



Universitat de Lleida

Departamento de Medicina Experimental

Trabajo final de tesis para optar al grado de Doctor

# Análisis de la señalización por Ret: Caracterización de la cascada molecular B-Raf/IKKs y Regulación de Ret por Sprouty1.

Esteban Javier Rozen

Director: Mario Encinas Martín

Abril de 2009



Índice	I
Agradecimientos	V
Resúmenes	VII
Abreviaturas	XIII
Introducción.	1
1 Los Ligandos de la Familia de GDNF.	3
2 El receptor Ret.	5
2.1 Estructura de Ret.	6
2.2 Mecanismos de activación de Ret.	8
2.3 Patologías asociadas a GDNF/Ret.	12
2.3.1 Ret en Cáncer.	12
2.3.1.a Ret en Carcinoma Papilar de la Glándula Tiroidea.	12
2.3.1.b Carcinoma Medular de Tiroides.	13
2.3.2 Mutaciones inactivadas de Ret. Enfermedad de Hirschsprung.	15
2.4 Eventos moleculares en la activación de Ret.	17
3 Significado Biológico de GFLs. Lecciones de modelos transgénicos.	19
3.1 Papel de Ret y GFLs durante el desarrollo del Sistema Nervioso.	21
3.1.1 Sistema Nervioso Periférico.	23
3.1.1.a Neuronas Simpáticas.	23
3.1.1.b Neuronas Parasimpáticas.	25
3.1.1.c Neuronas Entéricas.	26
3.1.1.d Neuronas Sensoriales Somáticas.	29
3.1.2 Sistema Nervioso Central.	31
3.1.2.a Neuronas Motoras.	31
3.1.2.b Neuronas Dopaminérgicas.	32
3.2 GDNF/Ret en el desarrollo del Sistema Génito-Urinario.	34
4 Vías de transducción de señales mediadas por Ret.	37
4.1 Vía Erk/MAPK.	38
4.2 Vía PI3K/Akt.	40
4.3 Otras vías de señalización.	43
4.4 Señalización de GDNF/GFR $\alpha$ 1 independiente de Ret.	43
4.5 Activación de Ret por otros factores de crecimiento.	45
5 Regulación de la actividad de Ret.	45
5.1 Las proteínas de la familia de Sprouty.	47

5.1.1 Mecanismos de acción de Sprouty.	48
5.1.2 Sprouty como supresor de tumores.	53
6 Modelos de estudio y objetivos.	54
Objetivos	57
Materiales y Métodos.	63
1 Anticuerpos y Reactivos.	65
2 Animales.	66
2.1 Ratones knock-in para <i>RET</i> .	66
2.2 Ratones knock-out para <i>Sprouty1</i> .	67
3 Cultivos Celulares.	67
3.1 Medios de Cultivo.	67
3.2 Líneas.	68
3.3 Cultivos primarios.	68
3.3.1 Ensayos de supervivencia neuronal.	69
3.3.2 Ensayos de Inmunoprecipitación y Western Blot.	69
4 Transfección de células de mamíferos.	71
4.1 Fosfato Cálculo.	71
4.2 Mediada por vectores lentivirales.	71
5 Histología y tinciones por inmuno-fluorescencia.	73
5.1 Ganglio Cervical Superior.	73
5.2 Riñones.	73
5.3 Plexo entérico.	74
5.3.1 Inmuno-fluorescencia.	74
5.3.2 Tinción histoquímica para Acetilcolinesterasa.	75
6 RT-PCR.	75
Resultados.	77
1 Neuronas de ratones knock-in para Ret9 o Ret51 exhiben respuestas similares a GDNF respecto a ratones wild-type.	79
2 La activación de Akt y ERK1/2 se ve afectada de forma específica por la mutación de Tyr981, Tyr1015 o Tyr1062 de Ret9.	80
3 Sólo la mutación Tyr1062Phe -pero no Tyr981Phe o Tyr1015Phe- elimina la supervivencia mediada por GDNF en los cultivos primarios de neuronas.	83
4 La supervivencia neuronal dependiente de GDNF no requiere la señalización a través de la vía PI3K/Akt ni la activación de ERK1/2.	86
5 La vía PI3K/Akt promueve el crecimiento celular.	89

6 La supervivencia de neuronas simpáticas inducida por factores neurotróficos es mediada por B-Raf.	90
7 IKKs son moléculas efectoras diana de B-Raf en neuronas simpáticas.	93
8 IKKs son necesarias para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y GDNF.	96
9 B-Raf es un mediador clave para la supervivencia neuronal.	100
10 Sprouty1 no es requerido para la supervivencia -ni para la regulación de la vía ERK/MAPK- mediadas por GDNF en neuronas simpáticas.	101
11 La ausencia de <i>Sprouty1</i> no revierte los defectos en la supervivencia de neuronas simpáticas de ratones knock-in para <i>Y1062FRet9</i> .	105
12 La eliminación de <i>Sprouty1</i> no rescata los defectos de la inervación entérica de ratones knock-in para <i>Y1062FRet9</i> .	106
13 La ausencia de <i>Sprouty1</i> revierte los defectos del desarrollo renal característicos de ratones knock-in para la mutación <i>Y1062FRet9</i> .	110
14 La eliminación de <i>Sprouty1</i> retrasa la muerte post-natal temprana de ratones knock-in <i>Y1062FRet9</i> .	114
15 Sprouty1 interacciona físicamente con C-Raf e inhibe su activación.	114
Discusión	117
1 Ret y Supervivencia Neuronal.	119
1.1 Papel de Tyr981 y Tyr1015 en la función de Ret.	119
1.2 Tyr1062 de Ret media la supervivencia de Neuronas Simpáticas.	121
1.3 La vía PI3K en el metabolismo celular.	123
1.4 La vía B-Raf/IKKs es indispensable para la supervivencia de Neuronas.	124
2 Regulación de la actividad de Ret por Sprouty.	129
2.1 Papel de Sprouty1 en la regulación de Ret en Neuronas Simpáticas.	129
3 <i>Sprouty1</i> y <i>Tyr1062Ret9</i> .	131
3.1 Sistema Nervioso Simpático.	131
3.2 Sistema Nervioso Entérico.	132
3.3 Organogénesis Renal.	133
4 Sprouty interacciona con Raf.	136
Conclusiones	141
Bibliografía	145



## Agradecimientos

OK! Aquí comienza el show... la hora de los agradecimientos, dedicatorias y reflexiones varias que a uno le han quedado dando vueltas en torno a todo aquello que significa la tesis más allá de lo Científico/Académico. Como todos sabemos, esta parte de la tesis cumple una función humanizadora y social. Dicho de otra forma, es la única parte que mi madre (y muchas otras personas cercanas) comprenderá sin la necesidad de consultar un manual de Biología, Fisiología o cualquier otra -logía que corresponda. Además, esta sección de la memoria lleva implícita la presión de que será la parte más leída de esta tesis a lo largo de los años. En fin, lamento haberlo dejado para el final, y encontrarme en estos instantes poco inspirado y con la cabeza a punto estallar.... Intentaré ser justo y no olvidarme de nadie, pero lo veo complicado. De todas maneras, antes y después de esta tesis habrán agradecimientos personales, que a mi criterio son mucho más valiosos.

Comenzando por el principio (hace cerca de 5 años atrás, aún antes de venir), tengo que dar las gracias al Dr. Joan Comella, que fue quien me brindó la oportunidad y me proporcionó los medios económicos para poder comenzar mi tesis aquí. Al mismo tiempo, al Mario\*, el boss, futuro (mejor dicho reciente?) padre y gran compañero y director. También él me aceptó aún sin conocerme para ser su primer becario doctoral, apenas llegado de Saint Louis. Por todo lo que vino después sólo tengo palabras de gratitud, las que pretendo poder brindarle personalmente.

Ya una vez en Lleida, tantas caras nuevas que venían, que se iban, que pasaban.... para no liarnos (más de lo que ya vamos), enumeraré a las personas que entonces estaban en el lab, y con quienes tuve la suerte de compartir vivencias de las que se quedan en la memoria: Marta Lovera, Daniel Sanchís, Judit Herreros, Carles Cantí, Rosa Soler, Isabel Sánchez y, como no, La Roser : ) A todos ellos, muchas gracias por todo!! Luego, la lista de becarios (y afines), la más extensa e importante!! Empezando por los que se fueron, la Mari y el Miguel, la Yolanda, la Carme, Carlos y Marisa, El Petar, La Gordana, el Sera, la Sonia, la Cardús, el Antón,...y la lista continúa!!! Con todos ellos (con unos un poco más, con otros un poco menos) compartí, conviví, aprendí y pasé muy buenos ratos y experiencias, tanto dentro como fuera del Lab. Ahora, los que aún están en la lucha (cada vez quedamos menos!!!) y con los que más tiempo he compartido (sí, está bien...a los que más quiero también!!): Mónica, Arindam, Maya, Rosa, Nùria Bahí, Nùria Eritja\* (aka Nuri, aka Dr. Troncho/Gamba), Ji Sheng (chinito simpático), lo deivi\* (ex-“Mister-Becario-Ideal” y futuro “Mister-Postdoc-Ideal”; es envidia sana!!), la Anabel, la Dolors y las nuevas camadas que le traen aire fresco a este rancio laboratorio (es broma, no se lo tomen a mal!!): la Ana de Barna (aka la niña prodigio, futura “Miss-Becaria-Ideal-pero-més-maca”). Dicho esto, creo que debo pasar a rendir el merecido tributo a los restantes becarios de otros grupos con los que también he pasado excelentes momentos y algunos de los cuales han tenido (y aún tienen) un papel primordial en mi Lleidatan-experience. A las chicas del Grupo de Nefro (y ya que estamos al Valdi también!!): Eva, Montse, Sarita, Milica, Petya... quien se me queda? Para no olvidarme, también lo incluyo aquí al simpaticón del Manu. A todo el personal del Grupo de anatomía patológica, particularmente al Dr. Matías-Guiu, al Xavi Dolcet (tipo bueno, si los hay!!), a la Ana (Made in Madrid) –cuyos chistes son un componente indispensable para el día a día de la “chocolatera”-, a la Andrée (Supernanny) y porqué no, a las chicas del servicio de Histología, que tanto me ayudaron y enseñaron estos años!!! Saltamos la acera (más bien las aceras) y vamos rápidamente la Facultad de Medicina, hábitat natural de una especie poco conocida y de comportamiento extraño,

los otros becarios!!! (Sí bueno, igual que nosotros, pero los de allá son más raros!!). Suelen anidar en la primera planta, aunque se los ha observado formando reducidas colonias en la segunda y la tercera. De allí, el Dani\* (un crack, sin lugar a dudas!!!), la Mariona, la Alba, David y Nùria Brunet, Hugo, Ekaterina, Myriam, Stefka, Verónica, M<sup>a</sup> José, Armando, M<sup>a</sup> Alba, Siba, Marcel.lí, Neus, Rita, Marta, Sònia, Xènia, Jéssica, José... y los que me olvido (sorry!!)... a todos mis más sinceros agradecimientos!!!! Mareados??? Aún falta!! Porque todos esos becarios/técnicos tienen jefes, y debo confesar que con algunos de ellos también llegué a entablar buenas relaciones!! Por ello un saludo especial a la Carme Gallego, el Martí, al Eloi, a Manel y Reinald, a la Carme Espinet... uf!!! Se me estarán pasando unos cuantos, lo siento!!!

Ya a modo de formalidad, pero no por ello menos sincero, quiero agradecer a las autoridades y al personal en general de la UdL y del HUAV que siempre están allí, aunque no los veamos, para que las cosas funcionen como deben (todos somos humanos!!). Destaco entre ellos a Emeterio (el coach), al Manolo (el mister) y a Araceli, por su gran simpatía y excelente predisposición. Siguiendo esta línea, me gustaría dedicar una línea a la muchas veces infravalorada Lleida, que durante estos 4 años y medio me proporcionó todo aquello que pude haber necesitado o querido, y donde he pasado unos de los mejores años de mi vida (sin exagerar!!!).

Al Dr. Graeme Guy y a toda la barra del IMCB de Singapur (Martina y Marc, Rebecca y Arjuna, JinXi, Jan, Li Dan, Permeen, Daniel, Esther, Chye Yun y Soah Yee), por la mejor experiencia que me ha pasado en la vida!! La estancia temporal soñada!! Thank you all so much...!!!

Ahora sí, pasaré a brindar mis dedicatorias a todas las otras personas a las que debo tanto, tanto, tanto.... los que están un poquito más allá, y que a pesar de la distancia hacen que mi vida sea más alegre y feliz. Los que están en Mendoza (vaya uno a saber si aún andan por allí): familia y amigos, y los que están en Barcelona: Vero, Juan, Reales & Co., etc. A la family... no hay mucho que decir a través de este medio, pero a efectos oficiales: les debo todo!!! (realmente es así), esto es por y para Uds. (como ha sido todo lo anterior y como será todo lo que venga). A los amigos.... que les debo tanto!! Que si estoy aquí ahora es gracias a Uds., y que han estado en mis pensamientos cada día desde mi partida. Y que han sabido estar en momentos difíciles, a pesar del charco que hay de por medio. Y finalmente, a los de más acá!!! Juan, mi hermano, la mejor incorporación que el equipo podía pedir!! Qué suerte es que estés aquí!! Los Reales: Seba y Sil (y Branca?), los mejores amigos que he tenido, no porque quiera quedar bien, sino porque supieron demostrarlo cuando las cosas se pusieron feas, y además porque siempre están ahí para lo que sea.... Gracias!!! También a los amigos de la ciudad condal, Marta, Diego, Lilia, Dani, Oriol, Mari.... son unos cuantos más... a todos ellos, mis agradecimientos. Y para el final, me dejo, lo mejor!!!! A la Vero. Mi compañera. Has sido mi soporte incondicional, consejo, ayuda, diversión, cocinera, entrenadora, representante, niñera.... y muchas cosas más, a lo largo de tantos años. Muuuuuchas Gracias...te quiero!!! (ya me encargaré de agradecértelo como corresponde personalmente).

## Resumen

Ret es el Receptor Tirosina Quinasa (RTK) para los factores neurotróficos de la familia de GDNF, que median supervivencia, diferenciación, migración o crecimiento celulares, entre otros efectos biológicos, durante el desarrollo y la vida de los organismos superiores. El desarrollo de diversas subpoblaciones de neuronas derivadas de precursores de la Cresta Neural requieren la señalización mediada por estos y otros factores neurotróficos (como NGF) para proliferar, migrar, diferenciarse, sobrevivir y crecer durante la organogénesis embrionaria y/o tras el nacimiento. Los RTKs se encargan de transportar la información química de las neurotrofinas hacia el interior de la célula por medio de una variedad de rutas de señalización molecular, que ulteriormente desembocan en la modulación de la expresión de diversos genes en núcleo celular, dando lugar a efectos biológicos determinados. Así, hemos estudiado los efectos de la señalización de GDNF/Ret para la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo primario, obtenidas de diferentes líneas de ratones transgénicos que portaban mutaciones en residuos específicos de tirosina de Ret necesarios para la iniciación de las diferentes cascadas de transducción de señales. En particular, nos enfocamos en determinar qué vías de señalización eran necesarias y suficientes para el mantenimiento de nuestras neuronas simpáticas. Nuestros experimentos no sólo arrojaron luz sobre cuáles son las funciones de las diferentes cascadas de señalización activadas por Ret, sino que también nos permitieron establecer que la supervivencia de estas células, mediada por GDNF y por NGF, ocurre a través de un novedoso módulo de transducción nunca antes caracterizado, en el cual la activación de Tyr1062 de Ret (residuo necesario para la activación de las cascadas PI3K/Akt y Ras-ERK/MAPK) mediaría la viabilidad neuronal a través de la activación directa del complejo IKKs por B-Raf, en un proceso que es independiente tanto de la activación de MEKs/ERKs como de la vía PI3K/Akt.

Alternativamente, analizamos el papel de las proteínas de la familia de Sprouty, específicamente de Spry1, en la regulación de la actividad de Ret, tanto en el modelo de supervivencia de neuronas simpáticas, como en otros paradigmas en los que la relevancia de dichas proteínas se ha puesto de manifiesto anteriormente, como son el desarrollo de Sistema Nervioso Entérico y la organogénesis del tracto Génito-Urinario. Valiéndonos de un modelo *in vivo* con ratones nulos para el gen *Sprouty1*, desarrollamos una nueva línea de ratones doblemente mutantes, portando, además de

esta última modificación, el gen de Ret con la mutación Tyr1062Phe. En este contexto, pudimos determinar que tanto en el Sistema Nervioso Simpático como en el Entérico, la ausencia de Spry1 no tenía ningún efecto significativo. Más aún, dicha mutación no mostraba ninguna consecuencia sobre los defectos característicos de la mutación Tyr1062Phe en Ret en estos sistemas. No obstante, durante el desarrollo renal, las alteraciones fenotípicas de la mutación de Ret (agénesis o hipodisplasia renales) eran revertidas a un fenotipo normal por la eliminación concomitante de Spry1. Este sorprendente efecto nos permite hipotetizar que Sprouty1 es capaz de modular la actividad de Ret en ausencia de su Tyr1062, planteando nuevas posibles vías de señalización intracelular sobre las que Spry1 actuaría durante el desarrollo embrionario de los riñones.

## Summary

Ret is the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) for the neurotrophic factors from the GDNF family of ligands (GFLs), which mediate cellular survival, differentiation, migration or growth, among other biological effects, during development and life of superior organisms. The development of diverse subpopulations of neurons derived from precursors of the Neural Crest requires the signalling mediated by these and other neurotrophic factors (like NGF) for their proliferation, migration, differentiation, survival and growth during the embryonic organogenesis and/or after the birth. The RTKs transport the chemical information from neurotrophins towards the interior of the cell by means of a variety of molecular pathways, that later end by modulating the expression of diverse genes in the cellular nucleus, giving rise to determined biological effects. Thus, we have studied the effects of the signalling by GDNF/Ret for the survival of sympathetic neurons in primary culture, obtained from different lines of transgenic mice that carried mutations in specific tyrosine residues in Ret, which are necessary for the initiation of different transduction signals. Particularly, we focused in determining which signalling routes are required and sufficient for the maintenance of our sympathetic neurons. Our experiments not only clarified on which are the functions for the different signalling cascades activated by Ret, but also allowed us to establish that the GDNF- and NGF-induced survival of these cells takes place through a so far unknown transduction module, in which the activation of Ret's Tyr1062 (necessary for the activation of the PI3K/Akt and ERK/MAPK cascades) mediates neuronal viability through the direct activation of the IKKs complex by B-Raf, independently MEKs/ERKs and PI3K/Akt activation.

Alternatively, we analyzed the role that the Sprouty family of proteins play, specifically Spry1, in the regulation of Ret, as much in the model of survival of sympathetic neurons, like in other paradigms in which the relevance of these proteins has been shown previously, as it is the case for the development of the Enteric Nervous System and the organogenesis of the Genito-Urinary Tract. By taking advantage of an *in vivo* model of null-mice for the *Sprouty1* gene, we developed new line of doubly mutant mice, carrying, in addition to this mentioned modification, a Tyr1062Phe mutation in *Ret*. In this context, we determined that either in the Sympathetic or in the Enteric Nervous Systems, the absence of Spry1 did not show any significant effect.

Moreover, this mutation did not show any consequence on the characteristic defects of the Tyr1062Phe mutation in Ret for both systems. However, during the renal development, the phenotypic alterations due to Ret mutation (renal agenesis or hypodisplasia) were reverted to a normal phenotype by the concomitant elimination of Spry1. This surprising effect allowed us to hypothesize that Sprouty1 is able to modulate the activity of Ret in absence of its Tyr1062, rising new possible signalling routes on which Spry1 could act during the embryonic development of kidneys.

## Resum

Ret és el Receptor Tirosina Quinasa (RTK) per als factors neurotròfics de la família de GDNF, que promouen supervivència, diferenciació, migració o creixement cel·lulars, entre altres efectes biològics, durant el desenvolupament i la vida dels organismes superiors. El desenvolupament de diverses subpoblacions de neurones derivades de precursors de la Cresta Neural requereixen la senyalització induïda per aquests i altres factors neurotròfics (com NGF) per a proliferar, migrar, diferenciar-se, sobreviure i créixer durant la organogènesis embrionària i/o després del naixement. Els RTKs s'encarreguen de transportar la informació química de les neurotrofines cap a l'interior de la cèl·lula per mitjà d'una varietat de rutes de senyalització molecular, que ulteriorment desemboquen en la modulació de l'expressió de diversos gens al nucli cel·lular, donant lloc a determinats efectes biològics. Així, hem estudiat els efectes de la senyalització de GDNF/Ret para la supervivència de neurones simpàtiques en cultiu primari, obtingudes de diferents línies de ratolins transgènics que portaven mutacions en residus específics de tirosina de Ret necessaris per a la iniciació de les diferents cascades de transducció de senyals. En particular, ens vam enfocar a esbrinar quines vies de senyalització eren necessàries i suficients per al manteniment de les nostres neurones simpàtiques. Els nostres experiments no només van llançar llum sobre quins són les funcions de les diferents cascades de senyalització activades per Ret, sinó que també ens van permetre establir que la supervivència d'aquestes cèl·lules, induïda per GDNF i per NGF, ocorre a través d'un nou mòdul de transducció mai abans caracteritzat, en el qual l'activació de Tyr1062 de Ret (residu necessari per a l'activació de les cascades PI3K/Akt i Ras-ERK/MAPK) promouria la viabilitat neuronal a través de l'activació directa del complex IKKs per B-Raf, en un procés que és independent tant de l'activació de MEKs/ERKs com de la via PI3K/Akt.

Alternativament, vam analitzar el paper de les proteïnes de la família de Sprouty, específicament de Spry1, en la regulació de l'activitat de Ret, tant en el model de supervivència de neurones simpàtiques, com en altres paradigmes en els quals la rellevància d'aquestes proteïnes ja s'ha posat de manifest anteriorment, com són el desenvolupament del Sistema Nerviós Entèric i l'organogènesi del tracte Gènito-Urinari. Valent-nos d'un model *in vivo* amb ratolins nuls per al gen Sprouty1, vam desenvolupar una nova línia de ratolins doblement mutantes, portant, a més d'aquesta

última modificació, el gen de Ret amb la mutació Tyr1062Phe. En aquest context, vam poder determinar que tant en el Sistema Nerviós Simpàtic com en el Entèric, l'absència de Spry1 no tenia cap efecte significatiu. Más encara, aquesta mutació no mostrava cap conseqüència sobre els defectes característics de la mutació Tyr1062Phe en Ret en aquests sistemes. No obstant això, durant el desenvolupament renal, les alteracions fenotípicas de la mutació de Ret (agènesis o hipodisplasia renal) eren revertits a un fenotip normal per l'eliminació concomitant de Spry1. Aquest sorprenent efecte ens permet hipotetitzar que Sprouty1 és capaç de modular l'activitat de Ret en absència de la seva Tyr1062, plantejant noves possibles vies de senyalització intracel·lular sobre les quals Spry1 actuaria durant el desenvolupament embrionari dels ronyons.

## Abreviaturas

ARTN: Artemina.  
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.  
CAKUT: Anomalías Congénitas del Riñón y el Tracto Génito-Urinario.  
cAMP: Adenosina-5'-monofosfato cíclica.  
CDNF: Conserved Dopamine Neurotrophic Factor.  
CNS: Sistema Nervioso Central.  
CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP.  
CRD: Dominio Rico en Cisteínas.  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico.  
Dominios PTB: Dominios de unión a fosfo-tirosinas.  
Dominios SH2: Dominios de homología a Src de tipo 2.  
ECM: Matriz Extracelular.  
EGFR: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.  
ENS: Sistema Nervioso Entérico.  
ERKs: Quinasas Reguladas Extracelularmente.  
FAK: Quinasa de Adhesión Focal.  
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos.  
GDP/GTP: Guanosina-5'-di/tri-fosfato.  
GDNF: Factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales.  
GFLs: Ligandos de la familia de GDNF.  
GFR $\alpha$ s: Receptores  $\alpha$  para ligandos de la familia de GDNF.  
GPI: Glicofosfatidilinositol.  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.  
HSCR: Enfermedad de Hirschsprung.  
IAPs: Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.  
LAR: leukocyte common antigen-related  
MAPKs: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos.  
MEN2A y MEN2B: Neoplasias endócrinas múltiples de tipo 2A y 2B.  
MTC: Carcinoma Medular de Tiroides.  
MM: Mesénquima Metanéfrico.  
NCAM: Molécula de Adhesión Celular Neural.  
NGF: Factor de Crecimiento Nervioso.  
NMJ: Unión Nueromuscular.  
NRTN: Neurturina.  
NS: Sistema Nervioso.  
PDGFR: Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.  
PI3K: Fosfoinositol 3-Quinasa.  
PKC: Proteína Quinasa C.  
PLC- $\gamma$ : Fosfolipasa C- $\gamma$ .  
PNS: Sistema Nervioso Periférico.  
PTC: Carcinoma Papilar de Tiroides.  
PSPN: Persefina.  
RBD: Dominio de unión a Raf.  
*RET*: Gen que codifica el RTK Ret (por RE-arranged during Transfection).  
RPTPJ: receptor-type protein tyrosine phosphatase J.  
RTK(s): Receptor(es) Tirosina Quinasa  
SCG: Ganglio Cervical Superior.

SFKs: Qinasas de la Familia de Src.  
SNS: Sistema Nervioso Simpático.  
SPRED: SProuTy-Related proteins with an EVH1 Domain.  
SRD: Dominio Rico en Serinas.  
TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ .  
TNF: Factor de necrosis tumoral.  
UB: Yema Uretérica.  
VEGFR: Receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular.  
WB: Técnica de Western blot o Inmunoblot.  
WD: Conducto Nefrogénico o de Wolff.

# Introducción



**E**l proto-oncogén *RET* codifica un receptor tirosina quinasa que se expresa principalmente en células derivadas de la cresta neural, las cuales actuarán como precursoras de diferentes sub-poblaciones de neuronas del Sistema Nervioso Periférico (PNS) y del Sistema Nervioso Central (CNS), así como también está implicado en la organogénesis del tracto génito-urinario (Avantaggiato, V. *et al.* 1994; Schuchardt, A. *et al.* 1994). Funcionalmente, la proteína Ret es el receptor para los Ligandos de la Familia del GDNF (GFLs), que incluye a 4 factores de crecimiento polipeptídicos: GDNF (Glial-cell-line Derived Neurotrophic Factor), NRTN (Neurturina), ARTN (Artemina) y PSPN (Persefina).

#### 1 Los Ligandos de la Familia del GDNF.

El GDNF fue purificado en 1993 como un factor de crecimiento capaz de promover la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo - aquellas que degeneran durante la enfermedad de Parkinson- tanto *in vitro* (Lin, L.F. *et al.* 1993) como *in vivo* (Stromberg, I. *et al.* 1993; Tomac, A. *et al.* 1995). Subsiguientemente, se demostró que GDNF era también un potente factor trófico para moto-neuronas espinales (Henderson, C.E. *et al.* 1994; Zurn, A.D. *et al.* 1994; Oppenheim, R.W. *et al.* 1995; Yan, Q. *et al.* 1995) y neuronas centrales noradrenérgicas (Arenas, E. *et al.* 1995). Asimismo, el GDNF induce la proliferación de neuroblastos y promueve la supervivencia y/o diferenciación de diferentes tipos de neuronas del Sistema Nervioso Periférico (PNS), entre las que se cuentan sub-poblaciones de neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y entéricas (Buj-Bello, A. *et al.* 1995; Ebendal, T. *et al.* 1995; Trupp, M. *et al.* 1995; Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Manie, S. *et al.* 2001; Airaksinen, M.S. *et al.* 2002). Fuera del sistema nervioso, el GDNF tiene importantes funciones en el desarrollo renal y en la maduración de las células madre espermatogénicas (Moore, M.W. *et al.* 1996; Pichel, J.G. *et al.* 1996; Sainio, K. *et al.* 1997; Sariola, H. *et al.* 1999; Meng, X. *et al.* 2000).

NRTN, ARTN y PSPN comparten propiedades similares con el GDNF en el mantenimiento de sub-poblaciones neuronales *in vitro*, con PSPN como excepción, ya que no es capaz de promover la supervivencia de neuronas periféricas (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Akerud, P. *et al.* 1999; Baloh, R.H. *et al.* 2000; Zihlmann, K.B. *et al.* 2005). No obstante, como veremos más adelante, el análisis *in vivo* de cada uno de estos ligandos y de sus respectivos receptores ha permitido discernir entre aquellas funciones que les son específicas de aquellas que son redundantes.

Ret transmite al interior de la célula las señales extracelulares de un complejo multimolecular al que se unen los Ligandos de la Familia del GDNF (GFLs). Así, la unión de los GFLs a Ret no es directa, sino mediada por las proteínas GFR $\alpha$ 1-4 (por GDNF-Family Receptor  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 4). De este modo, los GFR $\alpha$ s actúan como co-receptores para la unión de ligandos, pero no poseen dominios transmembrana ni intracelular, sino que están anclados a la superficie celular a través de una cadena de Glicosilfosfatidil-Inositol (GPI). De esta manera se ha estipulado que los GFR $\alpha$ s constituyen el componente “ $\alpha$ ” y Ret el componente “ $\beta$ ” del complejo multiproteico receptor para los GFLs (GFRalpha, N.C. 1997) (Fig. 1).

Puesto que inicialmente se caracterizaron sus formas oncogénicas constitutivamente activadas, Ret permaneció como un receptor huérfano por varios años, hasta que en 1996 varios grupos reportaron que el GDNF era su ligando fisiológico (Durbec, P. *et al.* 1996; Jing, S. *et al.* 1996; Treanor, J.J. *et al.* 1996; Trupp, M. *et al.* 1996; Vega, Q.C. *et al.* 1996). Desde entonces, los distintos miembros de la Familia de Ligandos del GDNF -GDNF, NRTN, PSPN y ARTN- fueron caracterizados como inductores de la actividad de Ret (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Saarma, M. *et al.* 1999; Baloh, R.H. *et al.* 2000; Saarma, M. 2000). Estructuralmente, los GFLs están íntimamente relacionados entre sí, a pesar de sólo compartir alrededor del 40% de identidad en la secuencia aminoacídica. Pertenecen a la Superfamilia del Factor de Crecimiento

Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Ibáñez, C.F. 1998). Están incluidos en la familia de proteínas “nudo de cisteína” (cystein knot) y actúan como homodímeros. El GDNF es sintetizado inicialmente como una típica proteína de secreción, bajo una forma precursora inactiva de 211 aminoácidos, el pre-proGDNF. El proGDNF secretado es entonces escindido proteolíticamente por una proteasa aún no identificada para dar lugar al producto activo de 134 residuos, el GDNF (Saarma, M. *et al.* 1999). Aparentemente, los GFLs se unen a las cadenas laterales de heparán-sulfato de los proteoglucanos de la Matriz Extracelular (ECM) (Hamilton, J.F. *et al.* 2001; Airaksinen, M.S. *et al.* 2002). Como ya se mencionó, la unión de alta afinidad del GDNF a Ret es mediada por GFR $\alpha$ 1 (Jing, S. *et al.* 1996; Treanor, J.J. *et al.* 1996). Por especificidad de unión, los ligandos para los distintos co-receptores GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3, GFR $\alpha$ 4 son GDNF, NRTN, ARTN y PSPN, respectivamente (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Saarma, M. *et al.* 1999; Baloh, R.H. *et al.* 2000b), no obstante, se han observado posibles interacciones cruzadas en modelos *in vitro* (Baloh, R.H. *et al.* 1997; Jing, S. *et al.* 1997; Saarma, M. 2000) (Fig. 1). GFR $\alpha$ 4 de mamíferos sólo reconoce a PSPN y su estructura es significativamente diferente de los restantes miembros (Lindahl, M. *et al.* 2001). Se especula que los mecanismos moleculares de señalización inducidos por los GFLs deben ser comunes, puesto que todos los GFR $\alpha$ s se unen y activan al mismo RTK, e inducen la fosforilación coordinada de los mismos residuos tirosina de Ret con cinéticas similares (Coulpier, M. *et al.* 2002). Sin embargo, cada miembro de la familia GFR $\alpha$  posee un patrón de expresión único, que es dependiente del estado de desarrollo, así como también específico del tejido o tipo celular de que se trate, lo cual sugiere que desempeñan papeles especializados en la activación de Ret en cada contexto celular (Baloh, R.H. *et al.* 2000).

## 2 El receptor Ret.

En 1985, el gen *RET* fue identificado como un nuevo oncogén durante la transfección de células NIH 3T3 con DNA aislado de linfoma de células T

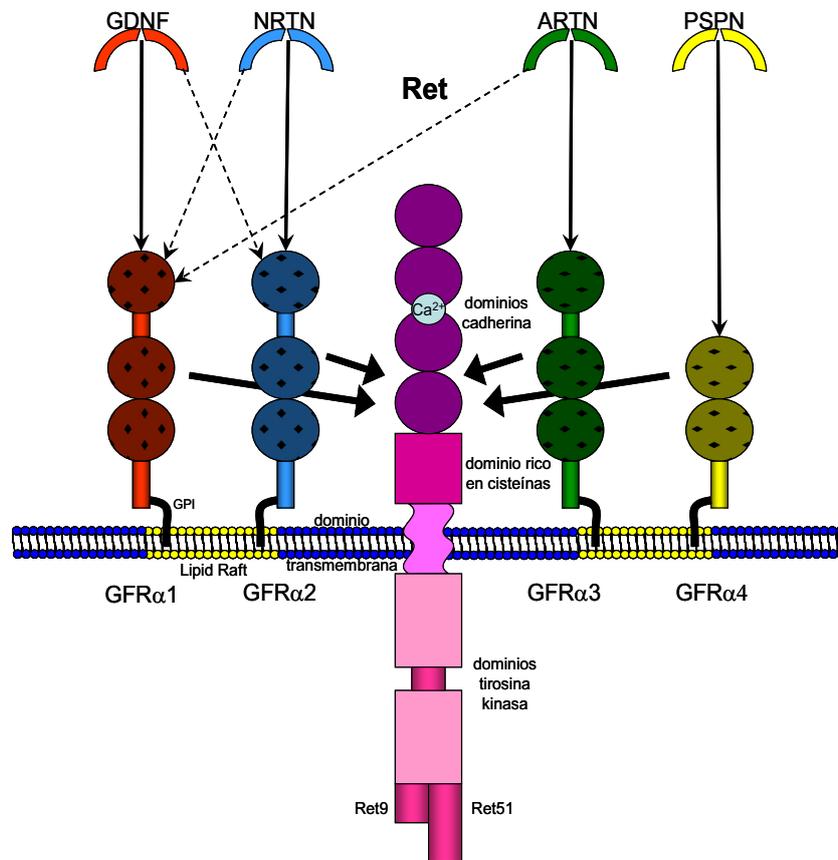
humanas. El gen transformante resultaba de la recombinación entre dos secuencias de DNA no relacionadas, proceso que ocurría durante la transfección, motivo por el cual se lo denominó "REarranged during Transfection" -*RET*- (REorganizado durante la Transfección) (Takahashi, M. *et al.* 1985). La relevancia clínica de *RET* se vio aumentada posteriormente, cuando se demostró que ciertas mutaciones en este gen eran las responsables de dos desórdenes hereditarios conocidos: las Neoplasias Endocrinas Múltiples de tipo 2 (MEN 2A y MEN 2B) y la Enfermedad de Hirschsprung o Aganglioneurosis Intestinal Congénita (Jhiang, S.M. 2000). Desde entonces, la investigación sobre Ret ha proporcionado valiosos datos sobre las interacciones moleculares que dan origen al Sistema Nervioso y al Riñón, y ha esclarecido los eventos genéticos involucrados en el desarrollo de ciertos cánceres, malformaciones congénitas y otras patologías.

En humanos, el gen *RET* se encuentra en la banda cromosómica 10q11.2 y comprende 21 exones (Ishizaka, Y. *et al.* 1989). Se han identificado genes homólogos de *RET* en vertebrados superiores, inferiores y *Drosophila melanogaster* (Hahn, M. *et al.* 2001).

## 2.1 Estructura de Ret.

Ret es un RTK transmembranal cuya estructura comprende tres dominios: 1) un dominio extracelular de unión al ligando, el cual incluye cuatro repeticiones de tipo cadherina y un Dominio Rico en Cisteínas (CRD); 2) un dominio hidrofóbico transmembranal; 3) una porción citoplasmática que incluye un dominio (separado en dos regiones) encargado de su actividad tirosina quinasa (Takahashi, M. *et al.* 1987; Takahashi, M. *et al.* 1988; Takahashi, M. *et al.* 1989; Tahira, T. *et al.* 1990; Takahashi, M. *et al.* 1991; Iwamoto, T. *et al.* 1993; Takahashi, M. *et al.* 1993; Myers, S.M. *et al.* 1995; Ponder, B.A. 1999; Carter, M.T. *et al.* 2001) (Fig. 1). Por último, es necesario destacar que el dominio extracelular de Ret contiene varios sitios de glicosilación (Takahashi, M. *et al.*

1991). La forma totalmente glicosilada de 170 kDa es la versión madura de Ret que encontramos en la membrana celular, mientras que la forma de 150 kDa es un intermediario inmaduro que carece de glicosilación y que se encuentra exclusivamente en el Retículo Endoplásmico (Takahashi, M. *et al.* 1993).



**Fig. 1 Estructura e interacciones de GFLs y sus receptores.**

Esquema de la estructura de Ret mostrando los 4 dominios de tipo cadherina extracelulares, el dominio rico en cisteínas (CRD), la región transmembrana y las dos regiones intracelulares que conforman el dominio tirosina kinasa. Se indican las dos posibles variantes de "splicing" alternativo, Ret9 y Ret51 (modificado de Arighi, E. *et al.* 2005). Homodímeros de cada GFL activan a Ret uniéndose previamente a su correspondiente co-receptor GFR $\alpha$ . Cada flecha continua indica la interacción GFL-GFR $\alpha$  preferente *in vivo*, mientras que las flechas discontinuas indican interacciones cruzadas putativas, de menor afinidad. GFR $\alpha$ s están asociados a los Lipid Rafts (en amarillo) de la membrana plasmática mediante una cadena de GPI. GFLs se unen principalmente al segundo dominio globular de su respectivo GFR $\alpha$ , el cual también es crucial para la interacción con Ret (Scott, R.P. *et al.* 2001). GFLs: Ligandos de la Familia de GDNF. GFR $\alpha$ 1-4: co-receptores  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 4 para GFLs; GPI: Glicofosfatidilinositol; NRTN: neurturina, ARTN: artemina; PSPN: persefina (modificado de Airaksinen, M.S. *et al.* 2002).

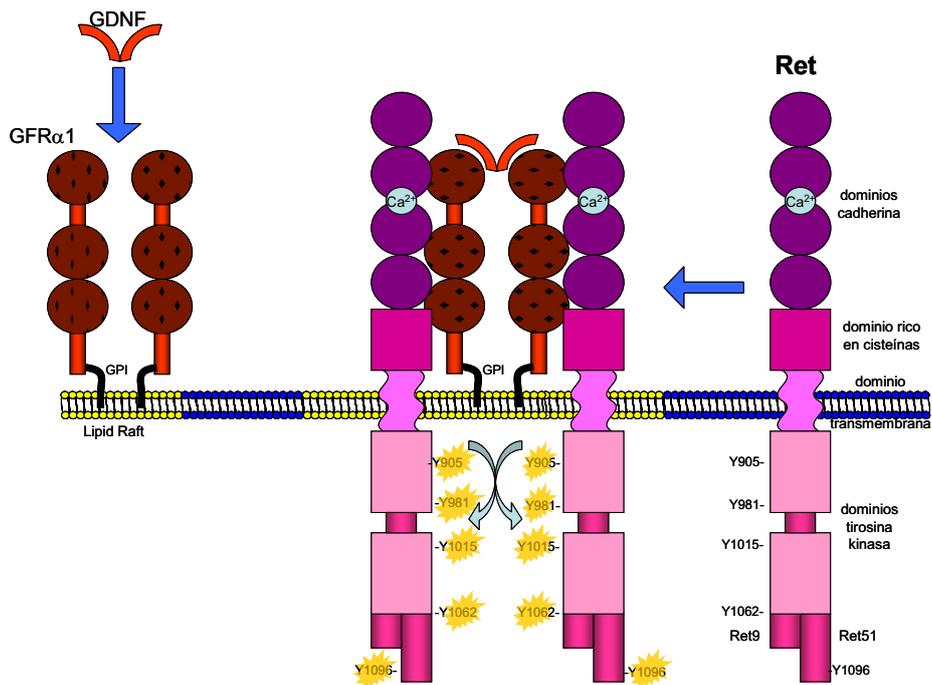
Por mecanismos de “splicing” alternativo (corte y empalme del transcrito primario) de *RET* se generan al menos 3 isoformas (Tahira, T. *et al.* 1990; Myers, S.M. *et al.* 1995) de idéntica secuencia desde el primer aminoácido hasta el residuo en posición 1063. A partir de éste, la isoforma larga (1114 aminoácidos) posee un segmento único de 51 residuos en su extremo C-terminal (por ello denominada Ret51), que es reemplazado por otras secuencias únicas de 43 y de 9 residuos en las isoformas intermedia (Ret43) y corta (Ret9), respectivamente (Hansford, J.R. *et al.* 2000). De ellas, Ret51 y Ret9 son las isoformas principales y se encuentran altamente conservadas entre las especies (Carter, M.T. *et al.* 2001).

## 2.2 Mecanismos de activación de Ret.

Como ya se mencionó, Ret es incapaz de unir GDNF por si mismo, pero sí lo hace al complejo formado por GDNF y  $GFR\alpha 1$  (Jing, S. *et al.* 1996; Treanor, J.J. *et al.* 1996). Inicialmente, el ligando, en forma de homodímero, da lugar a la formación de un complejo de alta afinidad con un homodímero de su correspondiente  $GFR\alpha$ , los que debido a su “ancla” de GPI, se encuentran localizados en los micro-dominios de la membrana plasmática llamados Lipid Rafts. Este conjunto tetramérico recluta entonces a dos moléculas de Ret, que al juntarse sufren el proceso de auto-fosforilación cruzada en residuos tirosina específicos de su dominio intracelular, iniciando así las cascadas de señalización hacia el núcleo celular (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Sariola, H. *et al.* 2003) (Fig. 2). Los Lipid Rafts son micro-dominios especiales de la membrana plasmática (Nota: la traducción literal para la acepción correcta de “raft” según el diccionario Merriam-Webster sería “una masa cohesiva que flota”. En este contexto es incorrecto traducir “raft” por “balsa”), compuestos por esfingolípidos y colesterol, que se encuentran “empaquetados” formando plataformas móviles en el seno de la bicapa lipídica (Simons, K. *et al.* 1997; Ikonen, E. *et al.* 1998). Se ha sugerido que los Lipid Rafts funcionan como compartimientos de membrana altamente enriquecidos de parte de la maquinaria esencial de

señalización celular (Simons, K. *et al.* 2000), como proteínas con cadenas GPI (GFR $\alpha$ s), las unidas a colesterol, aquellas doblemente aciladas (Src Family Kinases), proteínas palmitoiladas y algunas transmembranales (Poteryaev, D. *et al.* 1999).

Numerosas evidencias experimentales apoyan dos modelos para la activación de Ret: de acuerdo con el primero, en ausencia de estímulo, Ret estaría localizado fuera de los micro-dominios y sólo cuando el GDNF se une a GFR $\alpha$ 1, que se encuentra en los Lipid Rafts, Ret sería “arrastrado” hacia los mismos, donde dimerizaría y, en consecuencia, se activaría (señalización en *cis*) (Jing, S. *et al.* 1996; Treanor, J.J. *et al.* 1996; Eketjall, S. *et al.* 1999) (Fig. 2).



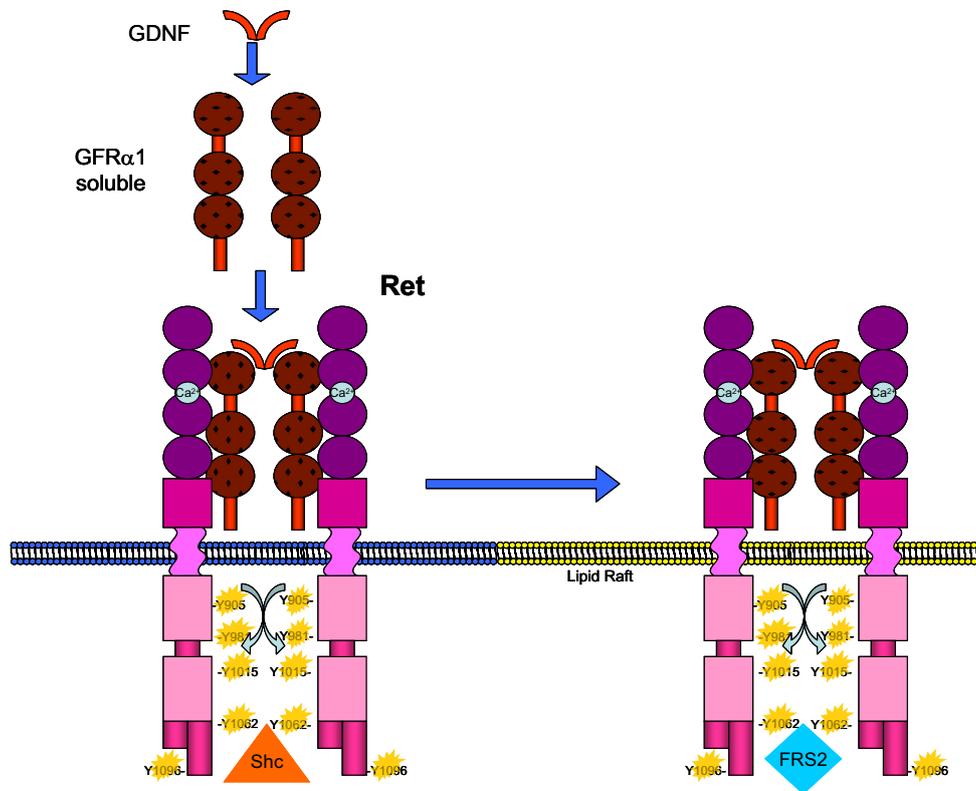
**Fig. 2 Modelo esquemático de la activación en *cis* para la señalización por Ret.**

En este modelo, dímeros de GDNF se unen con gran afinidad a dímeros de GFR $\alpha$ 1, localizados en los Lipid Rafts. A continuación, dos moléculas de Ret son reclutadas hacia estos, las que al juntarse, se autofosforilan cruzadamente en residuos clave, y dan así inicio a las diversas cascadas de señalización intracelular (modificado de Arighi, E. *et al.* 2005).

Milbrandt, Johnson y sus colaboradores (Tansey, M.G. *et al.* 2000), observaron que inhibiendo la re-localización de Ret hacia dichos dominios, se atenuaban profundamente sus efectos biológicos, como diferenciación y supervivencia neuronales, a pesar de que la fosforilación de Ret dependiente de GDNF no se veía afectada.

De acuerdo con el segundo mecanismo propuesto, los GFR $\alpha$ s, usualmente unidos a la superficie celular, pueden ser liberados por la acción de fosfolipasas o proteasas aún desconocidas, dando lugar a una forma soluble extracelular capaz de unirse a sus ligandos y, subsiguientemente, de activar a Ret (Jing, S. *et al.* 1996; Treanor, J.J. *et al.* 1996; Klein, R.D. *et al.* 1997; Yu, T. *et al.* 1998; Worley, D.S. *et al.* 2000) (Fig. 3). También es posible que se produzcan formas solubles de GFR $\alpha$ s -como mínimo, se han observado para GFR $\alpha$ 4- por splicing alternativo de sus transcritos primarios (Lindahl, M. *et al.* 2001). Asimismo, GFR $\alpha$ 1 soluble y biológicamente activo es liberado por neuronas, células de Schwann y en respuesta a daños en el Nervio Ciático (Worley, D.S. *et al.* 2000; Paratcha, G. *et al.* 2001). En su estado soluble, GFR $\alpha$ 1 podría capturar los GFLs que están unidos a la ECM y presentarlos a Ret en la membrana celular (señalización en *trans*) (Trupp, M. *et al.* 1997; Yu, T. *et al.* 1998). La activación de Ret en *trans* también re-localiza al receptor hacia los Lipid Rafts, incluso en ausencia total de GFR $\alpha$ 1 no soluble (es decir, anclado a la membrana), a través de un mecanismo aún desconocido. Esta activación es más lenta y sostenida que la activación en *cis*. (Paratcha, G. *et al.* 2001; Paratcha, G. *et al.* 2002; Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2002a).

De esta manera, podría ser que la activación de Ret ocurriera inicialmente fuera de los Lipid Rafts y que a continuación se trasladara hacia los mismos. La activación de Ret fuera de los Lipid Rafts ha sido relacionada con la señalización mediada por la molécula adaptadora Shc, mientras que en el contexto de los Lipid Rafts, se asocia preferentemente con FRS2 (Paratcha, G. *et al.* 2001) (Fig. 3).



**Fig. 3 Modelo esquemático de la activación en *trans* de la señalización por Ret.**

En este caso, los dímeros de GDNF se unen a moléculas solubles de GFR $\alpha$ 1, formando los complejos tetraméricos que ahora pueden interactuar y activar a Ret, tanto en el contexto de los Lipid Rafts como fuera de ellos. Nótese que cuando Ret es activado en los Lipid Rafts, FRS2 está implicado en mediar sus señales, mientras que fuera de dichos micro-dominios de membrana, su señalización es transducida por Shc (modificado de Arighi, E. *et al.* 2005).

Así, la activación de Ret en *cis* y en *trans* induce mecanismos moleculares con cinéticas diferentes, donde ambos podrían cooperar para obtener una señalización óptima en neuronas (Paratcha, G. *et al.* 2001). Con el objeto de esclarecer la relevancia de la señalización de Ret en *trans*, Enomoto y sus colaboradores diseñaron una línea de ratones transgénicos que sólo expresaban GRF $\alpha$ 1 en aquellas células que expresan Ret (señalización “todo-*cis*”), de manera que no se produjera señalización en *trans*. Este elegante modelo les permitió demostrar que tanto la señalización de GDNF/GFR $\alpha$ 1 vía Ret en *trans*, como aquella independiente de Ret, no son indispensables para la

organogénesis y la regeneración nerviosa *in vivo* (Enomoto, H. *et al.* 2004).

### 2.3 Patologías asociadas a GFLs/Ret.

#### 2.3.1 Ret en Cáncer.

##### 2.3.1.a Ret en Carcinoma Papilar de la Glándula Tiroidea.

Los tumores de tiroides son las enfermedades del sistema endocrino de mayor prevalencia. Entre ellos, el Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC) es la dolencia de tiroides más común. Las alteraciones genéticas más frecuentes en PTC son reordenamientos cromosómicos en el gen *RET*, variando geográficamente entre el 5% y el 70% de los casos (Pierotti, M.A. *et al.* 1996; Jhiang, S.M. 2000). Dichos reordenamientos originan la fusión del dominio tirosina quinasa de Ret con genes heterólogos, generando oncogenes quiméricos denominados *RET/PTC*. Hasta la fecha se han aislado 12 variantes quiméricas de PTCs esporádicos y asociados a radiaciones (Alberti, L. *et al.* 2003; Ichihara, M. *et al.* 2004; Santoro, M. *et al.* 2004). En cada caso, el dominio intracelular de Ret se fusiona a distintos genes activadores, resultando en su dimerización independiente de ligandos y por ende, la activación constitutiva de estas proteínas. En consecuencia, los reordenamientos *RET/PTC* activan el potencial transformante de Ret a través de distintos mecanismos (Santoro, M. *et al.* 2002). En primer lugar, la sustitución del promotor transcripcional de *RET* por aquellos de los genes con los que se fusiona, permite la expresión de la proteína quimérica en el epitelio folicular de la tiroides, donde normalmente *RET* está silenciado. En segundo lugar, las onco-proteínas quiméricas que se producen se encuentran constitutivamente activadas.

Paralelamente, se ha reportado recientemente otro reordenamiento cromosómico en varios PTCs que resulta en la activación constitutiva de la quinasa de serina/treonina B-Raf (Ciampi, R. *et al.* 2005). La proteína de fusión

generada presenta una actividad quinasa constitutiva, capaz de transmitir señales mitogénicas a través de la vía ERK/MAPK. La activación de B-Raf ejerce un papel preponderante en la carcinogénesis de PTCs esporádicos. De hecho, cerca del 40% de PTCs en individuos adultos portan la mutación puntual Val600Glu en B-Raf (Kimura, E.T. *et al.* 2003; Xu, X. *et al.* 2003; Puxeddu, E. *et al.* 2004), que lo activa de forma constitutiva (Dibb, N.J. *et al.* 2004). De esta manera, los PTCs esporádicos se asocian preferentemente con mutaciones puntuales de *B-RAF* más que con reordenamientos cromosómicos.

### 2.3.1.b Carcinoma Medular de Tiroides.

El Carcinoma Medular de Tiroides (MTC) es un tumor maligno originado en las células C (parafoliculares) secretoras de calcitonina de la Glándula Tiroidea. El 75% de los casos de MTCs son esporádicos, mientras que el 25% restante se incluyen dentro de los síndromes de cáncer familiar MEN 2 (Neoplasias Endocrinas Múltiples de tipo 2) (Goodfellow, P.J. *et al.* 1995; DeLellis, R.A. 1995a; Sherman, S.I. 2003). Las neoplasias MEN 2 se dividen en 3 variantes clínicas diferentes: MEN 2A, MEN 2B y FMTC (por MTC Familiar), todos ellos heredados de forma autosómica dominante (Brandi, M.L. *et al.* 2001). El fenotipo MEN 2 varía en la agresividad y el espectro de órganos afectados. Una característica en común es la hiperplasia de células C de la tiroides previa al desarrollo de MTC. MEN 2A constituye más del 75% de casos de MEN 2 y se caracteriza por MTC, Feocromocitoma en un 50% de casos e hiperplasia de la paratiroides o adenoma en 20-30% de los mismos (Eng, C. *et al.* 1996). MEN 2B es la variante más agresiva y se caracteriza por un inicio de MTC en edades tempranas, asociada con Feocromocitoma (alrededor del 50% de casos) y menos frecuentemente, con anomalías en el desarrollo, que incluyen neuromas de la mucosa, ganglioneuromatosis intestinal y anomalías oculares y esqueléticas. FMTC se caracteriza por la sola presencia de MTC en al menos cuatro miembros de una misma familia. Se le considera el menos agresivo de los tres subtipos de MEN 2.

Ret fue caracterizado como el principal gen de susceptibilidad hacia los síndromes MEN 2 (Donis-Keller, H. *et al.* 1993; Mulligan, L.M. *et al.* 1993; Eng, C. *et al.* 1994; Hofstra, R.M. *et al.* 1994; Carlson, K.M. *et al.* 1994a). MEN 2 surge como resultado de mutaciones activadoras en el gen *RET*. Así, mutaciones puntuales de *RET* en la línea germinal son las responsables de todos los síndromes de cáncer autosómico dominante MEN 2 (Pasini, B. *et al.* 1996). Dichas mutaciones se incluyen dentro de dos grupos principales: aquellas que afectan el dominio extracelular de Ret y otras que involucran a su dominio tirosina quinasa. Las mutaciones MEN 2A causan la sustitución de cisteínas extracelulares en los codones 609, 611, 618, 620 (del exón 10), 630 o 634 (del exón 11). La mayoría de pacientes con MEN 2A poseen la mutación de Cys634, la cual es altamente predictiva sobre el riesgo de desarrollo de hiperplasia de paratiroides y feocromocitoma. Las mutaciones FMTC son similares a aquellas que causan MEN 2A, pero están distribuidas más homogéneamente entre las cisteínas 609, 618 y 620. MEN 2B es causado por las mutaciones altamente específicas Met918Thr (95%) y Ala883Phe (<5%) (Carlson, K.M. *et al.* 1994a; Smith, D.P. *et al.* 1997).

Todas estas mutaciones puntuales de Ret tienen un efecto de ganancia de función. El mecanismo molecular para la activación de moléculas de Ret que portan mutaciones en residuos de cisteína del dominio extracelular es la dimerización constitutiva (Asai, N. *et al.* 1995; Borrello, M.G. *et al.* 1995; Santoro, M. *et al.* 1995). Normalmente, estos residuos formarían puentes disulfuro intramoleculares, de tal manera que la mutación resulta en el desapareamiento de una cisteína, que puede ahora establecer interacciones intermoleculares con otra molécula de Ret que posea la misma mutación. Cada una de estas mutaciones está asociada a disminuciones en la eficiencia de maduración y diferentes capacidades para inducir la dimerización, lo cual explicaría la agresividad del fenotipo que cada una ocasiona.

La mutación MEN 2B Met918Thr, además de causar cambios cuantitativos en la actividad quinasa de Ret, también produciría cambios cualitativos a nivel de las señales intracelulares que activa el receptor (Santoro, M. *et al.* 1995). Se ha sugerido que este residuo alteraría la selectividad de Ret por sus sustratos (Donis-Keller, H. *et al.* 1993; Songyang, Z. *et al.* 1995; Pandit, S.D. *et al.* 1996), lo que podría afectar tanto su patrón de auto-fosforilación como el de fosforilación de sus proteínas diana involucradas en la transducción de las señales (Santoro, M. *et al.* 1995; Yu, T. *et al.* 1998; Salvatore, D. *et al.* 2001). De esta forma, los mecanismos moleculares por los cuales Met918Thr altera la función de Ret son múltiples. Por un lado, ocasiona la activación de su función quinasa de manera independiente de ligando, pero al mismo tiempo, sin necesidad de que Ret forme dímeros. Por otro lado, altera la especificidad de los sustratos intracelulares de Ret. La combinación de estos procesos mediados por Ret-MEN 2B explicaría la mayor agresividad de esta mutación.

### 2.3.2 Mutaciones inactivadoras de Ret. Enfermedad de Hirschsprung.

La Enfermedad de Hirschsprung (HSCR, Online Mendelian Inheritance in Men OMIM 142623), o Aganglioneosis Intestinal Congénita, es un desorden relativamente común (uno de cada 5000 nacidos vivos), causado por defectos en la migración de los precursores de la cresta neural que resultan en deficiencias en la inervación entérica, obstrucción intestinal y constipación crónica (Parisi, M.A. *et al.* 2000). Esta patología se caracteriza por la ausencia de los plexos nerviosos mientéricos (o Plexos de Auerbach) y de los plexos nerviosos submucosos (o Plexos de Meissner) a lo largo de regiones de longitud variable del intestino. Las células de la cresta neural que contribuyen a la formación del Sistema Nervioso Entérico (ENS) se originan de las regiones vagal, troncal y sacra del tubo neural (Goyal, R.K. *et al.* 1996; Gershon, M.D. 1997; Taraviras, S. *et al.* 1999b). La colonización del intestino por precursores de la cresta neural requiere la coordinación de procesos que incluyen migración,

proliferación y diferenciación celulares, los cuales han de ser finamente regulados.

La mayoría de casos de HSRC son esporádicos, siendo sólo el 15-20% de los casos de tipo familiar, los cuales raramente se relacionan con fenómenos de herencia mendeliana simple (Amiel, J. *et al.* 2001). Las primeras mutaciones asociadas a HSRC que se caracterizaron fueron alteraciones en el gen *RET* (Romeo, G. *et al.* 1994). Las mutaciones con pérdida de función de Ret se relacionan con cerca del 50% de casos familiares y con el 15-35% de casos esporádicos (Angrist, M. *et al.* 1995; Attie, T. *et al.* 1995; Eng, C. 1996b; Brooks, A.S. *et al.* 2005). Numerosas evidencias apoyan el importante rol de la señalización de Ret en HSCR (ver más adelante).

