biol. 27, 1934-1946.

[109] Ledda, F., Bieraugel, O., Shirazi Fard, S., Vilar, M., Paratcha, G. Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. Journal of Neurosci. 2008, 28, 39-49.

[110] Guo D, Nilsson J, Haapasalo H, Raheem O, Bergenheim T, et al. (2006) Perinuclear leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain proteins (LRIG1-3) as prognostic indicators in astrocytic tumors. Acta Neuropathol (Berl) 111: 238–246.

[111] Hedman H, Henriksson R (2007) LRIG inhibitors of growth factor signalling - double-edged swords in human cancer? Eur J Cancer 43: 676–682.

[112] Holmlund C, Nilsson J, Guo D, Starefeldt A, Golovleva I, et al. (2004) Characterization and tissue-specific expression of human LRIG2. Gene 332: 35–43.

[113] Wang B., Han L., Chen R., Cai M., Han F., Lei T. and Guo D. (2009) Downregulation of LRIG2 expression by RNA interference inhibits glioblastoma cell (GL15) growth, causes cell cycle redistribution, increases cell apoptosis and enhances cell adhesion and invasion in vitro. Cancer Biol. Ther. 8, 1018-1023.

[114] Holmlund C., Haapasalo H., Yi W., Raheem O., Brannstrom T., Bragge H., Henriksson R. and Hedman H. (2009) Cytoplasmic LRIG2 expression is associated with poor oligodendroglioma patient survival. Neuropathology 29, 242-247.

[115] Zhao H, Tanegashima K, Ro H, Dawid IB. Lrig3 regulates neural crest formation in Xenopus by modulating Fgf and Wnt signaling pathways Development. 2008. 135 (7): 1283-1293.

[116] Abraira VE, Del Rio T, Tucker AF, Slonimsky J, Keirnes HL, Goodrich LV. Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear. Development. 2008;135(24):4091-9.

[117] Abraira VE, Satoh T, Fekete DM, Goodrich LV. Vertebrate Lrig3-ErbB interactions occur in vitro but are unlikely to play a role in Lrig3-dependent inner ear morphogenesis. PLoS One. 2010;5(2):e8981.

[118] Rafidi H, Mercado III F , Astudillo M, Fry WH, Saldana M, Carraway KL 3rd, Sweeney C. Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein-1 (Lrig1) negative regulatory action toward ErbB receptor tyrosine kinases is opposed by leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein 3 (Lrig3). J Biol Chem. 2013;288(30):21593-605.

[119] Del Rio T, Nishitani AM, Yu WM, Goodrich LV. In vivo analysis of Lrig genes reveals redundant and independent functions in the inner ear. PLoS Genet. 2013;9(9):e1003824.

[120] Sholl, A., and Uttley, A.M. (1953). Pattern discrimination and the visual cortex. Nature 171, 387-388.

[121] Kaufmann WE, Moser HW (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. Cereb Cortex. 10(10):981-91.

[122] Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 14(3):285-93.

[123] Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. Nat Rev Neurosci 11, 316-328.

[124] Whitford, K.L., Dijkhuizen, P., Polleux, F., and Ghosh, A. (2002). Molecular control of cortical dendrite development. Annu Rev Neurosci 25, 127-149.

[125] Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. The Journal of neuroscience 29, 12764-12767.

[126] Horch, H.W., Kruttgen, A., Portbury, S.D., and Katz, L.C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. Neuron 23, 353-364.

[127] Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T., Feng, L., Duan, S., and Lu, B. (2010). Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. Nat Neurosci 13, 302-309.

[128] Jin, X., Hu, H., Mathers, P.H., and Agmon, A. (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. The Journal of neuroscience 23, 5662-5673.

[129] McAllister, A.K., Katz, L.C., and Lo, D.C. (1996). Neurotrophin regulation of cortical denritic growth requires activity. Neuron 17, 1057-1064.

[130] Segal, R.A., Pomeroy, S.L., and Stiles, C.D. (1995). Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. The Journal of neuroscience 15, 4970-4981.

[131] Cheung, Z.H., Chin, W.H., Chen, Y., Ng, Y.P., and Ip, N.Y. (2007). Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. PLoS Biol 5, e63.

[132] Kwon, M., Fernandez, J.R., Zegarek, G.F., Lo, S.B., and Firestein, B.L. (2011). BDNF promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. The Journal of neuroscience 31, 9735-9745.

[133] Lazo, O.M., Gonzalez, A., Ascano, M., Kuruvilla, R., Couve, A., and Bronfman, F.C. (2013). BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. The Journal of neuroscience 33, 6112-6122.

