

Tesis Doctoral

# Los factores de transcripción Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta neurotrófica y el desarrollo

Fontanet, Paula A.

2015-03-17

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

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

Cita tipo APA:

Fontanet, Paula A.. (2015-03-17). Los factores de transcripción Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta neurotrófica y el desarrollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fontanet, Paula A.. "Los factores de transcripción Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta neurotrófica y el desarrollo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-17.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

# **Los factores de transcripción Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta neurotrófica y el desarrollo.**

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

**Paula A. Fontanet**

**Director de tesis: Maria Fernanda Ledda.**

Consejero de Estudios: Arturo Romano

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

Buenos Aires, 2015.

Martes 17 de Marzo del 2015.

## RESUMEN.

### **Los factores de transcripción Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta neurotrófica y el desarrollo.**

El preciso desarrollo de las conexiones neuronales es esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, y la falta de precisión en este proceso está asociada al desarrollo de diferentes patologías. La formación de los circuitos neuronales depende de la interacción de factores celulares intrínsecos y extrínsecos, que regulan la transmisión de la información en el sistema nervioso. Entre estos, los factores neurotróficos (FN) cumplen roles esenciales en el mantenimiento y supervivencia, crecimiento dendrítico y axonal, sinaptogénesis y plasticidad sináptica de distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso central y periférico. Para ello estos factores inducen la expresión de programas transcripcionales específicos implicados en el desarrollo neuronal. Durante los últimos años, las evidencias indican que diversos aspectos del desarrollo neuronal están dirigidos por la expresión de combinaciones específicas de factores transcripcionales. Es por ello que uno de los desafíos de la neurobiología del desarrollo es entender cómo múltiples señales son integradas por las neuronas en programas transcripcionales que generan patrones específicos de conectividad.

El objetivo general de este proyecto es identificar nuevos elementos de los programas transcripcionales y vías de señalización disparadas por los factores neurotróficos, para controlar la conectividad de distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso central y periférico.

Con el objeto de identificar genes involucrados en la diferenciación neuronal hemos realizado ensayos de expresión génica diferencial en un modelo celular análogo a neuroblastos en proliferación, que en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF, nerve growth factor) detienen su división celular y adquieren un fenotipo neuronal. Este ensayo permitió identificar dos genes que codifican para dos factores de transcripción denominados: **Etv4** (también conocido como E1AF o Pea3) y **Etv5** (también conocido como Erm)

que son inducidos por NGF.

En la primera sección de este trabajo demostramos que estos dos miembros de la familia Pea3 son expresados en neuronas sensoriales que responden a NGF durante el período de inervación cutánea y son inducidos local y distalmente por esta neurotrofina. Ensayos de pérdida y ganancia de función para Etv4 o Etv5, indicaron que estos factores son esenciales en el crecimiento neurítico de las neuronas sensoriales inducidas por NGF sugiriendo que estos factores cumplen un rol fisiológico durante el período de inervación periférica inducida por esta neurotrofina.

En este trabajo también mostramos que Etv4 y Etv5 son expresados en neuronas hipocampales de las áreas CA1, CA3 y el giro dentado. Describimos que estos factores son inducidos en neuronas hipocampales cultivadas en respuesta al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, brain derived neurotr<sup>o</sup>fic factor) y utilizando ensayos de inmunoprecipitación in vivo, mostramos que Etv4 y Etv5 interactúan en el hipocampo. Análisis in vitro de pérdida y ganancia de función indicaron que estos factores median los efectos de crecimiento y ramificación del árbol dendrítico disparados por la neurotrofina BDNF en neuronas hipocampales. El estudio de animales deficientes para Etv4 y Etv5 evidenció un importante rol de estos factores transcripcionales en el desarrollo de la conectividad neuronal hipocampal.

En resumen, nuestros resultados demuestran que Etv4 y Etv5 son moléculas esenciales del programa transcripcional disparado por neurotrofinas que llevan al correcto establecimiento de las conexiones neuronales.

## SUMMARY.

### **Etv4 and Etv5 transcription factors as mediators of neurotrophic factor signaling and development.**

Construction of the neural networks depends largely on the precision with which neuronal circuits are established during development. The accuracy of this process is fundamental for normal nervous system function and its aberrant connectivity leads to nervous system disorders. The accuracy of this process depends on the combined actions of extrinsic and intrinsic factors. Between them, neurotrophic factors play key roles in the maintenance and survival of different neuronal populations, dendritic and axonal sprouting, synaptogenesis and synaptic plasticity in the peripheral and central nervous system. To this end, the soluble factors induce the expression of specific transcriptional programs involved in neuronal development. In recent years, the evidence indicates that several aspects of neural development are driven by the expression of specific combinations of transcription factors. Identifying the transcriptional programs and signalling pathways triggered by extracellular cues that control neuronal circuit formation will be of great importance in order to be able to decipher and understand the functioning of mature nervous system. Our general aim focus on the identification of transcriptional programs and signaling pathways triggered by extracellular cues, such as neurotrophic factors, to control the connectivity between specific populations of central and peripheral neurons.

In order to identify genes involved in neuronal differentiation and proliferation of neuronal precursors we performed differential gene expression assays in a cellular model analogous to proliferating neuroblasts which in the presence of nerve growth factor (NGF) stops cell division and acquire a neuronal phenotype. This assay allowed us to identify, among others, genes encoding two transcription factors named **Etv4** (also known as E1AF, E1A enhancer binding protein) and **Etv5** (also known as Erm, ETS related molecule). In this thesis we

studied the role of Etv4 and Etv5 in the development of different neuronal type, in central or peripheral nervous system.

In the first part of this work we demonstrate that this two members of the Pea3 family are expressed in sensory neurons positive for the NGF receptor, TrkA, during the period of cutaneous innervation and are induced by this neurotrophin. Lost and gain of function assays for Etv4 and Etv5 indicated that these factors are essential for the neurite growth of sensory neurons induced by NGF, suggesting that these factors play a physiological role during the period of peripheral innervation induced by this neurotrophin.

In this work we also present data that demonstrate that Etv4 and Etv5 are expressed by CA1, CA3 hippocampal neurons and cells from the dentate gyrus. We describe that these transcriptional factors are induced in hippocampal neuron cultures in response to brain derived neurotrophc factor (BDNF) and immunoprecipitation assays from hippocampus showed that Etv4 and Etv5 interacts *in vivo*. Moreover, *in vitro*, lost and gain of function assays indicated that these factors mediate dendrite branching and outgrowth triggered by the BDNF in hippocampal neurons. Animals deficient in Etv4 evidenced a crucial role of it in the development of hippocampal connectivity.

In summary, our results demonstrate that Etv4 and Etv5 are essential molecules of the transcriptional program triggered by neurotrophins that leads to the correct establishment of the neuronal connections.

## AGRADECIMIENTOS.

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tenés que agradecer a tanta gente.

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo, dedicación y mucha paciencia por parte de mí persona y mi director de tesis, la doctora **Fernanda Ledda**, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación mencionaré y muchas de las cuales han sido un soporte y compañía muy importante en momentos de mucho trabajo.

Primero y antes que nada, agradecer hoy y siempre a mi familia porque se que procuran mi bienestar aunque a veces les sea difícil entender cual es mi trabajo de todos los días. A mis padres **Stella** y **Raul**, mis hermanas **Nadia** y **Emma**, y más que nada en especial a la persona que me acompaña todos los días, con todo lo que ello implica, **Javi**.

Por estar incondicionalmente siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Les doy las gracias por todos los esfuerzos que han hecho, por toda su ayuda y principalmente, por hacerme feliz. Una persona que hoy no esta conmigo físicamente, **mi tía Vivi**, a la que adoro y se que desde donde sea que me este mirando esta muy orgullosa de la meta que alcanzo hoy con esta tesis.

De igual manera mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, **Fernanda**, con quien día a día durante estos 5 años, me mostro como "hacer ciencia" de manera rigurosa, siendo siempre crítica y auto-exigente con mis resultados y experimentos. Es por esto que elegi seguir formando parte de su grupo de investigación. Aprovecho esta oportunidad para agradecerle por todas las veces que quise intentar técnicas o formas nuevas y diferentes de proceder en mis experimentos, siempre supo guiarme y acompañarme en cada momento.

No puedo olvidarme de agradecer a **Gustavo**, una persona "obsesiva de sus experimentos" que contagia su entusiasmo y obsesión por la ciencia. Una persona con la capacidad de ver un resultado en una membrana de PVDF recién salida de una transferencia.

A mis compañeros de todos los días en el laboratorio. Algunos, amigos con los que comparto infinidad de momentos desde la universidad y tuve la suerte de compartir mi doctorado, **Anto** y **Fer. Fer** gracias por comprar discusiones y disecciones, y muchísimas gracias por convertir sombras en bandas. **Anto**, cómplices en la universidad, desde

madrugadas de estudio hasta cursadas en el verano, te sumaste al laboratorio más tarde, y me acompañaste hasta el día de hoy. **Lola**, con esa forma particular y única de tomar mate, haciéndonos parte a todos de tus sensaciones y sentimientos; **Fran**, arrancamos juntos el doctorado, siempre con palabras difíciles y respuestas extraordinariamente raras; y **Facu**, un metro y 90 cm de buena voluntad y predisposición, muchas gracias.

**Dani**, una personita que conocí sin esperarlo y que nunca dudo en darme una respuesta a cada una de mis dudas, ni ofrecerme ayuda a cada uno de mis problemas; siempre dándome ideas para mejorar mis experimentos.

A **mis amigos**, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo. Estoy absolutamente convencida de que si de algo puedo presumir en esta vida es de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir una persona muy afortunada. No hace falta que los nombre, ellos saben quienes son y lo importantes que son para mí y, aunque algunos están lejos, tengo la suerte de poder sentirme siempre acompañada.

A todas las personas, tanto el personal como los becarios del IBCN. **Manu** y **Yamí**, gracias por cuidar de mis ratones y ayudarme en todo momento que lo necesite; y a todos los becarios por hacer divertidos los pasillos del instituto.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mi eterno agradecimiento.

## Índice.

Lista de abreviaturas. ....	9.
Publicaciones.....	12.
Objetivos - Hipotesis. ....	13.
Introducción General. ....	14.

### Capítulo I-Sistema Nervioso Periférico: **“Etv4 y Etv5, medían el crecimiento neurítico inducido por NGF en neuronas sensoriales durante el desarrollo.”**

I a. Introducción. ....	27.
I b. Resultados. ....	37.
I c. Discusión. ....	57.
I d. Materiales y Métodos. ....	63.

### Capítulo II-Sistema Nervioso Central: **“Etv4 y Etv5 son requeridos durante el desarrollo dendrítico hipocampal en respuesta a BDNF.”**

II a. Introducción. ....	70.
II b. Resultados. ....	80.
II c. Discusión. ....	98.
II d. Materiales y Métodos. ....	103.
Discusión General. ....	107.
Bibliografía. ....	110.

## Lista de Abreviaturas.

ADN	( <u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico)
AMPA	( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- ácido isoxazolepropionico)
ARNm	( <u>Á</u> cido r <u>i</u> bo <u>n</u> ucleico <u>m</u> ensajero)
ARN	( <u>Á</u> cido r <u>i</u> bo <u>n</u> ucleico- <u>s</u> mall <u>h</u> airpirin)
BDNF	( <u>B</u> rain <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor; Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro)
Bax	( <u>B</u> cl-2 <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein)
CREB	(cAMP response element-binding protein)
DAPI	(4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole)
DIV	( <u>d</u> ías <u>i</u> n <u>v</u> itro)
DRG	( <u>D</u> orsal <u>R</u> oot <u>G</u> anglia; Ganglios de la Raiz Dorsal)
E	(día embrionario)
Erk	( <u>E</u> xtracellular Signal <u>R</u> egulated <u>K</u> inase; Kinasa Reguladora de la Señal Extracelular)
ERM	( <u>E</u> ts <u>r</u> elated <u>m</u> olecule)
Er81	( <u>E</u> ts- <u>r</u> elated <u>81</u> )
Ets	( <u>E</u> 26 E-twenty-six, <u>t</u> ransformation- <u>s</u> pecific)
Etv	( <u>E</u> ts <u>v</u> ariant)
FGF	( <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor; Factor de Crecimiento Fibroblástico)
FN	( <u>F</u> actor <u>N</u> eurotrófico)
GDNF	(glial <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor; factor neurotrófico derivado de la glia)
GFR $\alpha$	( <u>G</u> DNF <u>f</u> amily <u>r</u> eceptor- <u>\alpha</u> , familia de receptores de GDNF $\alpha$ )
GFL	(GDNF family ligands, familia de ligandos de GDNF)

GFP	(green fluorescent protein, proteína fluorescente verde)
HA	(Hemoaglutinina)
IP3	(Inositol (1,4,5)-triphosphate; Inositol (1,4,5)- trifosfato)
MAPK	(Mitogen activated protein kinase; proteína kinasa activada por mitógenos)
MEK	(MAPK/Erk-kinase; Kinasa MAPK/Erk)
MMP	(matrix metalloproteinases; metaloproteasas de matriz extracelular)
NCAM	(Neural Cell Adhesion Molecule, molécula de adhesión neuronal)
NGF	(Nerve Growth Factor; Factor de Crecimiento Nervioso)
NMDA	(N-metil-D-aspartato)
NT	(Neurotrophin; Neurotrofina)
PBS	(Phosphate buffered saline, buffer fosfato)
Pea3	(polyoma enhancer activator 3)
PFA	(para-formaldehído)
PI3K	(Phosphoinositide 3-kinase; Fosfoinositol 3-Kinasa)
PKC	(Protein kinase C; Proteína Kinasa C)
PKA	(Protein kinase A; Proteína Kinasa A)
PLC $\gamma$	(Phospholipases C-gamma; Fosfolipasa C-gamma)
Ret	(rearranged during transfection)
RTK	(Receptor Tyrosine Kinase; Receptor Tirocin Kinasa)
SNC	(Sistema Nervioso Central)
SNP	(Sistema Nervioso Periférico)
Tbp	(TATA binding protein, caja TATA de unión al ADN)
TG	(Trigeminal Ganglia; Ganglio del Trigémino)

Trk (tropomyosin receptor kinase, sus siglas en inglés)

**Publicaciones incluidas en esta tesis.**

PEA3 TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY MEMBERS, ETV4 AND ETV5, MEDIATE RETROGRADE SIGNALING AND AXONAL GROWTH OF DRG SENSORY NEURONS IN RESPONSE TO NGF.

**Paula Fontanet**, Dolores Irala, Fernando Alsina, Gustavo Paratcha, and Fernanda Ledda.

The Journal of Neuroscience, 2 October 2013, 33(40):15940-15951.

PEA3 TRANSCRIPTION FACTORS, ETV4 AND ETV5, ARE REQUIRED FOR BDNF-MEDIATED HIPPOCAMPAL DENDRITE GROWTH.

**Paula Fontanet**, Gustavo Paratcha, Fernanda Ledda. Manuscrito en preparación.

**Publicaciones no incluidas en esta tesis.**

SPROUTY4 IS AN ENDOGENOUS NEGATIVE MODULATOR OF TRKA SIGNALING AND NEURONAL DIFFERENTIATION INDUCED BY NGF.

Fernando Cruz Alsina, Dolores Irala, **Paula Fontanet**, Francisco Hita, Fernanda Ledda and Gustavo Paratcha.

PLoS One. 2012;7(2):e32087. Epub 2012 Feb 23.

GDNF/GFR $\alpha$ 1 COMPLEX IS REQUIRED FOR DENDRITE MORPHOGENESIS AND CIRCUIT DEVELOPMENT OF HIPPOCAMPAL NEURONS .

Dolores Irala, Antonela Bonafina, **Paula A. Fontanet**, Fernando C. Alsina, Gustavo Paratcha and Fernanda Ledda. Manuscrito en preparación.

## **Objetivo.**

El objetivo general de nuestro laboratorio es contribuir al entendimiento de los mecanismos a través de los cuales los distintos FN regulan el desarrollo del sistema nervioso como una vía para dilucidar la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y así contribuir al desarrollo y mejoramiento de terapias regenerativas.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- (1) Estudiar el rol de Etv4 y Etv5 en los procesos de diferenciación neuronal inducidos por distintos factores neurotróficos en el sistema nervioso periférico y central.
- (2) Identificar los mecanismos moleculares a través de los cuales Etv4 y Etv5 regulan la diferenciación neuronal.

Para ello utilizamos técnicas de bioquímica, biología celular y molecular, y ratones mutantes deficientes para Etv4.

## **Hipotesis.**

La hipótesis que nos propusimos contrastar en este trabajo fue que los factores de transcripción de la familia Pea3, Etv4 y Etv5, median los efectos de los factores neurotróficos en poblaciones específicas de neuronas periféricas y centrales para regular los procesos celulares que subyacen al establecimiento del patrón de conectividad neuronal.

## **Introducción General.**

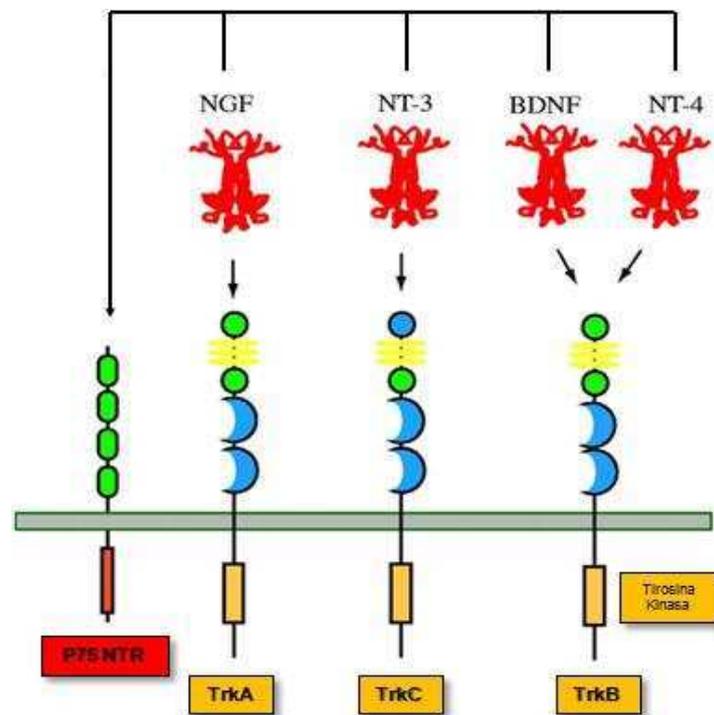
El sistema nervioso está compuesto por circuitos neuronales interconectados, los cuales orquestan nuestra percepción y comportamiento. Cada circuito neuronal está especializado en diferentes funciones, desde la percepción sensorial, reflejos simples y el control del movimiento en procesos cognitivos como la emoción, el aprendizaje y la memoria. Cada función está determinada por la arquitectura del circuito, basada en las conexiones sinápticas entre neuronas. El diseño de los circuitos neuronales se establece durante el desarrollo embrionario y durante la vida postnatal temprana, donde se generan distintos tipos neuronales que se ensamblan específicamente (Albright AL. et al., 2000; Dasen JS. y Jessell TM., 2009; Jessell TM. y Sanes JR., 2000; Ladle DR. et al., 2007). La generación de neuronas es un paso crítico en el ensamblado de los circuitos e incluye procesos como el de inducción neural y neurogénesis. En la siguiente etapa, los neuroblastos comienzan la especificación neuronal y dan origen a diferentes tipos neuronales. El proceso de especificación neuronal es regulado, tanto espacial como temporalmente, por señales extrínsecas e intrínsecas, las cuales inicialmente definen el destino celular del progenitor y la siguiente identidad postmitótica. Las neuronas postmitóticas migran hacia ubicaciones específicas en el sistema nervioso e inician su crecimiento neurítico. El ensamblaje de los circuitos neuronales representa un proceso secuencial, durante el cual las subpoblaciones neuronales proyectan sus axones hacia sus neuronas postsinápticas o tejidos blanco, ramifican su terminal y establecen conexiones sinápticas. En paralelo, las neuronas van desarrollando su árbol dendrítico y reciben conexiones sinápticas. La complejidad de la morfología dendrítica y la distribución de sus contactos sinápticos juega un rol fundamental en la adquisición de las propiedades funcionales de las neuronas y finalmente en los circuitos neuronales (Spruston N., 2008; Gullledge AT. et al., 2005; Häusser M. et al., 2000). Existen diversas enfermedades neurológicas del desarrollo cuyo origen se encuentra íntimamente asociado a anomalías estructurales del árbol dendrítico (Kaufmann WE. y Moser HW., 2000; Penzes P. et al., 2011). El correcto establecimiento de estos circuitos depende de programas genéticos intrínsecos y señales extracelulares, entre

los cuales se encuentran los factores neurotróficos (FN) (Park H. y Poo MM., 2013; Russ JB. y Kaltschmidt JA., 2014).

### **Factores Neurotróficos.**

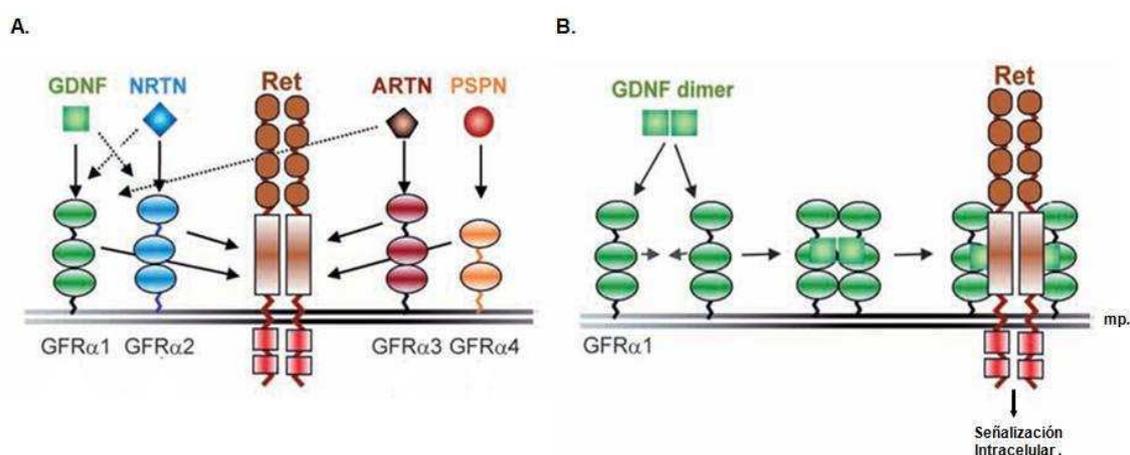
Los FN cumplen roles esenciales en el mantenimiento y supervivencia de distintas poblaciones neuronales, en la dirección del crecimiento axonal, en el proceso sinaptogénico y en la plasticidad sináptica de poblaciones neuronales específicas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Varias familias de FN han sido identificadas en el sistema nervioso de mamíferos, incluyendo las neurotrofinas: Factor de Crecimiento Nervioso (NGF, Nerve Growth Factor, sus siglas en inglés); el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor, sus siglas en inglés), la Neurotrofina 3 (NT-3, Neurotrophin-3, sus siglas en inglés) y la Neurotrofina 4 (NT-4, Neurotrophin-4 sus siglas en inglés) (Reichardt LF., 2006) y los miembros de familia del Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales (GFLs, GDNF Family Ligands; y GDNF, Glial Derived Neurotrophic Factor sus siglas en inglés) que incluye: GDNF, Neurturina (NRTN, Neurturin), Artemina (ARTN, Artemin) y Persefina (PSPN, Persephin) (Paratcha G. y Ledda F., 2008). Las señales intracelulares disparadas por los FN son mediadas a través de distintos receptores tirosina quinasa (RTKs). Tres RTKs diferentes han sido identificados para los distintos miembros de la familia de neurotrofinas, Trk (Tropomyosin-related kinase) A, TrkB y TrkC y un único RTK que es utilizado por los diferentes miembros de la familia de GDNF, Ret (abreviación de “rearranged during transfection”). Los receptores Trk presentan alta afinidad y especificidad por distintas neurotrofinas: NGF se une al receptor TrkA, el factor neurotrófico BDNF y NT-4 se unen al receptor TrkB, y por último NT-3 se une al receptor TrkC (Segal RA, 2003; Huang EJ. y Reichardt LF., 2003) (Figura 1). En la señalización mediada por los receptores Trk interviene un cuarto receptor, p75NTR (p75 neurotrophin receptor; también se lo denomina LNGFR, Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor) (Figura 1). El receptor p75NTR influye en la conformación de los receptores Trk, favoreciendo la afinidad por su ligando. En ausencia de los receptores Trk, p75NTR activa vías de señalización intracelulares antagónicas a las que activa cuando se une a los Trk. (Huang EJ. y Reichardt LF., 2003; Roux PP. y Barker PA., 2002).

La unión del FN a su receptor Trk, promueve la dimerización y autofosforilación de los mismos. Esto lleva a la activación de distintas vías de señalización intracelulares (Greene LA. and Kaplan DR., 1995; Chao MV., 2003), entre las cuales se encuentran: la vía de señalización de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase, sus siglas en inglés) (Markus A. et al., 2002a; Zhong J. et al., 2007); y la vía de PI3K-Akt (phosphoinositide 3'-kinase, sus siglas en inglés) (Huang EJ. y Reichardt LF., 2001; Huang EJ. y Reichardt LF., 2003, Atwal JK. et al., 2000; Vogel W. et al., 2000) involucradas en la supervivencia neuronal y la extensión de los procesos neuronales. Estas señales resultan en la expresión de programas transcripcionales específicos implicados en el desarrollo neuronal (Reichardt LF., 2006).



**Figura 1. Interacción neurotrofina-receptor.** El esquema muestra la interacción de cada neurotrofina con su receptor Trk. El factor trófico NGF se une específicamente a TrkA; BDNF y NT4 a TrkB, y NT3 activa TrkC. A su vez cada neurotrofina puede unirse al receptor p75NTR. Se muestra además un esquema simplificado de los diferentes dominios proteicos/estructurales dentro de cada receptor Trk, graficando su similitud entre ellos y su diferencia con el receptor p75NTR (adaptado de Reichardt LF., 2006).

En cuanto a los factores tróficos de la familia de GDNF, éstos se unen con alta afinidad a un receptor anclado a membrana por un grupo glicosil-fosfatidil-inositol, denominado GFR $\alpha$  (GDNF family receptor alpha, sus siglas en inglés) (Jing S. et al, 1996). Este complejo puede interactuar con el receptor Ret o con la molécula de adhesión neuronal NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, sus siglas en inglés), que son moléculas transmembrana y hacen posible la transducción de la señal hacia el espacio intracelular. Existen 4 tipos de receptores GFR $\alpha$  con distintas afinidades para los distintos miembros que conforman la GFLs. Así GFR $\alpha$ 1 presenta mayor afinidad por GDNF, GFR $\alpha$ 2 por NRTN, GFR $\alpha$ 3 por ARTN y GFR $\alpha$ 4 por PSPN (Sariola H. y SaarmaM, 2003) (Figura 2).



**Figura 2. Ligandos de la GFL y la interacción con el receptor Ret.** A. Solo de muestra la interacción de los ligandos de la familia de GDNF con el receptor Ret es mediante diferentes receptores GFR $\alpha$ . Posteriormente se describió un nuevo receptor para los ligandos de la GFL, el receptor NCAM (Paratcha G. et al., 2003). B. Cada ligando GDNF une a una molécula de GFR $\alpha$ 1, formando un dímero receptor-ligando que luego se une al receptor Ret, permitiendo la señalización intracelular (adaptado de Sariola H. y Saarma M., 2003)

### Identificación de genes involucrados en la diferenciación neuronal inducida por factores neurotróficos.

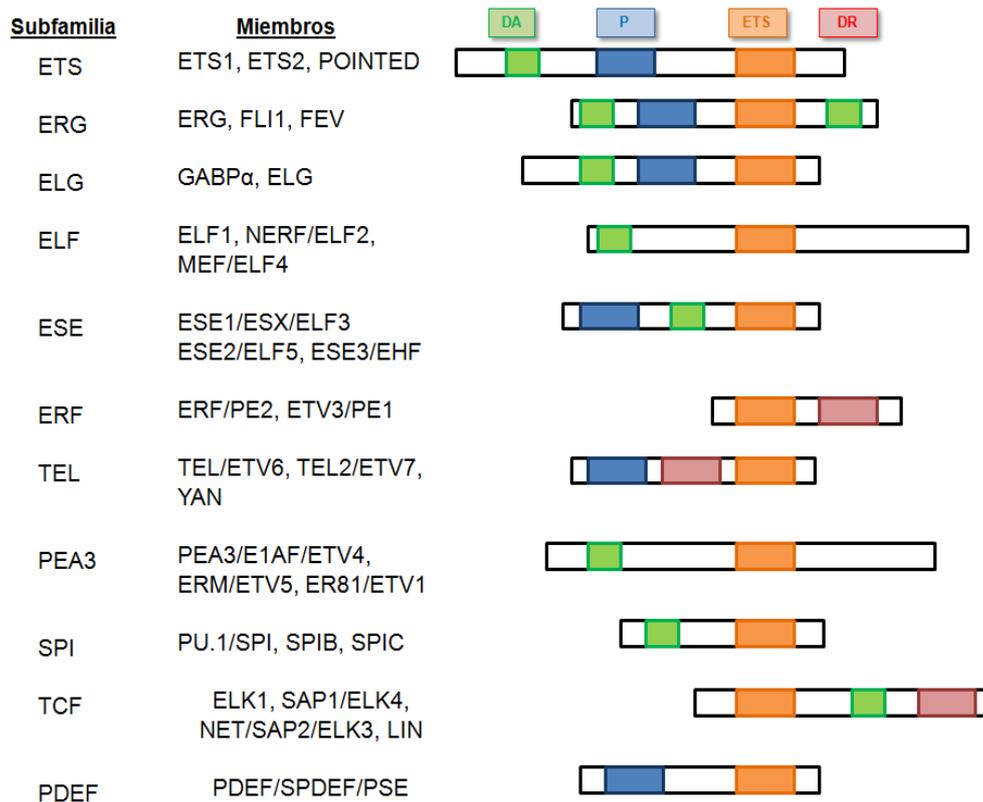
Con el objeto de identificar genes involucrados en la diferenciación neuronal inducida por factores neurotróficos se llevaron a cabo ensayos de expresión génica diferencial en la línea celular neuronal PC12. Esta línea es derivada de feocromocitoma de la médula adrenal de rata, estructura que tiene origen a partir de las células de la cresta neural. Estas células proliferan en presencia de suero o en presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), pero en presencia del factor trófico NGF detienen su

proliferación y adquieran propiedades fundamentales de tipo neuronal (Greene LA., 1978), como la liberación de neurotransmisores por vesículas (Greene LA. y Tischler AS., 1976) y la expresión de canales iónicos (Toledo-Aral et al. 1995). También puede observarse luego de días de tratamiento con NGF, la acumulación de las vesículas en los extremos de los procesos neuríticos que estas células forman (Westerink RH. y Ewing AG., 2008). En presencia de NGF, las células PC12 adquieren, a través de un mecanismo dependiente de transcripción un fenotipo neuronal caracterizado por la formación de neuritas y el aumento en la expresión de marcadores neuronales propios del estado postmitótico (Gunning PE. et al., 1981).

Con el objeto de identificar genes responsables de diferenciación neuronal inducida por el factor trófico NGF, llevamos a cabo ensayos de chip de ADN (DNA microarrays, en inglés) y se comparó el patrón de genes inducidos en estas células en dos condiciones: control (sin NGF) y en presencia del factor trófico (con NGF). Entre los distintos factores inducidos se identificaron 2 factores transcripcionales de la gran familia de factores de transcripción ETS, **Etv4** y **Etv5**.

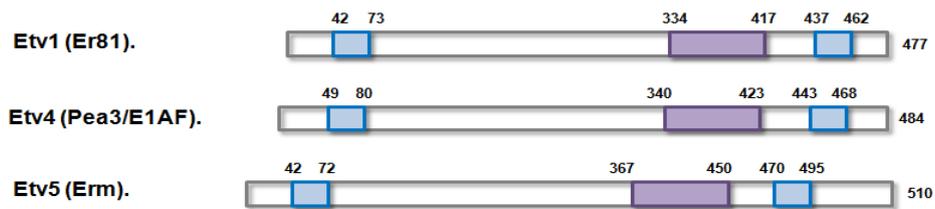
### **Factores de transcripción Pea3.**

Los factores de transcripción Pea3, forman parte de una extensa familia llamada Ets (E26 transformation-specific o E-twenty-six, LePrince D. et al., 1983; Nunn MF. et al., 1983). Esta debe su nombre a la secuencia proteica responsable de la unión al ADN común en todos sus miembros: el dominio ETS (Figura 3) (Karim FD. et al., 1990). Este dominio es una variante del motivo hélice-giro-hélice (Liang H. et al., 1994). El primer miembro de ésta familia, Ets-1, se identificó como un oncogen del virus de la Eritroblastosis aviar (LePrince D. et al., 1983; Nunn MF. et al., 1983). Aproximadamente 30 miembros de la familia fueron identificados hasta el momento (Sharrocks AD., 2001) y reagrupados en 11 subfamilias, basados en las similitudes de secuencia en el dominio ETS como también la de otros dominios conservados (Gutierrez-Hartman A. et al, 2007, Figura 3).



**Figura 3. Familia Ets de factores transcripcionales.** En el esquema se muestran los principales dominios característicos de cada subfamilia. Dominios: DA, dominio de activación transcripcional; ETS, dominio de unión al ADN; P, dominio hélice-giro-helice; DR, dominio de represión transcripcional (adaptado de Gutierrez-Hartman A. et al, 2007)

En particular la subfamilia Pea3 incluye 3 miembros: Er81 (Ets-related o Etv1; Brown TA. et al., 1992.), Pea3 (polyomavirus enhaner activator 3 o Etv4; Xin JH. et al., 1992) y ERM (Ets related molecule o Etv5; Monte D. et al., 1994), que en esta tesis serán referidos como Etv1, Etv4 y Etv5. El análisis del ARNm de *Etv1*, *Etv4* y *Etv5*, muestra que son genes que se expresan en diversos órganos durante el desarrollo embrionario y el adulto (Hollenhorst PC. et al., 2004; Chotteau-Lelievre A. et al., 1997; Chotteau-Lelievre A. et al., 2001). Si bien inicialmente fueron descritos como activadores de la transcripción, posteriormente se observó que también podían actuar como represores (Mavrothalassitis G. y Ghysdael J., 2000). Estas proteínas presentan gran similitud a nivel estructural y de sus dominios (Figura 4) y están altamente conservados a nivel evolutivo (Brown LA. et al., 1998; Munchberg SR. et al., 1999).



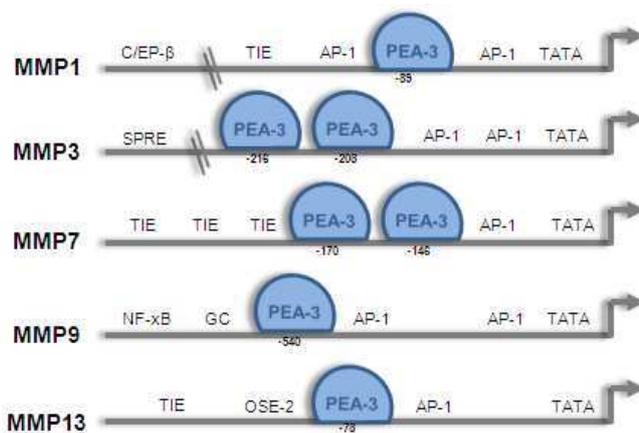
**Figura 4. Subfamilia de factores de transcripción Pea3.** En el esquema se muestran los principales dominios característicos de cada miembro. En azul se muestra el dominio de activación y en color violeta el dominio de unión al ADN, ETS (adaptado de Oh S. et al, 2012).

Los factores de transcripción Ets pueden unirse al ADN por si solos, sin embargo existen evidencias que indican que la interacción con otros factores proteicos modifican su afinidad por el ADN y como consecuencia el patrón de genes regulados por los mismos en distintos contextos celulares (Sharrocks AD, 2001). La secuencia consenso a la que los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 se unen es la secuencia 5'-ACCGGAAGT-3', sin embargo las bases que son indispensables en tal interacción son 5'-GGAA-3' (Wei GH. et al., 2010). El dominio ETS es crítico para su unión al ADN, pero lo es también para la interacción con otras factores proteicos (Li R. et al., 2000). Las proteínas Ets son blanco de importantes vías de señalización. Diversas publicaciones postulan a los factores de transcripción Ets como efectores de la vía de señalización de MAPK (Yordy JS. et al., 2000; Oikawa T. et al., 2003; de Launoit Y. et al., 2006; Hollenhorst PC. et al., 2011). Los factores de transcripción Pea3 son expresados durante el desarrollo normal y en procesos oncogénicos que involucran remodelación de la matriz extracelular (Lu BC. et al, 2009; Zhang Z. et al., 2009, Oh S. et al., 2012).

#### **Los factores de transcripción Pea3 como oncoproteínas.**

Los factores transcripcionales de la subfamilia Pea3, al igual que otros miembros de la familia Ets, han sido vinculados con procesos oncogénicos. Los tres factores transcripcionales Pea3 presentan altos niveles de expresión en distintos tipos de neoplasias (de Launoit Y. et al., 2000; de Launoit Y. et al., 2006). Un ejemplo son los tumores mamarios, donde los factores de transcripción Pea3 son efectores de la vía de señalización HER/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor, sus siglas en inglés) (Shepherd TG. et al., 2001; Subbaramaiah K. et al, 2002). En particular, respecto del factor transcripcional Etv4 existe un extenso número de publicaciones que muestran la relación de los niveles de expresión de esta proteína con el mal pronóstico

oncológico en pacientes con cáncer de mama. Etv4 también presenta niveles altos de expresión en otros tipos tumorales como lo son los tumores de ovario (Davidson B. et al., 2004), los colorectales y gástrico (Horiuchi S. et al., 2003; Boedefeld WM. et al., 2005; Moss AC. et al., 2006). Se han descrito translocaciones cromosómicas de los factores transcripcionales Pea3 asociadas al desarrollo de tumores de próstata (Tomlins SA. et al., 2006; Helgeson BE. et al., 2008) y al sarcoma de Ewin (Peter M. et al., 1997; Jeon IS. et al., 1995; Urano F. et al., 1996). En la bibliografía se encuentran descritos diversos genes blanco de estos factores transcripcionales, que están relacionados con procesos neoplásicos. En particular los factores de transcripción Pea3 regulan una variedad de genes que participan en los procesos de remodelación de la matriz extracelular que ocurre durante el proceso de invasión/progresión tumoral que llevan al desarrollo de metástasis. Entre estos se encuentra los de que codifican para metaloproteasas de matriz (MMP, matrix methaloprotease, sus siglas en inglés) entre las cuales se encuentran: MMP1 (colagenasa intersticial), MMP3 (stromelisin 1), MMP7 (matrilisina) y MMP9 (gelatinasa B) (Bosc DG. et al., 2001; Qin L. et al., 2008; Higashino F. et al., 1995; Crawford HC. et al., 2001) (Figura 5).



**Figura 5. Sitios de unión de diferentes factores de transcripción en secuencias promotoras de metaloproteasas de matriz.** C/EBP-β (CCAAT enhancer-binding protein); TIE (transforming growth factor-β inhibitory element); AP-1 (activator protein-1); PEA-3 (polyoma enhancer A binding protein-3, en color azul); OSE-2 (osteoblastic cis-acting element); TATA, (TATA box); AP-2 (activator protein-2); NF-κB (NF-κB binding site); CCAAT (CCAAT box); SPRE (stromelysin-1

platelet-derived growth factor responsive element) (adaptado de Spinale FG., 2007).

### **Rol fisiológico de los factores de transcripción Pea3.**

En el desarrollo normal, el análisis de la expresión de los distintos miembros de la subfamilia Pea3 reveló que estos genes se expresan tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto (Hollenhorst DA. et al., 2004; Chotteau-Lelievre A. et al., 1997 y Chotteau-Lelievre A. et al., 2001). A pesar de que existe cierta superposición en la expresión de estos factores transcripcionales, siendo Etv5 el de expresión más ubicua, los

patrones de expresión de *Etv1*, *Etv4* y *Etv5* son diferentes incluso a nivel celular dentro de un mismo órgano. Esto indica que los tres factores transcripcionales presentan una regulación específica dando lugar a funciones fisiológicas diferentes.