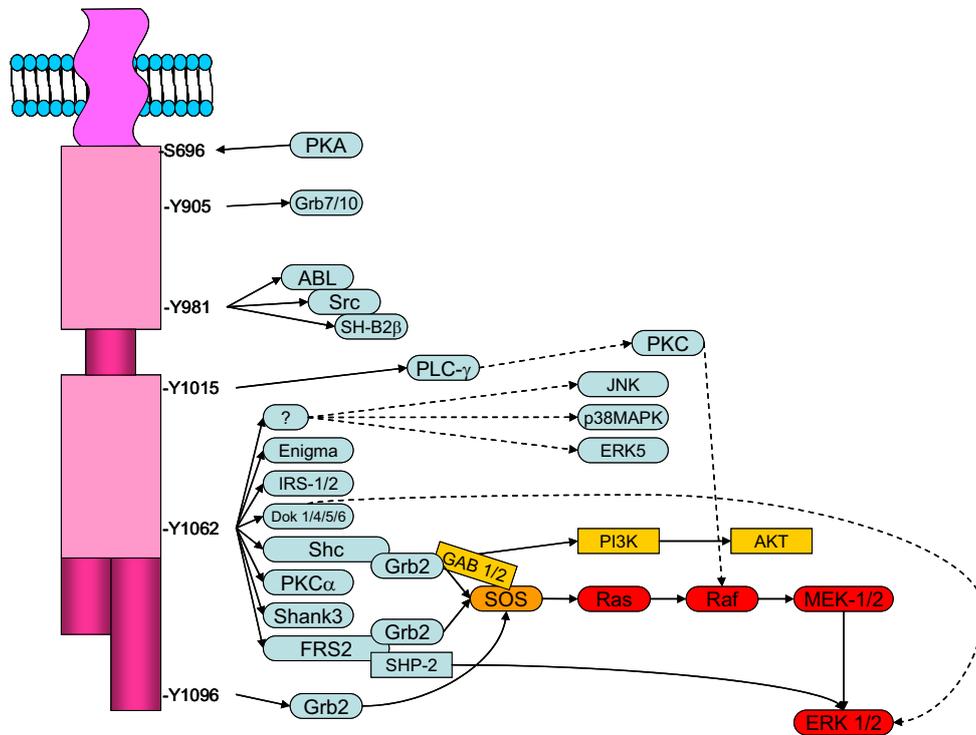
Las mutaciones de *RET* en HSCR se distribuyen a lo largo de toda la secuencia codificante e incluyen deleciones, inserciones, cambios en el marco de lectura, mutaciones sin sentido y de sentido equivocado (Eng, C. *et al.* 1997; Parisi, M.A. *et al.* 2000). La mayoría de dichas mutaciones causan, o bien una disminución en el dosaje de la proteína Ret, o pérdidas de la función de ésta (Parisi, M.A. *et al.* 2000; Iwashita, T. *et al.* 2001). Así, las consecuencias funcionales de las mutaciones HSCR se correlacionan con su posición en la secuencia codificante y han sido clasificadas en cuatro grupos (Pelet, A. *et al.* 1998; Iwashita, T. *et al.* 2001; Manie, S. *et al.* 2001). Las mutaciones de Clase I, en el dominio extra-citoplasmático, interrumpen la maduración de Ret e inhiben su translocación hacia la membrana plasmática (Carlomagno, F. *et al.* 1996; Iwashita, T. *et al.* 1996a). Las mutaciones de Clase II producen el remplazo en uno de cuatro residuos de cisteína del dominio extracelular (Cys609, 611, 618 o 620) por un aminoácido diferente. Estas mismas cisteínas también se encuentran mutadas en ciertos casos de MEN 2A y FMTC, e incluso ambas patologías pueden estar presentes simultáneamente (Mulligan, L.M. *et al.* 1994b). Se ha explicado el comportamiento dual para el caso de la Cys620: por un lado, dicha mutación activa a Ret constitutivamente debido a un fenómeno de

homodimerización por puentes disulfuro aberrantes; pero al mismo tiempo, los dímeros de Ret se vuelven incapaces de responder a GDNF (Eng, C. *et al.* 1997). La gran actividad de los dímeros de Ret mutados durante la embriogénesis sería suficiente para iniciar la hiperplasia de células C de la tiroides, pero bajo determinados contextos genéticos, la incapacidad de respuesta a ligandos resultaría en una incapacidad para dirigir la migración de los neuroblastos entéricos a lo largo de la pared intestinal. Las mutaciones de Clase III afectan al dominio tirosina quinasa, perturbando la actividad catalítica del receptor (Takahashi, M. *et al.* 1999; Iwashita, T. *et al.* 2001). Finalmente, las mutaciones de Clase IV no influyen en la actividad catalítica de Ret, pero sí interfieren de forma específica en la unión al receptor de diversas moléculas adaptadoras/efectoras implicadas en la señalización, como Shc, PLC- $\gamma$ , FRS2 o IRS-1 (Eng, C. *et al.* 1997; Lorenzo, M.J. *et al.* 1997; Geneste, O. *et al.* 1999; Melillo, R.M. *et al.* 2001; Melillo, R.M. *et al.* 2001b).

#### 2.4 Eventos moleculares en la activación de Ret.

Como se mencionó anteriormente, Ret activa diferentes cascadas de señalización intracelular que pueden regular funciones biológicas como supervivencia celular, diferenciación, proliferación, migración, quimiotaxis, morfogénesis, crecimiento de neuritas y/o plasticidad sináptica, según el tipo y contexto celular de que se trate. Dado que durante varios años Ret permaneció como un receptor huérfano, gran parte de la literatura inicial sobre su señalización se basa en estudios con formas oncogénicas y/o quiméricas del receptor. La estimulación de Ret por sus ligandos, al igual que en las variantes oncogénicas constitutivamente activas, origina un proceso de autofosforilación cruzada en residuos de tirosina específicos del dominio citoplasmático (Liu, X. *et al.* 1996; Xing, S. *et al.* 1998; Salvatore, D. *et al.* 2000; Coulpier, M. *et al.* 2002; Kawamoto, Y. *et al.* 2004). Existen 16 tirosinas en la parte intracelular de Ret<sub>9</sub> y 2 adicionales en Ret<sub>51</sub>. La autofosforilación de algunas de las mismas es indispensable para la señalización mediada por Ret. Se han identificado las

tirosinas Tyr905, Tyr981, Tyr1015, Tyr1062 y Tyr1096 -sólo presente en Ret51- como los sitios de unión para diferentes moléculas adaptadoras/ejecutoras que activarán, a su vez, toda una gama de vías de señalización intracelular y que, en última instancia, desencadenarán los efectos biológicos citados (Fig. 4). Así, Grb7/Grb10 se unen a Tyr905 (Pandey, A. *et al.* 1995; Pandey, A. *et al.* 1996); Src, c-Abl y SH2-B1 $\beta$  interaccionan con Tyr981 (Encinas, M. *et al.* 2004; lavarone, C. *et al.* 2006; Zhang, Y. *et al.* 2006; Donatello, S. *et al.* 2007); Fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) lo hace con Tyr1015 (Borrello, M.G. *et al.* 1996), y Grb2 se une a Tyr1096 de Ret51 (Alberti, L. *et al.* 1998). Tyr1062 es un residuo de particular importancia, ya que actúa como un sitio de acoplamiento múltiple para diferentes moléculas de señalización, como Shc/Rai (Asai, N. *et al.* 1996; Arighi, E. *et al.* 1997; Lorenzo, M.J. *et al.* 1997; Ohiwa, M. *et al.* 1997; Pelicci, G. *et al.* 2002), FRS2 (Kurokawa, K. *et al.* 2001; Melillo, R.M. *et al.* 2001b), IRS-1/2 (Hennige, A.M. *et al.* 2000; Melillo, R.M. *et al.* 2001), Dok-1 (Murakami, H. *et al.* 2002), Dok-4/5 (Grimm, J. *et al.* 2001), Dok6 (Crowder, R.J. *et al.* 2004), Enigma (Durick, K. *et al.* 1996), PKC $\alpha$  (Andreozzi, F. *et al.* 2003) y Shank3 (Schuetz, G. *et al.* 2004). Tras la estimulación de Ret por los GFLs, como mínimo dos complejos de señalización se ensamblan en torno a Tyr1062, uno de los cuales lleva a la activación de la vía Ras/ERK/MAPK, mientras que el otro desemboca en la cascada PI3K/Akt (Besset, V. *et al.* 2000; Hayashi, H. *et al.* 2000) (Fig. 4). Las distintas señales originadas en Tyr1062 son cruciales para la mayoría de funciones biológicas en las que Ret está implicado (Jijiwa, M. *et al.* 2004), así como para la actividad transformante de sus variantes oncogénicas (Asai, N. *et al.* 1996; Mercuri, E. *et al.* 2001; Degl'Innocenti, D. *et al.* 2004). En variantes oncogénicas de Ret también se fosforilan Tyr687, Tyr826 y Tyr1029, pero se desconoce actualmente el papel que desempeñan en la señalización (Liu, X. *et al.* 1996). Utilizando técnicas de espectrometría de masas, también se han identificado Tyr806, Tyr809, Tyr900 y Tyr1090 como posibles sitios de autofosforilación (Kawamoto, Y. *et al.* 2004).



**Fig. 4 Mecanismos de señalización intracelular inducidos por GDNF/Ret.** Esquema de las proteínas adaptadoras y efectoras que se unen a los residuos del dominio intracelular de Ret críticos para su señalización, y de las principales cascadas moleculares que éstas desencadenan. La unión de PKCα a Tyr1062 es probablemente indirecta. Enigma y Shank3 se unen específicamente a Tyr1062 de la isoforma Ret9 (modificado de Arighi, E. *et al.* 2005 y de Ichihara, M. *et al.* 2004).

Asimismo, en variantes constitutivamente activas de Ret, Tyr752 y Tyr928 actuarían como sitios de unión para STAT3 (Schuringa, J.J. *et al.* 2001). Finalmente, se ha observado que PDK1 y STAT1 son fosforiladas y activadas por la forma oncogénica RET/PTC (Kim, D.W. *et al.* 2003; Hwang, E.S. *et al.* 2004), pero se ignora cuáles serían los residuos de Ret implicados en la promoción de tal efecto.

### 3 Significado Biológico de los GFLs. Lecciones de modelos transgénicos.

Las diferentes evidencias sobre la relevancia biológica de Ret, GFLs y  $GFR\alpha$ s provienen principalmente de los estudios realizados en modelos de ratones transgénicos con mutaciones en los genes que codifican éstas y otras proteínas implicadas en sus vías de señalización (Tabla 1). El sistema GDNF/Ret desempeña un papel crítico en el desarrollo del Sistema Nervioso Entérico (ENS) y del Riñón, como se ha determinado al comparar las grandes similitudes fenotípicas que comparten los ratones deficientes para *GDNF*, *GFR $\alpha$ 1* o *RET*. Todos ellos exhiben severos defectos en la inervación entérica del tracto gastro-intestinal y en la organogénesis del sistema génito-urinario (Schuchardt, A. *et al.* 1994; Moore, M.W. *et al.* 1996; Pichel, J.G. *et al.* 1996; Schuchardt, A. *et al.* 1996; Cacalano, G. *et al.* 1998; Enomoto, H. *et al.* 1998; Taraviras, S. *et al.* 1999). Asimismo, se ha demostrado la importancia de estos genes durante el desarrollo temprano del Sistema Nervioso Parasimpático (Marcos, C. *et al.* 1996; Enomoto, H. *et al.* 2000; Rossi, J. *et al.* 2000). Durante el desarrollo embrionario de vertebrados, Ret es expresado en el epitelio nefrogénico, en todos los linajes del PNS y en muchos núcleos del Sistema Nervioso Central, incluyendo neuronas catecolaminérgicas y motoras (Pachnis, V. *et al.* 1993; Avantaggiato, V. *et al.* 1994; Tsuzuki, T. *et al.* 1995; Durbec, P. *et al.* 1996; Trupp, M. *et al.* 1997; Bennett, D.L. *et al.* 1998; Young, H.M. *et al.* 1998). En el testículo, GDNF es secretado por las células de Sertoli, donde actúa de forma paracrina sobre una subpoblación de células madre espermatogénicas que expresan Ret y  $GFR\alpha$ 1. En éstas, GDNF es necesario para mantener el balance adecuado entre aquellas que se someterán al proceso de diferenciación y las que se mantendrán indiferenciadas (Meng, X. *et al.* 2000; Meng, X. *et al.* 2001). Dosis reducidas de GDNF llevan a una diferenciación exacerbada y la ulterior desaparición de células madre espermatogénicas, mientras que concentraciones aumentadas del factor conllevan una reducción en la diferenciación de células espermatogénicas y la consecuente acumulación de las mismas (Jain, S. *et al.* 2004).

**Tabla 1. Fenotipos de ratones nulos para los Ligandos de la Familia de GDNF y sus receptores.**  
Ver en el texto (adaptado de Airaksinen, M.S. *et al.* 2002).

Gen knockout	<i>RET</i>	<i>GDNF</i> o <i>GFR<math>\alpha</math>1</i>	<i>NRTN</i> o <i>GFR<math>\alpha</math>2</i>	<i>ARTN</i> o <i>GFR<math>\alpha</math>3</i>	<i>GFR<math>\alpha</math>4</i>
General	letal al nacer 32	letal al nacer 1	Pesudoptosis, fértiles; GFR $\alpha$ 2-/- retado de crecimiento 1	Ptosis, viables, fértiles 29	Viables, fértiles 31
Viscerosensorial	defectos de respiración	defectos de respiración 24 PG: 40% de pérdida neuronal	ND	ND	ND
Somatosensorial	DRG: NS 32	TG: defectos de mielinización del folículo de whisker DRG: menor tamaño del soma 49	DRG: menor tamaño del soma, pérdida de sensibilidad al calor 51	DRG: NS 29	ND
Simpático	SCG: defectos de migración e innervación, defectos menores en otros ganglios 34	SCG: pérdidas menores de neuronas 1	SCG: NS 1	SCG: defectos de migración e innervación 29 o menor proliferación 35, mueren hacia p60.	ND
Parasimpático	No SPG ni OG, menor nº y tamaño de neuronas SMG y otros ganglios 38	No SPG ni OG, menor nº y tamaño de neuronas SMG y otros ganglios 38,40	SPG: defectos de innerv. defectos de innerv. y tamaño del soma en otros ganglios 38,40	SMG: NS 29	ND
Entérico	Carecen de plexos entéricos por debajo del estómago 32	Carecen de plexos entéricos por debajo del estómago 2	Pérdida menor de fibras en el intestino delgado, menor motilidad 1	NS 29	ND
Motor	pérdidas neuronales en varios núcleos	pérdidas neuronales menores en varios núcleos 52,53	NS 53	ND	ND
Cerebro	SN: NS 32	SN: NS 1, defectos de aprendizaje en ratón adulto GDNF-/- 32	Defecto menor de transmisión sináptica en el hipocampo 71	NS 29	NS 31
Otros	Sin riñones 32, pérdida de células C tiroideas 30	Sin riñones 2, degeneración testicular en ratón adulto GDNF+/- 59	ND	ND	ND

DRG: Ganglios de la Raíz Dorsal; ND: No Determinado; NS: cambio No Significativo; OG: Ganglio Oíco; PG: Ganglio Petrosal; SCG: Ganglio Cervical Superior; SMG: Ganglio Submandibular; SPG: Ganglio Esfingo-Palatino; SN: Substancia Negra; TG: Ganglio Trigémino.

### 3.1 Papel de Ret y GFLs durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

Los GFLs desempeñan un papel crucial en el desarrollo y funcionamiento del Sistema Nervioso (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Airaksinen, M.S. *et al.* 2002). El GDNF fue identificado en 1993 como un factor secretado por una línea celular de glioma, y capaz de mantener la supervivencia de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas embrionarias en cultivo (Lin, L.F. *et al.* 1993), las mismas que degeneran en la enfermedad de Parkinson. Más tarde, se descubrió que poseen un potente efecto de supervivencia sobre neuronas motoras y otros subtipos neuronales de los Sistemas Nerviosos Central y Periférico (Henderson, C.E. *et al.* 1994; Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Airaksinen, M.S. *et al.* 2002). Adicionalmente a su efecto sobre la supervivencia, el GDNF también ejerce funciones esenciales en proliferación, migración y diferenciación de células

neuronales (Taraviras, S. *et al.* 1999; Young, H.M. *et al.* 2001; Airaksinen, M.S. *et al.* 2002; Natarajan, D. *et al.* 2002; Gianino, S. *et al.* 2003).

Ratones nulos para los genes de *RET*, *GDNF* o *GFR $\alpha$ 1* mueren durante las primeras horas tras el parto, mientras que aquellos en los que se han eliminado otros *GFLs* o *GFR $\alpha$ s* son viables y fértiles. La gran similitud entre los fenotipos de ratones knock-out para cada ligando y su respectivo co-receptor indican la asociación funcional entre cada factor y su correspondiente *GFR $\alpha$*  *in vivo* (Tabla 1). La gran mayoría de tejidos y células que se ven afectados en ratones nulos para *GFLs* o para *GFR $\alpha$ s* también expresan *Ret*, demostrando que es éste el principal receptor que media la señalización de los *GFLs* *in vivo*. De esta manera, todos los ratones knockout para los genes *RET*, *GDNF* o *GFR $\alpha$ 1* comparten un fenotipo caracterizado por agénesis renal y la ausencia de diferentes tipos de neuronas parasimpáticas y entéricas (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999). De manera similar, animales knock-out para *NRTN* o *GFR $\alpha$ 2* presentan alteraciones en la inervación entérica y parasimpática. Sin embargo, de estos últimos, sólo los ratones nulos para *GFR $\alpha$ 2* exhiben retardos en el crecimiento, probablemente debido a sus múltiples defectos de la inervación a lo largo del tracto digestivo. Esta discrepancia en el crecimiento entre ratones deficientes para *NRTN* y *GFR $\alpha$ 2* podría deberse al hecho de que, en ausencia *NRTN*, *GDNF* podría unirse de forma cruzada a *GFR $\alpha$ 2* y rescatar el fenotipo, aunque no se pueden descartar efectos debidos a diferencias en el contexto genético y/o en los hábitos alimenticios.

Curiosamente, a pesar de que ratones nulos para *GFR $\alpha$ 2* y aquellos para *GFR $\alpha$ 3*, comparten un fenotipo de Ptosis (párpados superiores caídos), las causas subyacentes en cada caso son completamente diferentes. Así, en ratones en los que se ha eliminado la expresión de *GFR $\alpha$ 2*, se observa una carencia de inervación parasimpática en la glándula lacrimal, mientras que en el caso de ratones knock-out para *GFR $\alpha$ 3* el mencionado fenotipo es causado por

una ausencia de inervación simpática en el músculo elevador del párpado (Nishino, J. *et al.* 1999). Por último, se ha visto que PSPN mantiene la supervivencia *in vitro* de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de embriones de rata, pero no así de ratón. Esta diferencia entre especies parece deberse a que en el sistema nervioso del ratón, el mRNA mensajero de  $GFR\alpha 4$  no se expresa (Lindahl, M. *et al.* 2000). Esto está de acuerdo con el hecho de que la ausencia de PSPN no conlleva ningún defecto significativo en el desarrollo del cerebro de estos ratones knock-out (Lindfors, P.H. *et al.* 2006).

Cada miembro de la familia de GDNF parece tener la capacidad de regular la expresión de su correspondiente  $GFR\alpha$ , puesto que en ratones nulos para *GDNF*, la expresión de  $GFR\alpha 1$  -pero no de  $GFR\alpha 2$  o Ret- en ganglios periféricos disminuye, mientras que en animales knock-out para NRTN, ocurre lo opuesto (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999). Curiosamente, este tipo de regulación podría ser independiente de la señalización por Ret, puesto que la expresión de  $GFR\alpha s$  en ratones nulos para RET no se encuentra alterada (Taraviras, S. *et al.* 1999).

### 3.1.1 Sistema Nervioso Periférico.

#### 3.1.1.a Neuronas Simpáticas.

Aunque los fenotipos de ratones nulos para *RET*, *GDNF* o *GFR $\alpha 1$*  son muy similares (Tabla 1), se pueden encontrar algunas diferencias. Inicialmente, se determinó que los ratones knock-out para *RET* carecen totalmente de Ganglios Cervicales Superiores (SCGs), en ratones knock-out para *GDNF* dichos ganglios sólo presentan una pérdida neuronal del 35%, mientras que en animales nulos para *GFR $\alpha 1$*  no hay una disminución significativa (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999; Baloh, R.H. *et al.* 2000). Esto estaría a favor de la hipótesis según la cual GDNF podría ejercer sus efectos a través de otro miembro de la familia de los  $GFR\alpha s$  (probablemente  $GFR\alpha 2$ ) y/o que otros factores de la

familia de GDNF podrían inducir la activación de Ret durante el desarrollo del SCG. Más tarde, se demostró que la eliminación de la expresión de *RET* no produce la desaparición propiamente dicha del SCG, sino que, en realidad, afecta su migración e invasión de órganos diana (Enomoto, H. *et al.* 2001). De esta manera, el análisis de ratones nulos para *GFR $\alpha$ 3* (Nishino, J. *et al.* 1999) y para *RET* (Enomoto, H. *et al.* 2001) ha revelado un papel crítico para la señalización del sistema ARTN/*GFR $\alpha$ 3*/Ret durante la migración de los precursores del SCG (Nishino, J. *et al.* 1999). Como ya dijimos, los ratones knock-out para *GFR $\alpha$ 3* presentan Ptosis (párpados superiores caídos) debida a una carencia de invasión simpática del músculo tarsal superior y, por lo tanto, tienen una verdadera incapacidad para mantener el párpado superior levantado. Esta falta de invasión simpática es causada por un serio defecto en el desarrollo del SCG. En estos ratones, las neuronas del SCG no migran correctamente durante el desarrollo embrionario, por lo que el ganglio se localiza en una posición más caudal de lo normal (Nishino, J. *et al.* 1999). En un comienzo, ARTN es un factor quimiotáctico producido de forma local en la vecindad de los ganglios simpáticos en desarrollo, y más tarde se expresa en vasos sanguíneos de gran calibre, a lo largo de los cuales los axones de dichas neuronas simpáticas irán creciendo hasta alcanzar sus órganos y tejidos diana. En estadios tardíos del desarrollo embrionario las neuronas simpáticas se vuelven independientes de ARTN a través de una regulación negativa de la expresión de *GFR $\alpha$ 3*, al tiempo que se vuelven dependientes de la señalización mediada por NGF, que comienza a ser secretado por los tejidos diana de la invasión. De esta manera, las neuronas simpáticas del SCG de ratones knock-out para *GFR $\alpha$ 3* aparentemente mueren debido a que sus axones no logran alcanzar sus dianas de invasión adecuadamente y, en consecuencia, no reciben el soporte trófico (NGF) de los mismos. Adicionalmente, se han identificado defectos menores en la migración e invasión de otros ganglios de la cadena simpática en embriones de ratones nulos para *ARTN*, para *GFR $\alpha$ 3* (Honma, Y. *et al.* 2002) o para *RET* (Enomoto, H. *et al.* 2001).

Todos estos resultados indican que durante el desarrollo de neuronas simpáticas la señalización quimiotáctica de ARTN/GFR $\alpha$ 3/Ret es necesaria para la migración y el crecimiento axonal de estas células. Asimismo, esta señalización podría tener una función relacionada con la supervivencia y proliferación de dichas neuronas antes de la adquisición de la dependencia por NGF (Andres, R. *et al.* 2001), aunque actualmente esta idea está bajo debate.

### 3.1.1.b Neuronas Parasimpáticas.

Las neuronas parasimpáticas post-ganglionares están situadas en pequeños ganglios muy cercanos o incluso dentro de sus tejidos diana. En la región lacrimal, se incluyen los ganglios ciliar, esfenopalatino, submandibular y ótico. En ratones knock-out para *RET*, *GFR $\alpha$ 1* o *GDNF* recién nacidos los ganglios esfenopalatino y ótico se encuentran ausentes, indicando que la señalización a través de este sistema es esencial para el desarrollo de estas neuronas parasimpáticas durante la embriogénesis (Enomoto, H. *et al.* 2000; Rossi, J. *et al.* 2000). De hecho, hacia el 12<sup>o</sup> día embrionario, estos ganglios ya han desaparecido y sus precursores neuronales exhiben defectos de migración y proliferación (Enomoto, H. *et al.* 2000). Los precursores parasimpáticos expresan Ret y GFR $\alpha$ 1, mientras que GDNF es secretado por los tejidos que los rodean durante su migración, por lo que la señalización por GDNF/GFR $\alpha$ 1/Ret es necesaria para la migración y proliferación de los precursores de neuronas parasimpáticas durante el desarrollo embrionario temprano. La expresión de GFR $\alpha$ 1 en neuronas parasimpáticas es regulada negativamente antes del nacimiento, pero continúan expresando Ret y GFR $\alpha$ 2, a medida que la producción de NRTN por parte de sus tejidos diana va aumentando (Enomoto, H. *et al.* 2000; Rossi, J. *et al.* 2000). Es interesante el hecho de que el único fenotipo macroscópicamente evidente de ratones knock-out para *GFR $\alpha$ 2* o *NRTN* también es Ptosis aparente, la cual a diferencia de la observada en ratones nulos para GFR $\alpha$ 3, es consecuencia de una total falta de inervación parasimpática de la glándula lacrimal (Heuckeroth, R.O. *et al.* 1999; Rossi, J. *et*

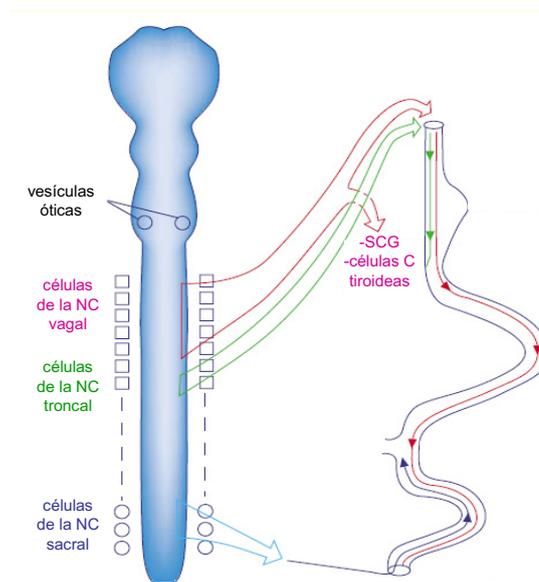
*al.* 1999). Más aún, en ambos tipos de ratones se observan también defectos de inervación parasimpática de la glándula submandibular y tienen pérdidas significativas en el número de neuronas del ganglio submandibular (Heuckeroth, R.O. *et al.* 1999; Rossi, J. *et al.* 1999). Análisis más detallados demuestran que ratones nulos para *NRTN* o para *GFR $\alpha$ 2* presentan defectos variables en la inervación parasimpática de todas las zonas examinadas. Así, la inervación de la glándula lacrimal que se origina del ganglio esfenopalatino, en estos animales se encuentra ausente, a pesar de que los cuerpos neuronales en dicho ganglio no se encuentran disminuidos en número (pero sí en tamaño). Por lo tanto, las funciones principales de *NRTN* en este ganglio parasimpático (y presumiblemente en otros) serían promover y guiar la inervación de tejidos diana y mantener el tamaño neuronal o estatus trófico. Alternativamente, se ha determinado recientemente que las fibras nerviosas parasimpáticas y células gliales que se localizan dentro y alrededor de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, expresan *GFR $\alpha$ 2*, mientras que la inervación parasimpática de dichos islotes en ratones nulos para *GFR $\alpha$ 2* se encuentra severamente reducida (Rossi, J. *et al.* 2005).

En resumen, parece claro que *GDNF* y *NRTN* poseen funciones distintas y secuenciales durante el desarrollo de neuronas parasimpáticas. Este cambio en el requerimiento de *GDNF* a *NRTN* también se ha observado en el sistema nervioso entérico (ENS), sugiriendo que el desarrollo embrionario de ambas poblaciones neuronales comparte mecanismos de señalización comunes.

### 3.1.1.c Neuronas Entéricas.

El sistema *GDNF/GFR $\alpha$ 1/Ret* también es fundamental para el desarrollo de todas las neuronas y células gliales entéricas que colonizarán el tracto digestivo desde el estómago hasta el colon (Moore, M.W. *et al.* 1996; Pichel, J.G. *et al.* 1996; Sanchez, M.P. *et al.* 1996; Cacalano, G. *et al.* 1998; Enomoto, H. *et al.* 1998). Las neuronas entéricas surgen principalmente desde los

precursores entéricos de la cresta neural vagal, que invaden la región anterior del intestino hacia el día embrionario 9.5 y desde allí van migrando distalmente a lo largo del mismo (Le Douarin, N.M. *et al.* 1974; Gershon, M.D. 1997) (Fig. 5). En ratones knock-out para *RET*, *GFR $\alpha$ 1* o *GDNF*, las neuronas y células gliales entéricas derivadas de la cresta neural vagal y sacra se encuentran ausentes desde el estómago en adelante (Manie, S. *et al.* 2001).



**Fig. 5 Diferentes sub-poblaciones de células derivadas de la NC que contribuyen al desarrollo del ENS.**

Las células de la NC que participan en la formación del ENS se originan de las regiones vagal, troncal y sacra del tubo neural. Las células vagales (en rojo) surgen de la porción dorsal entre las somitas 1 y 5, colonizan todo el intestino y dan origen al SCG y las células C de la tiroides. Por ello, constituyen el linaje simpato-enterico. Las células del tronco (en verde), surgen entre las somitas seis y siete, y colonizan la porción anterior del intestino y la cadena simpática posterior al SCG. Pertenecen al linaje simpato-adrenal y son independientes de *GDNF/Ret*. Finalmente, las células de la NC sacra (en azul) invaden la zona post-umbilical del intestino. NC: cresta neural; ENS: sistema nervioso entérico; SCG: ganglio cervical superior (modificado de Manie, S. *et al.* 2001).

El *GDNF* es expresado por las células mesenquimales del intestino para promover la migración, proliferación, supervivencia y diferenciación de las células precursoras entéricas derivadas de la cresta neural, que expresan *Ret* y *GFR $\alpha$ 1* (Taraviras, S. *et al.* 1999).

Tal como ocurre con otros precursores del sistema autónomo, se desconoce si todos estos efectos del *GDNF* son directos y cuál es su contribución relativa *in vivo*. Aparentemente, las células no neuronales del intestino producen *GFR $\alpha$ 1* soluble, el cual promovería el efecto proliferativo del *GDNF* sobre los precursores neuronales entéricos (Worley, D.S. *et al.* 2000).

Hacia estadios embrionarios tardíos, la producción de  $GFR\alpha 1$  soluble desaparece y la función del GDNF sobre las neuronas entéricas cambiaría desde una respuesta mitogénica a una trófica. Por otro lado, el grupo de Enomoto observó que la disrupción de la expresión de  $GFR\alpha 1$  en estadios tardíos del desarrollo del ENS, resultaba en una rápida y extendida muerte neuronal en el colon, llevando a un fenotipo de aganglionsis similar al observado en casos de Enfermedad de Hirschsprung (Uesaka, T. *et al.* 2007). En un interesante modelo, Natarajan y colaboradores observaron que cuando injertaban precursores entéricos de la cresta neural (Ret-positivos) en intestinos agangliónicos (nulos para *RET*) en cultivo, dichos injertos tenían la capacidad de colonizar el tracto digestivo en toda su extensión, confirmando que la eliminación de la expresión de *RET* tiene un efecto autónomo sobre las células de la cresta neural precursoras del ENS (Natarajan, D. *et al.* 1999). En un estudio reciente del mismo grupo, se ha determinado que si el injerto de dichos progenitores se realiza en puntos previos de la vía migratoria (entre el mesénquima de las somitas 2-4 y el tubo neural), las células precursoras sólo son capaces de colonizar la región más anterior del intestino, sugiriendo que la ausencia de Ret tendría un efecto no autónomo en las células de la cresta neural pre-entericas durante la invasión del intestino anterior (Bogni, S. *et al.* 2008).

Ratones nulos para NRTN presentan defectos en el ENS, incluyendo una reducción de la densidad nerviosa en el plexo mientérico y una menor movilidad gastro-intestinal (Heuckeroth, R.O. *et al.* 1999). Otro grupo determinó que en ratones nulos para  $GFR\alpha 2$  no se observaban pérdidas aparentes de neuronas entéricas. No obstante, estos ratones exhibían una disminución moderada -pero significativa- de plexos nerviosos mientéricos colinérgicos finos (que contienen sustancia P) en el intestino delgado, particularmente en el duodeno (Rossi, J. *et al.* 2003). Durante estadios del desarrollo embrionario tardío y post-natal temprano, NRTN se expresa en la capa muscular circular del intestino, mientras que las neuronas entéricas post-natales poseen  $GFR\alpha 2$  y Ret. Curiosamente, aunque en ratones knock-out para  $GFR\alpha 2$  la densidad de plexos mientéricos

sólo se encuentra levemente afectada, la secreción *in vitro* de sustancia P por el colon de animales nulos para *NRTN* se reduce de forma marcada. Esto implica que además de promover la inervación entérica, la señalización a través de *NRTN/GFR $\alpha$ 2* podría regular la liberación de neurotransmisores. Se debe destacar que la expresión de *GFR $\alpha$ 1* decae notablemente tras el parto, mientras que la de *GFR $\alpha$ 2* aumenta (Snider, W.D. *et al.* 1998; Pezeshki, G. *et al.* 2001; Stucky, C.L. *et al.* 2002; Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2002b). Por lo tanto, aunque la señalización a través de *GDNF/GFR $\alpha$ 1* es crucial durante los estadios iniciales del desarrollo del ENS (lo cual se refleja en el fenotipo), el sistema *NRTN/GFR $\alpha$ 2* parece tener un papel importante para dichas neuronas en el desarrollo y/o supervivencia en eventos posteriores al nacimiento.

#### 3.1.1.d Neuronas Sensoriales Somáticas.

Se ha observado que *in vitro*, los GFLs pueden mantener distintas subpoblaciones de neuronas sensoriales primarias, pero en cualquier caso sus implicaciones fisiológicas en este contexto continúan siendo desconocidas. Antes del nacimiento, muchas neuronas sensoriales del Ganglio Nodoso-Petroso requieren para su supervivencia la señalización de *GDNF* y *BDNF*, que son secretados desde los tejidos diana de su inervación (Erickson, J.T. *et al.* 2001). Dichas neuronas sensoriales viscerales inervan al cuerpo carotídeo participando en el control central de la respiración. Apoyando esta idea, los animales nulos para *RET* y *GDNF* presentan alteraciones respiratorias, mientras que mutaciones puntuales en estos genes han sido asociadas con el Síndrome de Hipoventilación Central Congénita o Síndrome de Ondine (Amiel, J. *et al.* 1998).

La mayoría de neuronas sensoriales de los Ganglios Raquídeos (DRGs) y del Ganglio Trigémino (TG) requieren *NGF* para sobrevivir durante el desarrollo embrionario. Al poco tiempo del parto, cerca de la mitad de estas células cambian la expresión de *TrkA* por la de *Ret* (Snider, W.D. *et al.* 1998). Estas

neuronas, que median la sensación de dolor y temperatura predominantemente en la piel, terminan en la región interna de la lamina II de la médula espinal.

Para analizar la influencia de la señalización de Ret sobre el desarrollo post-natal de las neuronas sensoriales, se generó una línea de ratones mutantes condicionales para eliminar la expresión de *RET* en células pre-migratorias de la cresta neural, que incluyen a las neuronas progenitoras de los DRGs (Luo, W. *et al.* 2007). En estos ratones, se observó que si bien Ret no es indispensable para la viabilidad de las neuronas del DRG *in vivo*, sí lo es para la adquisición del tamaño normal de su soma, para la correcta inervación axonal de la epidermis, para la eliminación post-natal de TrkA y para la expresión de genes específicos de esta sub-población neuronal.

Durante la embriogénesis, los mRNAs de *GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2* y *GFR $\alpha$ 3* son expresados en nervios periféricos y se co-expresan junto con Ret en sub-poblaciones parcialmente superpuestas de neuronas sensoriales (Bennett, D.L. *et al.* 2000), mientras que las regiones sensoriales diana, como la epidermis o los folículos de los bigotes (en el ratón), expresan GDNF y NRTN (Fundin, B.T. *et al.* 1999). GDNF no es detectado en la piel de individuos adultos (Golden, J.P. *et al.* 1998), pero sí en células de Schwann y en las capas superficiales de la médula espinal (Jongen, J.L. *et al.* 1999). El mRNA de *ARTN* es encontrado en las raíces de nervios periféricos en desarrollo, pero dichos niveles en el adulto son bajos. *GFR $\alpha$ 1* y Ret también son expresados en una sub-población de neuronas mecanosensoriales mielinizadas. Las evidencias *in vitro* indican que las neuronas somatosensoriales comienzan a depender de GDNF post-natalmente (Baudet, C. *et al.* 2000). Consistentemente, el número de neuronas sensoriales en los DRGs y TG de ratones recién nacidos nulos para *GFR $\alpha$ 1* (Airaksinen, M.S. *et al.* 1999) o *GDNF* (Oppenheim, R.W. *et al.* 2000) no está afectado. Tras el parto, la señalización de GDNF sería necesaria para la supervivencia, inervación y/u otras funciones en las sub-poblaciones de neuronas sensoriales que expresan Ret y *GFR $\alpha$ 1*. En este contexto, se ha

sugerido que GDNF promovería la inervación sensorial cutánea luego del nacimiento (Fundin, B.T. *et al.* 1999).

También  $GFR\alpha 2$  es expresado en ganglios sensoriales, mientras que NRTN es capaz de mantener la supervivencia en cultivo de sub-poblaciones de neuronas de DRGs y TG (Kotzbauer, P.T. *et al.* 1996; Bennett, D.L. *et al.* 1998; Naveilhan, P. *et al.* 1998). Aunque no se detectaron disminuciones en el número de neuronas sensoriales en ratones knock-out para NRTN o  $GFR\alpha 2$ , las neuronas que expresan  $GFR\alpha 2$  de los ganglios sensoriales de ratones nulos para NRTN sí están disminuidas o ausentes (Heuckeroth, R.O. *et al.* 1999).

### 3.1.2 Sistema Nervioso Central.

#### 3.1.2.a Neuronas Motoras.

Los factores tróficos producidos por el músculo y las células gliales actúan de forma sinérgica para promover la supervivencia de neuronas motoras (Arce, V. *et al.* 1998). Durante el desarrollo, GDNF es producido principalmente por las células de Schwann. En embriones de ratones knock-out para GDNF y  $GFR\alpha 1$  se observa una reducción sustancial de neuronas motoras espinales y craneales (entre 20% y 40%, según cada región), y un aumento correspondiente de la muerte celular (Garces, A. *et al.* 2000). Asimismo, se ha determinado que en ratones nulos para RET, existen pérdidas significativas en todas las sub-poblaciones de neuronas motoras estudiadas (Airaksinen, M.S. *et al.* 2002). Por otro lado, la expresión forzada de GDNF en el músculo estimula la supervivencia de neuronas motoras, indicando la relevancia fisiológica de este factor para la viabilidad de cierta sub-población de neuronas motoras (Oppenheim, R.W. *et al.* 2000). Con respecto a NRTN, aunque su aporte exógeno también mantiene la supervivencia de neuronas motoras en cultivo, esto ocurre principalmente a través de  $GFR\alpha 1$ . Apoyando esta noción, en ratones nulos para  $GFR\alpha 2$  no se observan pérdidas obvias de dichas neuronas (Garces, A. *et al.* 2000). La

inyección continuada de GDNF (pero no de NRTN) en estadios post-natales (Keller-Peck, C.R. *et al.* 2001) o la sobre-expresión específica de GDNF (Zwick, M. *et al.* 2001) en el músculo esquelético, producen una hiper-inervación de la Unión Neuromuscular (NMJ) que se mantiene en estadios posteriores. Parece ser que el GDNF induciría dicha inervación exacerbada debido a una mayor estimulación de la ramificación terminal del axón y de la formación de sinapsis (Keller-Peck, C.R. *et al.* 2001). Valiéndose de ratones knock-out para *RET* y de otras líneas de ratones mutantes condicionales para *RET* en la médula espinal, Kramer y colaboradores demostraron que el sistema GDNF/Ret funciona como una señal de orientación o guía para ciertos axones de neuronas motoras durante el establecimiento de la inervación de músculos de las extremidades dorsales. De tal forma que en estos ratones mutantes, los axones de las motoneuronas siguen una trayectoria ventral aberrante, alejándose de las regiones dorsales enriquecidas en GDNF. Es interesante destacar que este fenotipo se incrementa en ratones doblemente nulos, tanto para *RET* como para el gen del receptor *EPHA4*, señalando que ambos receptores cooperarían en la función de guía axonal para neuronas motoras (Kramer, E.R. *et al.* 2006). Paralelamente, Baudet y colaboradores generaron otra línea de ratones en los que la expresión de *RET* era eliminada específicamente en neuronas motoras craneales. En dichos animales, la ausencia de Ret provoca un déficit en la maduración motoneuronal y en la especialización de terminales neuromusculares pre-sinápticos de ciertos grupos de neuronas motoras (Baudet, C. *et al.* 2008).

### 3.1.2.b Neuronas Dopaminérgicas.

Aunque originalmente caracterizado como un potente factor de supervivencia para neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vitro*, el análisis de ratones knock-out demuestra que la señalización a través de GDNF/Ret no es indispensable para el desarrollo embrionario de dichas neuronas, ilustrando el complejo entramado de vías de señalización y mecanismos compensatorios que modulan el desarrollo neural. Apoyando esta idea, se ha sugerido que el factor

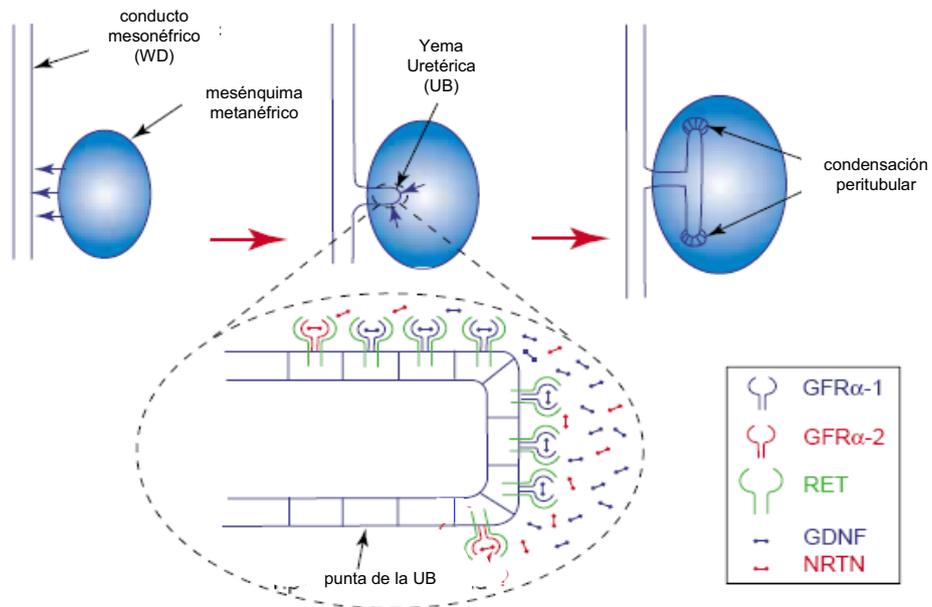
neurotrófico CDNF (por Conserved Dopamine Neurotrophic Factor) podría compensar la deficiencia de señalización por GDNF/GFR $\alpha$ 1/Ret durante el desarrollo embrionario del mesencéfalo (Lindholm, P. *et al.* 2007). GDNF y NRTN son potentes factores de supervivencia para las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Sin embargo, sólo GDNF es capaz de inducir el crecimiento axonal e hipertrofia en estas células (Akerud, P. *et al.* 1999). Ambos ligandos parecen señalar a través del sistema GFR $\alpha$ 1/Ret, que se encuentra tanto en neuronas dopaminérgicas en desarrollo como en aquellas maduras. En cualquier caso, GDNF podría aún ser requerido durante los estadios post-natales del desarrollo de neuronas dopaminérgicas, para el mantenimiento y/o plasticidad de dichas células, y para la inervación estriatal de sus dianas. Esto se ve apoyado por la observación de que GDNF se expresa prominentemente en el Cuerpo Estriado durante las primeras semanas post-natales, momento en que toma lugar la inervación de tejidos diana por parte de las neuronas dopaminérgicas. Asimismo, al transplantar neuronas dopaminérgicas mesencefálicas provenientes de embriones nulos para *GDNF* en ratones cuyos tejidos estriatales habían sido denervados químicamente, dichas neuronas no lograban inervar a sus dianas ni sobrevivir (Granhölm, A.C. *et al.* 2000). Más aún, la inhibición de la expresión de GDNF disminuye la gemación y ramificación de los axones de neuronas dopaminérgicas tras un daño en el Cuerpo Estriado (Batchelor, P.E. *et al.* 2000). No obstante, como en tantos otros casos, la relevancia de Ret en el mantenimiento de neuronas dopaminérgicas no está exenta de controversias. En este sentido, Jain y colaboradores generaron ratones knock-out condicionales en los que podían eliminar la expresión de *RET* específicamente en neuronas dopaminérgicas. Así, mediante un detallado análisis morfométrico y bioquímico, determinaron que Ret no es indispensable para proveer el soporte trófico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en ratones adultos (Jain, S. *et al.* 2006b). En un trabajo posterior en el que se generó otra línea de ratones con el gen de *RET* eliminado específicamente en neuronas dopaminérgicas, se determinó que sólo en ratones envejecidos, dicha mutación conducía a una pérdida progresiva y específica de

neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la Sustancia Negra (SNpc), indicando de esta manera el papel que Ret desempeña como regulador crítico para el mantenimiento a largo plazo del sistema nigrostriatal (Kramer, E.R. *et al.* 2007). Otro modelo que ha puesto de relevancia el rol de Ret en el sistema dopaminérgico está relacionado con ratones knock-in, que expresan la variante constitutivamente activada *RET MEN2B*. En este trabajo, los autores demostraron que la actividad constitutiva de Ret era suficiente para aumentar las concentraciones de dopamina en el cerebro y el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Mijatovic, J. *et al.* 2007).

### 3.2 GDNF/Ret en el desarrollo del Sistema Génito-Urinario.

El desarrollo del sistema excretor se inicia con la formación del Conducto Nefrogénico o de Wolff (WD por Wolffian Duct) a partir del mesodermo intermedio, el cual crece caudalmente, induciendo inicialmente los túbulos de los riñones pronéfricos y mesonéfricos -estructuras embrionarias transitorias de los vertebrados superiores- y posteriormente, dando lugar a la Yema Uretérica (UB por Ureteric Bud) en su extremo más caudal, el primer componente del riñón metanéfrico o permanente (Saxén, L. 1987). Bajo la influencia de una región especializada del mesodermo intermedio, denominado Mesénquima Metanéfrico (MM), la UB evagina y comienza a ramificarse repetidamente, siguiendo un patrón característico. Finalmente, el epitelio de la UB dará lugar al sistema colector urinario, una compleja estructura tubular arborescente compuesta por el uréter, cálices y conductos colectores corticales y medulares (Fig. 6). En contraste, el epitelio de la nefrona (incluyendo glomérulos, túbulos contorneados proximales y distales, asa de Henle y túbulos conectores) deriva de células progenitoras del MM, que sufren el proceso de transición mesenquimal-a-epitelial en respuesta a factores secretados por la UB (Saxén, L. 1987). Defectos en la organogénesis del uréter y el riñón se cuentan entre algunos de los defectos del nacimiento más frecuentes, mientras que alteraciones más sutiles durante la ramificación de la UB pueden causar un número reducido de nefronas

que más tarde desencadenarían patologías renales diversas (al-Awqati, Q. *et al.* 1998; Pohl, M. *et al.* 2002; Kett, M.M. *et al.* 2004).



**Fig. 6 Representación de los estadios tempranos del desarrollo renal.**  
Ver en el texto (modificado de Manie, S. *et al.* 2001).

Por algún tiempo se ha sabido que el MM controla varios aspectos del crecimiento y ramificación de la UB por medio de señales inductivas, e incluso ahora se sabe que el estroma renal -el cual deriva de una población celular diferente del blastema metanéfrico- también es importante para el desarrollo normal de la UB (Hatini, V. *et al.* 1996; Batourina, E. *et al.* 2001; Levinson, R. *et al.* 2003; Cullen-McEwen, L.A. *et al.* 2005). Así, varios factores de crecimiento expresados por el MM, y/o células del estroma, o de la misma UB han sido implicados en el control de la morfogénesis renal temprana (Vainio, S. *et al.* 2002; Shah, M.M. *et al.* 2004). Uno de los factores que ejerce una función particularmente crítica en este proceso es GDNF.

Durante el desarrollo temprano del sistema excretor, Ret y GFR $\alpha$ 1 se expresan a lo largo del WD, mientras que GDNF sólo es expresado por el MM adyacente a la porción más caudal del WD, lugar donde emergerá la UB (Pachnis, V. *et al.* 1993; Hellmich, H.L. *et al.* 1996; Baloh, R.H. *et al.* 1997; Sainio, K. *et al.* 1997) (Fig. 6). Una vez que la UB evagina y comienza a ramificarse, la expresión de Ret es regulada a la baja en el WD y el tronco de las ramificaciones de la UB, quedando exclusivamente restringido a las puntas más distales de cada ramificación. Simultáneamente, GDNF queda restringido al mesénquima indiferenciado que rodea a cada punta de la UB. El papel clave de GDNF y sus receptores en el desarrollo renal fue inicialmente revelado mediante la disrupción de los genes de *RET*, *GDNF* y *GFR $\alpha$ 1* (Schuchardt, A. *et al.* 1994; Moore, M.W. *et al.* 1996; Pichel, J.G. *et al.* 1996; Sanchez, M.P. *et al.* 1996; Cacalano, G. *et al.* 1998; Enomoto, H. *et al.* 1998). Ratones deficientes para cada uno de dichos genes presentan defectos similares en el sistema excretor, que van desde agénesis renal con uréteres ciegos sin tejido renal, hasta riñones rudimentarios, hipo-/dis-plásicos, pequeños y desorganizados.

Estos descubrimientos establecieron que la señal de GDNF/Ret era importante para inducir el crecimiento de la yema uretérica desde el WD y para promover su crecimiento y ramificación tempranos. La evaginación inicial de la UB es un paso crítico en el desarrollo del sistema urogenital, de modo que si falla, el uréter y el riñón no se formarán (agénesis renal), mientras que si ocurre en una posición que no es debida, dicho uréter ectópico no podrá conectar adecuadamente con la vejiga (Mackie, G.G. *et al.* 1975; Ichikawa, I. *et al.* 2002). Estos defectos resultan en anomalías del tracto genito-urinario que incluyen megauréter y reflujo vesico-uretérico, los cuales se cuentan entre los defectos de nacimiento más comunes del ser humano (Scott, J.E. *et al.* 1988; Pohl, M. *et al.* 2002; Scott, J.E. 2002).

En humanos, alrededor del 40% de casos de agénesis renal se asocian a mutaciones en Ret y 5-10%, a mutaciones en GDNF. Sin embargo, se debe reconocer que uréteres y riñones rudimentarios se pueden formar aún en ausencia total de Ret o GDNF, de forma variable según el contexto genético (Schuchardt, A. *et al.* 1994; Moore, M.W. *et al.* 1996; Pichel, J.G. *et al.* 1996; Sanchez, M.P. *et al.* 1996; Schuchardt, A. *et al.* 1996). Esto sugiere la existencia de señales adicionales que serían parcialmente redundantes con GDNF en su habilidad para inducir el crecimiento de la yema. Algunos candidatos para dicha función son Fgf7, Fgf10 y HGF, aunque la eliminación de cada uno de dichos genes causa defectos renales mínimos (Schmidt, C. *et al.* 1995; Qiao, J. *et al.* 1999; Ohuchi, H. *et al.* 2000), quizás debido al ya mencionado fenómeno de redundancia funcional y al papel preponderante de GDNF en dicha función.

Hay muchas evidencias de que GDNF no sólo es importante para la evaginación inicial de la UB, sino que también lo es para el proceso de ramificación continuada durante todo el desarrollo renal. En primer lugar, Ret, GFR $\alpha$ 1 y GDNF continúan expresándose de forma específica en la región periférica del riñón en desarrollo, donde hay mayor crecimiento y ramificación. Finalmente, se ha sugerido que *in vivo*, las mutaciones hipomórficas de *RET* o de *GDNF* -que reducen pero no eliminan su señalización- producen riñones hipo-/dis-plásicos, aparentemente, porque reducen la velocidad de crecimiento y/o de ramificación de la UB (Costantini, F. *et al.* 2006).

#### 4 Vías de transducción de señales mediadas por Ret.

Como se mencionó anteriormente, en su naturaleza de receptor con actividad tirosina quinasa, Ret activa distintos mecanismos de transducción de señales, entre los que se incluyen la vía Ras/Raf -que lleva a la activación de las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPKs) ERK1 y ERK2 (por Extracelular-Regulated Kinases) (Santoro, M. *et al.* 1994; van Weering, D.H. *et al.* 1995; Worby, C.A. *et al.* 1996; Trupp, M. *et al.* 1999)-, la cascada PI3K/Akt -

implicada en supervivencia celular (van Weering, D.H. *et al.* 1997; Trupp, M. *et al.* 1999; Segouffin-Cariou, C. *et al.* 2000; Maeda, K. *et al.* 2004)- y las vías Cdc42/JNK (Chiariello, M. *et al.* 1998), p38MAPK (Kurokawa, K. *et al.* 2003), ERK5 (Hayashi, H. *et al.* 2000) y PLC- $\gamma$  (Borrello, M.G. *et al.* 1996).

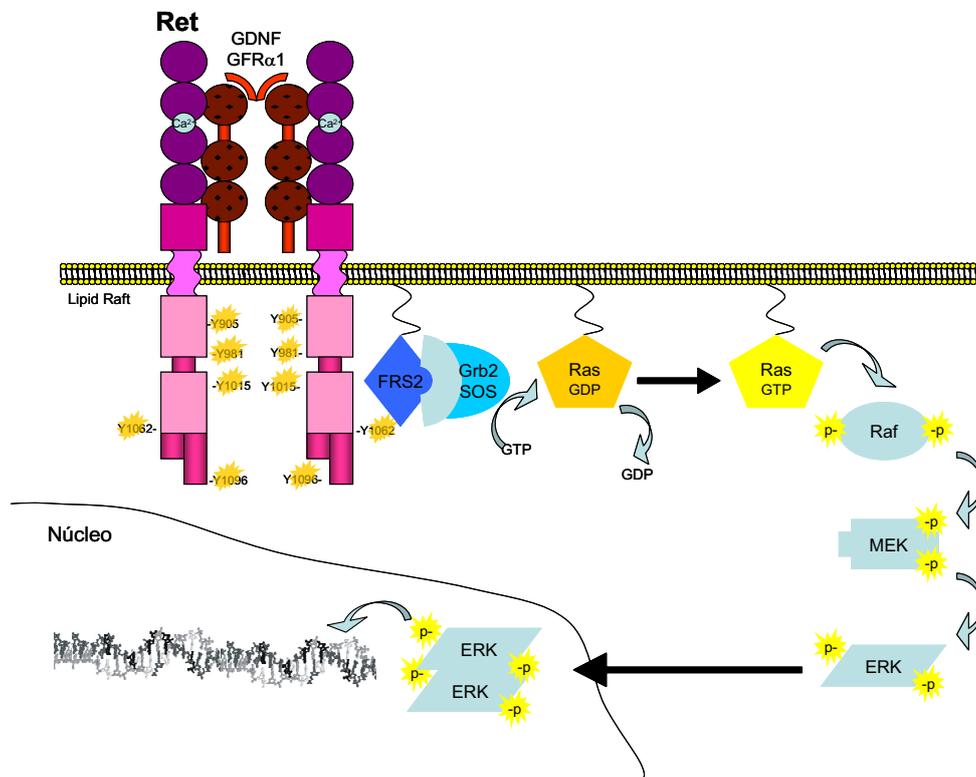
#### 4.1 Vía Erk/MAPK.

Tras la activación de Ret por sus ligandos la cascada Ras/Erk/MAPK se inicia cuando las moléculas adaptadoras Shc y/o FRS2 se unen a fosfo-Tyr1062 en Ret. En el modelo más clásico y mejor estudiado, el complejo Grb2-SOS es reclutado por estas moléculas adaptadoras. La unión de Grb2-SOS promueve el intercambio de una molécula del ribonucleótido GDP por una de GTP en la proteína G pequeña Ras, desencadenando su activación, que se traduce en la fosforilación de Raf. Ésta, a su vez, fosforila y activa a MEK1/2 lo cual determina la subsiguiente activación de las quinasas Erk1/2, que se translocarán al núcleo celular para modular la actividad de diversos factores de transcripción y, por ende, la expresión de aquellos genes diana requeridos para las distintas funciones biológicas (Fig. 7). Para el caso de la isoforma larga Ret51, la Tyr1096 (no presente en la isoforma corta Ret9) es capaz de mediar la unión directa de Grb2, constituyendo una vía alternativa para la activación de esta cascada de señalización. Numerosos estudios genéticos y bioquímicos han demostrado el rol crítico de Raf en la vía de señalización ERK/MAPK (Avruch, 1994).

Las proteínas de la familia de Raf poseen una característica estructural en común, compartiendo 3 Regiones Conservadas (CR), dos de ellas, CR1 y CR2, en la región N-terminal y la tercera, CR3 –que incluye al dominio quinasa-, en el extremo C-terminal. Esta familia de enzimas esta sujeta a una compleja regulación, lo cual se ve reflejado por la presencia de numerosos sitios de fosforilación distribuidos a todo lo largo de su secuencia aminoacídica. Algunos de dichos residuos se encuentran conservados en las tres isoformas, indicando que se trata de mecanismos de modulación comunes, mientras que otros son

específicos para cada isoforma, lo cual sugiere circuitos reguladores independientes. A-Raf es una isoforma más pequeña que C-Raf, con 68 kDa y 72-74 kDa, respectivamente. B-RAF puede sufrir procesos de splicing alternativo para dar origen a una variedad de formas de entre 75 y 100 kDa (Storm, S.M. *et al.* 1990; Barnier, J.V. *et al.* 1995).

**Fig. 7 Modelo esquemático de la cascada de señalización Ras-Raf/ERK/MAPK.**  
(Ver en el texto)



No obstante, más recientemente se han comenzado a proponer otras funciones de Raf, independientes de MEKs (Murakami, M.S. *et al.* 2001; O'Neill, E. *et al.* 2005). Más aún, algunas de estas funciones alternativas parecen ser independientes de la actividad quinasa de Raf, pudiendo en estos casos actuar

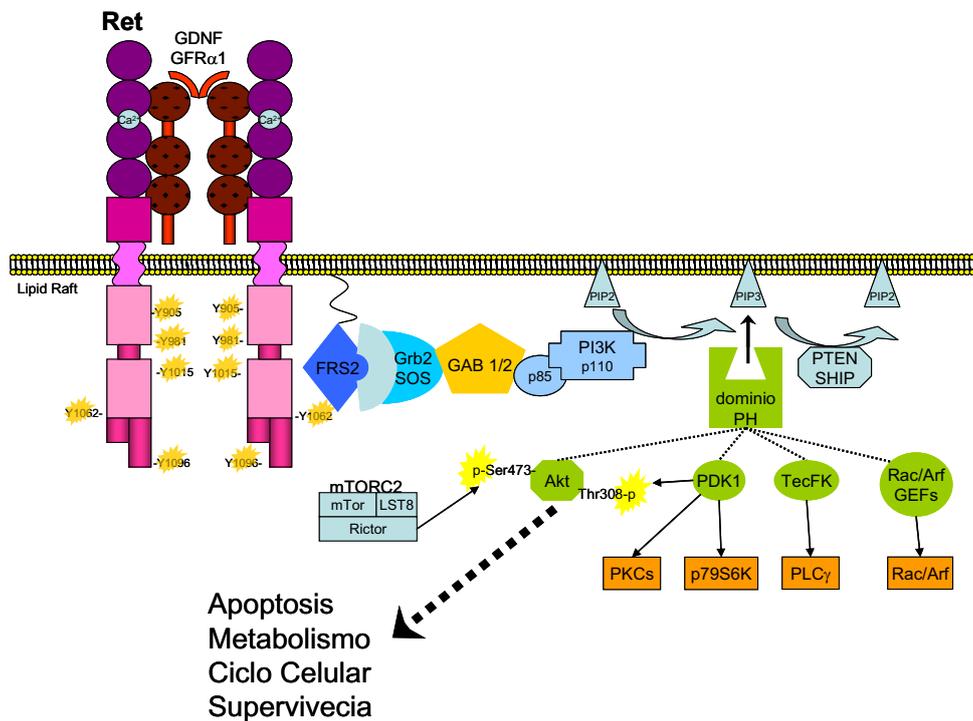
como proteínas adaptadoras o de andamiaje (Chen, J. *et al.* 2001b; O'Neill, E. *et al.* 2005; Galabova-Kovacs, G. *et al.* 2006) (Ver Discusión).

#### 4.2 Vía PI3K/Akt.

El complejo adaptador Grb2-SOS constituye un punto de bifurcación en la señalización inducida por Tyr1062 de Ret, puesto que alternativamente puede reclutar a Gab1/2. De manera que éstas interactúan directamente con la subunidad reguladora p85 de la enzima PI3K (por Phosphoinositide 3-Kinase). Así, el reclutamiento de PI3K cataliza la transformación de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (Hawkins, P.T. *et al.* 1992), intermediario que desempeña un papel crítico en la activación de diferentes vías de señalización intracelular. PIP3 es reconocido por los dominios PH (por Pleckstrin Homology) presentes en diversas moléculas adaptadoras y efectoras (Rameh, L.E. *et al.* 1997), induciendo su relocalización hacia la membrana plasmática y/o modificaciones alostéricas (Fig. 8). La amplia variedad de moléculas efectoras reclutadas por PIP3 da lugar a una compleja red de señalización, e involucrando diferentes funciones celulares. Algunas de estas respuestas son específicas del contexto celular o temporal, mientras que otras resultan ser comunes a una gran variedad de contextos. Una de las respuestas de carácter general que mejor se han estudiado, implica el papel de PI3K en la regulación del movimiento celular y la formación de lamelipodios. En este marco, la producción de PIP3 estaría relacionada con la modulación de la actividad de varias proteínas intercambiadoras de nucleótidos de Guanidina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que a su vez regularían la función de las proteínas con actividad GTPasa Ras y Arf, mediadores de los reordenamientos del citoesqueleto y la membrana plasmática indispensables para el movimiento celular (Houldsworth, J. *et al.* 2002; Ridley, A.J. *et al.* 2003; Van Haastert, P.J. *et al.* 2004).