[134] McAllister, A.K., Lo, D.C., and Katz, L.C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. Neuron 15, 791-803.

[135] Drake, C.T., Milner, T.A., and Patterson, S.L. (1999). Ultrastructural localization of fulllength trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. The Journal of neuroscience 19, 8009-8026.

[136] Nibuya, M., Morinobu, S., and Duman, R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. The Journal of neuroscience 15, 7539-7547.

[137] Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. The Journal of neuroscience 17, 9492-9505.

[138] Elmariah, S.B., Crumling, M.A., Parsons, T.D., and Balice-Gordon, R.J. (2004). Postsynaptic TrkB-mediated signaling modulates excitatory and inhibitory neurotransmitter receptor clustering at hippocampal synapses. The Journal of neuroscience 24, 2380-2393.

[139] Parrish, J.Z., Emoto, K., Kim, M.D., and Jan, Y.N. (2007). Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. Annu Rev Neurosci 30, 399-423.

[140] Wong, R.O., and Ghosh, A. (2002). Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. Nat Rev Neurosci 3, 803-812.

[141] Kulkarni, V.A., and Firestein, B.L. (2012). The dendritic tree and brain disorders. Mol Cell Neurosci 50, 10-20.

[142] Cohen, S., and Greenberg, M.E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 24, 183-209.

[143] Yang, T., Massa, S.M., and Longo, F.M. (2006). LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways. J Neurobiol 66, 1420-1436.

[144] Cosker, K.E., and Segal, R.A. (2014). Neuronal signaling through endocytosis. Cold Spring Harbor perspectives in biology 6.

[145] Ouyang, Q., Lizarraga, S.B., Schmidt, M., Yang, U., Gong, J., Ellisor, D., Kauer, J.A., and Morrow, E.M. (2013). Christianson syndrome protein NHE6 modulates TrkB endosomal signaling required for neuronal circuit development. Neuron 80, 97-112.

[146] Finsterwald, C., and Martin, J.L. (2011). Cellular mechanisms underlying the regulation of dendritic development by hepatocyte growth factor. Eur J Neurosci 34, 1053-1061.

[147] Lim, C.S., and Walikonis, R.S. (2008). Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway. Cell Signal 20, 825-835.

[148] Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF (1996). Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. J Comp Neurol 374:21– 40.

[149] Yacoubian TA, Lo DC (2000). Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. Nat Neurosci 3:342–349.

[150] Carim-Todd L, Bath KG, Fulgenzi G, Yanpallewar S, Jing D, Barrick CA, Becker J, Buckley H, Dorsey SG, Lee FS, Tessarollo L (2009). Endogenous Truncated TrkB.T1 Receptor Regulates Neuronal Complexity and TrkB Kinase Receptor Function In Vivo. Journal of Neurosci, 29(3):678–685.

[151] de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M.L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Comoletti, D., Taylor, P., and Ghosh, A. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. Neuron 64, 799-806.

[152] Linhoff, M.W., Lauren, J., Cassidy, R.M., Dobie, F.A., Takahashi, H., Nygaard, H.B., Airaksinen, M.S., Strittmatter, S.M., and Craig, A.M. (2009). An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. Neuron 61, 734-749.

[153] Nam, J., Mah, W., and Kim, E. (2011). The SALM/Lrfn family of leucine-rich repeat containing cell adhesion molecules. Semin Cell Dev Biol 22, 492-498.

[154] Takahashi, H., Katayama, K., Sohya, K., Miyamoto, H., Prasad, T., Matsumoto, Y., Ota, M., Yasuda, H., Tsumoto, T., Aruga, J., et al. (2012). Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPdelta trans-synaptic interaction. Nat Neurosci 15, 389-398, S381-382.

[155] Takahashi, H., Arstikaitis, P., Prasad, T., Bartlett, T.E., Wang, Y.T., Murphy, T.H., and Craig, A.M. (2011). Postsynaptic TrkC and presynaptic PTPsigma function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex. Neuron 69, 287-303.

[156] McIlroy, G., Foldi, I., Aurikko, J., Wentzell, J.S., Lim, M.A., Fenton, J.C., Gay, N.J., and Hidalgo, A. (2013). Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the Drosophila melanogaster CNS. Nat Neurosci 16, 1248-1256.

[157] Liu, O.W., and Shen, K. (2011). The transmembrane LRR protein DMA-1 promotes dendrite branching and growth in C. elegans. Nat Neurosci 15, 57-63.

[158] Dong, X., Liu, O.W., Howell, A.S., and Shen, K. (2013). An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. Cell 155, 296-307.