En los últimos años se ha descrito un importante rol de estos factores de transcripción durante el desarrollo embrionario de los riñones (Kuure S. et al., 2010). En este sistema se ha observado que mientras *Etv4* y *Etv5* son expresados en el extremo más distal de los ductos epiteliales durante la diferenciación del mesonefro embrionario, *Etv1* se expresa en las células mesenquimáticas adyacentes. Sin embargo, posterior a la diferenciación del glomérulo renal, la expresión de los factores de transcripción *Etv4* y *Etv5* se reduce drásticamente (Chotteau-Lelievre A. et al., 2003). La expresión de *Etv4* y *Etv5* en el mismo tipo celular, sugiere que estarían desempeñando funciones similares o complementarias en el desarrollo embrionario del órgano. Ratones deficientes para *Etv4* o *Etv5* evidencian que la función de cada uno de estos factores puede ser compensada, al menos de manera parcial por el otro, debido a que solo los animales deficientes para ambos no son capaces de desarrollar riñones (Mao J. et al., 2009).

Otro órgano donde se expresan los tres miembros de la subfamilia Pea3, es la glándula mamaria (Chotteau-Lelievre A. et al., 1997). *Etv1*, *Etv4* y *Etv5* se expresan durante el desarrollo y sus niveles disminuyen en el epitelio mamario adulto (Trimble MS. et al., 1993; Laing H. et al., 2000; Shephert TG. et al., 2001). Los tres factores transcripcionales se expresan en todas las células progenitoras del TEBs (terminal end buds, sus siglas en inglés) y en las células mioepiteliales de los conductos proximales. Sin embargo solo *Etv1* se expresa en el epitelio luminal de la glándula (Kurpios NA. Et al., 2009).

Un tercer ejemplo en el desarrollo embrionario donde participan los factores transcripcionales Pea3, es la formación de las extremidades. En particular, se sabe que desempeñan un rol clave en el desarrollo embrionario temprano en cuanto a la determinación de los ejes proximal-distal y anterior-posterior de las extremidades, en consecuencia animales deficientes en *Etv4* y *Etv5* sufren de polidactilia (Mao J. et al., 2009; Zhang Z. et al., 2009). *Etv4*, como también *Etv5* fueron descritos como genes blanco de la vía de señalización inducida por el factor trofico FGF, en diversos eventos del desarrollo embrionario.

Los ratones deficientes para el factor transcripcional *Etv4* no presentan un fenotipo letal, pero presentan

alteraciones en cuanto a su reproducción. Estos animales no presentan defectos en los órganos reproductores ni producción de esperma anómala, dado que puede realizarse fecundación *in vitro* con sus espermatozoides. Muestran conductas sexuales/reproductivas normales, por lo que se cree que podría existir una erección o eyaculación defectuosa (Laing MA. et al., 2000). A diferencia de los ratones *Etv4*<sup>-/-</sup>, los ratones deficientes para *Etv5* si muestran defectos en sus órganos reproductivos. Los machos *Etv5*<sup>-/-</sup>, son estériles y tienen testículos de menor tamaño que los ratones salvajes. Esto se debe al rol que desempeña *Etv5* en la renovación de las espermatogonias (Chen C. et al., 2005; Schlessner HN. et al., 2008). Las hembras mutantes no son fértiles: presentan falta de interés en la conducta reproductiva y problemas en su ovulación debido a una estructura ovárica defectuosa (Eo J. et al., 2011).

### **Factores de transcripción Pea3 en el sistema nervioso.**

Poco se conoce sobre el rol de los factores Pea3 en el desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo los trabajos publicados hasta el momento describen principalmente el rol del factor transcripcional *Etv1*, tanto en el desarrollo de estructuras del sistema nervioso central como el periférico.

Recientemente se ha descrito que *Etv1* desempeña un rol en la modulación de la actividad neuronal dependiente de la expresión génica en la maduración de las células granulares del cerebelo. *Etv1* auto regula sus niveles de expresión durante la maduración (Sato M. et al., 2005) así como también la expresión de un gran número de proteínas involucradas en la transmisión sináptica, que resultan esenciales en el establecimiento de los circuitos neuronales del cerebelo (Brickley SG. et al., 2001). También se ha descrito la expresión de *Etv1* en el bulbo olfatorio, donde es requerido para la expresión del marcador neuronal dopaminérgico TH (la enzima Tirosina Hidroxilasa) (Cave J. et al., 2010).

Diversos trabajos evidencian un rol crucial de los factores Pea3 en el desarrollo de la corteza cerebral. Los tres miembros de la familia Pea3 han sido descritos como mediadores importantes en la migración de progenitores corticales durante el proceso de laminación cortical mediando los efectos de los miembros de la familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF, fibroblast growth factor, sus siglas en inglés) (Hasegawa H. et al., 2004). También se ha descrito la expresión de *Etv1* en una subpoblación de células Cajal-Retzius

(Zimmer C. et al. 2010) cuya función durante el desarrollo embrionario cortical consiste en guiar a las neuronas postmitóticas durante la migración radial (Rice DS. et al., 2001; Ogawa M. et al., 1995; Supèr H. et al., 2000).

Finalmente, el trabajo de Yoneshima H. et al. (2008) sugiere la participación de Etv1 en la diferenciación/maduración de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral, proponiéndolo como un marcador molecular característico que podría estar conservado en la evolución.

La expresión de Etv1 y Etv4 también ha sido descrita en neuronas sensoriales del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG, Dorsal Root Ganglia sus siglas en inglés) y en ciertas poblaciones de motoneuronas de la médula espinal. Tanto Etv1 como Etv4 son expresadas por motoneuronas de la columna lateral (LMC, Lateral Motor Column, sus siglas en inglés), que inervan los músculos de los miembros). Sin embargo, no son coexpresadas por las mismas subpoblaciones neuronales. Aquellas motoneuronas positivas para Etv1 inervan músculos diferentes a lo que lo hacen las positivas para Etv4 (Lin JH. et al., 1998). Además, Etv4, participa en el posicionamiento dorso-ventral de ciertas subpoblaciones de motoneuronas LMC dentro del asta ventral durante el desarrollo embrionario (Arber S. et al., 2000; Livet J. et al., 2002). Ratones deficientes para Etv4 presentan problemas en la ramificación de subpoblaciones de motoneuronas en la inervación de sus músculos blanco y en el posicionamiento de las motoneuronas. El factor neurotrófico, GDNF, fue identificado como el factor periférico necesario para inducir la expresión de Etv4 en motoneuronas y ratones deficientes para GDNF presentan problemas de inervación muscular similar a los observados en los animales mutantes para Etv4. A diferencia de Etv1 y Etv4, el tercer miembro de la subfamilia Pea3, Etv5 no fue descrito en motoneuronas (Lin JH. et al., 1998; Hagedorn L. et al., 2000; Paratore C. et al., 2002).

La expresión de Etv1 y Etv4 también ha sido descrita en las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (DRG). En esta estructura, Etv1 es expresado por una subpoblación de neuronas del DRG; las neuronas propioceptivas positivas para el receptor de la neurotrofina NT3, TrkC, y participa en la formación de la conexión sensorial propioceptiva-motora (Arber S. et al., 2000; de Nooij JC. et al., 2013). En esas células, la expresión de Etv1 es inducida por NT3 y animales deficientes para esta neurotrofina muestran defectos similares a los animales mutantes para Etv1 en el establecimiento de la conexión sensorial propioceptiva-

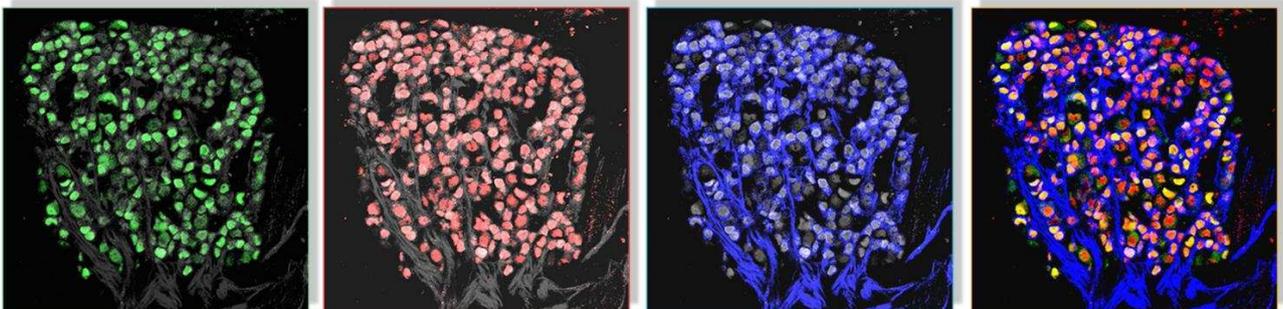
motora (Patel TD. et al., 2003).

En esta tesis trataremos de elucidar el rol de los factores de la familia Pea3 menos estudiados, Etv4 y Etv5, en el desarrollo de distintas estructuras centrales y periféricas del sistema nervioso. Esta tesis se divide en 2 capítulos, el primero contiene estudios sobre expresión y función de estos factores transcripcionales en el desarrollo del DRG y el segundo comprende estudios sobre la expresión y participación de estos factores en la conectividad hipocampal.

## Capítulo I.

### Sistema Nervioso Periférico.

**Etv4 y Etv5, median el crecimiento neurítico inducido por NGF en neuronas sensoriales durante el desarrollo.**



PEA3 TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY MEMBERS, ETV4 AND ETV5, MEDIATE RETROGRADE SIGNALING AND AXONAL GROWTH OF DRG SENSORY NEURONS IN RESPONSE TO NGF.

**Paula Fontanet**, Dolores Irala, Fernando Alsina, Gustavo Paratcha, and Fernanda Ledda.

The Journal of Neuroscience, 2 October 2013, 33(40):15940-15951.

## **Ia. Introducción.**

### **El sistema somatosensorial.**

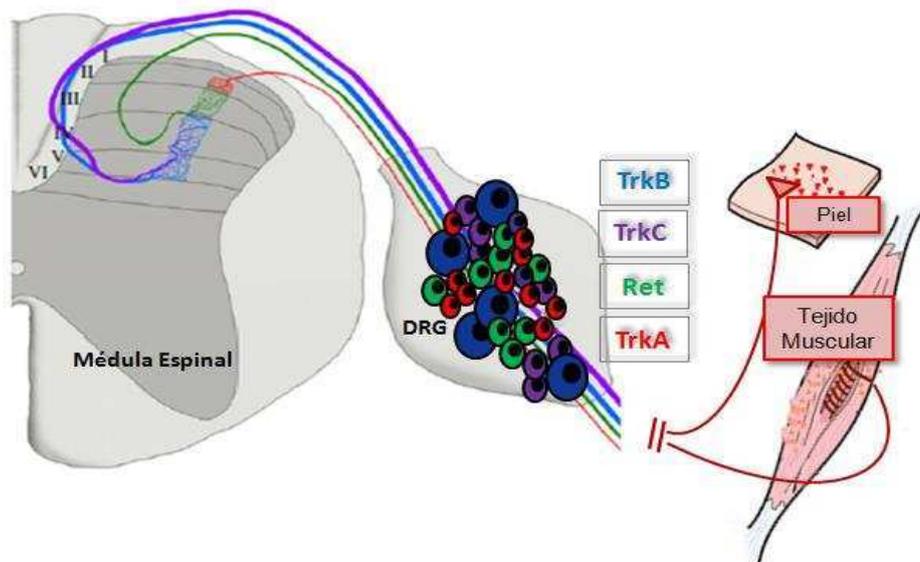
En los vertebrados, el sistema encargado de transmitir la extensa información que se encuentra en el medio que los rodea hasta el cerebro para su decodificación es el sistema somatosensorial. Tal información se presenta de diversas modalidades como son el tacto, la temperatura, el dolor, entre otras. Ante la diversidad de estímulos, para ser capaces de decodificarlos es necesaria la presencia de subtipos neuronales sensoriales que tengan la capacidad de transmitir estímulos específicos. Cada subtipo neuronal se caracteriza por la expresión de ciertas proteínas específicas y necesarias para la función que desempeñan. Las neuronas sensoriales se encuentran en los ganglios sensoriales formando parte del SNP. La información somatosensorial recibida en la piel, el órgano más extenso, en las zonas del tronco y de las extremidades se envía a la médula espinal mediante las neuronas sensoriales cuyos somas se alojan en los ganglios de la raíz dorsal (Scott RH. et al., 1992) ubicados en forma simétrica a lo largo del cordón espinal; mientras que la información sensorial recibida en la cara se transmite al tallo cerebral por neuronas sensoriales localizados en ganglio del trigémino (TG, trigeminal ganglia) (Waite PME. y Tracey D.J, 1995). Las neuronas del DRG y del TG, se originan de las células de las crestas neurales, una población celular transiente que surge del borde de la placa neural posterior a la gastrulación, un tipo celular único en sus capacidades de dar origen a una diversidad enorme de tipos celulares y migrar a lo largo de todo el embrión (His N. et al., 1868). Finalmente la especificación en subtipos neuronales ocurre en el mismo ganglio sensorial. Diferentes subtipos neuronales expresan marcadores específicos y proyectan hacia la médula espinal inervando a diferentes profundidades de la misma. Eventos como la proliferación, supervivencia celular y el crecimiento axonal, son procesos de suma importancia en el desarrollo de las neuronas sensoriales y se encuentran regulados por diferentes factores extrínsecos e intrínsecos, entre los cuales se pueden identificar factores de transcripción, cuya expresión está estrictamente regulada tanto temporal como espacialmente, y factores solubles (Marmigere F. y Ernfors P., 2007).

### **Subpoblaciones neuronales del DRG.**

Las diferentes neuronas sensoriales del DRG están especializadas para percibir y procesar diferentes modalidades de un estímulo. Las neuronas sensoriales del DRG son un grupo heterogéneo en cuanto a sus marcadores moleculares y sus funciones celulares. Las neuronas sensoriales del DRG pueden clasificarse utilizando diferentes criterios: tamaño del cuerpo neuronal, dependencia por el factor trófico junto con la expresión de sus correspondientes receptores Trk o Ret, la mielinización de sus axones y la expresión de neuropéptidos y canales iónicos que responden específicamente a distintos estímulos.

Los receptores Trk fueron originalmente descritos como mediadores del crecimiento inducido por las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3 y NT4/5) durante el desarrollo. La disponibilidad limitada de estos factores en los tejidos a inervar por estas neuronas, lleva a la muerte celular de aquellas que no alcanzaron a establecer correctamente la conexión neuronal. Además éste mecanismo asegura la relación apropiada entre el tamaño del tejido a inervar y el número de axones que lo llegan a él. Los receptores Trk se expresan en tres subpoblaciones dentro del DRG correspondiendo con una función sensitiva específica (Bibel y Barde, 2000).

**TrkA**, se expresa en neuronas de menor tamaño, con axones no mielinizados (fibras C) y son neuronas nociceptivas que inervan la piel y las vísceras. **TrkB**, se expresa en neuronas de medio y gran tamaño, con axones densa o escasamente mielinizados y son neuronas mecanorreceptivas de adaptación rápida. **TrkC**, son neuronas de gran tamaño, con axones densamente mielinizados y son neuronas propioceptivas que inervan las células de Merkel, los órganos tendinosos de Golgi y las fibras musculares. Los receptores Trk se expresan diferencialmente durante el desarrollo y el patrón de expresión en el adulto que se describió anteriormente, no coincide con el patrón inicial.



**Figura 6. Expresión de TrkA, TrkB, TrkC y Ret en neuronas sensoriales del DRG.** El esquema muestra la caracterización de las diferentes neuronas sensoriales por la expresión de los diferentes receptores de factores neurotróficos. La mayoría de las neuronas TrkA y Ret positivas presentan un cuerpo neuronal pequeño y su aferencia corresponde a fibras no mielinizadas, involucradas en la nocicepción. Las neuronas TrkB o TrkC positivas son de mayor tamaño con fibras mielinizadas. Los axones TrkA positivos alcanzan las láminas más superficiales en la medula espinal, mientras que TrkB y TrkC alcanzan las más profundas. En el esquema se puede ver alguno de los órganos que son inervados por neuronas sensoriales como la piel y el músculo.

En edades tempranas del desarrollo la mayoría de las neuronas expresan el receptor TrkC y muchas de ellas expresan coexpresan TrkB (Farinas I. et al., 1998; Kahana N. y Kalcheim C., 1994; Snider WE. y Wright DE., 1996). Luego la mayoría de estas células dejan de expresar TrkC y pasan a determinar poblaciones neuronales discretas positivas para cada uno de los receptores Trk, en etapas más tardías del desarrollo.

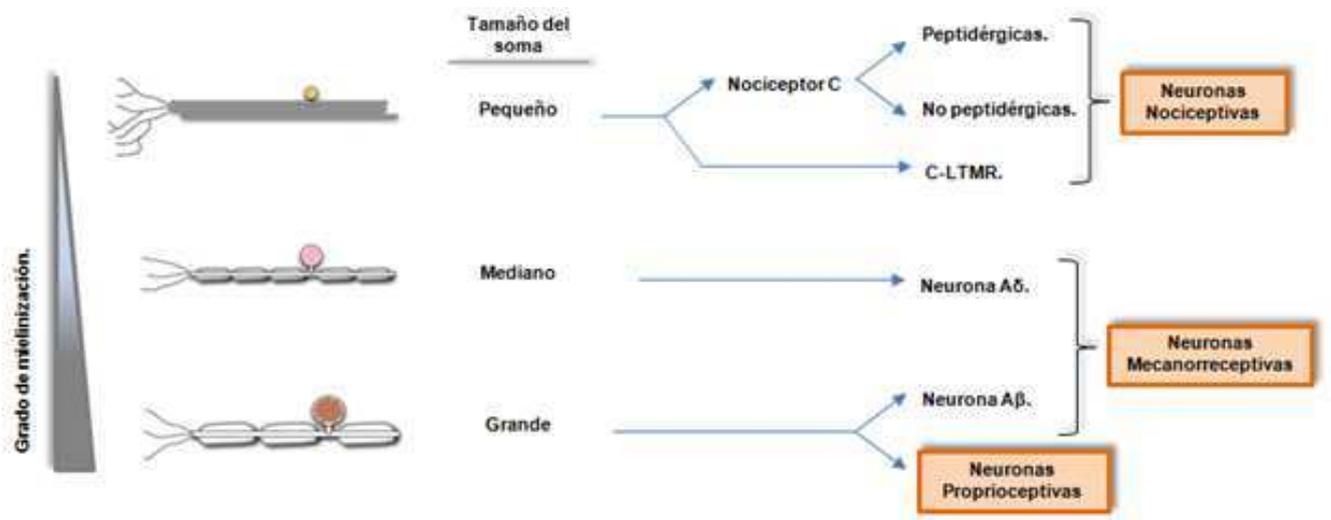
Las **neuronas nociceptivas**, de menor tamaño se convierten en la fibras C, son aproximadamente el 80% del total de las células, todas expresan TrkA antes del nacimiento. Esta subpoblación neuronal en la edad perinatal sufre un cambio fenotípico donde aproximadamente el 50% de las neuronas dejan de expresar el receptor TrkA y expresan, el receptor de GDNF, **Ret** (Molliver DC. y Snider WD., 1997; Molliver DC. et al., 1997). Recientemente se logró identificar un factor transcripcional denominado Runx1 clave en la transición de la expresión del receptor TrkA a Ret que ocurre perinatalmente en el desarrollo (Chen CL. et al., 2006b), dando origen a dos poblaciones de neuronas nociceptivas. Por un lado las neuronas  $TrkA^-/Ret^+$ , de menor

tamaño que proyectan su eferencia central en la lamina II de la médula espinal; y se la puede identificar además por la expresión de la isolectina (IB4) (Molliver DC. et al., 1997). Por otro las neuronas TrkA<sup>+</sup>/Ret<sup>-</sup>/IB4<sup>-</sup> que además expresan altos niveles de neuropéptidos, como el péptido CGRP (calcitonin gene-related peptide, sus siglas en inglés) y el SP (sustancia P), proyectan hacia la médula en las láminas I y II.

Las **neuronas propioceptivas** son la de mayor velocidad de conducción, densamente mielinizadas y pueden ser clasificadas en tres clases: Ia (aferencias primarias de las fibras musculares), Ib (los órganos tendinosos de Golgi) y II (aferencias musculares de las fibras musculares), que inervan diferentes estructuras y proyectan al cordón espinal en diferentes láminas (Hoheisel U. et. al., 1989).

Las **neuronas sensoriales mecanorreceptivas** presentan gran diversidad en el tamaño de sus somas y el grado de mielinización de sus axones, mientras que la respuesta a estímulos químicos y térmicos está solo a cargo de las neuronas de axones no mielinizados o escasamente mielinizados.

Otro de los marcadores moleculares que caracteriza a la diferentes poblaciones de neuronas sensoriales son los canales iónicos Trp (transient receptor potential, sus siglas en inglés) que determinan las propiedades receptivas de cada tipo neuronal (Vastani N. et al., 2005). Existen resultados controversiales en cuanto a la caracterización de los marcadores moleculares que caracterizan a las subpoblaciones neuronales, lo que evidencia que a pesar de la extensa bibliografía que lo describe, es un sistema que muestra una gran complejidad.



**Figura 7. Morfología de los diferentes tipos neuronales en el DRG.** Las neuronas sensoriales pueden ser divididas en tres grandes grupos según el tamaño del cuerpo neuronal (pequeño, mediano y chico) y el grado de mielinización. Dentro de cada grupo existen subtipos neuronales siendo las fibras C - neuronas nociceptivas; fibras A - neuronas mecanoreceptivas y por último las neuronas de gran tamaño son las neuronas propioceptivas.

### **Señalización de TrkA/NGF en el DRG.**

El NGF fue descubierto en el contexto de experimentos para determinar la interacción entre las neuronas en desarrollo y los tejidos inervados por ellas. El NGF puede ser producido por una gran variedad de células en el organismo (Levi-Montalcini R. et al., 1996).

La mayoría de las neuronas sensoriales del DRG de diámetro pequeño, que responden a estímulos nociceptivos y median la respuesta al dolor, expresan el receptor para NGF, TrkA (Holtzman DM. et al., 1992). Estas neuronas proyectan axones no mielinizados o escasamente mielinizados e inervan la epidermis, en respuesta al NGF producido por los queratinocitos, durante el desarrollo embrionario (Luo W. et al., 2007; Lallemand F. y Ernfors P., 2012). Neuronas sensoriales derivadas del DRG puestas en cultivo extienden sus axones en respuesta a NGF (Cohen S. et al., 1954), resultados que coinciden con lo observado en ratones neonatos deficientes en NGF que presentan anomalías en la inervación epidérmica (Patel TD. et al., 2000).

El factor trófico NGF se une extracelularmente a los dos receptores en la membrana celular, TrkA y p75NTR, y estos se dimerizan y transfosforilan los residuos tirosina de su par en el dímero generando sitios de unión de proteínas adaptadoras, determinantes en la activación de vías de señalización intracelular (Cunningham MD. et al., 1997). Las vías inducidas por NGF en las neuronas TrkA positivas incluyen la vía de Ras/MEK/ERK, la de PI3K (fosfatidilinositol 3 kinasas), la de PLC (fosfolipasa C) (Sofroniew MV. et al., 2001).

La activación del receptor TrkA, lleva al aumento de la actividad de la proteína pequeña-G Ras, la cual fosforila la mediante la activación de la serina/treonina kinasas Raf (MAPKKK) a MEK (MAPKK), que culmina en la activación de la ERK (MAPK) (Kaplan DR. y Miller FD., 1997; Katz ME. y McCormick F., 1997). Esta vía, Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), esta involucrada en un gran número de procesos y funciones celulares, incluyendo la regulación de la expresión génica (Katz ME. y McCormick F., 1997). La vía canónica de MAPK lleva a la activación en las kinasas Erk1 y Erk2 (Robinson MJ. y Cobb MH., 1997), sin embargo los miembros de la familia

Ras pueden activar una gran diversidad de MAP kinasas (Pearson G. et al., 2001). El nombre de MAPkinasa se debe a (i) la capacidad de estas moléculas de fosforilar la proteína asociada a microtubulos (MAPII) y (ii) éstas kinasas además median los efectos proliferativos de varios factores de crecimiento, por lo que se las denominan proteínas kinasas activadas por mitógenos. Dentro de los miembros de la gran familia de MAP kinasas, al menos 3 se saben que se activan en la vía de señalización inducida por neurotrofinas: Erk 1, Erk2 y Erk5 (Cavanaugh JE. et al. 2001; Kamakura S. et al. 1999; Watson FL. et al., 2001).

Estudios *in vitro* muestran que las vías de señalización MAPK (Markus EJ. et al., 2002a; Zhong J. et al., 2007); la vía de PI3K-Akt (Huang EJ. and Reichardt L., 2001; Huang EJ. and Reichardt L., 2003, Atwal JK. et al., 2000; Vogel W. et al., 2000) y la vía de PLC participan en el crecimiento neurítico de las neuronas sensoriales inducidos por NGF. El estudio reciente de ratones deficientes en intermediarios de la vía MAPK, establece la relevancia fisiológica de ésta vía de señalización para los procesos de ramificación y extensión de los axones sensoriales (Zhong J. et al., 2007). Sin embargo el mecanismo por el cual la señal disparada por el factor trófico NGF en los terminales axonales alcanza el cuerpo neuronal y modula la expresión génica aún es poco claro. Es por esto que la identificación de factores de transcripción y sus genes blanco, involucrados en los procesos de extensión y ramificación axonal que induce como respuesta biológica el factor NGF representa un gran desafío.

### **Transporte retrógrado del NGF.**

El análisis *in vivo* en modelos de ratones transgénicos han evidenciado que NGF, BDNF, NT3 y NT4 así como sus receptores TrkA, TrkB y TrkC son requeridos para la supervivencia neuronal. En cada una de estas líneas de ratones se observa que una población específica de neuronas sensoriales del DRG se encuentra reducida (Patel TD. et al., 2000; Perez-Pinera P. et al., 2008; Minichiello L. et al., 1995).

La muerte celular es un evento que ocurre normalmente durante el desarrollo embrionario y que la supervivencia neuronal depende de los factores tróficos secretados por los tejidos blanco que éstas inervan (Rita Levi-Montalcini R. y Hamburger V., 1949). En función de éstas observaciones llevaron a formular la “Hipótesis Neurotrófica”, que postula que durante el desarrollo, mientras una neurona extiende su proceso neurítico

hasta la célula blanco, compite con las demás neuronas por una cantidad limitada del factor trófico que esta célula blanco libera y aquellas neuronas que logran captar el factor trófico sobreviven y las que no lo hacen mueren.

Diversas líneas de evidencia indican que las neurotrofinas operan de forma retrógrada para controlar la sobrevivencia de las distintas poblaciones neuronales en el sistema nervioso periférico. Para que las neurotrofinas secretadas por los tejidos blanco puedan afectar la expresión génica en el soma de las neuronas que los inervan, la señal debe viajar grandes distancias, a veces mayores a 1 metro, a través del axón. La activación *in vivo* de los receptores Trk en presencia de la neurotrofina en los terminales se propaga a través del axón retrógradamente hacia el cuerpo neuronal (Ehlers M. et al 1995, Bhattacharyya A. et al 1997). Para que ello ocurra es necesaria la endocitosis del complejo receptor-ligando en vesículas, y que estos endosomas de señalización viajen desde el terminal nervioso al cuerpo celular (Watson FL. et al., 1999).

El sistema de cultivos compartimentalizados diseñado por Robert Campenot ha permitido entender los mecanismos de señalización retrógrada (Campenot RB., 1977; Campenot RB., 1994). En éste sistema el medio que rodea a los cuerpos neuronales ubicados en un compartimento, queda aislado del medio que baña a los axones distales en el segundo compartimento. De esta forma las neurotrofinas pueden ser aplicadas exclusivamente en los axones distales, recapitulando la estimulación selectiva de los terminales neuronales que ocurre *in vivo* después de la liberación de las neurotrofinas por sus células blanco. Estos cultivos compartimentalizados han sido claves para demostrar las vías de señalización específicas que son activadas por los factores neurotróficos en forma distal y cómo se traducen en patrones transcripcionales que permiten la sobrevivencia y crecimiento de las neuronas del sistema periférico. La mayor parte de estos trabajos han sido realizados en neuronas sensoriales y simpáticas que expresan el receptor TrkA y dependen de NGF para su sobrevivencia (Heather M. et al 2002).

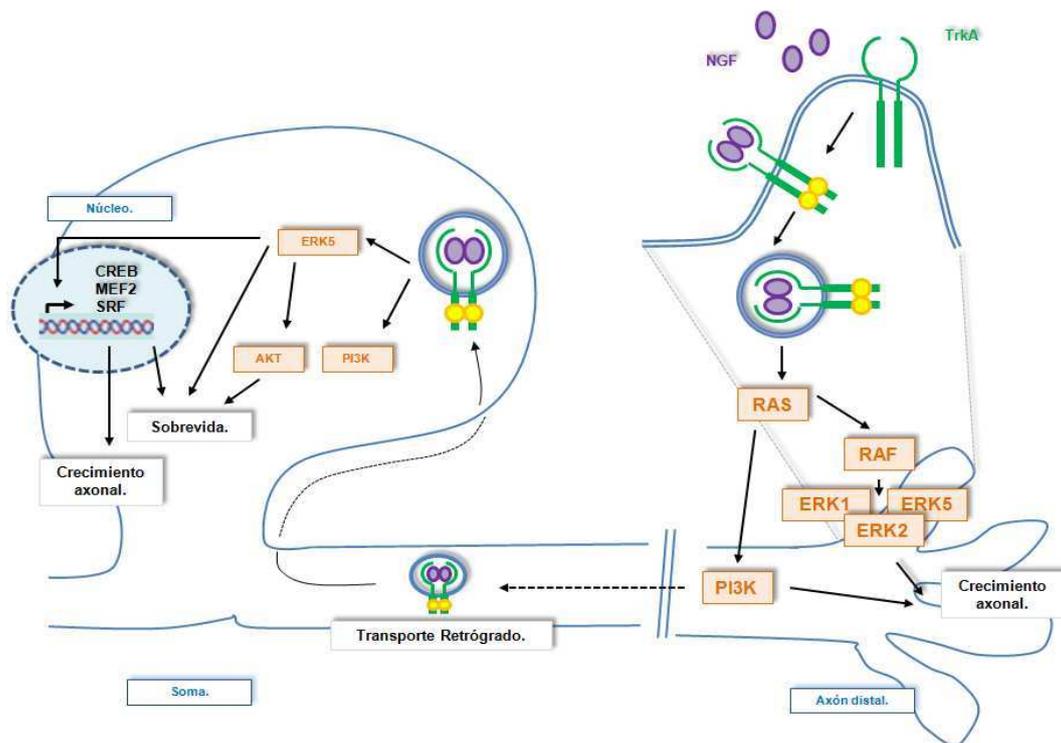
El uso de los cultivos compartimentalizados en el estudio del transporte retrógrado y las vías de señalización involucradas, permitió discriminar en una respuesta diferencial según la trofina se aplique en contacto con los somas neuronales o en los terminales. La estimulación distal de los axones con el factor neurotrófico NGF no solo inicia la endocitosis del complejo TrkA-NGF, sino que localmente activa las vías de señalización:

Erk1/Erk2, Erk5, PI3 Kinasa-Akt y la de PLC $\gamma$ . Sin embargo las formas activas de Erk (Extracellular-signal-regulated kinase, sus siglas en inglés) 1/2 no se detectan en los cuerpos neuronales después de la estimulación distal (Kamakura S. et al., 1999; Cavanaugh JE. et al., 2001; Watson FL. et al., 2001). Es posible que componentes activos de la vía de señalización de Erk5 sean transportados junto con el receptor TrkA activado en endosomas, hasta el cuerpo celular donde luego se traslocaría al núcleo y activaría programas transcripcionales específicos (Watson FL. et al., 2001). La actividad de la vía de PI3K es necesaria en los estadios tempranos del proceso de endocitosis y junto con la activación de Erk1/2 participan en el crecimiento axonal (Kuruville R. et al., 2000).

Todos éstos resultados indican que la ubicación subcelular donde ocurre la estimulación del receptor es clave en la respuesta neurotrófica (Novikova LN. et al., 2000).

Recientemente se ha logrado identificar algunos elementos del programa transcripcional inducido por NGF. Algunos de los genes identificados que son necesarios para la supervivencia y crecimiento axonal en respuesta a la neurotrofina incluyen a: CREB (cAMP response element-binding, sus siglas en inglés) (Watson FL. et al., 2001), SRF (Serum response factor, sus siglas en inglés) (Wickramasinghe SR. et al., 2009) y NFAT (Nuclear factor of activated T-cells, sus siglas en inglés) (Kim MS. et al., 2014), mientras otros como MEF2 (myoocyte-specific enhancer factor 2, sus siglas en inglés) (Pazyra-Murphy MF. et al., 2009) participan específicamente en las vías de señalización de supervivencia celular (Figura 8).

**Figura 8.** Neuronas sensoriales del DRG responden al factor trófico NGF liberado desde el tejido blanco. Luego de la activación de los receptores TrkA, el NGF se internaliza y juntos se transportan en endosomas que viajan retrógradamente hasta el soma neuronal. Existe una respuesta local en el axón distal que consta en la activación de la vía de PI3K, y las kinasa Erk1, -2 y -5, que intervienen en el crecimiento axonal. Los endosomas alcanzan el cuerpo neuronal, se activa la kinasa Erk5, se trasloca al núcleo y activa la expresión génica, que junto con la activación de la vía de PI3K participan en la supervivencia neuronal. Sin embargo, cuando el NGF actúa directamente sobre los receptores del cuerpo neuronal (no se muestra en la figura), la expresión génica está regulada por las kinasas clásicas Erk1 y Erk2, y por Erk5. Estas vías activan programas transcripcionales necesarios para la supervivencia neuronal, y crecimiento axonal que incluyen la inducción de: CREB (cAMP response element-binding, sus siglas en inglés), SRF (Serum response factor, sus siglas en inglés), MEF2 (myoocyte-specific enhancer factor 2) (adaptado de Harrington AW. y Ginty DD; 2013).



### Neurotrofinas y factores transcripcionales Pea3 en el desarrollo de DRG.

En el sistema nervioso periférico, los factores neurotróficos pueden inducir la expresión génica de los factores de transcripción de la subfamilia de ETS, Pea3, la cual comprende los tres miembros mencionados previamente: Etv1, Etv4 y Etv5. Diversas publicaciones postulan a los factores de transcripción Pea3 como efectores de la vía de señalización de MAPK (Yordy JS. y Muise-Helmericks RC., 2000; Oikawa T. y Yamada T., 2003; de Launoit Y. et al., 2006; Hollenhorst PC. et al., 2011). En particular, estos tres factores transcripcionales se expresan en diferentes subpoblaciones de las neuronas sensoriales del DRG a lo largo del desarrollo embrionario (Chotteau-Lelievre A. et al., 1997; Arber S. et al., 2000; Hagedorn L. et al., 2000; Paratore C. et al., 2002). Específicamente, Etv1 se expresa en neuronas propioceptivas (positivas para el receptor TrkC) en respuesta a NT3 y participa en la formación de la conexión sensorial propioceptiva-motora (Arber S. et al., 2000; Patel TD. et al., 2003). A diferencia de Etv1, la expresión de los otros dos miembros de la familia Pea3, no fue caracterizada aún en detalle. En cuanto a Etv4, se describió que se expresa en una subpoblación neuronal TrkC positiva, además de hacerlo en una población neuronal que aún no fue caracterizada (Arber S. et al., 2000) y la población de neuronas sensoriales del DRG que expresa Etv5 no se encuentra caracterizada aún. En éste primer capítulo de la tesis, mostramos que Etv4 y Etv5 se expresan en neuronas sensoriales que expresan

el receptor para el factor neurotrófico NGF, TrkA. Demostramos la participación de estos factores transcripcionales en la respuesta biológica inducida por este factor trófico en cuanto a la inervación nociceptiva.

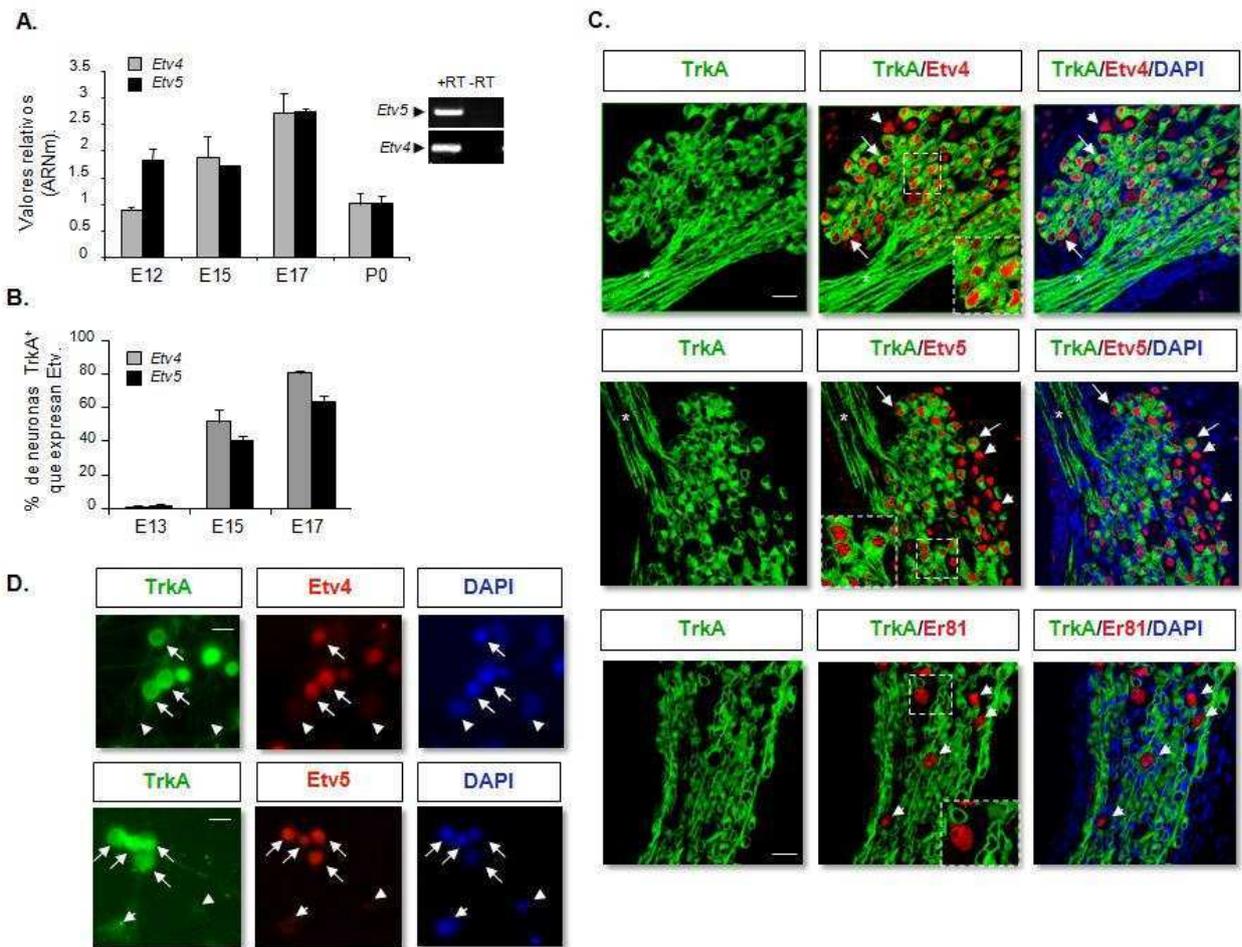
## **Ib. Resultados.**

### **Expresión de los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 durante el desarrollo del DRG.**

A pesar de que el rol del factor de transcripción Etv1 en el desarrollo del DRG ha sido ampliamente estudiado, nada se conoce sobre la función de Etv4 y Etv5 en estas neuronas sensoriales. Con el objetivo de elucidar el rol de estos factores en el desarrollo de estas neuronas, lo primero que nos planteamos fue estudiar la expresión del ARNm de Etv4 y Etv5 en el DRG por RT-PCR en tiempo real durante el desarrollo embrionario (Figura 9 A). Observamos un incremento de la expresión del ARNm de Etv4 y Etv5 entre el día embrionario (E) 15 y E17, período en el cual los axones de las neuronas sensoriales crecen en respuesta al NGF que está siendo producido por las células de los tejidos blanco durante el proceso de inervación periférica. Para determinar si estos factores de transcripción podrían mediar la señalización que el NGF induce al unirse al receptor TrkA, evaluamos el patrón de expresión de Etv4, Etv5 y TrkA en secciones coronales de DRG usando anticuerpos específicos. El análisis cuantitativo de la expresión de Etv4 y Etv5 en neuronas TrkA positivas puede observarse en el panel B de la figura 9. La coexpresión de Etv4 y Etv5 en neuronas positivas para TrkA no se observó en edades tempranas. En E13, se detectó expresión de Etv4 y Etv5 en células negativas para TrkA y positivas para el factor transcripcional Sox2, marcador de neuronas de la cresta neural migratorias (Wakamatsu Y. et al., 2000; datos no mostrados). A partir de E15, la expresión de Etv4 y Etv5 se observó en la mayoría de las neuronas que expresan TrkA (Figura 9 B y C). En E17 el  $80.7 \pm 1.5\%$  (promedio  $\pm$  SEM) de neuronas TrkA positivas expresaron Etv4 y el  $63.3 \pm 4.1\%$  Etv5. Observamos que la mayoría de las neuronas que expresan TrkA, co-expresan Etv4 y Etv5 ( $61.9 \pm 3.0\%$ ). La alta correlación entre la expresión de Etv4 y Etv5 en las neuronas TrkA positivas (80%), nos llevaron a proponer a ambos factores de transcripción como mediadores de la respuesta biológica inducida por NGF.