Otra de las funciones generalizadas tras la activación de PI3K en respuesta a factores de crecimiento desemboca en un incremento del crecimiento celular, proliferación y supervivencia. Existen cada vez más evidencias de que estas y otras funciones celulares en respuesta a PIP3 están mediadas por la activación de la Proteína Quinasa B (PKB) o Akt. De hecho, la inducción de Akt por PI3K parece tener un carácter universal, mientras que la fosforilación de Akt en sus residuos activadores clave (Thr308 y Ser473) se acepta popularmente como un marcador de la actividad de PI3K (Downward, J. 2004; Cully, M. *et al.* 2006; Engelman, J.A. *et al.* 2006; Garcia, Z. *et al.* 2006; Shaw, R.J. *et al.* 2006; Wulschleger, S. *et al.* 2006).

**Fig. 8 Modelo esquemático de las cascadas de señalización mediadas por PI3K.**  
(Ver en el texto)



Akt desempeña un gran número de funciones celulares entre las que se encuentra la modulación de mTORC1 (Complejo 1 de mTor) -un complejo crítico para la integración respuestas vinculadas al crecimiento celular-, de la familia de factores de transcripción FOXO, de p27<sup>KIP</sup> y GSK3 (Glucógeno Sintasa Quinasa 3), siendo todas estas componentes claves para la regulación del ciclo celular y la supervivencia.

La ruta de transducción de señales PI3K/Akt también ha sido implicada en la regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, implicado en la modulación de diferentes procesos biológicos, como crecimiento celular, proliferación e inhibición de la apoptosis (Kane, L.P. *et al.* 1999; Romashkova, J.A. *et al.* 1999; Hayashi, H. *et al.* 2000). La función más ampliamente estudiada del Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es su habilidad para promover la supervivencia celular mediante la inducción de genes diana, cuyos productos reprimen varios aspectos de la maquinaria apoptótica, tanto en células normales como transformadas (Luo, J.L. *et al.* 2005). La Familia de NF- $\kappa$ B comprende a 5 miembros: NF- $\kappa$ B1 (tanto en su forma precursora, p105, como la procesada, p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), c-Rel, RelB y RelA (p65). Todos ellos comparten el denominado Dominio de Homología Rel (RHD), que media la unión al ADN, dimerización e interacciones con las proteínas inhibidoras conocidas como I $\kappa$ Bs (por Inhibitor of  $\kappa$ B). Estas últimas actúan reteniendo a los dímeros funcionales de NF- $\kappa$ B en el citoplasma. Un amplio espectro de estímulos activan a NF- $\kappa$ B, principalmente a través de la fosforilación de I $\kappa$ Bs y su subsiguiente degradación, evento que es mediado por el complejo multiproteico I $\kappa$ B Quinasa o IKK (Luo, J.L. *et al.* 2005).

De esta manera, por activación del complejo IKK, los dímeros de NF- $\kappa$ B se liberan de I $\kappa$ Bs y se dirigen al núcleo, donde regularán la transcripción de diferentes genes que codifican para citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular, así como también proteínas pro- o anti-

apoptóticas (Karin, M. *et al.* 2000; Ghosh, S. *et al.* 2002). El complejo IKK consiste de dos subunidades quinasa altamente homólogas, denominadas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y de una subunidad reguladora, IKK $\gamma$ /NEMO (Karin, M. *et al.* 2000).

#### 4.3 Otras vías de señalización.

Como hemos visto, Tyr1062 de Ret cumple un rol destacado en la transmisión de señales hacia el interior celular porque actúa como un sitio de acoplamiento para múltiples proteínas adaptadoras y efectoras. La unión de Shc, FRS2, IRS-1/2 y las proteínas Dok a Tyr1062 depende de que la misma se encuentre fosforilada, y es mediada por los dominios de unión a fosfo-tirosinas PTB (por Phospho-Tyrosine Binding) o SH2 (por Src-Homology 2) presentes en dichas moléculas adaptadoras. Contrariamente, Enigma (Durick, K. *et al.* 1996) y Shank3 -que se une exclusivamente a Tyr1062 de Ret- (Schuetz, G. *et al.* 2004), lo hacen independientemente de su estado de fosforilación. La elevación de los niveles de AMP cíclico (cAMP) resulta en la fosforilación específica de otro residuo aminoacídico de Ret, Ser696, que es mediada por la Proteína Quinasa A (PKA). Este fenómeno es importante para la activación de Rac y la posterior formación de lamelipodios inducidas por GDNF/Ret (Fukuda, T. *et al.* 2002), indicando una función del receptor en la reorganización del citoesqueleto, y que depende de la fosforilación de serinas. Asimismo, se conoce la capacidad de Ret para activar las vías de señalización mediadas por Src, p38MAPK, JNK, Rho/Rac/Cdc42, ERK5 y PLC $\gamma$ , pero los detalles moleculares de su activación y sus funciones en el contexto de GFLs/GFR $\alpha$ s/Ret aún requieren un análisis en profundidad.

#### 4.4 Señalización de GDNF/GFR $\alpha$ 1 independiente de Ret.

La amplia expresión de GFR $\alpha$ s en regiones del sistema nervioso donde no se encuentra Ret sugiere que podría existir una señalización de GDNF/GFR $\alpha$ 1 independientemente del RTK (Trupp, M. *et al.* 1997; Ylikoski, J. *et*

*al.* 1998; Kokaia, Z. *et al.* 1999). En líneas celulares y cultivos primarios de neuronas deficientes en Ret, la adición de GDNF estimula la actividad quinasa de proteínas de la familia de Src (SFKs), la fosforilación de MAPKs, PLC- $\gamma$ , CREB y la inducción de Fos (Poteryaev, D. *et al.* 1999; Trupp, M. *et al.* 1999). Asimismo, el GDNF restaura parcialmente la morfogénesis de la ramificación uretérica en ratones nulos para el gen *RET* (Popsueva, A. *et al.* 2003). Por otro lado, estos autores observaron que en células de la línea celular MDCK que expresan  $GFR\alpha 1$ , el GDNF estimula la ramificación, pero no la migración quimiotáctica, que sí se observa cuando Ret es co-expresado, mimetizando los efectos del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) en respuesta a su receptor Met en células MDCK parentales. De hecho, el GDNF induce la fosforilación de Met en líneas celulares que expresan  $GFR\alpha 1$ , tanto en ausencia como en presencia de Ret. No obstante, la interacción directa entre el GDNF y Met parece altamente improbable. De este modo, la fosforilación de Met inducida por el GDNF posiblemente estaría mediada por SFKs (Popsueva, A. *et al.* 2003). De acuerdo con esta idea, otros grupos han sugerido que la señal de GDNF/ $GFR\alpha 1$  en ausencia de Ret puede ser transducida por “receptores alternativos”, entre los que se encuentra la Molécula de Adhesión de Células Neurales (NCAM) (Paratcha, G. *et al.* 2003). Cuando  $GFR\alpha 1$  está asociado a NCAM (unión de baja afinidad), el GDNF se une con alta afinidad a  $p^{140}NCAM$ , activando a Fyn y a la Quinasa de Adhesión Focal, FAK. En ausencia de GDNF, la interacción de  $GFR\alpha 1$  con NCAM inhibiría la adhesión celular (Paratcha, G. *et al.* 2003). La unión de GDNF a NCAM estimula la migración de células de Schwann y el crecimiento axonal de neuronas del hipocampo y corticales, de manera independiente de Ret. Sin embargo, existen dudas sobre la relevancia fisiológica de todos estos mecanismos alternativos de señalización independiente de Ret. En un elegante estudio se generó una línea de ratones transgénicos en los que *GFR\alpha 1* se encontraba bajo el control transcripcional del gen *RET*, de manera que  $GFR\alpha 1$  sólo podía expresarse en células que expresaran Ret (ratones “todo *cis*”). Por medio de este sistema, se pudo comprobar que la expresión de  $GFR\alpha 1$  en dominios diferentes a los de Ret no

es indispensable para las funciones fisiológicas con las que la actividad de  $GFR\alpha 1$  independiente de Ret se había asociado en modelos *in vitro* (Enomoto, H. *et al.* 2004). De este modo, los papeles exactos de estos mecanismos de interconexión entre sistemas de receptores no relacionados *in vivo* aún deben ser esclarecidos.

#### 4.5 Activación de Ret por otros factores de crecimiento.

El Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) es el activador trófico clásico para las neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior (SCG). Así, durante el desarrollo embrionario, la supervivencia de casi todas las neuronas del SCG depende de NGF y su receptor TrkA. Tras el nacimiento, la función de NGF/TrkA es reemplazada por GFLs/Ret (Airaksinen, M.S. *et al.* 2002; Sariola, H. *et al.* 2003). Sin embargo, NGF puede promover la fosforilación de la isoforma larga de Ret, Ret51, en un proceso que no requiere a los GFLs, ni a  $GFR\alpha s$  (Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2002c), a través de un novedoso mecanismo de interacción "inter-receptor", resultando en un incremento del crecimiento, el metabolismo y la expresión de determinados genes. Los detalles moleculares de dicho diálogo cruzado entre TrkA y Ret se desconocen, pero aparentemente sería indirecto (Sariola, H. *et al.* 2003). Estos resultados demuestran que los factores de crecimiento y sus receptores generan comunicaciones cruzadas para formar una red de señales tróficas interrelacionadas durante el desarrollo.

#### 5 Regulación de la actividad de Ret.

Dado el papel crucial que desempeñan en la mediación de diferentes procesos del desarrollo, la actividad de los RTKs se encuentra estrictamente regulada, de manera que las señales tengan la intensidad y la duración adecuadas. Uno de los mecanismos más extendidos para controlar la función de estos receptores consiste en su degradación mediada por Ligasas de Ubiquitina E3 (Haglund, K. *et al.* 2003). La mono-ubiquitinación de los receptores actúa

como una señal de internalización, modulando el tráfico endocítico del receptor activado y su transporte hacia los lisosomas para ser finalmente degradados. Por otro lado, la poli-ubiquitinación del receptor es un evento necesario para degradación de proteínas por el Proteasoma. En el caso de Ret, la degradación inducida por ligandos ocurre tras su ubiquitinación mediada por Ligasas E3 como Cbl. Existen evidencias de que, a diferencia de otros RTKs, la interacción de Cbl con Ret activado no sucede de forma directa, sino a través de la unión de Cbl a Shc y Grb2 (Scott, R.P. *et al.* 2005). Recientemente, se ha sugerido que el principal mecanismo para la degradación de Ret envuelve al Proteasoma (Pierchala, B.A. *et al.* 2006), aunque los detalles moleculares por los cuales esto sucedería aún no han sido aclarados. En el citado trabajo, los autores describen un nuevo mecanismo en la regulación de la actividad de GDNF, según el cual los Lipid Rafts secuestrarían a Ret activado evitando su degradación por el proteasoma y aumentando el tiempo de vida media de su actividad señalizadora. Otro mecanismo para la modulación negativa de Ret involucra la desfosforilación del receptor por Proteínas Fosfatasas de Tirocinas. Al respecto, ciertos estudios han identificado algunas de las fosfatasas candidatas para llevar a cabo esta función, entre las que se cuentan LAR (por leukocyte common antigen-related), SHP1 y RPTPJ (por receptor-type protein tyrosine phosphatase J). Éstas son capaces de interactuar físicamente con variantes oncogénicas de Ret y reducir así su nivel de fosforilación, su actividad señalizadora y transformante (Hennige, A.M. *et al.* 2001; Qiao, S. *et al.* 2001; Iervolino, A. *et al.* 2006).

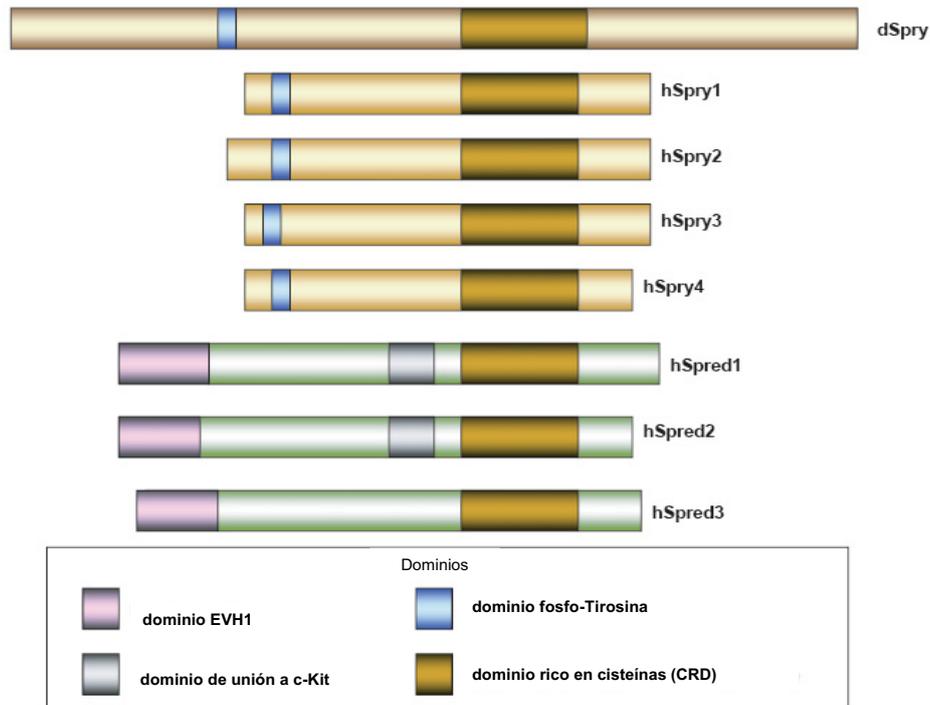
Por último, existen mecanismos alternativos que regulan negativamente a Ret a través de proteínas que antagonizan una o varias de las vías de señalización activadas por éste. Recientemente se ha descrito que Lrig1 es capaz de asociarse a Ret y de este modo evitar la interacción del receptor con GFR $\alpha$ s, su re-localización hacia los Lipid Rafts, su autofosforilación y la activación de la vía Erk/MAPK en respuesta a GDNF (Ledda, F. *et al.* 2008). Paralelamente, otros elegantes estudios han puesto de manifiesto la relevancia de las proteínas de la Familia de Sprouty en la regulación de la señalización

mediada por GDNF/Ret. Así, se ha determinado la función reguladora de Sprouty2 en el contexto de líneas celulares de Neuroblastoma (Ishida, M. *et al.* 2007), pudiendo también estar implicada en el desarrollo del NES *in vivo* (Taketomi, T. *et al.* 2005), mientras que Spry1 estaría involucrada en el control de GDNF/Ret durante la organogénesis renal en ratón (Basson, M.A. *et al.* 2005; Basson, M.A. *et al.* 2006).

### 5.1 Las proteínas de la familia de Sprouty.

El primer miembro de la familia de proteínas Sprouty fue identificado investigando el desarrollo de las vías aéreas en *Drosophila melanogaster* (dSpry). Se trata de una proteína de 63 kDa que contiene un dominio único de 124 residuos aminoacídicos rico en cisteínas (CRD por Cistein-Rich Domain) (Hacohen, N. *et al.* 1998). Se han identificado homólogos de dSpry en rana, en gallina, ratón y humanos, cuyas similitudes de secuencia se encuentran prácticamente restringidas al CRD de la porción C-terminal (Hacohen, N. *et al.* 1998; Nutt, S.L. *et al.* 2001). Tanto el ratón como el ser humano poseen 4 genes homólogos de *Sprouty* (*Spry1* a *Spry4*) que codifican las cuatro respectivas proteínas, de un tamaño considerablemente menor (32-35 kDa) respecto a dSpry, y que muestran divergencia de secuencia en su mitad N-terminal, excepto a nivel de una pequeña secuencia altamente conservada que contiene un residuo tirosina -Tyr55 en hSpry2- (Fig. 9). Dicha tirosina puede ser fosforilada en respuesta a factores tróficos y subsiguientemente reconocida por dominios de tipo SH2 y PTB presentes en diferentes moléculas de señalización intracelular. La variabilidad de secuencia de la región N-terminal en los cuatro homólogos de mamíferos podría dictar diferentes funciones para cada miembro, potencialmente, mediante la formación de distintas interacciones proteína-proteína. Se ha identificado otro grupo de moléculas relacionadas que contiene un CRD altamente similar al de las proteínas Sprouty. Se trata de una familia de reguladores negativos de la señalización por Ras llamadas SPRED (por SProuTy-Related proteins with an EVH1 Domain) (Fig. 9).

En los últimos años se ha comenzado a evidenciar la importancia de una región rica en serinas (SRD) que también se encuentra altamente conservada entre los distintos miembros de la familia de Sprouty, y que se localiza adyacente al CRD, alrededor de los residuos en posiciones 120 a 140 de Sprouty2 (Lao, D.H. *et al.* 2007; Aranda, S. *et al.* 2008). Estos trabajos sugieren que algunos residuos de Ser y/o Thr de este dominio se encontrarían fosforilados en condiciones basales, y que su desfosforilación sería un requisito para la activación de esta proteína.



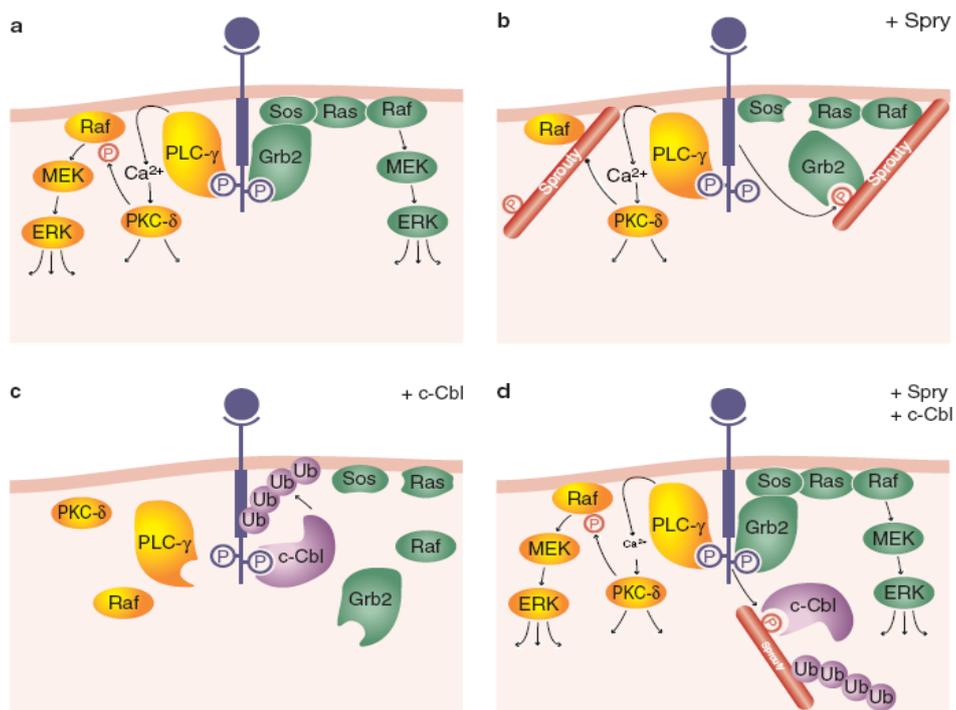
**Fig. 9 Esquema de la organización estructural de proteínas de la familia de Sprouty y Spred.** Los distintos dominios que caracterizan a las proteínas Sprouty y Spred están indicados para los homólogos de *D. melanogaster* y humano, en sus distintas isoformas. (modificado de Guy, G.R. *et al.* 2003).

### 5.1.1 Mecanismos de acción de Sprouty.

Los estudios iniciales sobre dSpry establecieron que ésta actuaba como un inhibidor general de la señalización de Ras mediada por RTKs (Hacohen, N. *et al.* 1998; Casci, T. *et al.* 1999) y abrieron las puertas para la caracterización de los ortólogos de vertebrados. Las proteínas Sprouty inhiben de forma específica la señalización de la vía Ras-ERK/MAPK inducida por RTKs, sin afectar otros mecanismos de señalización (Gross, I. *et al.* 2001; Yusoff, P. *et al.* 2002). Existe controversia respecto al punto en el cuál Sprouty bloquea la activación de la cascada ERK/MAPK, puesto que las evidencias experimentales sugieren la existencia de múltiples mecanismos que dependen del contexto celular y/o del tipo de RTK que se trate. Se ha observado que las proteínas Sprouty interactúan con varios componentes de las vías de transducción mediadas por RTKs, pero en la mayoría de casos aún no queda claro cómo dichas interacciones modulan la señalización (Fig. 10).

Durante el desarrollo de los ojos en *D. melanogaster*, dSpry inhibe la señalización inducida por el Receptor para el Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR) en un punto previo (upstream o “corriente arriba” en la cascada de señalización) a la activación de Ras (Hacohen, N. *et al.* 1998), mientras que en el desarrollo de las alas y del ovario, la función de dSpry ocurre a nivel de Raf - es decir downstream de Ras- (Reich, A. *et al.* 1999). En fibroblastos de ratón, Sprouty2 (mSpry2) actúa tras la activación del Receptor para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR), upstream a Ras (Gross, I. *et al.* 2001), mientras que en células 293T, bloquea la señalización tanto de FGFR como del Receptor  $\beta$ 2 Adrenérgico, a nivel de Raf (Yusoff, P. *et al.* 2002). Se ha observado que mSpry4 interfiere con la activación de Raf independiente de Ras, mediada por el Receptor para el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (Sasaki, A. *et al.* 2003). Sin embargo, otro grupo determinó que Sprouty4 humano (hSpry4) reprime la señalización mediada por los Receptores de Insulina y de EGF en punto a nivel de Ras o anterior (Leeksa, O.C. *et al.* 2002). Estos resultados están de acuerdo con un estudio en células endoteliales

en las que mSpry4 inhibía la función de FGF y VEGF a través del desacoplamiento de la activación de Ras (Lee, S.H. *et al.* 2001). Otros estudios sobre Sprouty1 de la rana *X. laevis* (xSpry1) y Spry2 murino sugieren que Sprouty antagoniza la activación de la vía ERK/MAPK inducida por FGF en base a su capacidad para competir con Shp2 y FRS2 por la unión con el complejo Gbr2-SOS (Hanafusa, H. *et al.* 2002; Tefft, D. *et al.* 2002).



**Fig. 10 Modelo de los diferentes mecanismos de acción propuestos para Sprouty.**

Esquema general de la activación de las cascadas de señalización Ras-Raf/ERK/MAPK (en verde) y PLC-γ/PKCδ (en anaranjado) por RTKs. **A.** En ausencia de Spry y c-Cbl, la señalización ocurre a través de ambos mecanismos. Nótese que la activación de PKCδ provoca la señalización hacia la vía Raf-ERK/MAPK independiente de Ras. **B.** En presencia de c-Cbl, ésta se une a las tirosinas fosforiladas del RTK activado, resultando en su ubiquitinación y degradación final. En consecuencia, la señalización disminuye. **C.** En presencia de Spry, éste es fosforilado en residuos de tirosina, que funcionan como sitios de acoplamiento para los dominios SH2 y PTB presentes en diversas moléculas adaptadoras/efectoras. Así, la unión competitiva de Spry a Grb2, SOS o Ras resulta en la inhibición de la vía Ras-Raf/ERK/MAPK. Por medio de su RBD, Spry también puede interactuar directamente con Raf, previniendo así la activación de la vía PLC-γ/PKCδ/Raf/MAPK, independiente de Ras. **D.** Modelo propuesto para la activación de EGFR por Spry. En presencia de c-Cbl y Spry, la fosforilación de este último reclutaría a c-Cbl con gran afinidad, evitando la ubiquitinación del RTK y prolongando su actividad de señalización. RTKs: receptores tirosina kinasa; SH2: dominio de homología a Src tipo 2; PTB: dominio de unión a fosfo-tirosinas; RBD: dominio de unión a Raf (de Christofori, G. 2003).

Según este modelo, la interacción Spry-Grb2 sería mediada por la unión del dominio SH2 de Grb2, al residuo fosfo-Tyr55 de Sprouty2. Sin embargo, otros grupos observaron que la unión de Spry2 al complejo Grb2-SOS era constitutiva (Gross, I. *et al.* 2001; Rubin, C. *et al.* 2005) y que no inhibía la unión de FRS2 al mismo (Gross, I. *et al.* 2001). Se debe destacar que, a pesar de ser incapaz de asociarse con Grb2, Spry1 también es un potente inhibidor de la señalización de RTKs (Gross, I. *et al.* 2001), por lo que otros mecanismos podrían estar tomando lugar. Más aún, la interferencia en la unión de FRS2 a Grb2-SOS no explicaría el efecto inhibitorio que Spry ejerce sobre la señalización del Receptor para el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGFR), el cual no señala a través de FRS2, sino que recluta a Grb2-SOS de forma directa (Gross, I. *et al.* 2001).

Por otro lado, permanece aún sin esclarecer el papel de Sprouty en la regulación de la actividad de EGFR en mamíferos. En este contexto, diversos grupos han sugerido que Sprouty no tendría un efecto inhibitorio sobre la actividad de la cascada Ras-ERK/MAPK inducida por este receptor, sino que por el contrario podría incluso aumentar y prolongar sus efectos. Este fenómeno ha sido relacionado con la capacidad de los miembros de la familia de Sprouty para interactuar con la ligasa E3 de Ubiquitina c-Cbl, a través de una unión de alta afinidad (Egan, J.E. *et al.* 2002; Wong, E.S. *et al.* 2002; Rubin, C. *et al.* 2003). Esta enzima es la que se encarga de mediar la ubiquitinación del receptor activado, marcándolo para su internalización y posterior degradación. Así, el “secuestro” de c-Cbl por Spry inhibiría la degradación del receptor activado, prolongando su actividad (Fig. 10d).

En su conjunto, las evidencias actuales sugieren que la fosforilación de Sprouty permite a sus monómeros y/u oligómeros reclutar a aquellos cofactores requeridos para mediar sus efectos represivos. Permanece sin determinar si la fosforilación en tirosinas de Sprouty es siempre necesaria para la inhibición de la señalización de RTKs (Impagnatiello, M.A. *et al.* 2001; Hanafusa, H. *et al.* 2002).

Existen evidencias crecientes (ver Discusión) de que en ciertos contextos celulares Sprouty puede inhibir la activación de la cascada Raf/ERK/MAPK inducida por VEGF, independientemente de Ras, mediante la formación de un complejo entre Spry4 y Raf-1, a través de un dominio de la región C-terminal de Sprouty4 y, por ende, sin requerir fosforilación de su tirosina N-terminal (Sasaki, A. *et al.* 2003). Así, parece probable que Sprouty actúe a través de dos mecanismos simultáneamente: uno que es controlado de forma rápida y reversible por medio de la fosforilación del residuo tirosina conservado y otro que depende de la regulación transcripcional y de la expresión de sus genes en respuesta a los factores de crecimiento.

Resulta valioso mencionar en este punto el trabajo de Basson y sus colaboradores (Basson, M.A. *et al.* 2005), quienes utilizaron ratones en los que el gen *Spry1* se había eliminado selectivamente (*Spry1*<sup>-/-</sup>). Así, determinaron que ratones *Spry1*<sup>-/-</sup> recién nacidos exhiben defectos en el riñón y el tracto genito-urinario que se asemejan al síndrome humano CAKUT (por Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract) (Ichikawa, I. *et al.* 2002). Este fenotipo surge como resultado de alteraciones durante la morfogénesis de la Yema Uretérica (UB). En el mutante para *Spry1*, la UB es inusualmente ancha, y con frecuencia surgen múltiples yemas ectópicas desde distintas posiciones del Conducto de Wolff (WD). Como se ha señalado previamente, el factor de crecimiento clave para la inducción de la UB y su subsiguiente ramificación es GDNF (Vainio, S. *et al.* 2002). Así, en la ausencia de *Spry1*, las células del WD se vuelven hipersensibles a GDNF, de manera que el dominio de señalización de GDNF se extiende anteriormente a lo largo del WD. Es interesante reiterar que este fenotipo es revertido cuando, simultáneamente, se elimina la expresión de un alelo del gen *GDNF*.

Estudios realizados en un modelo *in vitro* confirman el efecto inhibitorio que Sprouty ejerce sobre la actividad del sistema GDNF/Ret (Ishida, M. *et al.* 2007). En dicho trabajo observaron que, en líneas celulares de neuroblastoma, *Spry2*

regula la proliferación y la diferenciación dependientes de GDNF/Ret. Paralelamente, el grupo de Taketomi estudió un modelo de ratones knock-out para *Spry2* (Taketomi, T. *et al.* 2005). En ellos se determinó que exhibían un fenotipo con alteraciones gastro-intestinales caracterizado por defectos en las contracciones del esófago e intestino, asociados a una hiperplasia del sistema nervioso entérico. Las neuronas entéricas de estos animales presentaban una actividad incrementada de las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/Akt en respuesta a GDNF, sugiriendo que el fenotipo mencionado podría deberse a un fenómeno de hipersensibilidad a dicho factor.

Todos estos datos demuestran la relevancia de las funciones que estas proteínas desempeñan en la regulación de la señalización por Ret durante el desarrollo y apoyan la hipótesis según la cual Sprouty restringe el nivel de las señales inducidas por los GFLs que las células han de percibir.

#### 5.1.2 Sprouty como supresor de tumores.

Dado que Sprouty es un regulador negativo de la señalización de RTKs mediada por factores de crecimiento, varios grupos han comenzado a investigar el papel de estas proteínas en cánceres humanos. Así, se ha determinado que la expresión de *Spry1* y *Spry2* esta significativamente disminuida en cáncer de mama (79% y 96% respectivamente) y de próstata (40% para *Spry1*), así como también en líneas celulares de melanoma (Kwabi-Addo, B. *et al.* 2004; Lo, T.L. *et al.* 2004; Tsavachidou, D. *et al.* 2004; McKie, A.B. *et al.* 2005). Los procesos por los cuales Sprouty se encuentra regulado a la baja son variables y específicos para cada tipo de cáncer. En un 82% de casos de cáncer de próstata se ha detectado hiper-metilación del promotor de *hSpry2* (McKie, A.B. *et al.* 2005). Asimismo, entre 27-40% de los casos presentaba pérdida de heterocigosidad (pérdida de un alelo) en este gen, exhibiendo el alelo restante metilado. La inducción de *Spry1* en respuesta a FGF en líneas celulares de cáncer de próstata es muy débil (Kwabi-Addo, B. *et al.* 2004). Por otro lado, en

cáncer de mama *Spry2* se encuentra silenciado, pero dicha represión no parece deberse a un proceso de hiper-metilación de su promotor, sino posiblemente a la expresión anómala de algún factor de transcripción requerido para su expresión (Lo, T.L. *et al.* 2004). En melanomas, donde la vía ERK/MAPK está sobre-activada, el mecanismo para escapar de la regulación por Sprouty es doble (Tsavachidou, D. *et al.* 2004). En aquellos melanomas en los que B-Raf tiene mutaciones activadoras, *Spry2* pierde la capacidad de unírsele y, por lo tanto, no puede reprimir su actividad. En aquellos melanomas en los que B-Raf no está mutado, la expresión de *Spry2* está disminuida, a través de un mecanismo aún desconocido. La pérdida en la expresión de Sprouty parece ser un evento tardío en la progresión del cáncer. Así, cánceres de próstata en estadios tempranos mantienen la expresión normal de *Spry2*, mientras que en cánceres metastásicos la expresión de *Spry2* sí que se encuentra disminuida (McKie, A.B. *et al.* 2005). En base a esto, se ha sugerido la posibilidad de utilizar el nivel de expresión de Sprouty como un marcador de progresión de la enfermedad.

## 6 Modelos de estudio y objetivos.

En el presente proyecto de tesis doctoral nos propusimos indagar sobre la regulación y el significado biológico de la activación del RTK Ret en respuesta a GDNF en diferentes modelos de estudio, tanto bioquímicos como fisiológicos, en los que la importancia de su función ya ha sido puesta de manifiesto previamente. Inicialmente, nos enfocamos en el estudio de la supervivencia de neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior en cultivo, en respuesta a los factores Neurotróficos GDNF y NGF. Para investigar los mecanismos moleculares de señalización que median la supervivencia inducida por GDNF en dichas células, utilizamos cultivos primarios de neuronas simpáticas aisladas a partir de diferentes líneas de ratones transgénicos, que portan mutaciones en aquellas tirosinas del dominio intracelular de Ret claves para la transducción de las señales hacia el núcleo. En dichos ratones, la expresión del gen *RET* se ha reemplazado (ratones knock-in) por una versión de la isoforma corta *RET9* -o

bien la larga *RET51*- de origen humano, con o sin mutaciones en las tirosinas en posición 981, 1015 ó 1062 a fenilalanina (Jain, S. *et al.* 2006a). Mediante los mismos, intentamos elucidar cuáles son las cascadas de señalización dependientes de GDNF necesarias para la supervivencia de neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior (SCG) en cultivo primario y qué funciones llevarían a cabo las diferentes rutas de transducción iniciadas en cada uno de dichos residuos.

Nuestros datos revelan un papel crítico para Tyr1062 de Ret9 en la supervivencia neuronal inducida por GDNF, pero no así para Tyr1015 o Tyr981. Puesto que la mutación de Tyr981 elimina la activación de Akt, se desprende que la función de la vía PI3K/Akt no es requerida para el mantenimiento de estas neuronas. En su lugar, hemos encontrado evidencias sobre un nuevo mecanismo de señalización a través de B-Raf/IKKs, que resulta ser indispensable para mediar los efectos de supervivencia inducidos no sólo por GDNF, sino también por NGF, en neuronas simpáticas.

Paralelamente, quisimos analizar la regulación de la actividad de Ret por parte de la familia de proteínas Sprouty en la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por GDNF. En este caso, realizamos nuestros estudios con cultivos primarios de neuronas simpáticas obtenidas de una línea de ratones con una mutación que anula la expresión del gen *Sprouty1* (ratones knock-out). Estos experimentos revelaron que la ausencia de Spry1, la de Spry2 o la de ambos en dichas neuronas no afectan la capacidad de supervivencia de las mismas, como así tampoco se ve alterado el patrón de activación de la cascada ERK/MAPK en respuesta a GDNF.

Continuando nuestros estudios, decidimos analizar si Spry1 ejercería algún papel en la regulación de la actividad de Ret en ausencia de Tyr1062 del receptor, tanto en nuestro modelo de supervivencia de neuronas simpáticas, como así también durante el desarrollo del sistema nervioso entérico y la

organogénesis del tracto génito-urinario. Para examinar si la modulación que *Spry1* ejerce sobre *Ret* es dependiente de *Tyr1062Ret9*, cruzamos una línea de ratones portando la mutación que anula la expresión del gen *Sprouty1* en un alelo (*Spry1*<sup>+/-</sup>) (Basson, M.A. *et al.* 2005) con ratones heterocigotos de la línea knock-in para la mutación Y1062F (*Ret*<sup>+/*Y1062F*Ret9</sup>), obteniendo una nueva línea progenitora de ratones doblemente heterocigotos para ambas mutaciones (*Ret*<sup>+/*Y1062F*Ret9</sup>; *Spry1*<sup>+/-</sup>). El análisis de la progenie de dichos ratones nos permitió determinar que la eliminación de *Spry1* rescata la agénesis renal y la muerte postnatal temprana características de la mutación *Y1062FRet9*. Así, los ratones homocigotos para ambas mutaciones presentan un desarrollo macroscópicamente normal del sistema génito-urinario. Este efecto era específico de dicho tejido, puesto que los defectos debidos a la mutación de *Ret* no eran revertidos en otros sistemas como el ENS ni el PNS.

Estos datos sugieren que *Spry1* podría modular la señalización por *Ret9* de manera independiente del sistema *Tyr1062/Grb2-SOS/Ras* durante la organogénesis renal, delineando un novedoso mecanismo de acción para las proteínas de la Familia de *Sprouty*.

## Objetivos



1 Caracterizar los eventos moleculares a través de los cuales Ret promueve la supervivencia de neuronas simpáticas en respuesta a GDNF.

1.a Determinar si existen diferencias en la capacidad de transducción de señales y de mediación de supervivencia entre las principales isoformas de Ret, Ret9 y Ret51, en respuesta a GDNF.

1.b Analizar el patrón de activación de las cascadas de señalización ERK/MAPK y PI3K/Akt mediadas por variantes de Ret con diferentes mutaciones en tirosinas críticas para su función, así como también la capacidad de las mismas para promover supervivencia inducida por GDNF.

1.c Esclarecer el significado biológico para cada una de estas mutaciones de Ret.

1.d Estudiar la relevancia de las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/Akt para la supervivencia de neuronas simpáticas en respuesta a factores neurotróficos.

1.e Determinar otros efectos fisiológicos en los que dichas cascadas de señalización estarían implicadas.

1.f Investigar el mecanismo molecular mediante el cual Ret promovería la supervivencia de estas neuronas independientemente de PI3K/Akt y ERK/MAPK.

1.g Validar la relevancia nuestras observaciones en diferentes tejidos y organismos.

1.h Caracterizar el papel de la proteína reguladora Sprouty1 para la modulación de la actividad de Ret en la supervivencia de neuronas simpáticas inducida por GDNF y, particularmente, en el patrón de activación de la cascada de señalización ERK/MAPK.

1.i Clarificar los posibles roles biológicos de Sprouty1 durante el desarrollo embrionario de neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior *in vivo*.

1.j Definir la trascendencia que la proteína Sprouty2 pudiera ejercer en la regulación de la actividad de la vía ERK/MAPK inducida por GDNF/Ret, tanto en el contexto de neuronas simpáticas de tipo silvestre como en aquellas provenientes de ratones nulos para *Sprouty1*.

1.k Analizar el perfil de expresión de los diferentes miembros de la familia de Sprouty en el Ganglio Cervical Superior.

1.l Evidenciar las consecuencias del déficit de Sprouty1 en el contexto de ratones knock-in *Y1062FRet9* sobre la supervivencia neuronal y la actividad de la ruta de señalización ERK/MAPK mediadas por GDNF.

2 Comparar los efectos de la ausencia de Sprouty1 en el marco de animales knock-in *Y1062FRet9* en otros modelos fisiológicamente relevantes.

2.a Estudiar el impacto de la doble mutación sobre la colonización del tracto gastro-intestinal por precursores neuronales de la cresta neural durante el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso Entérico.

2.b Averiguar la función *in vivo* de Sprouty1 en el establecimiento de los plexos entéricos.

2.c Describir el patrón de expresión de los miembros de la familia de Sprouty en el plexo entérico del tracto intestinal.

2.d Observar las secuelas de la eliminación de *Sprouty1* en ratones knock-in *Y1062FRet9* durante la organogénesis del sistema génito-urinario.

2.e Identificar posibles mecanismos moleculares para la regulación de Ret por Sprouty1 en el riñón de ratones knock-in *Y1062FRet9*.

3 Caracterizar el mecanismo molecular por medio del cual Sprouty1 antagoniza la vía ERK/MAPK y las implicaciones de Raf en el mismo.

*Objetivos*

Materiales y  
Métodos



## 1 Anticuerpos y Reactivos.

Los anticuerpos contra Ret9 (C-19G), Ret51 (C-20G), A-Raf (C-20G) y B-Raf (F-7), c-IAP-1 y c-IAP-2 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Los anticuerpos contra fosfo-Ser473Akt, ERK1/2 doblemente fosforiladas (Thr202/Tyr204) y fosfo-Ser180IKK $\alpha$ /fosfo-Ser181IKK $\beta$  eran de Cell Signaling (Beverly, MA, EUA). Los anticuerpos contra PDK1 y C-Raf fueron comprados a BD Biosciences (San José, CA, EUA). Anti-IKK $\alpha$  y anti-IKK $\beta$  eran de Calbiochem (Darmstadt, Alemania) mientras que anti-Bax se obtuvo de Upstate (Lake Placid, NY, EUA). Los anticuerpos contra BimEL y XIAP se compraron a Stressgen (Victoria, BC, Canadá), mientras que anti- $\beta$ -tubulina era de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El anticuerpo contra PUMA era de ProSci Inc. (Poway, CA, EUA). El anticuerpo contra el dominio Extracelular de Ret no es comercial, y fue obtenido según se describe en (Encinas, Crowder et al. 2004). Asimismo, se utilizaron anticuerpos de conejo contra Spry1 (Zymed; dilución 1/100), Spry2 (Sigma; dilución 1/200), Spry3 (Santa Cruz; dilución 1/50) o Spry4 (Santa Cruz; dilución 1/50), junto con el anticuerpo monoclonal contra Tau-1 (Chemicon; dilución 1/200). El anticuerpo primario contra citoqueratina era de Sigma (Surrey, UK). Asimismo, se usaron anticuerpos secundarios conjugados a las sondas fluorescentes Alexa488 y Alexa546 (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, UK). Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de ratón y de conejo, conjugados a peroxidasa se adquirieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, EUA). Finalmente, también empleamos anticuerpos contra FLAG (M2; Sigma), HA (Sigma), c-Cbl (Cell Signal) y fosfo-C-Raf (sc-28005-R; Santa Cruz).

LY294002, PD98059 y U0126 se obtuvieron de Calbiochem. Todos los reactivos restantes se compraron a Sigma, excepto en donde se especifica el origen.

Todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron llevadas a cabo en un equipo GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems, excepto los ensayos de PCR en tiempo real (ver más adelante).

## 2 Animales.

Todos los procedimientos en los que se utilizaron ratones en nuestro proyecto, se realizaron bajo la supervisión del personal pertinente de nuestra institución, respetando todas las disposiciones legales y éticas vigentes para la manipulación de animales de experimentación.

### 2.1 Ratones knock-in para *RET*.

Los animales knock-in para *Ret* utilizados en este trabajo fueron generosamente obtenidos del grupo de Eugene M. Johnson Jr. y Jeffrey Milbrandt. En estos animales las secuencias de los cDNAs codificantes para las isoformas humanas de *Ret9* (o bien *Ret51*), con o sin las mutaciones de tirosina a fenilalanina ya citadas, fueron recombinadas homológamente dentro del primer exón del gen *RET*, interrumpiendo así la síntesis de *Ret* murino endógeno (Enomoto, H. *et al.* 2001; Jain, S. *et al.* 2004). Brevemente, los diferentes constructos con cDNAs de *Ret* se produjeron en pcDNA3.1 mediante mutagénesis por PCR, verificados por secuenciación y a continuación, subclonados en el denominado "targeting vector". Para la recombinación homóloga, se usaron las células 129Sv derivadas de células madre embrionarias R1, a partir de las cuales se obtuvieron los ratones mutantes mediante métodos habituales (Enomoto, H. *et al.* 2001). La transmisión de los alelos recombinados en la línea germinal fue confirmada por ensayos de Southern Blot (Jain, S. *et al.* 2004). Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones con un trasfondo genético mixto (129/SvJ; C57BL/6). Se determinó rutinariamente el genotipo de cada animal mediante PCR (40-45 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 60°C y 45 seg. a 72°C, con un ciclo final de 5 min. a 72°C) para detectar la presencia de los alelos wild-type y/o knock-in de *Ret* (Jain, S. *et al.* 2004) con los siguientes oligonucleótidos cebadores (primers):

P6855 (pimer común): 5'- CAGCGCAGGTCTCTCATCAGTACCGCA-3'  
P4828 (primer wt): 5'- CAGTACCCGCAGCGACCCGGTTC-3'  
P8889 (primer ki): 5'- AGCATCCCTCGAGAAGTAGAGG-3'

## 2.2 Ratones knock-out para *Sprouty1*.

Los ratones knock-out *Sprouty1* utilizados en este trabajo fueron generosamente cedidos por M. Albert Basson. De forma resumida, mediante la tecnología Cre/lox (Lewandoski, M. *et al.* 1997; Rodriguez, C.I. *et al.* 2000), se produjeron líneas de ratones que portaban un alelo de *Spry1* en el cual se había eliminado la secuencia codificante (*Spry1*<sup>-/-</sup>). Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones con un trasfondo genético mixto (129/SvJ; C57BL/6; FVB/N). Los ratones heterocigotos para esta mutación (*Spry1*<sup>+/-</sup>) eran viables, fértiles y con un fenotipo aparentemente normal (Basson, M.A. *et al.* 2005). La delección de dicho alelo se confirmó mediante genotipado por PCR (40-45 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 55°C y 45 seg. a 72°C, con un ciclo final de 5 min. a 72°C) con los siguientes primers:

P1 (primer wt):                    5'-CTCAATAGGAGTGGACTGTGAAACTGC-3'  
P2 (primer común):                5'-GGGAAAACCGTGTCTAAGGAGTAGC-3'  
P3 (primer ko):                    5'-GTTCTTTGTGGCAGACACTCTTCATTC-3'

## 3 Cultivos Celulares.

### 3.1 Medios de Cultivo.

**DMEM 10%-293T:** Dubelcco's modified Eagle's medium (Gibco-Invitrogen) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (hiFBS; de Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2mM L-Glutamina (Gibco-Invitrogen), 10% Aminoácidos no esenciales (NEAAs; de Gibco-Invitrogen), 10% Piruvato de Sodio (Gibco-Invitrogen) y Penicilina/Streptomina (20µg/ml cada una).

**DMEM 10%-SH-SY5y:** Dubelcco's modified Eagle's medium (Gibco-Invitrogen) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (hiFBS; de Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2mM L-Glutamina (Gibco-Invitrogen) y Penicilina/Streptomina (20µg/ml cada una).

**Leibovitz L15 (Gibco-Invitrogen).**

**AM0 completo:** Medio AM0 (Gibco-Invitrogen) con 10% hiFBS, 2mM L-Glutamina, factores antimetabólicos -20 $\mu$ M uridina (Sigma) y 20 $\mu$ M 5-flúor-2'-deoxiuridina (Sigma)- y Penicilina/Streptomocina (100 $\mu$ g/ml c/u)

### 3.2 Líneas.

La línea celular HEK293T (por Human Embryonic Kidney) fue generosamente cedida por el Grupo de Neurobiología del Desarrollo y Regeneración Neuronal que dirige el Dr. Eduardo Soriano. Estas células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM 10%-293T en atmósfera húmeda controlada al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

La línea celular de Neuroblastoma Humano SH-SY 5y fue adquirida de la American Tissue Culture Collection (ATTC). Estas células fueron cultivadas en DMEM 10%-SH-SY5y en atmósfera húmeda controlada al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

### 3.3 Cultivos primarios.

Neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior (SCG) de ratones recién nacidos fueron disecadas y cultivadas como se describe en (Deckwerth, T.L. *et al.* 1993). En resumen, inmediatamente después de la disección, los ganglios –mantenidos en medio de cultivo Leibovitz L15 durante el proceso– fueron secuencialmente tratados, primero con colagenasa (1 mg/ml) por 30 min a 37°C y luego otros 30 min con tripsina (2,5 mg/ml) a 37°C (ambas enzimas fueron adquiridas de Worthington, Lakewood, NJ, EUA). Tras un lavado con medio de cultivo AM0 completo, los ganglios fueron resuspendidos en un volumen apropiado de dicho medio de cultivo y sus células disociadas por “trituration”, pasándolos suavemente 40-50 veces por la punta de una pipeta automática P200. Por último, las células fueron plaqueadas en placas de cultivo que previamente habían sido recubiertas con una preparación de colágeno de rata, en AM0 completo con 50 ng/ml de NGF (de Alomone Labs, Jerusalem, Israel) y 3,33  $\mu$ g/ml de afidicolina (AG Scientific, San Diego, CA, EUA).

### 3.3.1 Ensayos de supervivencia neuronal.

Para los ensayos de supervivencia, 1/10 a 1/15 de ganglio por cada pocillo de una placa "multi-well" de 24 pocillos (Falcon, BD Biosciences), fueron cultivados (en presencia de vectores virales a partir del segundo día de cultivo en los casos que corresponda) por 5 días, al cabo de los cuales fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con AM0 y cambiadas a medio AM0 completo que contenía 50 ng/ml de NGF (como control positivo), o bien anticuerpos bloqueantes contra NGF, en ausencia (deprivación, como control negativo) o presencia de 50 ng/ml de GDNF (Alomone) y 100 ng/ml de Fc-GFR $\alpha$ 1 (de R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Así, la supervivencia se determinó contando un campo determinado de cada pocillo antes y después de los diferentes tratamientos en los puntos temporales indicados en cada experimento.

Al inicio de cada experimento, por lo general se contaban 200-300 neuronas por campo, realizando triplicados para cada condición. Los resultados se expresan como los porcentajes de neuronas respecto de las células contadas inicialmente. Cada experimento fue repetido como mínimo 3 veces, y los datos independientes reunidos y expresados como la media  $\pm$  S.D. (desviación estándar).

Para la medición del diámetro del soma neuronal, las correspondientes micro-fotografías fueron analizadas con el programa informático AnalySIS de Soft Imaging System GmbH (Alemania).

### 3.3.2 Ensayos de Inmunoprecipitación y Western Blot.

Para los ensayos de Inmunoprecipitación y Western Blot las neuronas fueron plaqueadas a concentraciones mayores (normalmente 1 ó 2 ganglios por pocillo en placas multi-well de 24 ó 12 pocillos, respectivamente) y mantenidas en medio de cultivo AM0 completo con 50 ng/ml de NGF y 3,33  $\mu$ g/ml de afidicolina por 5-7 días (en presencia de los vectores virales a partir del 2<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> día de cultivo en los casos que corresponda), tras los cuales fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con AM0 y mantenidas en deprivación (AM0

+ anticuerpos bloqueantes contra NGF) toda la noche (ON). A la mañana siguiente las neuronas fueron tratadas por 10 min (o 24 hs donde se indica) con medio AM0 completo que contenía 50 ng/ml de NGF (como control positivo), o bien anticuerpos bloqueantes contra NGF, en ausencia (deprivación, como control negativo) o presencia de 50 ng/ml de GDNF + 100 ng/ml de Fc-GFR $\alpha$ 1. Al término de esta estimulación, las células fueron lisadas en Buffer NP-40 (buffer conteniendo 1% de detergente no iónico Nonidet P-40, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 1mM EGTA), suplementado con un cóctel fresco de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), 1mM Ortovanadato de Sodio, 10mM Fluoruro de Sodio y 50 mM  $\beta$ -Glicerofosfato. Para los experimentos de Western Blot las células podían ser alternativamente lisadas en Buffer de Laemmli directamente. Las proteínas de estos lisados fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS (SDS-PAGE), electro-transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) y dichas membranas, bloqueadas 30-60 min con TBS-T [una solución de Buffer TBS con 0,01% de detergente Tween20 (Sigma)] al 5% de albúmina de suero bovino (BSA; de Sigma). A continuación se las incubó ON a 4°C en TBS-T al 2% de BSA con los anticuerpos primarios indicados, seguido de 3-5 lavados e incubadas con anticuerpos secundarios dirigidos contra los primarios, y conjugados a la enzima peroxidasa, para ser detectados mediante la reacción quimioluminescente con el reactivo ECL-Advance (Amersham, GE Healthcare) en películas fotosensibles para rayos X (SuperRX, Fujifilm). Dichas películas fueron luego digitalizadas con un scanner EPSON Perfection 3200 PHOTO utilizando el programa informático Adobe Photoshop. El análisis densitométrico de las bandas detectadas fue llevado a cabo con el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Para el caso de los ensayos de Inmunoprecipitación, los lisados obtenidos en buffer NP-40 se incubaron por tiempos variables (entre 2hs y ON a 4°C) con los anticuerpos correspondientes, en presencia de pequeñas bolas de sefarosa unidas covalentemente a proteína A y/o proteína G (Sigma), luego se lavaron con buffer NP-40 fresco y finalmente, los inmuno-complejos resuspendidos en Buffer de Laemmli y hervidos (5 min), para su posterior análisis por Western Blot.

#### 4 Transfección de células de mamíferos.

##### 4.1 Fosfato Cálcico.

Método económico, sencillo y ampliamente utilizado para la introducción de material genético de forma eficiente en ciertas líneas celulares como HEK293T. Se basa en la formación de precipitados insolubles de sales de calcio que atrapan al DNA y se depositan sobre la superficie celular, tras lo cual son endocitados por las células, donde el material genético se libera. Resulta una técnica poco aplicable en cultivos primarios, debido a su toxicidad hacia dichas células, pero es altamente efectivo en ciertas líneas celulares, como en este caso las 293T. El método emplea 2 soluciones que contienen 3 ingredientes esenciales, además de agua:

Solución 1: -CaCl<sub>2</sub> 250 mM  
-DNA  
-H<sub>2</sub>O

Solución 2: -Buffer HBS 2X pH 7

Se procede añadiendo gota a gota la solución 1 sobre la solución 2 en constante agitación (por Vórtex). El pH del Buffer HBS 2X es un parámetro crítico en este protocolo y debe ajustarse de manera precisa y, dentro de lo posible, se debe controlar la calidad (y pH) de las restantes soluciones usadas.

##### 4.2 Mediada por vectores lentivirales.

Los vectores basados en lentivirus (FSVsi) para la expresión de “short-hairpin” RNAs (shRNAs) para el silenciamiento de genes por interferencia del RNA mensajero, comprendían un promotor U6, para la expresión del shRNA, y la variante “Venus” de YFP (proteína fluorescente amarilla) bajo el control del promotor SV40, para monitorear la eficiencia de transfección. Las partículas lentivirales fueron producidas en células de la línea 293T, mediante la co-transfección por la técnica del fosfato cálcico del mencionado vector junto con otros dos plásmidos codificantes para la envoltura (VSV-G) y el sistema de empaquetamiento ( $\Delta$ 8.9) de las partículas víricas. Al día siguiente de la

transfección, las células 293T fueron cambiadas a medio de cultivo AM0, en ausencia de agentes antimitóticos, e incubadas por 2-3 días más. A continuación se recolectaron los sobre-nadantes (el medio de cultivo usado que posee las partículas víricas), se filtraron con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , se suplementaron con NGF y factores antimitóticos, y finalmente se aplicaron directamente sobre las neuronas en cultivo primario. Normalmente, las neuronas eran infectadas al segundo o tercer día de cultivo, por una noche (ON). En los experimentos con el objeto de determinar la eficiencia del silenciamiento de genes por Western Blot, las células eran mantenidas por 5 días en cultivo con NGF, seguido de 2 días adicionales en presencia de GDNF, privación o NGF (ver más arriba). En aquellos casos en los que el silenciamiento génico era deletéreo para las células, se utilizó el inhibidor general de Caspasas BAF (50 $\mu\text{M}$ ), añadiéndose 2-3 días antes de la preparación de los lisados neuronales. Para la expresión de v600EB-Raf, el cDNA de origen humano de B-Raf conteniendo la mutación V600E fue clonado en el vector lentiviral de expresión FCMV, bajo la actividad del promotor del citomegalovirus humano. Cuando era necesario realizar infecciones secuenciales, las células eran infectadas ON con el primer grupo de lentivirus, durante el día siguiente se las dejaba recuperarse y se las re-infectaba nuevamente ON con el segundo grupo de lentivirus. Tras esta segunda infección las neuronas eran incubadas otros tres días en NGF, antes de continuar con los diferentes tratamientos experimentales. Aquellos virus cuyos efectos eran potencialmente beneficiosos para la supervivencia (como v600EB-Raf o shRNA contra Bax) eran añadidos primero, mientras que los que pudieran tener efectos perjudiciales se agregaban en segundo lugar. Las secuencias utilizadas para la generación de los shRNAs fueron:

PDK1:	5'-TGGTGAGGTCCCAAAGTGA-3'
PDK1 control:	5'-GGGAATTCCTAAGGACGC-3'
A-Raf A1:	5'-CCTATGGTGTGTGCTCTAT-3'
A2:	5'-TGCGTTGACATGAGTACCAA-3'
B-Raf B1:	5'-GCTACCTTATTCAAACATCAA-3'
B2:	5'-GCTTACGAGAAATACACTGAA-3'
C-Raf C1:	5'-CCTATGGTGTGTGCTCTAT-3'

C2:	5'-TGCGTTGACATGAGTACCAA-3'
Raf control:	5'-GTCCGGTTCGTTTAGAGTCTT-3'
IKK $\alpha$ $\alpha$ :	5'-CAGGCTCTTTCAGGGACAT-3'
IKK $\beta$ $\beta$ :	5'-GCTGCACATTTGAATCTGTAT-3'
$\beta$ 2:	5'-GCTCTTAGATACCTTCATGAA-3'
IKK control:	5'-GCTCTCTTGAAGGTTGATGTA-3'
Bax:	5'-GCAGCTGACATGTTTGCTGAT-3'
Bax control:	5'-ACTGCCTTGGACTGTGTCTTT-3'
Sprouty2:	5'-GGAGCCGGATCCAAGAGAT-3'
Sprouty2 control:	5'-GAGTCACGGAGCATGACAC-3'

## 5 Histología y tinciones por inmuno-fluorescencia.

### 5.1 Ganglio Cervical Superior.

SCGs de ratones recién nacidos de los genotipos indicados fueron disecados e inmediatamente fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7-7.4) a 4°C. Posteriormente se los incluyó en parafina y secciones de 5  $\mu$ m se procesaron mediante la tinción de Nissl para el conteo de cuerpos neuronales. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  S.D. de 3 ganglios por cada genotipo.

### 5.2 Riñones.

Riñones de ratones recién nacidos fueron disecados e inmediatamente fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7-7.4) a 4°C. Posteriormente se los incluyó en parafina y secciones de 5  $\mu$ m se procesaron mediante la tinción de H-E (Hematoxilina-Eosina) o tinción de PAS (Periodic acid-Schiff) para el estudio de la citoarquitectura. Los conteos de glomérulos se realizaron según se describe en (Jain, S. *et al.* 2006). Básicamente, se obtuvieron secciones seriadas de riñones completos de animales recién nacidos y se contaron los glomérulos cada 120  $\mu$ m (Majumdar, A. *et al.* 2003). Los análisis cuantitativos fueron realizados con el programa informático SigmaPlot (SPDD Inc.) y la

significancia estadística se determinó mediante la Prueba t de Student. Todas las evaluaciones histológicas fueron realizadas bajo un sistema ciego.

Para la tinción de Inmunofluorescencia contra citoqueratina, riñones embrionarios fueron disecados e instantáneamente fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7-7.4) a 4°C. Luego de 3 lavados extensivos en PBS con Tritón X-100 al 0,1% (PBS-Tx), las muestras fueron bloqueadas (PBS-Tx al 5% de hiFBS) e incubadas ON a 4°C en presencia del anticuerpo primario contra citokeratina (Sigma, Surrey, UK). Subsiguientemente, se realizó un segundo lavado y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a la sonda fluorescente a Alexa488 (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, UK), como se describe en (Basson, M.A. *et al.* 2005). Finalmente, los riñones fueron aclarados y montados en medio de montaje Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK), y examinados con un microscopio de epifluorescencia Nikon 80i. Alrededor de 5 imágenes digitales de cada muestra fueron capturadas a diferentes planos focales de donde se calculó el número total de puntas de la ramificación uretérica, mediante el software Nikon NIS-Elements.

### 5.3 Plexo entérico.

#### 5.3.1 Inmuno-fluorescencia.

Plexos mientéricos de ratones recién nacidos fueron disecados y separados cuidadosamente de la capa submucosa intestinal. Inmediatamente después fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7-7.4) a 4°C, lavados extensivamente con PBS-Tx y bloqueados en PBS-Tx al 5% de hiFBS. A continuación fueron incubados ON a 4°C con anticuerpos de conejo contra Spry1 (Zymed; dilución 1/100), Spry2 (Sigma; dilución 1/200), Spry3 (Santa Cruz; dilución 1/50) o Spry4 (Santa Cruz; dilución 1/50), junto con el anticuerpo monoclonal de ratón contra Tau-1 (Chemicon; dilución 1/200), como marcador específico de neuronas. Luego del lavado de los anticuerpos primarios, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con las sondas fluorescentes Alexa488 y Alexa546 (Molecular Probes, Invitrogen,

Paisley, UK). Los plexos fueron analizados bajo un microscopio confocal Olympus.

### 5.3.2 Tinción histoquímica para Acetilcolinesterasa.

Tractos gastro-intestinales de ratones recién nacidos fueron disecados y fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7-7.4) a 4°C, transferidos a una solución saturada de Sulfato de Sodio y almacenados ON a 4°C. A continuación, se los incubó en una solución conteniendo 0,2 mM Ethopropazina HCL (Sigma), 4 mM Yoduro de Acetil-ticolina (Sigma), 10 mM Glicina, 2 mM Sulfato Cúprico y 65 mM de Acetato de Sodio (pH5,5), durante 2-4 hs a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica para detectar la actividad de la enzima acetil-colinesterasa (marcadora de neuronas del plexo entérico) se desarrolló al sumergir las muestras en una solución de Sulfuro de Sodio (1,25%, pH 6) por 90 seg. El tejido fue enjuagado con agua previamente al montaje en 50% Glicerol en PBS, para la obtención de microfotografías bajo una lupa binocular de disección. Para un mejor montaje y visualización, los plexos fueron cortados longitudinalmente a lo largo del borde mesentérico y extendidos con la superficie serosa hacia arriba.