[159] Salvatore D, Barone MV, Salvatore G, Melillo RM, Chiappetta G, Mineo A, Fenzi G, Vecchio G, Fusco A, Santoro M (2000). Tyrosines 1015 and 1062 are in vivo autophosphorylation sites in ret and ret-derived oncoproteins. J Clin Endocrinol Metab. 85:3898–3907.

[160] Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell. 61(2):203-12.

[161] Waite KA1, Eng C. (2002) Protean PTEN: form and function. Am J Hum Genet. 70(4):829-44. Epub 2002 Mar 1.

[162] Butler MG1, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C. (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTENtumour suppressor gene mutations. J Med Genet. 42(4):318-21.

[163] Goffin A1, Hoefsloot LH, Bosgoed E, Swillen A, Fryns JP. (2001) PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and autism. Am J Med Genet. 105(6):521-4.

[164] Zori RT1, Marsh DJ, Graham GE, Marliss EB, Eng C.(1998) Germline PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. Am J Med Genet. 80(4):399-402.

[165] Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ, Parada LF (2006). PTEN regulates neuronal arborization and social interaction in mice. Neuron 50(3):377-88.

[166] Song W., Volosin M., Cragnolini A. B., Hempstead B. L. and Friedman W. J. (2010) ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. J. Neurosci. 30, 15608‑15615.

[167] McCall J., Weidner N. and Blesch A. (2012) Neurotrophic factors in combinatorial approaches for spinal cord regeneration. Cell Tissue Res. 349, 27‑37.

[168] Hollis E. R., 2nd, Jamshidi P., Low K., Blesch A. and Tuszynski M. H. (2009) Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkBinduced Erk activation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 106, 7215-7220.

[169] Friedman W. J. (2010) Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. Neuroscientist 16, 244-252.

[170] Teng K. K., Felice S., Kim T. and Hempstead B. L. (2010) Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. Dev. Neurobiol. 70, 350-359.

[171] Denayer E., Ahmed T., Brems H. et al. (2008) Spred1 is required for synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning. J. Neurosci. 28, 14443-14449.

[172] Mi S., Miller R. H., Lee X. et al. (2005) LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. Nat. Neurosci. 8, 745-751.

[173] Mi S., Miller R. H., Tang W. et al. (2009) Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. Ann. Neurol. 65, 304-315.

[174] Inoue H., Lin L., Lee X. et al. (2007) Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 14430-14435.

[175] Ginty D. D. and Segal R. A. (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. Curr. Opin. Neurobiol. 12, 268-274.

[176] Ascano M., Bodmer D. and Kuruvilla R. (2012) Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. Trends Cell Biol. 22, 266-273.

[177] Torii S., Kusakabe M., Yamamoto T., Maekawa M. and Nishida E. (2004) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. Dev. Cell 7, 33-44.

[178] Tsang M. and Dawid I. B. (2004) Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. Sci. STKE 2004, pe17.

[179] Lindvall O. and Wahlberg L. U. (2008) Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? Exp. Neurol. 209, 82-88.

[180] Aron L, Klein R. (2011) Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. Trends Neurosci. 34(2):88-100.

[181] Salazar-Grueso, E.F., Kim, S., and Kim, H. (1991). Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. Neuroreport 2, 505-508.

[182] Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y.A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. The EMBO journal 18, 616-622.

[183] Paratcha, G., Ledda, F., and Ibanez, C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. Cell 113, 867-879.

[184] Otero, M.G., Alloatti, M., Cromberg, L.E., Almenar-Queralt, A., Encalada, S.E., Pozo Devoto, V.M., Bruno, L., Goldstein, L.S., and Falzone, T.L. (2014). Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function. J Cell Sci 127, 1537-1549.

[185] Jensen, K.B., and Watt, F.M. (2006). Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11958-11963.

[186] Nakamura, T., Hamuro, J., Takaishi, M., Simmons, S., Maruyama, K., Zaffalon, A., Bentley, A.J., Kawasaki, S., Nagata-Takaoka, M., Fullwood, N.J., et al. (2014). LRIG1 inhibits STAT3-dependent inflammation to maintain corneal homeostasis. J Clin Invest 124, 385-397.

[187] Berghuis, P., Dobszay, M.B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K.M., Schulte, G., Ernfors, P., Mackie, K., Paratcha, G., et al. (2005). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 19115-19120.