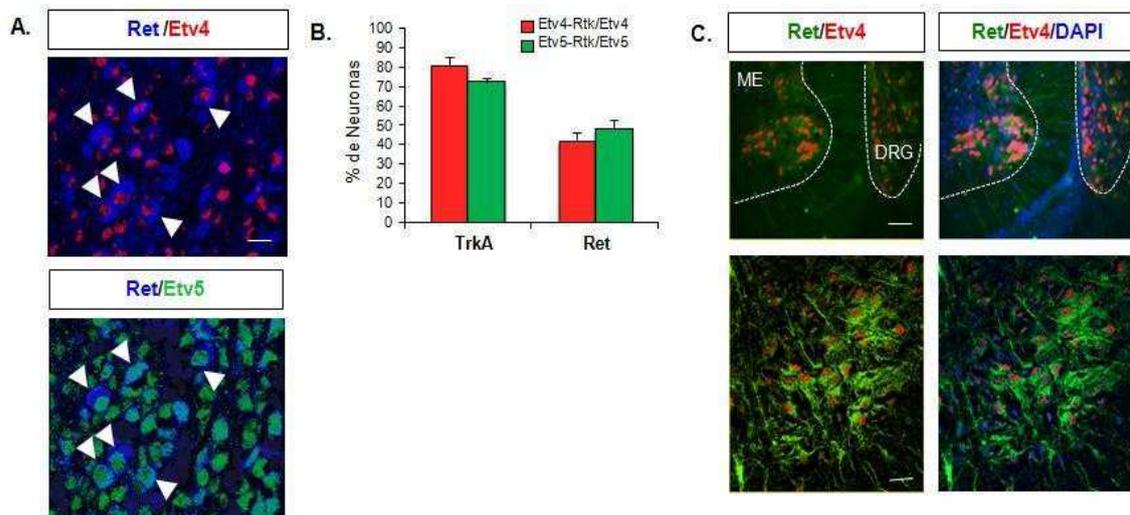
En el DRG, coexisten diferentes subpoblaciones neuronales que van adquiriendo su identidad a lo largo del desarrollo. A partir de E16 las neuronas TrkA dan origen a distintas poblaciones neuronales caracterizadas por la expresión o no del receptor de GDNF, el receptor tirosina kinasa Ret (Luo W. et al., 2007; Chen CL. et al.,

2006). Con el objeto de estudiar si la expresión de Etv4 y Etv5 se mantenía en esta población neuronal positiva para Ret analizamos la expresión de estos factores transcripcionales en estas células. Observamos que en E17 los dos factores transcripcionales analizados se expresaron en la mayoría de las neuronas Ret positivas (Figura 10) y un  $8.7\pm 1.1\%$  de neuronas Etv4 positivas y  $10.4\pm 2.3\%$  de neuronas Etv5 positivas, resultaron negativas para TrkA, Ret y S100 $\beta$  (marcador de células gliales, datos no mostrados). Como ha sido previamente descrito (Arber S. et al., 2000), también detectamos la co-expresión de Etv4 con Ret en motoneuronas del cordón espinal (Figura 10 C). De acuerdo con resultados previamente publicados, no se detectó expresión de estos dos factores en el núcleo de las células de Schwann que rodean las fibras nerviosas TrkA positivas (Paratore C. et al., 2002; Figura 9 C). La expresión de Etv1 fue evaluada en secciones coronales de DRG en E16. Como se observa en la figura 9 B, y de acuerdo con resultados previos, Etv1 no se expresa en neuronas positivas para el receptor de NGF, TrkA, pero sí en neuronas que presentan un cuerpo neuronal de mayor diámetro, que corresponden a neuronas TrkC positivas (neuronas propioceptivas). También analizamos la expresión de estos factores en cultivos primarios de neuronas disociadas derivadas del DRG de rata (E15). De acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo*, observamos que todas las neuronas TrkA positivas mostraron también expresión de Etv4 y Etv5 (Figura 9 D). La especificidad de los anticuerpos utilizados anti-Etv en las inmunotinciones en las secciones coronales y células disociadas, se evaluó por western blot (Figura 13 D). La expresión de Etv4 y Etv5 en neuronas sensoriales TrkA positivas, junto con los elevados niveles de expresión que muestran ambos factores transcripcionales en el periodo de inervación periférica guiada por NGF, sugirieron que Etv4 y Etv5 podrían estar mediando el crecimiento axonal y la inervación en respuesta al factor neurotrófico durante este período del desarrollo embrionario.



**Figura 9. Expresión y localización de Etv4 y Etv5 en neuronas sensoriales de DRG.** **A.** Análisis cuantitativo de la expresión de Etv4 y Etv5 en el DRG a diferentes estadios del desarrollo: E12, E15, E17 y neonatos (P0) por RT-PCR en tiempo real. El nivel de expresión (ARNm) de *Etv4* y *Etv5* a cada estadio se normalizó evaluando nivel de expresión del ARNm de la proteína *Tbp* (TATA binding protein), y los valores se expresaron como valores relativos a los niveles de expresión detectados a P0. Se muestran valores promedio  $\pm$  SD medidos por triplicado. En el margen superior derecho se muestran las bandas amplificadas por PCR a partir de ARNm de DRG correspondientes a *Etv4* y *Etv5*, también se incluyen los controles realizados en ausencia de la enzima transcriptasa reversa (-RT). **B.** Análisis cuantitativo de la co-expresión de Etv4 o Etv5, con *TrkA* durante el desarrollo, en secciones coronales de DRG lumbares. Se muestran valores del promedio  $\pm$  SEM. **C.** Inmunohistofluorescencia de los factores transcripcionales *Pea3* y *TrkA* en secciones coronales de DRG E16. Se muestran inmunotinciones de Etv4 (panel superior), Etv5 (panel medio) y Etv1 (panel inferior) en rojo y *TrkA* en verde. Se muestran imágenes en alta magnificación donde se observa la localización nuclear de los factores transcripcionales. Las flechas indican células individuales señalando la colocalización de Etv4-*TrkA* o Etv5-*TrkA*. Las puntas de flecha indican células expresando Etv4, Etv5 o Etv1 en ausencia de *TrkA*. El asterisco señala las fibras del ganglio sensorial positivas para *TrkA* y negativas

para Etv. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . **D.** Co-localización por inmunocitofluorescencia de Etv4 (panel superior) y Etv5 (panel inferior) con TrkA en neuronas sensoriales disociadas derivadas del DRG. Las flechas indican células positivas para Etv4 o Etv5 y TrkA. Las puntas de flecha indican células negativas para TrkA y diferentes Etv. Escala: 15  $\mu\text{m}$ .



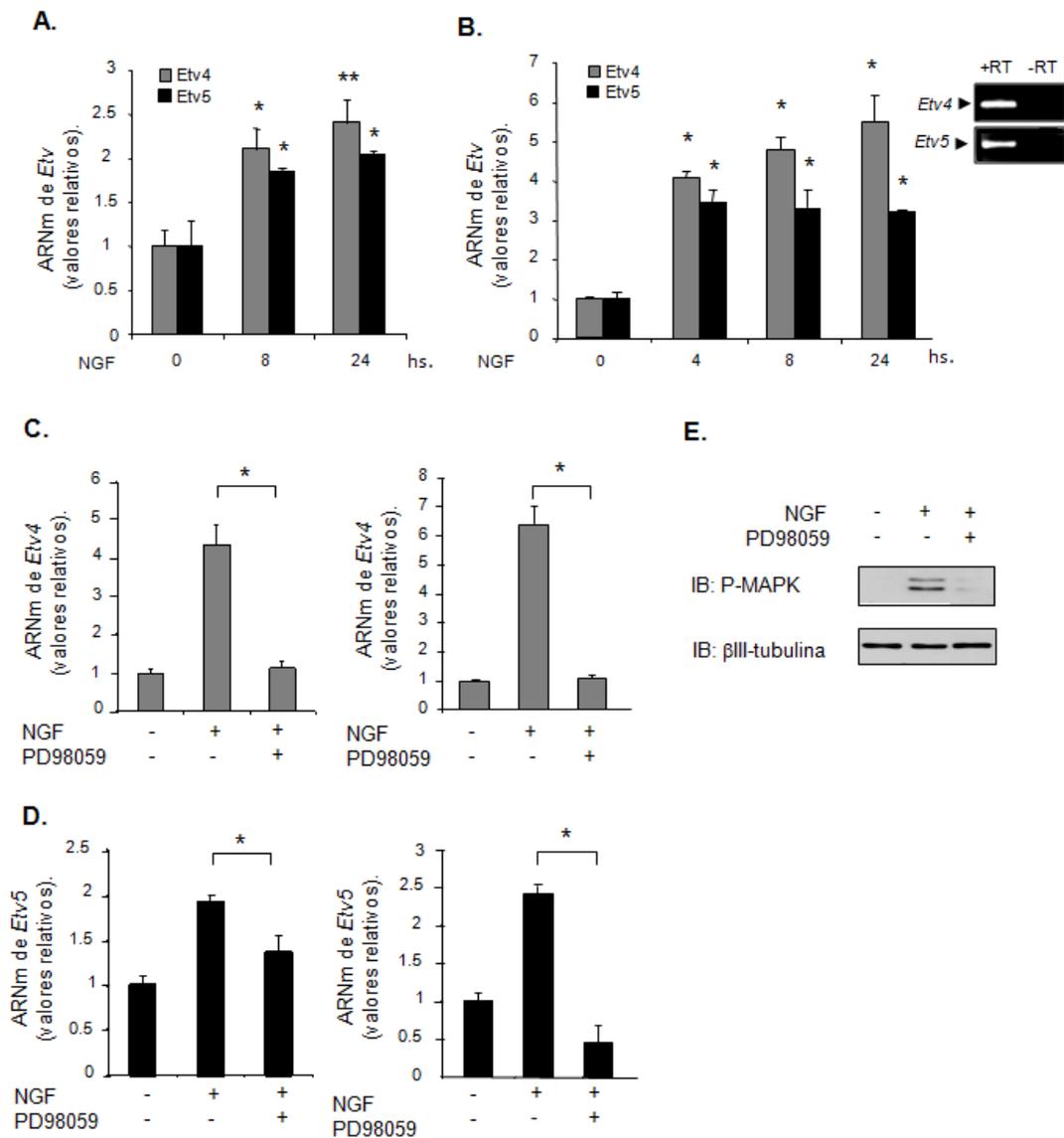
**Figura 10. Expresión de Etv4 y Etv5 en neuronas sensoriales de DRG que expresan Ret.** **A.** Co-localización por inmunocitofluorescencia de Etv4 (panel superior) y Etv5 (panel inferior) con Ret en neuronas sensoriales del DRG. Las puntas de flechas indican células individuales señalando la co-localización de Etv4-Ret o Etv5-Ret. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . **B.** Análisis cuantitativo de la co-expresión de Etv4 o Etv5, con los receptores TrkA o Ret en secciones coronales de DRG lumbares de día embrionario 17. Se muestran valores del promedio  $\pm$  SD. **C.** Inmunohistofluorescencia del factor transcripcional Etv4 y Ret en secciones coronales de DRG de E17. En el panel superior se muestran inmunotinciones de Etv4 en rojo, Ret en verde y DAPI en azul; en la médula espinal (ME, región ventral) y en los ganglios sensoriales (DRG). Se muestran imágenes en alta magnificación donde se observa la localización nuclear de Etv4 en neuronas motoras de la médula espinal. Escala: 60  $\mu\text{m}$  (panel superior) y 120  $\mu\text{m}$  (panel inferior).

### La vía de señalización de MAPK, activada por NGF, es necesaria para la inducción de Etv4 y Etv5.

Diversos trabajos describen genes, inducidos por la vía de señalización de NGF-TrkA, que se encuentran vinculados con la supervivencia y diferenciación neuronal, el crecimiento axonal e inervación cutánea de neuronas sensoriales (Chen L. et al., 1999; Huang EG. and Reichardt LF., 2001, 2003). Los factores de transcripción, Etv4 y Etv5 fueron descritos como reguladores de la expresión de numerosos genes relevantes en el crecimiento neuronal (Oikawa T. y Yamada T., 2003; de Launoit Y. et al., 2006; Hollenhorst PC. et al., 2011). Con el objetivo de estudiar si Etv4 y Etv5 son genes regulados por NGF, se estudió la expresión de éstos dos factores

de transcripción en respuesta a NGF a diferentes tiempos, en neuronas sensoriales derivadas de DRG y en la línea celular PC12, dos sistemas bien descritos para el estudio de la respuesta biológica inducida por ésta trofina. El análisis por RT-PCR en tiempo real, reveló una inducción significativa del ARNm de *Etv4* y *Etv5* en células PC12 y neuronas sensoriales, expuestas a NGF en comparación con la condición control (sin trofina) (Figura 11 A y B), indicando que la expresión de ambos factores de transcripción son regulados por NGF.

El factor neurotrófico NGF, unido a su receptor TrkA requiere para disparar su respuesta biológica, la activación de diferentes vías de señalización, entre las cuales se encuentran la vía de señalización de MAPK (Markus A. et al., 2002; Zhong J. et al., 2007). Por otra parte se sabe que los factores de transcripción de la familia Ets son efectores de esta vía de señalización (Wasylyk B. et al., 1998; Yordy JS. y Muise- Helmericks RC., 2000). Con el objetivo de determinar si la inducción de *Etv4* y *Etv5* dependiente de NGF involucra la activación de la vía de MAPK, células PC12 y neuronas disociadas derivadas del DRG fueron pre-tratadas con el inhibidor farmacológico de la vía de MAPK, PD98059 (50  $\mu$ M; Alessi DR. et al., 1995) y luego estimuladas con NGF. Los niveles de expresión de los ARNm de *Etv4* y *Etv5* fueron determinadas por RT-PCR en tiempo real y como puede verse en la Figura 11 (paneles C y D) la presencia del inhibidor de MAPK bloqueó la inducción de los ARNm de *Etv4* y *Etv5*, demostrando que la vía de señalización de MAPK es requerida para la inducción de éstos dos factores transcripcionales por NGF. La actividad del inhibidor de MAPK, el PD98059 fue evaluado midiendo la activación de MAPK por western blot de lisado total de células PC12 pre-tratadas o no 30 minutos antes con PD98059 y luego estimuladas con NGF durante 10 minutos (Figura 11 E).

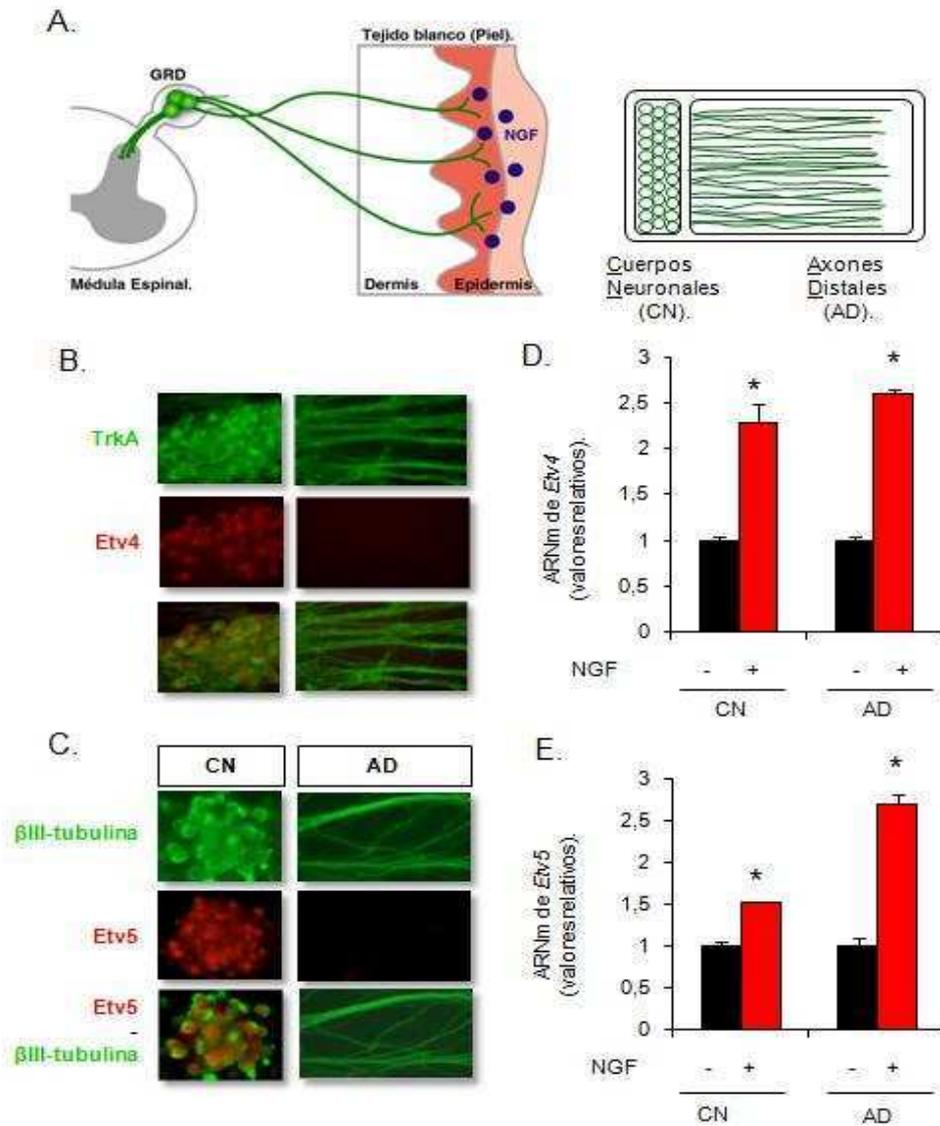


**Figura 11. Etv4 y Etv5 son inducidos por NGF en neuronas sensoriales.** Análisis de expresión del ARNm de *Etv4* y *Etv5* por RT-PCR en tiempo real en neuronas sensoriales derivadas de DRG (A) y en células PC12 (B) tratadas con NGF (50 ng/ml) a los tiempos indicados. Los niveles de ARNm de *Etv4* y *Etv5* fueron normalizados evaluando el nivel de expresión del ARNm de la proteína *Tbp*. Se muestran promedio  $\pm$  SD de triplicados. A, \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ; B, \* $p < 0.001$ , grupo de tratadas con NGF vs. grupo control (sin trofina) (ANOVA, seguido de un post test de Dunnett). B. El inserto en el margen superior derecho del panel, muestra el análisis de la expresión del ARNm de *Etv4* y *Etv5* por PCR en células PC12. Análisis de la expresión del ARNm de *Etv4* (C) y *Etv5* (D) por RT-PCR en tiempo real, en neuronas sensoriales derivadas de DRG (izquierda) y en células PC12 (derecha) tratadas primero con el inhibidor PD98059 (50  $\mu$ M) por 30 minutos y luego estimuladas con NGF (50 ng/ml) durante 8hs. Los niveles de ARNm de *Etv4* y *Etv5* fueron normalizados evaluando el nivel de expresión del ARNm de la proteína *Tbp*. Se muestran promedio  $\pm$  SD de triplicados. \* $p < 0.01$  (ANOVA, seguido de un post test Student–Neuman–Keuls). E. La inhibición de la vía de señalización de MAPK por el PD98059 fue testada midiendo la activación

de MAPK (pMAPK, MAPK fosforilada) por western blot de células PC12 estimuladas con NGF (50ng/ml). El control de carga se realizó con anticuerpo primario anti- $\beta$ tubulina.

### **La estimulación distal con NGF induce la expresión de los factores de transcripción, Etv4 y Etv5.**

Durante el desarrollo, las neuronas sensoriales proyectan sus axones a largas distancias e inervan el tejido blanco. El factor neurotrófico NGF es liberado desde la periferia y es requerido para la supervivencia y el crecimiento neuronal de poblaciones específicas de neuronas sensoriales de DRG que expresan el receptor TrkA. El mecanismo por el cual la señal disparada por NGF en el terminal nervioso viaja retrógradamente hacia el cuerpo neuronal ha sido extensamente estudiada (Zweifel LS. et al, 2005). Diversos experimentos realizados en los últimos años, han demostrado que el transporte retrógrado de la señal disparada por NGF es requerida para la transcripción génica, la respuesta de supervivencia, el crecimiento axonal y la conectividad (Riccio A. et al., 1997; Ginty DD. y Segal RA., 2002; Ye H. et al., 2003; Harrington AW. and Ginty DD., 2013). Con el fin de determinar si Etv4 y Etv5 pueden ser inducidos por la activación distal del receptor TrkA, realizamos cultivos compartimentalizados de neuronas sensoriales derivadas de DRG (E14.5) (Figura 12 A). Luego de inducir el crecimiento de las neuritas, los compartimentos de los cuerpos neuronales (CN, cuerpos neuronales) o de los axones (AD, axones distales) fueron estimulados con NGF (50ng/ml) durante 8 hs y los niveles de ARNm de Etv4 y Etv5 se midieron por RT-PCR en tiempo real. Nuestros resultados demostraron que el ARNm de Etv4 como Etv5 se inducen tanto cuando la estimulación ocurre en los cuerpos neuronales como cuando el estímulo es aplicado distalmente, indicando que el transporte retrógrado de la señal disparada por NGF es suficiente para la inducción de los factores de transcripción Etv4 y Etv5 (Figura 12). Estos resultados sugieren que ambos genes podrían estar desempeñando un rol en la inervación periférica guiada por NGF. La subpoblación de neuronas sensoriales encargadas de la nocicepción, expresan TrkA y dependen del NGF secretado desde el órgano blanco para la supervivencia y para el crecimiento de sus axones, por lo que este resultado indica que Etv4 y Etv5 serían mediadores críticos de la respuesta transcripcional disparada por NGF en el crecimiento axonal.



**Figure 12. La expresión de Etv4 y de Etv5 es regulada distalmente por NGF.** A. Esquema representativo de las neuronas sensoriales ubicados en el DRG y sus proyecciones hacia la periferia (por ejemplo la inervación dérmica) y la médula espinal. A la derecha se muestra el dispositivo usado en los cultivos compartimentalizados de neuronas sensoriales derivadas de DRG mostrando los compartimentos de los cuerpos neuronales (CN) y de los axones distales (AD). B, C. Inmunotinciones de neuronas sensoriales en los cultivos compartimentalizados, mantenidos durante 7 días en presencia de NGF (100ng/ml), con anticuerpos primarios anti-Etv4 (rojo, panel B) o anti-TrkA (verde, panel B) o anti-βIII-tubulina (verde, panel C). Nótese que la tinción para los Etv solo es positiva para el compartimento de los cuerpos neuronales. D, E. Análisis de la expresión del ARNm de *Etv4* (D) y *Etv5* (E) por RT-PCR en tiempo real, luego de la estimulación con NGF (100ng/ml) en CN o AD. Los cultivos compartimentalizados de neuronas sensoriales de 7 días *in vitro*, fueron mantenidos durante 16hs en medio F12 : DMEM (1:1) en ambos compartimentos y posteriormente estimulados con NGF (100ng/ml) en el compartimento AD o el CN durante 8hs. El ARN total fue extraído del compartimento CN y la expresión de *Etv4* y *Etv5* fue analizada por RT-PCR en tiempo real. Los niveles del ARNm de *Etv4* y *Etv5* fueron

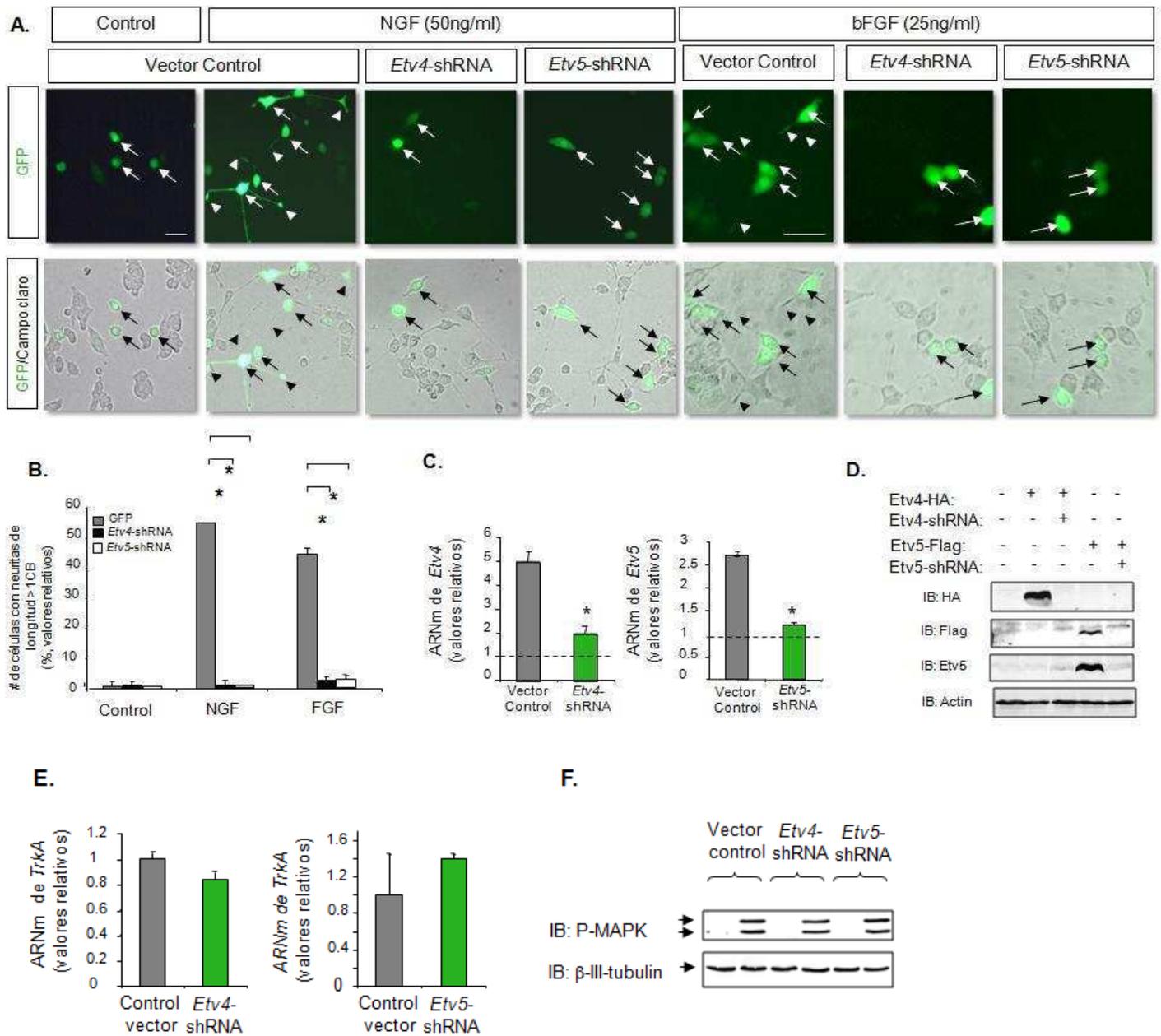
normalizados evaluando el nivel de expresión del ARNm de la proteína *Tbp*. Se muestran los valores promedio  $\pm$  SD de triplicados. **D**, CN: \* $p < 0.001$  (test de Student,  $t=10.55$ ); AD: \* $p < 0.001$  (test de Student,  $t=36.33$ ); **E**, CN: \* $p < 0.001$  (test de Student,  $t=16.45$ ); AD: \* $p < 0.001$  (test de Student,  $t=22.9$ ).

### **Etv4 y Etv5 son independientemente requeridos para el crecimiento neurítico inducido por NGF.**

Está ampliamente demostrado en la literatura que el crecimiento axonal mediado por NGF en neuronas sensoriales requiere de la activación de la vía de señalización de MAPK. Con el objeto de estudiar si Etv4 y/o Etv5 participan en la diferenciación celular inducida por NGF, células PC12 fueron transfectadas en forma transiente con diferentes vectores que contienen secuencias que interfieren la expresión de los respectivos ARNm (ARNsh) y la secuencia codificante para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP, green fluorescent protein). Estas células, transfectadas con los vectores de Etv4-ARNsh, Etv5-ARNsh o con el vector control que también contiene la secuencia fluorescente GFP, fueron mantenidas en ausencia o en presencia de NGF (50ng/ml) durante 72 horas y luego se cuantificó el crecimiento de procesos neuríticos. En presencia de NGF, las células transfectadas con el plásmido control desarrollaron neuritas; a diferencia de las células transfectadas con uno u otro del los Etv-ARNsh. Las células en las que la expresión de Etv4 o Etv5 fue suprimida, no se observó crecimiento neurítico alguno (Figura 13 A, B), sugiriendo que estos dos factores mediarían los efectos de crecimiento inducidos por NGF. No se observó muerte celular en células transfectadas con los Etv-ARNsh. La confirmación de que cada Etv-ARNsh efectivamente suprime la expresión de los genes *Etv4* o *Etv5* en las células PC12 se evaluó por RT-PCR en tiempo real (Figura 13 C). La eficiencia de los ARNsh utilizados, en reducir la expresión de los respectivos Ets también se evaluó en células COS (línea celular derivada de riñón de mono del tipo fibroblástico) co-transfectadas con plásmidos que codifican para Etv4 fusionada a la secuencia de Hemaglutinina (Etv4-HA) o Etv5 fusionada a la secuencia "etiqueta" Flag (Etv5-Flag) junto a los plásmidos que llevaban los respectivos ARNsh (Figura 13 D).

Dado que ambos factores de transcripción fueron descritos como mediadores de las vías de señalización activadas por los diferentes factores de crecimiento fibroblástico en el desarrollo (FGF, fibroblast growth factor sus siglas en inglés) (Mao J. et al., 2009; Zhang Z. et al., 2009; Znosko WA. et al., 2010), evaluamos si Etv4 y Etv5 también eran requeridos para la diferenciación morfológica que induce FGF (en particular bFGF,

basic fibroblast growth factor sus siglas en inglés) en las células PC12. Observamos que en presencia de los Etv-ARNsh la diferenciación morfológica inducida por FGF en estas células, al igual que la inducida por NGF se anula por completo (Figura 13 B). La completa anulación de la diferenciación morfológica inducida por NGF en células PC12 cuando Etv4 o Etv5 están ausentes, nos llevó a preguntarnos si estos factores de transcripción podrían estar regulando los niveles de expresión del receptor para el factor neurotrófico NGF, TrkA o las señales que se encuentran río abajo del mismo, como la vía de señalización de MAPK. Para ello, analizamos la expresión del ARNm del receptor *TrkA* por RT-PCR en tiempo real y la activación de la vía de MAPK por western blot en células transfectadas con los vectores Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh y estimuladas con NGF (50 ng/ml). Para ello, las células PC12 transfectadas para tal fin fueron seleccionadas con el antibiótico puromicina (5 µg/ml), para aumentar la población de células PC12 que hayan incorporado el vector Etv-ARNsh correspondiente. Al ser analizadas, no se observaron diferencias en los niveles del ARNm del receptor *TrkA* (Figura 13 E), y niveles similares se observaron en la activación de la vía de MAPK (pMAPK) en células transfectadas con los distintos Etv-ARNsh en comparación con el grupo control (Figura 13 F), indicando que la anulación de la diferenciación morfológica que se observa en ausencia de los factores de transcripción, Etv4 y Etv5, no se debe a la alteración en los niveles de expresión del receptor TrkA, ni a los niveles de activación de la vía de MAPK. Estos resultados indicaron que Etv4 y Etv5 son factores de transcripción necesarios en la respuesta biológica mediada por NGF, pero el mecanismo no sería por regulación de la activación de la vía de TrkA-MAPK.



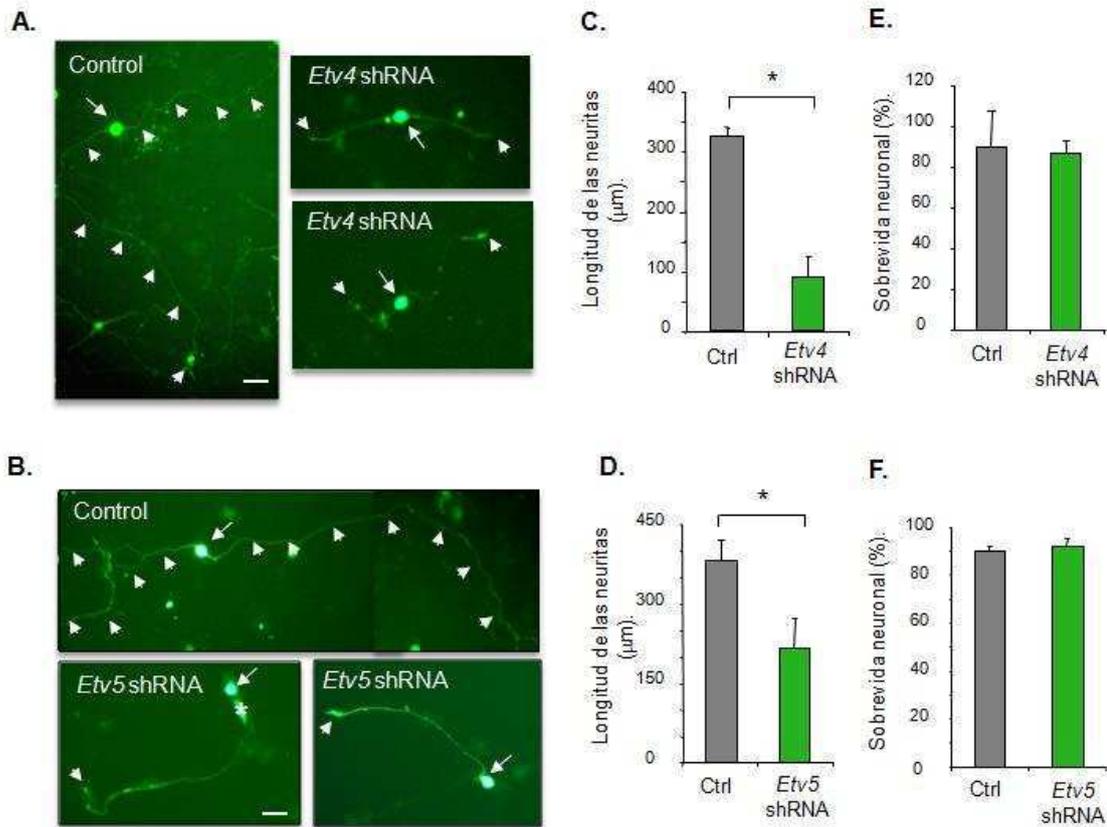
**Figura 13. *Etv4* y *Etv5* son independientemente requeridos en la diferenciación neuronal mediada por NGF.** **A.** Imágenes representativas de células PC12 transfectadas con el vector de expresión control, *Etv4*-ARNsh o *Etv5*-ARNsh que expresan la proteína fluorescente GFP. Después de 72hs de tratamiento con NGF (50ng/ml) o bFGF (25ng/ml) las células fueron fijadas y analizadas. Las flechas indican los cuerpos neuronales y las puntas de flecha indican las terminales neuríticas. Escala: 20  $\mu$ m. **B.** El histograma muestra la cuantificación del número relativo de células GFP positivas con neuritas con una longitud mayor a la de un cuerpo celular y medio, luego de un tratamiento de 72hs con NGF o bFGF. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  SD de un experimento representativo. \* $p < 0.001$  (ANOVA, seguido de un post test Student Newman-Keuls). El experimento fue realizado por triplicado con resultados similares. **C.** Los niveles del ARNm de *Etv4* y *Etv5* fueron analizados por RT-PCR en tiempo real de células PC12 transfectadas con el vector control, *Etv4*-ARNsh o *Etv5*-ARNsh que expresan GFP. Las células transfectadas fueron

seleccionadas con puromicina (5 ug/ml) para enriquecer la población de células que contengan los vectores Etv-ARNsh. Las células fueron mantenidas en condiciones control (sin factor neurotrófico) o estimuladas con NGF (50ng/ml) durante 8 horas. El histograma muestra las diferencias relativas a la condición control (células no tratadas, línea punteada). El análisis cuantitativo se muestra como promedio  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  (test de Student). **D.** Los niveles proteicos de Etv4 y Etv5 fueron analizados por western blot en células COS transfectadas solo con los vectores codificantes para Etv4-HA, Etv5-Flag o junto con los que contienen las secuencias Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh. La reducción en la expresión de Etv4 o Etv5, fue evaluada usando anticuerpos anti-HA o anti-Etv4 y anti-Flag o anti-Etv5. El control de carga se realizó con anticuerpo anti-actina. **E.** Los niveles del ARNm del receptor *TrkA* fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real de células PC12 transfectadas con el vector control, o los vectores que contienen Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh. El análisis cuantitativo se muestra como el promedio  $\pm$  SD de triplicados. Los niveles de los ARNm de *Etv4*, *Etv5* y *TrkA* fueron normalizados usando la expresión del ARNm de *Tbp*. **F.** La activación de la vía de señalización de MAPK (pMAPK, MAPK fosforilada) se evaluó en lisados totales de células PC12 transfectadas con Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh tratadas con NGF (50ng/ml) durante 10 minutos y luego detectados por western blot. El control de carga se realizó en la misma membrana con el anticuerpo primario anti- $\beta$ tubulina.