### 6 RT-PCR.

Ganglios Cervicales Superiores (SCG) de ratones wild-type recién nacidos fueron disecados e inmediatamente procesados para el aislamiento del RNA total, mediante el kit RNeasy de Qiagen, incluyendo el tratamiento opcional con DNasas para eliminar posibles contaminaciones de DNA genómico. La técnica se realizó según las recomendaciones del fabricante. A continuación dichas muestras de RNA total fueron sometidas a la reacción de retro-transcripción a cDNA mediante el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las condiciones de esta reacción fueron: 2 min a 90°C (sólo el RNA templado), 10 min a 25°C, 60 min a 42°C y 5 min a 95°C. Dicho cDNA total fue utilizado para la detección de los transcritos de Spry1 a Spry4, mediante una reacción de PCR estándar con las

siguientes parejas de primers diseñados para amplificar de forma específica el cDNA de los cuatro homólogos:

Spry1F: 5'-AGCCTGCTACGATTCTGTCC-3'  
Spry1R: 5'-AAGACACACTGCTGCTGCTC-3'  
Spry2F: 5'-ATCCGAGTGCAGCCTAAATC-3'  
Spry2R: 5'-TGTCCCTCATCGTCATTGGAG-3'  
Spry3F: 5'-CTTCCCTCATTGTGCAAACC-3'  
Spry3R: 5'-TCAGCTTCTCCCTTCAGAGC-3'  
Spry4F: 5'-CCCAAGGTGGTTCACTGTAAG-3'  
Spry4R: 5'-CAAGAGCCCTCATCATCCTC-3'

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 32-35 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 55°C y 45 seg. a 72°C, con un ciclo final de amplificación a 72°C por 10 min. Resultados similares se obtuvieron a partir de neuronas purificadas de SGC, indicando que los mRNAs de los distintos miembros de Spry detectados en SCGs totales provienen de las neuronas de los mismos (datos no enseñados) y no de otros tipos celulares.

## Resultados

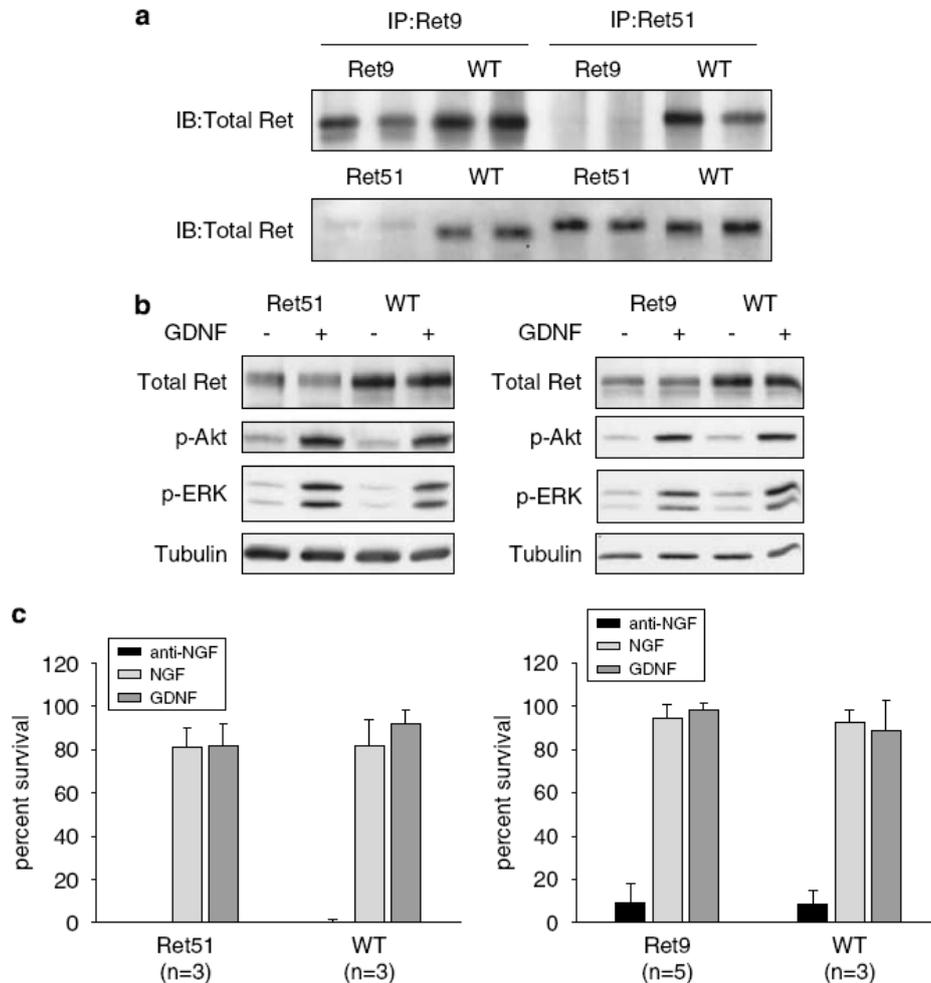


1 Neuronas de ratones knock-in para Ret9 o Ret51 exhiben respuestas similares a GDNF respecto a ratones wild-type.

Como se explicó en la introducción, en el presente trabajo utilizamos ratones knock-in que expresaban las isoformas humanas de Ret9 o Ret51 en reemplazo del gen *RET* endógeno. Inicialmente, quisimos analizar si las diferencias en la secuencia C-terminal de cada isoforma de Ret afectaban su capacidad de señalización y/o bioactividad en neuronas simpáticas. En primer lugar, se verificó la expresión específica de cada isoforma de Ret mediante inmunoprecipitación del receptor a partir de lisados de neuronas simpáticas en cultivo que expresaban Ret de tipo silvestre (wild-type), o bien Ret9 o Ret51 respectivamente (Fig.11a).

A continuación, determinamos la capacidad de cada isoforma para activar las vías de señalización PI3K/Akt y Ras-ERK/MAPK. Así, lisados provenientes de cultivos de neuronas simpáticas estimulados por 10 min. con GDNF fueron procesados por Western Blot (WB) y analizados con fosfo-anticuerpos específicos que reconocen a fosfo-Ser473Akt o a las formas de Erk1/2 doblemente fosforiladas. No se detectaron diferencias en la capacidad de activar dichas cascadas de señalización entre Ret9 o Ret51 ni en sus respectivos hermanos wild-type, excepto que los ratones mutantes parecen expresar niveles levemente menores de Ret que los animales wild-type (Fig.11b).

Finalmente, estudiamos la supervivencia promovida por GDNF sobre los cultivos primarios de neuronas de animales Ret9 y Ret51. Como se muestra en Fig.11c, GDNF promovía la supervivencia de 80-90% de neuronas de ratones knock-in para Ret9 y Ret51, valores comparables a los de sus correspondientes hermanos wild-type, tanto en respuesta a GDNF como a NGF. En consecuencia, a pesar de las diferencias encontradas en la secuencia aminoacídica entre Ret9 y Ret51, ambas isoformas parecen inducir respuestas biológicas similares frente a GDNF y NGF en cultivos primarios de neuronas simpáticas.

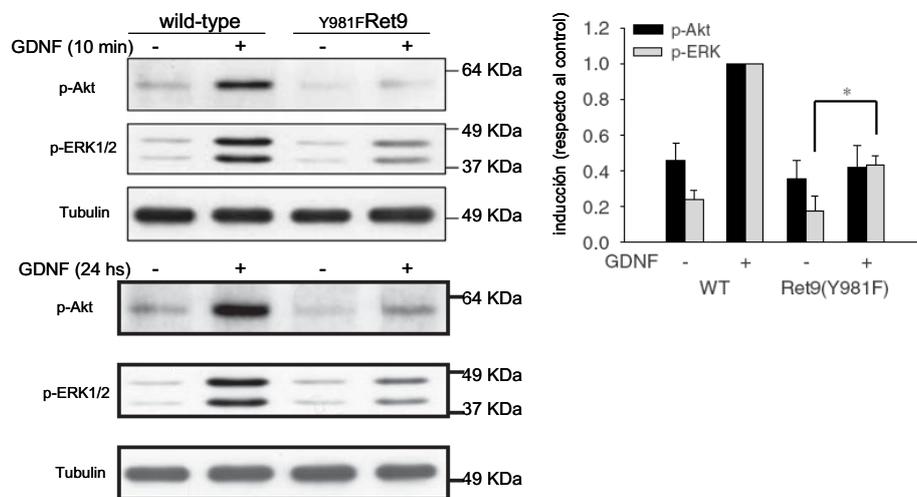


**Fig. 11 Neuronas de ratones knock-in para *Ret9* o *Ret51* exhiben respuestas similares a GDNF.**

(a) Expresión de la isoforma de Ret esperada por cada tipo de ratones knock-in. Lisados de neuronas simpáticas en cultivo de ratones que expresan Ret9 o Ret51 de origen humano fueron inmunoprecipitados con anticuerpos específicos para cada isoforma y detectados por WB con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (Ret total). Nótese la diferencia en la movilidad electroforética entre Ret9 y Ret51. (b) La señalización en neuronas que expresan Ret9 o Ret51 es indistinguible de la de neuronas wt. Las células fueron estimuladas con GDNF por 10 min., sus lisados fueron resueltos por WB y detectados con anticuerpos fosfo-específicos contra fosfo-Ser473Akt y ERK1/2 fosforiladas. (c) GDNF mantiene totalmente la supervivencia de neuronas simpáticas de ratones knock-in para *Ret9* y para *Ret51*. Neuronas de cada genotipo fueron cultivadas en NGF por 5 días y entonces, cambiadas a medio de cultivo conteniendo o bien un anticuerpo bloqueante anti-NGF (sin factores tróficos -deprivación-), NGF (control positivo), o bien GDNF. La supervivencia neuronal fue medida a las 48hs como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El número entre paréntesis corresponde al número de animales analizados. WB: técnica de Western Blot; wt: wild-type.

2 La activación de Akt y ERK1/2 se ve afectada de forma específica por la mutación de Tyr981, Tyr1015 o Tyr1062 de Ret9.

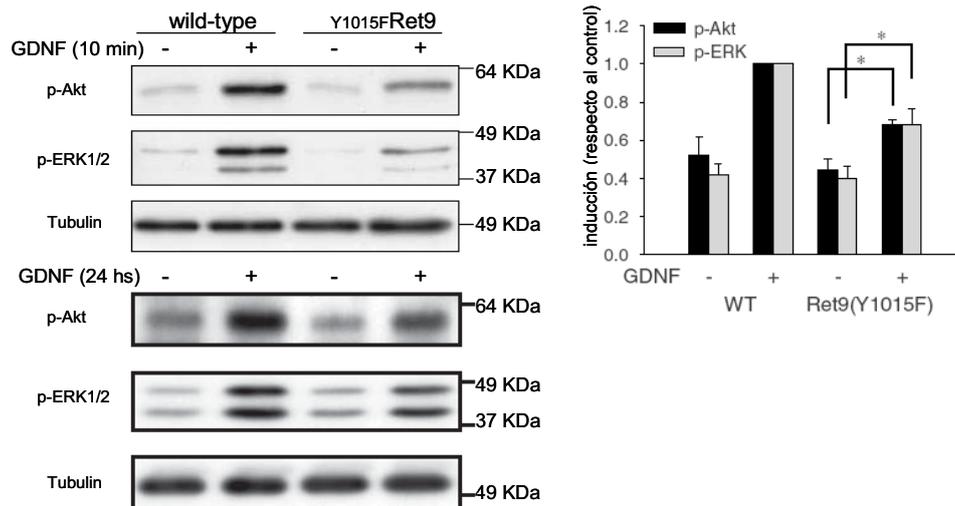
Para indagar acerca del papel que las tirosinas 981, 1015 y 1062 de Ret desempeñan en la señalización intracelular mediada por GDNF en neuronas simpáticas, estudiamos la activación de Akt y ERK1/2 tras la inducción aguda (por 10 min.), o bien tras un tratamiento por 24 hs, con GDNF en lisados de cultivos primarios de neuronas simpáticas obtenidas de animales knock-in para las variantes de Ret9 en las que cada una de dichas tirosinas ha sido reemplazada por fenilalanina, y se compararon con sus respectivos hermanos wild-type. Así, pudimos observar que la mutación de Tyr981 elimina casi completamente la fosforilación de Akt, mientras que reduce, aunque de manera menos drástica, la activación de ERK1/2, tanto cuando la estimulación es transitoria, como cuando es por 24 hs (Fig. 12).



**Fig. 12 La mutación en Tyr981 afecta la señalización mediada por GDNF.**

Inmunoblots representativos con anticuerpos contra fosfo-Ser473Akt y ERK1/2 fosforiladas de lisados de neuronas *Y981FRet9* vs. los respectivos controles de hermanos wild-type. La mutación en Tyr981 causó una eliminación casi total de la activación de Akt y redujo, en menor medida la de ERK. Resultados similares se obtuvieron tanto a 10 min. de estimulación con GDNF (panel superior izquierdo) como a 24 hs de tratamiento (panel inferior). El panel de la derecha muestra el análisis densitométrico del número indicado de experimentos independientes. Los datos están expresados como la media  $\pm$  S.E.M. de la relación de inducción (respecto al control estimulado). Los asteriscos indican  $p < 0,05$  en pruebas t de dos colas.

En ambos tratamientos, la mutación Tyr1015Phe resultaba en una disminución aproximada del 50% en la capacidad del receptor para activar las vías de transducción estudiadas (Fig. 13).



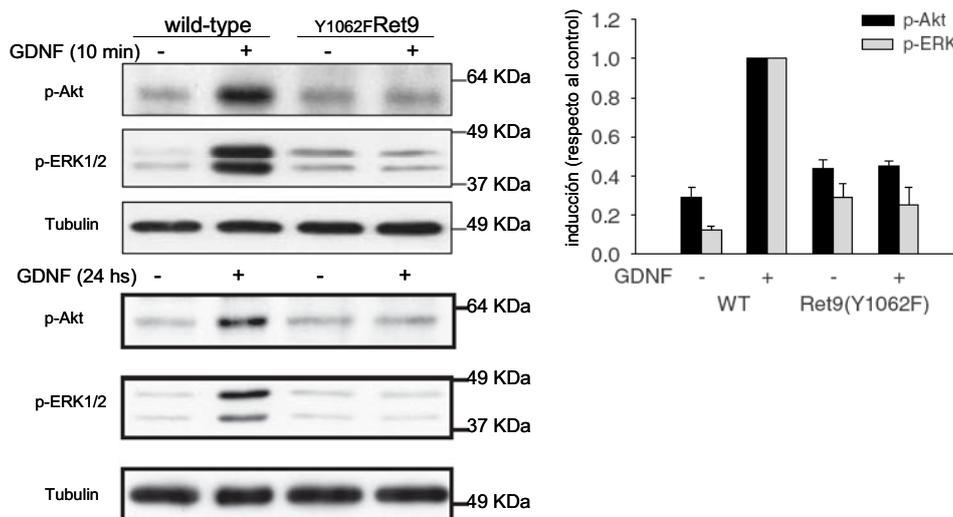
**Fig. 13 La mutación en Tyr1015 de Ret afecta la señalización mediada por GDNF.**

Inmunoblots representativos con anticuerpos contra fosfo-Ser473Akt y ERK1/2 fosforiladas de lisados de neuronas *Y1015FRet9* vs. los respectivos controles de hermanos wild-type. En neuronas *Y1015FRet9* ambas vías de señalización disminuyeron aproximadamente el 50%. Resultados similares se obtuvieron tanto a 10 min. de estimulación con GDNF (panel superior izquierdo) como a 24 hs de tratamiento (panel inferior). El panel de la derecha muestra el análisis densitométrico del número indicado de experimentos independientes. Los datos están expresados como la media  $\pm$  S.E.M. de la relación de inducción (respecto al control estimulado). Los asteriscos indican  $p < 0,05$  en pruebas t de dos colas.

Finalmente, y de manera consistente con observaciones anteriores, en aquellas células provenientes de ratones knock-in para la mutación en Tyr1062, la activación de ambas cascadas moleculares se encontraba reducida a los niveles basales (Fig. 14).

Sorprendentemente, se ha observado que, en el contexto de Ret51, ninguna de las tres mutaciones ocasiona cambios significativos en los patrones de activación de Akt ni de ERK1/2 (Jain, S. *et al.* 2006). Existen evidencias de que tanto ratones que expresan *Y1062FRet51* como aquellos que portan la

variante Y1096FRet51, desarrollan riñones normales, mientras que los animales Y1062FRet9 presentan agénesis renal (Jain, S. *et al.* 2006). Estas evidencias, junto con nuestros datos sugieren que Tyr1096 tendría un papel redundante con Tyr1062 en la señalización inducida por Ret51.



**Fig. 14 La mutación en Tyr1062 de Ret afecta la señalización mediada por GDNF.**

Inmunoblots representativos con anticuerpos contra fosfo-Ser473Akt y ERK1/2 fosforiladas de lisados de neuronas Y1062FRet9 vs. los respectivos controles de hermanos wild-type. La mutación Y1062FRet9 bloqueaba la activación de ambas vías analizadas hasta alcanzar sus niveles basales. Resultados similares se obtuvieron tanto a 10 min. de estimulación con GDNF (panel superior izquierdo) como a 24 hs de tratamiento (panel inferior). El panel de la derecha muestra el análisis densitométrico del número indicado de experimentos independientes. Los datos están expresados como la media  $\pm$  S.E.M. de la relación de inducción (respecto al control estimulado). Los asteriscos indican  $p < 0,05$  en pruebas t de dos colas.

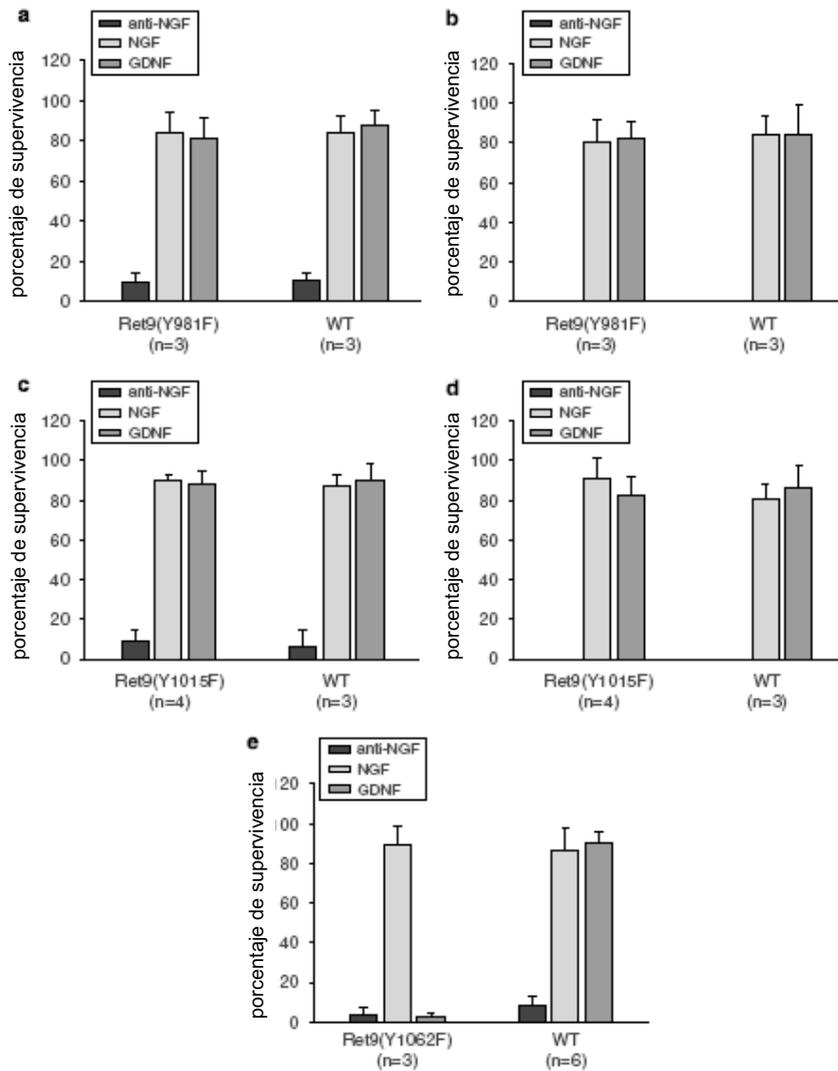
Para caracterizar los efectos de las diferentes mutaciones en tirosinas de Ret evitando las posibles confusiones derivadas de los efectos redundantes de Tyr1096, todos los estudios del presente trabajo fueron realizados únicamente en el contexto de Ret9.

3 Sólo la mutación Tyr1062Phe -pero no Tyr981Phe o Tyr1015Phe- elimina la supervivencia mediada por GDNF en los cultivos primarios de neuronas.

Habiendo demostrado que las mutaciones de Tyr981, Tyr1015 ó Tyr1062 en Ret9 afectaban de manera diferencial la habilidad de dicho receptor para transducir las señales de GDNF hacia el núcleo, quisimos analizar los efectos de cada una de dichas mutaciones en la supervivencia neuronal mediada por GDNF. Dadas las evidencias que sugieren un papel de la vía PI3K/Akt en la supervivencia neuronal (Crowder, R.J. *et al.* 1998; Mazzoni, I.E. *et al.* 1999), comprobamos con asombro que, en nuestro modelo de estudio, las neuronas simpáticas de animales *Y981FRet9* no exhibían ninguna alteración en la supervivencia (Fig. 15a y b, y Fig. 16a) tanto a 48 hs como a 7 días de estimulación con GDNF, a pesar de que la inducción de Akt en dichas células se encuentra seriamente comprometida (Fig. 12). Así, los niveles de supervivencia de estas células eran similares a aquellos de las correspondientes células de sus hermanos wild-type y a las provenientes de ratones knock-in para *Ret9* sin mutaciones. Asimismo, dicha supervivencia inducida por GDNF era comparable a la respuesta obtenida frente a NGF, como mínimo durante los 7 días que se analizaron en estos experimentos (Fig. 15a y b y Fig. 16a).

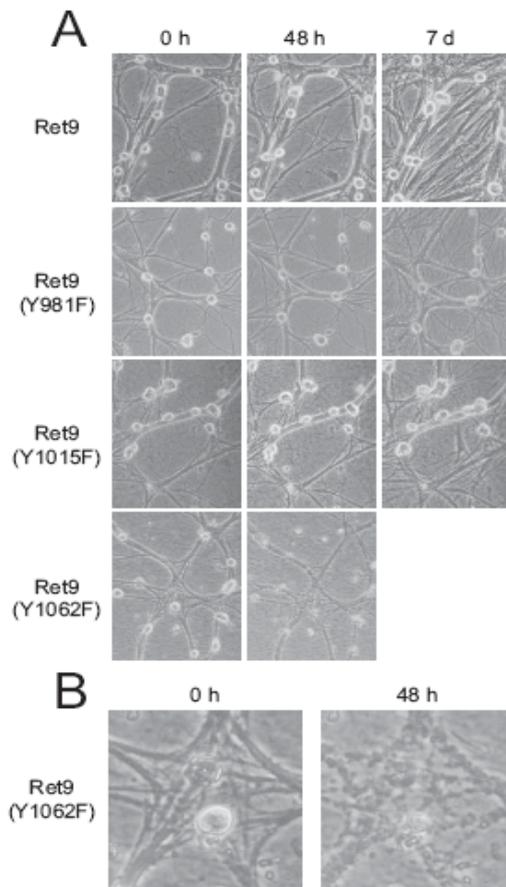
Las neuronas *Y1015FRet9* respondían al tratamiento de manera similar, es decir, sin verse afectada su capacidad de sobrevivir en respuesta a GDNF ni a NGF, con respecto a los controles (Fig. 15c y d, y Fig. 16a), indicando que la inactivación parcial de las vías de transducción de señales en estas células no sería suficiente para afectar significativamente su supervivencia. Finalmente, tal como era de esperar, la mutación de Tyr1062 en Ret9 prevenía totalmente, y de forma específica, la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por GDNF a 48 hs (Fig. 15e y Fig. 16 a y b), mientras que respondían normalmente a NGF tanto a 48 hs como a 7 días de tratamiento. Estos datos sugerirían un posible papel de la vía Erk/MAPK en el mantenimiento de neuronas simpáticas en cultivo mediado por GDNF. De forma resumida, a pesar de que las mutaciones en Tyr981 y Tyr1015 disminuyen diferencialmente la activación de Akt y ERK1/2, no parecen tener efectos evidentes en la supervivencia neuronal, mientras que sólo la mutación de Tyr1062, que anula completamente la actividad de ambas

vías, es capaz de eliminar la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por GDNF.



**Fig. 15 Sólo las neuronas de ratones *Y1062FRet9* son incapaces de sobrevivir en respuesta a GDNF.**

Cuantificación de la supervivencia mediada por GDNF de neuronas simpáticas provenientes de ratones *Y981FRet9* (a y b), *Y1015FRet9* (b y c) o *Y1062FRet9* (e). Los gráficos de la izquierda (a, c y d) indican la supervivencia tras 48hs de cambiar a medio de cultivo con GDNF, mientras que los de la derecha (b y d) muestran los mismos cultivos a una semana del tratamiento. Las neuronas control se mantuvieron en NGF. La supervivencia se comparó con la de las correspondientes neuronas de animales wt hermanos. El número entre paréntesis indica la cantidad de animales de cada tipo que se analizaron.



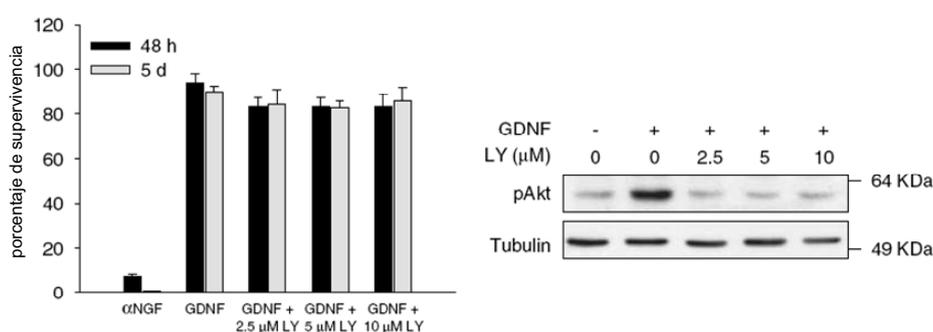
**Fig. 16 Sólo las neuronas de ratones *Y1062FRet9* son incapaces de sobrevivir en respuesta a GDNF.**

(a) Se tomaron fotografías de un mismo campo a neuronas simpáticas en cultivo a 0 hs, 48 hs y 7 días de tratamiento con GDNF. La mayoría de neuronas sobrevivían hasta el séptimo día de análisis, excepto para aquellas obtenidas de ratones *Y1062FRet9*, que morían dentro de las primeras 48hs en GDNF. (b) La observación a mayores aumentos del campo correspondiente a neuronas *Y1062FRet9* permite visualizar los cuerpos celulares y neuritas en desintegración.

4 La supervivencia neuronal dependiente de GDNF no requiere la señalización a través de la vía PI3K/Akt ni la activación de ERK1/2.

Puesto que la reducción casi total de la activación de Akt por GDNF en neuronas de ratones *Y981FRet9* no se correlacionaba con una disminución de la supervivencia, decidimos analizar la relevancia directa de la cascada molecular PI3K/Akt en la supervivencia de neuronas en respuesta a GDNF. Para esto, estudiamos los efectos de la inhibición de la activación de dicha vía de señalización mediante dos estrategias independientes. En primer lugar nos valimos de la droga LY294002, un inhibidor selectivo de la enzima PI3K. En este contexto, pudimos constatar que la adición de dicho fármaco no tenía un efecto

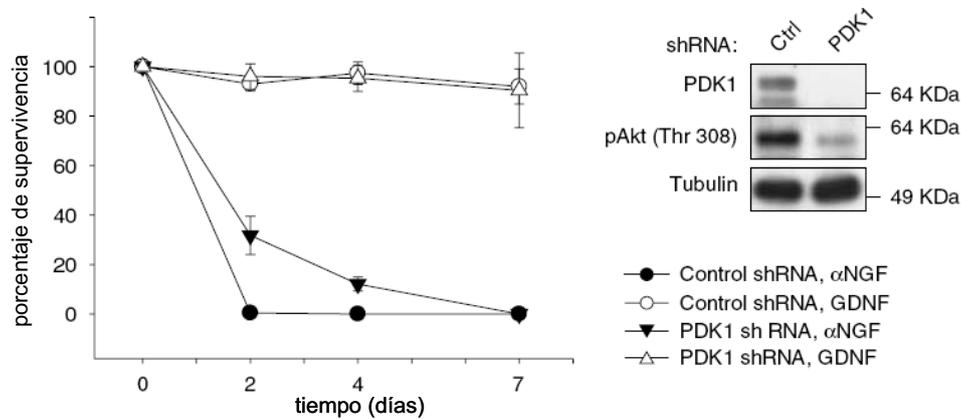
significativo sobre la supervivencia de neuronas simpáticas wild-type respecto a los controles tratados con el vehículo (Fig. 17, panel izquierdo). Para comprobar la validez de este resultado, determinamos la eficiencia con la que esta droga inhibía la actividad de su molécula diana. En este sentido, vimos que las dosis utilizadas en nuestros ensayos efectivamente inhibían la fosforilación de Akt, sugiriendo un completo bloqueo sobre la inducción por GDNF de la vía PI3K/Akt (Fig. 17, panel derecho).



**Fig. 17 La vía PI3K/Akt no es necesaria para la supervivencia neuronal mediada por GDNF.**

Neuronas simpáticas de ratones wt fueron cultivadas por 5 días en NGF y luego cambiadas a GDNF, en ausencia o presencia de las dosis indicadas del inhibidor de PI3K LY294002. La supervivencia neuronal fue determinada 48hs y 5 días después del cambio (panel izquierdo). En el panel de la derecha, lisados de neuronas estimuladas por 24hs con GDNF en presencia de las dosis indicadas de LY294002 fueron analizados por WB con un anticuerpo contra fosfo-Ser473Akt. Nótese que en los experimentos de supervivencia, el medio de cultivo con inhibidor fresco era reemplazado cada 24hs para asegurar su actividad.

En nuestra segunda estrategia, hicimos uso de la tecnología del RNA de interferencia. Así, diseñamos un vector lentiviral codificando un shRNA (por short hairpin RNA) que eliminaba la expresión de PDK1, una enzima clave en la señalización entre PI3K y las restantes moléculas implicadas en esta cascada intracelular (Mora, A. *et al.* 2004). De forma similar a los resultados obtenidos con el inhibidor LY294002, la ausencia de PDK1, y la consiguiente inhibición en la activación de Akt (Fig. 18), tampoco tuvieron efectos notorios sobre la supervivencia neuronal, confirmando que el mecanismo de señalización PI3K/Akt no es indispensable para la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo inducida por GDNF.

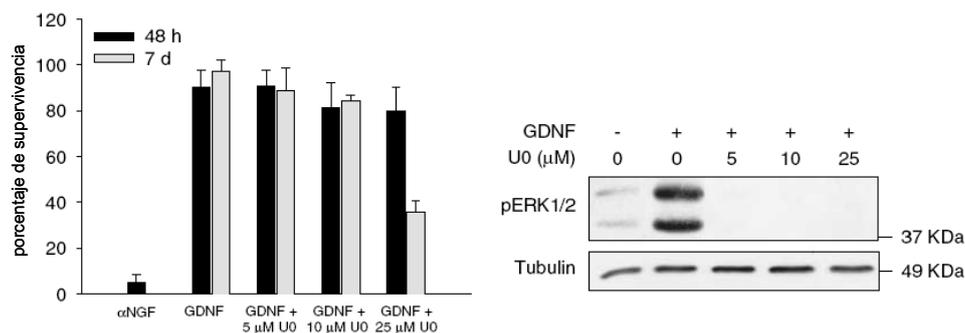


**Fig. 18 La vía PI3K/Akt no es necesaria para la supervivencia neuronal mediada por GDNF.**

Neuronas simpáticas en cultivo fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan un shRNA contra *PDK1* como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las neuronas fueron mantenidas en NGF por 5 días y luego cambiadas a los tratamientos que se indican. La supervivencia neuronal fue medida a los puntos temporales indicados tras el cambio de medio (panel izquierdo). A la derecha, la eficiencia de la eliminación de la expresión de *PDK1* y de la fosforilación de Akt se analizaron por WB.

Como se mencionó en la sección anterior, la incapacidad de las neuronas derivadas de ratones knock-in *Y1062FRet9* para sobrevivir en respuesta a GDNF sugiere un potencial papel de la vía ERK/MAPK en la consecución de dicho efecto. Para poner a prueba esta hipótesis, utilizamos el inhibidor U0126, altamente específico para MEK1/2. Sorpresivamente, pudimos determinar que el efecto de supervivencia mediada por GDNF en neuronas simpáticas en cultivo no era inhibido en presencia de dosis de U0126 a las que la fosforilación de ERK1/2 era eficientemente bloqueada (Fig. 19). Al cabo de una semana de tratamiento, sólo a concentraciones muy altas de la droga ( $25\mu\text{M}$ ) la viabilidad celular se veía disminuida, pero es probable que este efecto fuera debido a un fenómeno de toxicidad. Para corroborar estos resultados utilizamos PD98059, un segundo inhibidor de MEK, con el cual se observó, una vez más, que la viabilidad de estas células en presencia de GDNF tampoco era afectada (datos no mostrados). Por lo tanto, dado que dos inhibidores de MEK que no están relacionados estructuralmente eran incapaces de prevenir la supervivencia

neuronal promovida por GDNF, concluimos que esta vía de señalización probablemente no es requerida para esta función. En todos los experimentos con inhibidores el medio de cultivo se cambiaba cada 24hs para asegurar la eficiencia del bloqueo por cada droga.



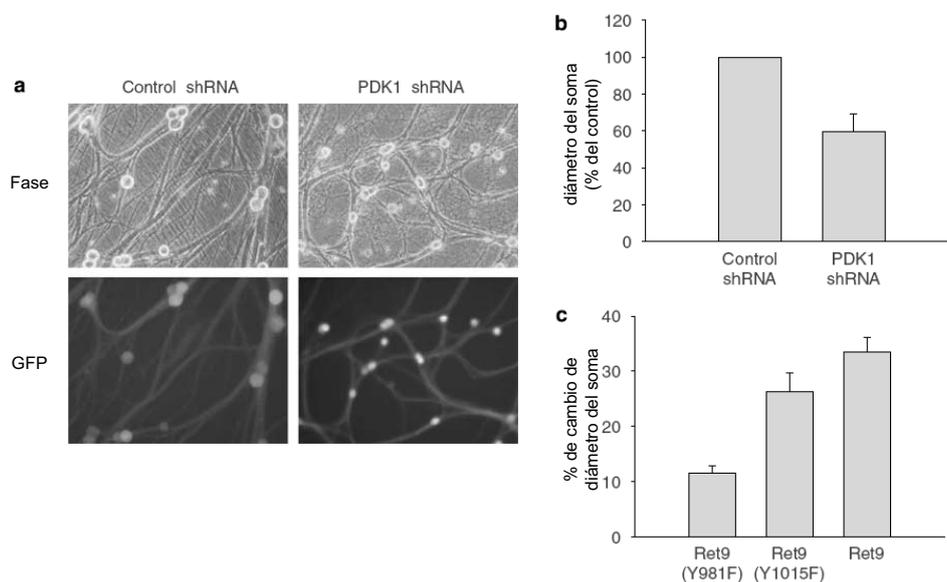
**Fig. 19 La vía ERK/MAPK no es necesaria para la supervivencia neuronal mediada por GDNF.**

Neuronas simpáticas de ratones wt fueron cultivadas por 5 días en NGF y luego cambiadas a GDNF, en ausencia o presencia de las dosis indicadas del inhibidor de MEK U0126. La supervivencia fue medida a las 48hs y 7 días tras el tratamiento (panel izquierdo). A la derecha, la eficiencia de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 se analizó por WB.

## 5 La vía PI3K/Akt promueve el crecimiento celular.

A medida que maduran en presencia de NGF, las neuronas simpáticas aumentan progresivamente su tamaño y se vuelven independientes del aporte de NGF para sobrevivir. Así, en neuronas maduras, NGF es necesario para estimular su metabolismo anabólico, pero no para la viabilidad (Putcha, G.V. *et al.* 2002), indicando que supervivencia y crecimiento celular son procesos regulados independientemente en dichas células. A pesar de no mostrar ningún efecto significativo sobre la supervivencia neuronal, nosotros pudimos observar que la reducción de los niveles de expresión de PDK1 resultaba en una marcada disminución del diámetro del soma neuronal, sugiriendo que en nuestro sistema, la señalización por la vía PI3K/Akt estaría implicada en la regulación del crecimiento celular (Fig. 20a y b). De manera consistente, las neuronas de ratones *Y981FRet9*, cuya habilidad para activar la cascada de señalización

PI3K/Akt en presencia de GDNF se encuentra altamente reducida, exhibían una tasa de crecimiento del soma mucho menor que aquellas provenientes de animales knock-in *Y1015FRet9* y *Ret9* (Fig. 20c y Fig. 16a). De esta manera, tal como está descrito para el caso de NGF, parece ser que en neuronas simpáticas, GDNF se vale de la ruta molecular PI3K/Akt para estimular el crecimiento celular, sin afectar la señalización de la cual depende la supervivencia neuronal.

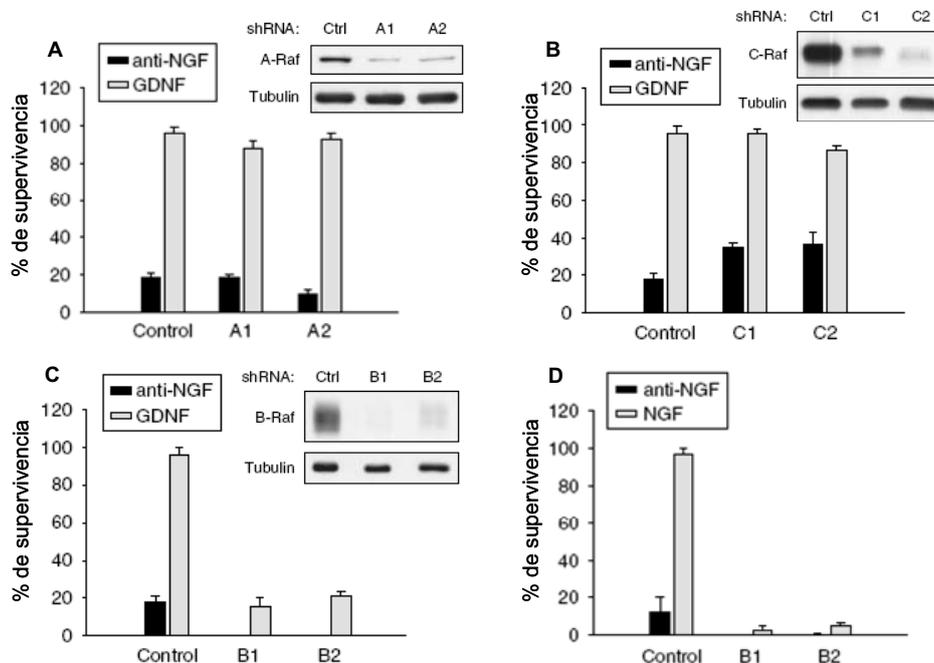


**Fig. 20 La eliminación de la expresión de PDK1 reduce el crecimiento celular.**

(a y b) Neuronas simpáticas de ratones wt fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan shRNA contra *PDK1*. Las fotografías fueron tomadas tras 14 días en cultivo utilizando un microscopio de fluorescencia para mostrar tanto la morfología como el nivel de infección (visualizado como la expresión de GFP). En (b), el diámetro del soma neuronal fue medido como se explica en Materiales y Métodos. (c) La ausencia de Tyr981 de Ret reduce el crecimiento celular. Neuronas simpáticas de ratones knock.in para *Y981FRet9* y *Y1015FRet9* fueron mantenidas por 5 días en NGF y entonces cultivadas en GDNF por 7 días más. El diámetro del soma fue determinado al cambiar a GDNF y al cabo de los 7 días en presencia de éste, y el porcentaje de incremento del tamaño del soma en dicho periodo fue calculado. GFP: Proteína Fluorescente Verde.

6 La supervivencia de neuronas simpáticas inducida por factores neurotróficos es mediada por B-Raf.

Como ya hemos mencionado, la caída en la fosforilación de ERK1/2 en neuronas de ratones *Y1062FRet9* se correlacionaba con la incapacidad de GDNF para inducir su supervivencia, mientras que en neuronas obtenidas de animales *Y981FRet9* y *Y1015FRet9*, esta vía de señalización, aunque parcialmente disminuida, aún podía ser activada, sin verse afectada la viabilidad de estas células. Dado que nuestros experimentos con inhibidores de MEK demostraban que la activación de ERK1/2 no es requerida para la supervivencia de neuronas wild-type, nos planteamos la posibilidad de que alguna/s molécula/s de esta cascada de señalización previas a MEK1/2, como por ejemplo Ras o Raf, pudieran estar participando de manera cruzada en la activación de otros mecanismos de transducción de señales, para promover los efectos de supervivencia inducidos por GDNF a través de algún mecanismo independiente de la función de MEK. Ratones en los que se ha eliminado la expresión de A-RAF presentan un fenotipo caracterizado por defectos neurológicos y gastrointestinales, específicamente, Megacolon, muy similar al observado en animales con mutaciones inactivadoras en Ret (Pritchard, C.A. *et al.* 1996). Por otro lado, Wiese y colaboradores determinaron en un modelo *in vivo*, que B-Raf juega un papel fundamental para la supervivencia de neuronas motoras y sensoriales embrionarias (Wiese, S. *et al.* 2001). Por estas razones, nos propusimos determinar, en primer lugar, la relevancia de los miembros de la familia de Raf en la supervivencia de nuestras neuronas simpáticas. Para ello utilizamos shRNAs dirigidos contra las tres isoformas A-Raf, B-Raf y C-Raf, que eliminaban eficientemente la expresión de cada miembro (Fig. 21a, b y c, respectivamente). Por medio de este experimento, determinamos que la inducción de supervivencia celular mediada por GDNF en cultivos de neuronas simpáticas wild-type sólo estaba afectada cuando se eliminaba la expresión de B-Raf, pero no por la ausencia de A-Raf ni de C-Raf. Más aún, la eliminación de B-Raf también producía la muerte neuronal aún en presencia de NGF (Fig. 21d). Este dato indica que tanto NGF como GDNF compartirían el mecanismo molecular a través del cual inducen la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo, y que B-Raf sería indispensable para que dicho efecto tenga lugar.

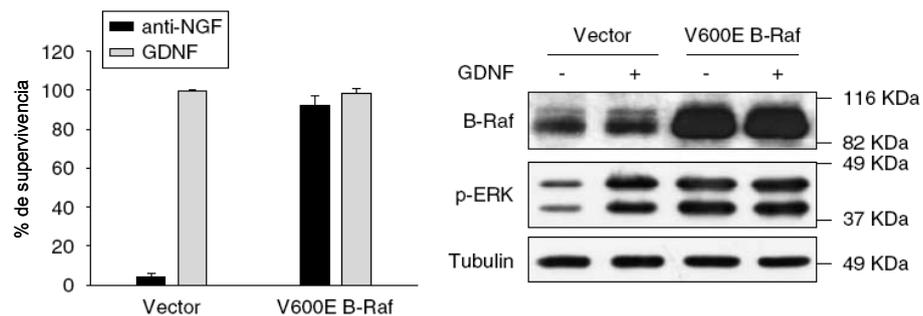


**Fig. 21** La eliminación de la expresión de B-Raf -pero no de A-Raf ni C-Raf- previene la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y por GDNF.

(a, b y c) Paneles de la izquierda: neuronas simpáticas de ratones wt fueron infectadas con vectores lentivirales que expresaban shRNAs contra *A-Raf* (A1 y A2), *B-Raf* (B1 y B2) y *C-Raf* (C1 y C2) 1 día después de ser plaqueadas (ver Materiales y Métodos) y se cultivaron por 5 días en NGF antes de ser cambiadas a GDNF. La supervivencia fue medida a las 48hs de tratamiento con GDNF. Paneles de la derecha: la eficiencia de la eliminación de la expresión de dichas proteínas fue determinada por WB con anticuerpos específicos contra cada isoforma de Raf. En el caso de B-Raf, las neuronas fueron rescatadas de la muerte celular por medio de la adición del inhibidor general de caspasas, BAF (50  $\mu$ M), dos días previos a la preparación del lisado. (d) Igual que el panel (b), pero en este caso, las células fueron tratadas con NGF en lugar de GDNF.

Para confirmar la relevancia de B-Raf en la supervivencia neuronal, estudiamos los efectos de la sobre-expresión del mutante constitutivamente activado v600EB-Raf en relación a la muerte neuronal por privación de factores neurotróficos. En este contexto, vimos que la versión mutada de B-Raf tenía la habilidad de rescatar a las neuronas simpáticas de la muerte por privación de soporte trófico (Fig. 22). Este dato sugiere que la activación de B-Raf inducida por NGF y GDNF es fundamental para mediar la supervivencia de las neuronas simpáticas en cultivo, y que la carencia de factores neurotróficos

desembocaría en un proceso de muerte celular debido a la falta de activación de B-Raf, dado que su variante constitutivamente activada es suficiente para rescatar a dichas neuronas del proceso apoptótico. En su conjunto, estas evidencias ponen de manifiesto el papel crítico de B-Raf en la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por factores neurotróficos.



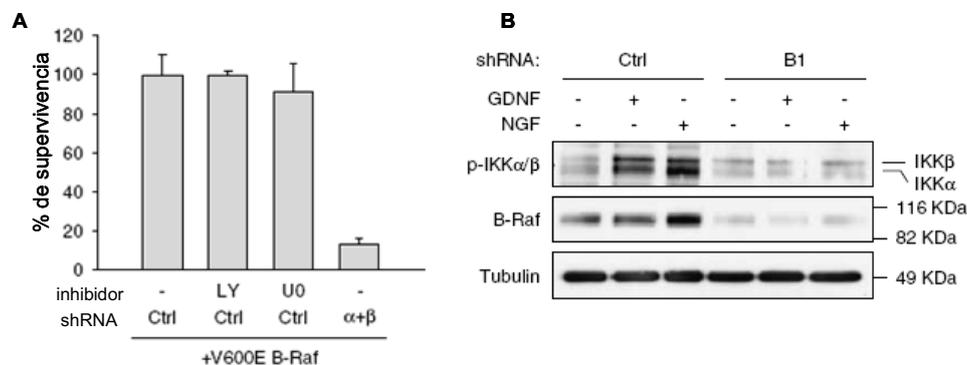
**Fig. 22 V600E B-Raf protege a las neuronas simpáticas de la muerte por privación.**

Izquierda: neuronas simpáticas de ratones wt fueron infectadas con vectores lentivirales que expresaban V600E B-Raf de origen humano, o bien el vector vacío como control. Luego de 4 días, fueron cambiadas a medio de cultivo con un anticuerpo bloqueante anti-NGF en ausencia (deprivación) o presencia de GDNF. La supervivencia fue medida a las 48hs tras el cambio de medio. Derecha, el mutante V600E B-Raf está constitutivamente activado: neuronas infectadas con V600E B-Raf o el vector vacío fueron estimuladas por 10 min. con GDNF y los correspondientes lisados celulares, analizados por WB con anticuerpos contra B-Raf y ERK1/2 fosforiladas.

7 IKKs son moléculas efectoras diana de B-Raf en neuronas simpáticas.

En años recientes, se han sugerido diversos mecanismos a través de los cuales los miembros de la familia Raf podrían ejercer funciones independientemente de ERKs, pero se desconocen muchos de los detalles moleculares y la relevancia biológica de los mismos. Se han propuesto varias moléculas diana de Raf, entre las cuales se encuentran MTS-2, Rok $\alpha$ , Bad y la vía NF- $\kappa$ B (Wellbrock, C. *et al.* 2004; Galabova-Kovacs, G. *et al.* 2006). De todas ellas, decidimos investigar ésta última, puesto que la vía de NF- $\kappa$ B ha sido caracterizada como un mecanismo que bloquea la apoptosis en neuronas simpáticas y sensoriales (Maggirwar, S.B. *et al.* 1998; Hamanoue, M. *et al.*

1999). En la llamada vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B, el complejo IKK –con sus dos subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y la subunidad reguladora IKK $\gamma$ - fosforila a las proteínas inhibitoras de NF- $\kappa$ B -las I $\kappa$ Bs-, tras lo cual son degradadas por el proteasoma. En consecuencia, NF- $\kappa$ B es liberado para translocarse al núcleo, donde modulará a diferentes genes diana. En este paradigma, decidimos analizar si la eliminación de IKKs por medio de shRNAs afectaba la supervivencia de neuronas simpáticas. Como se detalla en Fig. 23a, efectivamente pudimos observar que el silenciamiento simultáneo de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  -pero no la inhibición farmacológica de PI3K ni de MEK- revertía la protección otorgada por v600EB-Raf a las neuronas simpáticas sometidas a privación del soporte trófico. Este experimento nos permite hipotetizar que la activación de B-Raf mediada por factores tróficos en neuronas simpáticas desembocaría en la activación de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , cuyas funciones resultarían críticas para el mantenimiento de estas células.

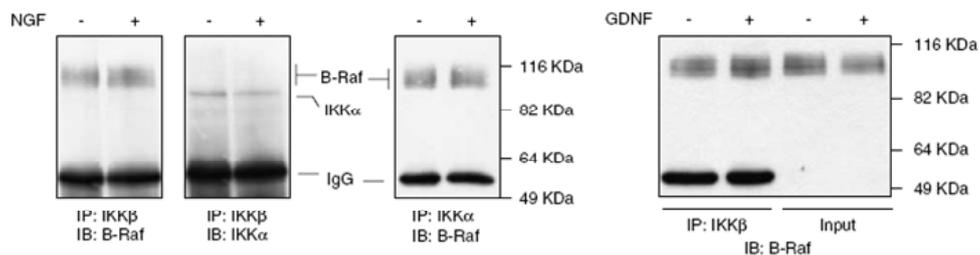


**Fig. 23 IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  son dianas efectoras de B-Raf.**

(a) El silenciamiento de IKKs -pero no la inhibición de PI3K o MEK- revierte el rescate de la muerte por privación promovido por v600EB-Raf. Las neuronas fueron infectadas secuencialmente (ver Materiales y Métodos) con v600EB-Raf y con una mezcla de shRNAs contra *IKK $\alpha$*  e *IKK $\beta$*  ( $\alpha + \beta$ ) o bien los respectivos controles. Al cabo de 3 días, las células fueron privadas y mantenidas en presencia de los inhibidores indicados (10 mM cada uno) por dos días más, tras los cuales se cuantificó la supervivencia. (b) B-Raf actúa en un punto previo a la activación de IKKs en la cascada de señalización. Las neuronas fueron infectadas con un shRNA contra *B-Raf* (B1) o su control. Tras 4 días de infección, las células fueron privadas ON en presencia del inhibidor de caspasas BAF (50  $\mu$ M). Las neuronas fueron estimuladas por 10 min. con los factores indicados y sus lisados analizados por WB con anticuerpos contra fosfo-IKKs, B-Raf o tubulin ( $\beta$ -tubulina).

Para confirmar que, según este modelo, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  serían dianas efectoras de B-Raf, a continuación examinamos si la estimulación con NGF o GDNF era capaz de activar a IKKs en nuestros cultivos neuronales, y si B-Raf era indispensable para que dicha activación tuviera lugar (Fig. 23b). Nuestros datos indican que ambos factores neurotróficos inducen la fosforilación tanto de IKK $\alpha$  como de IKK $\beta$ . Paralelamente, demostramos que eliminando la expresión de B-Raf se prevenía la fosforilación de IKKs inducida por NGF y GDNF, corroborando que IKKs son dianas efectoras de B-Raf, y delineando un novedoso mecanismo molecular a través del cual estos factores neurotróficos promueven la supervivencia de neuronas simpáticas.

El hecho de que IKKs sean dianas efectoras de B-Raf tras la inducción por factores neurotróficos en nuestro modelo, implica que probablemente exista algún tipo de interacción entre estas moléculas, ya sea directo o indirecto. Para indagar sobre este aspecto, investigamos mediante ensayos de inmunoprecipitación si B-Raf e IKKs se asocian físicamente para formar un complejo en neuronas simpáticas. Como se muestra en Fig. 24, B-Raf endógeno co-inmunoprecipitaba con IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  endógenos, de forma independiente de estímulo por factores tróficos, indicando que IKKs y B-Raf interactúan constitutivamente en estas neuronas.



**Fig. 24 IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  interactúan físicamente con B-Raf.**

IKKs y B-Raf endógenas forman complejos en neuronas simpáticas. Las neuronas fueron mantenidas en NGF por 5 días, deprivadas ON y estimuladas por 10 min. con medio sin factores tróficos o bien, con NGF (panel izquierdo) o GDNF (panel derecho). IKK $\alpha$  o IKK $\beta$  fueron inmunoprecipitados, y junto con los lisados totales (input, panel derecho), analizados por WB con los anticuerpos señalados.

Para validar nuestros resultados, llevamos a cabo estudios preliminares similares, con muestras procedentes de otros órganos, y determinamos que dicha interacción también ocurre en lisados obtenidos a partir de cerebro, corazón o piel de ratones recién nacidos, sugiriendo que la señalización de la vía B-Raf/IKKs no estaría restringida al Sistema Nervioso Simpático (datos no mostrados).

En su conjunto, estos resultados colocan a las IKKs como dianas efectoras directas de B-Raf para la promoción de supervivencia de neuronas simpáticas mediada por factores neurotróficos.

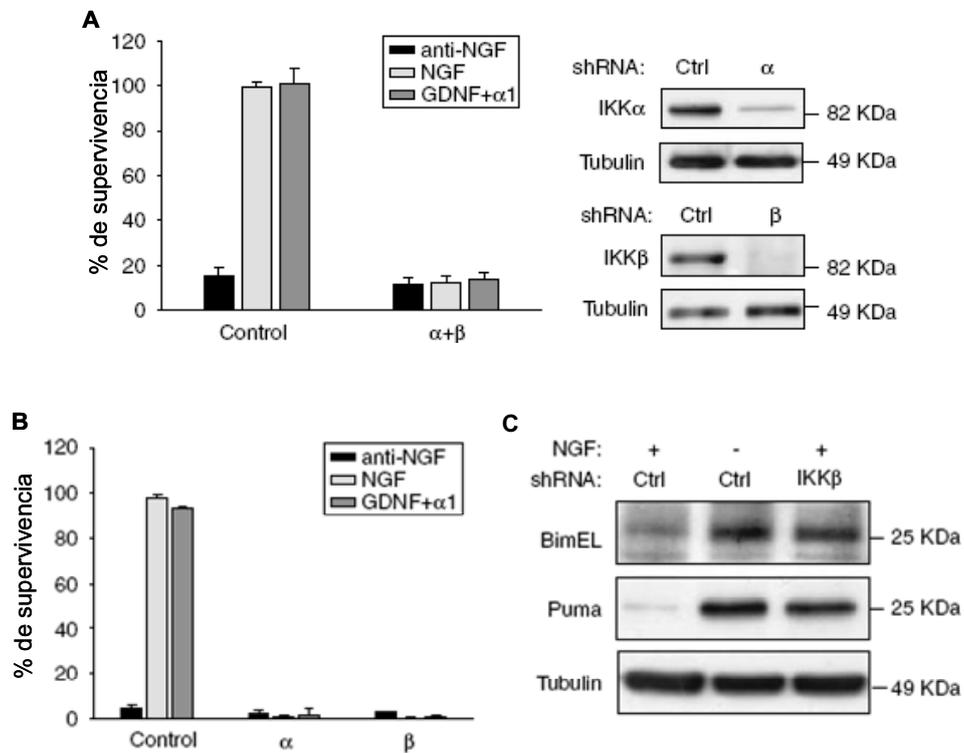
8 IKKs son necesarias para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y GDNF.

Habiendo demostrado que la eliminación de la expresión de IKKs previene los efectos de supervivencia de la sobre-expresión de v600EB-Raf, quisimos corroborar de una manera más directa si IKKs median la viabilidad neuronal en respuesta a factores neurotróficos. Así, observamos en ensayos de supervivencia, que el silenciamiento de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  en conjunto, o bien de cada uno individualmente (Fig. 25a y b, respectivamente), mataba a las neuronas simpáticas cultivadas en presencia de NGF o GDNF, indicando a favor de nuestra hipótesis, que ambas proteínas son requeridas para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por estos factores tróficos.

Con el objeto de profundizar en los detalles moleculares a través de los cuales este nuevo circuito de señalización promovería la supervivencia neuronal, analizamos si el patrón de la expresión de ciertos factores pro-apoptóticos se veía alterado por el silenciamiento de IKKs. En este sentido, encontramos que el tratamiento de neuronas simpáticas con shRNA contra IKK $\beta$  causaba un aumento de los niveles de las proteínas pro-apoptóticas Bim3L y PUMA en

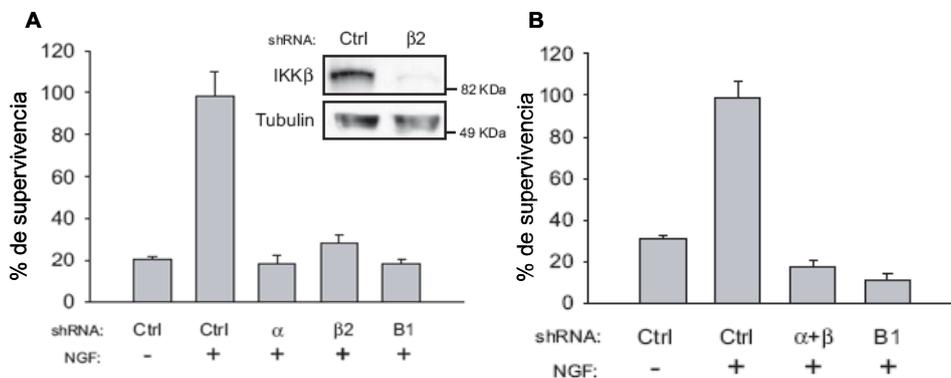
grados comparables con aquellos observados durante el proceso de muerte celular por privación de NGF (Putcha, G.V. *et al.* 2004) (Fig. 25c).

Para reforzar estos datos, a continuación quisimos determinar, si este novedoso módulo de señalización a través de RTKs/B-Raf/IKKs se encuentra restringido a neuronas simpáticas de ratón, o si por el contrario, podría desempeñar un papel más generalizado en otros subtipos neuronales y/o en diferentes organismos.



**Fig. 25 IKKs son necesarias para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y GDNF.** (a y b) Las neuronas fueron infectadas con shRNAs contra *IKK $\alpha$*  e *IKK $\beta$*  ( $\alpha + \beta$ ; a) o bien individualmente ( $\alpha$  o  $\beta$ ; b) al segundo día de cultivo. Tras otros 3 días en presencia de NGF, fueron cambiadas a medio de cultivo con los factores indicados y la supervivencia fue medida a las 48 hs del tratamiento. El panel derecho muestra la eficiencia del silenciamiento de los shRNAs. (c) La eliminación de la expresión de IKKs induce la expresión de BimEL y PUMA. Las neuronas fueron infectadas con shRNAs control o contra *IKK $\beta$*  y cultivadas con NGF por 3 días. A continuación fueron privadas o estimuladas con NGF por 24hs adicionales, según se indica, y los niveles de expresión de BimEL y PUMA fueron determinados por WB.

En este sentido, pudimos determinar que en efecto, el silenciamiento de la expresión de IKKs individualmente o de B-Raf en cultivos de neuronas simpáticas de rata eliminaba la habilidad de NGF para promover su supervivencia a 72 hs en cultivo (Fig. 26a). Asimismo, efectos similares fueron observados en un modelo neuronas trigéminas (sensoriales) de ratón (Fig. 26b), indicando que la actividad de esta nueva vía de señalización no se encuentra restringida a las neuronas simpáticas del SCG de ratón, sino que sería funcional en otras sub-poblaciones neuronales y en diferentes especies.



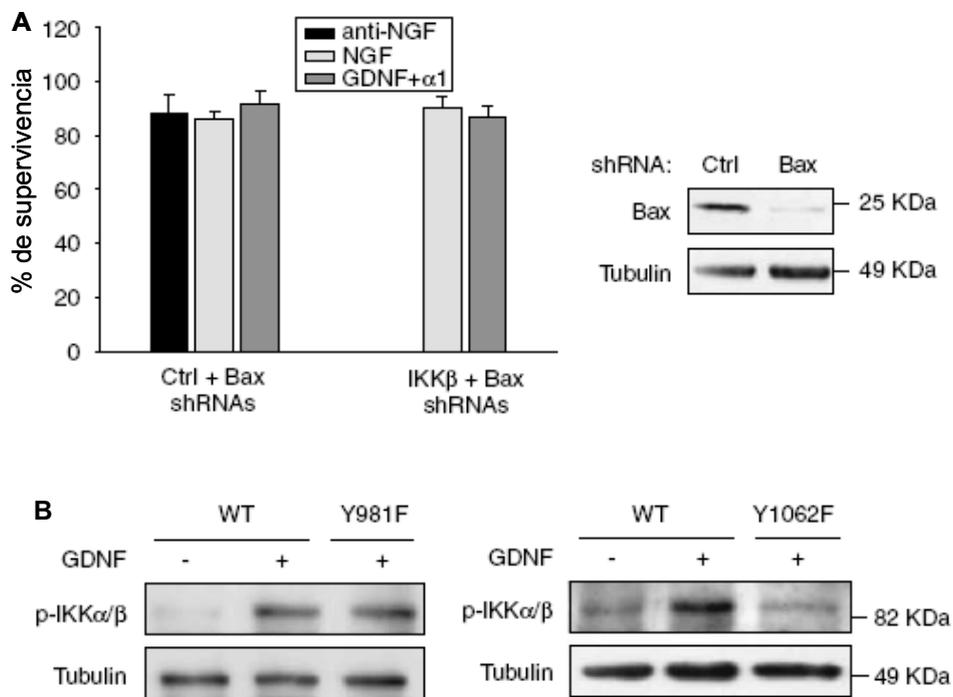
**Fig. 26 La vía B-Raf/IKKs no está restringida a neuronas simpáticas de ratón.**

(a) El silenciamiento de IKKs o B-Raf previene la supervivencia de neuronas simpáticas de rata mediada por NGF. Neuronas del SCG de ratas recién nacidas fueron cultivadas tal como se describe para neuronas simpáticas de ratón en Materiales y Métodos. Al segundo día fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan shRNAs contra *IKK $\alpha$*  ( $\alpha$ ), *IKK $\beta$*  ( $\beta 2$ ) o *B-Raf* (B1). Al cabo de 4 días, fueron tratadas como se indica durante dos días adicionales, tras los cuales se determinó la supervivencia. La gráfica representa 3 experimentos independientes. Nótese que el shRNA contra *IKK $\beta$*  de rata ( $\beta 2$ ) es distinto de aquel utilizado para *IKK $\beta$*  de ratón. La eficiencia del silenciamiento por dicho shRNA fue determinada por WB (panel superior derecho). (b) El silenciamiento de IKKs o B-Raf previene la supervivencia de neuronas del ganglio trigeminal de ratón mediada por NGF. Neuronas trigeminales de ratones recién nacidos fueron infectadas al segundo día de cultivo con vectores lentivirales que expresan los shRNAs indicados -*IKK $\alpha$*  e *IKK $\beta$*  ( $\alpha + \beta$ ) o *B-Raf* (B1)-. Al quinto día de cultivo, las células fueron cambiadas a medio de cultivo que contenía NGF o bien un anticuerpo bloqueante anti-NGF (en ausencia de factor trófico), como se indica. La supervivencia fue determinada a los 3 días de tratamiento. Se muestra una gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

Confirmando el modelo propuesto, vimos que el silenciamiento de otro factor pro-apoptótico, Bax, revertía la muerte neuronal causada tanto por privación de NGF como por eliminación de IKK $\beta$  (Fig. 27a). Estos resultados sugieren que la muerte celular causada por la eliminación forzada de la

señalización de IKKs recapitula los eventos moleculares de la muerte celular por privación de factores tróficos (Putcha, G.V. *et al.* 2004).