AGRADECIMIENTOS

No podría arrancar los agradecimientos sin mencionar primero a Gustavo, la persona que permitió que este esfuerzo realizado durante 5 años se haya concretado en una tesis. Es una persona que estuvo presente en todo momento, siempre ahí para lo que necesitara; no sólo aportando ideas y experimentos sino también discutiéndolos y puliéndolos para sacar el mejor povecho de cada uno de ellos. Me brindó todas las herramientas que estuvieron a su alcance, y gracias eso pude crecer enormemente. También no quiero dejar de agradecerle a Fernanda. Así como Gustavo, es una persona que me acompaña desde el primer día, y siempre estuvo dispuesta a enseñarme y a discutir conmigo todos los experimentos que se fueron planteando. A ambos, realmente, les tengo un aprecio muy profundo, una gratitud inmensa, e hicieron posible además, que en estos 5 años, haya tenido no simplemente un mero trabajo sino un ambiente en el cual pensar, crecer, aprender, innovar y divertirme.

En segundo lugar, quiero agradecer a todas las otras personas que me acompañaron todo este tiempo en el laboratorio: Lola, Pau, Anto, Facu y Fran. Cada uno de ellos estuvo conmigo para lo que necesité. Hicieron que hasta los días de cansancio y frustración terminaran con una sonrisa. No me voy a olvidar más las noches de pizza y picada que ayudaron a que el día terminara con buena onda! No sólo me llevo una tesis, sino una amistad y un lindo recuerdo de cada uno de los momentos que pasamos todos juntos y que estoy seguro que seguiremos pasando! Anto y Pau, gracias por estar conmigo y hacerme reir tanto ya desde tiempo atrás, en la facultad. Quién podía imaginarse que después de tantas horas de estudio y discusiones interminables, seguiríamos juntos por ese mismo camino. Lola, gracias por estar conmigo todo este tiempo, por toda la ayuda y por preocuparte de que siempre estuviera bien. Te amo y

estoy agradecido que nuestros caminos se hayan cruzado. Por último, los chicos Paratcha: Fran, siempre me va a quedar el recuerdo de cuando, junto con Pau, arrancamos el laboratorio; la pila y la buena onda que tuvimos que ponerle y remar para que las cosas salgan a flote. Facu, si bien te conocemos hace poco, aportás siempre esa locura y energía que le pone pila al laburo.

También quiero agradecer a todos los chicos e investigadores del instituto que, por supuesto, hicieron posible algunos de los experimentos de esta tesis. Un especial agradecimiento a Manu, que estuvo dispuesto siempre a enseñar y colaborar en el bioterio para lo que necesitara, no sólo yo, sino todo el laboratorio. Y también a Maru, por la ayuda y la buena onda del día a día.

Desde lo personal, quiero dejar plasmado en estas líneas un especial y profundo agradecimiento a mi familia: mis viejos, Cristina y Carlos, y mis hermanas, Julie y Pili. Los 4 estuvieron para mi siempre. Me bancaron en todas, hasta mis llegadas tardes constantes y recurrentes. "¿Hoy vas al laboratorio?", "¿Recién ahora salís?". Creo que muchos de los que estamos en esto hemos escuchado esta pregunta más de mil veces. Y así y todo ellos, estas 4 personas que no se que haría sin ellos, siempre lo hicieron sonar como algo cotidiano, como una compañía, aunque no estuvieran ahí conmigo. Aún hoy en día, logran que me sienta acompañado en todo momento, sin siquiera dudar un segundo que para lo que necesite van a estar ahí. Ellos también colaboraron con esta tesis. Y su interés y apoyo pero fundamentalmente su cariño, me dio fuerzas para seguir siempre adelante, aún en los momentos más difíciles. Los quiero mucho y, aunque parezca poco, estas líneas resumen un sentimiento y miles de palabras, anécdotas y que llenarían sin duda estas hojas. Acá por supuesto, también entrarían mis tíos, primos, abuelos y todos los familiares que estuvieron conmigo todo este tiempo, del cual también me llevo todo su

apoyo y cariño. Y aquellas personas como Vivi o Ludmi, que a veces me olvido de que no son familia, ya que siempre están ahí, con la mejor!

Por último, quiero agradecerle a mis amigos. A todos y cada uno de ellos, siempre tuvieron la mejor conmigo y también me alentaron cada vez que lo necesitaba. En especial a Fer, Pibe (Facu), Nano, Jota, Mai, Pablo, Euge, Tom, Mara, Claudio y Javi gracias por tener siempre una oreja y por acompañarme todo este tiempo!

Es probable que me esté olvidando de alguien. En el caso que así fuera, sepan que todo aquel que estuvo conmigo y me acompañó durante estos años, puso un grano de arena para que este proyecto de 5 años terminara de la mejor forma! A todos y a cada uno de uds le estoy inmensamente agradecido. Gracias a todos,¡¡¡los quiero!!!