### **Etv4 y Etv5 participan en el crecimiento axonal de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal en respuesta a NGF.**

Los resultados obtenidos en células PC12 nos llevaron a estudiar el significado fisiológico de los factores de transcripción, Etv4 y Etv5 como mediadores de la respuesta biológica inducido por NGF. Para ello, introdujimos los vectores con las secuencias Etv-ARNsh en neuronas sensoriales disociadas obtenidas a partir de DRG de E15 ya que en este período del desarrollo del ganglio de la raíz dorsal, la mayoría de las neuronas expresan altos niveles del receptor para NGF, *TrkA*. Luego de la transfección, las neuronas fueron mantenidas en presencia de NGF durante 36 horas, se fijaron y se cuantificó el crecimiento neurítico. De acuerdo con los resultados obtenidos en células PC12, el crecimiento neurítico inducido por NGF se vio significativamente reducido en presencia de los distintos Etv-ARNsh. Mientras que la reducción de la expresión de Etv5 llevó a una disminución significativa del crecimiento neurítico, la reducción en la expresión de Etv4 tuvo un efecto más drástico aún (Figura 14). Para descartar la posibilidad de que los efectos observados se deban a muerte celular, se evaluó la morfología nuclear por tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Las sobrevividas neuronales fueron similares en las neuronas transfectadas con los vectores Etv-ARNsh o con el vector control (Figura

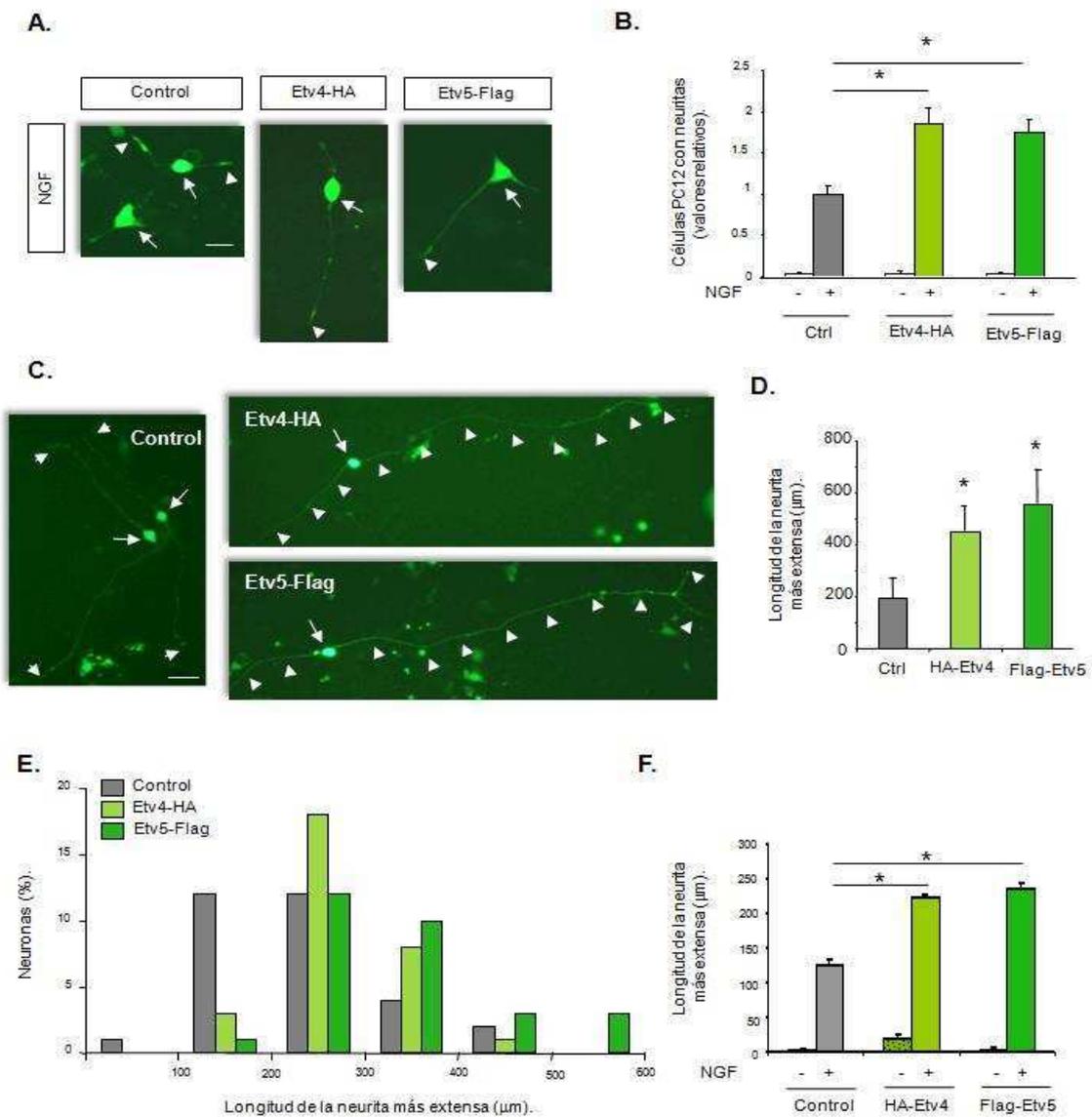
14 E y F). Nuestros resultados muestran que *Etv4* y *Etv5* son requeridos en el crecimiento axonal mediado por NGF.



**Figura 14. *Etv4* y *Etv5* median el crecimiento axonal inducido por NGF en neuronas sensoriales.** Neuronas sensoriales disociadas transfectadas con el vector control GFP, o vectores que contienen las secuencias *Etv4*-ARNsh (A) o *Etv5*-ARNsh (B) en presencia de NGF (50ng/ml). Luego de 36hs en cultivo, las neuronas fueron fijadas y analizadas. Escala: 20 µm. Las flechas indican los cuerpos neuronales, y las puntas de flecha señalan el recorrido y los extremos de las neuritas. El histograma muestra la inhibición del crecimiento neurítico de las neuronas sensoriales con la expresión de *Etv4* (C) o *Etv5* (D) reducida. Se cuantificó la longitud de la neurita más larga. Los resultados se muestran como el promedio ± SD de un experimento representativo. C, \*p=0.0135 (test de Student, t=4.2); D, \*p=0.0003 (test de Student, t=11.6). Los histogramas muestran la sobrevida de las neuronas sensoriales transfectadas con los vectores control, *Etv4*-ARNsh (E) o *Etv5*-ARNsh (F). La sobrevida neuronal fue evaluada usando la coloración nuclear de DAPI. Las neuronas GFP positivas con morfología nuclear fragmentada fueron consideradas apoptóticas. Los resultados se muestran como promedio ± SD de un experimento representativo, realizado por triplicado.

**La sobreexpresión de *Etv4* o *Etv5* potencia el crecimiento neurítico inducido por NGF.**

Dado que nuestros resultados indican que la reducción en la expresión de Etv4 o Etv5 limita el crecimiento neurítico inducido por NGF, nos preguntamos si la sobreexpresión de estos factores transcripcionales en forma independiente sería suficiente para promover el crecimiento neurítico. Para ello, las células PC12 fueron transfectadas con el vector control, o vectores que contienen las secuencias codificantes para Etv4-HA o Etv5-Flag en combinación con un vector que expresa la proteína GFP y luego mantenidas por 72 horas con o sin NGF en el medio, y posteriormente analizamos el crecimiento neurítico. De acuerdo con el rol de Etv4 y Etv5 como mediadores de la vía de señalización río abajo del receptor TrkA, se observó una significativa potenciación de la diferenciación en células PC12 que sobreexpresan Etv4 o Etv5 por sobre las control, sólo en presencia del factor neurotrófico. (Figura 15 A y B). Los mismos efectos se observaron cuando Etv4 o Etv5 fueron sobreexpresados en neuronas sensoriales derivadas de DRG (Figura 15 C-E). Debido a la dependencia del NGF para la sobrevivencia que presentan las neuronas sensoriales derivadas del DRG (aquella subpoblación positivas para el receptor TrkA), realizamos los mismos ensayos en presencia del inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK (50 nM), y los resultados indicaron que el efecto de Etv4 y Etv5 es independiente de la sobrevivencia neuronal (Figura 15 F). Los resultados anteriormente mencionados, demostraron que la sobreexpresión de Etv4 o de Etv5 potencia el crecimiento neurítico inducido por NGF. Sin embargo tanto los experimentos realizados en la línea celular PC12 como en cultivos primarios de neuronas sensoriales, indicaron que la sobreexpresión de Etv4 o Etv5 no es suficiente para inducir crecimiento neurítico en ausencia del factor neurotrófico, NGF (Figura 15 B y F). Sólo la sobreexpresión de Etv4 en neuronas sensoriales reveló un aumento, pero no significativo, en el crecimiento neurítico en ausencia de NGF (Figura 15 F). Estos resultados sugieren que modificaciones post-trasduccionales o la síntesis de otros componentes transcripcionales inducidos por la trofina serían necesarias para la diferenciación morfológica mediada por NGF.



**Figura 15. La sobreexpresión de Etv4 o Etv5 potencia la diferenciación inducida por NGF tanto en células PC12 como en neuronas sensoriales. A.** Imágenes representativas de células PC12 transfectadas con el vector control, Etv4-HA o Etv5-Flag junto con el vector que expresa la proteína GFP. Luego de 72 horas de tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células fueron fijadas. Las flechas indican los cuerpos celulares mientras que las puntas de flecha indican los extremos de las neuritas. Escala: 15 μm. **B.** El histograma muestra la cuantificación del número relativo de células GFP positivas con neuritas de longitud mayor a al diámetro de un cuerpo celular en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se muestran como promedio ± SD de un experimento representativo que se realizó por triplicado obteniendo resultados similares. \* $p < 0.01$  (ANOVA, seguido de un test Student–Newman–Keuls). **C.** Imágenes representativas de neuronas sensoriales transfectadas con el vector control, Etv4-HA o Etv5-Flag junto con el vector que expresa la proteína GFP. Luego de 24 horas mantenidas en medio con NGF (50ng/ml), las neuronas fueron fijadas y analizadas. Las flechas indican los cuerpos neuronales mientras que las puntas de flecha indican el recorrido y terminales de las neuritas. **D.** El histograma muestra la cuantificación de la longitud de la neurita más larga. Los resultados se muestran como promedio ± SD de un experimento representativo que se realizó por triplicado obteniendo resultados similares. \* $p < 0.01$  (ANOVA, seguido de un test de Dunnet). **E.** El

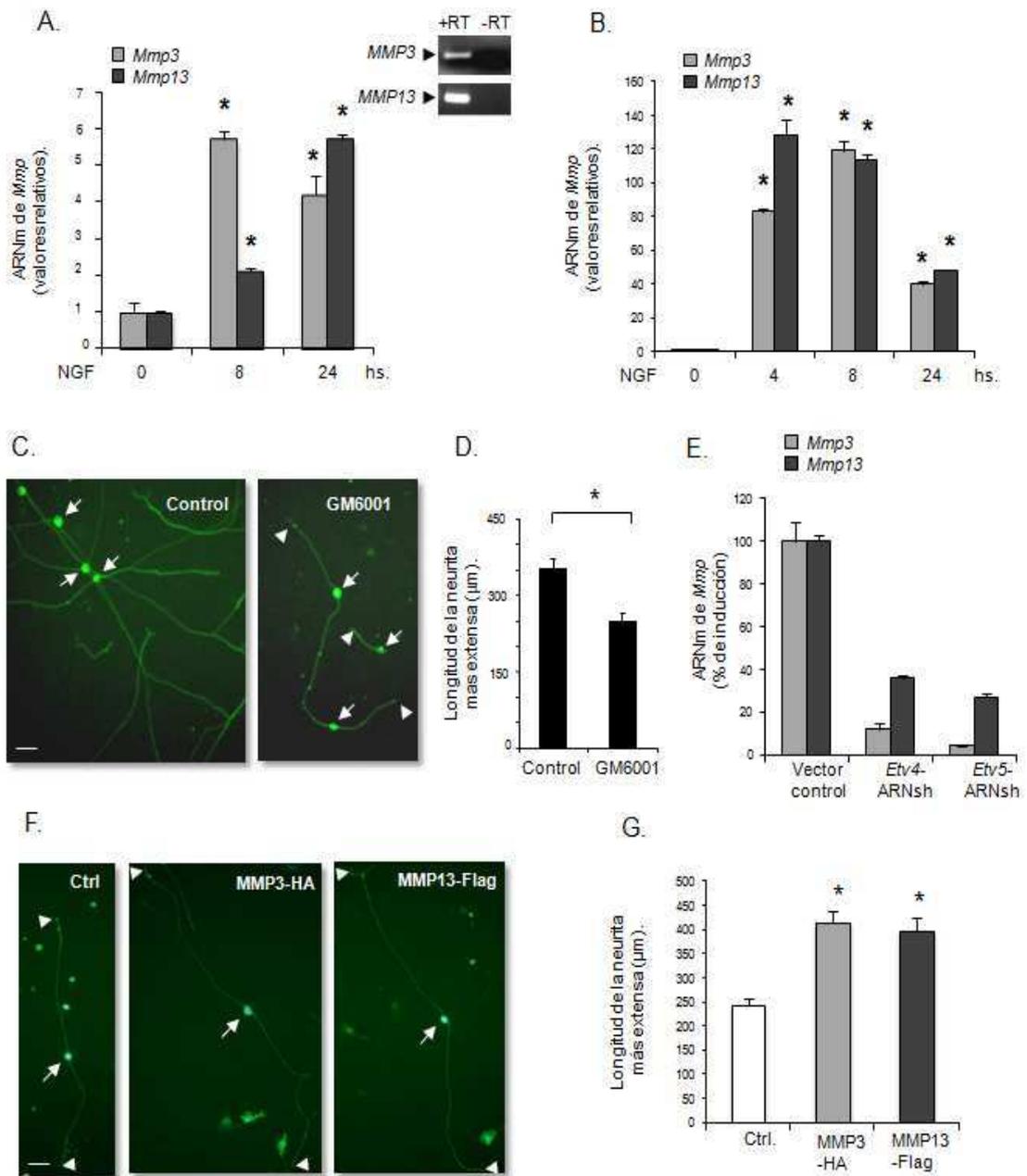
histograma muestra la distribución de neuronas clasificadas según la longitud de la neurita más extensa luego de la transfección con el vector control, Etv4-HA o Etv5-Flag junto con el vector de GFP. F. El histograma muestra la cuantificación de neuronas sensoriales sobre-expresando Etv4 o Etv5 junto con la proteína GFP, cultivadas en presencia del inhibidor apoptótico Z-VAD-FMK (50 nM). Las neuronas se mantuvieron como se indica, en ausencia o presencia del factor neurotrófico durante 24 hs y luego fueron fijadas. Se cuantificó la longitud de la neurita más extensa. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  SEM de un experimento representativo, que se realizó por triplicado. \* $p < 0.001$  Etv4-HA y Etv5-Flag vs control en presencia de NGF (ANOVA, seguido de un test de Student–Newman–Keuls).

### **Etv4 y Etv5 median la expresión inducida por NGF, de las metaloproteasas MMP3 y MMP13.**

Los factores de transcripción de la familia Ets regulan la expresión de diversos genes, para lo cual requieren de una amplia variedad de interactores y cofactores (Hollenhorst PC. et al., 2011). Entre los genes que fueron descritos como regulados por los factores de transcripción de la subfamilia Pea3, se encuentran varios miembros de la familia de las metaloproteasas de matriz celular, por ejemplo MMP3, MMP10 y MMP13, las cuales están implicadas en la remodelación de la matriz extracelular que ocurre durante el desarrollo normal y puede verse exacerbado en condiciones patológicas (Page-McCaw A. et al., 2007). En particular, MMP3 (también llamada estromelisina-1) es inducida por NGF y ha sido descrita como mediadora del crecimiento axonal y la invasividad del cono axonal a través de la matriz extracelular (Nordstrom LA. et al., 1995). Nuestros resultados mostraron una inducción significativa de los niveles de MMP3 y MMP13 (también llamada colagenasa 3) en células PC12 y neuronas sensoriales del DRG en respuesta al factor neurotrófico, NGF (Figura 16 A, B). El crecimiento neurítico inducido por esta trofina, tanto en células PC12 como en neuronas sensoriales (Figura 16 C, D) se vió bloqueado en presencia del inhibidor general (de amplio espectro) de metaloproteasas, GM6001. Dado que en las regiones regulatorias promotoras de los genes de MMP3 y MMP13, existen secuencias conservadas de unión para los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 (Yan C. y Boyd DD., 2007), decidimos estudiar si la expresión de Etv4 y Etv5 inducida por NGF, podría mediar la expresión de estas MMPs. Para este fin, se midieron los niveles de expresión de *Mmp3* y *Mmp13* por RT-PCR en tiempo real, en la línea celular PC12 transfectadas con los vectores que contienen las secuencias Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh, seleccionadas con puromicina (5 ug/ml) para incrementar la población de células que estén expresando los Etv-ARNsh y luego tratadas con NGF (50ng/ml). Como se muestra en la Figura 16 panel

E, observamos una disminución significativa en los niveles de ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* en respuesta a la estimulación con NGF, cuando la expresión de Etv4 o Etv5 fue interferida. Estos resultados indicaron que estos factores de transcripción median la inducción de la expresión de las metaloproteasas, MMP3 y MMP13, en la respuesta biológica inducida por NGF. De acuerdo con estos resultados, ensayos de ganancia de función, transfectando neuronas sensoriales con plásmido control, o plásmidos que contienen las secuencias codificantes para MMP3-HA o MMP13-Flag junto con el vector de expresión de la proteína GFP, evidenciaron una potenciación de la diferenciación morfológica inducida por NGF (Figura 16 F y G). En conjunto, estos resultados indicaron que Etv4 y Etv5 serían mediadores de la expresión de MMP3 y MMP13, dos metaloproteasas involucradas en el crecimiento neurítico inducida por NGF.

**Figura 16. Etv4 y Etv5 median la expresión de MMP3 y MMP13 inducida por NGF.** Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* por RT-PCR en tiempo real, en neuronas sensoriales (A) y células PC12 (B) en presencia de NGF (50ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de los ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* fueron normalizados respecto de los niveles del ARNm del gen *Tbp*. Lo que se muestran son valores promedio  $\pm$  SD evaluados por triplicado. \* $p < 0.001$  tratamiento con NGF versus el grupo control (no estimulado) (ANOVA, seguido por un test de Dunnett). **A.** En el panel superior se muestra el control sin transcriptasa reversa (-RT). **C.** Imágenes representativas de neuronas sensoriales mantenidas en presencia de NGF, en presencia o no del inhibidor GM6001 (2.5  $\mu$ M) durante 36 horas. Escala: 30  $\mu$ m. **D.** Cuantificación del crecimiento neurítico observado en C. \* $p < 0.0001$  (Test de Student,  $t = 14.78$ ). **E.** Los niveles del ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* fueron analizados por RT-PCR en tiempo real, de células PC12 transfectadas con el vector control, o vectores que contienen las secuencias Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh seguido de un tratamiento con NGF (50 ng/ml) durante 8 horas. Los niveles de los ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* fueron normalizados relativos a los niveles del ARNm de *Tbp*. Las células transfectadas fueron enriquecidas con puromicina (5  $\mu$ g/ml). El porcentaje de inducción por NGF del ARNm de *Mmp3* y *Mmp13* relativo a la condición sin tratar con NGF, es indicado para cada grupo experimental. **F.** Imágenes que muestran neuronas sensoriales transfectadas con los vectores control, o los que codifican para MMP3-HA o MMP13-Flag junto con el vector de expresión de la proteína GFP. Luego de 24 horas de tratamiento con NGF (50 ng/ml) en el medio, las células fueron fijadas. Escala: 30  $\mu$ m. Las flechas indican los cuerpos neuronales mientras que las puntas de flecha indican los terminales neuríticos. **G.** El histograma muestra la cuantificación de la longitud de la neurita más extensa. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  SEM de un experimento representativo, realizado por triplicado. \* $p < 0.005$  (ANOVA, seguido de un test de Dunnett).



**El factor de transcripción Etv4 es requerido para la extensión y ramificación de las proyecciones periféricas de las neuronas sensoriales TrKA positivas.**

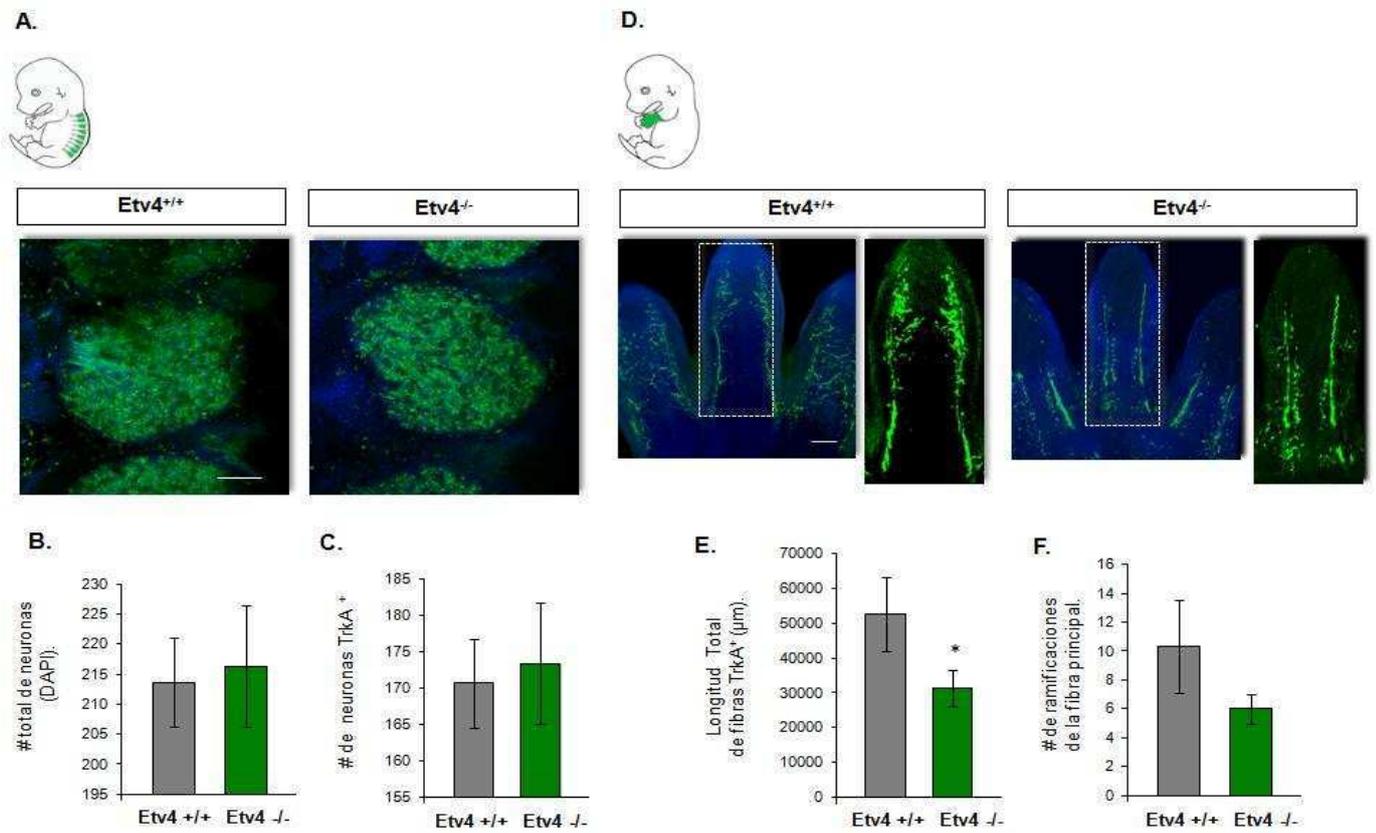
Con el objeto de analizar el rol fisiológico de los factores transcripcionales Pea3, comenzamos con el estudio de ratones deficientes en uno de ellos, Etv4 (Livet J et al., 2002).

El análisis realizado de los ratones deficientes en Etv4 indicó que este factor transcripcional no sería requerido para la supervivencia de las neuronas sensoriales del DRG ya que no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los DRG de los ratones mutantes (Etv4<sup>-/-</sup>) comparado con los ratones control (Etv4<sup>+/+</sup>) (Figura 17). El

conteo del número de neuronas total en estos ganglios, utilizando una tinción nuclear como DAPI, no reveló diferencias significativas entre los animales mutantes y los controles ( $216.3 \pm 10$  vs.  $213.7 \pm 7.5$ , respectivamente). Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de neuronas TrkA positivas en los DRG evaluados ( $173.3 \pm 8.3$  vs.  $170.7 \pm 6.1$ , respectivamente). Basados en los resultados que obtuvimos en ensayos *in vitro* en los que observamos una reducción del crecimiento neurítico de las neuronas sensoriales en respuesta a NGF en ausencia de Etv4, decidimos estudiar la inervación sensorial de las neuronas TrkA<sup>+</sup> en los animales Etv4<sup>-/-</sup>. Para ello realizamos ensayos de inmunohistofluorescencia utilizando anticuerpos anti-TrkA sobre secciones obtenidas de ratones control (Etv4<sup>+/+</sup>) y ratones mutantes (Etv4<sup>-/-</sup>) a estadios tempranos del desarrollo (E14.5). A partir de imágenes obtenidas en microscopio confocal se observó una reducción, en la complejidad de nervios sensoriales TrkA<sup>+</sup> tanto miembros anteriores como posteriores. Específicamente analizamos los miembros anteriores y observamos que mientras los principales haces de axones sensoriales que inervan las extremidades anteriores de los ratones controles se extienden hasta los extremos de los dígitos de estos embriones, los ratones deficientes en Etv4 reflejaron una inervación reducida, ( $52426 \pm 10644 \mu\text{m}$  vs.  $31340 \pm 5150 \mu\text{m}$ ) y un menor desarrollo de ramificaciones terminales con respecto a los animales control ( $10 \pm 3$  vs.  $6 \pm 1$  unidades). Estos resultados indicarían que éste factor transcripcional podría participar en la extensión y ramificación de las proyecciones periféricas de las neuronas sensoriales TrkA<sup>+</sup> del DRG *in vivo*, sin embargo es necesario el análisis de un número mayor de animales para poder obtener un resultado definitivo.

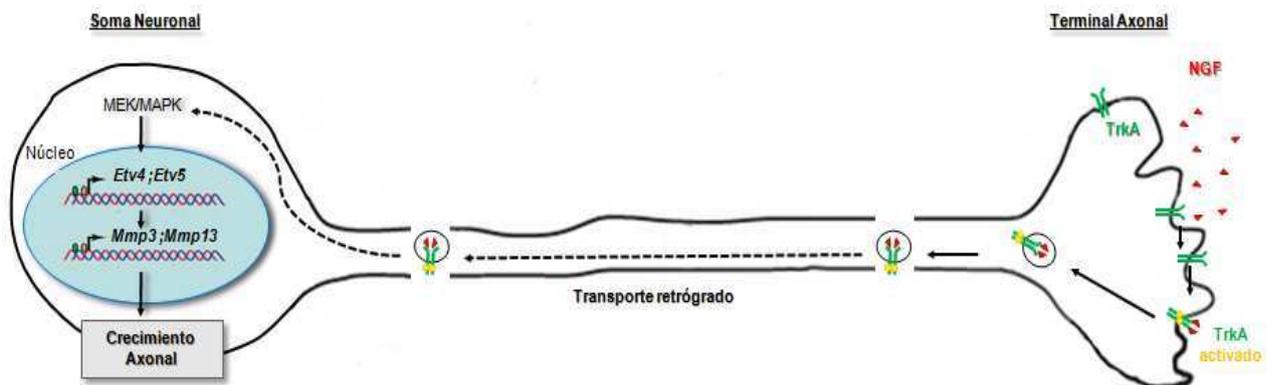
**Figura 17. Etv4 estaría involucrado en la correcta inervación periférica de las neuronas sensoriales TrkA<sup>+</sup> del DRG.** **A.** Etv4 no sería requerido para la supervivencia de neuronas del DRG. Inmunofluorescencia de DRG embrionarios (E14.5) lumbares de ratones control (Etv4<sup>+/+</sup>) o ratones deficientes para Etv4 (Etv4<sup>-/-</sup>) teñidos con anticuerpos anti-TrkA (verde) y colorante nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 60  $\mu\text{m}$ . Análisis cuantitativo del número total de neuronas (**B**) y número total de células TrkA<sup>+</sup> (**C**) en DRG de E14.5 obtenido de animales control (Etv4<sup>+/+</sup>) o deficientes en Etv4 (Etv4<sup>-/-</sup>). En cada histograma se representa el promedio  $\pm$  SD de los conteos. **D.** Inmunotinción de las extremidades anteriores de embriones control y mutantes con anticuerpos anti-TrkA y colorante nuclear DAPI. Barra de escala: 120  $\mu\text{m}$ . Análisis cuantitativo de la longitud total de fibras TrkA<sup>+</sup> en los dígitos de las extremidades anteriores (**E**) y del

número de ramificaciones observadas a partir de la fibra principal del dígito mayor de estas extremidades (F) en animales control ( $Etv4^{+/+}$ ) y animales mutantes ( $Etv4^{-/-}$ ). \* $p < 0.05$  (test de Student,  $t = 3.089$ ). En cada histograma se representa el promedio  $\pm$  SD de la cuantificación, de 3 animales control ( $Etv4^{+/+}$ ) y 3 animales mutantes ( $Etv4^{-/-}$ ).



## Ic. Discusión.

En este estudio se muestran evidencias del importante rol que desempeñan los factores de transcripción de la subfamilia Pea3, Etv4 y Etv5, como mediadores de la respuesta retrógrada del factor neurotrófico NGF y el crecimiento axonal en neuronas sensoriales derivados del ganglio de la raíz dorsal. Se logró identificar que la expresión de estos factores de transcripción requiere de la activación de la vía de señalización de MAPK y que estos median la expresión de las metaloproteasas MMP3 y MMP13, dos metaloproteasas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular y crecimiento axonal. Estos resultados sugieren que el factor neurotrófico NGF liberado desde la piel, se une a su receptor TrkA, es transportado retrógradamente hacia el cuerpo neuronal donde se induce la expresión de un programa génico, en el cual se encuentran Etv4 y Etv5, que promueven el crecimiento axonal de neuronas sensoriales (Figura 18).



**Figura 18. Modelo de inducción distal de Etv4 y Etv5 por el factor neurotrófico NGF.** El NGF se une a su receptor TrkA en el terminal nervioso, activándolo y los endosomas viajan hasta el cuerpo celular. Una vez en el cuerpo, se activa la vía de señalización MAPK induciendo la expresión de diferentes genes, involucrados en supervivencia neuronal, crecimiento y extensión axonal. Entre los factores de transcripción inducidos, se encuentran Etv4 y Etv5, los cuales median la expresión de genes involucrados en el crecimiento axonal, como Mmp3 y Mmp13.

### **La expresión de los factores de transcripción Pea3 en diferentes poblaciones neuronales del DRG.**

Existe extensa evidencia acerca de las vías de señalización disparadas por factores neurotróficos, involucradas en la supervivencia y especificación neuronal, crecimiento axonal y arborización terminal en diferentes subpoblaciones neuronales del ganglio de la raíz dorsal (Bibel M. y Barde YA., 2000; Markus A. et al., 2002; Huang EJ. y Reichardt LF., 2003). Sin embargo, son escasos los estudios acerca del programa transcripcional inducido por diferentes neurotrofinas a las cuales responden las diferentes poblaciones neuronales. En los últimos años, se demostró la expresión de los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 en diferentes poblaciones neuronales del ganglio de la raíz dorsal. Está ampliamente aceptado que el factor de transcripción Etv1 se expresa en neuronas propioceptivas del DRG luego de que sus axones alcanzan la periferia (Lin JH. et al., 1998; Arber S. et al., 2000). La expresión de Etv1 en estas células se correlaciona con la expresión del receptor TrkC, neuronas que responden al FN NT3 (Arber S. et al., 2000; Patel TD. et al., 2003). No ocurría lo mismo para los otros dos miembros de la familia Pea3, cuya expresión no había sido caracterizada en detalle. En cuanto a Etv4, se había descrito su expresión en el DRG en una subpoblación neuronal TrkC positiva, y en otras poblaciones de neuronas sensoriales no caracterizadas (Arber S. et al., 2000). Con respecto a la expresión de Etv5 en neuronas sensoriales del DRG, ésta no había sido caracterizada previamente.

En ésta tesis, mostramos que Etv4 y Etv5 se expresan en neuronas sensoriales que expresan el receptor para el factor neurotrófico NGF, TrkA. Es interesante destacar que tal expresión coincide con el período del desarrollo en el cual los axones sensoriales crecen en respuesta al NGF que es liberado desde la piel, indicando que Etv4 y Etv5 podrían mediar la inervación sensorial guiada por la trofina. Identificamos que la mayoría de las neuronas que expresan TrkA, también expresan Etv4 y Etv5, incluso pueden observarse en las inmunotinciones que existen diferentes niveles de expresión entre ellos, incluso dentro de la misma neurona. Sin embargo, Etv4 y Etv5 no se expresan exclusivamente en neuronas TrkA positivas, sino que también co-localizan con Ret, el receptor para GDNF. Cabe destacar que ni Etv4 ni Etv5 se expresan en las células gliales que rodean a las fibras de los ganglios sensoriales. De acuerdo con el trabajo de Arber S. et al 2000, no

detectamos la expresión de Etv1 en neuronas TrkA positivas, lo que indicaría que su expresión es independiente de NGF (Figura 9).

### **La vía de señalización de MAPK activada por NGF, es necesaria para la inducción de Etv4 y Etv5.**

El NGF liberado desde la piel, es esencial para la supervivencia neuronal así como para el desarrollo de la inervación sensorial cutánea (Zweifel LS. et al., 2005). La evidencia de que el NGF juega un rol crucial en el crecimiento de neuronas sensoriales, además de ser esencial para la supervivencia neuronal, proviene del estudio en los animales doble mutante para la proteína proapoptótica Bax (Bcl-2 associated X protein) y NGF (Bax<sup>-/-</sup> NFG<sup>-/-</sup>) o TrkA (Bax<sup>-/-</sup> TrkA<sup>-/-</sup>). Estos ratones en los cuales se evita la muerte neuronal por apoptosis por la falta de NGF, muestran defectos en la inervación periférica (Patel TD. et al., 2000). El principal mecanismo a través del cual el NGF viaja retrógradamente desde la periferia hasta el cuerpo celular es unido al receptor TrkA en endosomas (Figura 8. Barker PA. et al., 2002; Cosker KE. et al., 2008; Harrington AW. and Ginty D., 2013). A pesar de los diversos trabajos que describen los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el transporte retrógrado del factor neurotrófico, la identificación de los factores de transcripción y los genes río abajo que estarían mediando el crecimiento axonal y la inervación periférica dependiente de NGF, aún no se conocen en su totalidad. La expresión de Etv4 y Etv5 en el momento en que los axones sensoriales del ganglio de la raíz dorsal invaden la piel, nos llevó a preguntarnos si la expresión de ambos puede estar siendo regulada por el factor neurotrófico NGF. En este capítulo describimos que la expresión génica de Etv4 y Etv5 está regulada por NGF, a través de la activación de la vía de MAPK. Además mostramos que la activación de TrkA por NGF en el terminal axonal, es suficiente para poder inducir la expresión de éstos factores de transcripción. Probablemente ocurra a través de la activación de la kinasa Erk5, miembro de la familia de MAPK que se activa en el cuerpo neuronal luego de una estimulación con NGF distal. Tanto la kinasa Erk5 como las kinasas Erk1/2, son inhibidas por el fármaco PD98059 (Watson FL. et al., 2001; Kammakura S. et al., 1999; Mody N. et al., 2001.). En base a estos resultados, proponemos que los factores de transcripción, Etv4 y Etv5, son mediadores clave en el programa transcripcional que induce el NGF periférico unido a su receptor TrkA (Figura 18).

Los factores transcripcionales de la familia Ets, en particular los de la subfamilia Pea3, comparten el dominio ETS altamente conservado entre ellos, además de dos dominios de trans-activación (Figura 3 y 4). En la mayoría de los casos, los miembros de la familia Ets son factores de transcripción activadores de la transcripción génica. Estas proteínas regulan la transcripción de múltiples genes a través de la interacción con diversos tipos de proteínas, dependiendo del contexto celular; también sufren modificaciones post-traduccionales específicas como pueden ser la fosforilación y la acetilación (Li R. et al., 2000; Verger A. y Duterque-Coquillaud M., 2002). La interacción con otros factores proteicos característicos en cada contexto celular, construyen un patrón regulatorio que determina la especificidad de cada Ets por las secuencias promotoras génicas. Es por esto que la función de estos factores de transcripción debe ser considerada en combinación con otros factores transcripcionales, dado que la función de un mismo Ets difiere dependiendo en el contexto celular que se encuentre. Diversos estudios lograron identificar factores de transcripción inducidos por NGF en neuronas sensoriales, como CREB (cAMP response element-binding), NFAT (nuclear factor of activated T cells), MEF2 (myocyte enhancer factor-2) y SRF (serum response factor) entre otros, los cuales controlan distintos aspectos de la respuesta biológica inducida por NGF (Figura 8. Lonze BE. and Ginty D., 2002; Graef IA. et al., 2003; Wickramasinghe SR. et al., 2008; Pazyra-Murphy MF. et al., 2009). Conocer y entender las diferentes interacciones funcionales entre los diferentes factores transcripcionales, y el efecto biológico asociado a ellos es un importante desafío en el campo de las neurotrofinas.

### **La inducción de Etv4 y Etv5 es necesaria para el crecimiento axonal inducido por NGF.**

En éste capítulo de la tesis se describe que la reducción en la expresión de Etv4 o Etv5 reduce significativamente el crecimiento neuronal inducido por NGF; mientras que la sobreexpresión de uno u otro potencia el crecimiento neurítico inducido por la misma trofina. Es interesante mencionar que experimentos previos de diseño muy diferente a lo realizado en esta tesis, muestran que la expresión precoz de la fusión EWS-Etv4 en neuronas sensoriales derivadas de DRG de ratones mutantes ( $\text{Tau}^{\text{EWS-Pea3/+}} \text{Isl1}^{\text{Cre/+}}$ . EWs, Ewing Sarcoma e Isl1, Insulin gene enhancer protein 1), permite la supervivencia y el crecimiento neurítico independientemente de la presencia de neurotrofinas (Hippenmeyer S. et al., 2005). En este caso la expresión

prematura y la fusión EWS-Pea3, permite eludir la necesidad de activación por cofactores conservando la dependencia del sitio ETS en la activación del factor transcripcional Etv4, haciéndola menos sensible al contexto celular. La activación de los programas transcripcionales acoplados a la determinación de los diferentes destinos neuronales en el DRG, esta estrictamente regulada durante el desarrollo y forman parte de los mecanismos de maduración neuronal. Nuestros resultados de sobre-expresión de Etv4 o Etv5, en ausencia de NGF, no son suficientes para inducir tal crecimiento; indicando que la señal inducida por NGF es necesaria no solo para la inducción de Etv4 y Etv5 sino que la presencia de la trofina podría ser necesaria para la activación de estos factores o incluso la expresión de otras proteínas que interactúen con ellos. Un dato importante es la identificación de genes blanco regulados directa o indirectamente por Etv4 y Etv5 que podrían estar participando en el crecimiento neurítico inducido por NGF. Entre los candidatos logramos identificar de acuerdo a reportes en la literatura previos (Trojanowska M. et al, 2000; Oikawa T. y Yamada T., 2003; de Launoit Y. et al., 2006; Nordstrom LA. et al., 1995; Chen L. et al., 2008) dos metaloproteasas, MMP3 y MMP13 que se inducen en neuronas sensoriales derivadas del DRG y en la línea celular PC12, en respuesta al factor trófico NGF. Describimos que la reducción en la expresión de Etv4 o Etv5 disminuye la inducción por NGF de MMP3 y MMP13, de acuerdo con la presencia de sitios de unión Pea3 en las secuencias promotoras de éstas metaloproteasas (Figura 5. Yan C. y Boyd DD., 2007, Tardif G. et al., 2004). Realizamos ensayos de sobreexpresión de MMP3 o MMP13 en neuronas sensoriales y vimos que el crecimiento neurítico en respuesta a NGF se veía potenciado. A pesar de la evidencia de la regulación de Etv4 y Etv5 sobre la expresión de éstas metaloproteasas en respuesta a NGF, consideramos que estos factores de transcripción podrían tener otros genes blanco que participen el crecimiento neurítico. Los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 se expresan tanto durante el desarrollo normal como en procesos oncogénicos que pueden involucrar el remodelado de la matriz (Lu C. et al., 2009; Zhang Z. et al., 2009; Oh S. et al., 2012).

Nuestros resultados señalan a Etv4 y Etv5 como factores clave en el crecimiento neurítico durante el desarrollo, y sugiere que también podrían estar involucrados en procesos de regeneración axonal que le siguen a un evento de injuria. Por esto es que consideramos importante entender el rol de Etv4 y Etv5 en la

compleja red molecular que controla el crecimiento neurítico en respuesta a claves del medio extracelular, lo que sería determinante para el diseño de terapias de reparación y regeneración en el sistema nervioso.