Por último, volviendo al modelo inicial en el que analizábamos la relevancia de las diferentes tirosinas de Ret9 en la supervivencia de neuronas simpáticas, estudiamos el patrón de activación de IKKs en cultivos neuronales provenientes de ratones *Y981FRet9* y *Y1062FRet9* (Fig. 27b).

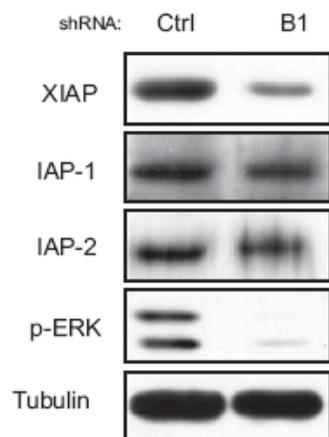


**Fig. 27 IKKs son necesarias para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y GDNF.** (a) El silenciamiento de Bax rescata la muerte de neuronas debida a la eliminación de IKK $\beta$ . Las células fueron infectadas con shRNA contra *Bax* y subsiguientemente re-infectadas con shRNAs control o contra *IKK $\beta$*  (ver Materiales y Métodos). Estas neuronas fueron mantenidas en NGF por 3 días adicionales y luego cambiadas a medio de cultivo con los factores señalados. La supervivencia neuronal fue determinada a las 48 hs de tratamiento. El panel de la derecha enseña la eficiencia del silenciamiento por el shRNA contra *Bax*. (b) La mutación de Tyr1062 de Ret, pero no de Tyr981, bloquea la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$  inducida por GDNF. Neuronas simpáticas con los genotipos indicados fueron cultivadas en presencia de NGF por 5 días, privadas ON y estimuladas por 10 min. con GDNF. Se analizaron los lisados celulares por WB con anticuerpos contra fosfo-IKKs. Nótese que debido a un mayor porcentaje de acrilamida en el gel, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  no se resolvieron como en Fig. 23b.

En concordancia con nuestra hipótesis, pudimos observar que la mutación de Tyr1062 prevenía totalmente la activación de IKKs inducida por GDNF, lo cual se relaciona directamente con la incapacidad de estas células para sobrevivir en respuesta a dicho factor neurotrófico, mientras que la mutación de Tyr981 no alteraba significativamente la fosforilación de IKKs, así como la supervivencia de dichas neuronas tampoco se veía comprometida (Fig. 27b, y Fig. 15 a y b).

9 B-Raf es un mediador clave para la supervivencia neuronal.

En su conjunto, nuestros datos indican que B-Raf es indispensable para la supervivencia de neuronas simpáticas dependiente de NGF y de GDNF a través de un nuevo mecanismo molecular que es independiente de la actividad de MEK, pero que sí involucra la activación directa de IKKs por B-Raf.



**Fig. 28 Efectos anti-apoptóticos de B-Raf.**

El silenciamiento de B-Raf genera una disminución de los niveles de XIAP y fosfo-ERK1/2, pero no de c-IAP1 o c-IAP2. Neuronas simpáticas fueron infectadas al segundo día de cultivo con shRNA contra *B-Raf* (B1). Al cabo de otros 4 días, se las cambió a medio de cultivo con GDNF en presencia del inhibidor general de caspasas BAF (50  $\mu$ M) y se las incubó por dos días más. Los niveles de las proteínas o fosfo-proteínas indicadas fueron determinados por WB con los correspondientes anticuerpos específicos.

Esto está de acuerdo con otros trabajos en los que se ha demostrado que la eliminación de la expresión de *B-Raf* causa un descenso en los niveles de IAPs, particularmente de XIAP (Wiese, S. *et al.* 2001), y con aquellos que han reportado un papel indispensable de IAPs para la supervivencia mediada por GDNF de neuronas motoras embrionarias (Perrelet, D. *et al.* 2002). En base a

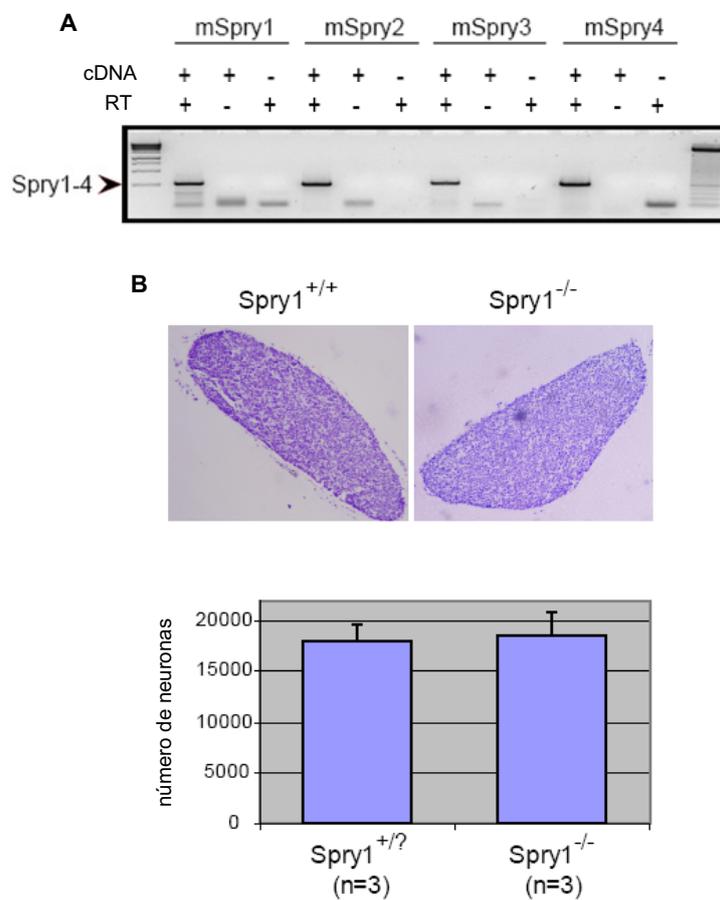
esto, nos propusimos estudiar si en nuestro modelo, el silenciamiento de B-Raf afectaba el patrón de expresión de IAPs. Consistentemente con los datos de la literatura, nosotros pudimos observar que en nuestro paradigma, el silenciamiento de B-Raf en neuronas simpáticas de ratón se correlaciona con una marcada disminución en los niveles de XIAP (Fig. 28).

10 *Sprouty1* no es requerido para la supervivencia, ni para la regulación de la vía ERK/MAPK, mediadas por GDNF en neuronas simpáticas.

Las proteínas *Sprouty* son un grupo de proteínas intracelulares cuya función consiste en modular la actividad de RTKs a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Los detalles moleculares por los cuales dichas proteínas regulan estos receptores aún no han sido completamente aclarados, pero se conoce que el efecto antagónico de *Sprouty* recae sobre la actividad de la vía ERK/MAPK. Dependiendo de la isoforma de *Sprouty*, el tipo de célula o tejido, el estadio de desarrollo y otras características del contexto celular, se han sugerido distintos mecanismos a través de los cuales *Sprouty* inhibiría esta cascada, todos ellos basados en la capacidad de estas proteínas para interactuar con diferentes moléculas adaptadoras y/o efectoras -entre ellas Ras y Raf- involucradas en la transducción de estas señales intracelulares.

Otro de los aspectos que nos propusimos analizar en nuestro modelo de supervivencia de neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior (SCG) implica el posible papel que las proteínas de la Familia de *Sprouty* pudieran desempeñar en la regulación de la actividad de Ret en respuesta a GDNF. En un primer momento, quisimos determinar qué miembros de la familia de *Sprouty* son expresados *in vivo* en el SCG de ratones wild-type recién nacidos. Así, como pudimos observar mediante RT-PCR, todos los miembros de esta familia de proteínas son expresados en neuronas del SCG de animales wild-type recién nacidos (Fig. 29a), sugiriendo un papel para estas proteínas en el sistema simpático. Valiéndonos de una línea de ratones knock-out para *Sprouty1*,

comenzamos a estudiar la relevancia que dicha molécula podría desempeñar para el desarrollo del Ganglio Cervical Superior *in vivo*. El análisis histológico de SCGs aislados de ratones *Spry1*<sup>-/-</sup> recién nacidos reveló que no presentaban diferencias significativas en su tamaño, forma o citoarquitectura, como así tampoco a nivel de la morfología y el número de sus neuronas (Fig. 29b), comparado con los correspondientes ganglios de animales wild-type.



**Fig. 29 Sprouty1 no es requerido para el desarrollo del Ganglio Cervical Superior.**

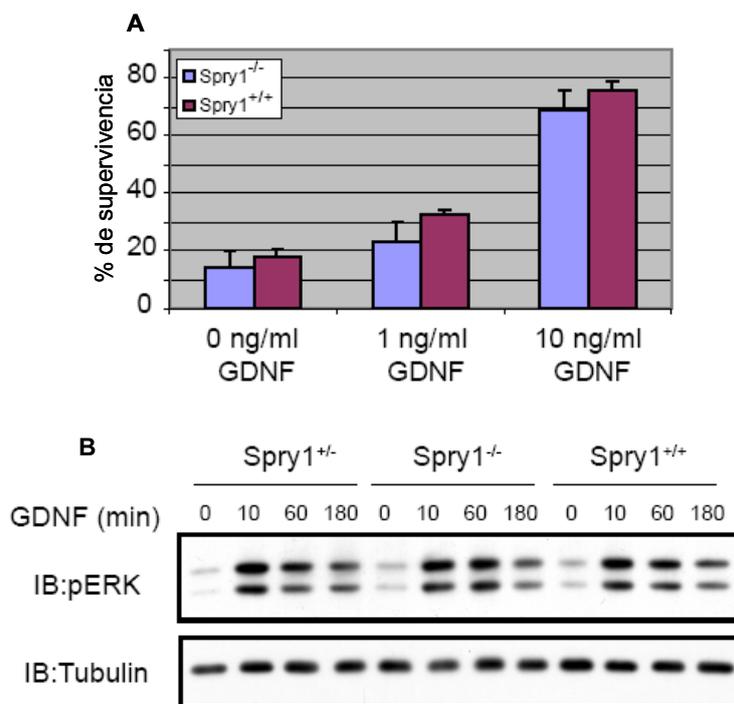
(a) SCGs de ratones wt recién nacidos fueron disecados y su RNA total extraído. A continuación se determinó por RT-PCR la presencia del mRNA de los 4 miembros de la familia de Sprouty. Nótese los controles en ausencia de la enzima transcriptasa reversa (RT), confirmando la ausencia de contaminación de DNA genómico en cada muestra. (b) Fotografías representativas de una tinción de Nissl sobre cortes histológicos del SCG de ratones recién nacidos de los genotipos indicados. En el panel inferior se indican los resultados del conteo de somas neuronales expresado como el promedio de 3 experimentos independientes.

Para extender y corroborar los resultados anteriores decidimos caracterizar los efectos de la carencia de Sprouty1 sobre la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por GDNF (Fig. 30a), empleando dosis subóptimas de GDNF para descartar que la activación de Ret por concentraciones excesivas de GDNF pudiera enmascarar algún efecto de la eliminación de *Spry1*. Estos experimentos demostraron que para neuronas simpáticas del SCG provenientes de ratones nulos para *Spry1*, el patrón de supervivencia en respuesta a un tratamiento de 48 hs en presencia de GDNF no se veía afectado comparado con los respectivos controles de ratones hermanos wild-type. Puesto que Sprouty1 es un antagonista de la activación de la vía ERK/MAPK, quisimos analizar si la ausencia del mismo en neuronas simpáticas podía resultar en una hiper-activación de dicha cascada en respuesta a GDNF. En concordancia con los resultados anteriores, vimos que la reducción de la dosis génica de *Spry1* no altera el patrón temporal de activación de ERK1/2 inducido por GDNF en nuestro modelo de cultivos primarios de neuronas simpáticas (Fig. 30b).

En su conjunto, todos estos datos sugieren que Sprouty1 no es indispensable para el desarrollo ni la supervivencia de neuronas simpáticas, como así tampoco para la regulación de la actividad de Ret inducida por GDNF en las mismas. Este hecho se podría deber a un fenómeno de redundancia funcional, donde la actividad de otro u otros miembros de la familia Sprouty podría ser suficiente (o específicamente necesaria) para sobrellevar la ausencia de *Spry1*.

Al respecto, se ha demostrado que Sprouty2 tiene una función crítica en la regulación de la diferenciación y supervivencia inducidas por BDNF en neuronas del CNS (Gross, I. *et al.* 2001; Gross, I. *et al.* 2007). Asimismo, *Spry2* regularía la proliferación y diferenciación mediadas por GDNF/Ret en líneas celulares de neuroblastoma (Ishida, M. *et al.* 2007), convirtiéndolo en un serio

candidato para ocupar un rol en la regulación de la actividad de Ret en nuestro modelo.

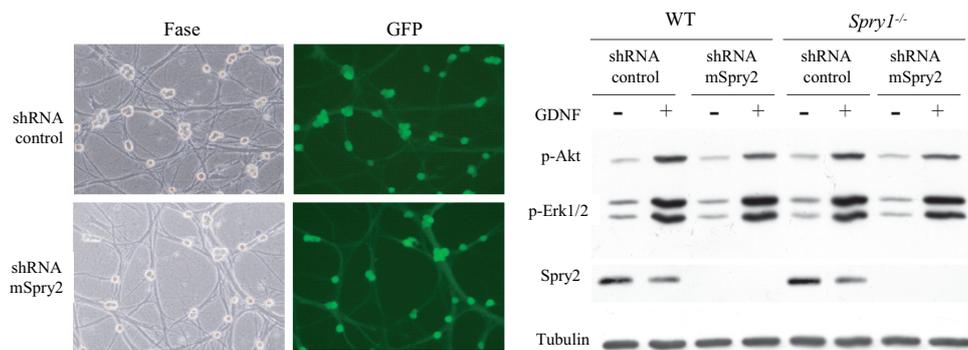


**Fig. 30 Sprouty1 no es indispensable para la supervivencia ni para la regulación de la vía ERK/MAPK mediadas por GDNF en neuronas simpáticas.**

(a y b) Neuronas simpáticas de ratones recién nacidos de los genotipos indicados fueron estimuladas con GDNF por 48hs (a ensayo de supervivencia) o por los tiempos que se señalan (b WB). En a se observa el patrón de supervivencia a las concentraciones subóptimas de GDNF indicadas. En b se exhibe el patrón temporal de activación de ERK1/2 en respuesta a GDNF, determinado por WB.

En consecuencia, decidimos analizar el efecto del silenciamiento de *Sprouty2* sobre la activación de la vía ERK/MAPK inducida por GDNF en neuronas simpáticas, tanto en el contexto de animales wild-type como de ratones knock-out para *Spry1*. Una vez más, encontramos que la eliminación de la expresión de *Sprouty2* no afectaba la activación de la vía de señalización ERK/MAPK mediada por GDNF/Ret en neuronas simpáticas en cultivo, como así

tampoco lo hacía la eliminación de *Spry2* en el contexto de neuronas nulas para *Spry1* (Fig. 31).



**Fig. 31 La eliminación de Sprouty2 no afecta la activación de la vía ERK/MAPK mediada por GDNF en neuronas simpáticas.**

(a) Panel superior: fotografías representativas de la eficiencia de expresión del gen marcador GFP codificado por el vector retroviral utilizado para expresar un shRNA contra *Spry2* en cultivos de neuronas simpáticas de ratones wt recién nacidos. Panel inferior: neuronas simpáticas de ratones recién nacidos de los genotipos indicados fueron infectadas con el vector que expresa el shRNA contra *Spry2*, o bien con el vector control, y al cabo de 4 días, estimuladas con GDNF por 10 min. Los correspondientes lisados celulares fueron analizados por WB con anticuerpos contra las proteínas o fosfo-proteínas que se indican.

11 La ausencia de *Sprouty1* no revierte los defectos en la supervivencia de neuronas simpáticas de ratones knock-in para *Y1062FRet9*.

Existen evidencias de que *Sprouty1* regula la señalización de GDNF/Ret durante el desarrollo del sistema génito-urinario (Basson, M.A. *et al.* 2005; Basson, M.A. *et al.* 2006). Paralelamente, Taketomi y colaboradores (Taketomi, T. *et al.* 2005) demostraron que *Sprouty2* regula la actividad de Ret durante el desarrollo del ENS. Por lo tanto, nos planteamos averiguar si *Sprouty1* podría tener algún efecto sobre la señalización mediada por Tyr1062 de Ret en los modelos fisiológicos anteriormente citados, así como en el paradigma de supervivencia de neuronas simpáticas.

Para llevar a cabo estos experimentos cruzamos ratones heterocigotos para la mutación *Y1062FRet9* con ratones heterocigotos para la mutación que

anula la expresión de *Spry1*, produciendo de esta manera una nueva línea progenitora de ratones doblemente mutados, heterocigotos para ambas mutaciones. Dichos animales, que eran viables, fértiles y macroscópicamente normales, fueron luego cruzados entre sí, y analizamos la progenie al nacer o en estadios embrionarios, según se indica.

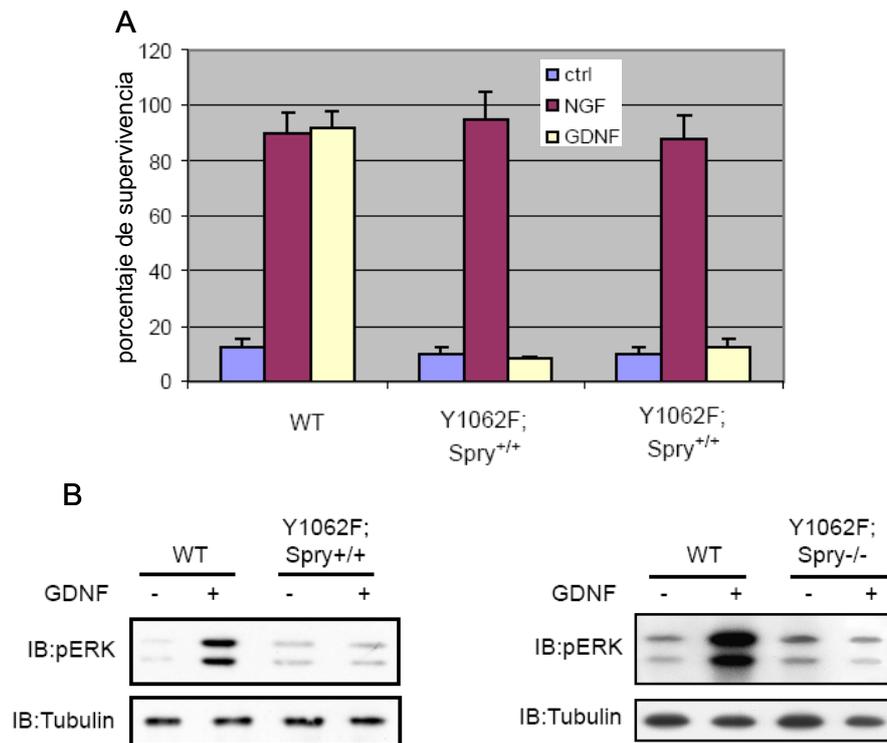
En una primera aproximación, quisimos analizar si la incapacidad de las neuronas simpáticas de ratones knock-in *Y1062FRet9* para sobrevivir en respuesta a GDNF era afectada por la eliminación concomitante de *Spry1*. Como se observa en Fig. 32a, pudimos constatar que la eliminación de *Spry1* en neuronas simpáticas de ratones con la mutación Tyr1062Phe de *Ret9* no ejerce ningún efecto significativo comparado con neuronas knock-in *Y1062FRet9*. De esta manera, tanto en presencia como en ausencia de *Spry1*, las neuronas simpáticas de ratones *Y1062FRet9* son incapaces de sobrevivir en respuesta a GDNF. Asimismo, analizamos el patrón de la activación de ERK1/2 inducida por GDNF en neuronas simpáticas de estos ratones doblemente mutantes y observamos que la eliminación de *Sprouty1* en el contexto de neuronas *Y1062FRet9* tampoco modificaba la inhabilidad para activar esta vía de señalización (Fig. 32b).

En su conjunto, estos resultados confirman nuestros datos anteriores, según los cuales *Sprouty1* no ejercería un papel relevante en la regulación de la actividad de *Ret* en respuesta a GDNF en nuestro modelo de supervivencia de neuronas simpáticas.

12 La eliminación de *Sprouty1* no rescata los defectos de la inervación entérica de ratones knock-in para *Y1062FRet9*.

Otro de los fenotipos que caracterizan a los ratones knock-in *Y1062FRet9* es una carencia total de colonización del plexo entérico por parte de los

precursores neuronales derivados de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, resultando en aganglionsis intestinal.

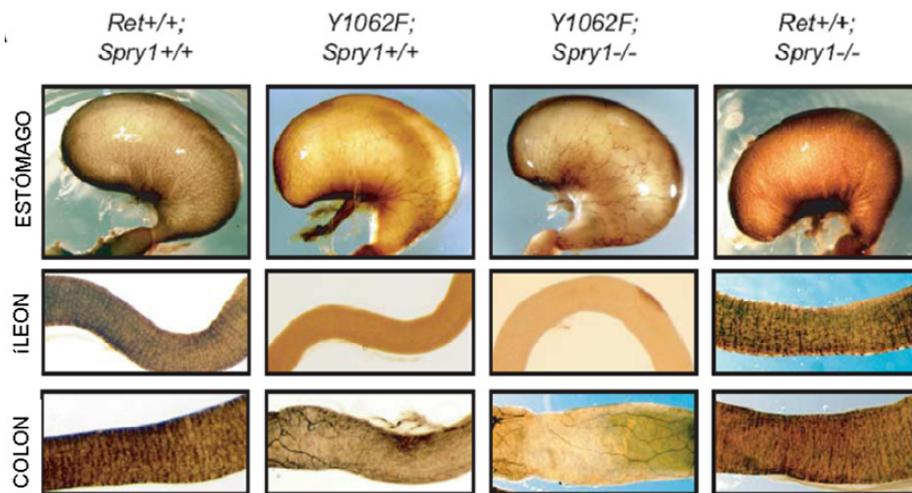


**Fig. 32 La deficiencia de *Spry1* no revierte la incapacidad de sobrevivir, ni de activar la vía ERK/MAPK en respuesta a GDNF de neuronas simpáticas de ratones *Y1062FRet9*.**

(a) Neuronas simpáticas de ratones de los genotipos indicados fueron cultivadas en presencia de NGF por 5 días y a continuación sometidas a privación, estímulo con GDNF o con NGF como control. La supervivencia se cuantificó a las 48 hs. (b) Las células fueron estimuladas con GDNF por 10 min., sus lisados fueron resueltos por WB y analizados con anticuerpos específicos contra ERK1/2 fosforiladas y tubulina.

Continuando nuestros estudios, decidimos determinar si los defectos en la migración de los neuroblastos entéricos debidos a la ausencia de Tyr1062 de Ret9 podían ser revertidos por la eliminación de *Spry1* en los ratones doble mutantes. Para el análisis de los plexos neuronales del ENS utilizamos una tinción en “whole-mount” que detecta la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (un marcador neuronal) en muestras de estómago, íleon y colon

de ratones homocigotos para la mutación de *Spry1*, para la de *Y1062FRet9*, para ambas (doble mutantes) y para ninguna (wild-type). Como era de esperar, ratones *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>* presentaban aganglionosis intestinal y una notable reducción de la densidad de fibras en el estómago, al tiempo que los ratones *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>; Spry1<sup>-/-</sup>* mostraban defectos similares, indicando que, al igual que lo observado en el modelo de neuronas simpáticas, la ausencia de *Spry1* tampoco compensa la falta de señalización debida a la mutación de Tyr1062 de *Ret9* en el ENS (Fig. 33).

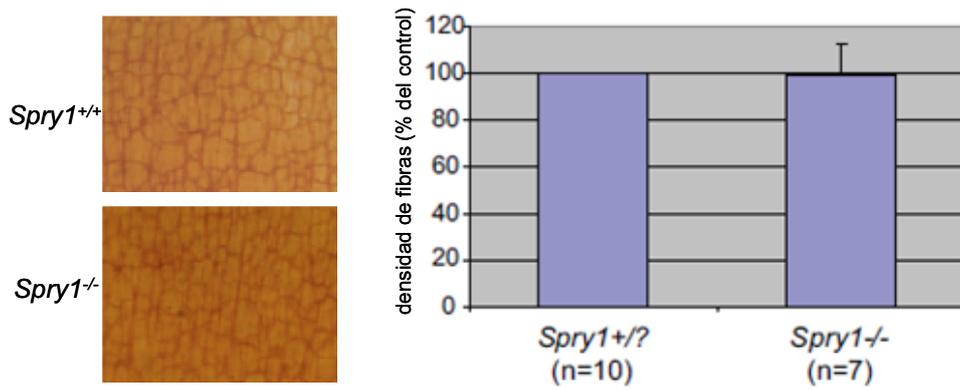


**Fig. 33** La deficiencia de *Spry1* no revierte los defectos de la innervación entérica característicos de ratones *Y1062FRet9*.

Tinción en "whole-mount" contra la actividad de la enzima acetil-colinesterasa (marcador neuronal) sobre el tracto digestivo de ratones recién nacidos de los genotipos indicados (ver Materiales y Métodos). Nótese el marcaje específico del plexo mientérico en los ratones wt y *Spry1<sup>-/-</sup>*, pero no en los ratones *Y1062FRet9* ni los doble mutantes.

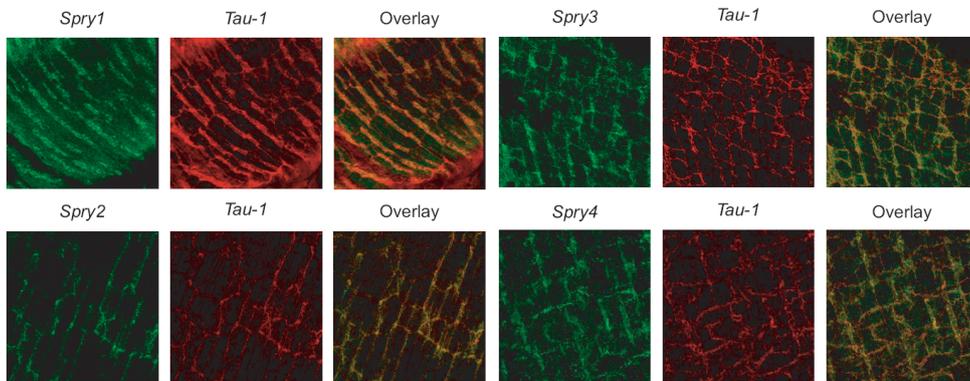
Por otro lado, los plexos entéricos de los intestinos de ratones nulos para *Sprouty1* parecían ser normales en toda su extensión (Fig. 33). El análisis en profundidad de estos últimos mostró que la densidad de fibras de los plexos entéricos de ratones nulos para *Spry1* es similar a la de los ratones hermanos de tipo silvestre (Fig. 34). De este modo, concluimos que *Sprouty1* no parece influir

en la migración y proliferación de los neuroblastos entéricos mediados por GDNF.



**Fig. 34 La deficiencia de *Spry1* no afecta al desarrollo del ENS.**

Detalle a mayor aumento de la tinción "whole-mount" contra la actividad de acetil-colinesterasa sobre el tracto digestivo de ratones wt o *Spry1*<sup>-/-</sup> al nacer. En el panel izquierdo se enseña la cuantificación demostrando que no hay diferencias significativas en la densidad de los plexos mientéricos entre estos genotipos.



**Fig. 35 Todos los miembros de la Familia de Sprouty se expresan en neuronas del plexo mientérico de ratón.**

Se muestran tinciones inmunofluorescentes dobles para cada una de las proteínas *Spry* indicadas en cada caso y el marcador neuronal *Tau-1*, sobre ejemplares de intestino de ratones wt recién nacidos. Nótese que en todos los casos el marcaje específico para cada proteína *Sprouty* co-localiza con el marcador neuronal *Tau-1*.

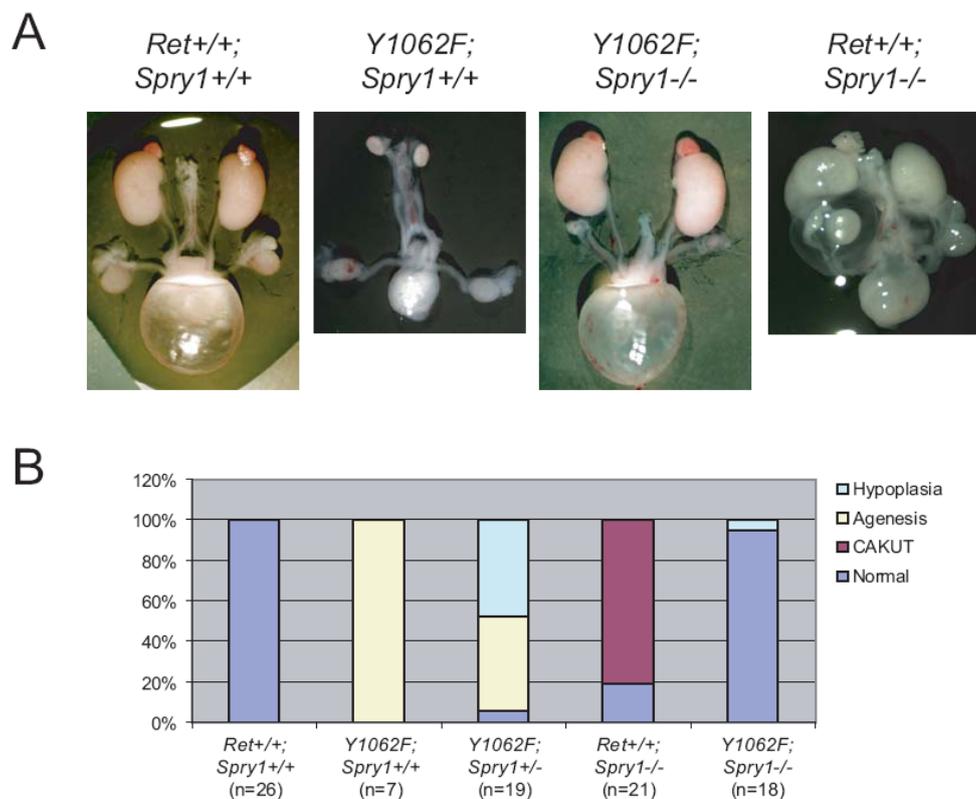
Se debe resaltar que los cuatro miembros de la familia de Sprouty se encuentran presentes en el plexo entérico, como pudimos determinar por tinciones inmunofluorescentes en "whole-mount" (Fig. 35), lo que nuevamente sugeriría un posible efecto de redundancia funcional entre los distintos miembros, que enmascararía los efectos de la pérdida de *Spry1* o, alternativamente, que sería *Spry2* de manera específica quien llevaría a cabo la modulación de GDNF/Ret en este modelo (Taketomi, T. *et al.* 2005).

13 La ausencia de *Sprouty1* revierte los defectos del desarrollo renal característicos de ratones knock-in para la mutación *Y1062FRet9*.

El tercer sistema en el que analizamos la regulación de Ret por Sprouty1 fue durante la organogénesis del sistema renal. Como ya se ha mencionado, éste es un modelo de desarrollo ampliamente estudiado en el cual la señalización GDNF/Ret ocupa el eje central, y donde se ha demostrado la relación directa entre dicho receptor y Sprouty1 (Basson, M.A. *et al.* 2005). Una de las características fenotípicas de los ratones knock-in *Y1062FRet9* es agénesis renal, debido a la incapacidad del conducto nefrogénico (WD) para invadir el mesénquima metanéfrico (MM) -proceso que es inducido por GDNF/Ret- durante los eventos iniciales del desarrollo del riñón. Por otro lado, el fenotipo renal asociado a la ausencia de Sprouty1 se caracteriza por diversas malformaciones que se agrupan bajo la sigla CAKUT (Anomalías Congénitas del Riñón y el Tracto Urinario), debidas a una señalización exacerbada por GDNF/Ret (Basson, M.A. *et al.* 2005).

Sorprendentemente, en nuestro estudio encontramos que aquellos ratones homocigotos para ambas mutaciones presentaban un rescate fenotípico en el desarrollo renal, exhibiendo riñones y uréteres de tamaño y forma macroscópicamente normales, así como también una correcta conexión de los riñones a los uréteres. Asimismo, presentaban sus vejigas llenas de orina, indicando la funcionalidad de dichos riñones (Fig. 36a). En un análisis

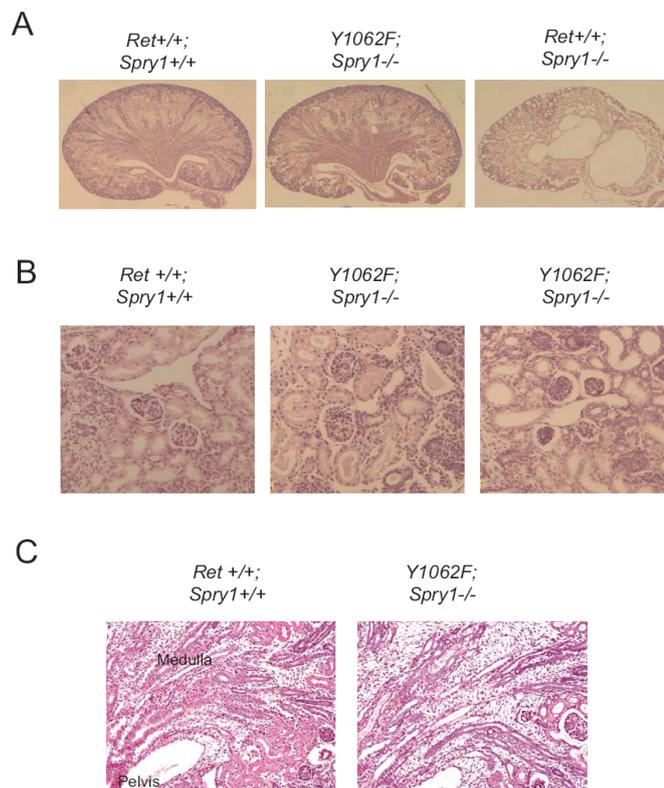
cuantitativo, dicho rescate fenotípico fue observado en el 95% de animales doblemente mutantes analizados, demostrando la relevancia fisiológica del rescate fenotípico observado. Es importante destacar que la pérdida de un sólo alelo de *Spry1* producía un modesto rescate en el fenotipo de agénesis renal característico de ratones *Y1062FRet9* hacia un fenotipo menos severo de hipoplasia renal (Fig. 36b).



**Fig. 36 La eliminación de *Sprouty1* rescata los defectos renales característicos de animales *Y1062FRet9*.** (a) Fotografías representativas del fenotipo general del tracto génito-urinario de animales recién nacidos de los genotipos indicados. Nótese para animales wt y doble mutantes, las vejigas llenas de orina, indicativas de una adecuada función renal. (b) Cuantificación del fenotipo renal de ratones recién nacidos de los genotipos indicados. El término Agénesis incluye tanto casos de agénesis unilateral como bilateral.

El examen microscópico en profundidad de los riñones de ratones doblemente mutantes mostró una citoarquitectura normal, con una correcta

organización de corteza y médula, y una prominente zona nefrogénica en la periferia, típicamente observada a esta edad (Fig. 37a y c). No obstante, la observación histológica en detalle reveló una leve dilatación de los cistos renales en un 50% de los animales doblemente mutantes, mientras que los restantes se presentaban sin alteraciones (Fig. 37b). En contraste, aquellos ratones nulos para *Spry1* presentaban riñones desorganizados y a menudo supernumerarios con cistos originados de los túbulos colectores (Kurokawa, K. *et al.* 2001; Basson, M.A. *et al.* 2005; Basson, M.A. *et al.* 2006).

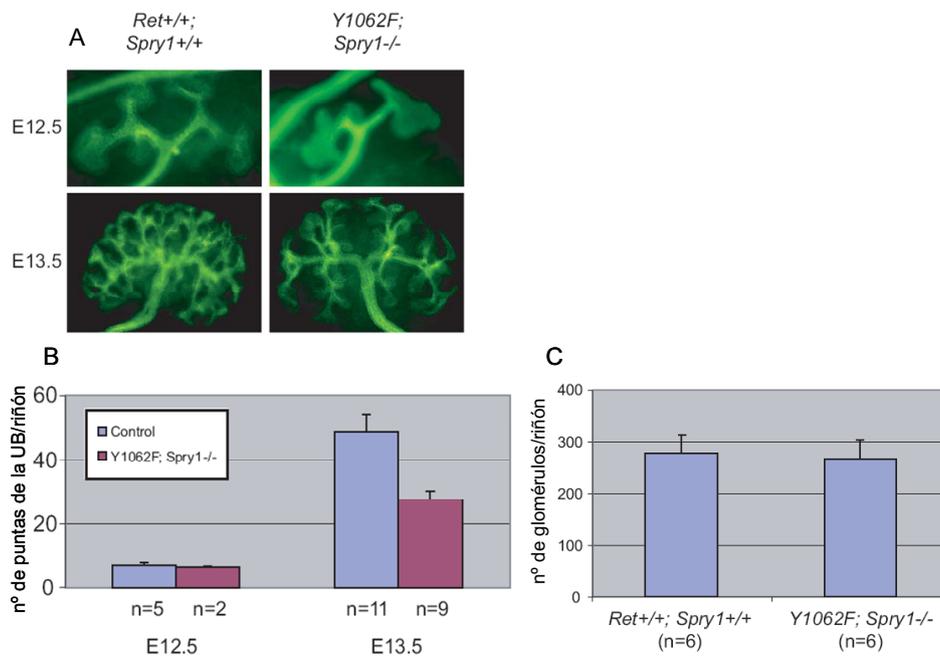


**Fig. 37 Análisis histológico de riñones de animales doble mutantes.**

**(a)** Tinción de Hematoxilina-Eosina sobre secciones de parafina de riñones de ratones recién nacidos de los genotipos indicados. Nótese la citoarquitectura esencialmente normal de los riñones de animales doblemente mutantes. **(b)** Fotografías a mayor aumento de secciones correspondientes a ratones doblemente mutantes mostrando cistos normales (centro) o bien levemente dilatados (derecha). Una fotografía comparativa correspondiente a un animal normal se indica a la izquierda. **(c)** Tinción PAS sobre cortes de médula de riñones de ratones recién nacidos de los genotipos indicados. Obsérvese la arquitectura esencialmente normal de los animales doblemente mutados.

A continuación, analizamos el patrón de ramificación de la Yema Uretérica (UB) mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra citokeratina (marcador de los túbulos colectores) en riñones embrionarios a E12.5 y E13.5

(días de edad embrionaria). Como se observa en Fig. 38a y b, mientras que la invasión inicial del MM y el número de ramificaciones de la UB entre riñones wild-type y aquellos doblemente mutantes a E12.5 eran similares, a E13.5 - aunque de tamaño total similar- las ramificaciones de la UB eran menos abundantes. Dicha disminución reflejaría un pequeño decremento en la velocidad de ramificación, que sin embargo, no afectaría drásticamente al desarrollo final de estos riñones, dado que el tamaño y el número total glomérulos en los riñones de ratones doble mutantes al nacer eran comparables a los de sus hermanos wild-type (Fig. 38c).



**Fig. 38 Los ratones doblemente mutantes exhiben un leve retardo en la velocidad de ramificación del árbol uretérico durante la organogénesis temprana del riñón.**

(a) Fotografías representativas de tinciones inmuno-fluorescentes en "whole-mount" contra citoqueratina (marcador de túbulo colectores renales) para riñones de los genotipos y edades embrionarias indicadas. (b) la cuantificación de puntas de la UB revela un retardo en la tasa de ramificación en los ratones doblemente mutantes. A E13.5 las diferencias observadas entre animales doblemente mutados y controles wt eran significativas ( $p=0,007$  en Prueba t de 2 colas). Puesto que no se encontraron diferencias entre animales wt y aquellos heterocigotos (*Ret*<sup>+/?</sup>; *Spry1*<sup>+/?</sup>), todos fueron incluidos en el mismo grupo, denominado "control". (c) A pesar de ello, el número de glomérulos en riñones de ratones doblemente mutantes al nacer era similar al de los correspondientes riñones wt ( $p=0,84$  en Prueba t de 2 colas).

14 La eliminación de *Sprouty1* retrasa la muerte post-natal temprana de ratones knock-in *Y1062FRet9*.

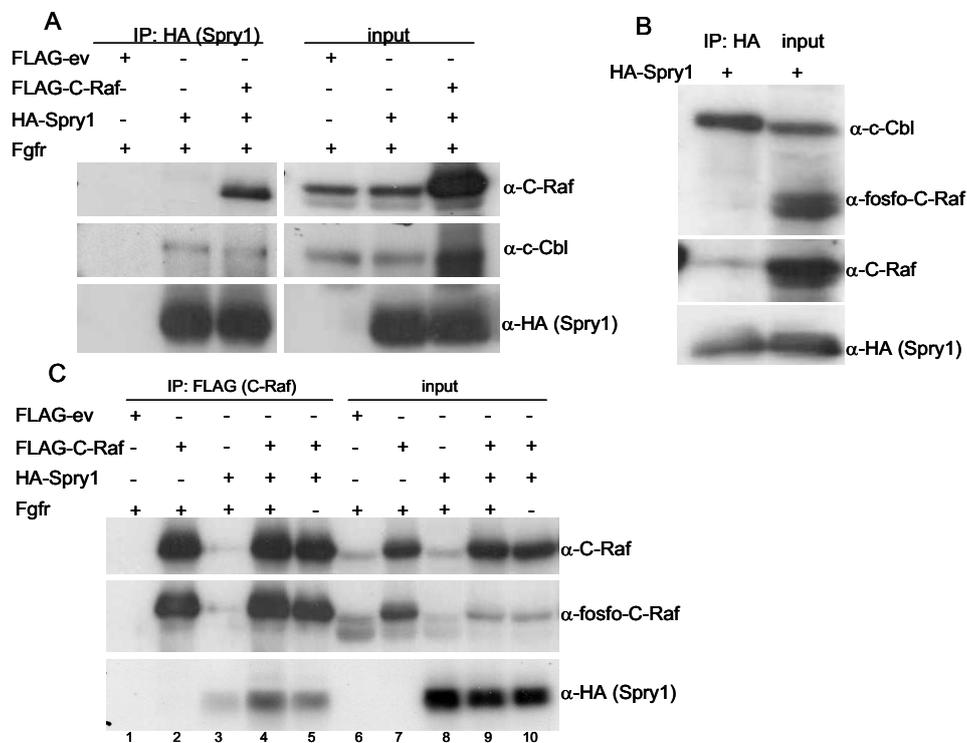
Finalmente, analizamos si la ausencia de *Spry1* era capaz de rescatar la letalidad post-natal temprana característica de los animales con la mutación en Tyr1062 de Ret. Para ello, determinamos el genotipo de la progenie obtenida a partir de animales heterocigotos para ambas mutaciones a P0.5 (es decir a edad Postnatal de 0,5 días, considerada como la mañana en que dichos animales habían nacido).

Así, el porcentaje de animales recién nacidos *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>* recuperados a P0.5 era sólo del 2,53% (cuando la proporción mendeliana esperada es del 6,25%), confirmando la letalidad temprana ocasionada por la mutación de Tyr1062. Por el contrario, los porcentajes obtenidos para animales *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>; Spry1<sup>-/-</sup>* a la edad analizada era del 7,6% sobre el 6,25% esperado, demostrando que la eliminación de *Spry1* en estos animales los rescata de la muerte temprana debida al ausencia de Tyr1062 en Ret. El análisis a P7 (7 días post-natales) arrojó un porcentaje de sólo el 0,5% para los animales doblemente mutados, sugiriendo que dichos animales mueren durante la primera semana de vida, presumiblemente debido a la carencia de inervación entérica (Stanchina, L. *et al.* 2006).

En resumen, hemos establecido que la delección de *Spry1* rescata los defectos del desarrollo renal -pero no los del sistema nervioso entérico y simpático- encontrados en ratones knock-in *Y1062FRet9*, sugiriendo un mecanismo potencial para la regulación de la vía ERK/MAPK por *Sprouty1* durante el desarrollo del tracto génito-urinario independiente de Tyr1062 de Ret (ver Discusión).

15 *Sprouty1* interacciona físicamente con C-Raf e inhibe su activación.

En un intento por esclarecer el mecanismo potencial por medio del cual Sprouty1 regularía la actividad de la vía ERK/MAPK, iniciamos un análisis bioquímico preliminar con el fin de caracterizar la capacidad de esta proteína para formar asociaciones con otras moléculas. Dadas las crecientes evidencias que postulan la interacción de miembros de la familia de Sprouty con Raf (Tefft, D. *et al.* 2002; Yusoff, P. *et al.* 2002; Sasaki, A. *et al.* 2003; Tsavachidou, D. *et al.* 2004; Yang, X. *et al.* 2006), inicialmente quisimos estudiar la habilidad de Sprouty1 para formar complejos con C-Raf.



**Fig. 39 Sprouty1 interacciona con C-Raf e inhibe su fosforilación.**

(a) Ensayo de co-inmunoprecipitación. HA-Spry1 y FLAG-C-Raf fueron sobre-expresados en células 293T y sus lisados celulares, inmunoprecipitados con un anticuerpo contra HA (Spry1). Nótese la co-precipitación de C-Raf con HA-Spry1. (b) Igual que en (a), pero sólo se sobre-expresó HA-Spry1, para determinar la co-inmunoprecipitación de C-Raf endógeno. Nótese en (a) y (b) la co-precipitación de c-Cbl endógeno como control positivo. (c) Co-inmunoprecipitación inversa. En este caso se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra FLAG (C-Raf) y se detectó la co-precipitación de Spry1. Nótese la menor fosforilación de C-Raf endógeno al sobre-expresar Spry1 (comparar carriles 6 y 8). input: lisados celulares antes de la inmunoprecipitación.

Para ello sobre-expresamos Spry1 y/o C-Raf en células de la línea HEK 293T y los correspondientes lisados celulares fueron sometidos a la técnica de inmunoprecipitación. Inmuno-complejos de Spry1 sobre-expresado se asociaban específicamente a C-Raf tanto en su forma endógena (Fig. 39b) como cuando era expresado ectópicamente (Fig. 39a y c). Así, pudimos determinar que efectivamente, Spry1 tiene la habilidad de formar complejos moleculares con C-Raf (Fig. 39). Es interesante destacar que el nivel de fosforilación de C-Raf endógeno parecía disminuir cuando Spry1 se encontraba sobre-expresado (comparar carriles 6 y 8 de Fig. 39c), indicando que, tal como se ha propuesto, la interacción de Spry1 con C-Raf inhibiría la activación de este último. No obstante, como se mencionó previamente, la caracterización de los mecanismos moleculares por los cuales Spry1 regularía la actividad de C-Raf (y posiblemente de las restantes proteínas de esta familia) se encuentra en una etapa preliminar, por lo que aún queda mucho por hacer para terminar de esclarecer estas interacciones, así como el significado biológico de las mismas.

## Discusión



## 1 Ret y Supervivencia Neuronal.

En la primera parte del presente trabajo de tesis doctoral nos enfocamos en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo, mediada por el sistema GDNF/GFR $\alpha$ 1/Ret. Para descomponer y analizar las vías de señalización inducidas por GDNF que dichas células necesitan para sobrevivir, nos valimos de cultivos primarios de neuronas provenientes de diferentes líneas de ratones knock-in en los que la expresión del gen *RET* endógeno ha sido reemplazada por una versión de origen humano que codifica la isoforma corta *Ret9* -o bien la isoforma larga *Ret51*-, donde las tirosinas en posiciones 981, 1015 o 1062 han sido mutadas -o no- a fenilalanina (ratones knock-in *Ret9*, *Y981FRet9*, *Y1015FRet9* o *Y1062FRet9*, respectivamente). Este modelo nos permitió determinar que la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK/MAPK se ven afectadas de forma diferencial por cada una de estas mutaciones. Así, la ausencia de Tyr1062 de Ret resulta en una reducción de la fosforilación tanto de Akt como de ERK1/2 hasta los niveles basales. Al respecto, sabemos que Ret activa las vías de señalización PI3K/Akt y ERK/MAPK por medio de la molécula adaptadora Grb2, que es reclutada tras la fosforilación de SHC o FRS2 (Besset, V. *et al.* 2000; Melillo, R.M. *et al.* 2001b), a través de la interacción directa de estas últimas con fosfo-Tyr1062 de Ret. La unión de GAB1/2 a Grb2 desencadena la activación de PI3K/Akt, mientras que la asociación de SOS a Grb2 inicia la cascada Ras-Raf-MEK, con la ulterior fosforilación de ERK1/2. Como ya se mencionó, tanto Shc como FRS2 se unen a Tyr1062 de Ret y por lo tanto, la mutación de dicho residuo eliminaría la fosforilación de estas proteínas adaptadoras y el subsiguiente desacoplamiento de Grb2, lo cual explicaría la incapacidad observada para activar ambas rutas de transducción de señales en dichos mutantes.

### 1.1 Papel de Tyr981 y Tyr1015 en la función de Ret.

Los mecanismos moleculares por los cuales Tyr981 podría regular estas vías de señalización (particularmente la cascada PI3K/Akt) no están claros, pero existen varias posibilidades que se relacionan principalmente con la

capacidad de este residuo para activar a las quinasas de la familia de Src (Encinas, M. *et al.* 2004). En este sentido, existen evidencias indicando que la señalización mediada por Ret/Src es necesaria para la fosforilación y activación de la molécula adaptadora Dok6, cuya función podría estar relacionada con el crecimiento neurítico inducido por GDNF (Crowder, R.J. *et al.* 2004). Por otro lado se ha descrito que el dominio de tipo SH3 de Src es requerido para interaccionar con Akt y así inducir su fosforilación y activación (Jiang, T. *et al.* 2003). Otro grupo ha sugerido que las quinasas de la familia de Src (SFKs) tienen la habilidad de modular la señalización mediada por PI3K a través de la inhibición directa de PTEN (Lu, Y. *et al.* 2003). Alternativamente, también se ha visto que SH2-B $\beta$  -otra proteína adaptadora que se asocia a Tyr918 (Zhang, Y. *et al.* 2006)- es un regulador positivo de la activación de Akt mediada por NGF en el modelo de diferenciación neuronal de la línea celular PC12 (Wang, X. *et al.* 2004), por lo que resulta lógico suponer un potencial papel para SH2-B $\beta$  en la modulación de la actividad de Akt en nuestro modelo. Finalmente, debemos recordar que Tyr981 de Ret también actúa como un sitio de acoplamiento para la quinasa de tirosinas c-Abl (Iavarone, C. *et al.* 2006). Al respecto, existen abundantes pruebas que asocian a las variantes oncogénicas de c-Abl (v-Abl y BCR-ABL) con la activación de la señalización por PI3K y su actividad transformante (Varticovski, L. *et al.* 1991; Jain, S.K. *et al.* 1996), aunque la relación directa de c-Abl con dicha cascada de señalización aún permanece sin esclarecer. Sea cual fuere el caso, los detalles de esta regulación aún necesitan ser explorados.

Con respecto a Tyr1015, vimos que su mutación sólo causa una disminución parcial de la señalización a través de ambas vías. Dicha tirosina activa la cascada de transducción PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>-PKC, de la cual es ampliamente sabido que puede afectar la activación directa de Raf/MEK/ERK a través de un mecanismo independiente de Ras (Ueda, Y. *et al.* 1996; Formisano, P. *et al.* 2000). Sin embargo, desconocemos los detalles del mecanismo mediante el cual esta mutación podría ejercer sus moderados efectos sobre la activación de la vía PI3K/Akt. Al respecto, se ha observado que, dependiendo del contexto celular, tanto PKC $\alpha$  (Kawakami, Y. *et al.* 2004; Partovian, C. *et al.* 2004) como

PKC $\beta$ II (Kawakami, Y. *et al.* 2004), o incluso la variante atípica PKC $\lambda$  (Li, J. *et al.* 2004), pueden fosforilar Ser473 de Akt. Por otro lado, la activación de PLC $\gamma$  dispara un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular que desemboca en la inducción de diferentes cascadas de señalización, principalmente a través de la activación de Calmodulina (Finkbeiner, S. *et al.* 1996). En este marco, se ha determinado que la activación de PI3K/Akt por el sistema Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina, es indispensable para la supervivencia de moto-neuronas de pollo en respuesta a NGF, BDNF (Egea, J. *et al.* 2001) y a GDNF (Perez-Garcia, M.J. *et al.* 2004). Alternativamente, existen datos según los cuales Tyr1175 de VEGFR-2 -el sitio de unión y activación para PLC $\gamma$  en dicho receptor- permite, además, el acoplamiento y fosforilación de otra proteína adaptadora, Shb, cuya activación parece ser necesaria para la señalización por PI3K y para la fosforilación de la quinasa de adhesión focal, FAK, inducidas por VEGF (Holmqvist, K. *et al.* 2004). Aunque no existen evidencias sobre la interacción entre Ret y Shb, es sabido que esta proteína adaptadora se asocia a diversos RTKs, como FGFR y TrkA (Lindholm, C.K. *et al.* 1999; Hooshmand-Rad, R. *et al.* 2000; Cross, M.J. *et al.* 2002; Lindholm, C.K. 2002), participando en la activación de FAK (Holmqvist, K. *et al.* 2003) y en la neuritogénesis inducida por NGF (Anneren, C. *et al.* 2003). Por otro lado, está bien documentada la activación de FAK por Ret (Murakami, H. *et al.* 1999), por lo que no resultaría extraño suponer que Shb pudiera tener la habilidad de mediar la activación indirecta de PI3K/Akt por Tyr1015 de Ret9, de manera independiente de PLC $\gamma$ . Futuros trabajos en torno a estas posibilidades deberán llevarse a cabo para esclarecer los detalles moleculares implicados en este efecto.

## 1.2 Tyr1062 de Ret media la supervivencia de Neuronas Simpáticas.

Más allá de los diferentes efectos que cada una de estas mutaciones de Ret9 ocasiona sobre las vías de señalización, sólo la mutación Tyr1062Phe elimina la capacidad de nuestros cultivos primarios de neuronas para sobrevivir en respuesta a GDNF. Como explicamos anteriormente, las principales vías de señalización intracelular activadas por este residuo de tirosina son las cascadas PI3K/Akt y ERK/MAPK. Existe multitud de evidencias –aunque no

exentas de polémica- que vinculan la actividad de ambas rutas de señalización con la supervivencia celular en diversos modelos y contextos celulares. Sorpresivamente, en nuestro modelo de neuronas simpáticas en cultivo, pudimos determinar que las vías de señalización PI3K/Akt y ERK/MAPK no son indispensables para que dicha supervivencia dependiente de GDNF tenga lugar.

En relación a la cascada de señalización PI3K/Akt, es importante recalcar que, según nuestros datos, no desempeñaría un papel significativo para la supervivencia mediada por GDNF de neuronas simpáticas en cultivo, a pesar de que se han demostrado los efectos anti-apoptóticos de la activación de PI3K en diferentes modelos. En base a la literatura, podemos decir que la actividad de esta ruta de transducción en relación a la supervivencia de neuronas simpáticas es controvertida, aunque hay que destacar que la mayoría de trabajos se han realizado en modelos de supervivencia mediada por NGF. Así, algunos autores han reportado que el bloqueo de la función de PI3K previene la supervivencia de neuronal mediada por NGF (Crowder, R.J. *et al.* 1998; Mazzoni, I.E. *et al.* 1999), mientras que otros grupos han descrito el efecto contrario (Philpott, K.L. *et al.* 1997; Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2000). Se desconocen las razones para tales discrepancias, pero probablemente estén relacionadas con las condiciones de cultivo, los métodos utilizados para inhibir la función de PI3K y/o para medir la supervivencia celular en cada modelo. Como ejemplo, los métodos para evaluar supervivencia basados exclusivamente en la actividad metabólica (como ensayos de reducción de MTT), pueden ser engañosos, puesto que la inhibición de PI3K, como pudimos corroborar en nuestro caso, disminuye el tamaño celular y, por ende, la actividad metabólica de las células (Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2000), pero no su viabilidad, pudiendo dar lugar a resultados dudosos sobre viabilidad celular. Del mismo modo, la utilización de dosis excesivas de drogas inhibitorias, como LY294002, podrían ocasionar toxicidad celular o afectar a otras enzimas de manera inespecífica, dando lugar a conclusiones equivocadas. Finalmente, se ha demostrado que el bloqueo de PI3K no desencadena los mismos eventos moleculares apoptóticos que se observan durante la privación de NGF en neuronas del SGC, como son la translocación de Bax hacia la mitocondria o la

liberación de Citocromo C hacia el citosol (Putcha, G.V. *et al.* 2004), indicando que la inhibición de esta vía de señalización no recapitula los efectos de la carencia de soporte trófico de manera precisa (Tsui-Pierchala, B.A. *et al.* 2000).

### 1.3 La vía PI3K en el metabolismo celular.

A favor de la idea según la cual la actividad de PI3K no está implicada en la supervivencia neuronal, nuestras evidencias parecen apuntar a un papel de la vía PI3K/Akt en el crecimiento y el estatus trófico de las células (Bayascas, J.R. *et al.* 2008; Bayascas, J.R. 2008b). Sustentando este concepto, vimos que la eliminación de la expresión de PDK1, cuya función es indispensable y limitante para la activación de PI3K/Akt *in vivo* (Bayascas, J.R. *et al.* 2008; Bayascas, J.R. 2008b), causaba un marcado descenso del tamaño celular, sin afectar la viabilidad de nuestras neuronas en cultivo. De manera similar, la ausencia de Tyr981 en Ret9, que provocaba un bloqueo prácticamente total de la fosforilación de Akt, también resultó en una disminución del tamaño del soma neuronal, sin provocar alteraciones en la supervivencia de estas células. Consistentemente, se ha observado que ratones con una mutación hipomórfica del gen *PDK1* son viables y fértiles, pero presentan una masa corporal reducida causada por una disminución en el tamaño de sus células, pero no en su número (Lawlor, M.A. *et al.* 2002). Más aún, en fibroblastos provenientes de estos animales, la tasa de apoptosis es igual que la de aquellos correspondientes a animales wild-type, por lo que se deduce que su viabilidad no se encuentra afectada de forma significativa. En este contexto, hipotetizamos que el control del estatus trófico y el tamaño celular por PI3K, podría estar asociado a la activación de mTOR, una kinasa que desempeña un conocido papel como “censor” de nutrientes para las células e implicada en la estimulación del anabolismo y el crecimiento neuronal (Jaworski, J. *et al.* 2006; Swiech, L. *et al.* 2008). Recientemente se ha establecido una conexión entre mTOR y la vía PI3K/Akt en el contexto del sistema insulina/IGF, tras la observación de que Akt fosforila -y en consecuencia inactiva- al complejo TSC1/TSC2, un inhibidor de la actividad de mTOR (Inoki, K. *et al.* 2002; Potter, C.J. *et al.* 2002; Huang, J. *et al.* 2009). Un modelo alternativo sugiere que Akt reprimiría la función de la Proteína Quinasa

Activada por AMP (AMPK), que es un activador de TCS2, promoviendo así la función de mTor (Hahn-Windgassen, A. *et al.* 2005). De forma tal que en nuestro sistema, el bloqueo en la activación de PI3K/Akt resultaría en una represión de la señalización mediada por mTOR, con la consecuente reducción o detención del crecimiento celular inducido por GDNF. Trabajos futuros deberán abordar estas hipótesis para desentrañar los detalles del mecanismo implicado en la regulación del estatus trófico por la vía PI3K/Akt en respuesta a GDNF.