## **Id. Materiales y Métodos.**

**Líneas celulares, proteínas recombinantes e inhibidores.** La línea celular PC12 (línea celular tumoral derivada de feocromocitoma de la glándula adrenal de rata; Greene LA., 1976) se creció en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), 5% suero de caballo y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen; Shirazi Fard et al., 2010). La línea celular COS (CV-1 simian in Oorigin and carrying the SV40 genetic material, Gluzman Y et al, 1981) se creció en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino. Ambos medios suplementados con: Glutamax (2 mM) y penicilina/streptomycin (60 unidades/ml y 60µg/ml, respectivamente), crecidas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Los ligandos NGF y el bFGF (también conocido como FGF2 o FGF-β) fueron obtenidos de Promega y R&D Systems respectivamente. El inhibidor de la vía de MAPK, PD98059 fue obtenido de Sigma-Aldrich, el inhibidor general de caspasas N-Benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp (O-Me) fluoromethyl cetona (Z-VAD-FMK) obtenido en R&D Systems y el inhibidor de amplio espectro de metaloproteasas GM6001 obtenido de Calbiochem

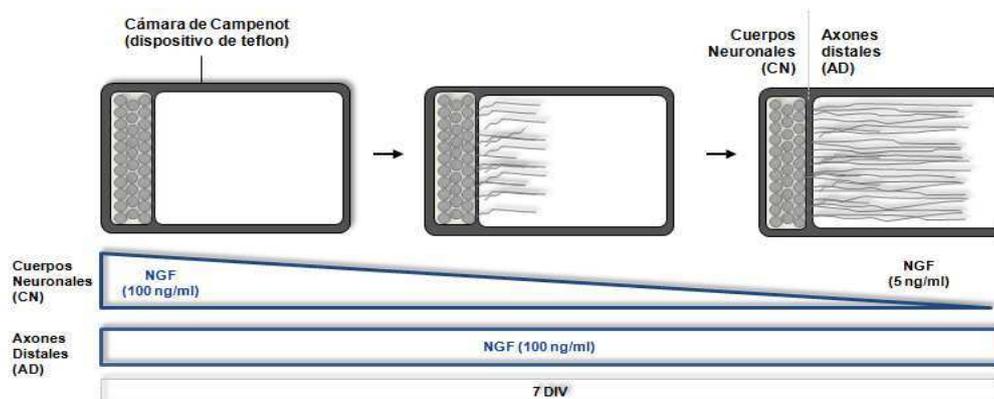
**RT-PCR en tiempo real (Real-time RT-PCR).** La expresión de *Etv4*, *Etv5*, *TATA box binding protein (Tbp)*, *TrkA*, y *MMP3* ARNm fueron analizados por RT-PCR cuantitativa. El ARN total fue extraído y aislado de células PC12 y neuronas sensoriales derivadas del ganglio de la raíz dorsal tratadas o no con NGF por los tiempos indicados usando un kit de extracción y purificación de ARN total (RNA-easy columns, de Quiagen). El ADN copia (ADNc) fue sintetizado usando la transcriptase reversa MultiScribe y Hexameros Random (de Applied Biosystems). El ADNc fue amplificado usando los siguientes sets de primers: Tbp: forward, 5'-GGGGAGCTG TGA TGT GAA GT-3; reverse, 5'-CCAGGAAAT AAT TCT GGC TCA-3'(Ledda et al., 2007); Etv5 de rata: forward, 5'-GAA GTG CCT AAC TGC CAG TCA CCC-3'; reverse, 5'-GGC ACC ACG CAA GTG TCA TCG A-3'; Etv4 de rata: forward, 5'-ACT CAG ATG TCC CTG GAT GTG-3'; reverse, 5'-TCA CTC CAT CAC CTG AAG AGG-3'; TrkA de rata: forward, 5'-CTG CCA GGA CAA ACA GAA CAC-3'; reverse, 5'-GTGGTTGGCTTCGTCTGAGTA-3'; MMP3 de rata:forward, 5'-GCT ATT CTG GCC ACC TTC TTC-3'; reverse, 5'-TCA TCA TCA CCA TAG GGA AGG-3'; MMP13 de rata: forward, 5'-

GAC AGA TTC TTC TGG CGT CTG-3'; reverse, 5'-GAA GTT CTG GCC AAA AGG ACT-3'. La especificidad de los primers fue controlada por PCR convencional. Las RT-PCR fueron realizadas usando el kit SYBR Green qPCR Master Mix (de Invitrogen) en un sistema de detección ABI7500 (de Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l, siguiendo las instrucciones del prospecto adjunto a cada kit.

**Transfección celular, plásmidos y tratamientos farmacológicos.** Las células COS fueron transfectadas con polietilenimine (PEI, de Polyscience), mientras que para las células PC12 se utilizó X-tremeGENE (de Roche) siguiendo las instrucciones del prospecto adjunto a cada reactivo. En particular, según lo indicado, las células fueron transfectadas con los plásmidos Ets-ARNsh-GFP y luego fueron seleccionados con puromicina (5 $\mu$ g/ml) para incrementar el número de células transfectadas sobre las que no. La transfección transiente de neuronas sensoriales disociadas derivadas del ganglio de la raíz dorsal, fue realizada con Lipofectamina 2000 (de Invitrogen) en 300 $\mu$ l de volumen final de medio (DMEM:F12, 1:1) con 1 $\mu$ g de ADN plasmídico total por cada pocillo (se utilizaron las placas de multiwell P24). Para los ensayos de sobreexpresión, las células PC12 se co-transfectaron con los plásmidos Etv4-HA o Etv5-Flag, MMP3-HA o MMP13-Flag (0.9  $\mu$ g) y el plásmido de expresión de GFP (0.1  $\mu$ g). Los plásmidos de Etv4-ARNsh-GFP, Etv5-ARNsh-GFP, Etv4-HA, Etv5-Flag, MMP3-HA y MMP13-Flag fueron obtenidos de Cellogenetics. El vector retroviral pRetro-U6G shRNA fue utilizado para la expresión de Etv4-ARNsh y Etv5-ARNsh; mientras que para los plásmidos Etv4-HA, Etv5-Flag, MMP3-HA y MMP13-Flag se utilizó en vector pRPCX1.0. El plásmido de expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) fue obtenido de Clontech. El inhibidor de la vía de señalización de MAPK, PD98059, se usó en una concentración de 50  $\mu$ M, durante 30 minutos previo a la estimulación con el factor neurotrófico NGF, a 37°C. El inhibidor Z-VAD-FMK (Neumar RW. et al., 2003) fue utilizado en una concentración de 50 nM y el inhibidor de metaloproteasas, GM6001, fue utilizado en una concentración de 2.5  $\mu$ M.

**Cultivo primario de neuronas sensoriales.** Neuronas sensoriales derivadas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de día embrionario (E) 15 de rata (obtenidos del bioterio de Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) fueron disociadas como se describe previamente en el trabajo de Baudet C. (2000).

Brevemente los ganglios sensoriales fueron disociados enzimáticamente con colagenasa I (Sigma-Aldrich), tripsina (Invitrogen) y DNase I (Invitrogen) y luego plaqueadas en placas de multiwell P24 con una matriz de poly-ornitina (Sigma-Aldrich) y laminina (Sigma-Aldrich). Las neuronas fueron mantenidas en DMEM: F12 (1:1) suplementado con penicilina (12 unidades/ml), streptomycin (12 µg/ml), glutamine (2mM, Invitrogen), BSA (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) y el factor neurotrófico NGF (50 ng/ml). Los cultivos compartimentalizados fueron realizados como se describió previamente (Campenot RB., 1994; Ledda F. et al., 2002). Brevemente, placas de 60 mm (P60), fueron cubiertas con una matriz de colágeno I de cola de rata sobre la cual se realizaron trazados paralelos a través de la matriz (pin rake, Tyler Research Instruments). Luego se colocó la cámara de teflón con dos compartimentos (Tyler Research Instruments), utilizando grasa vacuna (DOW CORNING High Vacuum Silicone Grease-Sigma;) para adherirla sobre la matriz de colágeno de la placa P60 (Campenot RC., 1994). Las neuronas disociadas se plaquearon en uno de los dos compartimentos de la cámara, y se las mantuvo 2 días en DMEM: F12 suplementado con 100 ng/ml de NGF. Luego el medio fue reemplazado por medio con cantidades diferentes del factor neurotrófico: en el compartimento de los cuerpos neuronales (CN) 10–20 ng/ml y en el de los axones (DA) 100 ng/ml. Al séptimo día de cultivo, cuando los axones ya atravesaron la barrera de grasa hacia el compartimento DA, se realizó el hambreado de las neuronas en ambos compartimentos y luego se estimuló durante 8 horas con NGF en los distintos compartimentos CB o DA. Las neuronas del compartimento CB fue procesado para la extracción de ARN y la expresión de *Etv4* y *Etv5* fue analizada por RT-PCR en tiempo real.



**Figura 19. Cámaras de Campenot, cultivos compartimentalizados.** Este modelo *in vitro* se utiliza en el estudio del transporte retrógrado de las neurotrofinas y sus receptores, como las vías de señalización inducidas río abajo. Los dispositivos de teflón se colocan por sobre una matriz de colágeno tipo I, y se adhiere con una grasa que puese ser atravesada por los axones. En el esquema se muestra la evolución de los cultivos y las concentraciones utilizadas de NGF: en el compartimento de los cuerpo neuronales (CN) inicialmente se usa 100 ng/ml y finalmente 5 ng/ml; y en el compartimento donde los axones van creciendo la concentración es constante (100 ng/ml). Cuando los axones finalmente se encuentran del otro lado de la barrera de grasa y con una longitud significativa, luego de 7 DIV, se procede con la estimulación con NGF distalmente.

**Western blot.** Las células fueron lisadas a 4°C en un buffer 0.5% de Triton X-100, 1% octil-glucosil plus protease, e inhibidores de fosfatasas. Los lisados proteicos fueron clarificados por centrifugación y analizados luego por Western blot como se describió anteriormente en el trabajo de Ledda F. et al., 2008. Las membranas de PVDF fueron reveladas usando el escáner (Storm 845 Phosphor Imager, GE Healthcare Life Sciences). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Etv5 (H-100), anti-Etv4 (G-10), y anti-actina (Santa Cruz Biotechnology); anti-TrkA (R&D Systems); anti-Flag (Sigma-Aldrich); anti-MAPK fosforilada (New England Biolabs); y anti- $\beta$ III tubulina (Promega).

**Immunofluorescencia.** Embriones de rata a distintos estadios del desarrollo fueron procesados para realizar secciones coronales de criostato. Estas secciones y cultivos primarios de neuronas sensoriales derivadas de DRG fueron fijados con PFA 4%, permeabilizados con 0.25% Triton X-100 en PBS, bloqueados con 10% suero normal de burro (Jackson ImmunoResearch), y luego incubados entre 12 y 16 horas a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios. Anti-TrkA policlonal (1:200 para secciones de criostato y 1:1000 para cultivos primarios; R&D Systems), anti-Ret (1:200 para secciones de criostato; R&D Systems), anti-Etv4 (1:400 para secciones de criostato y 1:800 para cultivos primarios), anti-Etv5 (1:400 para secciones de criostato y 1:800 para cultivos primarios; Santa Cruz Biotechnology), anti- $\beta$ III tubulina (1:3000; Promega), anti-Sox2 (1:400; Sigma-Aldrich). Anti-Etv1 (1:2000) fue proporcionado amablemente por la Dra. Silvia Arber (Universidad de Basel, Suiza). Anticuerpos secundarios fueron comprados en Jackson ImmunoResearch. Para cada edad embrionaria, se disecó la médula espinal con los ganglios sensoriales adosados a nivel lumbar y se realizaron cortes coronales de 10  $\mu$ m de espesor.

La inmunotinción para el estudio de la inervación sensorial de los miembros posteriores de ratones salvajes y mutantes para el factor transcripcional Etv4 fue realizada según (Ranhe JA. et al., 2007) con el anticuerpo primario anti TrkA.

Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-81 y un microscopio confocal Olympus, según se indica en la leyenda de cada figura.

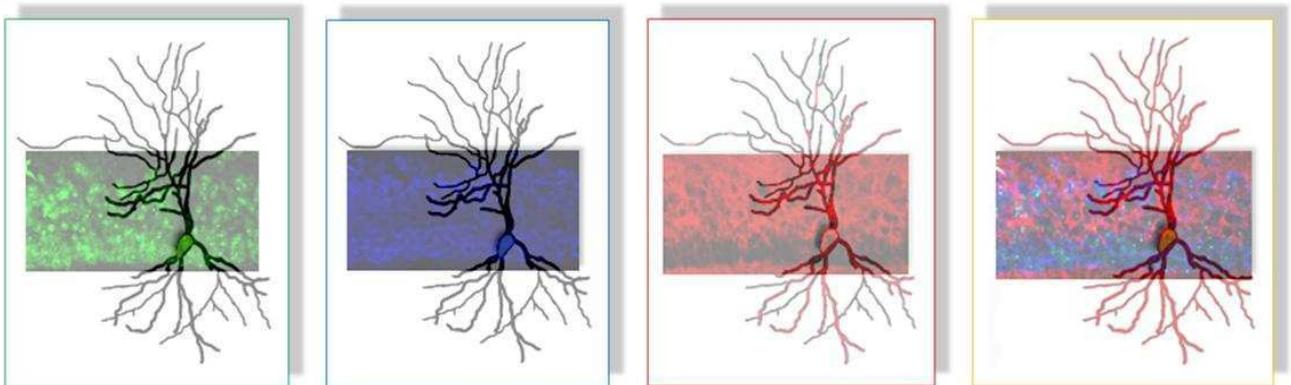
**Ensayos de crecimiento neurítico.** Las células PC12 fueron transfectadas de forma transiente con los plásmidos de Etv-ARNsh usando X-tremeGENE, en placas de 35mm. Al día siguiente las células transfectadas se plaquearon en placas multiwell P24 en medio completo, luego del hambreado se procedió con la estimulación o no con el factor neurotrófico NGF (50 ng/ml). Luego de 72 horas, las células fueron fijadas con 4% PFA. Se cuantificó el número de células con neuritas de longitud mayor a uno y medio o dos diámetros de cuerpos celulares sobre el número total de células. Se contaron al menos 10 campos tomados al azar de tres pocillos, en cada experimento, el cual se realizó por triplicado. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-81. En neuronas sensoriales, los ensayos de crecimiento neurítico fueron realizados en neuronas derivadas de ganglios sensoriales de día embrionario 15 de rata. Estas neuronas fueron transfectadas con Etv4-ARNsh-GFP, Etv5-ARNsh-GFP, Etv4-HA, Etv5-Flag, MMP3-HA, MMP13-Flag, o vector control expresando la proteína GFP y mantenidas en presencia de NGF (50 ng/ml) durante 24 o 36 horas. Luego las células fueron fijadas con 4% PFA y teñidas con anticuerpo primario anti- $\beta$ III tubulina como marcador neuronal. La sobrevivencia neuronal fue evaluada por la coloración nuclear de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole dihidroclorido; Sigma-Aldrich). Las neuronas positivas para GFP con núcleo fragmentado o condensado fueron consideradas células apoptóticas y no fueron consideradas en la cuantificación de los ensayos de crecimiento neurítico. La cuantificación de la neurita más larga se realizó con el software ImageJ. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-81.

**Ensayos de pérdida de función: Ets-ARNsh.** La secuencia blanco del Etv4-ARNsh es 5'-GCAGCAAATCTCCCGGAAATG-3', y corresponde a los nucleótidos número 324–344 del ARNm de Etv4 de rata. Para el caso del Etv5-ARNsh la secuencia blanco es 5'-GGATCACAGCAGCAAACATTT-3' y corresponde a los nucleótidos número 691–711 del ARNm del Etv5 de rata. Estas regiones no son homologas a otros factores de transcripción u otro gen conocido determinado por búsqueda BLAST. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5.0, en cada caso se indica el test o análisis realizado: test de Student o ANOVA de una vía, seguido del post test Dunnett o de Newman–Keuls.

## Capítulo II.

### Sistema Nervioso Central.

**Etv4 y Etv5 son requeridos durante el desarrollo dendrítico hipocampal en respuesta a BDNF.**



## **Ila. Introducción.**

### **El hipocampo y su función.**

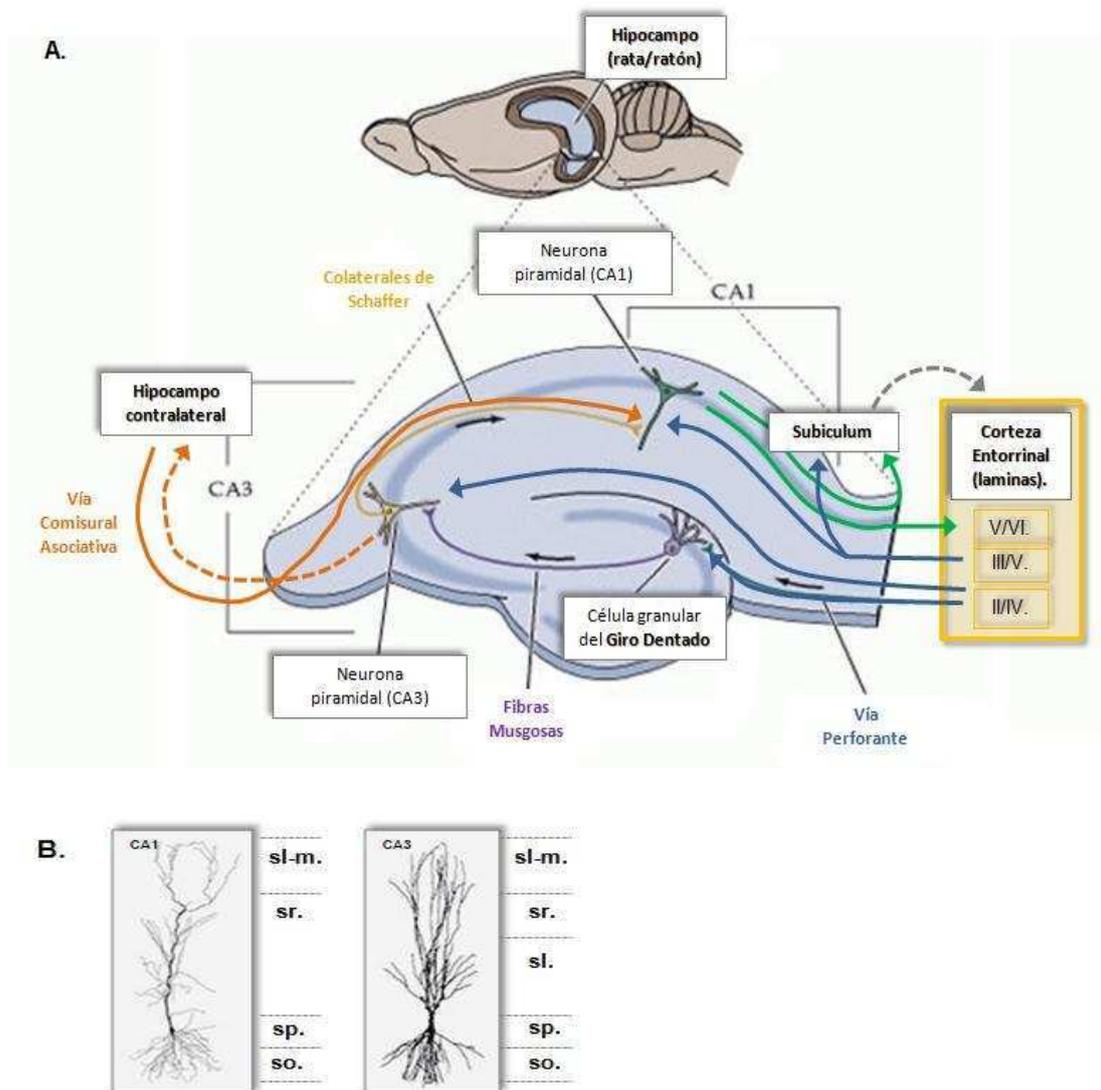
El hipocampo es una estructura involucrada en los procesos de memoria y las neuronas que lo forman son las primeras en verse dañadas en patologías como la enfermedad de Alzheimer. El daño al hipocampo también puede proceder de situaciones de hipoxia, encefalitis o epilepsia del lóbulo temporal. Las personas que han sufrido un daño extenso en el hipocampo pueden experimentar amnesia, es decir, la incapacidad para adquirir o retener nuevos recuerdos.

El hipocampo está localizado en el interior de la parte medial o interna del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical. La formación hipocampal pertenece al sistema límbico y consta de seis regiones citoarquitectónicas que incluyen el giro dentado, el hipocampo, propiamente dicho, subdividido en tres campos: CA (*Cornu Ammonis*) 1, CA2 y CA3, el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal.

La principal aferencia hipocampal es la corteza entorrinal que inerva el giro dentado a través de la vía perforante. Los axones de esta vía establecen contactos excitatorios con las dendritas de las células granulares y neuronas de la región CA3. Las células granulares proyectan a través de sus axones, formando las llamadas “mossy fibers” o “fibras musgosas” a las dendritas de las células piramidales de la región CA3. Estas neuronas proyectan sus axones hacia las células piramidales de la región CA1 formando las colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 envían sus axones al subiculum y corteza entorrinal. Además, se observa otro patrón unidireccional similar en las conexiones de la región CA3 a la CA1 por la vía las colaterales de Schaffer, y desde la región CA1 al subiculum.

En el hipocampo propiamente dicho la organización celular es laminar. La principal capa celular es la de las neuronas piramidales (*stratum pyramidale*, sp.). Inmediatamente debajo de la capa piramidal está el *stratum oriens* (so.), una fina capa con pocas células. Por encima de la capa piramidal de CA3 se encuentra una pequeña capa llamada *Stratum lucidum* (sl.), ocupada por los axones de las fibras musgosas del giro dentado. Por encima del *stratum lucidum* en CA3 y por encima de la capa piramidal en CA1, se encuentra el *stratum*

radiatum (sr.), y se define como la región supra-piramidal donde se localizan las conexiones de CA3 a CA1 por las colaterales de Schaffer. La parte más superficial del hipocampo recibe el nombre de stratum lacunosum-moleculare (sl-m.) y es aquí donde finalizan su recorrido las fibras de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal. Dentro de esta organización, la principal capa celular es la de las neuronas piramidales. Estas células tienen un árbol dendrítico basal que se extiende por el stratum oriens y otro árbol dendrítico apical en el stratum lacunosum-moleculare (Figura 20).



**Figura 20. El hipocampo: su estructura y sus conexiones.** A. Axones de la corteza entorrinal (laminas II/IV) llegan al giro dentado por la vía perforante. Las células de la capa granular del giro dentado inervan a través de las fibras musgosas (“mossy fibers”) la región CA3. En CA3 los axones que forman las colaterales de Schaffer proyectan a la región CA1. La información deja la región CA1 y alcanza las neuronas del subículo y la corteza entorrinal (laminas V/VI). A su vez de la corteza entorrinal (laminas III/V) la información alcanza la

región CA1 en el hipocampo y el subiculum, formando un bucle de información entre la corteza entorrinal, la región CA1 del hipocampo y el subiculum. **B.** Se muestran dos neuronas piramidales de morfología característica de las regiones CA1 y CA3 en el hipocampo y su relativa ubicación en la estructura laminar hipocámpal. Se pueden identificar diferentes láminas: stratum oriens (so.), stratum pyramidale (sp.), stratum lucidum (sl.), stratum radiatum (sr.) y stratum lacunosum-moleculare (sl-m.). (Adaptado de Moser El., 2011).

Las funciones que se le atribuyen al hipocampo tienen que ver con la memoria y la percepción espacial, debido a que sus neuronas presentan actividad relacionada con el entorno en el que se encuentra el animal en estudio, habiéndose definido un mapa cognitivo del hipocampo (O'Keefe J. y Dostrovsky J., 1971; Jacobs LF. y Schenk F., 2003). El hipocampo juega un papel central en la consolidación de la memoria, en la conversión de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo que se almacena en la corteza. Este hecho está avalado por estudios moleculares que indican que tras el aprendizaje inicial, es necesaria la reactivación de la memoria hipocámpal para la plasticidad cortical. El receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) es una molécula crucial en la plasticidad sináptica y en la formación de la memoria. Cuando las neuronas de la región CA1 carecen de dicho receptor, la formación de memoria a largo plazo se ve gravemente afectada (Shimizu E. et al., 2000). La plasticidad neuronal es uno de los principales sujetos de investigación en neurobiología. En sentido amplio, y sin considerar aspectos del desarrollo neuronal tardío, se entiende por neuroplasticidad la capacidad de las neuronas de cambiar su morfología tanto somática como dendrítica así como sus conexiones con otras neuronas, de tal forma que las sinapsis pueden sufrir modificaciones a nivel cuantitativo, cualitativo, topográfico y estructural. Siendo así responsable la neuroplasticidad de la capacidad de adaptación al medio ya que estos cambios intervendrían en procesos de aprendizaje, memoria y conducta (Cooke SF. y Bliss TV., 2006; Garcia-Segura LM., 2009). Existen dos grandes clases de mecanismos que determinan la neuroplasticidad: procesos inductivos por parte de una neurona aferente y dependientes de la actividad sináptica y procesos parcialmente autónomos de la propia neurona. Entre estos últimos se encontrarían las cascadas de señalización intracelulares que conllevan cambios transcripcionales y cuyo resultado final es la transformación morfológica de la célula (Bear MF. et al., 2008).

## **Desarrollo del árbol dendrítico neuronal.**

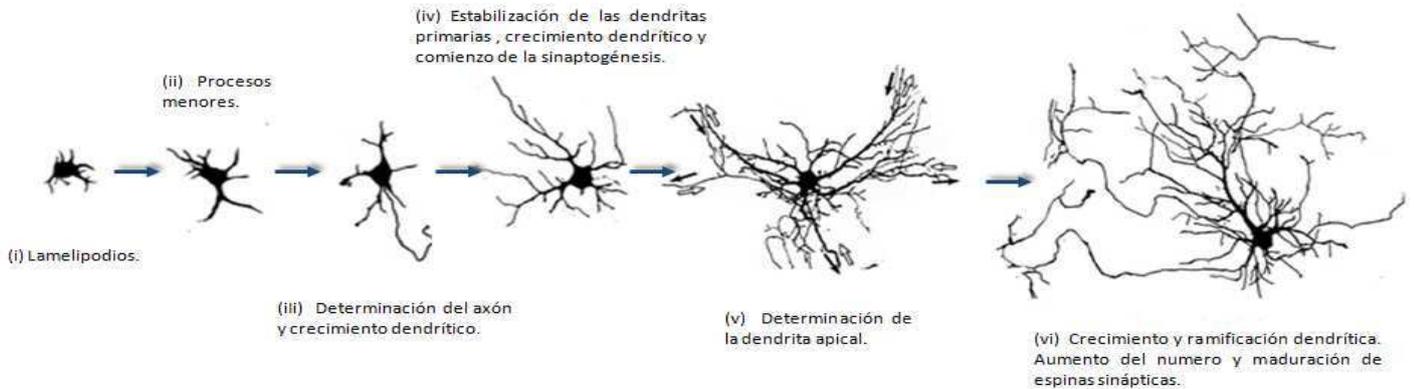
El crecimiento dendrítico es extraordinariamente dinámico y responde a señales del entorno, ya sean factores autónomos o señales extracelulares. En general, las neuronas presentan patrones de arborización dendrítica específicos de cada tipo neuronal, con propiedades de membrana altamente específicas de cada célula (Rall W. et al., 1995; Stuart G. et al., 1999). El desarrollo del sistema nervioso comprende varias etapas. Primero las neuronas nacen y migran hasta sus posiciones finales, seguidamente emiten sus axones y dendritas con patrones característicos según el tipo celular y finalmente se forman la conexión entre ellas, las sinapsis. Estas conexiones sinápticas tempranas son generalmente remodeladas por la actividad neuronal para alcanzar el patrón maduro de conectividad del cerebro (Goodman CS. y Shatz CJ., 1993; Katz LC. y Shatz CJ., 1996). La diferenciación de las dendritas ocurre simultáneamente a la formación de las sinapsis (Purves D. y Hume RI., 1981). La morfología de los árboles dendríticos son un factor clave en determinar cómo las señales que proceden de sinapsis individuales son integradas (Segev I. y London M., 2000, Gullledge AT. et al., 2005). Diferentes patologías neuronales están caracterizadas por presentar anomalías en la estructura de los árboles dendríticos, estas incluyen una serie de síndromes con retardo mental, como el síndrome de Down, el síndrome de Rett y el síndrome del X Frágil (Kaufmann WE. y Moser HW., 2000), esquizofrenia (Harrison PJ., 1999) y enfermedades neurodegenerativas (Anderton BH. et al., 1998). Además, algunos estudios han evidenciado que el estrés prolongado puede inducir la reducción de las dendritas, regresión dendrítica y pérdida de espinas dendríticas (Wood GE. et al 2004, Chen Y. et al., 2008). El desarrollo de los árboles dendríticos es un proceso complejo con múltiples pasos que puede ser dividido en varios estadios: (i) iniciación del crecimiento de neuritas, (ii) ramificación y (iii) estabilización dendrítica (Kossel AH. et al 1997; Wu GY. et al. 1999, Portera-Cailliau C. et al., 2003). Si bien estos procesos difieren entre las distintas especies, la secuencia de eventos es bastante similar. Inicialmente el crecimiento dendrítico es más lento seguido de un proceso de extensión más rápido. A posteriori, ocurre el proceso de ramificación dendrítica que combina la actividad neuronal y la formación de sinapsis y lleva al establecimiento de los árboles dendríticos. Mientras el desarrollo de los árboles dendríticos ocurre a tasas altas de adición y retracción de procesos, la maduración de los árboles dendríticos es menos plástica (Wu GY. et al 1999), y la estabilización de los árboles ocurre durante

un largo período de tiempo (Wu GY. et al 1999, Williams DW. y Truman JW. 2004). Sin embargo, los árboles dendríticos en el sistema nervioso maduro mantienen cierto grado de plasticidad. El paso final en la maduración dendrítica es el desarrollo de espinas. Estas pequeñas proyecciones dendríticas llevan la mayoría de las sinapsis excitatorias y contienen los receptores así como otras proteínas necesarias para la transmisión y modulación de la respuesta sináptica (Kennedy MB., 2000).

En la década de 1980, los estudios basados en el cultivo primario de neuronas hipocampales embrionarias fueron de suma importancia en la definición del evento de polarización morfológica neuronal. *In vitro* el árbol dendrítico y el axón de las neuronas hipocampales maduran de manera análoga a lo que ocurre *in vivo*. Luego de ser plaqueadas las neuronas hipocampales primero extienden lamelipodios móviles en todo su soma. Seguido los lamelipodios se agrupan en lugares específicos del soma y forman estructuras cilíndricas llamadas “neuritas menores”. Las neuritas son estructuras dinámicas indistinguibles entre ellas, que muestran períodos de extensión y retracción, hasta que una de ellas muestra un crecimiento abrupto y sostenido en el tiempo. Esta neurita se convierte en axón y el resto en dendritas. Por último se determina la dendrita apical y finalmente la maduración neuronal, donde se incrementa el ramificado y crecimiento del árbol dendrítico y se forman las espinas sinápticas (Figura 21).

Inicialmente se caracterizaron estas etapas que describen la evolución del cultivo de neuronas hipocampales de rata, sin embargo son válidas para cultivos de ratón, con mínimas diferencias (Figura 21) (Caceres A. et al., 2012). En líneas generales los neuronas hipocampales de ratón maduran más rápido que las de rata, pero presenta etapas intermedias de mayor inestabilidad (Routh RN. et al., 2009; Amrein I. et al., 2011).

	DIV					
Rata:	0.25	0.5	1.5-3	4-6	7-11	12-15
Ratón:	0.25	0.5	1-3	4-6	7-9	10-15



**Figura 21. Modelo in vitro del desarrollo de neuronas hipocámpicas.** Se identifican 3 etapas iniciales de polarización. Primero: i) y ii) generación de las primeras neuritas. Segundo: iii) determinación del axón, y de las neuritas menores las dendritas. Tercero: iv) y v) las dendritas se estabilizan y se determina la dendrita apical. La última etapa (vi) es la de maduración neuronal (adaptado de Cáceres A. et al., 2012).

### Bases moleculares de la arborización dendrítica.

El complejo proceso de desarrollo y estabilización dendrítica debe ser un proceso altamente controlado a nivel molecular. Avances recientes en la manipulación genética de las células neuronales ayudó a revelar una complicada red de procesos celulares y cientos de proteínas implicadas en la transducción de señales, como la síntesis de macromoléculas, rearrreglo del citoesqueleto y tráfico intracelular de proteínas y membranas. Estos procesos están regulados por programas genéticos intrínsecos y por una variedad de señales extracelulares que actúan a nivel celular y/o localmente sobre las dendritas. Los programas genéticos son ejecutados por los factores de transcripción, muchos de los cuales determinan el patrón dendrítico independientemente de las claves extracelulares. Un ejemplo extensamente estudiado es el del factor transcripcional Neurogenina 2 (Ngn2). Un factor con dominio helice-giro-helice que define un patrón específico de arborización dendrítica en neuronas piramidales de la corteza cerebral (Hand R. et al., 2005). Con respecto a las señales extracelulares que controlan la arborización dendrítica, es sabido que dependiendo del estadio de desarrollo la combinación de (i) factores difusibles, (ii) contactos celulares y (iii) actividad neuronal predominan en el control de la

arborización, plasticidad y estabilidad dendrítica. Los factores difusibles son numerosos, entre ellos cuyos efectos están descritos en la literatura, se encuentran los factores neurotróficos como el BDNF (McAllister AK. et al, 1995; Horch HW. y Katz LC., 2002; Tolwani RJ. et al., 2002; Wirth MJ. et al., 2003; Jaworski J. et al., 2005), los miembros de la familia de BMP (Bone Morphogenetic Protein) (Withers GS. et al. 2000; Guo X. et al. 2001; Lein PJ. et al.. 2007), las semaphorinas (Morita A. et al., 2006) y la familia de proteínas Slit (Whitford KL. et al. 2002; Dimitrova S. et al., 2008). Las interacciones entre proteínas de superficie celular como los miembros de la familia de las contactina (Cntn), los receptores Delta y Notch, el sistema de efrinas (ephrin-Eph), la gran familia de cadherinas, etc. (Berglund EO. et al., 1999; Sestan N. et al. 1999, Redmond L. et al. 2000; Hoogenraad CC. et al. 2005; Yu X. y Malenka RC., 2003; Zhu H. y Luo L. 2004; Gao FB. et al., 2000, Shima Y. et al., 2007) también son factores adicionales que pueden participar en controlar el crecimiento y ramificación dendrítica. El tercer factor extracelular importante en el desarrollo de los árboles dendríticos, es la transmisión neuronal que puede aumentar o reducir la arborización dendrítica (McAllister AK. et al., 2000). Ewald RC. y colaboradores (2008) demostraron que es necesaria la precisa composición de subunidades del receptor de glutamato NMDA (NMDAR) para una apropiada arquitectura dendrítica neuronal. Por otra parte, la interferencia de la función de los receptores AMPA (AMPA, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) también lleva a una reducción de la complejidad dendrítica (Haas K. et al., 2006). Los receptores NMDA actúan como canales iónicos activados por ligando y voltaje, aumentando la permeabilidad al calcio (Kandel ER. et al., 2000). La activación de estos receptores induce un crecimiento dendrítico rápido y localizado, y estabiliza lo ya existente (Rajan I. y Cline H. 1998). La entrada de calcio a la neurona activa las proteínas kinasas dependiente del complejo calmodulina/calico (CaM kinase II and CaM kinase IV), las activadas por mitógenos (MAPK) y la proteína kinasa A (PKA) (Redmond L. et al., 2002). Todas estas moléculas son clave en las vías de señalización que determinan la estructura del árbol dendrítico (Wong RO. y Ghosh A., 2002). Los factores difusibles necesitan mensajeros intracelulares para promover el desarrollo de los árboles dendríticos. La proteína Ras (rat sarcoma, sus siglas en inglés), una GTPasa asociada a la membrana celular, juegan un rol central en la transducción de estas señales y son clave en muchos aspectos del desarrollo neuronal, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Entre las cascadas moleculares que se encuentran río

abajo de Ras, está la vía de Raf-MEK-ERK y la de PI3K. Los procesos disparados por factores neurotróficos de ramificación dendrítica y formación de espinas en neuronas hipocampales pueden ser bloqueados por una mutante dominante negativa (DN) de Ras (RasN17) (Kumar V. et al., 2005; Wayman GA. et al., 2006).

La regulación de la transcripción juega un importante rol en la formación de los programas genéticos intrínsecos que determinan la arborización dendrítica. Sin embargo, los factores transcripcionales, los cofactores y las proteínas modificadoras de la cromatina son estudiados también en el contexto del desarrollo dendrítico inducido por factores extracelulares. Tanto la actividad neuronal, como los factores extracelulares difusibles y sus receptores en membrana pueden inducir la expresión de ciertos programas transcripcionales que influyen en los patrones de arborización dendrítica. Así por ejemplo, el factor transcripcional CREB juega un rol clave en la arborización dendrítica. La sobreexpresión de distintas formas mutantes que actúan como DN de CREB o la utilización de secuencias que interfieren su expresión, evitan el crecimiento dendrítico inducido por el tratamiento con KCl o con la trofina BDNF en neuronas hipocampales y corticales (Jagasia R. et al., 2009; Redmond L. et al., 2002; Wayman GA. et al., 2006). Por otra parte mutantes constitutivamente activas de esta proteína han demostrado ser suficientes para aumentar el crecimiento dendrítico total (Wayman GA. et al., 2006). La transcripción dependiente de CREB es necesario y suficiente para el crecimiento dendrítico regulado por la actividad neuronal (Wayman GA. et al., 2006, Wayman GA. et al., 2008).

### **BDNF: el rol de las neurotrofinas en la dendritogénesis.**

Señales que llegan desde el medio extracelular, como los factores neurotróficos, pueden modular patrones específicos de crecimiento y ramificación del árbol dendrítico neuronal, activando mecanismos que afectan y regulan la expresión génica (Whitford KL. et al, 2002).

Los factores neurotróficos: NGF, BDNF, NT3 y NT4/5 desempeñan no solo un rol en el control del número de neuronas durante el desarrollo y en la eliminación de las neuronas que fallan en el alcance de su célula blanco (Raff MC. et al., 1993), sino que tienen un rol clave en la regulación del crecimiento dendrítico (Scott EK. y Luo

L., 2001). Estos factores pueden ser secretados por células neuronales y gliales (Chao CC. et al., 1992; Levine ES. et al., 1995; Muller G. et al., 1995).

El factor neurotrófico BDNF (Barde YA. et al., 1982) es la neurotrofina más estudiada en relación al crecimiento dendrítico y la regulación de los procesos de ramificación del árbol dendrítico neuronal (Segal RA. et al., 1995). La expresión de BDNF así como su receptor, es abundante en estructuras del sistema cortico-límbico (Maisonpierre PC. et al., 1990; Pruunsild P. et al., 2007). La vía de señalización BDNF/TrkB fue reportada como crítica en diversos procesos fisiológicos como el aprendizaje y la construcción de memorias. Anormalidades en la vía de BDNF/TrkB fueron reportadas en varios desórdenes neurológicos (Pezet S. y Malsangio M., 2004). En particular se sabe que el BDNF es requerido para la maduración, diferenciación y supervivencia de progenitores neurales. Dentro de los efectos biológicos inducidos por el BDNF se ha descrito la promoción de dendritas primarias (Horch HW. et al., 1999) en diferentes áreas del sistema nervioso central, como la corteza (Chakravarthy S. et al., 2006; English CN. et al., 2012; Kaneko M. et al., 2012; Vigers AJ. et al., 2012), el hipocampo (Luikart BW. et al., 2005; Tyler W. y Pozzo-Miller JL, 2003; von Bohlen und Halbach O. et al., 2008) y el estriado (Baquet ZC. et al., 2004; Rauskolb S. et al., 2010). El BDNF activa a su receptor TrkB (Fayard B. et al., 2005) y las vías de señalización de PI3K/Akt y de MAPK entre otras, para llevar a cabo sus efectos biológicos. Ambas vías de señalización están involucradas en la promoción y el crecimiento de neuritas (Tojima T. et al., 2003), y coinciden en la fosforilación directa del factor de transcripción CREB. Existen numerosos trabajos que describen el rol de CREB como mediador crítico de la regulación de la complejidad del árbol dendrítico neuronal inducido por BDNF (Redmond L. y Ghosh A., 2005; Wayman GA. et al., 2006.). En el ratón mutante condicional de BDNF se observa una reducción en la supervivencia, arborización dendrítica y en la formación de memorias (Alcantara S. et al., 1997; Xu B. et al., 2000; Gorski JA. et al., 2003a, b). Al igual que el ratón mutante para su receptor, TrkB, el ratón mutante condicional de BDNF presenta una estructura cortical compacta, con neuronas de menor tamaño a las del ratón salvaje y de menor complejidad dendrítica (Xu B. et al., 2000; Gorski JA. et al., 2003a). Se sabe que el receptor TrkB promueve el crecimiento dendrítico en ciertas poblaciones neuronales (Xu B. et al., 2000; Yacoubian TA. y Lo DC., 2000; Luikart BW. et al., 2005) y que la

reducción en la expresión del receptor lleva a la retracción de los procesos dendríticos (Schechter LC. et al, 2012).