#### 1.4 La vía B-Raf/IKKs es indispensable para la supervivencia de Neuronas Simpáticas.

Continuando el análisis de la viabilidad neuronal, pudimos establecer que la supervivencia de neuronas simpáticas inducida por factores neurotróficos es mediada por B-Raf. De hecho, encontramos que B-Raf (pero no A-Raf ni C-Raf) es indispensable para la supervivencia de neuronas simpáticas mediada por NGF y por GDNF, a través de un mecanismo que, como ya dijimos, es independiente de la actividad de MEK/ERK (Fig. 40).

Con el objeto de caracterizar este novedoso mecanismo por el cual B-Raf promueve la supervivencia de neuronas simpáticas independientemente de ERK1/2, pudimos determinar que la supervivencia promovida por B-Raf era mediada por acción directa de esta última sobre el complejo IKK, más concretamente sobre IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y que la actividad de éstas era indispensable para la supervivencia de dichas células en respuesta a NFG y a GDNF (Fig. 40). Esto estaría de acuerdo con las evidencias de Wiese y colaboradores (Wiese, S. *et al.* 2001), quienes observaron que una mutación que anula la expresión de *B-RAF* prevenía la supervivencia de neuronas motoras y sensoriales embrionarias mediada por neurotrofinas *in vitro*. En este trabajo, los autores también demostraron que la ausencia de *B-RAF* causaba una caída en la expresión de ciertos miembros de la familia de Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAPs), particularmente de XIAP. Estas observaciones, a su vez están de acuerdo con aquellas publicadas por el grupo de Kato (Perrelet, D. *et al.* 2002), quienes demostraron que IAPs son

esenciales para la supervivencia de neuronas motoras embrionarias inducida por GDNF. Consistentemente, en nuestro modelo también detectamos una disminución en los niveles de XIAP tras el silenciamiento de *B-Raf* por medio de shRNAs (Fig. 21 y Fig. 40).

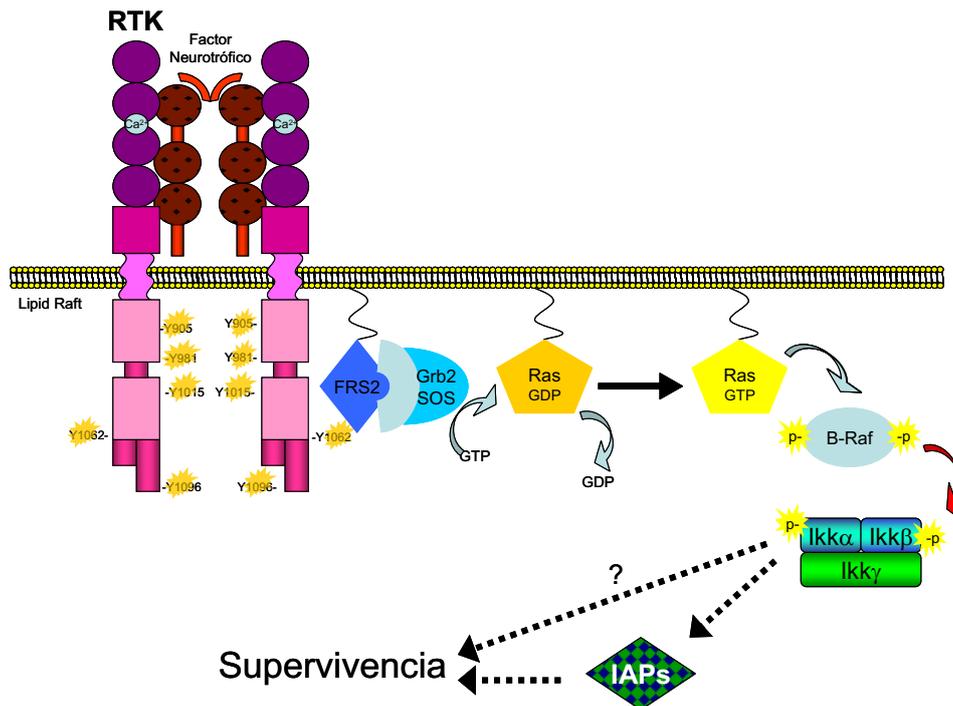


Fig. 40 Esquema del modelo propuesto para la supervivencia de neuronas simpáticas inducida por GDNF/Ret/B-Raf/IKKs.

La fosforilación de Tyr1062 de Ret9 activa la cascada Ras-Raf/ERK, que a nivel de B-Raf se bifurca hacia la inducción del complejo IKKs, para mediar la supervivencia a través de las proteínas de la Familia IAPs, entre otros posibles mecanismos.

No obstante, las neuronas simpáticas de ratones knock-out para *XIAP* pueden sobrevivir de manera normal en presencia de NGF (Potts, P.R. *et al.* 2003), indicando que la sola ausencia de *XIAP* no es suficiente para afectar la supervivencia de estas células en respuesta a neurotrofinas. Contrariamente a todas estas observaciones, un trabajo reciente sugiere que B-Raf no sería indispensable para la supervivencia de neuronas sensoriales *in vivo*, sino que en su lugar estaría relacionada con el crecimiento axonal de las mismas (Zhong, J. *et al.* 2007). Desconocemos si estas diferencias se deben a que son

específicas para cada tipo neuronal y/o al estadio de diferenciación de las mismas, o por el contrario, si se deben a la redundancia funcional entre los distintos miembros de la familia de Raf, o bien a detalles técnicos del citado reporte, como podría ser, por ejemplo, una ineficiente eliminación de la expresión de *B-Raf* en el momento del inicio de la muerte celular programada de las neuronas del DRG. En cualquier caso, futuras investigaciones deben ser aún llevadas a cabo para confirmar y esclarecer estas observaciones.

Por último, es interesante remarcar que B-Raf también podría desempeñar una función central como efector de la señalización de Ret fuera del sistema nervioso. B-Raf se encuentra mutado con alta frecuencia en cánceres humanos, particularmente en melanoma (30-60%), cáncer de tiroides (30-50%), cáncer colo-rectal (5-20%) y cáncer de ovario (~30%), así como también, aunque con baja frecuencia, en otros tipos de cánceres. Comúnmente, se trata de mutaciones de ganancia de función, que producen variantes con actividad quinasa constitutivamente activa (Davies, H. *et al.* 2002). Se han descrito más de 45 mutaciones en B-Raf, pero una de ellas en particular abraza cerca del 90% de los casos de cáncer en humanos. Se trata de la sustitución del residuo valina en posición 600 de B-Raf por un residuo de ácido glutámico, V600E-B-Raf.

Así, la vía Ret/Ras/B-Raf es la principal diana sobre la que recaen la mayoría de alteraciones genéticas relacionadas con el carcinoma de tiroides, donde la hiper-activación de los componentes de dicha cascada es la responsable de la proliferación y el fenotipo invasivo (Kimura, E.T. *et al.* 2003; Melillo, R.M. *et al.* 2005; Mitsutake, N. *et al.* 2006). En este contexto, existen evidencias de que, en una línea celular de carcinoma medular de tiroides humano, la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B se encuentra significativamente incrementada, y que ello se atribuye a una activación constitutiva de IKK $\beta$  (Ludwig, L. *et al.* 2001). Estos autores sostienen que dicha señalización es mediada por Ras y Raf, pero independientemente de la cascada PI3K/Akt y de MEK/ERK, y que la inhibición de NF- $\kappa$ B en dichas células resulta en la muerte apoptótica de las mismas. Más recientemente se ha descrito que en casos de

Carcinoma Medular de Tiroides, existe una asociación entre la presencia de mutaciones activadoras de *RET* y la activación de la señalización mediada por NF- $\kappa$ B (Gallel, P. *et al.* 2008). Paralelamente, se ha observado que en líneas celulares de melanoma que expresan el mutante constitutivamente activado V600E-Raf, la actividad del complejo IKK se encuentra aumentada, lo que se traduce en un incremento de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Más aún, se constató que la inhibición de la señalización por V600E-Raf conducía a una disminución en la actividad de IKKs y de NF- $\kappa$ B, haciendo a las células sensibles a la muerte apoptótica (Liu, J. *et al.* 2007). Este modelo difiere del paradigma clásico propuesto por el grupo de Marais, según el cual, en melanoma, los efectos de V600E-Raf son mediados por ERK1/2 (Wan, P.T. *et al.* 2004; Wellbrock, C. *et al.* 2004), pero se ve apoyado por trabajos recientes que demuestran que la inhibición de IKKs mediante diferentes aproximaciones constituye un arma potencial para el tratamiento de melanoma (Yang, J. *et al.* 2006; Yang, J. *et al.* 2007; Schon, M. *et al.* 2008)

Diversos grupos han comenzado a analizar las funciones de Raf independientes de MEK, principalmente mediante experimentos que incluyen inhibidores de MEK o versiones mutantes de Raf carentes de actividad quinasa. De entre las nuevas proteínas diana de Raf que se han descrito en los últimos años, algunas están implicadas en funciones biológicas como control de la muerte celular programada [ASK-1 (Chen, J. *et al.* 2001b) y MST-2 (O'Neill, E. *et al.* 2005)], regulación del ciclo celular [Retinoblastoma (Wang, S. *et al.* 1998) y Cdc25 (Galaktionov, K. *et al.* 1995)], supervivencia celular [NF $\kappa$ B (Pearson, G. *et al.* 2000) y miembros de la familia BAD/Bcl (Wang, H.G. *et al.* 1996a; Wang, H.G. *et al.* 1996b; Troppmair, J. *et al.* 2003)] y en organización del citoesqueleto [vimentina (Janosch, P. *et al.* 2000), Rok $\alpha$  (Ehrenreiter, K. *et al.* 2005) y keratina 8 (Ku, N.O. *et al.* 2004)].

Aunque el papel de las IKKs en la supervivencia neuronal no se conoce en profundidad, las evidencias disponibles de otros modelos sugieren toda una gama de mecanismos potenciales a través de los cuales las IKKs podrían bloquear la apoptosis. En primer lugar, la activación de NF- $\kappa$ B induce la

expresión de genes antiapoptóticos como miembros de la familia de Bcl-2 (A1/Bfl-1, Mcl-1 y Bcl-XL) o IAPs (XIAP) (Kucharczak, J. *et al.* 2003).

En segundo lugar, la activación de NF- $\kappa$ B mediada por IKKs puede bloquear la vía de señalización JNK. Está ampliamente establecido que la actividad de dicha ruta es necesaria para la muerte celular inducida por privación de factores tróficos en neuronas simpáticas (Ham, J. *et al.* 1995; Eilers, A. *et al.* 1998; Mota, M. *et al.* 2001; Xu, Z. *et al.* 2003). La represión de la cascada JNK por NF- $\kappa$ B puede llevarse a cabo de forma directa, por la inducción transcripcional de inhibidores de la misma, como Gadd45 $\beta$  (que bloquea la actividad de MKK7) (De Smaele, E. *et al.* 2001; Papa, S. *et al.* 2004), o de manera indirecta, por el aumento de los niveles de moléculas antioxidantes como la cadena pesada de Ferritina (Pham, C.G. *et al.* 2004), que contrarrestan la producción de especies reactivas de oxígeno durante el progreso de ciertos tipos de muerte celular, incluyendo la privación de NGF en neuronas simpáticas (Greenlund, L.J. *et al.* 1995; Jordan, J. *et al.* 1995).

En tercer lugar, las IKKs podrían ejercer sus efectos protectores independientemente de la activación de NF- $\kappa$ B. En este sentido, se ha observado que IKK $\beta$  contribuye al desarrollo tumoral porque promueve la fosforilación directa del factor de transcripción Foxo3A y su subsiguiente degradación dependiente de ubiquitina (Hu, M.C. *et al.* 2004). Apoyando este hecho, se ha demostrado que la proteína pro-apoptótica Bim se encuentra bajo la regulación transcripcional de Foxo3A -entre otros factores-, y que la eliminación de la expresión de Bim atenúa la muerte celular inducida por privación de factores tróficos en neuronas simpáticas (Gilley, J. *et al.* 2003).

En resumen, en el presente estudio hemos logrado esclarecer un novedoso mecanismo de señalización celular nunca antes descrito, a través del cual los factores neurotróficos promueven la supervivencia de neuronas simpáticas (y probablemente de otras sub-poblaciones neuronales y/o celulares), mediante la activación directa del complejo IKKs por B-Raf, pero independientemente de otras vías de señalización como PI3K/Akt o MEK/ERK.

Todos los resultados descritos hasta aquí han sido publicados en *Cell Death and Differentiation* (Encinas, M. *et al.* 2008).

## 2 Regulación de la actividad de Ret por Sprouty.

En una segunda aproximación, iniciamos el estudio de los efectos que pudiera tener la eliminación de Sprouty1 en la supervivencia y señalización molecular dependientes de GDNF/Ret en nuestro modelo de neuronas simpáticas en cultivo. Sprouty1 es miembro de una familia de proteínas reguladoras de la actividad de Ret y otros RTKs (Kim, H.J. *et al.* 2004), actuando como un antagonista de la vía ERK/MAPK, posiblemente a través de la inhibición de Raf (Sasaki, A. *et al.* 2003) y/o de otros componentes de dicha cascada, como Ras, Grb2 o FRS2 (Cabrita, M.A. *et al.* 2008).

### 2.1 Papel de Sprouty1 en la regulación de Ret en Neuronas Simpáticas.

Cada miembro de la familia de Sprouty se expresa en dominios específicos del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario del ratón (Zhang, S. *et al.* 2001). Spry2 ha sido implicado en la neuritogénesis de neuronas inmaduras del SNC en respuesta a BDNF, mientras que en neuronas diferenciadas estaría relacionada con la regulación del proceso de apoptosis (Gross, I. *et al.* 2007). La expresión forzada de Spry2 durante el desarrollo temprano de cerebro y cerebelo, ocasiona la muerte celular en la región anterior del mesencéfalo e induce otras alteraciones, todas estas asociadas a una señalización reducida de FGF (Basson, M.A. *et al.* 2008). Asimismo, Ishida y colaboradores han demostrado que Spry2 inhibe la proliferación y diferenciación de células de neuroblastoma inducidas por GDNF/Ret (Ishida, M. *et al.* 2007). Paralelamente, existen evidencias *in vivo* que indican un papel de Spry2 en la colonización del intestino por precursores neuronales del sistema nervioso entérico, proceso que también es mediado por GDNF/Ret (Taketomi, T. *et al.* 2005). Por otro lado, durante la organogénesis del tubo neural en el desarrollo embrionario del pollo, la expresión de Spry2 se detecta en el neuroporo anterior, la región ístmica, la placa neural y la médula espinal posterior. Sus transcritos también son observados en el mesodermo de los

arcos branquiales, la retina y el mesénquima intestinal, entre otras estructuras (Chambers, D. *et al.* 2000a; Chambers, D. *et al.* 2000b). En el desarrollo del pez cebra, *Spry1* se expresa en la región cráneo-facial y el mesencéfalo posterior, donde la expresión persiste hasta la madurez. Dominios adicionales en los que se observa *Spry1* son el telencéfalo, el cerebro posterior, el diencéfalo dorsal y la epífisis, entre otros (Komisarczuk, A.Z. *et al.* 2008). En este mismo modelo, se ha observado que una sobre-expresión moderada de *Sprouty4* induce la pérdida del cerebelo y una reducción del tamaño de la vesícula ótica (Furthauer, M. *et al.* 2001). Finalmente, aunque actualmente no hay datos que arrojen luz sobre las posibles funciones biológicas de *Spry3*, existen evidencias de que en el ratón, su expresión estaría restringida al cerebro y testículos de animales adultos (Minowada, G. *et al.* 1999).

En el modelo de cultivo primario de neuronas del SCG, nuestros datos indican que *Spry1* no ejerce un papel fundamental -si acaso alguno- en la modulación de la actividad de GDNF/Ret para la supervivencia neuronas simpáticas, como así tampoco para la regulación de la cascada ERK/MAPK en las mismas. Confirmando estos resultados, pudimos observar que en ratones nulos para *Spry1*, dicha eliminación no desencadena defectos sobre el desarrollo embrionario del Ganglio Cervical Superior *in vivo*. Asimismo, observamos que el silenciamiento de *Sprouty2* por medio de shRNAs tampoco afecta la activación de la vía de señalización ERK/MAPK mediada por Ret en neuronas simpáticas en cultivo, tanto en el contexto de neuronas wild-type como de aquellas nulas para *Spry1*. Puesto que, como hemos determinado en este trabajo, todos los miembros de la familia de *Sprouty* son expresados por neuronas simpáticas del SGC, no sabemos si nos encontramos ante un fenómeno de redundancia funcional, donde la actividad de los restantes miembros de la familia, *Spry3* y/o *Spry4*, serían suficientes para sobrellevar la carencia de *Spry1* y/o *Spry2* o, por el contrario, si estamos frente a una situación donde tanto *Spry1* como *Spry2* no desempeñarían funciones relevantes, siendo *Spry3* o *Spry4* de manera específica, las moléculas necesarias en la regulación de Ret en este sistema. Un trabajo sobre los efectos de la eliminación de *Sprouty4* en ratón sugiere un papel para dicha proteína en la morfogénesis de las extremidades y de la mandíbula, pero sin

tener efectos notables en órganos como pulmón, hígado, corazón, riñón, bazo y cerebro (Taniguchi, K. *et al.* 2007). Con respecto a Sprouty3, como ya se mencionó, actualmente no hay datos que arrojen luz sobre sus posibles funciones biológicas, pero existen evidencias de que en el ratón, su expresión estaría restringida al cerebro y testículos de animales adultos (Minowada, G. *et al.* 1999), convirtiéndolo en un interesante candidato para la regulación de la actividad de RTKs en neuronas simpáticas. Sea cual fuere el caso, futuras investigaciones serán necesarias para esclarecer la relevancia de los distintos miembros de la familia de Sprouty durante el desarrollo del Sistema Nervioso Simpático.

### 3 *Sprouty1* y *Tyr1062Ret9*.

En la segunda parte de este trabajo analizamos la relación entre la proteína Sprouty1 y las vías de señalización que tienen origen en Tyr1062 de Ret9, residuo que, como ya hemos visto, desempeña un papel crítico para la actividad biológica del receptor. Nos hemos centrado en el análisis de tres modelos fisiológicos en los que la actividad de Tyr1062 de Ret es indispensable, como son la supervivencia de neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior en cultivo, la colonización del tracto digestivo por los progenitores del sistema nervioso entérico y el desarrollo embrionario del sistema génito-urinario.

Para llevar a cabo este estudio decidimos producir una línea de ratones doblemente transgénicos, knock-in para *Y1062FRet9* y knock-out para *Spry1* al mismo tiempo. Así, obtuvimos una primera línea de progenitores, heterocigotos para cada una de las mutaciones estudiadas (*Ret<sup>+ / Y1062FRet9</sup>*; *Spry1<sup>+ / -</sup>*) de cuya cruce obtuvimos la progenie para ser analizada. Es importante mencionar que al nacer, dicha progenie guardaba las proporciones genotípicas mendelianas esperadas.

#### 3.1 Sistema Nervioso Simpático.

Al investigar la supervivencia mediada por GDNF de las neuronas simpáticas en cultivo, aisladas de ratones recién nacidos homocigotos para ambas mutaciones, encontramos que, tal como habíamos observado para el caso de animales knock-in *Y1062FRet9*, dichas células no eran capaces de sobrevivir, como así tampoco de activar a ERK1/2, en respuesta al mencionado factor neurotrófico. Esto significa que en el sistema simpático, la eliminación simultánea de la expresión de *Spry1* no modifica los efectos deletéreos de la ausencia de Tyr1062 de Ret9. Junto con nuestros datos anteriores según los cuales la eliminación de *Spry1* no afecta la supervivencia de neuronas simpáticas ni la modulación de la vía ERK/MAPK inducidas por GDNF, podemos confirmar nuestra conclusión inicial según la cual la función de *Sprouty1* no ocupa un papel crítico en este paradigma.

### 3.2 Sistema Nervioso Entérico.

En cuanto al desarrollo del Sistema Nervioso Entérico, vimos que la pérdida de *Spry1* no compensaba la falta de señalización debida a la mutación de Tyr1062 de Ret9, de manera que los ratones *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>; Spry1<sup>-/-</sup>* recapitulaban el fenotipo de aganglionsis del plexo entérico, característico de los animales knock-in *Y1062FRet9*. Por otro lado, en toda la extensión de los intestinos de ratones nulos para *Sprouty1* no se podían apreciar diferencias en la inervación entérica, respecto de los controles wild-type. La observación en profundidad arrojó que la densidad de fibras de los plexos entéricos en dichos animales era cuantitativamente comparable a la de los ratones hermanos de tipo silvestre. Por lo tanto, concluimos que *Sprouty1* no parece influir en la migración y proliferación de los neuroblastos entéricos, mediadas por GDNF/Ret. Al respecto, Taketomi y colaboradores (Taketomi, T. *et al.* 2005) reportaron que la eliminación de la expresión de *Sprouty2* en ratones generaba un fenotipo de hiperplasia de las neuronas entéricas, caracterizado por acalasia esofágica y pseudo-obstrucción intestinal. En este estudio, concluyeron que *Sprouty2* actúa como un regulador negativo de la señalización por GDNF/Ret en el desarrollo o supervivencia neonatales de las neuronas entéricas, indicando que diferentes miembros de la familia de *Sprouty* podrían desempeñar funciones específicas y no superpuestas durante el desarrollo

murino. Puesto que, tal como pudimos observar en el presente trabajo, todos los miembros de la familia de Sprouty se expresan en las neuronas del plexo mientérico de ratones wild-type recién nacidos, existe la posibilidad de que, paralelamente, existan ciertas funciones redundantes entre los distintos miembros de esta familia. Una vez más, futuras investigaciones deberán llevarse a cabo para continuar indagando el papel de los miembros de la familia de Sprouty durante la colonización y desarrollo de los precursores neuronales del ENS.

### 3.3 Organogénesis Renal.

Sorprendentemente, al investigar el modelo de desarrollo renal en estos animales, pudimos determinar que los defectos renales que caracterizan a la mutación *Y1062FRet9* -agénesis y/o hipodisplasia renal- son totalmente revertidos por la eliminación simultánea de *Sprouty1* (ratones *Ret<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>; Spry1<sup>-/-</sup>*). El análisis de la organogénesis renal temprana de estos ratones doblemente mutados indica que la Yema Uretérica (UB) puede emerger normalmente desde el conducto de Wolff (WD) en ausencia de Tyr1062 de Ret9 cuando Sprouty1 es eliminado, sugiriendo que la pérdida de Spry1 “des-reprimiría” algún mecanismo de señalización originado en otra(s) tirosina(s) del receptor, lo que sería capaz de compensar la ausencia de señalización desde Tyr1062 durante la evaginación de la UB (Fig. 41). Esta hipótesis está de acuerdo con los datos de Basson y sus colaboradores (Basson, M.A. *et al.* 2005), quienes demostraron que el fenotipo renal característico de ratones *Spry1<sup>-/-</sup>* (riñones supranumerarios, hidro-uréter, dilatación de cistos, entre otros) se debe a una hipersensibilidad de las células de la UB frente a las señales de GDNF secretadas por el mesénquima metanéfrico (MM), y que dicha capacidad de respuesta exacerbada (y el fenotipo que ocasiona) es revertida al reducir la dosis génica del citado factor trófico (ratones *GDNF<sup>+/-</sup>; Spry1<sup>-/-</sup>*).

Alternativamente, no podemos descartar un modelo en el cual la eliminación de Spry1 pudiera hiper-activar las vías de señalización -entre ellas ERK/MAPK- activadas por otros factores de crecimiento y sus correspondientes

RTKs, que también desempeñan un papel destacado durante el desarrollo renal, como FGFs (Bates, C.M. 2007) o HGF (Santos, O.F. *et al.* 1994), enmascarando la falta de señalización debida a la mutación Tyr1062Phe de Ret9. No obstante, en este paradigma, la importancia de estos sistemas de señalización no llega a ser comparable con la que tiene el sistema GDNF/Ret. Además, las evidencias de las que disponemos actualmente sobre la interacción génica entre *Sprouty1* y *GDNF* (Basson, M.A. *et al.* 2005; Basson, M.A. *et al.* 2006) nos permiten suponer que la actividad inhibidora de *Sprouty1* durante la organogénesis del sistema génito-urinario recae principalmente sobre la función de Ret.

Por lo tanto, y en vista de nuestros resultados, en este paradigma fisiológico proponemos un modelo según el cual, en ausencia de Tyr1062 de Ret, *Sprouty1* regularía las vías de señalización iniciadas en otra/s tirosina/s clave para la función de este receptor (Fig. 41). A pesar de que las limitaciones técnicas, debidas al tamaño minúsculo de los riñones embrionarios, no nos permitieron realizar un análisis bioquímico directo de los mecanismos moleculares responsables de la formación de la UB en los animales doblemente mutantes, nuestros datos aportan claridad sobre las vías mediante las que *Sprouty1* puede regular la actividad de GDNF/Ret.

Diversas líneas de evidencia reflejan que la mutación de Tyr1062 de Ret9 elimina la unión de Shc, FRS2 y Grb2 al complejo de señalización, motivo por el cual Ras no es activada tras la estimulación con GDNF (Asai, N. *et al.* 1996; Arighi, E. *et al.* 1997; Alberti, L. *et al.* 1998; Besset, V. *et al.* 2000; De Vita, G. *et al.* 2000; Hayashi, H. *et al.* 2000; Kurokawa, K. *et al.* 2001). Al respecto, es improbable que la pérdida de *Spry1* en estos ratones doblemente mutados resulte en una sobre-activación de la vía ERK/MAPK a nivel de Grb2 y/o de Ras, ya que la ausencia de Y1062 en Ret9 elimina el acoplamiento de Grb2-SOS/Ras en dichos animales. Apoyando esta idea, Martínez y colaboradores han demostrado que la inhibición de la vía ERK/MAPK por *Spry2* es independiente de su capacidad de unirse a Grb2, la cual ocurre de manera constitutiva (Martinez, N. *et al.* 2007).

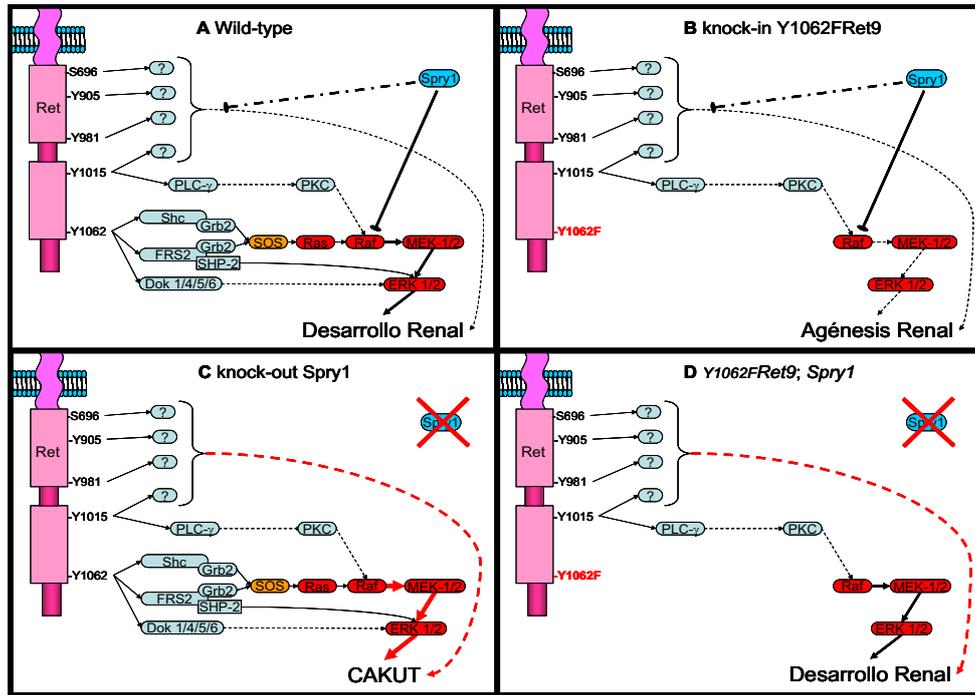


Fig. 41 Esquema del modelo propuesto para la regulación de Ret9 por Spry1 en ausencia de Tyr1062 durante la organogénesis renal.

**A** En el desarrollo renal de animales wild-type, la activación de la cascada ERK/MAPK a partir de Tyr1062 de Ret9 (y posiblemente de otras vías iniciadas en otras tirosinas del receptor, como por ejemplo, Y1015-PLC $\gamma$ /PKC/Raf) sería finalmente regulada por Spry1, para dar lugar a la correcta evaginación y ramificación de la UB. **B** En el caso de animales knock-in *Y1062FRet9*, la ausencia de señalización por la vía ERK/MAPK (y quizás otras vías originadas en dicho residuo) llevaría a la defectuosa evaginación de la UB y al correspondiente fenotipo renal que caracteriza a estos ratones. **C** Por el contrario, en aquellos individuos knock-out para *Spry1*, una excesiva señalización por ERK/MAPK (y posiblemente por vías iniciadas en otras tirosinas del receptor) desembocaría en el desarrollo de anomalías del tracto urinario (CAKUT). **D** Finalmente, en el caso de ratones doblemente mutantes, la carencia de señalización de Tyr1062 podría ser ahora rescatada por una des-represión de aquellas vías de señalización disparadas por otras tirosinas de Ret (como Y1015/PLC $\gamma$ /PKC/Raf), debido a la eliminación concomitante de Spry1.

Según nuestra hipótesis, una posible explicación sería que Spry1 regule la vía ERK/MAPK a través de la modulación de la señalización de Raf independiente de Ras, inhibiendo, en este caso, la activación de Raf inducida por el mecanismo PLC- $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>-PKC/Raf (Fig. 41), al igual que ocurre en la activación de ERK1/2 mediada por VEGF (Sasaki, A. *et al.* 2003 y ver más adelante). De hecho, se ha demostrado que Spry1 inhibe la proliferación de células endoteliales mediada por VEGF (Huebert, R.C. *et al.* 2004). Asimismo, se ha observado que en la rana *Xenopus tropicalis*, xtSpry inhibe la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup> intracelular y PKC $\delta$  durante la gastrulación (Sivak, J.M. *et al.* 2005), y que en una línea celular de ratón, la expresión de

Spry1 y Spry2 es regulada por la cascada de señalización PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> en respuesta a bFGF (Abe, M. *et al.* 2004).

En un trabajo reciente, se ha sugerido mediante estudios *in vitro*, que Spry4 no sólo regularía la activación de la vía ERK/MAPK inducida por VEGF/PLC- $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>-PKC, sino que además tendría la capacidad de inhibir la movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup> y otras funciones mediadas por PKC, entre las que se incluye la activación de IKKs/NF- $\kappa$ B (Ayada, T. *et al.* 2009). Paralelamente, existen evidencias previas *in vivo* de que la activación de PLC- $\gamma$  por GDNF/Ret es necesaria para la correcta ramificación de la UB (Jain, S. *et al.* 2006) y que la deficiencia de PLC- $\gamma$ 1 perjudica el desarrollo renal (Shirane, M. *et al.* 2001). Más aún, debemos recordar que en neuronas simpáticas en las que se ha mutado Tyr1015 de Ret9 -el sitio de unión y activación de PLC- $\gamma$ -, la fosforilación de ERK1/2 está reducida alrededor del 50% (Fig.12), sugiriendo que efectivamente, la activación de esta vía de señalización tiene lugar *in vivo*.

Como ya se mencionó, la eliminación de Sprouty1 retrasa la muerte post-natal temprana de ratones *Ret*<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>. Este efecto podría estar relacionado con el rescate fenotípico en el sistema renal, que favorecería de forma directa a una mayor capacidad de estos individuos para sobrevivir durante las primeras horas o días de vida, y de manera más indirecta, a un correcto desarrollo de los pulmones (Peters, C.A. *et al.* 1991). Probablemente debido a los defectos encontrados en el desarrollo del plexo mientérico en estos ratones, su supervivencia más allá de las 24-48 hs se encuentra seriamente comprometida (Stanchina, L. *et al.* 2006), y es por eso que a los 7 días de vida, el porcentaje de animales *Ret*<sup>Y1062FRet9/Y1062FRet9</sup>, *Spry1*<sup>-/-</sup> que sobreviven es prácticamente nulo.

#### 4 Sprouty interacciona con Raf.

Como ya se ha comentado, uno de los mecanismos propuestos para la inhibición de la vía ERK/MAPK por las proteínas Sprouty implica la unión de éstas a Raf, de manera que la secuestrarían, impidiendo su activación y/o

interacción con otros componentes de la cascada de señalización. Las primeras pruebas que sustentan este modelo provienen de los estudios de interacción genética en *D. melanogaster* de Reich y colaboradores (Reich, A. *et al.* 1999). Mediante experimentos de epistasis génica, estos investigadores demostraron que la expresión ectópica dSpry revertía los efectos letales inducidos por la sobre-expresión de un mutante activo de D-Raf y que en dichos individuos, el fenotipo de sus alas era similar al de aquellos en los que sólo dSpry -pero no Raf- estaba sobre-expresado. Asimismo, las alteraciones en el ovario originadas por la expresión ectópica de la variante activada de Raf, también eran rescatadas por la expresión concomitante de dSpry. Así, concluyeron que el efecto inhibitorio de dSpry sobre la ruta de señalización ERK/MAPK debía estar ocurriendo a nivel de Raf.

Posteriormente, dos trabajos publicados en 2002 pusieron mayor énfasis a dicha hipótesis. En uno de ellos, el grupo de Graeme Guy (Yusoff, P. *et al.* 2002) determinó que durante la inhibición de la vía Ras-ERK/MAPK por Spry2 de origen humano, la activación de Ras no se veía afectada. Mediante el uso de mutantes constitutivamente activos de Ras, Raf y MEK pudieron demostrar que el efecto represivo de hSpry2 ocurría a nivel de Raf, lo que fue verificado en ensayos de activación de Raf en el contexto de la señalización por FGF. En la otra línea de investigaciones, Teft y colaboradores (Tefft, D. *et al.* 2002) analizaron, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación, las interacciones de mSpry2 con diferentes miembros implicados en la activación de la cascada Ras-ERK/MAPK, tras la estimulación con Fgf10 de células epiteliales de pulmón de ratón. En este paradigma, determinaron que la inducción del receptor ocasionaba la fosforilación de mSpry2, su translocación a la membrana plasmática y su asociación a Raf-1, Grb2 y FRS2, lo cual resultaba en una reducción neta de la activación de ERKs.

Las pruebas más sólidas sobre las interacciones entre Sprouty y Raf provienen de las investigaciones de Sasaki y colaboradores (Sasaki, A. *et al.* 2003), quienes trabajaron con un modelo particularmente interesante. Analizaron la función de VEGFR-2, miembro de la familia de receptores para VEGF, que en células endoteliales activa a ERK1/2 a través de un mecanismo

particular, mediado por PLC- $\gamma$ 1, PKC/Ca<sup>2+</sup> intracelular y Raf, pero independientemente de Ras (Liebmann, C. 2001). En este contexto, observaron que mSpry4 bloqueaba completamente tanto la fosforilación de Raf-1 en Ser338 (Mason, C.S. *et al.* 1999; Kerkhoff, E. *et al.* 2001) –que es normalmente mediada por VEGF-, como la activación de ERK1/2. No obstante, vieron que la activación de Raf-1 y ERKs inducida por EGF (mediada por Ras) no se veía afectada por mSpry4. Además, observaron que mSpry4 también suprimía la actividad quinasa de C-Raf *in vitro*. Luego, corroboraron que el efecto inhibitorio de Spry4 ocurría a nivel de Raf-1 y no sobre la activación de PLC- $\gamma$ 1 o PKC, tras la estimulación con VEGF. Asimismo, demostraron que tanto Spry2 como Spry4 interaccionan físicamente con Raf-1 *in vivo* y que la región comprendida entre los residuos 151-222 del CRD de Spry4 era la responsable de dicha interacción. Esta región, a la que denominaron Dominio de Unión a Raf (RBD), está altamente conservada -como también lo estaría su función- entre los miembros de la familia de Sprouty, desde *D. melanogaster* hasta mamíferos. Con respecto a Raf-1, observaron que es su dominio catalítico C-terminal el requerido para la interacción con Spry4. Mediante ensayos de interacción *in vitro*, se determinó que la asociación entre estas moléculas ocurre de manera directa. La delección del RBD de Spry4 genera un mutante que retiene la capacidad de translocarse a la membrana plasmática y de formar oligómeros, pero aún así, no puede inhibir la activación de ERKs inducida por VEGF, sino que por el contrario, la incrementa y prolonga, teniendo un efecto “dominante negativo” sobre las proteínas Sprouty endógenas. Por el contrario, la tirosina altamente conservada en el dominio N-terminal de Sprouty (Tyr53 de Spry4) no parece ser necesaria para inhibir la activación de ERKs inducida por VEGF, mientras que sí lo es frente al estímulo de EGF o FGF, que son mediados por Ras.

En 2004, Tsavachidou y colaboradores (Tsavachidou, D. *et al.* 2004) presentaron evidencias sobre la interacción de Spry2 y Spry4 con B-Raf. En su modelo de estudio, observaron que Spry2 actúa como inhibidor de la señalización por ERK/MAPK en melanocitos primarios y líneas celulares de melanoma que expresan B-Raf de tipo silvestre (wild-type), pero no en aquellas que expresan la variante mutada V600E-B-Raf. Posteriormente, demostraron

mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, que tanto Spry2 como Spry4 interaccionan con B-Raf wild-type, pero no así con V600E-B-Raf y otros mutantes relacionados. Finalmente, encontraron que la expresión endógena de Spry2 en las células que expresan B-RAF wild-type estaba transcripcionalmente reprimida con respecto a aquellas células que expresan la variante mutada constitutivamente activada. Confirmando estas observaciones, más recientemente, se ha observado que la expresión de los miembros de la familia de Sprouty se encuentra regulada al alza en líneas de células de tumor de melanoma y de colon que portan la mutación V600E-B-Raf, debido a una insensibilidad a la modulación por retroalimentación negativa causada por dicha mutación, mientras que en líneas de tumores de mama y de pulmón, con mutaciones activadoras de RTKs -pero no en B-Raf-, la represión de la actividad de B-Raf sí tendría lugar (Pratilas, C.A. *et al.* 2009).

Más recientemente, Yang y colaboradores (Yang, X. *et al.* 2006) demostraron que en la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1, la sobreexpresión de Spry2 disminuye la activación de la vía ERK/MAPK mediada por Fgf1. En este contexto, determinaron que Raf-1 interacciona con un fragmento N-terminal de Spry2 (de 174 aminoácidos) en ensayos de “pull-down” con Glutación-S-Transferasa (GST pull-down).

Por último, las observaciones del grupo de Sutterlüty (Sutterlüty, H. *et al.* 2007) sugieren la posible relevancia fisiológica de la interacción entre Sprouty y Raf. Estos autores demostraron que la expresión de Spry2 inhibe la proliferación *in vivo* e *in vitro* de varias líneas celulares de carcinoma de pulmón (NSCLC), tanto de unas que expresaban K-Ras wild-type como de aquellas que expresaban la variante constitutivamente activada G12mutK-Ras. En estas últimas, el efecto inhibitorio de Spry2 ha de ser necesariamente en un punto posterior a la activación de Ras, muy posiblemente a nivel de Raf. Además, determinaron que el mutante Y55FSpry2, mantenía la capacidad de inhibir la proliferación de dichas células de manera significativa. El hecho de que Y55FSpry2 sea igualmente efectivo en dicha modulación apoya el papel de Raf en la misma, si recordamos que Sasaki y col. demostraron que tyr53 de Spry4 es irrelevante para la unión entre Spry4 y Raf-1.

Finalmente, y confirmando esta línea de evidencias, nosotros también hemos corroborado, en ensayos bioquímicos preliminares, la posible interacción molecular entre Sprouty1 y C-Raf. Estos datos se suman a las crecientes pruebas antes mencionadas, según las cuales, los distintos miembros de la Familia de Sprouty ejercerían sus efectos antagónicos sobre la cascada de señalización ERK/MAPK en base a su capacidad para unirse y, por ende “secuestrar” a Raf, impidiendo su activación y/o asociación a las restantes moléculas de la vía. En este contexto, pudimos además observar el potencial papel de Spry1 en la inhibición de la fosforilación de C-Raf, aunque estos resultados aún deben ser validados y su relevancia fisiológica estudiada.

En resumen, en esta segunda parte de nuestro estudio hemos determinado que la eliminación de *Spry1* rescata los defectos del desarrollo renal -pero no de los sistemas nerviosos entérico y simpático- encontrados en ratones knock-in para *Y1062FRet9*, sugiriendo un novedoso mecanismo potencial para la regulación de la vía ERK/MAPK por Sprouty1 durante el desarrollo del tracto génito-urinario. Gran parte de los resultados correspondientes a la segunda sección del presente trabajo han sido publicados en Journal of the American Society of Nephrology (Rozen, E.J. *et al.* 2008).

## Conclusiones



1. La mutación de las diferentes tirosinas del dominio intracelular de Ret, relevantes para su señalización -Tyr981, Tyr1015 y Tyr1062-, afectan diferencialmente el patrón de activación de las cascadas de transducción PI3K/Akt y ERK/MAPK.
2. La mutación Tyr1062Phe en Ret9 elimina la capacidad de activar las vías de señalización PI3K/Akt y ERK/MAPK, e impide la supervivencia, mediadas por GDNF en cultivos primarios de neuronas.
3. Las mutaciones en Tyr981 o Tyr1015 de Ret9 no alteran la capacidad de las neuronas simpáticas para sobrevivir en respuesta a GDNF.
4. La supervivencia neuronal dependiente de GDNF no requiere la señalización a través de la vía PI3K/Akt ni la activación de ERK1/2. La vía PI3K/Akt participa en el control del crecimiento celular mediado por GDNF.
5. B-Raf es una proteína clave para la supervivencia de neuronas simpáticas inducida por factores neurotróficos. IKKs interaccionan físicamente con B-Raf y actúan como moléculas diana efectoras de B-Raf en este sistema.
6. La inducción de la supervivencia neuronal a través de la señalización por el sistema B-Raf/IKKs no se encuentra restringido al Sistema Nervioso Simpático de ratón.
7. El desarrollo embrionario el Ganglio Cervical Superior de ratón no se ve alterado en ratones nulos para *Sprouty1*.
8. La supervivencia y la activación de la vía ERK/MAPK, mediadas por GDNF en neuronas simpáticas, no están sujetas a regulación por *Sprouty1*.
9. La carencia de *Sprouty1* no modifica los defectos de la supervivencia en respuesta a GDNF de neuronas simpáticas de ratones knock-in para *Y1062FRet9*. Tampoco rescata las deficiencias en la inervación entérica observadas en dichos ratones.

10. La eliminación de Sprouty1 revierte los defectos del desarrollo renal característicos de ratones knock-in para la mutación *Y1062FRet9*, por lo cual Spry1 es capaz de regular a Ret en ausencia de Tyr1062 del receptor.
  
11. Sprouty1 interacciona físicamente con C-Raf y posiblemente inhibe su fosforilación y consiguiente activación.

## Bibliografía



## Bibliografia

- Abe, M. and M. C. Naski (2004). "Regulation of sprouty expression by PLCgamma and calcium-dependent signals." Biochem Biophys Res Commun **323**(3): 1040-7.
- Airaksinen, M. S. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci **3**(5): 383-94.
- Airaksinen, M. S., A. Titievsky, et al. (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" Molecular & Cellular Neuroscience **13**(5): 313-25.
- Akerud, P., J. Alberch, et al. (1999). "Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons." J Neurochem **73**(1): 70-8.
- Alberti, L., M. G. Borrello, et al. (1998). "Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase." Oncogene **17**(9): 1079-87.
- Amiel, J. and S. Lyonnet (2001). "Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review." J Med Genet **38**(11): 729-39.
- Amiel, J., R. Salomon, et al. (1998). "Mutations of the RET-GDNF signaling pathway in Ondine's curse." Am J Hum Genet **62**(3): 715-7.
- Andreozzi, F., R. M. Melillo, et al. (2003). "Protein kinase Calpha activation by RET: evidence for a negative feedback mechanism controlling RET tyrosine kinase." Oncogene **22**(19): 2942-9.
- Andres, R., A. Forgie, et al. (2001). "Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth." Development **128**(19): 3685-95.
- Angrist, M., S. Bolk, et al. (1995). "Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease." Hum Mol Genet **4**(5): 821-30.
- Aranda, S., M. Alvarez, et al. (2008). "Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A." Mol Cell Biol **28**(19): 5899-911.
- Arce, V., R. A. Pollock, et al. (1998). "Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1)." J Neurosci **18**(4): 1440-8.
- Arenas, E., M. Trupp, et al. (1995). "GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo." Neuron **15**(6): 1465-73.
- Arighi, E., L. Alberti, et al. (1997). "Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase." Oncogene **14**(7): 773-82.
- Asai, N., H. Murakami, et al. (1996). "A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins." J Biol Chem **271**(30): 17644-9.
- Attie, T., A. Pelet, et al. (1995). "Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease." Hum Mol Genet **4**(8): 1381-6.
- Avantaggiato, V., N. A. Dathan, et al. (1994). "Developmental expression of the RET protooncogene." Cell Growth Differ **5**(3): 305-11.
- Ayada, T., K. Taniguchi, et al. (2009). "Sprouty4 negatively regulates protein kinase C activation by inhibiting phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis." Oncogene.
- Baloh, R. H., H. Enomoto, et al. (2000). "The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development." Curr Opin Neurobiol **10**(1): 103-10.

- Baloh, R. H., M. G. Tansey, et al. (1997). "TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret." *Neuron* **18**(5): 793-802.
- Baloh, R. H., M. G. Tansey, et al. (2000b). "Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists." *J Biol Chem* **275**(5): 3412-20.
- Basson, M. A., S. Akbulut, et al. (2005). "Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction." *Dev Cell* **8**(2): 229-39.
- Basson, M. A., D. Echevarria, et al. (2008). "Specific regions within the embryonic midbrain and cerebellum require different levels of FGF signaling during development." *Development* **135**(5): 889-98.
- Basson, M. A., J. Watson-Johnson, et al. (2006). "Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1." *Dev Biol* **299**(2): 466-77.
- Batchelor, P. E., G. T. Liberatore, et al. (2000). "Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum." *Eur J Neurosci* **12**(10): 3462-8.
- Bates, C. M. (2007). "Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development." *Pediatr Nephrol* **22**(3): 343-9.
- Baudet, C., A. Mikaels, et al. (2000). "Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron subpopulations, and their collaboration with neurotrophins." *Development* **127**(20): 4335-44.
- Baudet, C., E. Pozas, et al. (2008). "Retrograde signaling onto Ret during motor nerve terminal maturation." *J Neurosci* **28**(4): 963-75.
- Bayascas, J. R. (2008b). "Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways." *Cell Cycle* **7**(19): 2978-82.
- Bayascas, J. R., S. Wullschleger, et al. (2008). "Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance." *Mol Cell Biol* **28**(10): 3258-72.
- Bennett, D. L., T. J. Boucher, et al. (2000). "The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury." *J Neurosci* **20**(1): 427-37.
- Bennett, D. L., G. J. Michael, et al. (1998). "A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury." *J Neurosci* **18**(8): 3059-72.
- Bogni, S., P. Trainor, et al. (2008). "Non-cell-autonomous effects of Ret deletion in early enteric neurogenesis." *Development* **135**(18): 3007-11.
- Borrello, M. G., L. Alberti, et al. (1996). "The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2151-63.
- Brooks, A. S., B. A. Oostra, et al. (2005). "Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder." *Clin Genet* **67**(1): 6-14.
- Cabrita, M. A. and G. Christofori (2008). "Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling." *Angiogenesis* **11**(1): 53-62.
- Cacalano, G., I. Farinas, et al. (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* **21**(1): 53-62.

- Carter, M. T., J. L. Yome, et al. (2001). "Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function." Cytogenet Cell Genet **95**(3-4): 169-76.
- Costantini, F. and R. Shakya (2006). "GDNF/Ret signaling and the development of the kidney." Bioessays **28**(2): 117-27.
- Coulpier, M., J. Anders, et al. (2002). "Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival." J Biol Chem **277**(3): 1991-9.
- Crowder, R. J., H. Enomoto, et al. (2004). "Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth." J Biol Chem **279**(40): 42072-81.
- Crowder, R. J. and R. S. Freeman (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." J Neurosci **18**(8): 2933-43.
- Cully, M., H. You, et al. (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis." Nat Rev Cancer **6**(3): 184-92.
- Chambers, D. and I. Mason (2000a). "Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling." Mech Dev **91**(1-2): 361-4.
- Chambers, D., A. D. Medhurst, et al. (2000b). "Differential display of genes expressed at the midbrain - hindbrain junction identifies sprouty2: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists." Mol Cell Neurosci **15**(1): 22-35.
- Chen, J., K. Fujii, et al. (2001b). "Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7783-8.
- De Smaele, E., F. Zazzeroni, et al. (2001). "Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling." Nature **414**(6861): 308-13.
- Deckwerth, T. L. and E. M. Johnson, Jr. (1993). "Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor." J Cell Biol **123**(5): 1207-22.
- Dibb, N. J., S. M. Dilworth, et al. (2004). "Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family." Nat Rev Cancer **4**(9): 718-27.
- Donatello, S., A. Fiorino, et al. (2007). "SH2B1beta adaptor is a key enhancer of RET tyrosine kinase signaling." Oncogene **26**(45): 6546-59.
- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 177-82.
- Durick, K., R. Y. Wu, et al. (1996). "Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain." J Biol Chem **271**(22): 12691-4.
- Egan, J. E., A. B. Hall, et al. (2002). "The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6041-6.
- Egea, J., C. Espinet, et al. (2001). "Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin." J Cell Biol **154**(3): 585-97.
- Eilers, A., J. Whitfield, et al. (1998). "Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons." J Neurosci **18**(5): 1713-24.

- Eketjall, S., M. Fainzilber, et al. (1999). "Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex." EMBO J **18**(21): 5901-10.
- Encinas, M., R. J. Crowder, et al. (2004). "Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival." J Biol Chem **279**(18): 18262-9.
- Encinas, M., E. J. Rozen, et al. (2008). "Analysis of Ret knockin mice reveals a critical role for IKKs, but not PI 3-K, in neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons." Cell Death Differ **15**(9): 1510-21.
- Eng, C. (1996b). "Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease." N Engl J Med **335**(13): 943-51.
- Eng, C. and L. M. Mulligan (1997). "Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease." Hum Mutat **9**(2): 97-109.
- Engelman, J. A., J. Luo, et al. (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-19.
- Enomoto, H., T. Araki, et al. (1998). "GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys." Neuron **21**(2): 317-24.
- Enomoto, H., P. A. Crawford, et al. (2001). "RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons." Development **128**(20): 3963-74.
- Enomoto, H., R. O. Heuckeroth, et al. (2000). "Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin." Development **127**(22): 4877-89.
- Enomoto, H., I. Hughes, et al. (2004). "GFRalpha1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration." Neuron **44**(4): 623-36.
- Erickson, J. T., T. A. Brosenitsch, et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo." J Neurosci **21**(2): 581-9.
- Finkbeiner, S. and M. E. Greenberg (1996). "Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity?" Neuron **16**(2): 233-6.
- Formisano, P., F. Oriente, et al. (2000). "Insulin-activated protein kinase Cbeta bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells." Mol Cell Biol **20**(17): 6323-33.
- Fundin, B. T., A. Mikaelis, et al. (1999). "A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation." Development **126**(12): 2597-610.
- Furthauer, M., F. Reifers, et al. (2001). "sprouty4 acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish." Development **128**(12): 2175-86.
- Galabova-Kovacs, G., A. Kolbus, et al. (2006). "ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts." Cell Cycle **5**(14): 1514-8.
- Gallel, P., J. Pallares, et al. (2008). "Nuclear factor-kappaB activation is associated with somatic and germ line RET mutations in medullary thyroid carcinoma." Hum Pathol **39**(7): 994-1001.
- Garces, A., G. Haase, et al. (2000). "GFRalpha 1 is required for development of

- distinct subpopulations of motoneuron." *J Neurosci* **20**(13): 4992-5000.
- Garcia, Z., A. Kumar, et al. (2006). "Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division." *EMBO J* **25**(4): 655-61.
- Gershon, M. D. (1997). "Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system." *Curr Opin Neurobiol* **7**(1): 101-9.
- Gfralpha, N. C. (1997). "Nomenclature of GPI-linked receptors for the GDNF ligand family. GFR(alpha) Nomenclature Committee." *Neuron* **19**(3): 485.
- Gianino, S., J. R. Grider, et al. (2003). "GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation." *Development* **130**(10): 2187-2198.
- Golden, J. P., R. H. Baloh, et al. (1998). "Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS." *J Comp Neurol* **398**(1): 139-50.
- Granholt, A. C., M. Reyland, et al. (2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons." *J Neurosci* **20**(9): 3182-90.
- Greenlund, L. J., T. L. Deckwerth, et al. (1995). "Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death." *Neuron* **14**(2): 303-15.
- Grimm, J., M. Sachs, et al. (2001). "Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c- Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation." *J Cell Biol* **154**(2): 345-54.
- Gross, I., O. Armant, et al. (2007). "Sprouty2 inhibits BDNF-induced signaling and modulates neuronal differentiation and survival." *Cell Death Differ* **14**(10): 1802-12.
- Gross, I., B. Bassit, et al. (2001). "Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation." *J Biol Chem* **276**(49): 46460-8.
- Hacohen, N., S. Kramer, et al. (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways." *Cell* **92**(2): 253-63.
- Haglund, K., S. Sigismund, et al. (2003). "Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation." *Nat Cell Biol* **5**(5): 461-6.
- Hahn-Windgassen, A., V. Nogueira, et al. (2005). "Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity." *J Biol Chem* **280**(37): 32081-9.
- Hahn, M. and J. Bishop (2001). "Expression pattern of Drosophila ret suggests a common ancestral origin between the metamorphosis precursors in insect endoderm and the vertebrate enteric neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1053-8.
- Ham, J., C. Babij, et al. (1995). "A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death." *Neuron* **14**(5): 927-39.
- Hamanoue, M., G. Middleton, et al. (1999). "p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor." *Mol Cell Neurosci* **14**(1): 28-40.
- Hanafusa, H., S. Torii, et al. (2002). "Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway." *Nat Cell Biol* **4**(11): 850-8.
- Hansford, J. R. and L. M. Mulligan (2000). "Multiple endocrine neoplasia type 2 and

- RET: from neoplasia to neurogenesis." *J Med Genet* **37**(11): 817-27.
- Hawkins, P. T., T. R. Jackson, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase." *Nature* **358**(6382): 157-9.
- Hayashi, H., M. Ichihara, et al. (2000). "Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor." *Oncogene* **19**(39): 4469-75.
- Henderson, C. E., H. S. Phillips, et al. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." *Science* **266**(5187): 1062-4.
- Hennige, A. M., R. Lammers, et al. (2000). "Ret oncogene signal transduction via a IRS-2/PI 3-kinase/PKB and a SHC/Grb-2 dependent pathway: possible implication for transforming activity in NIH3T3 cells." *Mol Cell Endocrinol* **167**(1-2): 69-76.
- Hennige, A. M., R. Lammers, et al. (2001). "Inhibition of Ret oncogene activity by the protein tyrosine phosphatase SHP1." *Endocrinology* **142**(10): 4441-7.
- Heuckeroth, R. O., H. Enomoto, et al. (1999). "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." *Neuron* **22**(2): 253-63.
- Honma, Y., T. Araki, et al. (2002). "Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons." *Neuron* **35**(2): 267-82.
- Houldsworth, J., S. C. Heath, et al. (2002). "Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells." *Cell Growth Differ* **13**(6): 257-64.
- Hu, M. C., D. F. Lee, et al. (2004). "I $\kappa$ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." *Cell* **117**(2): 225-37.
- Huang, J. and B. D. Manning (2009). "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 217-22.
- Iavarone, C., M. Acunzo, et al. (2006). "Activation of the ERK8 MAP kinase by RET/PTC3, constitutively active form of the RET proto-oncogene." *J Biol Chem*.
- Ibáñez, C. F. (1998). "Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors." *Trends Neurosci* **21**(10): 438-44.
- Ichikawa, I., F. Kuwayama, et al. (2002). "Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT." *Kidney Int* **61**(3): 889-98.
- Iervolino, A., R. Iuliano, et al. (2006). "The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins." *Cancer Res* **66**(12): 6280-7.
- Ikonen, E. and K. Simons (1998). "Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells." *Semin Cell Dev Biol* **9**(5): 503-9.
- Impagnatiello, M. A., S. Weitzer, et al. (2001). "Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells." *J Cell Biol* **152**(5): 1087-98.
- Inoki, K., Y. Li, et al. (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* **4**(9): 648-57.
- Ishida, M., M. Ichihara, et al. (2007). "Sprouty2 regulates growth and differentiation

- of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase." *Cancer Sci* **98**(6): 815-21.
- Ishizaka, Y., F. Itoh, et al. (1989). "Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2." *Oncogene* **4**(12): 1519-21.
- Jain, S., M. Encinas, et al. (2006a). "Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development." *Genes Dev* **20**(3): 321-33.
- Jain, S., J. P. Golden, et al. (2006b). "RET is dispensable for maintenance of midbrain dopaminergic neurons in adult mice." *J Neurosci* **26**(43): 11230-8.
- Jain, S., C. K. Naughton, et al. (2004). "Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis." *Development* **131**(21): 5503-13.
- Jain, S. K., M. Susa, et al. (1996). "PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85 SH2 domains with p210 BCR/abl." *Blood* **88**(5): 1542-50.
- Jaworski, J. and M. Sheng (2006). "The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity." *Mol Neurobiol* **34**(3): 205-19.
- Jhiang, S. M. (2000). "The RET proto-oncogene in human cancers." *Oncogene* **19**(49): 5590-7.
- Jiang, T. and Y. Qiu (2003). "Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation." *J Biol Chem* **278**(18): 15789-93.
- Jijiwa, M., T. Fukuda, et al. (2004). "A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia." *Mol Cell Biol* **24**(18): 8026-36.
- Jing, S., D. Wen, et al. (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." *Cell* **85**(7): 1113-24.
- Jing, S., Y. Yu, et al. (1997). "GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family." *J Biol Chem* **272**(52): 33111-7.
- Jongen, J. L., E. Dalm, et al. (1999). "Depletion of GDNF from primary afferents in adult rat dorsal horn following peripheral axotomy." *Neuroreport* **10**(4): 867-71.
- Jordan, J., G. D. Ghadge, et al. (1995). "Expression of human copper/zinc-superoxide dismutase inhibits the death of rat sympathetic neurons caused by withdrawal of nerve growth factor." *Mol Pharmacol* **47**(6): 1095-1100.
- Kane, L. P., V. S. Shapiro, et al. (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." *Curr Biol* **9**(11): 601-4.
- Karin, M. and M. Delhase (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." *Semin Immunol* **12**(1): 85-98.
- Kawakami, Y., H. Nishimoto, et al. (2004). "Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion." *J Biol Chem* **279**(46): 47720-5.
- Kawamoto, Y., K. Takeda, et al. (2004). "Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry." *J Biol Chem* **279**(14): 14213-24.
- Keller-Peck, C. R., G. Feng, et al. (2001). "Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction." *J Neurosci* **21**(16): 6136-46.
- Kim, H. J. and D. Bar-Sagi (2004). "Modulation of signalling by Sprouty: a

- developing story." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(6): 441-50.
- Kimura, E. T., M. N. Nikiforova, et al. (2003). "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma." *Cancer Res* **63**(7): 1454-7.
- Klein, R. D., D. Sherman, et al. (1997). "A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor." *Nature* **387**(6634): 717-21.
- Komisarczuk, A. Z., S. Topp, et al. (2008). "Enhancer detection and developmental expression of zebrafish sprouty1, a member of the fgf8 synexpression group." *Dev Dyn* **237**(9): 2594-603.
- Kotzbauer, P. T., P. A. Lampe, et al. (1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." *Nature* **384**(6608): 467-70.
- Kramer, E. R., L. Aron, et al. (2007). "Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system." *PLoS Biol* **5**(3): e39.
- Kramer, E. R., L. Knott, et al. (2006). "Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb." *Neuron* **50**(1): 35-47.
- Kucharczak, J., M. J. Simmons, et al. (2003). "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." *Oncogene* **22**(56): 8961-82.
- Kurokawa, K., T. Iwashita, et al. (2001). "Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction." *Oncogene* **20**(16): 1929-38.
- Kurokawa, K., K. Kawai, et al. (2003). "Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase." *J Intern Med* **253**(6): 627-33.
- Kwabi-Addo, B., J. Wang, et al. (2004). "The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer." *Cancer Res* **64**(14): 4728-35.
- Lao, D. H., P. Yusoff, et al. (2007). "Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation." *J Biol Chem* **282**(12): 9117-26.
- Lawlor, M. A., A. Mora, et al. (2002). "Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice." *Embo J* **21**(14): 3728-38.
- Le Douarin, N. M. and M. A. Teillet (1974). "Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique." *Dev Biol* **41**(1): 162-84.
- Ledda, F., O. Bieraugel, et al. (2008). "Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF." *J Neurosci* **28**(1): 39-49.
- Lee, S. H., D. J. Schloss, et al. (2001). "Inhibition of angiogenesis by a mouse sprouty protein." *J Biol Chem* **276**(6): 4128-33.
- Lewandoski, M., E. N. Meyers, et al. (1997). "Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**: 159-68.
- Liebmann, C. (2001). "Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity." *Cell Signal* **13**(11): 777-85.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, et al. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic

- factor for midbrain dopaminergic neurons." Science **260**(5111): 1130-2.
- Lindahl, M., D. Poteryaev, et al. (2001). "Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells." J Biol Chem **276**(12): 9344-51.
- Lindahl, M., T. Timmusk, et al. (2000). "Expression and alternative splicing of mouse Gfra4 suggest roles in endocrine cell development." Mol Cell Neurosci **15**(6): 522-33.
- Lindfors, P. H., M. Lindahl, et al. (2006). "Ablation of persephin receptor glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha4 impairs thyroid calcitonin production in young mice." Endocrinology **147**(5): 2237-44.
- Lindholm, P., M. H. Voutilainen, et al. (2007). "Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo." Nature **448**(7149): 73-7.
- Liu, J., K. G. Suresh Kumar, et al. (2007). "Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells." Oncogene **26**(13): 1954-8.
- Liu, X., Q. C. Vega, et al. (1996). "Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities." J Biol Chem **271**(10): 5309-12.
- Lo, T. L., P. Yusoff, et al. (2004). "The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer." Cancer Res **64**(17): 6127-36.
- Lorenzo, M. J., G. D. Gish, et al. (1997). "RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2." Oncogene **14**(7): 763-71.
- Ludwig, L., H. Kessler, et al. (2001). "Nuclear factor-kappaB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation." Cancer Res **61**(11): 4526-35.
- Luo, J. L., H. Kamata, et al. (2005). "The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling." J Clin Immunol **25**(6): 541-50.
- Luo, W., S. R. Wickramasinghe, et al. (2007). "A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons." Neuron **54**(5): 739-54.
- Maggirwar, S. B., P. D. Sarmiere, et al. (1998). "Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons." J Neurosci **18**(24): 10356-65.
- Majumdar, A., S. Vainio, et al. (2003). "Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development." Development **130**(14): 3175-85.
- Manie, S., M. Santoro, et al. (2001). "The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation." Trends Genet **17**(10): 580-9.
- Martinez, N., C. A. Garcia-Dominguez, et al. (2007). "Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction." Cell Signal **19**(11): 2277-85.
- Mazzoni, I. E., F. A. Said, et al. (1999). "Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway." J Neurosci **19**(22): 9716-27.