Si bien es claro el rol del sistema BDNF/TrkB sobre la remodelación de los procesos dendríticos relativamente poco es lo que se conoce acerca de los genes blanco, los cuales regulan o modularían tales procesos (Zhou F. et al., 2006; Wayman GA. et al, 2006). Uno de los factores transcripcionales que se identificó recientemente como mediador de la vía BDNF/Trk, es Etv1. Este factor de transcripción desempeña un rol clave en la expresión de los genes característicos en la maduración neuronal inducidos por BDNF, NR2C y Tiam1 (Abe H. et al., 2011). La expresión de Etv1 es inducido por mecanismos regulados por la actividad neuronal (Abe H. et al., 2012).

Dado que nosotros y otros autores hemos descrito a los factores Pea3 como mediadores de los efectos de los factores neurotróficos (Patel TD. et al., 2003; Fontanet P. et al, 2013; Arber S. et al., 2000) y el conocido rol de BDNF como regulador de la plasticidad estructural hipocampal. Decidimos estudiar el posible rol de dos miembros de la familia Pea3, Etv4 y Etv5 en el desarrollo de los circuitos hipocampales.

### **Expresión de los factores de transcripción Pea3 en el desarrollo hipocampal.**

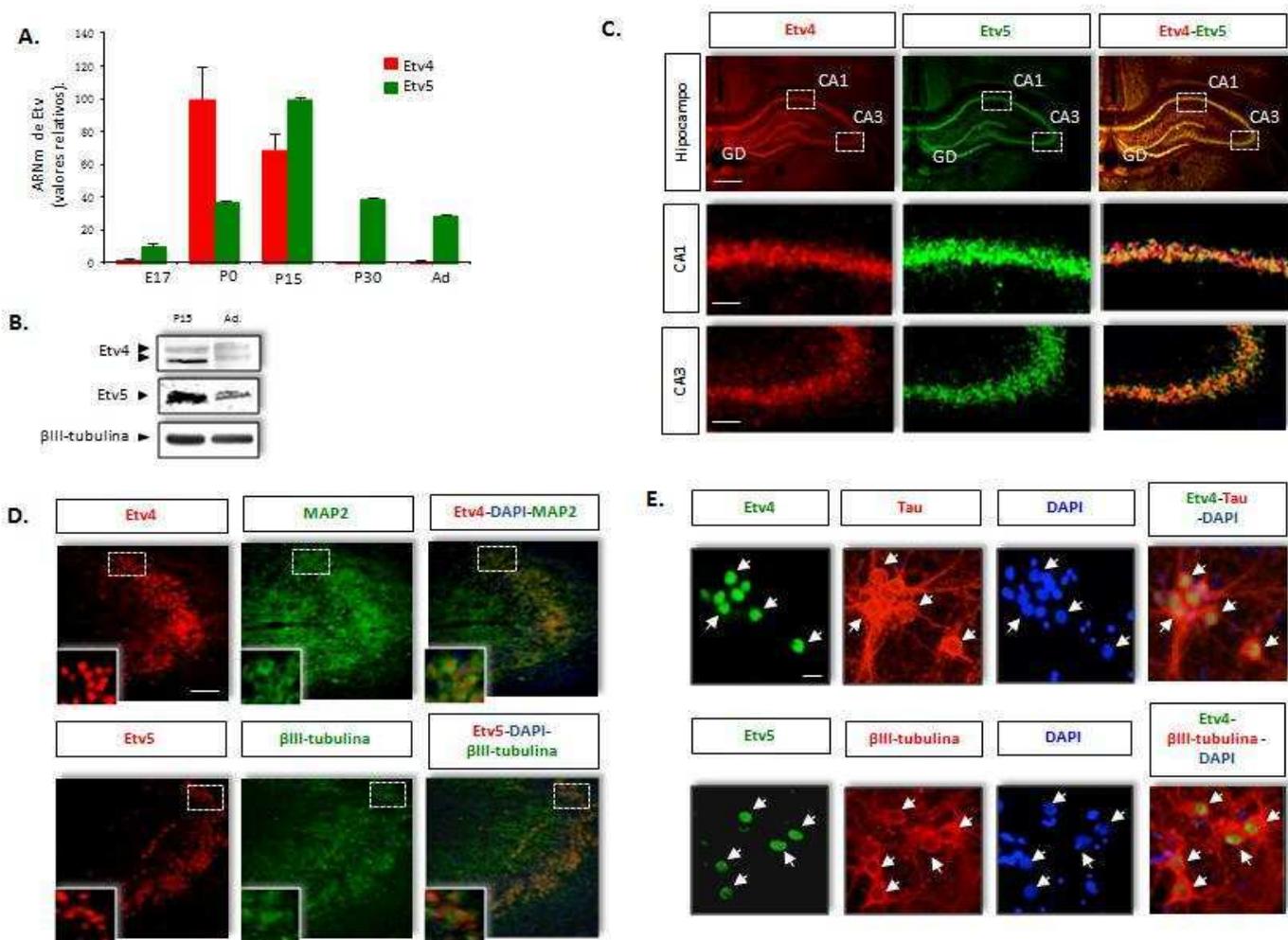
Muy poco se conoce sobre el rol de los factores de transcripción Pea3 en el desarrollo hipocampal. La expresión de los tres miembros de la subfamilia Pea3 han sido descritos en el desarrollo temprano del telencéfalo del ratón a diferentes niveles en la dirección rostro-caudal (Zimmer C. et al., 2010). Sin embargo existe una diferencia en el patrón de expresión de los tres factores de transcripción lo que refleja posibles diferencias en el rol que estarían desempeñando durante el desarrollo del sistema nervioso central. A nivel más rostral, los niveles de expresión de Etv4 y Etv5 son extensos en la línea dorso-ventral de la zona sub-ventricular del telencéfalo, mientras que para Etv1 se observa una expresión restringida a la zona marginal de la corteza (Cholfin JA. y Rubenstein JL., 2008; Fukuchi-Shimogori TE. y Grove A., 2003).

En éste capítulo, describimos la expresión de los factores transcripcionales Etv4 y Etv5 durante el desarrollo hipocampal y describimos su rol como mediadores del crecimiento y maduración dendrítica inducido por BDNF.

## **IIb. Resultados.**

### **Etv4 y Etv5 se expresan durante el desarrollo del hipocampo.**

Con el objeto de estudiar el rol de los factores de transcripción de la subfamilia Pea3, Etv4 y Etv5, en el desarrollo del hipocampo, se analizó la expresión de estos factores transcripcionales a distintos estadios del desarrollo embrionario (E), posnatal (P) y en el adulto utilizando las técnicas de western blot y RT-PCR en tiempo real. Detectamos expresión de estos factores en todos los estadios evaluados, observando los mayores niveles de expresión para Etv4 entre P0 y P15, y para Etv5 en P15 (Figura 22 A, B). Con el objeto de determinar su distribución en las distintas áreas hipocampales e identificar las células que expresan Etv4 y/o Etv5, su expresión fue analizada por inmunofluorescencia en secciones coronales de cerebro de rata de P15. Observamos que Tanto Etv4 como Etv5 se expresan en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. También se observó la expresión de Etv4 y Etv5 en la capa granular del giro dentado (Figura 22 C). Se realizaron coinmunomarcaciones utilizando anticuerpos primarios anti Etv4 o Etv5 y anticuerpos dirigidos contra distintos marcadores neuronales como  $\beta$ III-tubulina y MAP2 (proteína asociada a microtubulos II). La co-expresión de estos factores transcripcionales con los marcadores neuronales indicó que Etv4 y Etv5 están localizadas en los núcleos de células neuronales (Figura 22 D). En células disociadas, la totalidad de las neuronas hipocampales, mostraron expresión nuclear de Etv4 y Etv5 (Figura 22 E). No se observó expresión de estos factores en otros tipos celulares presentes en el cultivo.



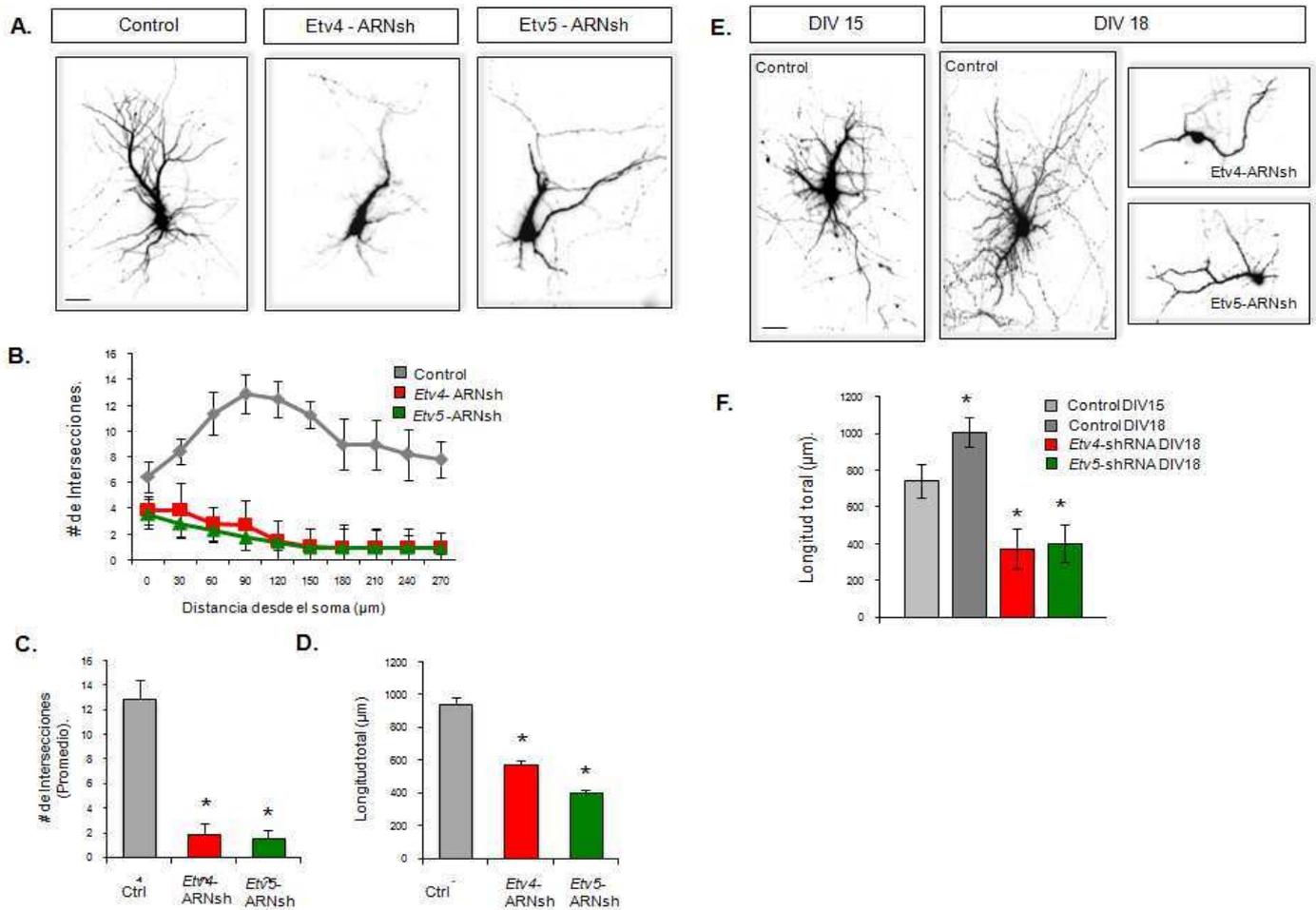
**Figura 22. Expresión y localización de Etv4 y Etv5 durante el desarrollo.** **A.** Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de *Etv4* y de *Etv5* en el hipocampo de rata a distintos estadios del desarrollo: E17, P0, P15, P30 y Adulto (Ad) por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de expresión de los ARNm de *Etv4* y *Etv5* se normalizaron evaluando el nivel de expresión del ARNm de *Tbp*. Los valores se expresan como valores relativos a los niveles de expresión detectados a P0 para *Etv4*, y P15 para *Etv5*. Se graficaron los valores promedio  $\pm$  SD medidos por triplicado. **B.** Análisis de la expresión de Etv4 y Etv5 por western blot en extractos de hipocampo (homogenato total) de rata de P15 y adulto. La misma membrana fue testada con anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina como control de carga. **C.** Inmunofluorescencia de los factores transcripcionales Etv4 y Etv5 en secciones coronales de hipocampo de rata de P15. Se muestran tinciones de Etv4 (rojo) y Etv5 (verde) en las regiones CA1, CA3 y en giro dentado (GD). Escala: 120  $\mu$ m. En los paneles inferiores se muestran imágenes en alta magnificación correspondiente a las regiones CA1 y CA3, donde se puede observar la co-localización de ambos factores transcripcionales. Escala: 30  $\mu$ m. **D.** Co-localización de Etv4 y Etv5 con marcadores neuronales en secciones coronales de hipocampo de ratón de P0. Panel superior: inmunofluorescencia de Etv4 (rojo) y MAP2 (verde). Panel inferior: inmunofluorescencia de Etv5 (rojo) y  $\beta$ III-tubulina (verde). Escala: 30  $\mu$ m. Se muestran imágenes en alta magnificación donde se observa la localización nuclear de los factores transcripcionales. **E.** Co-localización por inmunofluorescencia de Etv4 y Etv5 con marcadores neuronales en

neuronas hipocámpales disociadas. Panel superior: co-localización de Etv4 (verde) con Tau (rojo). Panel inferior co-localización de Etv5 (verde) con  $\beta$ III-tubulina (rojo). Las flechas indican células positivas para Etv4 o Etv5 con marcadores neuronales. Escala: 30  $\mu$ m.

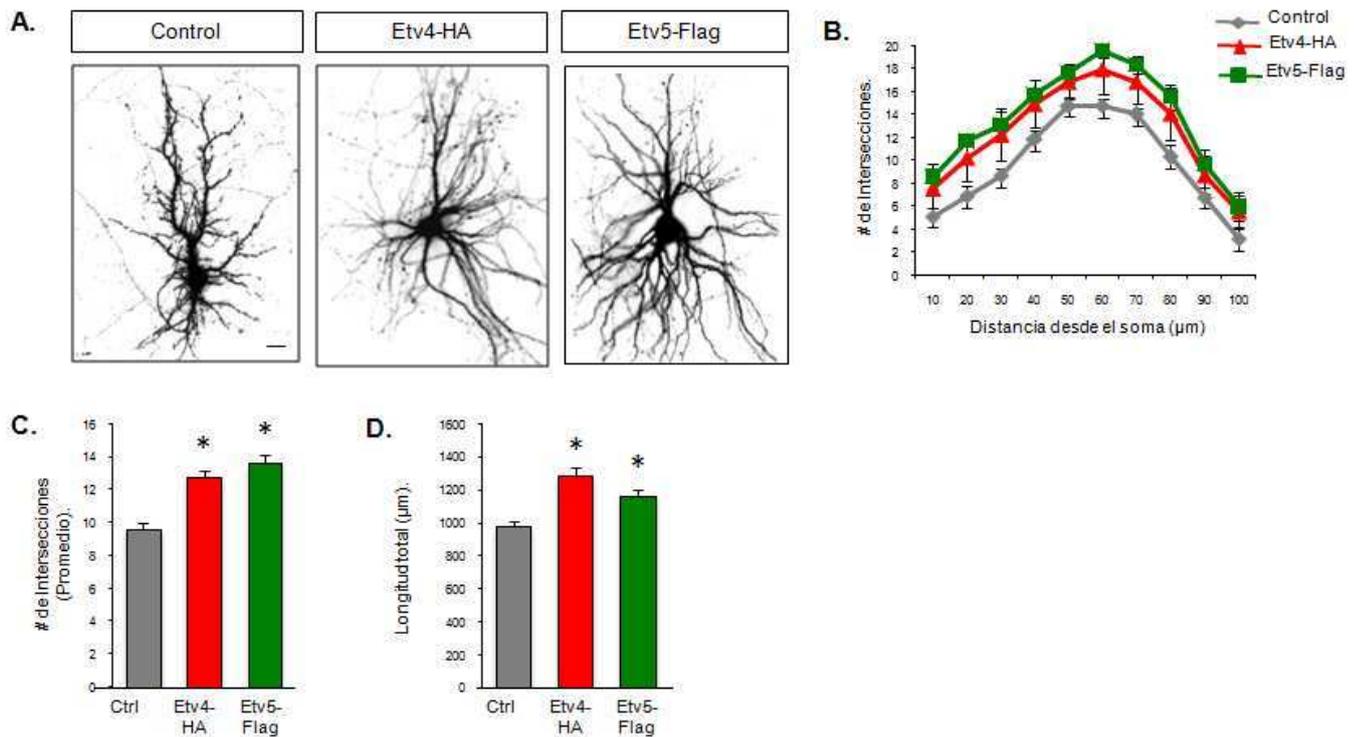
### **Etv4 y Etv5 son factores de transcripción necesarios para el crecimiento dendrítico hipocámpal.**

Como se observa en la Figura 22, Etv4 y Etv5 se expresan en el hipocampo a altos niveles en los primeros días postnatales, que es el período durante el cual ocurren eventos como el crecimiento dendrítico y la formación de contactos sinápticos (Ben-Ari Y. et al., 2007). Con el objeto de determinar si estos factores participan en estos procesos llevamos a cabo estudios de pérdida de función en los cuales se redujo la expresión de Etv4 y Etv5 utilizando secuencias de interferencia específicas. Para ello se utilizaron cultivos hipocámpales de rata de E17.5, un estadio en el cual el predominante tipo neuronal en los cultivos son las células piramidales (Bayer SA., 1980; Banker GA. y Cowan WM., 1977). Estas células fueron transfectadas con vectores control o que contienen secuencias que interfieren la expresión de Etv, ARNsh: contra Etv4 (Etv4-ARNsh) o Etv5 (Etv5-ARNsh). Éstos plásmidos Etv-ARNsh expresan también la proteína fluorescente GFP, lo que nos permite evaluar directamente parámetros morfométricos en las neuronas donde se encuentra reducida la expresión de cada Etv. Las neuronas fueron transfectadas a los 15 días *in vitro* (DIV), se mantuvieron durante 72 horas en medio completo, y finalmente fueron fijadas para su posterior análisis. Se cuantificó el crecimiento neurítico total y la complejidad de su árbol dendrítico mediante el análisis de Sholl (Figura 23). Este análisis se basa en el dibujo de círculos concéntricos respecto del soma neuronal de diámetros crecientes, y lo que se cuantifica es el número de intersecciones del árbol dendrítico con los círculos dibujados, lo que refleja la complejidad dendrítica (Sholl DA., 1953). El análisis se realizó sobre neuronas transfectadas expresando GFP, pero para asegurar una intensidad de fluorescencia homogénea y comparable entre tratamientos, posterior a la fijación se realizó una inmunocitofluorescencia con el anticuerpo primario anti-GFP. Pudimos observar que la reducción en la expresión de tanto Etv4 como de Etv5 resultó en una disminución de la complejidad dendrítica en comparación con las neuronas transfectadas con el vector control. Estos resultados indicaron que la reducción de Etv4 o Etv5 interfiere en el desarrollo del árbol dendrítico en neuronas hipocámpales. Esta reducción observada en el desarrollo de los árboles dendríticos podía deberse a que como consecuencia de la

falta de estos factores transcripcionales las dendritas frenen su crecimiento o a un efecto de retracción de las mismas. Para analizar estas posibilidades cultivamos neuronas durante 12 días *in vitro*, las transfectamos con el vector control y luego de 3 días fueron fijadas y analizadas (DIV15 final). Neuronas provenientes del mismo cultivo, plaqueadas inicialmente el mismo día, fueron transfectadas con el vector control, con Etv4-ARNsh o con Etv5-ARNsh en DIV 15 y fueron fijadas tres días después (DIV 18 final) (Figura 23 E). Observamos que las células transfectadas con el vector control y fijadas a DIV18 (DIV 18 final) mostraron un aumento en el crecimiento total comparada con los controles crecidos durante 15 días (DIV15 final). Sin embargo el crecimiento de las células con niveles de Etv4 y Etv5 reducidos mostró a los 18 DIV una importante reducción en su crecimiento con respecto a las células transfectadas con vector control y crecidas solo por 15 días (DIV15 final). Estos resultados indicaron que la reducción en los niveles de expresión de estos factores transcripcionales Pea3 lleva a la retracción de dendritas hipocampales. Estos hallazgos nos llevaron a investigar si la sobreexpresión de los factores transcripción Etv4 o Etv5, serían suficientes para promover el crecimiento dendrítico y mostrar una complejidad mayor en neuronas hipocampales. Para llevar a cabo este estudio, neuronas hipocampales fueron co-transfectadas con los vectores control o los que contienen las secuencias codificantes para Etv4-HA o Etv5-Flag, con el vector de expresión de GFP en los tres casos (Figura 24). Los resultados obtenidos indicaron que la sobreexpresión de Etv4 o Etv5 en forma independiente, es suficiente para inducir un significativo aumento en el crecimiento y complejidad dendrítica.



**Figura 23. Etv4 y Etv5, independientemente, median el crecimiento neurítico en neuronas hipocampales.** A y E. Imágenes representativas de neuronas hipocampales de rata transfectadas, con los vectores control, Etv4-ARNsh, Etv5-ARNsh, todos ellos expresando la proteína GFP. Las células se mantuvieron 3 días más en cultivo, fueron posteriormente fijadas y teñidas con el anticuerpo primario anti-GFP. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . A, Células transfectadas a DIV12, mantenidas 3 días en cultivo, fijadas y tenidas a DIV18, B. Análisis de Sholl del árbol dendrítico de de A. C. Histograma que muestran el número total de intersecciones de A. D. Histograma que muestra el crecimiento neurítico total de A. E. Células transfectadas a DIV12 o DIV15 con los vectores indicados y fijadas 3 días después: DIV 15 y DIV 18 respectivamente. F. Histograma que muestra el crecimiento neurítico total de E. En los histogramas se indican los valores promedio  $\pm$  SD para los diferentes grupos experimentales. \* $p < 0.001$  (ANOVA, seguido de un test de Bonferroni).



**Figura 24.** La sobreexpresión de Etv4 o Etv5 es suficiente para incrementar la complejidad de los árboles dendríticos hipocampales. **A.** Imágenes representativas de neuronas hipocampales de ratón transfectadas a DIV15 con los vectores control (Ctrl), Etv4-HA, Etv5-Flag, todos ellos junto con el vector de expresión de la proteína fluorescente GFP. Las células se mantuvieron 3 días más en cultivo, fueron posteriormente fijadas y teñidas con el anticuerpo primario anti-GFP. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . **B.** Análisis de Sholl del árbol dendrítico de neuronas hipocampales GFP positivas en DIV 18. Histogramas que muestran el número total de intersecciones (**C**) y el crecimiento neurítico total (**D**). En los histogramas se indican los valores promedio  $\pm$  SD para los diferentes grupos experimentales. \* $p < 0.001$  (ANOVA seguido de un test de Bonferroni).

### Etv4 y Etv5 median el crecimiento neurítico inducido por BDNF.

Trabajos previos muestran que los factores de transcripción de la subfamilia Pea3 median los efectos de factores tróficos en diferentes poblaciones neuronales (Patel TD. et al., 2003; Fontanet P. et al, 2013; Arber S. et al., 2000). Como se mencionó previamente el BDNF es un factor neurotrófico que se expresa en altos niveles en el sistema nervioso central, en particular en el hipocampo, y está ampliamente demostrado que estimula el crecimiento dendrítico y la maduración de las neuronas hipocampales (Cheung ZH. et al 2007; Jin H. et al 2003; Kwon M. et al., 2011; Lazo OM. et al., 2013).

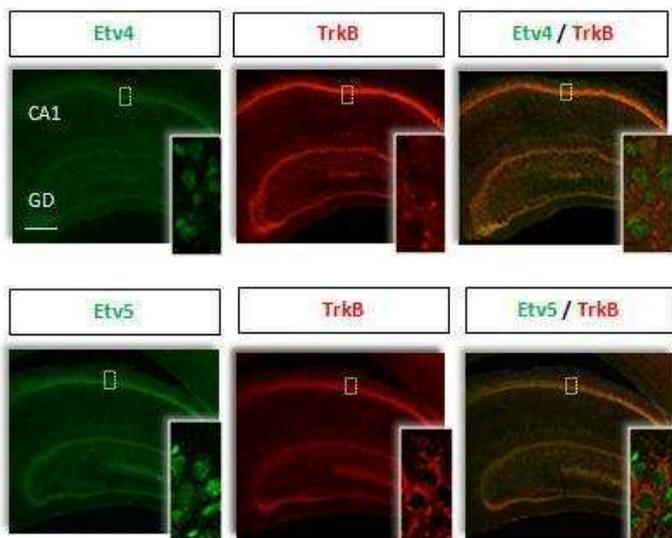
Ensayos de inmunofluorescencia en secciones coronales hipocampales de rata de P15 indicaron una clara localización nuclear de *Etv4* y *Etv5* en neuronas hipocampales positivas para el receptor de BDNF, TrkB (Figura 25 A). Basados en estas evidencias, decidimos evaluar si *Etv4* y *Etv5* podrían estar involucrados en la vía de señalización inducida por BDNF. Para ello realizamos ensayos de diferenciación neuronal dependiente de BDNF en la línea celular PC12. Dado a que esta línea celular no expresa TrkB en forma endógena, las células fueron co-transfectadas de manera transiente con un vector de expresión para el receptor tirosina kinasa TrkB, con un vector control o los vectores que llevan las secuencias de interferencia para los factores transcripcionales evaluados: *Etv4*-ARNsh o *Etv5*-ARNsh y la secuencia codificante para GFP. Las células transfectadas fueron mantenidas en medio DMEM sin suero, en presencia o no de BDNF (25ng/ml) durante 72 horas y luego se analizó la diferenciación morfológica (Figura 25 B, C). En presencia del factor neurotrófico BDNF, las células PC12 transfectadas con TrkB, mostraron procesos neuríticos. Sin embargo, cuando la expresión de *Etv4* o *Etv5* fue reducida, el crecimiento inducido por BDNF fue anulado por completo. Estos resultados indicaron que estos dos factores de transcripción, son independientemente necesarios en el crecimiento neurítico inducido por BDNF.

Basados en nuestros datos previos que muestran que los niveles de ARNm de *Etv4* y de *Etv5* pueden ser regulados por NGF en neuronas sensoriales, decidimos analizar si la expresión de estos factores era controlada de forma similar por BDNF en neuronas hipocampales. Para ello neuronas hipocampales fueron cultivadas en presencia de BDNF (25ng/ml) durante diferentes tiempos y los niveles de *Etv4* y *Etv5* fueron analizados por RT-PCR en tiempo real (Figura 25 D). Estos estudios revelaron una significativa inducción de los niveles de ARNm de *Etv4* y *Etv5* en neuronas expuestas a BDNF comparado con controles (no tratados con la trofina). Es sabido que la vía de MAPK activada en respuesta a la estimulación con BDNF participa en los procesos de diferenciación neuronal y la utilización de inhibidores farmacológicos de esta vía anula la diferenciación inducida por la neurotrofina (Alessi DR. et al., 1995). Por otra parte nosotros y otros autores hemos descrito previamente que *Etv4* y *Etv5* son efectores de esta vía de señalización (Fontanet P. et al., 2013; Wasyluk B. et al., 1998; Yordy JS. y Muise- Helmericks RC., 2000). Con el objeto de determinar si en nuestro sistema la activación de la vía de MAPK inducida por BDNF era requerida para la inducción de los

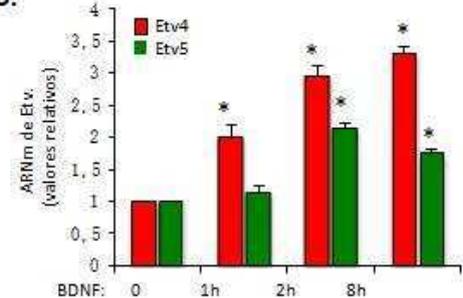
factores transcripcionales Etv, cultivos de neuronas hipocampales fueron tratadas con el inhibidor de la vía de MAPK, PD98059 (50  $\mu$ M), durante 30 minutos previamente a la estimulación de 2hs. con BDNF (25ng/ml). Como se observa en la figura 25 (panel E), la inducción de estos factores transcripcionales por la neurotrofina fue substancialmente reducida en presencia del inhibidor. En conjunto todos estos resultados indicaron que la inducción de Etv4 y Etv5 por BDNF requiere la activación de la vía de MAPK.

Basados en nuestras observaciones que indicaban que tanto Etv4 como Etv5 se co-expresan en neuronas de las distintas áreas hipocampales (Figura 22 D y C, Figura 24 A) y los ensayos de pérdida de función para Etv4 o Etv5 en células PC12 (Figura 25 B y C), analizamos si estos dos factores de transcripción podrían estar interactuando. Para estudiar esta posibilidad, primero realizamos inmunofluorescencias de secciones coronales de hipocampo de rata de P15 (Figura 26 A) e inmunofluorescencia de neuronas hipocampales de rata de E17.5, mantenidas 13 días *in vitro* (Figura 5 B) para confirmar que ambos factores transcripcionales se expresaban en las mismas neuronas. Realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares de tejido hipocampal de rata de P15, ya que en este estadio del desarrollo ambos factores transcripcionales presentan altos niveles de expresión (Figura 22 A). Los ensayos mostraron que Etv5 puede ser co-inmunoprecipitado con Etv4, pero no con el anticuerpo control (Figura 26 C), indicando que Etv4 y Etv5 interactúan en el núcleo de células hipocampales *in vivo*.

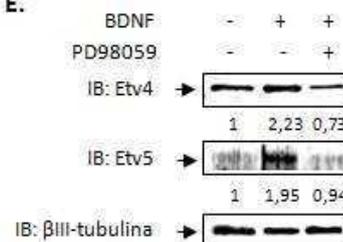
A.

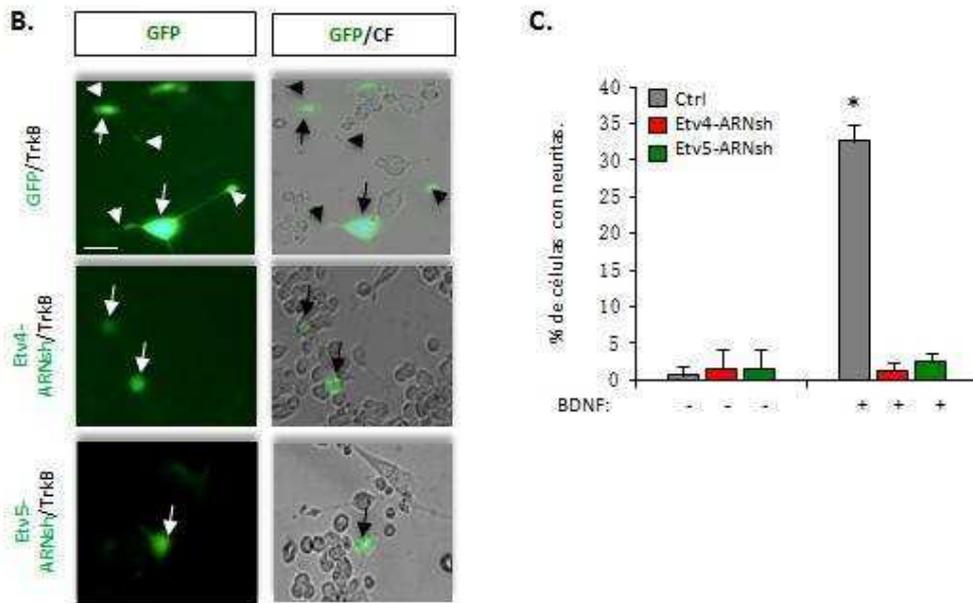


D.

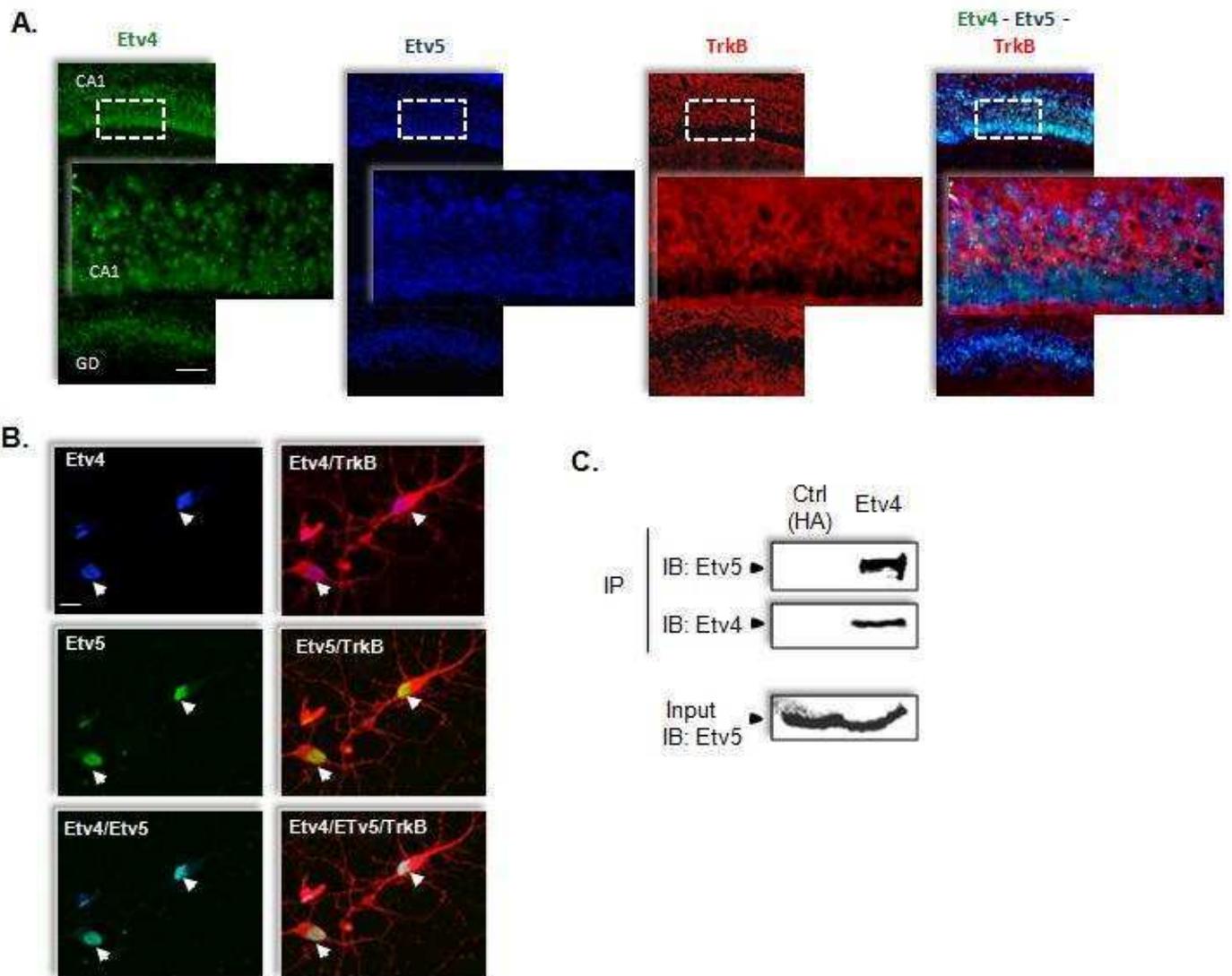


E.





**Figura 25. Etv4 y Etv5 co-localizan con TrkB *in vivo* y son independientemente necesarios en la diferenciación neuronal inducida por BDNF. A.** Expresión de Etv4 o Etv5 (verde) en neuronas TrkB (rojo) positivas en hipocampo de rata de día postnatal 15 . Escala: 120  $\mu$ m. **B.** Imágenes representativas de células PC12 co-transfectadas con los plásmidos control, Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh, que expresan la proteína GFP y el plásmido de expresión para el receptor de BDNF, TrkB. Después de 72 horas de tratamiento con o sin trofina (BDNF, 25ng/ml), las células fueron fijadas. Las flechas señalan los cuerpos celulares y las puntas de flecha los terminales neuríticos. Escala: 20  $\mu$ m. **C.** El histograma muestra la cuantificación del crecimiento neurítico como el número de células con procesos neuríticos de longitud mayor al de un cuerpo celular y medio luego de 72 horas de tratamiento o no con BDNF. Los resultados se muestran como valores promedio  $\pm$  SD de un experimento representativo, que se realizó por triplicado. \* $p < 0.001$  (ANOVA, seguido de un post test Student Newman-Keuls). **D.** Análisis cuantitativo de la inducción del ARNm de Etv4 (rojo) y Etv5 (verde) por RT-PCR en tiempo real. Neuronas hipocámpales de rata de DIV15 fueron tratadas con BDNF (25ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de expresión fueron normalizados según la expresión de gen de *Tbp*. Se muestran promedio  $\pm$  SD de triplicados. \* $p < 0.0001$ , grupo de tratadas con BDNF (25ng/ml) vs. grupo control (sin trofina) (ANOVA, seguido de un post test de Dunnett). **E.** Análisis de la inducción por western blot de Etv4 y Etv5, en neuronas hipocámpales disociadas tratadas previamente con el inhibidor PD98059 (50  $\mu$ M) por 30 minutos y luego estimuladas con BDNF (25 ng/ml) durante 2hs. El control de carga se realizó con anticuerpo primario anti- $\beta$ tubulina, se indica debajo de cada condición las veces de cambio respecto al control para cada Etv.