- Mckie, A. B., D. A. Douglas, et al. (2005). "Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer." *Oncogene* **24**(13): 2166-74.
- Melillo, R. M., F. Carlomagno, et al. (2001). "The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits phosphatidylinositol 3- kinase to Ret: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for the binding to Ret." *Oncogene* **20**(2): 209-18.
- Melillo, R. M., M. D. Castellone, et al. (2005). "The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells." *J Clin Invest* **115**(4): 1068-81.
- Melillo, R. M., M. Santoro, et al. (2001b). "Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade." *Mol Cell Biol* **21**(13): 4177-87.
- Mijatovic, J., M. Airavaara, et al. (2007). "Constitutive Ret activity in knock-in multiple endocrine neoplasia type B mice induces profound elevation of brain dopamine concentration via enhanced synthesis and increases the number of TH-positive cells in the substantia nigra." *J Neurosci* **27**(18): 4799-809.
- Minowada, G., L. A. Jarvis, et al. (1999). "Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed." *Development* **126**(20): 4465-75.
- Mitsutake, N., M. Miyagishi, et al. (2006). "BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis." *Endocrinology* **147**(2): 1014-9.
- Moore, M. W., R. D. Klein, et al. (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* **382**(6586): 76-9.
- Mora, A., D. Komander, et al. (2004). "PKD1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 161-70.
- Mota, M., M. Reeder, et al. (2001). "Evidence for a role of mixed lineage kinases in neuronal apoptosis." *J Neurosci* **21**(14): 4949-57.
- Mulligan, L. M., C. Eng, et al. (1994b). "Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene." *Hum Mol Genet* **3**(12): 2163-7.
- Murakami, H., Y. Yamamura, et al. (2002). "Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase." *J Biol Chem* **277**(36): 32781-90.
- Natarajan, D., M. Grigoriou, et al. (1999). "Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture." *Development* **126**(1): 157-68.
- Natarajan, D., C. Marcos-Gutierrez, et al. (2002). "Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis." *Development* **129**(22): 5151-60.
- Naveilhan, P., C. Baudet, et al. (1998). "Expression and regulation of GFRalpha3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1295-300.
- Nishino, J., K. Mochida, et al. (1999). "GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion." *Neuron* **23**(4): 725-36.
- O'Neill, E. and W. Kolch (2005). "Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo." *Cell Cycle* **4**(3): 365-7.
- Ohiwa, M., H. Murakami, et al. (1997). "Characterization of Ret-Shc-Grb2 complex

- induced by GDNF, MEN 2A, and MEN 2B mutations." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 747-51.
- Oppenheim, R. W., L. J. Houenou, et al. (2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes." J Neurosci **20**(13): 5001-11.
- Pandey, A., H. Duan, et al. (1995). "The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10." J Biol Chem **270**(37): 21461-3.
- Pandey, A., X. Liu, et al. (1996). "Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7." J Biol Chem **271**(18): 10607-10.
- Papa, S., F. Zazzeroni, et al. (2004). "Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNK2." Nat Cell Biol **6**(2): 146-53.
- Paratcha, G. and C. F. Ibanez (2002). "Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme." Curr Opin Neurobiol **12**(5): 542-9.
- Paratcha, G., F. Ledda, et al. (2001). "Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts." Neuron **29**(1): 171-84.
- Parisi, M. A. and R. P. Kapur (2000). "Genetics of Hirschsprung disease." Curr Opin Pediatr **12**(6): 610-7.
- Pasini, B., I. Ceccherini, et al. (1996). "RET mutations in human disease." Trends Genet **12**(4): 138-44.
- Pearson, G., R. Bumeister, et al. (2000). "Uncoupling Raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to Raf activation." J Biol Chem **275**(48): 37303-6.
- Pellicci, G., F. Troglio, et al. (2002). "The neuron-specific Rai (ShcC) adaptor protein inhibits apoptosis by coupling Ret to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway." Mol Cell Biol **22**(20): 7351-63.
- Perez-Garcia, M. J., V. Cena, et al. (2004). "Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." J Biol Chem **279**(7): 6132-42.
- Peters, C. A., L. M. Reid, et al. (1991). "The role of the kidney in lung growth and maturation in the setting of obstructive uropathy and oligohydramnios." J Urol **146**(2 ( Pt 2)): 597-600.
- Pezeshki, G., B. Franke, et al. (2001). "Evidence for a ligand-specific signaling through GFRalpha-1, but not GFRalpha-2, in the absence of Ret." J Neurosci Res **66**(3): 390-5.
- Pham, C. G., C. Bubici, et al. (2004). "Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species." Cell **119**(4): 529-42.
- Pichel, J. G., L. Shen, et al. (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 73-6.
- Pierchala, B. A., J. Milbrandt, et al. (2006). "Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation." J Neurosci **26**(10):

- 2777-87.
- Poteryaev, D., A. Titievsky, et al. (1999). "GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1." FEBS Lett **463**(1-2): 63-6.
- Potter, C. J., L. G. Pedraza, et al. (2002). "Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2." Nat Cell Biol **4**(9): 658-65.
- Potts, P. R., S. Singh, et al. (2003). "Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis." J Cell Biol **163**(4): 789-99.
- Pratilas, C. A., B. S. Taylor, et al. (2009). "V600EBRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Pritchard, C. A., L. Bolin, et al. (1996). "Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene." Curr Biol **6**(5): 614-7.
- Putcha, G. V., C. A. Harris, et al. (2002). "Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice." J Cell Biol **157**(3): 441-53.
- Putcha, G. V. and E. M. Johnson, Jr. (2004). "Men are but worms: neuronal cell death in C elegans and vertebrates." Cell Death Differ **11**(1): 38-48.
- Qiao, S., T. Iwashita, et al. (2001). "Differential effects of leukocyte common antigen-related protein on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant proteins." J Biol Chem **276**(12): 9460-7.
- Rameh, L. E., A. Arvidsson, et al. (1997). "A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains." J Biol Chem **272**(35): 22059-66.
- Reich, A., A. Sapir, et al. (1999). "Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling." Development **126**(18): 4139-47.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.
- Rodriguez, C. I., F. Buchholz, et al. (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." Nat Genet **25**(2): 139-40.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.
- Romeo, G., P. Ronchetto, et al. (1994). "Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." Nature **367**(6461): 377-8.
- Rossi, J., K. H. Herzig, et al. (2003). "Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2." J Clin Invest **112**(5): 707-16.
- Rossi, J., K. Luukko, et al. (1999). "Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor." Neuron **22**(2): 243-52.
- Rossi, J., P. Santamaki, et al. (2005). "Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2)." Diabetes **54**(5): 1324-30.
- Rossi, J., A. Tomac, et al. (2000). "Distinct roles for GFRalpha1 and GFRalpha2 signalling in different cranial parasympathetic ganglia in vivo." Eur J

- Neurosci **12**(11): 3944-52.
- Rozen, E. J., H. Schmidt, et al. (2008). "Loss of Sprouty1 Rescues Renal Agenesis Caused by Ret Mutation." J Am Soc Nephrol.
- Rubin, C., V. Litvak, et al. (2003). "Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops." Curr Biol **13**(4): 297-307.
- Saarma, M. (2000). "GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily?" Eur J Biochem **267**(24): 6968-71.
- Saarma, M. and H. Sariola (1999). "Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)." Microsc Res Tech **45**(4-5): 292-302.
- Salvatore, D., M. V. Barone, et al. (2000). "Tyrosines 1015 and 1062 are in vivo autophosphorylation sites in ret and ret-derived oncoproteins." J Clin Endocrinol Metab **85**(10): 3898-907.
- Sanchez, M. P., I. Silos-Santiago, et al. (1996). "Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 70-3.
- Santoro, M., F. Carlomagno, et al. (1995). "Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B." Science **267**(5196): 381-3.
- Santoro, M., R. M. Melillo, et al. (2002). "Molecular mechanisms of RET activation in human cancer." Ann N Y Acad Sci **963**: 116-21.
- Santos, O. F., E. J. Barros, et al. (1994). "Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development." Dev Biol **163**(2): 525-9.
- Sariola, H. and M. Saarma (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3855-62.
- Sasaki, A., T. Taketomi, et al. (2003). "Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1." Cell Cycle **2**(4): 281-2.
- Saxén, L. (1987). Organogenesis of the kidney. Cambridge [Cambridgeshire] ; New York, Cambridge University Press.
- Scott, R. P., S. Eketjall, et al. (2005). "Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase." J Biol Chem **280**(14): 13442-9.
- Schon, M., B. G. Wienrich, et al. (2008). "KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment." J Natl Cancer Inst **100**(12): 862-75.
- Schuchardt, A., V. D'agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." Nature **367**(6461): 380-3.
- Schuchardt, A., V. D'agati, et al. (1996). "Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k-mutant mice result from defects in ureteric bud development." Development **122**(6): 1919-29.
- Schuetz, G., M. Rosario, et al. (2004). "The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells." J Cell Biol **167**(5): 945-52.
- Shah, M. M., R. V. Sampogna, et al. (2004). "Branching morphogenesis and kidney disease." Development **131**(7): 1449-62.
- Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-30.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.

- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.
- Sivak, J. M., L. F. Petersen, et al. (2005). "FGF signal interpretation is directed by Sprouty and Spred proteins during mesoderm formation." Dev Cell **8**(5): 689-701.
- Snider, W. D. and S. B. McMahon (1998). "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors." Neuron **20**(4): 629-32.
- Stanchina, L., V. Baral, et al. (2006). "Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development." Dev Biol **295**(1): 232-49.
- Stromberg, I., L. Bjorklund, et al. (1993). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo." Exp Neurol **124**(2): 401-12.
- Stucky, C. L., J. Rossi, et al. (2002). "GFR alpha2/neurturin signalling regulates noxious heat transduction in isolectin B4-binding mouse sensory neurons." J Physiol **545**(Pt 1): 43-50.
- Sutterluty, H., C. E. Mayer, et al. (2007). "Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms." Mol Cancer Res **5**(5): 509-20.
- Swiech, L., M. Perycz, et al. (2008). "Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 116-32.
- Takahashi, M., N. Asai, et al. (1993). "Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells." Oncogene **8**(11): 2925-9.
- Takahashi, M., Y. Buma, et al. (1991). "Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells." Oncogene **6**(2): 297-301.
- Takahashi, M., J. Ritz, et al. (1985). "Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement." Cell **42**(2): 581-8.
- Taketomi, T., D. Yoshiga, et al. (2005). "Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia." Nat Neurosci **8**(7): 855-7.
- Taniguchi, K., T. Ayada, et al. (2007). "Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling." Biochem Biophys Res Commun **352**(4): 896-902.
- Tansey, M. G., R. H. Baloh, et al. (2000). "GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival." Neuron **25**(3): 611-23.
- Taraviras, S., C. V. Marcos-Gutierrez, et al. (1999). "Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system." Development **126**(12): 2785-97.
- Tefft, D., M. Lee, et al. (2002). "mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L700-6.
- Tomac, A., E. Lindqvist, et al. (1995). "Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo." Nature **373**(6512): 335-9.
- Treanor, J. J., L. Goodman, et al. (1996). "Characterization of a multicomponent receptor for GDNF." Nature **382**(6586): 80-3.
- Trupp, M., N. Belluardo, et al. (1997). "Complementary and overlapping expression

- of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS." *J Neurosci* **17**(10): 3554-67.
- Tsavachidou, D., M. L. Coleman, et al. (2004). "SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant." *Cancer Res* **64**(16): 5556-9.
- Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, et al. (2002a). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." *Trends Neurosci* **25**(8): 412-7.
- Tsui-Pierchala, B. A., J. Milbrandt, et al. (2002b). "NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons." *Neuron* **33**(2): 261-73.
- Tsui-Pierchala, B. A., G. V. Putcha, et al. (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the trophic, but not the survival-promoting, actions of NGF on sympathetic neurons." *J Neurosci* **20**(19): 7228-37.
- Ueda, Y., S. Hirai, et al. (1996). "Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf." *J Biol Chem* **271**(38): 23512-9.
- Uesaka, T., S. Jain, et al. (2007). "Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype." *Development* **134**(11): 2171-81.
- Vainio, S. and Y. Lin (2002). "Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting." *Nat Rev Genet* **3**(7): 533-43.
- Van Haastert, P. J. and P. N. Devreotes (2004). "Chemotaxis: signalling the way forward." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8): 626-34.
- Varticovski, L., G. Q. Daley, et al. (1991). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants." *Mol Cell Biol* **11**(2): 1107-13.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, et al. (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." *Cell* **116**(6): 855-67.
- Wang, X., L. Chen, et al. (2004). "SH2-B is a positive regulator of nerve growth factor-mediated activation of the Akt/Forkhead pathway in PC12 cells." *J Biol Chem* **279**(1): 133-41.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, et al. (2004a). "The RAF proteins take centre stage." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 875-85.
- Wellbrock, C., L. Ogilvie, et al. (2004b). "V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes." *Cancer Res* **64**(7): 2338-42.
- Wiese, S., G. Pei, et al. (2001). "Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons." *Nat Neurosci* **4**(2): 137-42.
- Wong, E. S., C. W. Fong, et al. (2002). "Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling." *EMBO J* **21**(18): 4796-808.
- Worley, D. S., J. M. Pisano, et al. (2000). "Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system." *Development* **127**(20): 4383-93.
- Wullschleger, S., R. Loewith, et al. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* **124**(3): 471-84.

- Xing, S., T. L. Furminger, et al. (1998). "Signal transduction pathways activated by RET oncoproteins in PC12 pheochromocytoma cells." *J Biol Chem* **273**(9): 4909-14.
- Xu, Z., N. V. Kukekov, et al. (2003). "POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis." *EMBO J* **22**(2): 252-61.
- Yang, J., K. I. Amiri, et al. (2006). "BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways." *Clin Cancer Res* **12**(3 Pt 1): 950-60.
- Yang, J., W. H. Pan, et al. (2007). "Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth." *Cancer Res* **67**(7): 3127-34.
- Yang, X., J. B. Webster, et al. (2006). "Sprouty genes are expressed in osteoblasts and inhibit fibroblast growth factor-mediated osteoblast responses." *Calcif Tissue Int* **78**(4): 233-40.
- Young, H. M., C. J. Hearn, et al. (2001). "GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells." *Dev Biol* **229**(2): 503-16.
- Yu, T., S. Scully, et al. (1998). "Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction." *J Neurosci* **18**(12): 4684-96.
- Yusoff, P., D. H. Lao, et al. (2002). "Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf." *J Biol Chem* **277**(5): 3195-201.
- Zhang, S., Y. Lin, et al. (2001). "Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis." *Mech Dev* **109**(2): 367-70.
- Zhang, Y., W. Zhu, et al. (2006). "Interaction of SH2-B{beta} with RET is involved in signaling of GDNF-induced neurite outgrowth." *J Cell Sci*.
- Zhong, J., X. Li, et al. (2007). "Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo." *Nat Neurosci* **10**(5): 598-607.
- Zihlmann, K. B., A. D. Ducray, et al. (2005). "The GDNF family members neurturin, artemin and persephin promote the morphological differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons." *Brain Res Bull* **68**(1-2): 42-53.
- Zwick, M., L. Teng, et al. (2001). "Overexpression of GDNF induces and maintains hyperinnervation of muscle fibers and multiple end-plate formation." *Exp Neurol* **171**(2): 342-50.

## Artículos



# Analysis of Ret knockin mice reveals a critical role for IKKs, but not PI 3-K, in neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons

M Encinas<sup>1,\*</sup>, EJ Rozen<sup>1</sup>, X Dolcet<sup>2</sup>, S Jain<sup>3</sup>, JX Comella<sup>1,8</sup>, J Milbrandt<sup>4,5</sup> and EM Johnson Jr<sup>4,6,7</sup>

We analyzed the survival responses and downstream signaling elicited by GDNF on sympathetic neurons from different Ret knockin mice. Lack of tyrosine 1062, a multidocking site in Ret, completely prevented GDNF-mediated survival. Importantly, lack of tyrosine 981, although abrogating Akt phosphorylation, had no effect on neuronal survival, indicating that the PI 3-K/Akt pathway is not necessary for survival of sympathetic neurons. In contrast, silencing of B-Raf completely prevented not only GDNF-mediated but also NGF-mediated cell survival, independently of MEK-1/2. We identified IKKs as the main effectors of the protective effects of B-Raf. First, B-Raf interacted with and activated IKKs. Second, knockdown of IKKs reversed the protection afforded by a constitutively active form of B-Raf. Third, knockdown of IKKs prevented both NGF- and GDNF-mediated survival. In conclusion, our data delineate a novel survival pathway for sympathetic neurons linking B-Raf to IKKs, independently of both PI 3-K and MEK-1/2 pathways.

*Cell Death and Differentiation* advance online publication, 23 May 2008; doi:10.1038/cdd.2008.76

The GDNF family ligands (GFLs) constitute a group of neurotrophic factors (GDNF, NRTN, PSPN and ARTN) that regulate several aspects of the developing nervous system. GDNF and NRTN were identified by virtue of their ability to promote the survival of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons and sympathetic neurons, respectively. The spectrum of neuronal populations, which survive in response to GFLs has been broadened and now includes sensory, motor, parasympathetic and enteric neurons.<sup>1</sup>

GFLs signal through a common tyrosine kinase receptor (Ret), and one of the four coreceptors known as GFR $\alpha$ 1–4. Ret is alternatively spliced to produce at least two variants of identical sequence up to residue 1063, followed by a unique C-terminal sequence composed of either 9 or 51 amino acids (Ret9 and Ret51) (reviewed in Airaksinen *et al.*<sup>2</sup>).

Ret has five important tyrosines, which serve as docking sites for downstream effectors. Tyr905 binds Grb10 and Grb7, whereas Tyr981 binds Src, Abl and SHB- $\beta$ . Phospholipase C- $\gamma$  and Grb2 bind to Tyr1015 and Tyr1096 (which is only present in Ret 51), respectively. Finally, Tyr1062 is a multidocking site, which binds Shc, IRS-1, FRS-2 and Dok4/5/6 (reviewed in Airaksinen and Saarma<sup>1</sup>).

After phosphorylation of docking tyrosines and binding to the adequate adaptors, engagement of RTKs leads to the activation of signaling pathways that are ultimately responsible for the biological effects. Among them, the

phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)/Akt and the extracellular-related kinase 1 and 2 (ERK1/2) pathways have been shown to convey pro-survival signals in many different systems. Since Ret was an orphan receptor for years, most of our knowledge of its signaling properties comes from the analysis of its oncogenic forms. Thus, the relevance of the signaling pathways elicited by ligand-activated endogenous, wild-type Ret, in neuronal function is largely unexplored. On the other hand, the signaling pathways by which NGF, another neurotrophic factor for sympathetic neurons, promotes their survival is controversial, as contradicting reports on the role of the PI 3-K/Akt had been published.<sup>3–6</sup>

We have previously generated knockin mice expressing point mutants of either Ret9 or Ret51 of human origin. These included tyrosine-to-phenylalanine mutations of residues 981, 1015 and 1062.<sup>7</sup> In this work, we aim to elucidate the signaling pathways important for the survival of sympathetic neurons using such mutants and GDNF-mediated survival as readout. Our data reveal a critical role for tyrosine 1062, but not tyrosines 981 or 1015, in neuronal survival. Notably, lack of Ret tyrosine 981 impairs Akt phosphorylation but has no effect on cell survival, indicating that the PI 3-K/Akt pathway is not necessary for GDNF-mediated survival of sympathetic neurons. Instead, we find that a novel B-Raf/IKK pathway mediates the pro-survival effects of not only GDNF but importantly also NGF in sympathetic neurons.

<sup>1</sup>Cell Signaling and Apoptosis Group, Departament de Medicina Experimental, Lleida 25198, Spain; <sup>2</sup>Grup de Patologia Oncologica, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Lleida 25198, Spain; <sup>3</sup>Department of Medicine, Renal Division, St. Louis, MO 63110, USA; <sup>4</sup>HOPE center for Neurological Disorders, St. Louis, MO 63110, USA; <sup>5</sup>Department of Pathology, St. Louis, MO 63110, USA; <sup>6</sup>Department of Molecular Biology and Pharmacology, St. Louis, MO 63110, USA and <sup>7</sup>Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

\*Corresponding author: M Encinas, Laboratori d'Investigació HUAV/UdL, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 1a planta, Rovira Roure, 80, Lleida 25198, Spain; Tel/Fax: + 34 973702213; E-mail: mario.encinas@mex.udl.cat

<sup>8</sup>Current Address: Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain.

**Keywords:** neuronal survival; Ret; B-Raf; IKK

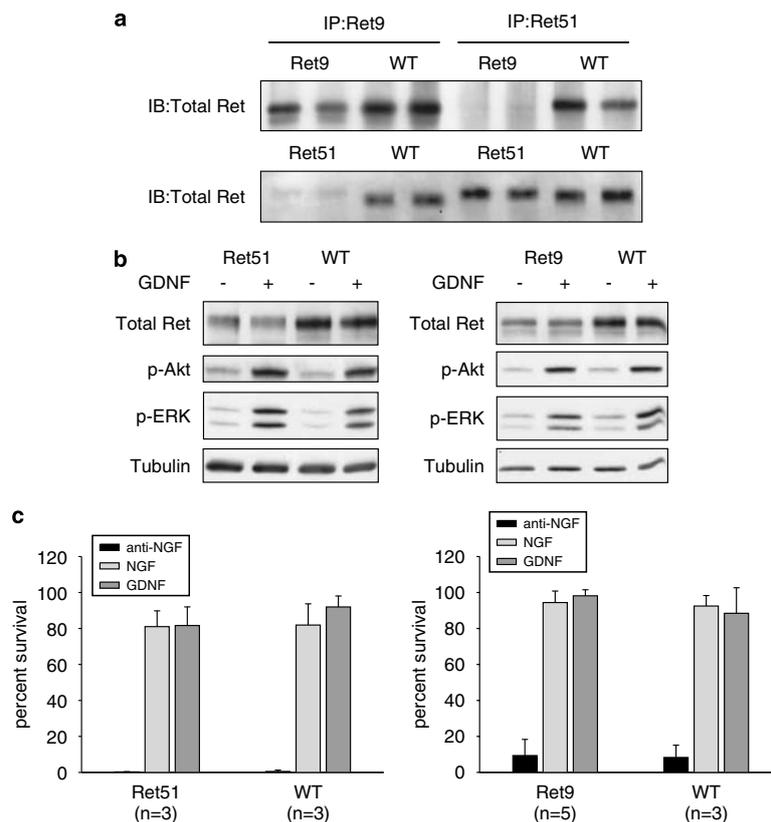
**Abbreviations:** GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; PI 3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; ERK, extracellular-signal regulated kinase; MAPK, mitogen activated protein kinase; IKK, I kappa B kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; RTK, receptor tyrosine kinase  
Received 30.11.07; revised 17.4.08; accepted 28.4.08; Edited by RA Knight

## Results

**Neurons from mice expressing Ret9 or Ret51 display similar responses to GDNF.** As mentioned above, two Ret splicing isoforms that differ at the carboxy terminus have been identified (Ret9 and Ret51). We wanted to analyze whether such differences affected Ret downstream signaling or bioactivity in sympathetic neurons. We first verified that neurons expressed the expected Ret isoforms by immunoprecipitating Ret from cultured sympathetic neurons from mice expressing either wild-type Ret9 or Ret51 (Figure 1a). We next checked the activation of the PI 3-K/Akt and Ras/MAPK pathways. Lysates from neurons stimulated with GDNF for 10 min were probed with phosphoantibodies specific for phosphorylated Ser473 Akt and dually phosphorylated ERK1/2. No differences between Ret<sup>RET9</sup> or Ret<sup>RET51</sup> knockin mice and their wild-type littermates were detected, despite the observation that mutant mice appeared to express slightly less Ret than

wild-type animals (Figure 1b). Finally, we analyzed the survival response prompted by GDNF on neurons from Ret<sup>RET9</sup> and Ret<sup>RET51</sup> mice. As shown in Figure 1c, GDNF promoted the survival of 80–90% of neurons from both Ret<sup>RET9</sup> and Ret<sup>RET51</sup> knockin mice, a response, which was similar to that of their wild-type littermates. This survival response was also comparable to NGF-dependent survival of both mutant and wild-type neurons. In summary, despite the differences between Ret9 and Ret51, the two splicing isoforms appear to elicit similar biological responses to GDNF in sympathetic neurons.

**Akt and ERK1/2 activation are differentially affected by the mutation of tyrosines 981, 1015 or 1062 in the context of Ret9.** To ascertain the role of Ret tyrosines 981, 1015 and 1062 in GDNF-mediated downstream signaling in sympathetic neurons, we checked the activation of both Akt and ERK1/2 after acute (10 min) stimulation with GDNF in



**Figure 1** Neurons from knockin mice expressing only Ret9 or Ret51 display similar responses to GDNF. (a) Ret knockin mice express the expected splice isoforms. Lysates from sympathetic neurons from knockin mice expressing human, wild-type Ret9 or Ret51 were immunoprecipitated with the indicated isoform-specific antibodies and probed with a Ret antibody raised against the extracellular domain of the receptor (total Ret). Note the difference in electrophoretic mobility between Ret9 and Ret51. (b) Signaling from neurons expressing only Ret9 or Ret51 is indistinguishable from that of wild-type neurons. Cells were stimulated for 10 min with GDNF and lysates were probed with phosphospecific antibodies to phosphor-Ser473 Akt and dually phosphorylated ERK1/2. (c) GDNF fully rescues sympathetic neurons from both Ret<sup>RET9</sup> and Ret<sup>RET51</sup> knockin mice. Neurons from each genotype were cultured in NGF for 5 days and then incubated with media containing a blocking anti-NGF antibody, NGF or GDNF. Neuronal survival was scored 48 h later as described in Materials and Methods section. The number in parenthesis depicts the number of animals analyzed

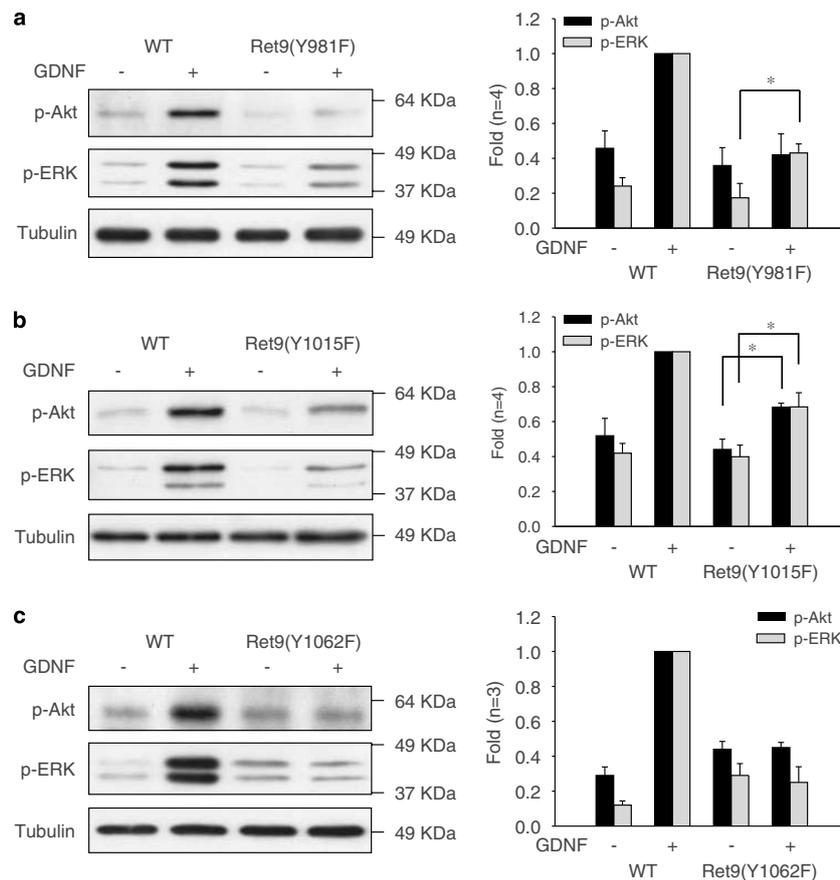
lysates from mice lacking the above tyrosines, and compared mutant mice with their wild-type littermates. In the context of Ret9, lack of tyrosine 981 caused an almost complete abrogation of Akt phosphorylation together with a remarkable but less drastic reduction in ERK1/2 activation. Mutation of tyrosine 1015, on the other hand, decreased both Akt and ERK1/2 phosphorylation to approximately a half, whereas sympathetic neurons from Ret<sup>RET9(Y1062F)</sup> mice showed no activation of either pathway above the baseline (Figure 2). Essentially, the same results were obtained when GDNF stimulation was performed for 24 h (Supplementary Figure 1). Surprisingly, none of the three mutations caused a significant change in the pattern of phosphorylation of either Akt or ERK1/2 in the context of Ret51 (data not shown and<sup>7</sup>).

These data, together with the observation that mice expressing either Ret51(Y1062F) or truncated Ret51 lacking

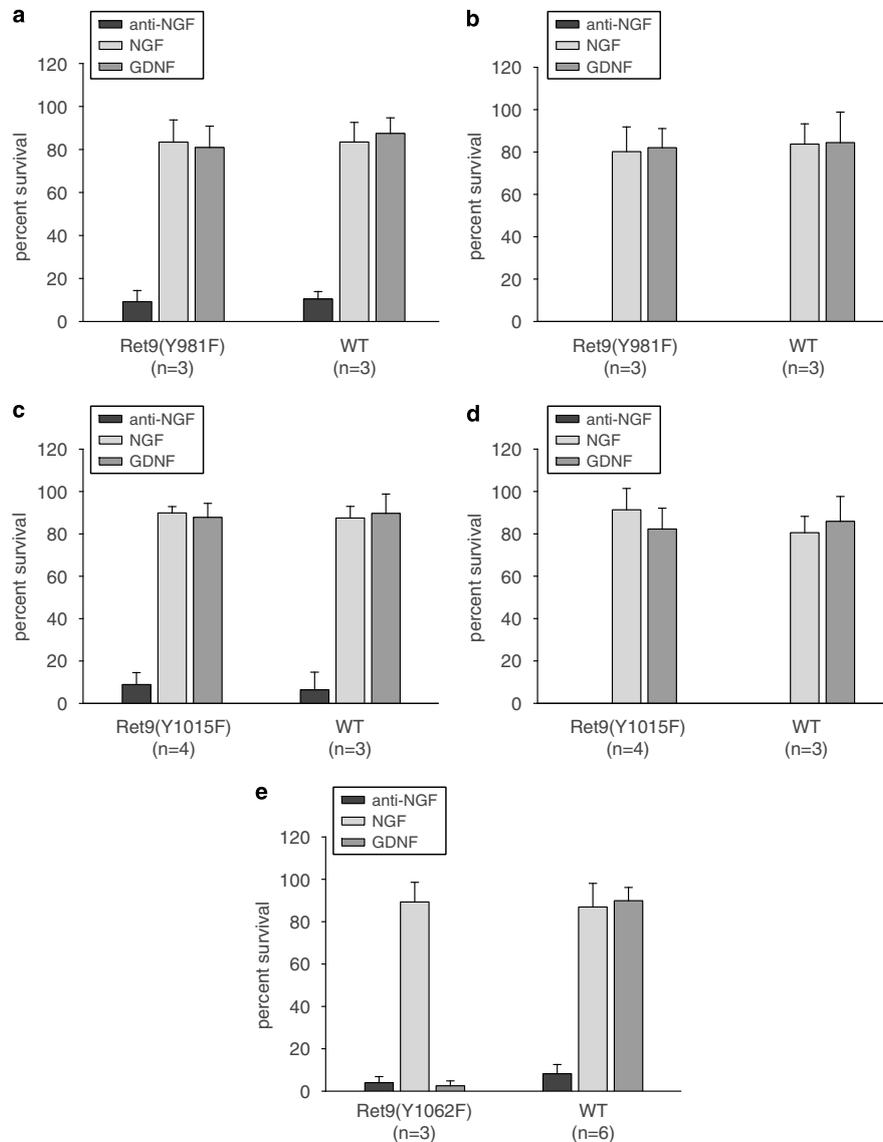
Tyr1096 develop normal kidneys, whereas Y1062F mutation introduced in Ret9 results in kidney agenesis,<sup>7</sup> suggest that Tyr1096 plays a redundant role in Ret signaling. To characterize the effects of mutations of Ret tyrosines 981, 1015 and 1062 without the confounding effects of redundant signaling by the carboxy terminus of Ret51, we performed further studies only in the context of the Ret9 isoform.

#### Mutation of tyrosine 1062, but not 981 or 1015 abrogates GDNF-mediated survival.

Having shown that mutation of tyrosines 981, 1015 and 1062 in Ret9 decreased downstream signaling, we sought to analyze the effects of their absence on GDNF-mediated neuronal survival. Surprisingly, neurons from Ret<sup>RET9(Y981F)</sup> mice did not show any reduction on GDNF-mediated survival (Figure 3, left column and Supplementary Figure 1), despite causing almost no phosphorylation of Akt. Neurons survived to levels



**Figure 2** Mutation of Ret tyrosines 981, 1015 or 1062 differentially affects GDNF-mediated downstream signaling. Representative immunoblots of phospho-Ser473 Akt and dually phosphorylated ERK1/2 from sympathetic neurons from Ret<sup>RET9(Y981F)</sup> (a), Ret<sup>RET9(Y1015F)</sup> (b) or Ret<sup>RET9(Y1062F)</sup> mice (c). For comparison, wild-type littermates are shown. Lack of tyrosine 981 caused an almost complete abrogation of Akt phosphorylation and reduced ERK phosphorylation to a lesser extent. In Ret<sup>RET9(Y1015F)</sup> animals, both Akt and ERK phosphorylation was decreased approximately 50%, whereas mutation of tyrosine 1062 blocked both Akt and ERK phosphorylation to basal levels. Right panels show densitometric analysis of the indicated number of independent experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of fold induction. Asterisks depict  $P < 0.05$  by two-tailed *t*-test



**Figure 3** Only neurons from  $Ret^{RET9(Y1062F)}$  mice fail to survive in the presence of GDNF. Quantification of the survival response to GDNF of sympathetic neurons from mice lacking tyrosine 981 (a and b), tyrosine 1015 (c and d) or tyrosine 1062 (e). The graphs on the left (a, c and e) depict survival 48 h after switching cells to GDNF, whereas the right panels (b and d) show the same cultures 1 week after switch. NGF-supported neurons were used as a control. The survival was compared to those of wild-type littermates. Number in parenthesis depicts the number of animals of each genotype analyzed

similar to those achieved by their wild-type littermates or by neurons from  $Ret^{RET9}$  mice. The survival response was similar to that elicited by NGF, and lasted at least up to 7 days, the last time point analyzed (Figure 3, right column and Supplementary Figure 2). Neurons from  $Ret^{RET9(Y1015F)}$  mice showed a similar response, that is, full rescue by GDNF (Figure 3 and Supplementary Figure 2), whereas mutation of tyrosine 1062 completely prevented GDNF-mediated survival. Neurons expressing this mutation responded

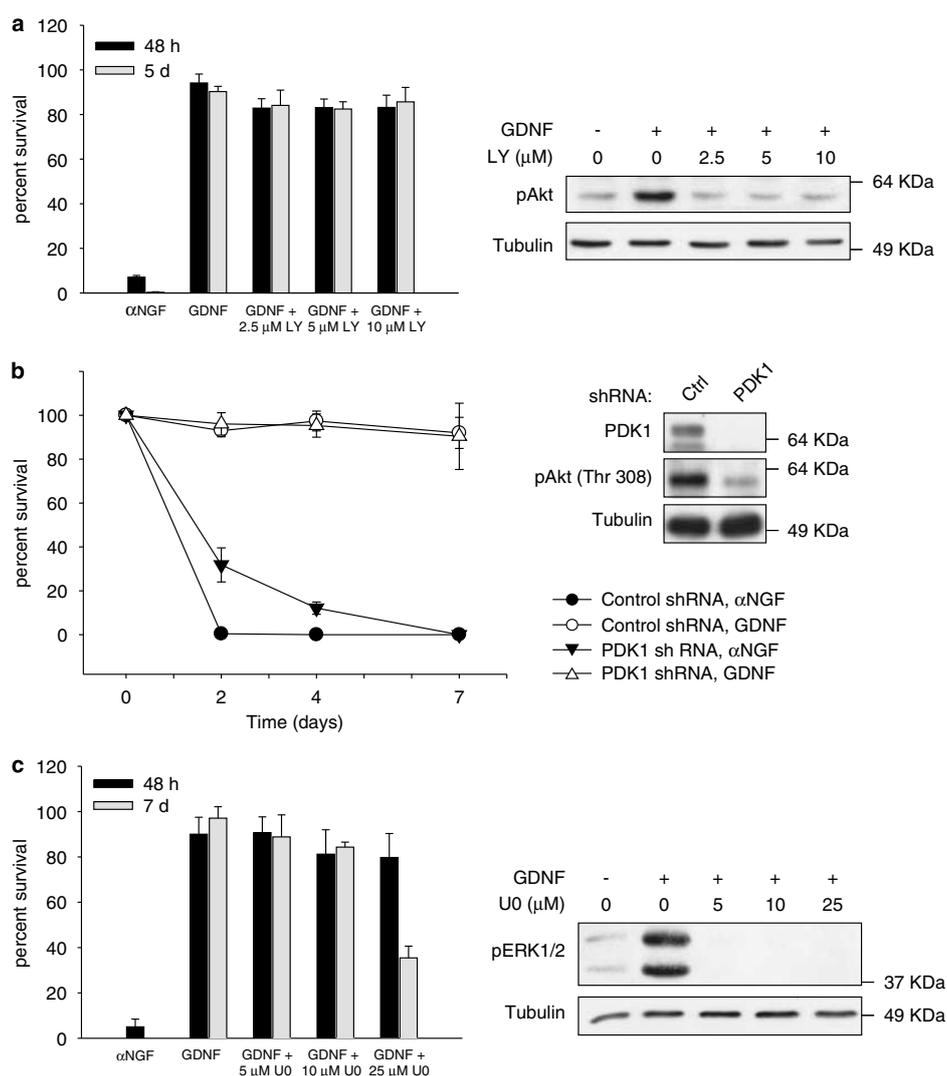
normally to NGF, demonstrating that the effect was specific for GDNF (Figure 3). Thus, although mutation of tyrosines 981 and 1015 diminished the activation of both Akt and ERK1/2, only mutation of tyrosine 1062 prevented GDNF-mediated survival of sympathetic neurons.

**Neither the PI 3-K/Akt nor the MEK/ERK pathways are necessary for GDNF-mediated survival.** Since the

reduction of Akt phosphorylation in neurons from Ret<sup>RET9(Y981F)</sup> animals did not correlate with a decrease in cell survival, we directly tested the role of the PI 3-K pathway on GDNF-mediated survival of sympathetic neurons. Addition of increasing doses of LY294002, a selective inhibitor of PI 3-K, did not kill a significant number of wild-type neurons when compared to vehicle-treated cells. The same doses inhibited Akt phosphorylation to basal levels

suggesting a complete blockade of GDNF-mediated PI 3-K signaling (Figure 4a).

PDK1 is a 'master' kinase linking PI 3-K activation to its more relevant downstream effectors, namely Akt and other members of the AGC family of kinases (reviewed in Mora *et al.*<sup>8</sup>). Consistent with the results obtained with LY294002, lentiviral delivery of shRNA against PDK1 had no effect on cellular survival, further confirming that the PI 3-K/Akt



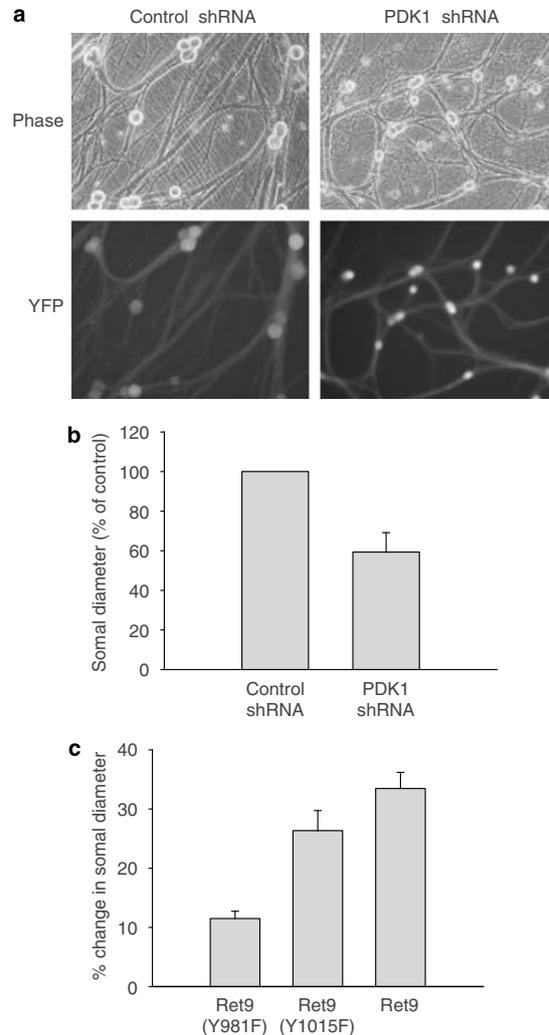
**Figure 4** Neither PI 3-K/Akt nor ERK1/2 is necessary for GDNF-mediated survival. (a) Sympathetic neurons from wild-type mice were cultured for 5 days in NGF and then switched to GDNF with or without the indicated doses of the PI 3-K inhibitor LY294002. Neuronal survival was assessed 48 h and 5 days after switch (left panel). In the right panel, lysates from neurons stimulated with GDNF in the presence of the indicated doses of LY294002 were probed with an antiphospho-Ser473 Akt. (b) Neurons were infected with lentiviruses expressing short-hairpin RNA (shRNA) against PDK1 as specified in Materials and Methods. Neurons were kept in NGF for 6 days and then switched to the indicated treatments. Neuronal survival was scored at the indicated time points after switch (left panel). In the right panel, the efficiency of the knockdown as well as the phosphorylation of Akt was assessed by western blot. (c) Cells were treated as in panel a but with the indicated doses of the MEK inhibitor U0126. Survival was assessed after 48 h and 7 days after treatment (left panel). Right panel, lysates were probed with an antibody to dually phosphorylated ERK1/2 to check the efficacy of the inhibitor

pathway is not necessary for GDNF-mediated survival of sympathetic neurons (Figure 4b).

Another candidate group of signaling intermediates that could be important for GDNF-mediated neuronal survival are the MAPK family members ERK1/2. We used U0126, a highly selective inhibitor of MEK1/2, the kinases upstream of ERK1/2. U0126 did not prevent the pro-survival effect of GDNF, at doses that effectively blocked phosphorylation of ERK1/2 (Figure 4c). Very high doses of U0126 (25  $\mu$ M) reduced cell survival after 1 week of treatment, suggesting a toxic effect of the drug. PD98059, the second MEK inhibitor used, also failed to block the survival of these neurons in the presence of GDNF (data not shown). Therefore, since two structurally unrelated MEK inhibitors did not prevent cell survival, it is unlikely that any of these kinases participate in the pro-survival effects of GDNF. In experiments using both PI 3-K and MEK1/2 inhibitors, we replaced the medium every 24 h to ensure sustained blockade of the pathways. As shown in Supplementary Figure 1, both inhibitors efficiently blocked activation of their respective targets after 24 h of stimulation.

**The PI 3-K/Akt pathway supports cell growth.** As sympathetic neurons mature in the presence of NGF, they progressively increase their size and become independent of NGF for survival. Thus, in mature neurons, NGF is required to stimulate the anabolic metabolism of the cell but not its survival,<sup>9</sup> indicating that cell growth and cell survival are regulated independently in these neurons. Silencing of PDK1, although not causing cell death, resulted in a marked reduction in the soma diameter of these neurons, indicating that PI 3-K signaling stimulates cell growth (Figure 5a and b). Consistent with this observation, neurons from *Ret*<sup>RET9(Y981F)</sup> animals increased their size over time in the presence of GDNF at a much slower rate than those from either *Ret*<sup>RET9</sup> or *Ret*<sup>RET9(Y1015F)</sup> mice (Figure 5c but see also Supplementary Figure 2). Therefore, as is the case for NGF,<sup>6</sup> it appears that GDNF relies on the activation of the PI 3-K/Akt pathway to stimulate cell growth of sympathetic neurons.

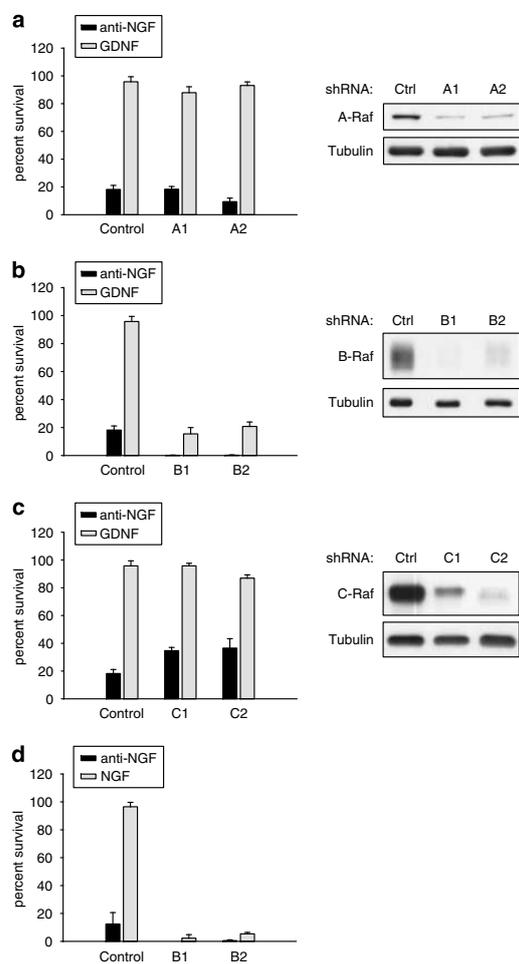
**Neurotrophic factor-induced neuronal survival of sympathetic neurons is mediated by B-Raf.** The lack of phosphorylation of ERK1/2 in neurons from *Ret*<sup>RET(Y1062F)</sup> mice correlated with the failure of GDNF to support survival of these sympathetic neurons, whereas in neurons from mice carrying either *Ret* Y981F or Y1015F this pathway, while diminished, was still active. Although experiments with U0126 ruled out a role of ERK1/2 in neuronal survival, it was still possible that apical elements of the pathway such as Ras or Raf could be involved in the pro-survival effects of GDNF, in a MEK-independent fashion. Lentiviral delivery of shRNAs against A-Raf, B-Raf and C-Raf effectively blocked the expression of each family member (Figure 6a–c). However, the protective effects of GDNF in cultured sympathetic neurons were only reversed by decreasing B-Raf levels. Importantly, knockdown of B-Raf killed sympathetic neurons also in the presence of NGF (Figure 6d). Finally, overexpression of a constitutively active form of B-Raf (V600E) was able to rescue trophic factor-deprived sympathetic neurons from death (Figure 7a).



**Figure 5** (a and b) Knockdown of PDK1 reduces cell growth. Wild-type mouse sympathetic neurons were infected with lentiviruses expressing shRNA to PDK1 as in Figure 6. Pictures were taken after 14 days in culture using a fluorescence microscope to show both the morphology and the degree of infection by visualizing expression of YFP. In panel b, the soma diameter was measured as described in Material and Methods. (c) Loss of Ret tyrosine 981 reduces cell growth. Sympathetic neurons from knockin mice expressing either *Ret*<sub>9</sub>, *Ret*<sub>9</sub>(Y981F) and *Ret*<sub>9</sub>(Y1015F) were kept in NGF for 5 days, then switched to GDNF and maintained for 7 additional days. Soma diameter was measured at the time of GDNF addition and 7 days after, and the percentage of increase in the soma size over this period of time was calculated

This observation is consistent with a critical role of B-Raf in neurotrophic factor-mediated survival of sympathetic neurons.

**IKKs are downstream effectors of B-Raf in sympathetic neurons.** Currently, it is unclear by which mechanism Raf kinases promote their biological effects independently of



**Figure 6** Knockdown of B-Raf, but not A-Raf or C-Raf, prevents GDNF- and NGF-mediated survival of wild-type mouse sympathetic neurons. (a, b and c) Left panels: neurons were infected with lentiviruses expressing shRNAs to A-Raf (A1 and A2), B-Raf (B1 and B2) and C-Raf (C1 and C2) 1 day after plating as described in Materials and Methods. Neurons were cultured in NGF for 5 days and then switched to GDNF. Survival was assessed after 48 h in the presence of GDNF. Right panels: the efficacy of the knockdown was assessed by immunoblot using isoform-specific Raf antibodies. In the case of B-Raf, cells were saved by the addition of the pan-caspase-inhibitor BAF 2 days before lysis. (d) Same as in panel b, but cells were treated with NGF instead of GDNF

MEK-1/2. Several putative Raf targets such as MTS-2, Rok- $\alpha$ , Bad and the NF- $\kappa$ B pathway had been proposed (reviewed in Wellbrock *et al.*<sup>10</sup> and Galabova-Kovacs *et al.*<sup>11</sup>). We chose to test the latter, because the NF- $\kappa$ B pathway has been reported to block apoptosis in sympathetic and sensory neurons.<sup>12,13</sup> In the so-called canonical NF- $\kappa$ B pathway, activated IKK complex formed by two catalytic subunits (IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ ) and a regulatory subunit (IKK $\gamma$ ) phosphorylates the inhibitors of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), which become degraded by the proteasome. Degradation of I $\kappa$ B frees cytoplasmic NF- $\kappa$ B

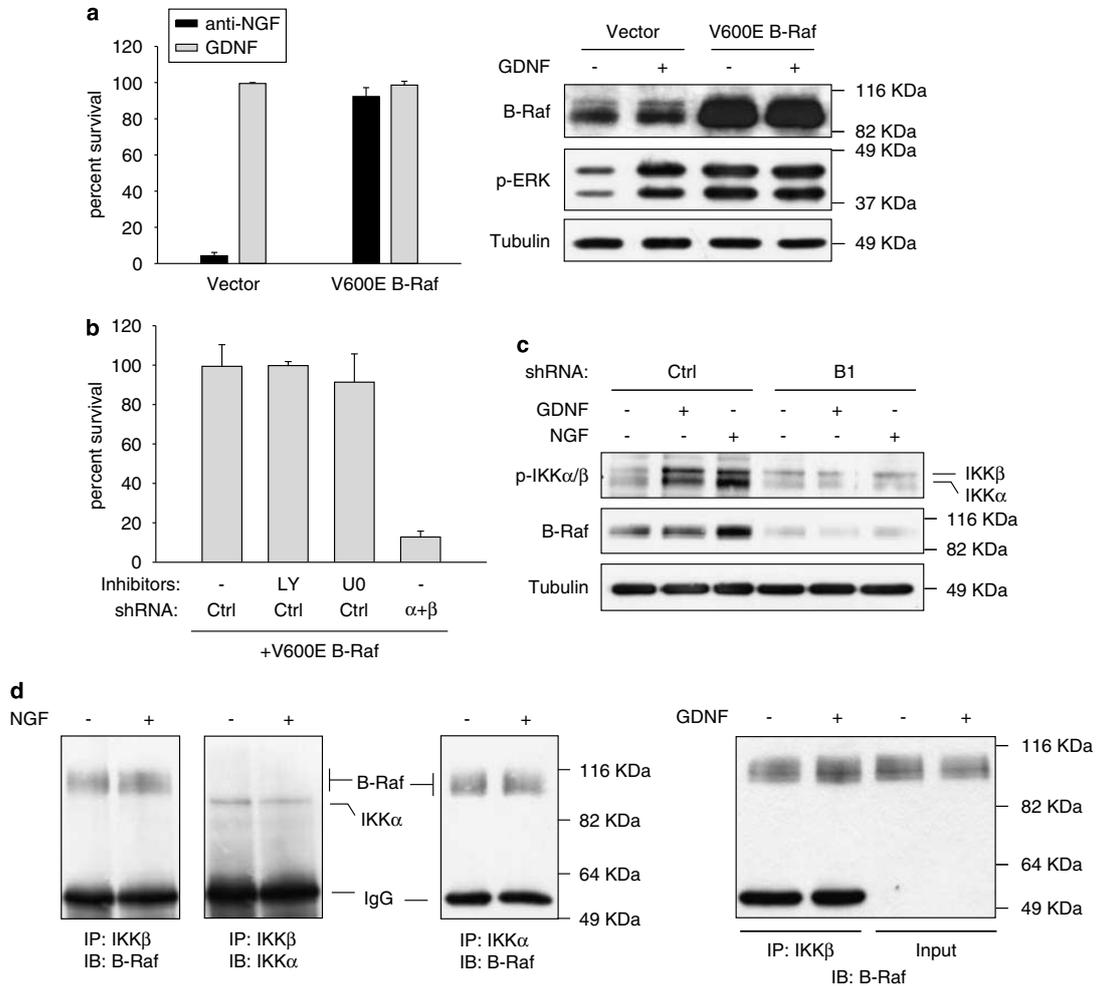
dimers, which translocate to the nucleus to activate transcription of target genes. As shown in Figure 7b, simultaneous silencing of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , but not the inhibition of PI 3-K or MEK-1/2, reversed the protection afforded by V600E B-Raf, suggesting that IKKs are downstream effectors of B-Raf. To further confirm this notion, we examined whether NGF or GDNF were able to activate IKKs in a B-Raf-dependent manner. Both neurotrophic factors induced phosphorylation of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  in their activation loop (Figure 7c). Silencing of B-Raf prevented phosphorylation of IKKs, indicating that the activation of IKKs by NGF or GDNF requires B-Raf (Figure 7c). Finally, we tested whether B-Raf and IKKs form a complex in sympathetic neurons. As shown in Figure 7d, endogenous B-Raf coimmunoprecipitated with endogenous IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  independently of trophic factor stimulation, indicating that IKKs and B-Raf are constitutively associated in these neurons. Interestingly, our preliminary results indicate that such binding is retained in organs from newborn mice such as brain, heart or skin (data not shown), suggesting that the B-Raf/IKK pathway could operate in other cell types outside the nervous system. Taken together, these results place IKKs as downstream targets mediating the pro-survival effects of B-Raf.

#### IKKs are necessary for NGF- and GDNF-mediated survival of sympathetic neurons.

Having shown that silencing of IKKs prevents the survival effects of V600E B-Raf, we next wanted to ascertain whether IKKs are necessary for neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons. Silencing of IKKs in conjunction or individually (Figure 8a and b, respectively) killed sympathetic neurons maintained in the presence of either NGF or GDNF, indicating that both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are necessary for neuronal survival triggered by NGF or GDNF. Such phenomenon was not restricted to mouse sympathetic neurons, as rat sympathetic neurons or mouse trigeminal neurons also died when either IKKs or B-Raf were silenced (Supplementary Figure 3). Silencing of IKK $\beta$  caused an increase in BimEL and PUMA levels in the presence of NGF, to levels comparable to those reached after NGF deprivation (Figure 7c). On the other hand, knockdown of Bax suppressed cell death caused by both NGF deprivation and lack of IKK $\beta$  (Figure 7d). These results, therefore, suggest that cell death caused by loss of IKK signaling mimics trophic factor withdrawal-induced cell death.<sup>14</sup> Finally, we checked the status of IKKs in sympathetic neurons from Ret<sup>RET(Y981F)</sup> and Ret<sup>RET(Y1062F)</sup> mice. As expected, mutation of tyrosine 1062 completely prevented activation of IKKs, whereas lack of tyrosine 981 had little or no effect (Figure 8e).

#### Discussion

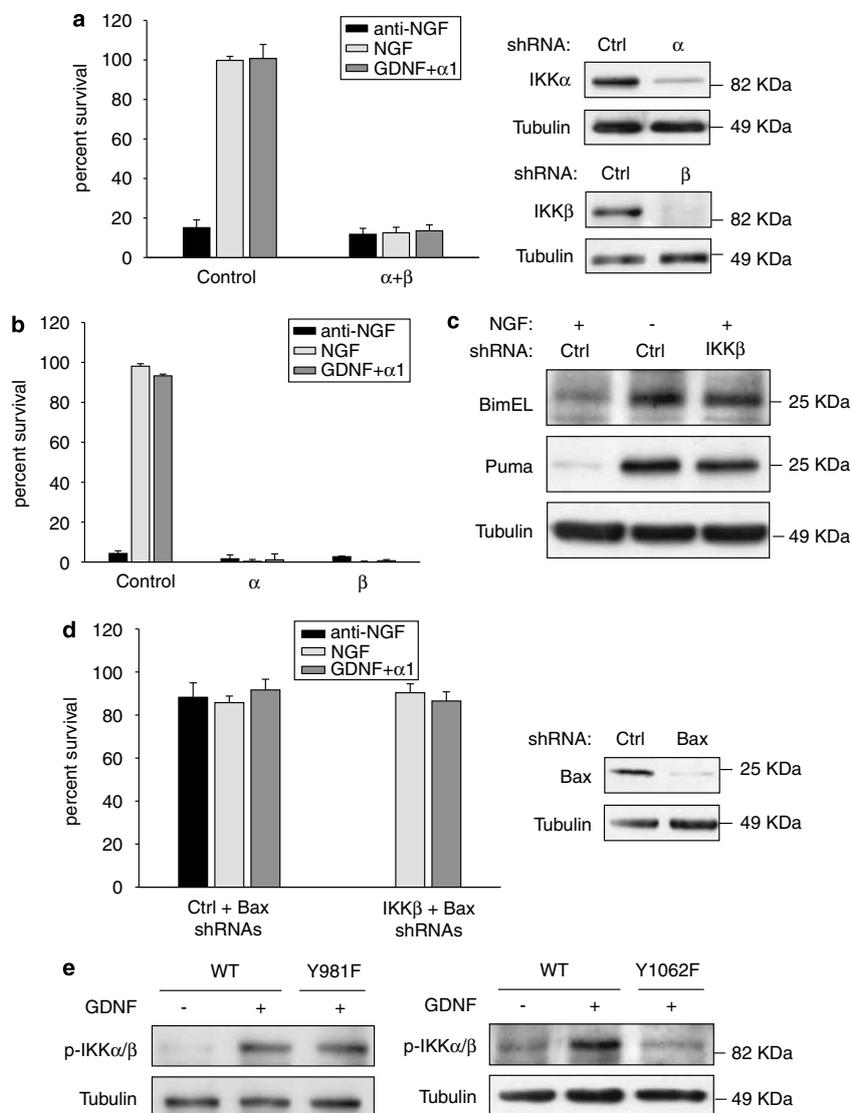
**Regulation of the PI 3-K/Akt and the ERK1/2 pathways by Ret tyrosines.** Absence of tyrosine 1062 results in blockade of phosphorylation of both Akt and ERK1/2 to baseline. Importantly, B-Raf is the major MEK kinase in sympathetic neurons (Supplementary Figure 2), indicating that Ret<sup>RET(Y1062F)</sup> is unable to activate B-Raf upon GDNF



**Figure 7** IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are downstream effectors of B-Raf. **(a)** A constitutively active form of B-Raf (V600E) rescues trophic factor-deprived neurons. Left, cells were infected with a lentiviral construct coding for human V600E B-Raf or empty vector. Four days later, cells were switched to media containing a blocking anti-NGF antibody or GDNF. Survival was assessed after 48 h in the presence of GDNF. Right, V600E B-Raf mutant is constitutively active. Cells infected with V600E B-Raf or empty vector were stimulated with for 10 min with GDNF and lysates probed with antibodies to B-Raf and dually phosphorylated ERK1/2. **(b)** Silencing of IKKs, but not the inhibition of PI 3-K or MEK, reverses the protection afforded by V600E B-Raf. Cells were sequentially infected, as described in Materials and Methods, with V600E B-Raf, and either with control shRNAs or with a mixture of shRNAs to IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  ( $\alpha + \beta$ ). Three days later cells were deprived and kept in the presence of the indicated inhibitors (10  $\mu$ M each) for two additional days, after which survival was evaluated. **(c)** B-Raf acts upstream of IKKs. Cells were infected with control shRNAs or a shRNA to B-Raf ('B1'). Four days after infection, cells were deprived overnight in the presence of 50  $\mu$ M BAF. Cells were stimulated for 10 min with the indicated factors and lysates probed against phospho-IKKs, B-Raf or tubulin. **(d)** Endogenous IKKs and B-Raf form a complex in sympathetic neurons. Neurons were kept in NGF for five days, deprived overnight and stimulated for 10 min with medium alone or containing the indicated factor. IKK $\beta$  or IKK $\alpha$  were immunoprecipitated and lysates were immunoblotted (IB) with the indicated antibodies. In the right panel, 5% of the input lysate was resolved in parallel to IKK $\beta$  immunoprecipitates

stimulation. Ret activates both the PI 3-K/Akt pathway and the Ras/ERK pathway through the recruitment of the adaptor protein Grb2 to phosphorylated Shc and/or FRS-2.<sup>15,16</sup> Binding of Grb2 to Gab1/2 activates the PI 3-K/Akt pathway, whereas binding of Grb2 to Sos activates ERK1/2 through Ras-Raf-MEK. As mentioned earlier, both Shc and FRS-2 bind to phosphotyrosine 1062 and therefore, its absence would impair the phosphorylation of such adaptors

and its subsequent binding to Grb2. How Tyr981 regulates these pathways in the case of Ret signaling is unclear but many possibilities exist, such as phosphorylation of Dok6 through an Src family kinase,<sup>17,18</sup> tyrosine phosphorylation of Akt by Src<sup>19</sup> or inhibition of PTEN activity by an Src family kinase.<sup>20</sup> In any case, the mechanisms by which these tyrosines regulate downstream signaling need to be further explored.