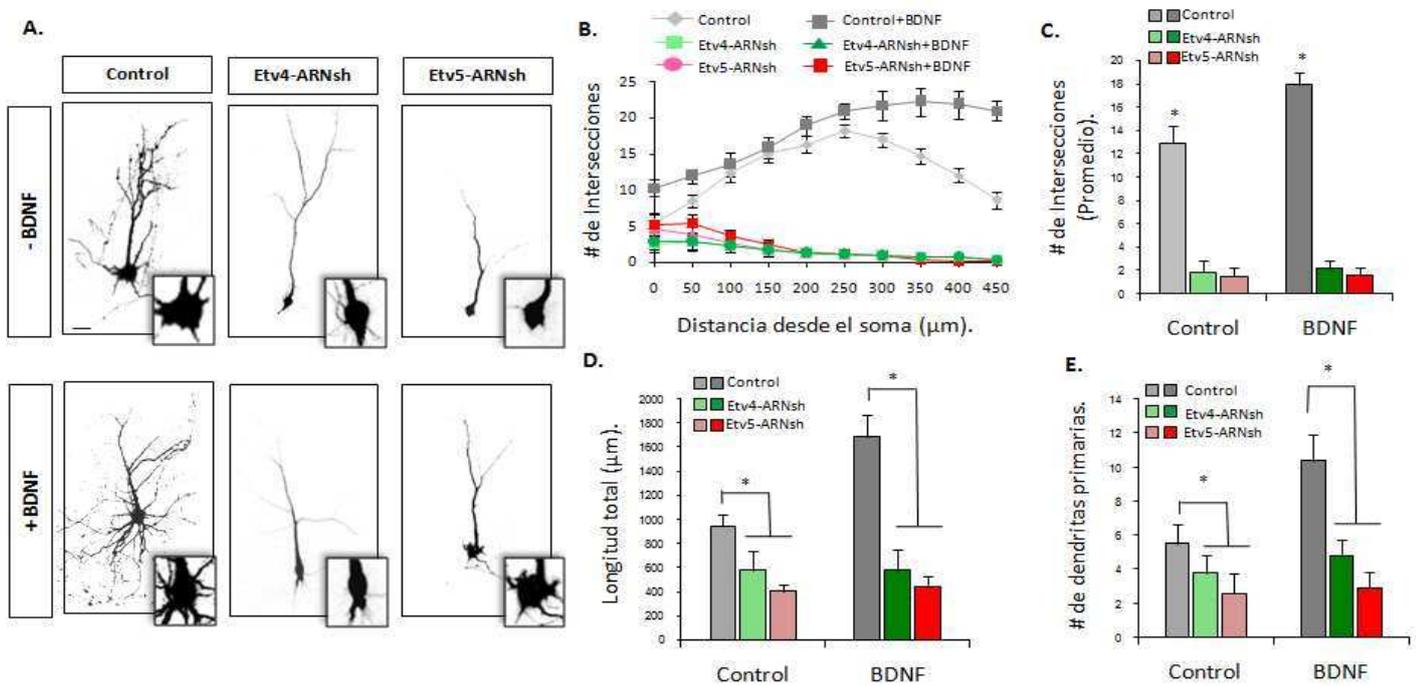


**Figura 26. Etv4 y Etv5 co-localizan con TrkB e interactúan in vivo.** **A.** Co-localización de los factores transcripcionales Etv4 y Etv5 con TrkB en secciones coronales de hipocampo de rata de P15. Se muestran inmunofluorescencias de Etv4 (verde), Etv5 (azul) y TrkB (rojo) en las regiones CA1 del hipocampo y en giro dentado (GD). Escala: 120 μm. En los paneles se muestran imágenes en alta magnificación correspondiente a las regiones CA1, donde se puede observar la co-localización de ambos factores transcripcionales y el receptor TrkB. **B.** Co-localización por inmunofluorescencia de Etv4 y Etv5 con el receptor TrkB neuronas hipocampales disociadas de rata DIV15. Panel superior: co-localización de Etv4 (azul) con TrkB (rojo). Panel medio co-localización de Etv5 (verde) con TrkB (rojo). Panel inferior: co-localización de Etv4 (azul) y Etv5 (verde) con el receptor TrkB (rojo). Las puntas de flecha indican células positivas para Etv4 y Etv5 junto con el receptor TrkB. Escala: 30 μm. **C.** Interacción entre Etv4 y Etv5 *in vivo*. Co-inmunoprecipitación entre Etv4 y Etv5 que se expresan endógenamente en el hipocampo de rata de P15. El homogenato total se dividió en dos partes iguales, una de ellas fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-HA (control) y la otra con un anticuerpo anti-Etv4. El blot fue revelado con el anticuerpo anti-Etv5, y reprobado con el anticuerpo anti-Etv4. La expresión de Etv5 en la muestra inicial (input) se muestra en el inmunoblot anti-Etv5. IP: Inmunoprecipitación, IB: inmunoblot.

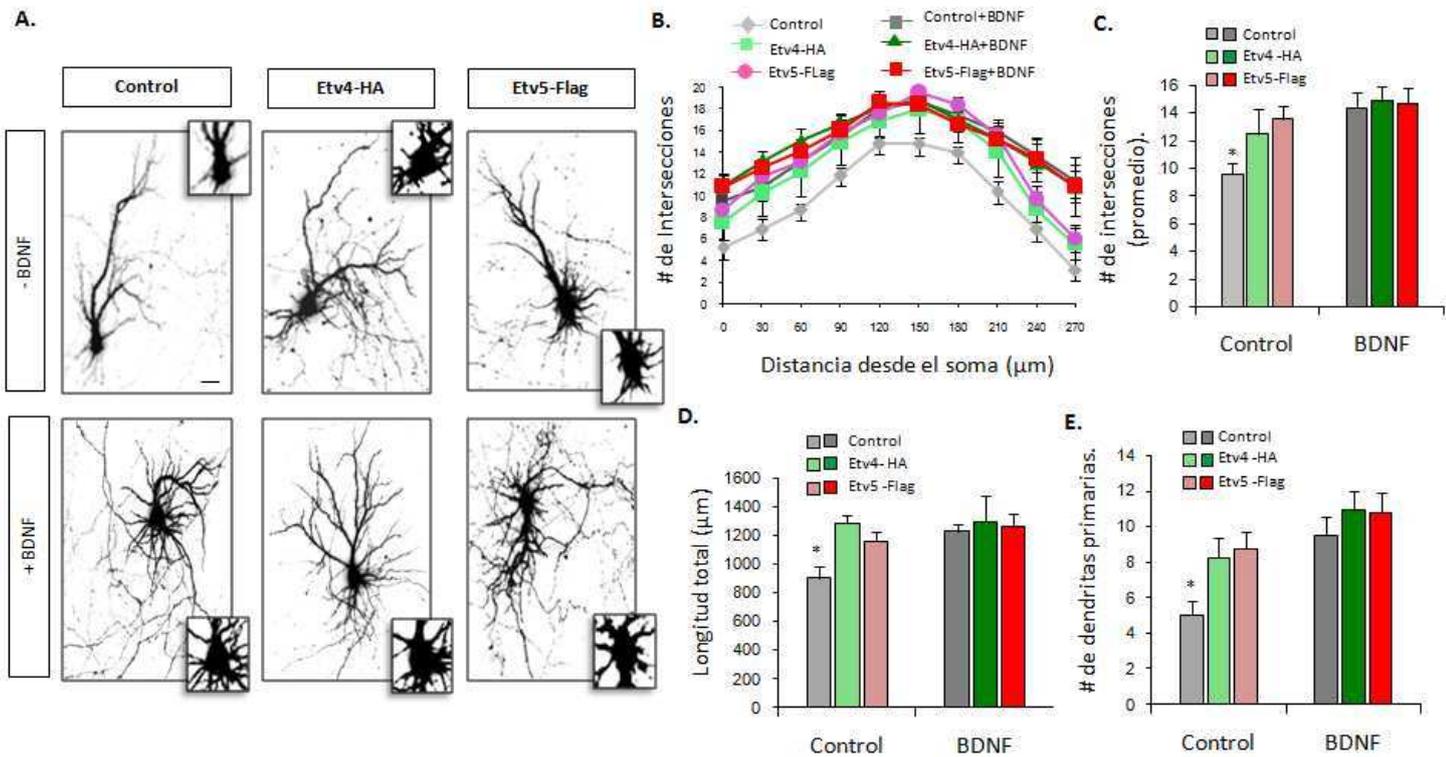
### **Etv4 y Etv5 median el crecimiento neurítico inducido por BDNF en neuronas hipocampales.**

Los resultados descritos anteriormente en la línea celular PC12, nos llevaron a estudiar en un contexto de mayor relevancia fisiológica el rol de Etv4 y Etv5 en la vía de señalización inducida por BDNF. Se sabe que el factor neurotrófico BDNF estimula el crecimiento dendrítico y la formación de espinas en neuronas hipocampales. Con el objetivo de estudiar el posible rol de Etv4 y Etv5 en la diferenciación hipocampal dependiente de BDNF, llevamos a cabo ensayos de pérdida de función en cultivos primarios hipocampales. Neuronas hipocampales de rata fueron transfectadas a DIV15 con los plásmidos que llevan secuencias para interferir la expresión de Etv4 y Etv5 (Etv4-ARNsh y Etv5-ARNsh) o con plásmido control, todos los cuales contienen secuencias de expresión de la proteína fluorescente GFP. Las neuronas se mantuvieron en presencia de BDNF durante 72 hs, luego fueron fijadas y posteriormente se analizaron diversos parámetros morfométricos (Figura 27). Evaluamos la complejidad del árbol dendrítico utilizando el análisis de Sholl (Figura 27 B). Como ha sido descrito previamente, en presencia de BDNF las neuronas transfectadas con vector control desarrollaron un aumento significativo en el número de dendritas primarias, longitud y complejidad dendrítica respecto de aquellas cultivadas en ausencia del factor. De acuerdo con un posible rol de los factores de transcripción Etv4 y Etv5 en la vía de señalización inducida por BDNF, la reducción en la expresión de estos factores de transcripción en neuronas hipocampales redujo significativamente el crecimiento dendrítico en presencia del factor trófico BDNF. Las neuronas hipocampales en las que se redujo la expresión de Etv4 y Etv5 mostraron una reducción significativa de la complejidad del árbol dendrítico, incluyendo el número de dendritas primarias y la longitud total del árbol dendrítico cuando fueron cultivadas en presencia de BDNF con respecto a los cultivos transfectados con el vector control (Figura 27). No se observaron efectos en la supervivencia neuronal como consecuencia de la reducción de los factores transcripcionales Pea3 (Horch HW. y Katz LC., 2002; Kellner Y. et al., 2014, Cheung ZH. et al., 2007). Como mostramos previamente (Figura 24) la sobreexpresión para los factores de transcripción Etv4 o Etv5 en cultivos primarios hipocampales resultó en un aumento de la complejidad del árbol dendrítico (Figura 28 B), el crecimiento neurítico total (Figura 28 C) y en el número de dendritas primarias (Figura 28 D) en comparación al grupo control, en ausencia del factor neurotrófico BDNF. El aumento de los parámetros morfométricos que resultaron de la

sobreexpresión de Etv4 y Etv5 fue similar a los valores de estos parámetros obtenidos cuando cultivos control fueron mantenidos en presencia de BDNF. Estos resultados sugieren que estos factores de transcripción, Etv4 y Etv5, actuarían como mediadores del efecto biológico de BDNF en cuanto el crecimiento y complejidad del árbol dendrítico. Sin embargo no se observó una potenciación de tales parámetros morfométricos cuando las neuronas que sobreexpresan Etv4 o Etv5 fueron tratadas con el factor trófico BDNF con respecto a las células control cultivadas en presencia de la trofina, indicando que en presencia de BDNF la sobreexpresión de estos factores no es suficiente para inducir un crecimiento aún mayor que el promovido por BDNF.



**Figura 27. Etv4 y Etv5 son requeridos para el crecimiento dendrítico hipocampal inducido por BDNF.** A. Imágenes de neuronas hipocampales transfectadas con el vector control o vectores que contienen las secuencias Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh y expresan GFP. Las neuronas hipocampales de rata fueron transfectadas a DIV15 y tratadas con BDNF (25 ng/ml) como se indica en la figura durante 72 hs y teñidas con anticuerpos anti-GFP. Escala: 30 μm. La supervivencia neuronal fue evaluada usando la tinción nuclear de DAPI, considerando a las células GFP positivas con núcleos condensados o fragmentados como neuronas apoptóticas. Se muestran imágenes a alta magnificación, donde puede observarse las dendritas primarias en cada uno de los grupos experimentales. B. Análisis de Sholl del árbol dendrítico de neuronas hipocampales transfectadas GFP positivas. Los histogramas muestran cuantificación del número total de intersecciones (C) y la longitud dendrítica total (D) y número de dendritas primarias (E) para cada uno de los grupos experimentales. \*  $p < 0.001$  (ANOVA, seguido de un test de Bonferroni). Se muestra los valores promedio  $\pm$  SD de un ensayo representativo. Estos ensayos fueron realizados por triplicado con resultados similares.

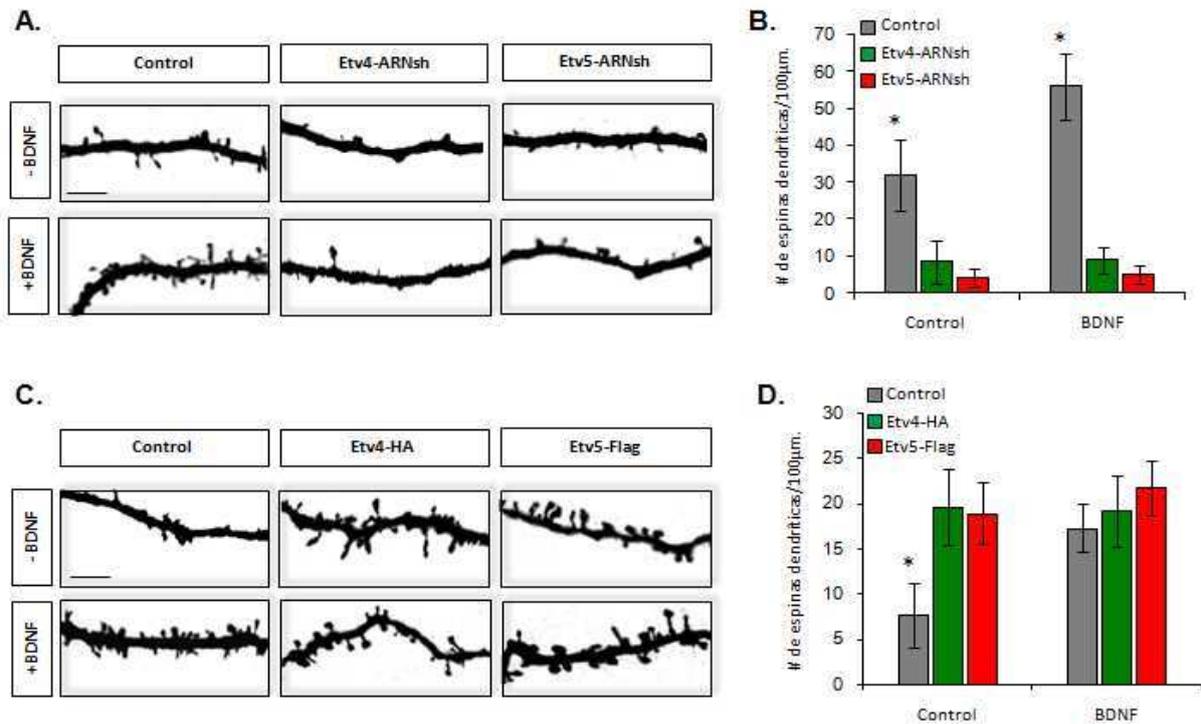


**Figura 28. La sobreexpresión de Etv4 o Etv5 simula el desarrollo del árbol dendrítico inducida por BDNF.** A. Imágenes de neuronas hipocámpales de ratón transfectadas con el vector control o vectores que contienen las secuencias Etv4-HA o Etv5-Flag y el vector de expresión de la proteína fluorescente GFP. Las neuronas hipocámpales de ratón fueron transfectadas a DIV10 y tratadas con BDNF (25 ng/ml) como se indica en la figura durante 72 hs y teñidas con anticuerpos anti-GFP. Escala: 30μm. Se muestran imágenes a alta magnificación, donde puede observarse las dendritas primarias en cada uno de los grupos experimentales. B. Análisis de Sholl del árbol dendrítico de neuronas hipocámpales GFP positivas. C. El histograma muestra el número de intersecciones para cada uno de los grupos experimentales. \* p<0.001 (ANOVA, seguido de un test de Bonferroni). D. Cuantificación del crecimiento neurítico total. E. cuantificación del número de dendritas primarias. \* p<0.001 (ANOVA, seguido de un test de Bonferroni). Se muestra los valores promedio ± SD de un ensayo representativo. Estos ensayos fueron realizados por triplicado con resultados similares.

### Etv4 y Etv5, dos factores de transcripción, involucrados en la formación de espinas sinápticas inducidas por BDNF en neuronas hipocámpales.

Entre los efectos fisiológicos que desempeña BDNF descritos en la bibliografía, se encuentra el proceso de sinaptogénesis. Las espinas sinápticas son los sitios post-sinápticos de la mayoría de las sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central (Harris KM. y Kater SB., 1994; Hiester BG. et al., 2013). A pesar de la diversidad de señales moleculares que fueron propuestas como ejecutoras de la formación de espinas sinápticas (Lin YC. y Koleske AJ., 2010), aún no se conoce los mecanismos que gobiernan tal proceso. Con el fin de analizar si Etv4

o Etv5 podían actuar como mediadores de BDNF en la formación de espinas, se realizaron ensayos de ganancia y pérdida de función en neuronas hipocampales. Cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata fueron transfectadas a los 15 días de cultivo *in vitro* con los vectores control o aquellos que llevan las secuencias para interferir la expresión de Etv4 o Etv5, Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh y fueron mantenidos en presencia o ausencia de BDNF durante 72hs. Los cultivos posteriormente fueron fijados y teñidos con anticuerpos anti-GFP para su análisis. De acuerdo a lo esperado las neuronas transfectadas con el vector control y crecidas en presencia de BDNF mostraron un incremento significativo en la densidad de espinas dendríticas con respecto a aquellas no tratadas con la neurotrofina. Las neuronas con reducción en los niveles de Etv4 y Etv5 mostraron una disminución significativa en el número total de espinas (Figura 29 A y B). La clasificación morfológica de las protrusiones dendríticas reveló que espinas dendríticas de diferentes estadios de maduración se vieron igualmente afectadas por la reducción en los niveles de estos factores transcripcionales (dato no mostrado). Estos resultados, indican que Etv4 y Etv5 son necesarios para la formación y/o estabilización de espinas inducidas por el factor neurotrófico BDNF. Posteriormente, analizamos si la sobreexpresión de estos factores sería suficiente para inducir el crecimiento de espinas dendríticas en presencia del factor trófico, BDNF. Para ello se transfectaron neuronas hipocampales de ratón mantenidas *in vitro* durante 10 días con los plásmidos control o Etv4-HA o Etv5-Flag junto con el plásmido de expresión de la proteína fluorescente GFP y se mantuvieron en presencia o ausencia de BDNF durante 72hs. Los cultivos fueron fijados y posteriormente teñidos con un anticuerpo primario anti-GFP para visualizar las espinas. Los resultados indicaron que tanto la sobreexpresión de Etv4 como de Etv5, independientemente, indujo un aumento significativo en la densidad de espinas sinápticas en neuronas cultivadas en ausencia de BDNF, similar al incremento en el número de espinas observados cuando células control fueron mantenidas en presencia de BDNF. Sin embargo, no se observó un incremento en la densidad de espinas cuando los factores Etv fueron sobreexpresados en neuronas hipocampales en presencia de BDNF, indicando que la sobreexpresión de Etv4 y Etv5 son suficientes para alcanzar el mismo nivel de espinas que el tratamiento con BDNF (Figura 29 C y D).

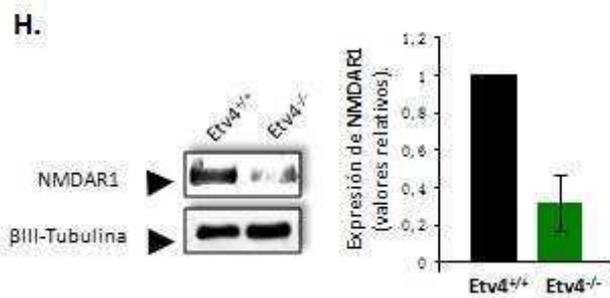
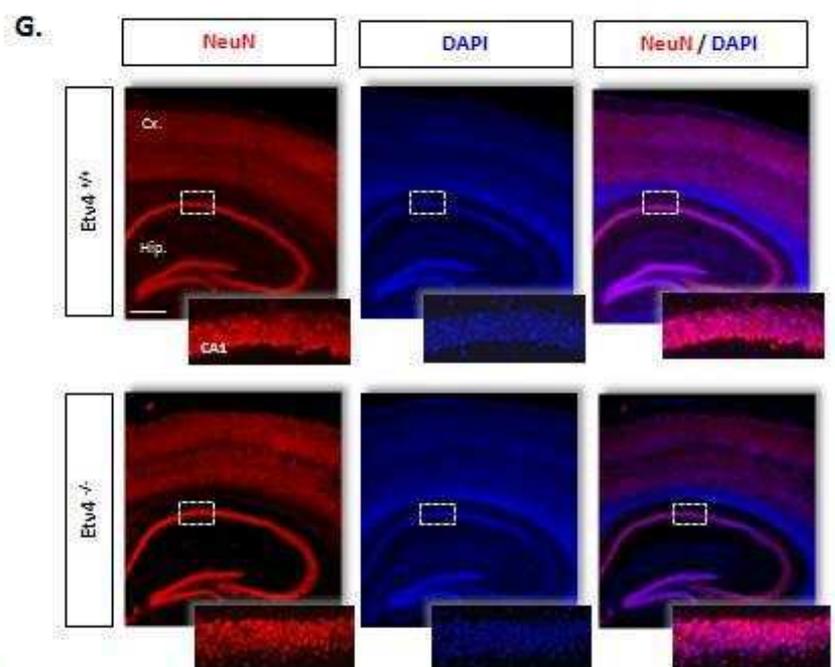
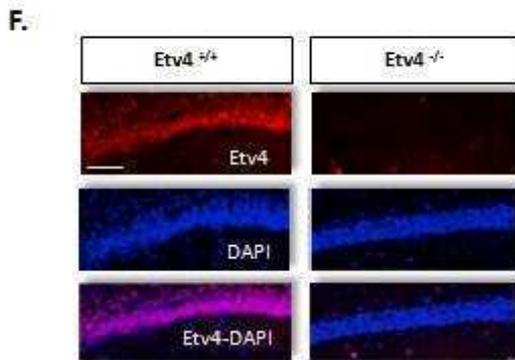
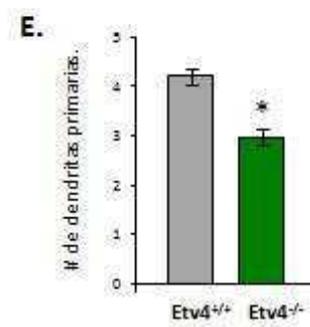
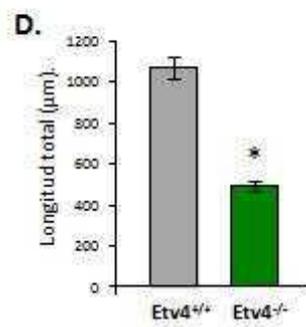
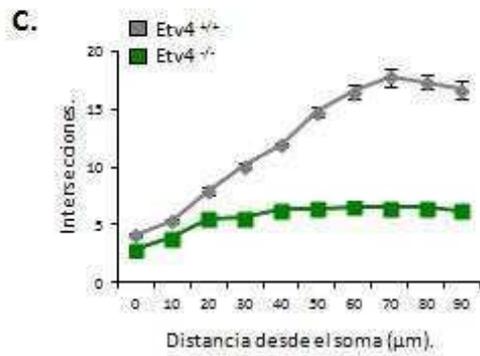
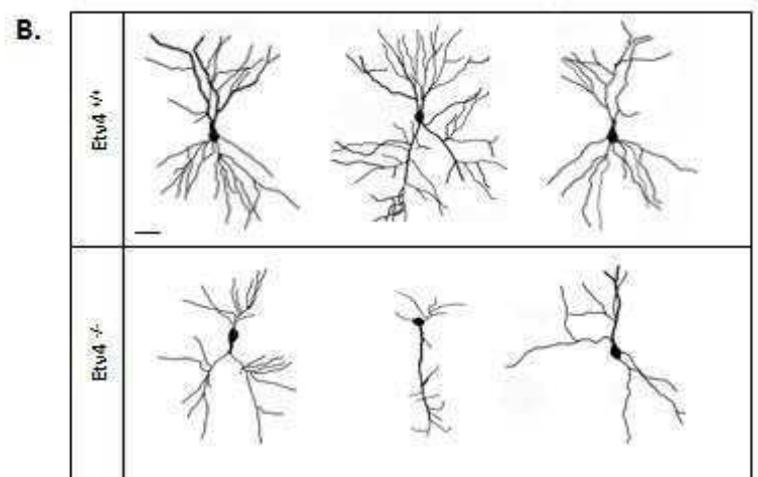
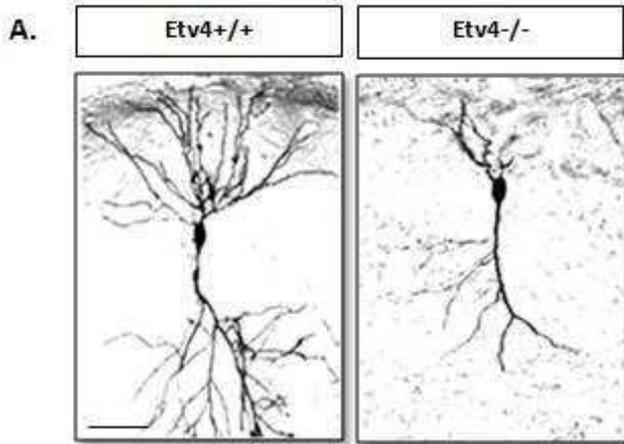


**Figura 29. ETV4 y ETV5, factores de transcripción que modulan la formación de espinas sinápticas en neuronas hipocámpales.** **A.** Imágenes de microscopía confocal de fragmentos dendríticos de neuronas hipocámpales de rata transfectadas a DIV15 con el vector control o vectores que contienen las secuencias ETV4-ARNsh o ETV5-ARNsh. Las neuronas fueron transfectadas a DIV15 y tratadas con BDNF (25 ng/ml) como se indica en la figura durante 72 hs y teñidas con anticuerpos anti-GFP. Escala: 10 μm. **B.** el gráfico de barras muestra la cuantificación del número de espinas totales en cada grupo experimental. **C.** Imágenes de microscopía confocal de fragmentos dendríticos en neuronas hipocámpales de ratón co-transfectadas a DIV 10 con los vectores control o los que contienen las secuencias de ETV4-HA o ETV5-Flag junto el vector de expresión de la proteína GFP y tratados o no, con BDNF (25 ng/ml) por 72 horas. Escala: 5 μm. **D.** El histograma muestra la cuantificación del número de espinas totales en cada grupo experimental. \* p<0.001 (ANOVA, seguido de un test de Bonferroni). Se muestra los valores promedio ± SD de un ensayo representativo. Estos ensayos fueron realizados por triplicado con resultados similares.

### ETV4 es necesario para el desarrollo del circuito hipocámpal.

Para evaluar el rol fisiológico del factor de transcripción ETV4 en el desarrollo del árbol dendrítico de neuronas hipocámpales, analizamos la complejidad de las neuronas hipocámpales de ratones deficientes en ETV4 (ETV4<sup>-/-</sup>, Laing MA. et al., 2000). Para ello, utilizamos la técnica de la impregnación argéntica de Golgi en cerebros de ratones control salvajes (wild type, ETV4<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en ETV4 (ETV4 Knockout - KO, ETV4<sup>-/-</sup>). La técnica de impregnación argéntica de Golgi, permite obtener neuronas teñidas de manera irregular en la sección de tejido, lo que hace posible visualizar neuronas aisladas para el estudio morfométrico.

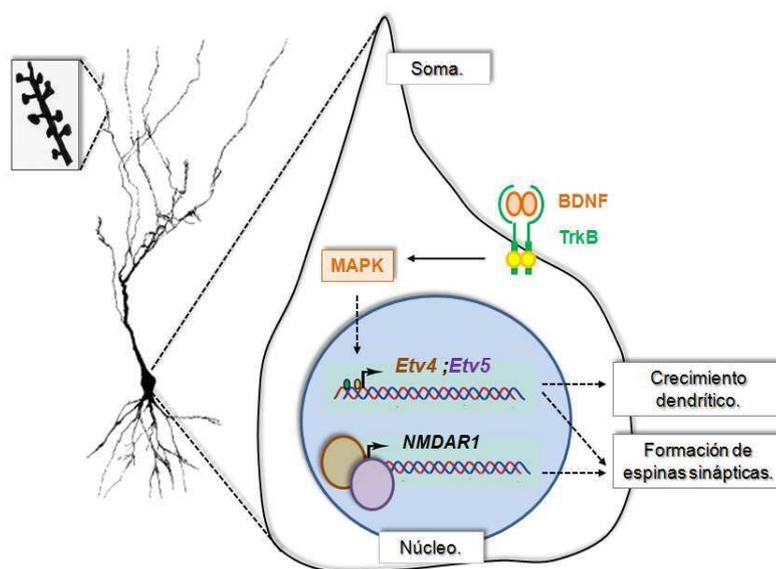
Se evaluó el crecimiento y la complejidad del árbol dendrítico en las neuronas hipocampales de la región CA1 en el hipocampo de ratones de día postnatal 15 (P15). Como puede observarse en la figura 30 los árboles dendríticos en el hipocampo de los ratones deficiente en el factor de transcripción Etv4 presentaron una complejidad (Figura 30 C) y un crecimiento neurítico total (Figura 30 D) significativamente reducido en comparación con los animales control. También se observó que el número de dendritas primarias de las neuronas de la región CA1 de los animales Etv4<sup>-/-</sup> es significativamente menor que la observada en los animales control (Figura 30 E). La ausencia de la expresión de Etv4 en estos animales fue verificada por inmunofluorescencia de Etv4 (Figura 30 F). No se observaron alteraciones groseras en el tamaño ni la organización hipocampal. Tampoco se observaron alteraciones significativas en el número de neuronas en las capas piramidales (Figura 30 G). Basados en la reducción de espinas dendríticas observadas en los cultivos hipocampales en los que se interfirió la expresión de Etv4, y en datos que indican que los factores transcripcionales Pea3 regulan la expresión de algunas proteínas sinápticas (Petersohn D. et al., 1995), analizamos en estos animales los niveles de expresión de la subunidad R1 del receptor glutamatérgico NMDA, cuya expresión es regulada por BDNF (Caldeira MV. et al., 2007). Para ello, estudiamos por western blot los niveles de expresión de estos receptores en homogenatos totales obtenidos de hipocampo de animales control (salvajes) o animales mutantes (Etv4<sup>-/-</sup>). Como se observa en la figura 30 (panel H) nuestros resultados evidenciaron una significativa reducción en los niveles de expresión de la subunidad R1 del receptor NMDA en animales mutantes respecto del control. En conjunto, estos resultados demuestran la relevancia del factor de transcripción Etv4, en el correcto establecimiento de las conexiones hipocampales *in vivo*.



**Figura 30. Etv4 participa en el crecimiento del árbol dendrítico de las neuronas de la región de CA1 del hipocampo.** **A.** Imágenes representativas de la impregnación argéntica de Golgi de la región CA1 del hipocampo de ratones  $Etv4^{+/+}$  y  $Etv4^{-/-}$  de día P15. Escala: 75  $\mu\text{m}$ . **B.** Representación de las diferentes morfologías neuronales observadas en las secciones de ratones salvajes ( $Etv4^{+/+}$ ) y mutantes ( $Etv4^{-/-}$ ). **C.** Análisis de Sholl proximal del árbol dendrítico de neuronas hipocámpales de la región CA1 de ratones control ( $Etv4^{+/+}$ ) vs. deficientes para Etv4 ( $Etv4^{-/-}$ ) de día P15. Se muestra la cuantificación del crecimiento total (**D**) y del número de dendritas primarias (**E**) de ratones control vs. deficientes para Etv4 de P15. Los resultados que se muestran son promedio  $\pm$  SD del análisis de 4 animales salvajes y 4 mutantes. \* $p < 0.001$ . **F.** Control de expresión del factor transcripcional Etv4 (rojo) en secciones coronales de cerebro de P15 de ratones salvajes ( $Etv4^{+/+}$ ) y deficientes para Etv4 ( $Etv4^{-/-}$ ), junto con la tinción para DAPI (azul). Escala: 30  $\mu\text{m}$ . **G.** Inmunotinciones con el marcador nuclear neuronal anti-NeuN (rojo) y con DAPI (azul) de secciones coronales de cerebro de ratones salvajes ( $Etv4^{+/+}$ ) y deficientes para Etv4 ( $Etv4^{-/-}$ ) de P15. Se puede ver las estructuras de la corteza cerebral (Cx) y el hipocampo (Hip). Escala: 120  $\mu\text{m}$ . Se muestran imágenes a alta magnificación de microscopía confocal, donde puede observarse la región CA1 del hipocampo. **H.** Análisis de la expresión de la subunidad R1 del receptor NMDA (NMDAR1) en el hipocampo de ratón de día P30. Homogenato total de hipocampo de ratones  $Etv4^{+/+}$  y  $Etv4^{-/-}$ , se analizó por western blot. El control de carga se realizó con anticuerpo primario anti- $\beta$ tubulina. El histograma muestra la reducción de la expresión de la subunidad NMDAR1 en el hipocampo de ratones mutantes relativo al nivel en ratones salvajes, como promedio  $\pm$  SD del análisis de 4 animales salvajes y 4 mutantes.

## IIc. Discusión.

En este trabajo caracterizamos dos factores transcripcionales de la familia Pea3, Etv4 y Etv5, como nuevos determinantes moleculares que subyacen al proceso de conectividad hipocampal. Nuestros resultados indican que Etv4 y Etv5 se expresan en neuronas hipocampales, alcanzando sus mayores niveles de expresión durante las primeras semanas postnatales que es cuando ocurren los procesos de dendritogénesis y sinaptogénesis. En este capítulo mostramos que Etv4 y Etv5 son requeridos para el desarrollo y maduración de las neuronas piramidales hipocampales. La sobreexpresión de Etv4 y Etv5 en neuronas hipocampales es suficiente para incrementar el crecimiento y complejidad dendrítica, así como también para inducir la aparición de espinas dendríticas a niveles comparables a los inducidos por la neurotrofina BDNF. En este capítulo identificamos a Etv4 y Etv5 como mediadores de los efectos de BDNF en el crecimiento y maduración dendrítica en neuronas hipocampales. También mostramos que estos factores son inducidos por BDNF y requieren la activación de la vía de MAPK para ser expresados (Figura 31).



**Figura 31. Modelo de inducción de Etv4 y Etv5 por BDNF en neuronas hipocampales.** El BDNF se une a su receptor TrkB y se activa entre otras la vía de señalización MAPK induciendo el crecimiento dendrítico y la formación de espinas mediante la expresión de los factores de transcripción Etv4 y Etv5. Estos interactúan en el núcleo e inducen la expresión de la subunidad R1 del receptor NMDA.

Finalmente el análisis de los animales deficientes en Etv4 mostró defectos en el crecimiento de las dendritas de neuronas piramidales.

### **Etv4 y Etv5 en la estructural hipocampal.**

Los factores de transcripción de la familia Pea3 han sido descritos como mediadores del crecimiento de neuronas del sistema nervioso central y periférico. Etv1 ha sido descrito en las neuronas sensoriales propioceptivas involucradas en la formación de la conexión sensorial propioceptiva-motora. Previamente nosotros hemos descrito a Etv4 y Etv5 como factores requeridos para el crecimiento de neuronas sensoriales nociceptivas del DRG. Poco se conoce sobre el rol de estos factores de transcripción en el desarrollo del sistema nervioso central. Etv1 es el miembro más estudiado de la subfamilia y ha sido descrito en subpoblaciones específicas de motoneuronas, en neuronas del cerebelo y en estadios tempranos del desarrollo cortical. Estudios previos muestran que Etv4 cumple un rol importante en el control de del patrón dendrítico y la conectividad de una subpoblación de motoneuronas (Lin JH. et al., 1998; Vrieseling E. et al., 2006). En estas neuronas, la expresión de Etv4 es inducida por el factor neurotrófico derivado de la glia, GDNF (Haase G. et al., 2002). La expresión de los tres miembros de la familia Pea3 ha sido descrita en el desarrollo de la corteza cerebral. Mientras Etv4 y Etv5 se expresan en la región del telencéfalo rostral, precursora del hipocampo, Etv1 se expresa en la zona marginal de la corteza (Zimmer C. et al., 2010). La expresión de los tres factores sería inducida por el factor trófico FGF (factor de crecimiento fibroblástico), en particular FGF18 liberado por las neuronas de la placa cortical de la corteza. En estas células, la expresión de estos factores transcripcionales sería necesaria para su migración hacia las capas más externas de la corteza cerebral (Hasegawa H. et al., 2004).

En este trabajo describimos que tanto Etv4 como Etv5 se expresan desde edades tardías en el desarrollo embrionario hipocampal hasta el adulto, teniendo un máximo de expresión en el período de dendritogénesis y sinaptogénesis hipocampal (Ben-Ari Y., et al, 2007). Basados en este dato y el rol descrito para los factores Pea3 en los procesos de diferenciación neuronal estudiamos la participación de los mismos en el desarrollo y maduración de neuronas hipocampales. Nuestros datos indicaron que tanto Etv4 como Etv5 son requeridos

para el apropiado crecimiento del árbol dendrítico y desarrollo de espinas dendríticas. Sin embargo hasta el momento no hemos podido evaluar si este efecto es específico afectando solo las dendritas o es un efecto general sobre el crecimiento neuronal, que además involucra al axón. Nuestros ensayos nos permiten concluir que existe un efecto sobre el crecimiento dendrítico, pero la evaluación del crecimiento axonal requerirá el uso de cultivos más jóvenes y la utilización de marcadores axonales específicos.

La interferencia de la expresión de Etv4 y Etv5 en cultivos maduros resultó en árboles dendríticos menos desarrollados y complejos que cultivos control más jóvenes, indicando que la reducción de los niveles de estos factores en células hipocampales lleva a una retracción de los procesos dendríticos. La utilización de técnicas de video microscopía en tiempo real nos permitirán analizar este efecto con mayor detalle. Estos resultados sugieren que los niveles de Etv4 y Etv5 deberían estar altamente controlados durante el establecimiento de las conexiones hipocampales específicas. Factores extrínsecos como la actividad neuronal y la presencia de factores solubles como los factores neurotróficos podrían estar involucrados en el control de la expresión de estos factores transcripcionales, como ha sido descrito para Etv1 en cerebelo (Haruka A. et al., 2012).

#### **Etv4 y Etv5 median los efectos de BDNF en neuronas hipocampales.**

Los factores neurotróficos desempeñan un rol importante en el desarrollo y regulación del árbol dendrítico en diferentes poblaciones neuronales del sistema nervioso (Scott EK. y Luo L., 2001; Bibel M. y Barde YA., 2000). Existen amplias evidencias que indican que los distintos miembros de la familia Pea3 son regulados por los factores neurotróficos. Entre ellas Etv1 es inducido por NT3 en neuronas sensoriales propioceptivas, Etv4 por GDNF en motoneuronas espinales, Etv4 y Etv5 por NGF en neuronas sensoriales nociceptivas.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de ganancia de función para Etv4 o Etv5, muestran un aumento en el número de dendritas primarias y una complejidad dendrítica mayor en comparación a las neuronas control similar al observado en presencia del factor neurotrófico BDNF. Basados en estos datos decidimos analizar si Etv4 y/o Etv5 podrían ser mediadores de los efectos biológicos disparados por BDNF en células hipocampales.

El factor trófico BDNF es la neurotrofina más estudiada en la promoción y regulación del crecimiento y ramificación del árbol dendrítico neuronal (Segal RA. et al., 1995; McAllister AK. et al., 1996; McAllister AK. et al., 1997; Schwartz PM. et al., 1997; Baker RE. et al., 1998; Jin X. et al., 2003) y en el aumento del número de dendritas primarias de neuronas piramidales (McAllister AK. et al., 1995; Baker RE. et al., 1998; Horch HW. et al., 1999). Sin embargo poco es lo que se conoce acerca de los programas transcripcionales que se encienden o se apagan en respuesta a este factor trófico (Horch HW. y Katz LC., 2002). En este trabajo demostramos que Etv4 y Etv5 son inducidos por BDNF en neuronas hipocampales a través de la activación de la vía MEK/MAPK y son mediadores de los efectos biológicos de este factor sobre neuronas hipocampales. Es conocido el efecto de BDNF sobre la plasticidad estructural y funcional del hipocampo regulando la expresión tanto de proteínas moduladoras del citoesqueleto como proteínas propias de la densidad postsináptica (Cohen S. y Greenberg ME, 2008; Reichardt LF, 2006). En este trabajo logramos identificar a Etv4 y Etv5 como factores de transcripción involucrados en la formación de espinas dendríticas. Es interesante mencionar que estos factores transcripcionales han sido descritos como mediadores de la expresión de proteínas involucradas en eventos de plasticidad sináptica como la proteína presináptica, sinapsinII (Petersohn D. et al., 1995). Será importante identificar cuáles son aquellos genes cuya expresión es regulada por Etv4 y Etv5 en neuronas hipocampales que podrían estar involucrados en los procesos de desarrollo y maduración dendrítica.