**Figure 8** IKKs are necessary for NGF- and GDNF-mediated survival of sympathetic neurons. (a and b) Neurons were infected with shRNAs to IKKs in combination ( $\alpha + \beta$ ) or alone ( $\alpha$  or  $\beta$ ) 2 days after plating. After 3 additional days in the presence of NGF, cells were switched to the indicated factors and survival was evaluated 48 h later. The right panel shows efficacy of the knockdown. (c) Silencing of IKKs induces BimEL and PUMA expression. On the second day after plating, cells were infected with control shRNAs or with an shRNA to IKK $\beta$  and kept on NGF for 3 additional days. Cells were then deprived or kept in NGF for 24 h more as depicted, and BimEL and PUMA expression was assessed by western blot. (d) Silencing of Bax rescues cells from the knockdown of IKK $\beta$ . Cells were infected with shRNAs to Bax, and subsequently infected with control or with shRNAs to IKK $\beta$  as detailed in Materials and Methods. Cells were maintained in NGF for 3 additional days, and switched to media containing the indicated factors. Cell survival was assessed 48 h later. Right panels shows efficacy of the knockdown. (e) Loss of tyrosine 1062, but not tyrosine 981, blocks GDNF-mediated phosphorylation of IKK $\alpha/\beta$ . Sympathetic neurons from the indicated genotypes were cultured in the presence of NGF for 5 days, deprived overnight and stimulated for 10 min with GDNF. Blots were probed with antibodies to phospho-IKKs. Note that owing to a higher acrylamide percentage, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  were not resolved as in Figure 7c

**The role of PI 3-K/Akt in neuronal survival.** Our data do not support a significant role of the PI 3-K/Akt pathway in GDNF-mediated neuronal survival of sympathetic neurons. Although PI3-K has been shown to exert antiapoptotic effects in many paradigms, its role in the survival of sympathetic

neurons is controversial. The most thoroughly examined neurotrophic factor in this paradigm is NGF. Some authors have reported that blockade of PI 3-K function by different means prevents NGF-mediated survival,<sup>3,4</sup> whereas others have shown the opposite.<sup>5,6</sup> The reason for these

discrepancies is unclear, but it is probably related to both the culture conditions and methods for assessing survival. For example, evaluation of survival relying solely on metabolic assays such as MTT reduction could be misleading since the inhibition of PI 3-K reduces the cell size and metabolic activity of these cells (our data<sup>6</sup>). Likewise, the use of exceedingly high doses of LY294002, well above those needed to inhibit PI 3-K completely, might cause cellular toxicity or affect other targets than PI 3-K itself. Finally, blockade of PI 3-K does not trigger the apoptotic molecular events that take place in NGF-deprived SCG neurons such as Bax translocation to the mitochondria or release of cytochrome *c* to the cytosol,<sup>14</sup> further indicating that inhibition of PI 3-K does not mimic the absence of trophic support completely.<sup>6</sup>

**Control of cell growth by the PI 3-K/Akt pathway.** Knock-down of PDK1, although not affecting cell survival, caused a marked reduction in cell size. Likewise, lack of Ret tyrosine 981, which resulted in an almost complete blockade of Akt phosphorylation, caused a reduction in cell size without affecting survival. Interestingly, mice expressing a hypomorphic mutation for PDK1 are viable and are fertile but have reduced body mass ultimately caused by a decrease in cell size but not in cell number.<sup>21</sup> Moreover, fibroblasts from these animals undergo apoptosis at the same rate than those from wild-type animals.

We hypothesize that the control of cell size by PI 3-K is linked to the activation of mTOR, a kinase, which plays a well-known role in both nutrient sensing and stimulation of anabolism and cell growth. The connection between mTOR and the PI 3-K/Akt has been recently unveiled in the case of the insulin/IGF system by finding that Akt phosphorylates and inactivates the TSC1/TSC2 complex, an inhibitor of mTOR activity (reviewed in Martin and Hall<sup>22</sup>). Thus, the inhibition of PI 3-K would result in repression of mTOR signaling, thereby reducing or stopping GDNF-mediated cell growth.

**B-Raf as a key mediator of survival.** Our data indicate that B-Raf is necessary for GDNF- and NGF-mediated survival in sympathetic neurons, independently of MEK. This is consistent with data from Wiese *et al.*,<sup>23</sup> who showed that targeted deletion of B-Raf prevented neurotrophin-mediated survival of embryonic motor and sensory neurons. In that work, the authors also show that lack of B-Raf causes a decrease in expression of IAPs, especially, XIAP. These observations are in agreement with those reported by Kato and colleagues,<sup>24</sup> who demonstrated that IAPs are essential for GDNF-mediated survival of embryonic motor neurons. Accordingly, we also observed a decrease in XIAP levels concomitant with silencing of B-Raf in our system (Supplementary Figure 4). However, sympathetic neurons from XIAP<sup>-/-</sup> mice survive normally in the presence of NGF,<sup>25</sup> indicating that loss of XIAP expression by itself is not sufficient to preclude NGF-mediated survival of these neurons (see below). A recent report suggests that B-Raf is not necessary for the survival of sensory neurons but instead regulates axon growth *in vivo*.<sup>26</sup> We do not know whether these differences are cell specific or on the contrary are due to functional redundancy between family members, or

perhaps to incomplete excision of Raf at the onset of programmed cell death of DRG neurons.

Finally, it is worth noting that the central role of B-Raf as an effector of Ret signaling appears to be conserved outside the nervous system, as the RET-RAS-BRAF pathway has been identified as one of the major genetic alterations found in thyroid carcinomas, being its activation responsible for the proliferation and invasive phenotype of these cells.<sup>27</sup>

**How do IKKs regulate neuronal survival?** One of the major findings of this paper is that IKKs are targets of B-Raf in sympathetic neurons, and that IKK activity is necessary for NGF and GDNF-mediated survival of these neurons. Although the role of IKKs in neuronal survival has not been addressed thoroughly, results obtained in other systems suggest a plethora of potential mechanisms by which IKKs could block apoptosis. First, antiapoptotic genes such as Bcl-2 family members A1/Bfl-1, Mcl-1 and Bcl-XL, or IAPs such as XIAP are found among transcriptional targets of NF- $\kappa$ B.<sup>28</sup> Second, IKKs can block the JNK pathway through the activation of NF- $\kappa$ B. It is well established that the activation of the JNK pathway is necessary for trophic factor withdrawal-induced death of sympathetic neurons.<sup>29–32</sup> Blockade of the JNK pathway can be accomplished directly by inducing the expression of antagonists of the pathway such as Gadd45 $\beta$  (which blocks the activity of MKK7).<sup>33,34</sup> It can also be blocked indirectly by inducing the expression of antioxidants such as ferritin heavy chain,<sup>35</sup> that counteract the production of reactive oxygen species concomitant to some types of cell death, including that occurring in sympathetic neurons after NGF withdrawal.<sup>36,37</sup> Third, IKKs may exert their protective effects independently of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activation. Thus, it has been shown that IKK $\beta$  contributes to tumor development by directly phosphorylating and inducing ubiquitin-dependent degradation of the transcription factor FOXO3A.<sup>38</sup> Interestingly, it has been shown that Bim is under the transcriptional control of FOXO3A<sup>39</sup> (although Bim levels can be regulated through other transcriptional and post-transcriptional mechanisms), and that Bim deletion attenuates trophic factor withdrawal-induced death of sympathetic neurons.<sup>39</sup> The contribution of all these potential mechanisms to blockade of sympathetic neuronal cell death by IKKs is currently being investigated.

#### Materials and Methods

**Antibodies and reagents.** Antibodies to Ret9 (C-19G), Ret51(C-20G), A-Raf (C-20G) and B-Raf (F-7) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies to phospho-Akt (Ser473), dually phosphorylated ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and phospho-IKK $\alpha$  (Ser180)/IKK $\beta$  (Ser181) were from Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-PDK1 and anti-C-Raf were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  antibodies were from Calbiochem (Darmstadt, Germany), and anti-Bax was from Upstate (Lake Placid, NY). The BIM and XIAP antibodies were obtained from Stressgen (Victoria BC, Canada), and the anti- $\alpha$ -tubulin was from Sigma (St. Louis, MO). Anti-PUMA was from ProSci Inc. (Poway, CA). Finally, the antibody against the extracellular domain of Ret has been described previously.<sup>17</sup> LY294002, PD98059 and U0126 were from Calbiochem. All other reagents were from Sigma.

**Cell culture and assessment of neuronal survival.** Mouse sympathetic neurons from the superior cervical ganglion of postnatal day 0–1 pups were dissected and cultured essentially as described.<sup>40</sup> Briefly, ganglia were sequentially digested in collagenase and trypsin (Worthington Lakewood, NJ),

dissociated by trituration and plated on rat tail collagen-coated dishes in the medium containing 50 ng/ml NGF (Alomone labs, Jerusalem, Israel), 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) and anti-mitotics for 5 days (AM0 medium). Subsequently, cells were washed three times with media and switched to media containing either anti-NGF, 50 ng/ml NGF (Alomone) or anti-NGF plus 50 ng/ml GDNF (Alomone) and 100 ng/ml Fc-GFR $\alpha$ 1 (R & D Systems, Minneapolis, MN). For survival experiments, one-tenth to one-fifth of a ganglion was plated in 24-well dishes. Neuronal survival was assessed by counting neurons of designated fields before and after treatments at the indicated time points. Typically, around 200–300 neurons per field were counted in triplicate wells. Results were expressed as a percentage of the initially counted cells. Experiments were repeated at least three times, the data was pooled and expressed as mean  $\pm$  S.D. For the measurement of soma diameter, pictures were analyzed with the AnalySIS software package (Soft Imaging System GmbH, Germany).

**Immunoprecipitation and western blot.** For western blot, cells were plated at higher density (typically 1–2 ganglia per well in 24-well or 12-well plates, respectively) and kept in NGF-containing media for 5–7 days. Then cells were washed three times with AM0 and deprived overnight in media containing no NGF. Neurons were stimulated with 50 ng/ml GDNF plus Fc-GFR $\alpha$ 1 or 50 ng/ml NGF for 10 min. We added GFR $\alpha$ 1 to match the culture conditions in survival experiments, even though its presence did not alter the signaling pattern elicited by GDNF (data not shown). Cells were lysed in NP-40 containing buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) freshly supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Roche Applied Science), 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate. Alternatively, cells were directly lysed in Laemmli's buffer. Proteins were resolved in SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (Millipore) and blocked in TBST containing 5% BSA. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C, followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunodetection was performed using ECL-Advance (Amersham, GE Healthcare). X-ray films were scanned with an EPSON Perfection 3200 PHOTO apparatus and acquired with Adobe Photoshop. Densitometric analysis was performed using the Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA). For immunoprecipitation, NP-40 lysates were incubated with the indicated primary antibodies plus sepharose-bound protein A and/or protein G (Sigma). Immunocomplexes were washed with buffer and boiled in Laemmli's buffer.

**Lentiviral delivery of short-hairpin RNAs (shRNAs).** Lentiviral-based vectors for RNA interference-mediated gene silencing (FSVsi) consisted on a U6 promoter for expression of short-hairpin RNAs and the venus variant of YFP under the control of an SV40 promoter for monitoring transduction efficiency. Lentiviral particles were produced in 293T cells cotransfected by the calcium phosphate method with the above plasmid plus plasmids coding for the envelope and the packaging systems (VSV-G and  $\Delta$ 8.9, respectively). The day after transfection, 293T cells were switched to AM0 containing no antimitotics and left for 2–3 days. Supernatants were then harvested, filtered through a 0.45  $\mu$ m filter, supplemented with NGF and antimitotics and directly applied to sympathetic neurons. Typically, cells were infected overnight the day after or 2 days after dissection. In experiments aimed to assess the efficacy of gene knockdown by immunoblot, cells were typically kept for 5 days in NGF followed by 2 more days in GDNF, or alternatively 7 days in NGF. When gene silencing was deleterious for the cells, the pan-caspase inhibitor BAF (50  $\mu$ M) was added to the media 2–3 days before lysis. For overexpression of B-Raf, the human cDNA of B-Raf containing a V600E substitution was cloned in a lentiviral expression vector (FCMV), which contains the promoter of human cytomegalovirus. When sequential infections were needed, cells were infected overnight with the first set of viruses, allowed to recover the day after and infected the following night with the second set of viruses. After this second infection, neurons were kept in NGF for 3 more days before proceeding with the different experimental conditions. Viruses expected to promote beneficial effects on survival (i.e., V600E B-Raf and Bax shRNA) were infected first, whereas viruses expected to have deleterious effects were infected afterwards.

**Sequences of shRNAs.** The following sequences were used for generation of shRNAs:

PKD1: 5'-TGGTGAGGTCCCAAACTGA-3', PDK1 control: 5'-GGGAATTCC TAAGGACGC-3', A1: 5'-CCTATGGTGTGTGCTCTAT-3', A2: 5'-TGCGTTGACA TGAGTACCAA-3', B1: 5'-GCTACTTATTCAAACATCAA-3', B2: 5'-GCTTACGA GAAATACACTGAA-3', C-Raf, C1: 5'-CCTATGGTGTGTGCTCTAT-3', C2: 5'-TGCGTTGACATGAGTACCAA-3', Raf Control: 5'-GTCCGGTTCGTTAGAG

TCTT-3'; IKK $\alpha$ : 5'-CAGGCTCTTCAGGGACAT-3'; IKK $\beta$ : 5'-GCTGCACATT GAATCTGTAT-3'; IKK control: 5'-GCTCTCTTGAAGGTTGATGTA-3'; Bax 5'-GC AGCTGACATGTTTGTGAT-3', Bax control 5'-ACTGCCTGGACTGTGCTTT-3'.

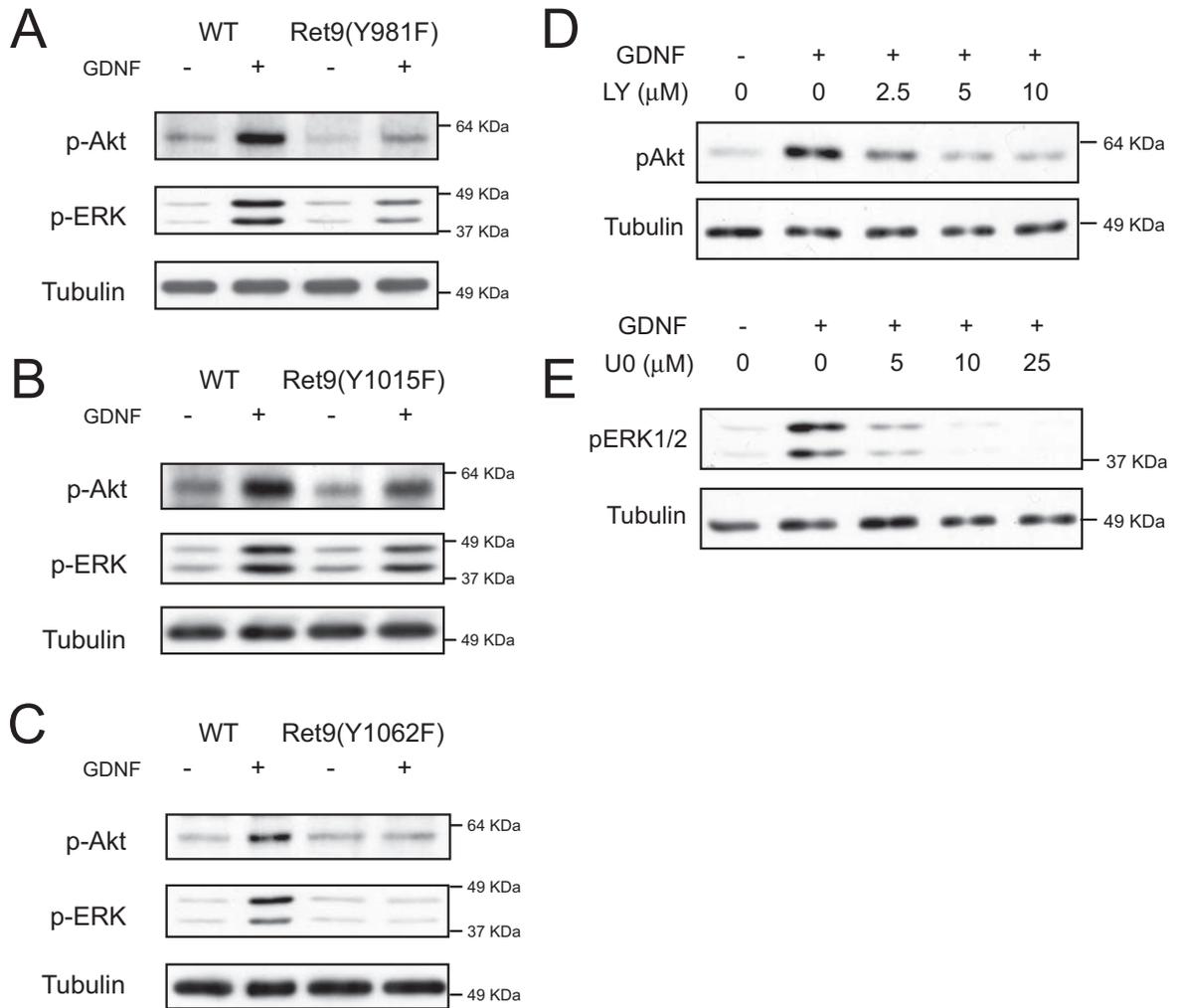
**Acknowledgements.** We thank Jason Gustin and Mao Yang for help with lentiviral constructs and also thank Martí Aldea, Carme Gallego and Malú G Tansey for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-03632 and BFU2007-67619) to ME, NIH Grants AG13730 and NS39358 to JM, AG13729 to EMJ and HD047396-01 to SJ, and funding from Suport als Grups de Recerca (Generalitat de Catalunya) to ME and JXC ME holds a contract from the 'Ramón y Cajal' program. EJR is recipient of a predoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. XD holds a contract from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**: 383–394.
- Airaksinen MS, Titevisky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999; **13**: 313–325.
- Crowder RJ, Freeman RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 2933–2943.
- Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 1999; **19**: 9716–9727.
- Philpott KL, McCarthy MJ, Klippel A, Rubin LL. Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J Cell Biol* 1997; **139**: 809–815.
- Tsui-Pierchala BA, Putcha GV, Johnson Jr EM. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the trophic, but not the survival-promoting, actions of NGF on sympathetic neurons. *J Neurosci* 2000; **20**: 7228–7237.
- Jain S, Encinas M, Johnson Jr EM, Milbrandt J. Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. *Genes Dev* 2006; **20**: 321–333.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 2004; **15**: 161–170.
- Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson Jr EM. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol* 2002; **157**: 441–453.
- Wellbrock C, Karasides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 875–885.
- Galabova-Kovacs G, Kolbus A, Matzen D, Meissl K, Piazzolla D, Rubiolo C *et al*. ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 2006; **5**: 1514–1518.
- Maggiarwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 10356–10365.
- Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999; **14**: 28–40.
- Putcha GV, Johnson Jr EM. Men are but worms: neuronal cell death in C elegans and vertebrates. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 38–48.
- Mellillo RM, Santoro M, Ong SH, Billaud M, Fusco A, Hadari YR *et al*. Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4177–4187.
- Besset V, Scott RP, Ibanez CF. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-RET receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39159–39166.
- Encinas M, Crowder RJ, Milbrandt Jr J, Johnson EM. Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival. *J Biol Chem* 2004; **279**: 18262–18269.
- Crowder RJ, Enomoto H, Yang M, Johnson Jr EM, Milbrandt J. Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2004; **279**: 42072–42081.
- Jiang T, Qiu Y. Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 15789–15793.
- Lu Y, Yu Q, Liu JH, Zhang J, Wang H, Koul D *et al*. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem* 2003; **278**: 40057–40066.
- Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, Williams MR, Murray-Tait V, Malone L *et al*. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J* 2002; **21**: 3728–3738.
- Martin DE, Hall MN. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 158–166.
- Wiese S, Pei G, Karch C, Troppmaier J, Holtmann B, Rapp UR *et al*. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 137–142.

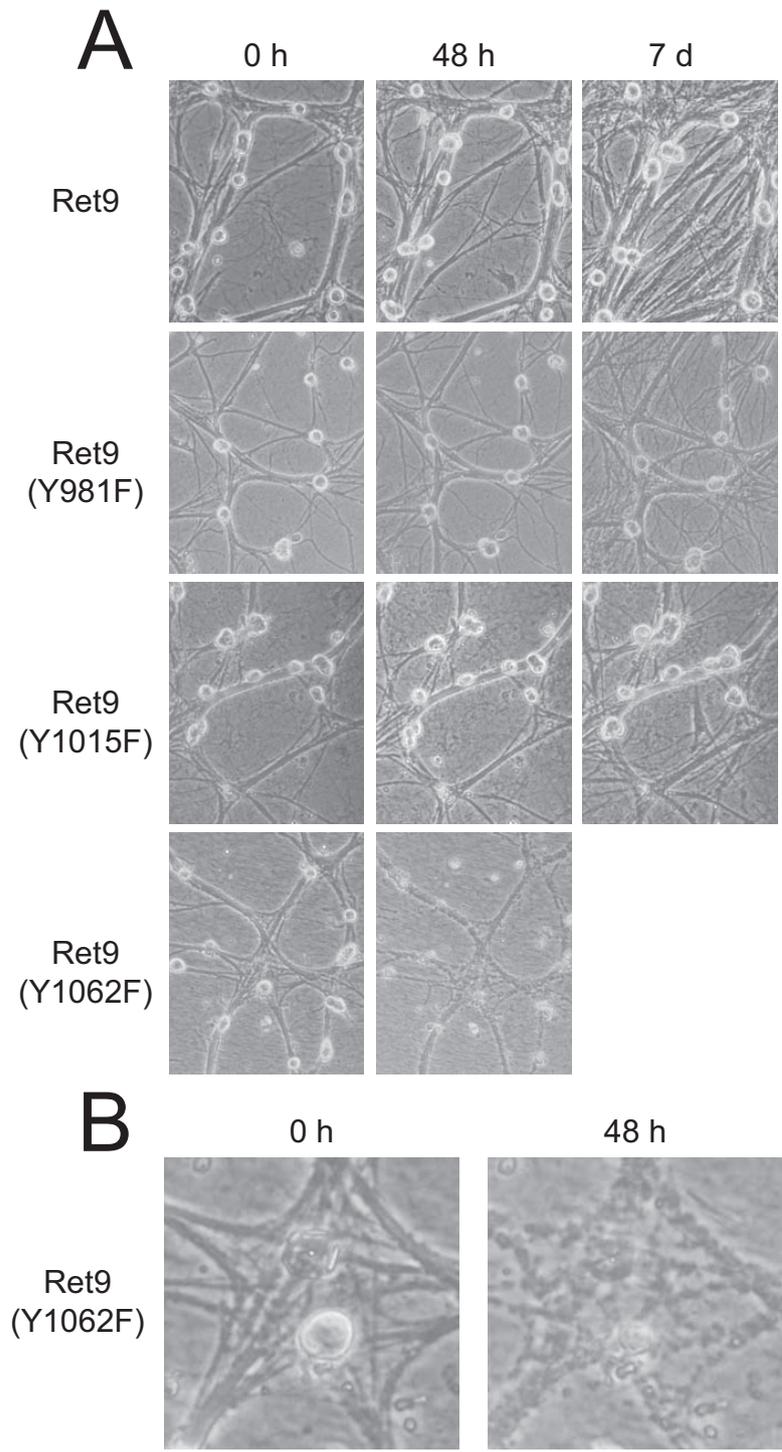
24. Perrelet D, Ferri A, Liston P, Muzzin P, Korneluk RG, Kato AC. IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 175–179.
25. Potts PR, Singh S, Knezek M, Thompson CB, Deshmukh M. Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 2003; **163**: 789–799.
26. Zhong J, Li X, McNamee C, Chen AP, Baccarini M, Snider WD. Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth *in vivo*. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 598–607.
27. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G *et al*. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1068–1081.
28. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinis C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer—role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003; **22**: 8961–8982.
29. Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M *et al*. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 1995; **14**: 927–939.
30. Eilers A, Whitfield J, Babij C, Rubin LL, Ham J. Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 1713–1724.
31. Mota M, Reeder M, Chernoff J, Bazenet CE. Evidence for a role of mixed lineage kinases in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001; **21**: 4949–4957.
32. Xu Z, Kukekov NV, Greene LA. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J* 2003; **22**: 252–261.
33. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J *et al*. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 2001; **414**: 308–313.
34. Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S *et al*. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 146–153.
35. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K *et al*. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNF alpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004; **119**: 529–542.
36. Greenlund LJ, Deckwerth Jr TL, Johnson EM. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 1995; **14**: 303–315.
37. Jordan J, Ghadge GD, Prehn JH, Toth PT, Roos RP, Miller RJ. Expression of human copper/zinc-superoxide dismutase inhibits the death of rat sympathetic neurons caused by withdrawal of nerve growth factor. *Mol Pharmacol* 1995; **47**: 1095–1100.
38. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY *et al*. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004; **117**: 225–237.
39. Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate Bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* 2003; **162**: 613–622.
40. Deckwerth TL, Johnson Jr EM. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1207–1222.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

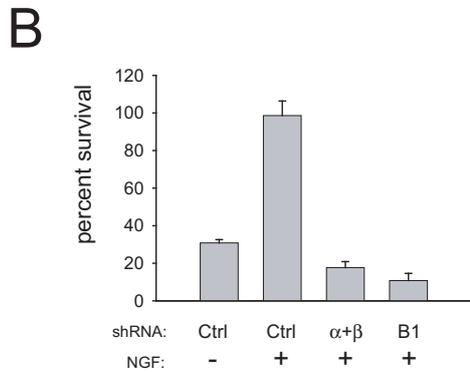
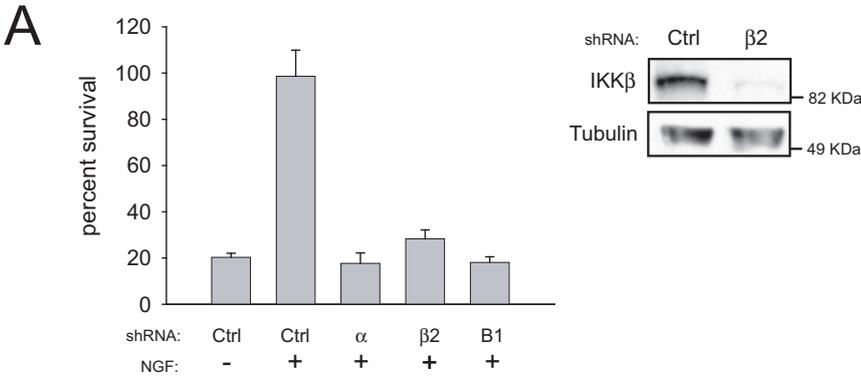
SUPPLEMENTAL FIGURE 1, Encinas et al.



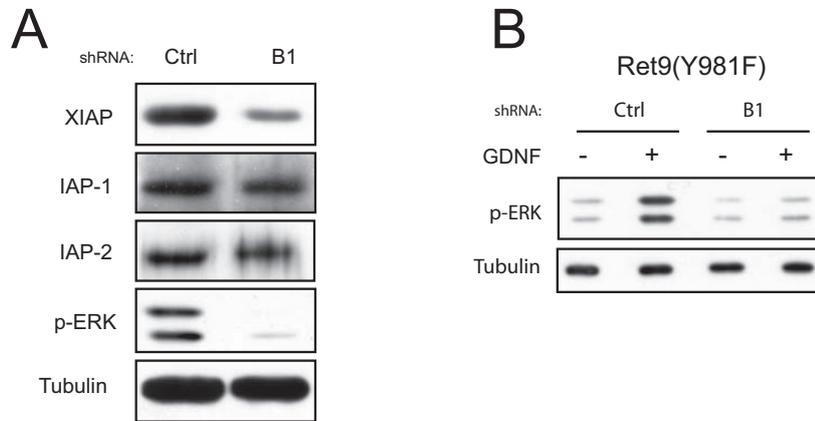
SUPPLEMENTAL FIGURE 2, Encinas et al.



SUPPLEMENTAL FIGURE 3, Encinas et al.



SUPPLEMENTAL FIGURE 4, Encinas et al.



## Supplemental Figure 1

Phosphorylation patterns of Akt and ERK1/2 after 24 hours of stimulation with GDNF.

(A, B, C) Sympathetic neurons from mice of the indicated genotypes were cultured in the presence of NGF for five days, washed three times with media, and either deprived or stimulated for 24 hours in the presence of GDNF. Lysates were probed with the indicated antibodies.

(D, E) Sympathetic neurons from wild type mice were cultured for five days in the presence of NGF, washed three times and either deprived or incubated with GDNF alone or in the presence of the indicated inhibitors for 24 hours. Lysates were probed with the indicated antibodies.

## Supplemental Figure 2

(A) Only neurons from Ret9(Y1062F) mice fail to survive in presence of GDNF.

Pictures from the same field were taken before switching cells to GDNF (0h), and 48h and 7 days afterwards. The majority of neurons survived up to one week (the last time point analyzed) in neurons from all genotypes analyzed except those from mice lacking tyrosine 1062 which had died within 48h in culture. (B) Higher magnification of the centre of the field of neurons from Ret9(Y1062F) mice allows visualization of disintegrating cell bodies and neurites.

### Supplemental Figure 3

(A) Silencing of IKKs or B-Raf prevents NGF-mediated survival of rat sympathetic neurons. SCG neurons from newborn rats were cultured exactly as described for mouse sympathetic neurons. The day after plating cells were infected with lentiviruses carrying shRNAs to IKK $\alpha$  (“ $\alpha$ ”), IKK $\beta$  (“ $\beta$ 2”) or B-Raf (“B1”). Four days later cells were switched to the indicated treatments for two additional days, after which survival was assessed. Shown is a representative graph of three independent experiments. Note that the shRNA used for rat neurons (“ $\beta$ 2”) is different from that used for mouse neurons. Its efficacy was tested by western blot on the right panel. The sequence of  $\beta$ 2 is as follows: 5'-GCTCTTAGATACCTTCATGAA-3'.

(B) Silencing of IKKs or B-Raf prevents NGF-mediated survival of mouse trigeminal neurons. Trigeminal ganglia from newborn mice were dissected and cells dissociated by sequential treatment with collagenase and trypsin. Cells were and plated onto collagen-coated 24-well dishes (one tenth of a ganglion/well) and cultured in AM0 medium supplemented with 3.33  $\mu$ g/ml aphidicolin (AG Scientific, San Diego, CA) to remove mitotic cells. The day after plating neurons were infected with lentiviruses bearing the indicated shRNAs to IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  (“ $\alpha$ + $\beta$ ”) or B-Raf (“B1”). On the fifth day after plating cells were switched to anti-NGF- or NGF-containing media as indicated. Survival was assessed three days after switch. Shown is a representative graph of three independent experiments.

#### Supplemental Figure 4

(A) Knockdown of B-Raf results in diminished levels of XIAP and phospho-ERK1/2, but not c-IAP-1 or c-IAP-2. Sympathetic neurons were infected one day after plating with the indicated shRNA to B-Raf (“B1”). Five days after plating cells were switched to GDNF in the presence of 50mM of the pan-caspase inhibitor BAF, and kept in culture for two additional days. Levels of the indicated proteins or phospho-proteins were assessed by immunoblot with the indicated antibodies. Antibodies to c-IAP-1 and c-IAP-2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

(B) B-Raf is activated by GDNF in sympathetic neurons from Ret<sup>RET9(Y981F)</sup> mice. Neurons were infected one day after plating with scrambled (“Ctrl”) or B-Raf (“B1”) shRNAs. On the fifth day in vitro, cells were stimulated for 10 minutes with GDNF and lysates probed with anti-phospho-ERK1/2. Knockdown of B-Raf abolished ERK phosphorylation, indicating that the main, if not the only MEK kinase activated by Ret9 (Y981F) mutant is B-Raf.



## Loss of Sprouty1 Rescues Renal Agenesis Caused by Ret Mutation

Esteban J. Rozen,\* Hagen Schmidt,<sup>†</sup> Xavier Dolcet,<sup>‡</sup> M. Albert Basson,<sup>†</sup> Sanjay Jain,<sup>§</sup> and Mario Encinas\*

\*Cell Signaling and Apoptosis Group and <sup>†</sup>Grup de Patologia Oncològica, Institut de Recerca Biomedica de Lleida, Lleida, Spain; <sup>‡</sup>Department of Craniofacial Development, King's College London, London, United Kingdom; and <sup>§</sup>Department of Medicine, Renal Division, and HOPE Center for Neurodegenerative Diseases, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

### ABSTRACT

Renal morphogenesis requires a balance between positive and negative signals, which are provided in part by the receptor tyrosine kinase Ret and the putative tumor suppressor Sprouty1, respectively. Tyrosine 1062 of Ret is a binding site for several adaptor and effector proteins, such as Grb2/Sos/Ras, which activate the ERK pathway. Mice lacking Ret tyrosine 1062 nearly mimic the phenotype of Ret-knockout mice, which includes renal agenesis. Sprouty1 regulates Ret activity by modulating the ERK pathway, but the mechanism by which this occurs is uncertain. Here, we show that loss of Sprouty1 rescues the renal agenesis and early postnatal lethality caused by lack of Ret tyrosine 1062. The kidneys and lower urinary tracts of double-mutant mice developed normally. This effect was specific to the urinary system, because loss of Sprouty1 did not rescue the defects in the enteric nervous system characteristic of animals lacking Ret tyrosine 1062. These results suggest that Sprouty1 can modulate ERK signaling downstream of Ret, independent of Grb2/Sos/Ras, during renal morphogenesis.

*J Am Soc Nephrol* 20: 255–259, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008030267

Development of the metanephric kidney begins when an outgrowth of the caudal Wolffian duct, the ureteric bud (UB), invades the surrounding metanephric mesenchyme (MM).<sup>1</sup> Subsequently, the UB branches repeatedly into a tree-like structure to form ultimately the collecting system of the kidney, whereas some cells of the MM generate the nephron epithelia. Both UB outgrowth and branching morphogenesis are regulated by positive and negative signals. Thus, GDNF secreted by the MM induces the UB to form from the caudal portion of the Wolffian duct, which expresses its receptor Ret. Similarly, branching of the UB is promoted by GDNF expressed by the condensing MM at the tips of the UB branches.

Conversely, UB outgrowth and branching are negatively regulated by genes that anteriorly restrict *GDNF* expression in the MM, such as *Foxc1*<sup>2</sup> or *Slit2/Robo2*,<sup>3</sup> or by negative regulators that modulate GDNF signaling downstream of Ret, such as Sprouty1.<sup>4–7</sup>

The GDNF family ligands are a group of neurotrophic factors (GDNF, NRTN, PSPN, and ARTN) required not only for kidney morphogenesis but also for nervous system development and spermatogonia maturation.<sup>8</sup> GDNF family ligands signal through a common tyrosine kinase receptor (Ret) and one of the four co-receptors known as GFR $\alpha$ 1 through  $\alpha$ 4. Ret is alternatively spliced to produce two variants with unique C-terminal sequences (Ret9 and

Ret51).<sup>9</sup> Mice deficient in *Ret* die within hours after birth as a result of renal agenesis, owing to failure of UB to form. In addition, enteric neuronal precursors fail to colonize the caudal digestive tract.<sup>8,10</sup> To date, five autophosphorylation residues have been identified in Ret. Among them, Tyr1062 is a multi-docking site that binds to adaptors such as Shc or FRS-2,<sup>8</sup> which in turn recruit Grb2/Sos complexes to the plasma membrane. Once at the plasma membrane, Sos activates Ras, triggering the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. We and others have shown that knockin mice lacking Ret tyrosine 1062 develop many defects found in Ret knockout animals, including kidney agenesis and defective migration of enteric neuroblasts, indicating that this tyrosine is critical for many of the receptor's functions.<sup>11–13</sup>

Sprouty1 (*Spry1*) belongs to a gene family composed of four members in

Received March 6, 2008. Accepted August 11, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

**Correspondence:** Dr. Mario Encinas, Departament de Medicina Experimental, Laboratori d'Investigació UdL/HUAV, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 1a planta, Rovira Roure, 80, Lleida 25198, Spain. Phone/Fax: +34-973702213; E-mail: mario.encinas@mex.udl.cat

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

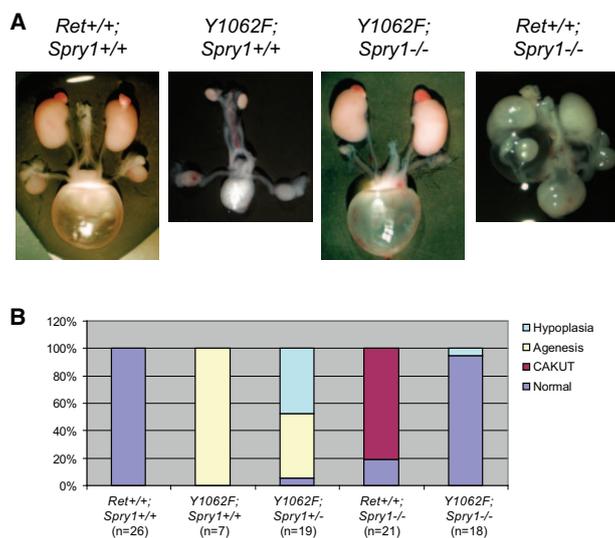
mammals (*Spry1* through 4). Sprouty proteins are inhibitors of receptor tyrosine kinase signaling, more specifically of the ERK MAPK pathway but not other MAPK pathways such as p38 or JNK.<sup>14–16</sup> In mice, Sprouty1 antagonizes GDNF signaling during kidney morphogenesis.<sup>4,5</sup> Targeted mutation of *Spry1* causes hyperactivation of the ERK MAPK pathway in the Wolffian duct, leading to ectopic, supernumerary UB and increased branching morphogenesis. These defects ultimately result in malformations such as multiple ureters; hydroureter; blind ureter; or supernumerary, cystic kidneys, reminiscent of human CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract).<sup>4</sup> Interestingly, reducing *GDNF* gene dosage in *Spry1* null mice rescues these defects, suggesting that signaling by GDNF/Ret is the major if not the only target of Sprouty1 during early kidney morphogenesis. The point at which mammalian Sprouty proteins interfere with the ERK MAPK pathway is controversial. *In vitro* experiments have led to the proposal of two main mechanisms. The first points to regulation of the pathway by Sprouty upstream of Ras, probably at the level of

Grb2.<sup>17–19</sup> The second indicates that Sprouty proteins regulate the pathway downstream of or independent of Ras by interacting with Raf kinases.<sup>20,21</sup> Although these differences may reflect multiple mechanisms of action depending on the cellular context, *in vivo* evidence for such mechanisms in mammals is lacking.

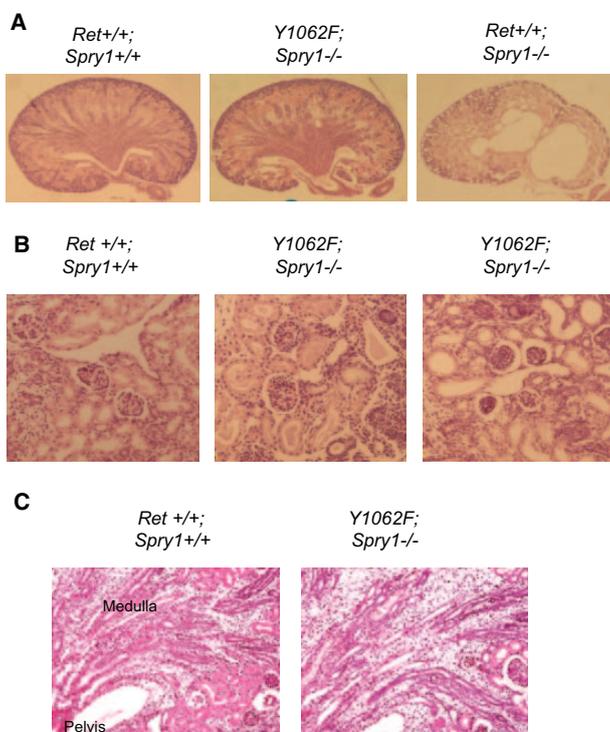
To ascertain whether regulation of Ret signaling by Sprouty1 was dependent on Ret Tyr1062, we crossed mice heterozygous for the targeted mutations to obtain double-heterozygous mice, which were viable and fertile. These mice were then intercrossed and offspring analyzed at birth. Surprisingly, double-mutant mice developed macroscopically normal-sized and -shaped kidneys and ureters and presented urine-filled bladder, indicative of functional kidneys, as well as proper connection between kidneys and ureters (Figure 1A). This phenotype was observed in 17 (95%) of 18 double-mutant mice. Loss of a single Sprouty1 allele modestly rescued renal deficits observed in *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup> mice (Figure 1B). When analyzed microscopically, kidneys from double-mutant mice presented normal architecture, with well-

organized cortex and medulla, and a prominent nephrogenic zone in the periphery that is typically seen at this age (Figure 2, A and C). Closer histologic examination revealed only mild cystic dilation in 50% of the double-mutant mice, whereas the remaining were histologically normal (Figure 2B). In contrast, kidneys from *Spry1*<sup>-/-</sup> mice had disorganized, often supernumerary kidneys with cysts that originated from the collecting duct system (Figure 2A and reference 4). We next analyzed the pattern of UB branching by anti-cytokeratin staining of embryonic day 12.5 (E12.5) and E13.5 kidneys. As shown in Figure 3, whereas initial invasion into the MM and number of UB tips at E12.5 were comparable in wild-type (WT) and double-mutant mice, UB tips were less abundant in double-mutant mice at E13.5, although kidney size was similar. Such decrease seemed to reflect a delay in the branching rate, because the number of glomeruli of double-mutant mice at birth was similar to that of WT littermates (Figure 3C).

These data indicate that the UB can grow out normally from the Wolffian duct in the absence of Ret Tyr1062 if Sprouty1 is absent, indicating that loss of Sprouty1 de-represses a pathway that is able to compensate the otherwise obligatory role of Tyr1062 in UB outgrowth. Although technical limitations as a result of small embryonic kidney size preclude a direct biochemical analysis of the pathways responsible for UB formation in double-mutant mice, our data shed light on the mechanisms by which Sprouty1 regulate ERK MAPK activity. Extensive analysis performed in different cell types show that in the absence of Tyr1062, Ret9 does not bind either Shc or FRS2, Grb2 is not recruited to the activated signaling complex, and therefore Ras is not activated upon Ret engagement.<sup>22–28</sup> Thus, it is unlikely that the loss of Sprouty1 in the double-mutant mice results in ERK activation as a result of de-repression of Grb2 and/or activation of Ras. A more likely explanation is that Sprouty1 regulates the ERK MAPK pathway through modulation of Raf signaling independent of Ras, *via* a phospholipase C (PLC) $\gamma$ -protein kinase



**Figure 1.** Loss of Sprouty1 rescues renal defects found in mice expressing Ret9 Y1062F. (A) Whole mount of genitourinary tracts from newborn mice of the indicated genotypes. (B) Quantification of the renal phenotype of mice with the indicated genotypes. "Agenesis" refers to either unilateral or bilateral agenesis.

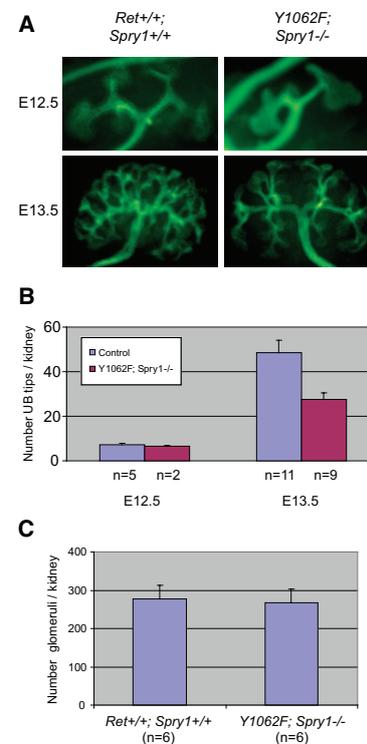


**Figure 2.** (A) Hematoxylin-eosin staining of paraffin sections of kidneys from newborn mice of the indicated genotypes. Note essentially normal architecture in the double-mutant mice. (B) High-magnification pictures of kidneys from newborn mice of the indicated genotypes. Representative sections are shown from mice with normal (center) as well as mild cystic dilation (right). For comparison, a WT mouse is shown on the left. (C) Periodic acid-Schiff staining of medulla of kidneys from newborn mice of the indicated genotypes shows essentially normal architecture in the double-mutant mice.

C-Raf pathway, as is the case for vascular endothelial growth factor-mediated activation of ERK MAPK.<sup>20</sup> Favoring this hypothesis, we previously showed that PLC $\gamma$  activity is necessary for correct UB branching.<sup>12</sup> Moreover, in sympathetic neurons lacking Ret Tyr1015, the binding site for PLC $\gamma$ , phosphorylation of ERK1/2 is reduced by approximately 50%.<sup>29</sup>

We next assessed whether defective migration of enteric neuroblasts was rescued in double-mutant mice. Whole-mount acetyl cholinesterase staining of stomach, ileum, and colon from Ret<sup>RET9(Y1062F/Y1062F)</sup> mice revealed that, as expected, these mice presented aganglionic intestines and decreased fiber density of the enteric innervation of the stomach. Double-mutant mice pre-

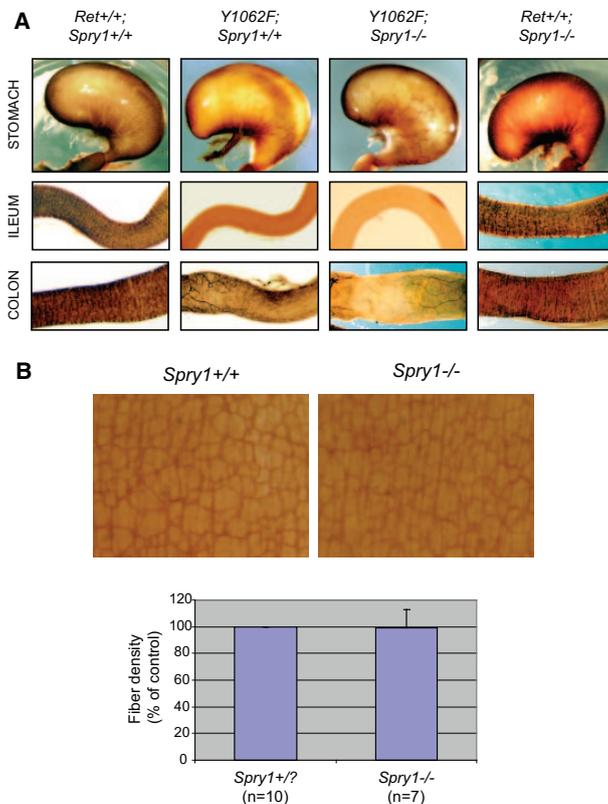
sented similar deficits, indicating that loss of Sprouty1 does not compensate for the lack of Ret Tyr1062 in the enteric nervous system (Figure 4A). Intestines from *Spry1*<sup>-/-</sup> mice seemed to be normally populated by enteric neurons throughout their entire length. When observed in more detail, enteric plexuses from *Spry1*<sup>-/-</sup> mice presented similar fiber density than WT littermates (Figure 4B). Thus, Sprouty1 does not seem to influence GDNF-mediated migration and proliferation of enteric neuroblasts. Rather, such function could be specifically accomplished by Sprouty2,<sup>30</sup> indicating that different Sprouty family members have distinct, nonoverlapping roles during mouse development. Supporting this notion, all Spry family members are expressed in the enteric neurons



**Figure 3.** Cytokeratin staining of developing kidneys from E12.5 and E13.5 embryos. (A) Representative pictures of the indicated genotypes at different embryonic ages. (B) Quantification of the UB tips reveals delayed branching in double-mutant mice. At E13.5, significant differences between control and double-mutant mice were observed ( $P = 0.007$  by two-tailed  $t$  test). Because no differences between WT and heterozygous mice were observed, Ret<sup>+/-</sup>;Spry1<sup>+/-</sup> kidneys were pooled and labeled as "control." (C) The number of glomeruli at birth of double-mutant mice was similar to that of WT littermates ( $P = 0.84$  by two-tailed  $t$  test).

of the myenteric plexus (Supplemental Figure 1).

Finally, we wanted to analyze whether loss of *Spry1* rescued early postnatal lethality observed in mice lacking Ret tyrosine 1062 in the context of Ret9. To this end, we genotyped offspring of double-heterozygous mice at postnatal day 0.5, that is, the morning these mice were born. Consistent with our previous observations,<sup>12</sup> we recovered only 2.53%



**Figure 4.** (A) Lack of effect of *Spry1* deficiency on the enteric innervation defects observed in *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup> mice, as revealed by whole-mount acetylcholinesterase activity of digestive tracts from newborn mice. (B) Whole-mount acetylcholinesterase activity of digestive tracts from newborn WT or *Spry1*<sup>-/-</sup> mice. Bottom panel shows no difference on plexus density between the two genotypes.

(versus an expected percentage of 6.25%) of *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup>; *Spry1*<sup>+/+</sup> pups, confirming that these mice die soon after birth. In contrast, mendelian proportions of *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup>; *Spry1*<sup>-/-</sup> were obtained (18 of 237, 7.6 versus 6.25%) at that age, indicating that deletion of Sprouty1 rescues early lethality observed in mice lacking Ret tyrosine 1062. When the same analysis was performed 7 d after birth, only one of 148 *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup>; *Spry1*<sup>-/-</sup> mice was recovered (0.5 versus 6.25%), indicating that these mice die within the first week after birth, presumably as a result of the absence of enteric innervation.<sup>31</sup> In summary, we have found that genetic deletion of *Spry1* rescues renal but not enteric defects found in *Ret*<sup>RET(Y1062F/Y1062F)</sup>

mice, suggesting a putative mechanism of regulation of the ERK MAPK pathway by Sprouty1 during early kidney development.

## CONCISE METHODS

### Histology and Cytokeratin Staining

Kidneys from newborn mice were fixed in 4% paraformaldehyde, sectioned at 5  $\mu$ m, and processed for hematoxylin-eosin or periodic acid-Schiff staining. Glomeruli counts were performed as described previously.<sup>12</sup> The histologic evaluations were done in a blinded manner. For cytochrome staining, embryonic kidneys were fixed and stained with antibodies to cytochrome and Alexafluor 488-conjugated secondary antibody as described previously.<sup>4</sup> Samples were

cleared and mounted in Citifluor mounting medium (Citifluor Ltd, London, UK) and examined with a Nikon 80i epifluorescent microscope. Approximately five digital images were captured of each specimen at different focal planes, and the total number of UB tips were counted using Nikon NIS-Elements software (Nikon, Surrey, UK).

### Acetylcholinesterase Histochemistry

Newborn mouse gut was dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for 1 to 2 h at 4°C, transferred to saturated sodium sulfate, and stored overnight at 4°C. The gut was then incubated in buffer (ethopropazine HCl [Sigma, St. Louis, MO] 0.2 mM, acetylthiocholine iodide [Sigma] 4 mM, glycine 10 mM, cupric sulfate 2 mM, and sodium acetate 65 mM [pH 5.5]) for 2 to 4 h. Staining for acetylcholinesterase was developed by incubating for 1.5 min in sodium sulfide (1.25%, pH 6). Tissue was rinsed extensively with water before photographing under a dissecting microscope. High-power photomicrographs were obtained by opening the gut along the mesenteric border, flattening the tissue with the serosal side up, and mounting in 50% glycerol before photographing.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-03632 and BFU2007-67619) and funding from Support als Grups de Recerca (Generalitat de Catalunya) to M.E.; O'Brien Center for Kidney Disease Research (P30 DK079333) and HD047396 to S.J.; and grants from the Wellcome Trust (080470) and the Medical Research Council (G0601104) to M.A.B. E.J.R. is recipient of a predoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. X.D. holds a contract from Fondo de Investigaciones Sanitarias. M.E. holds a contract from the "Ramón y Cajal" program.

We are grateful to Ana Velasco, Amanda Knoten, and Palvinder Kaur for technical assistance. We also thank Graeme R. Guy and Xavier Matias-Guiu for critical reading of the manuscript.

## DISCLOSURES

None.

## REFERENCES

- Saxen L. *Organogenesis of the Kidney*. Cambridge: Cambridge University Press, 1987
- Kume T, Deng K, Hogan BL: Murine forkhead/winged helix genes *Foxc1* (*Mf1*) and *Foxc2* (*Mfh1*) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* 127: 1387–1395, 2000
- Griesshammer U, Le Ma, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR: SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6: 709–717, 2004
- Basson MA, Akbulut S, Watson-Johnson J, Simon R, Carroll TJ, Shakya R, Gross I, Martin GR, Lufkin T, McMahon AP, Wilson PD, Costantini FD, Mason IJ, Licht JD: Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* 8: 229–239, 2005
- Basson MA, Watson-Johnson J, Shakya R, Akbulut S, Hyink D, Costantini FD, Wilson PD, Mason IJ, Licht JD: Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol* 299: 466–477, 2006
- Costantini F, Shakya R: GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 28: 117–127, 2006
- Dressler GR: The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 509–529, 2006
- Airaksinen MS, Saarma M: The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3: 383–394, 2002
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M: GDNF family neurotrophic factor signaling: Four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13: 313–325, 1999
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J: The GDNF family ligands and receptors: Implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10: 103–110, 2000
- Wong A, Bogni S, Kotka P, de Graaff E, D'Agati V, Costantini F, Pachnis V: Phosphotyrosine 1062 is critical for the *in vivo* activity of the Ret9 receptor tyrosine kinase isoform. *Mol Cell Biol* 25: 9661–9673, 2005
- Jain S, Encinas M, Johnson EM Jr, Milbrandt J: Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. *Genes Dev* 20: 321–333, 2006
- Jijiwa M, Fukuda T, Kawai K, Nakamura A, Kurokawa K, Murakumo Y, Ichihara M, Takahashi M: A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Mol Cell Biol* 24: 8026–8036, 2004
- Guy GR, Wong ES, Yusoff P, Chandramouli S, Lo TL, Lim J, Fong CW: Sprouty: How does the branch manager work? *J Cell Sci* 116: 3061–3068, 2003
- Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD: Sprouty proteins: Multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 16: 45–54, 2006
- Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y: Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 31858–31862, 2001
- Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD: Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276: 46460–46468, 2001
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E: Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4: 850–858, 2002
- Leeksma OC, Van Achterberg TA, Tsumura Y, Toshima J, Eldering E, Kroes WG, Mellink C, Spaargaren M, Mizuno K, Pannekoek H, de Vries CJ: Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur J Biochem* 269: 2546–2556, 2002
- Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, Kuriyama M, Saito N, Shibuya M, Yoshimura A: Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5: 427–432, 2003
- Yusoff P, Lao DH, Ong SH, Wong ES, Lim J, Lo TL, Leong HF, Fong CW, Guy GR: Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem* 277: 3195–3201, 2002
- Hayashi H, Ichihara M, Iwashita T, Murakami H, Shimono Y, Kawai K, Kurokawa K, Murakumo Y, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Takahashi M: Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* 19: 4469–4475, 2000
- Beset V, Scott RP, Ibanez CF: Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 275: 39159–39166, 2000
- Asai N, Murakami H, Iwashita T, Takahashi M: A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. *J Biol Chem* 271: 17644–17649, 1996
- Arighi E, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, Pasini B, Bongarzone I, Piutti C, Pierotti MA, Borrello MG: Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 14: 773–782, 1997
- Alberti L, Borrello MG, Ghizzoni S, Torriti F, Rizzetti MG, Pierotti MA: Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 17: 1079–1087, 1998
- De Vita G, Melillo RM, Carlomagno F, Visconti R, Castellone MD, Bellacosa A, Billaud M, Fusco A, Tschlis PN, Santoro M: Tyrosine 1062 of RET-MEN2A mediates activation of Akt (protein kinase B) and mitogen-activated protein kinase pathways leading to PC12 cell survival. *Cancer Res* 60: 3727–3731, 2000
- Kurokawa K, Iwashita T, Murakami H, Hayashi H, Kawai K, Takahashi M: Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction. *Oncogene* 20: 1929–1938, 2001
- Encinas M, Rozen EJ, Dolcet X, Jain S, Comella JX, Milbrandt J, Johnson EM Jr: Analysis of Ret knockin mice reveals a critical role for IKKs, but not PI 3-K, in neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons. *Cell Death Differ* 15: 1510–1521, 2008
- Taketomi T, Yoshiga D, Taniguchi K, Kobayashi T, Nonami A, Kato R, Sasaki M, Sasaki A, Ishibashi H, Moriyama M, Nakamura K, Nishimura J, Yoshimura A: Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* 8: 855–857, 2005
- Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M, Bondurand N: Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 295: 232–249, 2006

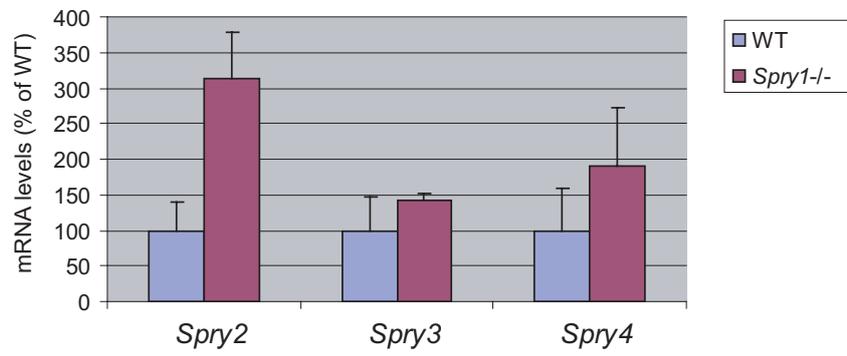
Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

## Supplemental Figure 1 Legend and Methods

(A) Spry2 mRNA is up-regulated in kidneys from Spry1<sup>-/-</sup> mice. Total RNA was extracted from newborn kidneys of the indicated genotypes, and the relative mRNA levels of Spry2, Spry3 and Spry4 were measured by real-time PCR using TaqMan® probes Mm00442344-m1 (Spry2), Mm01209269\_m1 (Spry3) and Mm00442345\_m1 (Spry4) from Applied Biosystems (Foster City, CA). Data shown is average±standard deviation of n=2 kidneys per genotype. Results were calculated by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method (Livak et al., Methods 25:402) and expressed as percent of WT. Although there was a trend of all Spry genes to be up-regulated in the knockout kidneys, only Spry2 levels were significantly different (p<0.05)

(B) All Spry family members are expressed in the enteric neurons of the myenteric plexus of newborn mice. Shown is a double staining for the indicated Spry proteins and Tau-1 as a neuronal marker. Myenteric plexuses from newborn wild type mice were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde and blocked in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 5% Fetal Bovine Serum. Plexuses were incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies to either Spry1 (Zymed, 40-1800, 1/100), Spry2 (Sigma, S1444, 1/200), Spry3 (Santa Cruz, sc-00050, 1/50) and Spry4 (Santa Cruz, sc-00051, 1/50), together with monoclonal antibodies to Tau-1 (Chemicon, MAB3420, 1/200). After washing, plexuses were incubated with Alexa Fluor 488- and 546-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, 1/400). Samples were observed under a confocal Olympus microscope.

A



B