#### **Relevancia fisiológica de los factores de transcripción Etv4 y Etv5 en el desarrollo hipocampal.**

Ratones deficientes en Etv4 mostraron defectos en el crecimiento y en la complejidad de las neuronas piramidales de CA1, pero no se observaron diferencias en el número de neuronas piramidales comparado con ratones control. No se observaron cambios groseros en las distintas regiones hipocampales en los ratones mutantes con respecto a los ratones control. Los déficits observados en el desarrollo de las neuronas hipocampales en los ratones mutantes para Etv4 plantean la importancia de llevar a cabo ensayos comportamentales que involucren a estas neuronas. También será importante analizar los ratones deficientes en Etv5 en cuanto a la morfología neuronal y comportamiento. Basados en los resultados obtenidos *in vitro*, esperamos observar defectos en el crecimiento de neuronas piramidales en los animales mutantes para Etv5.

Nuestros datos indican que Etv4 y Etv5 se co-expresan en la mayoría de las neuronas hipocampales y son capaces de interactuar entre sí. Sin embargo los resultados de ganancia y pérdida de función indican que actuarían en forma independiente y que sus funciones no podrían ser compensadas entre sí en neuronas hipocampales.

Está ampliamente documentada la relación de las deficiencias en la maduración dendrítica con el desarrollo de enfermedades como son el autismo, la esquizofrenia y el retardo mental. Nuestros hallazgos indican la participación de Etv4 y Etv5 en la conectividad hipocampal y predicen el desarrollo de defectos cognitivos en animales deficientes en estos factores. Será interesante analizar si el ensamblado inapropiado de las conexiones sinápticas debido a mutaciones que afectan a estos factores transcripcionales podría tener implicancias en la aparición de enfermedades del neurodesarrollo caracterizadas por defectos cognitivos.

## **IId. Materiales y Métodos.**

**Proteínas Recombinantes, líneas celulares y Ratón Etv4 KO.** La línea celular PC12 (línea celular tumoral derivada de feocromocitoma de la glándula adrenal de rata; Greene LA., 1976) se creció en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), 5% suero de caballo y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen; Shirazi Fard et al., 2010), suplementado como se describe en la sección Id del primer capítulo en esta tesis. El factor neurotrófico BDNF fue obtenido de R&D Systems (Abingdon, UK). El ratón transgénico deficiente para Etv4 es el descrito en el trabajo de Livet et al., 2002. Según lo descrito previamente (Laing MA. et al., 2000) se insertó un cassette IRES-NLS-LacZ en el exón 6 que codifica para el dominio de unión al ADN, y de esta forma se logró inactivar la función del factor de transcripción. Los animales mutantes ( $Etv4^{-/-}$ ) se obtienen con una frecuencia 1/8, y se utilizaron los siguientes primers para su genotipo: 5'-TCTGGACCCTCTCCAGGTGATG-3' y 5'-CCACCAGAACTGCCACAGTTG-3' (alelo wild type, tamaño del producto: 501 pb), 5'-AACGAGATCAGCAGCCTCTGTTC-3' y 5'-GGCTGGCCGGTTCTTCTGGATAC-3' (alolo mutado, tamaño del producto: 450 pb).

**Transfección transciente de células.** La línea celular PC12 fue transfectadas con el reactivo de transfección Xtreme Gene (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante, como se describe en la sección Id del primer capítulo en esta tesis. En los ensayos de pérdida de función se realizaron co-transfectando con el vector que contiene la secuencia codificante para TrkB (Bibel M. et al., 1999) y vectores control, Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh que contienen la secuencia codificante para la proteína fluorescente GFP. En el caso de los cultivos primario hipocampales, se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250  $\mu$ l de medio Neurobasal con 1  $\mu$ g de ADN total/ pocillo en placas de multiwell P24. En los ensayos de pérdida de función se realizó la transfección con la totalidad del plásmido control, Etv4-ARNsh o Etv5-ARNsh, que expresan la proteína fluorescente verde (GFP), por pocillo. En cambio en los ensayos de ganancia de función se realizaron co-transfecciones con el vector de GFP (de Clontech) y los vectores control (pcDNA3), Etv4-HA o Etv5-Flag, usando una relación 1:10

respectivamente. Los tres vectores fueron obtenidos de Cellogenetics, Inc. Los vectores Etv4-ARNsh, Etv5-ARNsh, Etv4-HA y Etv5-Flag, son los mismos que se utilizaron en los experimentos del primer capítulo (Fontanet P. et al, 2013)

**Ensayo de diferenciación.** Para los ensayos de diferenciación, el vector control Etv4-ARNsh y Etv5-ARNsh, que expresan la proteína GFP, fueron co-transfectados con el de expresión del receptor de BDNF, TrkB, en una relación 10:1 respectivamente. Las células PC12 se sembraron un día antes de la transfección en placas de 35 mm de diámetro. Los vectores se transfectaron con el agente de transfección Xtreme Gene (Roche) y se los incubó durante 24 horas. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 24 wells, en medio completo (DMEM, 10% Suero Fetal Bovino, 5% Suero de Caballo, Glutamax y penicilina/streptomycin, suplementado como se describe en la sección Id del Capítulo 1). Luego de 16 horas, el medio completo fue reemplazado por medio sin suero en presencia o ausencia de BDNF (25ng/ml) a las concentraciones indicadas. Después de 72 horas, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

**Cultivos primarios de hipocampo de rata.** La estructura del hipocampo fue disecada de embriones de rata de E17.5 y luego se realizó una disgregación mecánica seguido del cultivo de las células en medio completo hipocampal (medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% B27 (Gibco), penicilina/streptomycin (Invitrogen) y glutamax (2 mM, Gibco)) según se describe en el trabajo de Paratcha G. (2003). Las células se plaquearon en multiwell P24 sobre una matriz de poly-D-lisina (PDL, 10 µg/ml, Sigma).

**Cultivos primarios de hipocampo de ratón.** La estructura del hipocampo fue disecada de ratones neonatos (P0) y luego se realizó una disgregación enzimática seguida de una mecánica. La disgregación enzimática se realizó con papaina (45U) y ADNsa (0.05%) en medio de cultivo Hank's, a 37 °C 20 min. La actividad enzimática se detuvo con el agregado de DMEM 10%. Luego los hipocampos se disgregaron mecánicamente y las neuronas disociadas se plaquearon en multiwell P24 sobre una matriz de poly-D-lisina (PDL, 10 µg/ml, Sigma). Dos horas más tarde el medio se reemplaza por medio completo hipocampal.

**Ensayos de inmunoprecipitación y western blot.** El hipocampo disecado de rata en diferentes edades fue resuspendido en un buffer de homogeneización 1% tritonX-100, 2% Octil-glicosil e inhibidores de fostatasas y proteasas, a 4°C. El homogenato resultante y se clarificó (10 minutos a 10.000g quedando sobrenadante, S1 y pellet, P1) y fue analizado por western blot.

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación se preparó un extracto nuclear, a partir de la fracción P1, producto del clarificado anteriormente mencionado. El pellet (P1) fue homogeneizado en un buffer 20 mM Hepes, 0.4 KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM EDTA, 1% NP40, e inhibidores de fostatasas y proteasas, en agitación 1 hora a 4°C. El homogenato fue centrifugado 30 minutos a 14.000g a 4°C y el sobrenadante fue incubado con anticuerpo primario anti-HA (como anticuerpo control inespecífico) o anti-Etv4 (2 µg/ml) durante 12-16 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se agregaron microesferas de proteína G-Sepharosa (Gammabind Plus Sepharose GE Healthcare, gamma bind beads), 50 µl por cada 1 ml de homogenato y se las incubó 2 horas a 4°C en agitación. Las muestras fueron centrifugadas y las proteínas inmunoprecipitadas disueltas en el buffer de siembra para ser analizadas por western blot. Después de la electrophoresis, las muestras fueron transferidas a membranas de PVDF e incubadas con los anticuerpos indicados según Paratcha G. (2003). Los anticuerpos utilizados fueron: anti-Etv4 (1:400, Santa Cruz Biotechnology), anti-Etv5 (1:400, Santa Cruz Biotechnology), anti-NMDAR1 (1:1000, SIGMA), anti-βIII tubulina (1:3000; Promega) y anti-HA (Roche). Las membranas de PVDF fueron escaneadas en el scanner Storm 845 PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences) y la cuantificación se realizó con el software ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

**Inmunofluorescencia.** Secciones coronales de cerebro de P15 de rata, P0 o P30 de ratón; fueron teñidas con anticuerpos primarios anti-Etv4 y/o anti-Etv5, NeuN, TrkB, βIII tubulina o MAP2. Brevemente, se realizó una permeabilización de 1% TritonX-100 (Sigma) en PBS, luego se bloqueó en 10% suero normal de burro en PBS seguido de la incubación con el anticuerpo primario en 3% seroalbumina bovina (BSA) en PBS. Para las inmunocitofluorescencias, difirió en que la permeabilización de las células plaqueadas se realizó con 0.3% Tritón X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios empleados según se

indican en cada figura fueron: anti-Etv4 (1:400, Santa Cruz Biotechnology), anti-Etv5 (1:400, Santa Cruz Biotechnology), anti-NeuN (1:1000, Milipore), anti-MAPII y anti-Tau1 total (1:1000, Sigma), anti-TrkB (1:2000, R&D) y anti- $\beta$ III Tubulina (1:5000, Promega). La incubación de los anticuerpos secundarios (de Jackson ImmunoResearch) se realizó a temperatura ambiente 1 hora en una dilución 1:300 en BSA 3% en PBS. Finalmente, después de lavar el anticuerpo secundario, las células fueron incubadas con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) (1/10000). Las imágenes fueron obtenidas en el microcopio invertido Olympus IX-81 o en el microscopio confocal Olympus, según se indica en la leyenda de cada figura.

**Impregnación Argéntica de Golgi.** Brevemente, los cerebros de ratones de P15 fueron incluidos en la solución fijadora (formalina 10% en agua, Sigma) durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, se transfirieron a una solución de dicromato de potasio 3% en agua, durante tres días a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, los cerebros fueron transferidos a una solución de nitrato de plata 2% en agua durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los cerebros fueron procesados en vibrátomo, en secciones de 100  $\mu$ m de espesor. Éstas fueron colectadas en una solución de gelatina 0.3% en agua (de ReearchAG), secadas al aire, deshidratadas (etanol 95%-etanol 100%-xilol) y montados con bálsamo de Canadá en portaobjetos gelatinizados. Se analizó la complejidad del árbol dendrítico de neuronas de la región CA1 del hipocampo mediante el análisis de Sholl. También se cuantificó el número de dendritas primarias, y el crecimiento neuronal total. Se tomaron imágenes de campo claro en el microscopio Olympus IX-81.

## Discusión General.

Los miembros de la familia Pea3 fueron inicialmente descritos como proteínas oncogénicas y es amplia la bibliografía que describe su rol en el desarrollo y progresión de distintos tipos tumorales. Numerosas evidencias indican que su expresión está aumentada en células tumorales en diferentes neoplasias e incluso se los utiliza como indicadores de la agresividad e invasividad tumoral (Oh S. et al, 2012). Sin embargo cada vez es mayor el número de evidencias que indican una importante función de estos factores transcripcionales en procesos del desarrollo normal. En general todos los eventos en los que han sido descritos estos factores involucran la remodelación de la matriz extracelular. La participación de estos factores en procesos de proliferación como de diferenciación requiere que los mismos estén altamente regulados. Esta regulación puede deberse a los niveles de expresión (entendiéndose como la tasa de expresión/degradación, Kageyama R. et al., 2008), los distintos tipos de modificaciones post-traduccionales (Hand R. et al., 2005; Ma YC. et al., 2008) y/o a la interacción con diferentes cofactores u otros factores transcripcionales. Esto último, hace posible su participación en procesos biológicos diferentes e incluso opuestos. Recientemente se ha descrito que el factor transcripcional Ascl1, considerado inicialmente como un factor de diferenciación neuronal, participa también en la proliferación de progenitores neuronales (Castro DS. et al., 2011). La interacción con distintos factores, constituye un mecanismo que permite un cambio eficiente y rápido de un estado neuronal proliferativo a uno postmitótico, asegurando que los programas transcripcionales de cada estado o contexto sean mutuamente excluyentes.

Nuestros datos revelaron un rol esencial de **Etv4** y **Etv5** en los procesos de diferenciación neuronal disparado por factores neurotróficos, es por ello que resulta interesante la identificación de los programas transcripcionales regulados por estos factores en los distintos tipos neuronales.

En este trabajo identificamos a dos metaloproteasas (**MMP3** y **MMP13**) como alguno de los genes relevantes en el crecimiento de las neuronas sensoriales nociceptivas que estarían regulados por Etv4 y Etv5, sin embargo es claro que estas no serían las únicas moléculas involucradas en este proceso.

En cuanto a nuestros hallazgos del rol de Etv4 y Etv5 en neuronas hipocampales no hemos estudiados hasta el momento si algún miembro de la familia de metaloproteasas estaría involucrada en los procesos de remodelación dendrítica descritos, siendo que en la literatura se encuentra descrito el rol de diferentes MMPs en el crecimiento dendrítico (Fujioka H. et al, 2012).

La neurotrofina NGF es un importante modulador de la respuesta inflamatoria al dolor (Bennett D. et al., 2007). Se ha identificado que mutaciones en el gen codificante para el receptor TrkA, genera una insensibilidad al dolor (Indo Y., 2002). Tales mutaciones producen un receptor inactivo que se traduce en la imposibilidad a responder a estímulos dolorosos (Yu T. et al., 2014). Defectos en la inervación de las neuronas nociceptivas hacia la piel y/o a la médula espinal, podrían resultar en deficiencias en la recepción del dolor. En esta tesis describimos un rol esencial de los factores de transcripción Etv4 y Etv5 en el desarrollo *in vitro* de las neuronas nociceptivas. Estudios preliminares en animales deficientes en Etv4 mostraron defectos en la inervación periférica embrionaria de los nervios positivos para el receptor de NGF. Aún queda por analizar que ocurriría en los animales deficientes en Etv5. Como mencionamos previamente NGF es un importante mediador de la respuesta al dolor, es por ello que será interesante evaluar en los ratones adultos deficientes en Etv4 y/o Etv5 la sensibilidad a estímulos dolorosos.

Otro de los genes que logramos identificar en esta tesis, es la **subunidad R1 del receptor de NMDA**. El análisis de ratones mutantes para Etv4, mostró una reducción significativa de los niveles del NMDAR1 en el hipocampo adulto. Estos resultados son coherentes con el trabajo de Abe H et al. (2011) donde muestra la regulación de otra subunidad del receptor de NMDA por el factor transcripcional Etv1 en el cerebelo. Estudios similares a los realizados en los ratones mutantes para Etv4, restan por hacer en aquellos deficientes para Etv5 y doble mutantes para ambos factores de transcripción. Es importante mencionar que el receptor de NMDA también se expresa en las neuronas sensoriales, y la disminución en sus niveles de expresión está asociado a hiperexcitabilidad neuronal (Pagadala P. et al., 2013). Por esto debemos estudiar si la expresión de este receptor en las neuronas del DRG se regula por los factores transcripcionales Pea3, y proponer a la subunidad R1 del receptor de NMDA como un nuevo gen blanco de estos factores transcripcionales.

En cuanto a la función de Etv4 y Etv5 como mediadores de los efectos biológicos de los factores neurotróficos será interesante identificar los interactores diferenciales de estos factores en los distintos contextos celulares estudiados en este trabajo lo cual es posible utilizando ensayos de proteómica. La presencia de una combinación específica de factores transcripcionales dependiendo del contexto celular determina un patrón transcripcional diferencial regulado por estos factores.

Con el objeto de identificar genes regulados directamente por estos factores transcripcionales será interesante llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (Chip assays) en distintos contextos neuronales del sistema nervioso periférico y central. Dado que estos factores transcripcionales son mediadores de la respuesta celular inducida por factores neurotróficos será importante analizar si Etv4 y Etv5 son requeridos para la inducción de la expresión de genes que median los procesos de regeneración del sistema nervioso.

## Bibliografía.

- Abe H, Okazawa M, Nakanishi S. (2012). Gene regulation via excitation and BDNF is mediated by induction and phosphorylation of the Etv1 transcription factor in cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;109 (22):8734-9.
- Abe H, Okazawa M, Nakanishi S. (2011) The Etv1/Er81 transcription factor orchestrates activity-dependent gene regulation in the terminal maturation program of cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12497–12502.
- Akum BF, Chen M, Gunderson SI, Riefler GM, Scerri-Hansen MM, Firestein BL. (2004). Cypin regulates dendrite patterning in hippocampal neurons by promoting microtubule assembly. *Nat Neurosci.*; 7(2):145-52.
- Albright AL, Spoto R, Holmes E, Zeltzer PM, Finlay JL, Wisoff JH, Berger MS, Packer RJ, Pollack IF. (2000). Correlation of neurosurgical subspecialization with outcomes in children with malignant brain tumors. *Neurosurgery*.;47(4):879-85; discussion 885-7.
- Alcantara S, Frisé'n J, del Rio JA, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I. (1997). TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J Neurosci* 17:3623–3633.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489 –27494.
- Amrein, I., Isler, K., and Lipp, H. P. (2011). Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur. J. Neurosci.* 34, 978–987.
- Anderton BH, Callahan L, Coleman P, Davies P, Flood D, Jicha GA, Ohm T, Weaver C. (1998). Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol* 55: 595–609.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM (2000) ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* 101:485– 498.
- Ascano M, Bodmer D, Kuruvilla R (2012) Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends Cell Biol* 22:266 –273.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. (200). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron.* ;27(2):265-77.
- Baker, R.E., Dijkhuizen, P.A., Van Pelt, J. & Verhaagen, J. (1998). Growth of pyramidal, but not non-pyramidal, dendrites in long-term organotypic explants of neonatal rat neocortex chronically exposed to neurotrophin-3. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1037–1044.
- Banker GA, Cowan WM. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.*;126(3):397-42.
- Baquet Z.C., Gorski J.A. and Jones K.R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 4250-4258.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.*; 1(5):549-53.
- Barker PA, Hussain NK, McPherson PS (2002) Retrograde signaling by the neurotrophins follows a well-worn trk. *Trends Neurosci* 25:379 –381.
- Baudet C, Mikaelis A, Westphal H, Johansen J, Johansen TE, Ernfors P (2000) Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron subpopulations, and their collaboration with neurotrophins. *Development* 127:4335– 4344.
- Bayer SA. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol.*;190(1):115-34.
- Bear MF, Dölen G, Osterweil E, Nagarajan N. (2008). Fragile X: translation in action. *Neuropsychopharmacology.*;33(1):84-7..
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.*;87(4):1215-84.
- Bennett David (2007). Department of Neurology, King's College Hospital, London, UK
- Berglund EO, Murai KK, Fredette B, Sekerkova G, Marturano B, Weber L, Mugnaini E, Ranscht B (1999) Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24: 739–750.
- Bhattacharyya A, Watson FL, Bradlee TA, Pomeroy SL, Stiles CD, Segal RA. (1997). Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *JNeurosci.*;17(18):7007-16.
- Bibel M, Barde YA. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.*;14(23):2919-37.

- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.*;18(3):616-22.
- Boedefeld WM, Soong R, Weiss H, Diasio RB, Urist MM, Bland KI, Heslin MJ. (2005). E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog.*;43(1):13-7.
- Bosc DG, Goueli BS, Janknecht R. (2001). HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene.*;20(43):6215-24.
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M. (2001). Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature.*; 409(6816):88-92.
- Brose K, Tessier-Lavigne M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol.* ;10(1):95-102.
- Brown TA, McKnight SL. (1992). Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev.* ;6(12B):2502-12.
- Brown, L. A., A. Amores, T. F. Schilling, T. Jowett, J. L. Baert, Y. de Launoit, and A. D. Sharrocks. (1998). Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor. *Oncogene* 17:93-104
- Caceres, A., Ye, B., and Dotti, C. G. (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 547–553.
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB. (2007). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.*;35(2):208-19.
- Campenot RB. (1994). NGF and the local control of nerve terminal growth. *J Neurobiol* 25:599–611.
- Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, Johnston C, Drechsel D, Lebel-Potter M, Garcia LG, Hunt C, Dolle D, Bithell A, Ettwiller L, Buckley N, Guillemot F. (1994). A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev.*;25(9):930-45.
- Cavanaugh J. E., Ham J., Hetman M., Poser S., Yan C. and Xia Z. (2001). Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J. Neurosci.* 21, 434–443.
- Cave, J. W., Akiba, Y., Banerjee, K., Bhosle, S., Berlin, R., and Baker, H. (2010). Differential regulation of dopaminergic gene expression by Er81. *J. Neurosci.* 30, 4717–4724.
- Chakravarthy S, Saiepour MH, Bence M, Perry S, Hartman R, Couey JJ, Mansvelter HD, Levelt CN. (2006). Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;103(4):1071-6.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736–2741.
- Chao MV. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* (4):299-309.
- Chapleau CA, Larimore JL, Theibert A, Pozzo-Miller L. (2009). Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *J Neurodev Disord.* ;1(3):185-96.
- Charych EI, Akum BF, Goldberg JS, Jörnsten RJ, Rongo C, Zheng JQ, Firestein BL. (2006). Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J Neurosci.*;26(40):10164-76.
- Chen CL, Broom DC, Liu Y, de Nooij JC, Li Z, Cen C, Samad OA, Jessell TM, Woolf CJ, Ma Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron.*;49(3):365-77.
- Chen L, Maures TJ, Jin H, Huo JS, Rabbani SA, Schwartz J, Carter-Su C. (2008). SH2B1beta (SH2-Bbeta) enhances expression of a subset of nerve growth factor-regulated genes important for neuronal differentiation including genes encoding urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase 3/10. *Mol Endocrinol* 22:454–476.
- Chen WP, Chang YC, Hsieh ST. (1999). Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *J Biomed Sci* 6:79–85.
- Chen Y, Dube CM, Rice CJ, Baram TZ (2008) Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 28: 2903–2911.
- Chen H, Firestein BL. (2007). RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J Neurosci.* 1;27(31):8378-86.
- Cheung, Z.H., Chin, W.H., Chen, Y., Ng, Y.P., and Ip, N.Y. (2007). Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5.
- Cholfin JA, Rubenstein JL. (2008) Frontal cortex subdivision patterning is coordinately regulated by Fgf8, Fgf17, and Emx2. *J Comp Neurol.* ;509 (2):144-55.

- Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defossez PA, de Launoit Y (1997) Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* 15:937–952.
- Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y. (2003). PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol.* ;259(2):241-57.
- Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X (2001). Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev.*; 108(1-2):191-5.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;40(10):1014-8.
- Cohen, S., and Greenberg, M.E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 183–209.
- Cooke SF, Bliss TV. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain.*;129(Pt 7):1659-73.
- Cosker KE, Courchesne SL, Segal RA. (2008). Action in the axon: generation and transport of signaling endosomes. *Curr Opin Neurobiol* 18:270–275.
- Crawford HC, Fingleton B, Gustavson MD, Kurpios N, Wagenaar RA, Hassell JA, Matrisian LM. (2001). The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors. *Mol Cell Biol.*;21(4):1370-83.
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76:1001–1011.
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA. (1997). Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 272:10957–10967.
- Dasen JS, Jessell TM. (2009). Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol.* 2009;88:169-200.
- Davidson B, Goldberg I, Tell L, Vigdorichik S, Baekelandt M, Berner A, Kristensen GB, Reich R, Kopolovic J. (2004). The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis.* ;21(3):191-9.
- Davies, A. M., Lumsden, A. G. and Rohrer, H. (1987). Neural crest-derived proprioceptive neurons express nerve growth factor receptors but are not supported by nerve growth factor in culture. *Neuroscience* 20, 37-46.
- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. (2006). The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1766:79–87.
- de Launoit, Y., A. Chotteau-Lelievre, C. Beaudoin, L. Coutte, S. Netzer, C. Brenner, I. Huvent, and J. L. Baert. (2000). The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:107-116.
- de Nooij JC., Doobar S, Jessell TM. (2013). Etv1 inactivation reveals proprioceptor subclasses that reflect the level of NT3 expression in muscle targets. *Neuron.* 2013 Mar 20;77(6):1055-68.
- Dickson BJ. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* ;298(5600):1959-64. Review.
- Drake, C.T., Milner, T.A., and Patterson, S.L. (1999). Ultrastructural localization of fulllength trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience* 19, 8009-8026.
- Ehlers MD, Tingley WG, Huganir RL. (1995). Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science.*;269(5231):1734-7.
- English CN, Vigers AJ, Jones KR. (2002). Genetic evidence that brain-derived neurotrophic factor mediates competitive interactions between individual cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;109(47):19456-61.
- Eo J, Shin H, Kwon S, Song H, Murphy KM, Lim JH. (2011). Complex ovarian defects lead to infertility in Etv5<sup>-/-</sup> female mice. *Mol Hum Reprod.*;17:568–576.
- Ewald RC, Van Keuren-Jensen KR, Aizenman CD, Cline HT. (2008). Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology in vivo. *J Neurosci* 28:850–861.
- Fariñas I, Wilkinson GA, Backus C, Reichardt LF, Patapoutian A. (1998). Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron.* ;21(2):325-34.
- Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vögelin E, Krüttgen A. (2005) The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *J Neurosci Res.*;80(1):18-28.
- Fink C. C., Bayer K. U., Myers J. W., Ferrell J. E. Jr., Schulman H., Meyer T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39:283–297.
- Frank E, Sanes JR. (1991). Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus. *Development.* ;111(4):895-908.
- Frank E, Wenner P. (1993). Environmental specification of neuronal connectivity. *Neuron.* ;10(5):779-85.

- Fujioka H, Dairyo Y, Yasunaga K, Emoto K. (2012). Neural functions of matrix metalloproteinases: plasticity, neurogenesis, and disease. *Biochem Res Int.*;2012:789083.
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA. (2003). Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling. *Nat Neurosci.* ;6(8):825-31.
- Gao FB, Kohwi M, Brenman JE, Jan LY, Jan YN. (2000). Control of dendritic field formation in *Drosophila*: the roles of flamingo and competition between homologous neurons. *Neuron* 28: 91–101.
- Ginty DD, Segal RA. (2002). Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268 –274.
- Gluzman Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* ;23(1):175-82.
- Goodman CS, Shatz CJ. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* 1993 Jan;72 Suppl:77-98.
- Gorski JA, Balogh SA, Wehner JM, Jones KR. (2003 b). Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience.*;121:341–354.
- Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR. (2003 a). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci.*;23:6856–6865.
- Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M, Crabtree GR (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113:657– 670.
- Greene LA and Kaplan DR. (1995). Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol.* (5):579-87.
- Greene LA and Tischler AS. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 73(7): 2424–2428.
- Greene LA. (1976). Binding of alpha-bungarotoxin to chick sympathetic ganglia: properties of the receptor and its rate of appearance during development. *Brain Res.* ;111 (1):135-45.
- Greene, L. A. (1978) Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J. Cell Biol.*
- Gullledge AT, Kampa BM, Stuart GJ. (2005). Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol.* 2005 Jul;64(1):75-90.
- Gunning PW., Landreth GE., Layer P., Ignatius M. and Shooter EM. (1981). Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells: evaluation of changes in RNA and DNA metabolism. *The Journal of Neuroscience.* Vol. 1, No. 4, pp. 368-379.
- Guo X, Lin Y, Horbinski C, Drahushuk KM, Kim IJ, Kaplan PL, Lein P, Wang T, Higgins D. (2001). Dendritic growth induced by BMP-7 requires Smad1 and proteasome activity. *J Neurobiol* 48: 120–130.
- Gutierrez-Hartman A, Duval DL, Bradford AP (2007). "ETS transcription factors in endocrine systems". *Trends Endocrinol Metab* 18 (4): 150–8.
- Haas K, Li J, Cline HT. (2006). AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12127–12131.
- Haase G, Dessaud E, Garcès A, de Bovis B, Birling M, Filippi P, Schmalbruch H, Arber S, deLapeyrière O.(2002) GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron.*; 35(5):893-905.
- Hagedorn L, Paratore C, Brugnoli G, Baert JL, Mercader N, Suter U, Sommer L. (2000). The Ets domain transcription factor Erm distinguishes rat satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Dev Biol* 219:44 –58.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R. (1949). Proliferation, differentiation and degeneration on the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*; 111: 457.
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48: 45–62.
- Hansen, K.F., Sakamoto, K., Wayman, G.A., Impey, S., and Obrietan, K. (2010). Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS ONE* 5, e15497.
- Harper S, Davies AM. (1990). NGF mRNA expression in developing cutaneous epithelium related to innervation density. *Development.*;110(2):515-9.
- Harrington AW, Ginty DD. (2013). Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci* 14:177–187.
- Harris KM. y Kater SB. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.*;17:341-71.
- Harrison PJ. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4): 593–624.
- Hasegawa H, Ashigaki S, Takamatsu M, Suzuki-Migishima R, Ohbayashi N, Itoh N, Takada S, Tanabe Y. (2004). Lamina patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J Neurosci.*;24:8711–8719.

- Hasegawa H., S. Ashigaki, M. Takamatsu, R. Suzuki-Migishima, N. Ohbayashi, N. Itoh, S. Takada, Y. Tanabe. (2004). Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J. Neurosci.*, pp. 8711–8719.
- Häusser M, Spruston N, Stuart GJ. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*. 2000 Oct 27;290(5492):739-44.
- Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, Cao X, Singla N, Montie JE, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. (2008). Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res.*1;68(1):73-80.
- Hiester BG, Galati DF, Salinas PC, Jones KR. (2013). Neurotrophin and Wnt signaling cooperatively regulate dendritic spine formation. *Mol Cell Neurosci.*;56:115-27.
- Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K. (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene.*;10(7):1461-3.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3:e159.
- Hippenmeyer S, Kramer I, Arber S. *Trends*. (2004). Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Neurosci.*;27(8):482-8.
- Hoheisel U, Lehmann-Willenbrock E, Mense S. (1989). Termination patterns of identified group II and III afferent fibres from deep tissues in the spinal cord of the cat. *Neuroscience.*;28(2):495-507
- Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* 80:437– 471.
- Hollenhorst PC, Ferris MW, Hull MA, Chae H, Kim S, Graves BJ. (2011). Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes Dev.*;25(20):2147-57.
- Hollenhorst PC, Jones DA, Graves BJ. (2004). Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic Acids Res.*;32(18):5693-702.
- Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC. (1992). p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* 9:465– 478.
- Hoogenraad CC, Milstein AD, Ethell IM, Henkemeyer M, Sheng M (2005) GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci*.
- Horch HW, Krüttgen A, Portbury SD, Katz LC. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron.*;23(2):353-64.
- Horch HW, Katz LC. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci.*;5(11):1177-84.
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. (2003). Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol.* ;200(5):568-76.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677–736.
- Huang EJ, Reichardt LF. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642.
- Huber AB1, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci.*;26:509-63
- Indo Y. (2002). Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin Auton Res.*;12 Suppl 1:i20-32.
- Jacobs LF, Schenk F. (2003). Unpacking the cognitive map: the parallel map theory of hippocampal function. *Psychol Rev.*;110(2):285-315.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.*;29(25):7966-77.
- Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25: 11300–11312.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN. (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* ;10(6):1229-34.
- Jessell TM, Sanes JR. (2000) Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol.*;10(5):599-611.
- Jin, X., Hu, H., Mathers, P.H., and Agmon, A. (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5662-5673.
- Jing S, Wen D, Yu Y, 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.

- Kahane N, Kalcheim C. (1994). Expression of trkC receptor mRNA during development of the avian nervous system. *J Neurobiol.*;25(5):571-84
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem*274: 26563–26571.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessel, T.M. (2000). *Principles of Neural Science*. 4th ed. McGraw Hill: New York.
- Kaneko M, Xie Y, An JJ, Stryker MP, Xu B. (2012). Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. *J Neurosci.*;32(14):4790-802.
- Kaplan DR, Miller FD. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9:213–221.
- Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA, Gunther CV, Nye JA, et al. (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.*;4(9):1451-3.
- Katz ME, McCormick F. (1997). Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* 7:75-79.
- Katz LC, Shatz CJ. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.*;274(5290):1133-8.
- Kaufmann WE, Moser HW. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex.*;10(10):981-91.
- Kellner Y, Gödecke N, Dierkes T, Thieme N, Zagrebelsky M, Korte M. (2014). The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Front Synaptic Neurosci.*;6:5.
- Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750 –754.
- Kim MS, Shutov LP, Gnanasekaran A, Lin Z, Rysted JE, Ulrich JD, Usachev YM. (2014). Nerve growth factor (NGF) regulates activity of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) in neurons via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) pathway. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7;289(45):31349-60.
- Korte M, Barde YA. (2010). Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci.*;30(5):1739-49.
- Kossel AH, Williams CV, Schweizer M, Kater SB. (1997). Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J Neurosci* 17:6314–6324.
- Kulkarni VA and Firestein BL (2012). The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci.*;50(1):10-20.
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K/Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25: 11288–11299.
- Kurpios NA., MacNeil L., Shepherd TG., Gludish DW., Giacomelli AO., Hassell JA. (2009). The Pea3 Ets transcription factor regulates differentiation of multipotent progenitor cells during mammary gland development. *Dev Biol*.
- Kuure S., Chi X., Lu B., Costantini F. (2010). The transcription factors Etv4 and Etv5 mediate formation of the ureteric bud tip domain during kidney development. *Development.*;137(12):1975-9.
- Kwon, M., Fernandez, J.R., Zegarek, G.F., Lo, S.B., and Firestein, B.L. (2011). BDNF promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 9735-9745.
- Ladle DR, Pecho-Vrieseling E, Arber S. (2007). Assembly of motor circuits in the spinal cord: driven to function by genetic and experience-dependent mechanisms. *Neuron.*;56(2):270-83.
- Laing MA, Coonrod S, Hinton BT, Downie JW, Tozer R, Rudnicki MA, Hassell JA. (2000). Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene. *Mol Cell Biol.*;20(24):9337-45.
- Lallemand F, Ernfors P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.*(6):373-81.
- Lazo O.M., Gonzalez A., Ascano M., Kuruvilla R., Couve A., and Bronfman F.C. (2013). BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 6112-6122.
- Ledda F, Bieraugel O, Fard SS, Vilar M, Paratcha G. (2008). Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *J Neurosci* 28:39– 49.
- Ledda F, Paratcha G, Ibañez CF. (2002). Target-derived GFRalpha1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron* 36:387– 401.
- Ledda F, Paratcha G, Sandoval-Guzmán T, Ibañez CF. (2007). GDNF and GFRalpha1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nat Neurosci* 10:293–300.
- Lein PJ, Guo X, Shi GX, Moholt-Siebert M, Bruun D, Andres DA. (2007). The novel GTPase Rit differentially regulates axonal and dendritic growth. *J Neurosci* 27: 4725–4736.
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stehelin D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature.*;306(5941):395-7.

- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinine. *Trends Neurosci.*;19(11):514-20.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR. (1995). Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic basal forebrain neurons. *Journal of Neuroscience.*;15:3084–3091.
- Li R, Pei H, Watson DK. (2000) Regulation of Ets function by protein-protein interactions. *Oncogene* 19:6514–6523.
- Li R, Pei H, Watson DK, Papas TS. (2000). EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene.*;19(6):745-53.
- Liang H, Mao X, Olejniczak ET, Nettesheim DG, Yu L, Meadows RP, Thompson CB, Fesik SW. (1994). Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. *Nat Struct Biol.*;1(12):871-5.
- Lin JH, Saito T, Anderson DJ, Lance-Jones C, Jessell TM, Arber S. (1998). Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* 95:393– 407.
- Lin YC, Koleske AJ. (2010). Mechanisms of synapse and dendrite maintenance and their disruption in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci.*;33:349-78.
- Livet J, Sigrist M, Stroebel S, De Paola V, Price SR, Henderson CE, Jessell TM, Arber S. (2002). ETS gene *Pea3* controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron.*;35(5):877-92.
- Lonze BE, Ginty DD. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605– 623.
- Lu B, Cebrian C, Chi X, Kuure S, Kuo R, Bates CM, Arber S, Hassell J, MacNeil L, Hoshi M, Jain S, Asai N, Takahashi M, Schmidt-Ott KM, Barasch J, D'Agati V, Costantini F. (2009). *Etv4* and *Etv5* are required downstream of GDNF and *Ret* for kidney branching morphogenesis. *Nat Genet* 41:1295–1302.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.*; 6:603–614.
- Luikart BW, Nef S, Virmani T, Lush ME, Liu Y, Kavalali ET, Parada LF. (2005). *TrkB* has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. *J Neurosci.*;25:3774–3786.
- Luikart BW, Nef S, Virmani T, Lush ME, Liu Y, Kavalali ET, Parada LF. (2005). *TrkB* has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. *J Neurosci.*;25(15):3774-86.
- Luo W, Wickramasinghe SR, Savitt JM, Griffin JW, Dawson TM, Ginty DD. (2007). Ahierarchical NGF signaling cascade controls *Ret*-dependent and *Ret*-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron* 54:739 –754.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.*;5(4):501-9.
- Mao J, McGlenn E, Huang P, Tabin CJ, McMahon AP. (2009). Fgf-dependent *Etv4/5* activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Dev Cell* 16:600–606.
- Mar M, Barde YA. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919–2937.
- Markus A, Patel TD, Snider WD. (2002). Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12:523–531.
- Marmigère F, Ernfors P. (2002). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci.*;8(2):114-27.
- Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. (2004). Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci.*;7(9):930-8.
- Mavrothalassitis G, Ghysdael J. (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene.*;19(55):6524-32.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron.*;18(5):767-78.
- McAllister A.K., Katz, L.C., and Lo, D.C. (1996). Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17, 1057-1064.
- McAllister, A.K., Lo, D.C., and Katz, L.C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15, 791-803.
- Mell LK, Ogren DS, Davis RL, Mullooly JP, Black SB, Shinefield HR, Zangwill KM, Ward JI, Marcy SM, Chen RT; Centers for Disease Control and Prevention Vaccine Safety Datalink Project. (2005). Compliance with national immunization guidelines for children younger than 2 years, 1996-1999. *Pediatrics.*;115(2):461-7.
- Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P. (2001). Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett* 502: 21–24.
- Molliver DC, Snider WD. (1997). Nerve growth factor receptor *TrkA* is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol.*;381(4):428-38.
- Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD. (1997) *IB4*-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron.*;19(4):849-61.
- Molnár Z, Cheung AF. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res.*;55(2):105-15.

- Monté D, Coutte L, Dewitte F, Defossez PA, Le Coniat M, Stéhelin D, Berger R, de Launoit Y. (1994). Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors. *Genomics*. ;35(1):236-40.
- Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, Uchida Y, Nakajima O, Nakamura F, Yagi T, Taniguchi M, Usui H, Katoh-Semba R, Takei K, Goshima Y. (2006). Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci* 26: 2971–2980.
- Moser EI. (2011). The multi-laned hippocampus. *Nat Neurosci*.;14(4):407-8.
- Moss AC, Lawlor G, Murray D, Tighe D, Madden SF, Mulligan AM, Keane CO, Brady HR, Doran PP, MacMathuna P. (2006). ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*.;345(1):216-21.
- MULLER G., AYOUB M., STORZ P., RENNECKE J., FABBRO D., PFIZENMAIER K. (1995). PKC  $\zeta$  is a molecular switch in signal-transduction of TNF- $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic-acid. *EMBO J*.;14:1961–1969.
- Munchberg, S. R., E. A. Ober, and H. Steinbeisser. (1999). Expression of the Ets transcription factors erm and pea3 in early zebrafish development. *Mech. Dev.* 88:233-236.
- Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttman RP, Siman R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 278:14162–14167. *Neuron*. 2002 Aug 29;35(5):893-905.
- Nibuya, M., Morinobu, S., and Duman, R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 7539-7547.
- Nordstrom LA, Lochner J, Yeung W, Ciment G. (1995). The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae. *Mol Cell Neurosci* 6:56–68.
- Novikova L.N. Novikov L.N. Kellerth J.O. (2002). Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J. Comp. Neurol*.;452:255–263.
- Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature*.;306(5941):391-5.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*.; 14(5):899-912.
- Oh S, Shin S, Janknecht R. (2012). ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 1826:1–12.
- Oikawa T, Yamada T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303:11–34.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*.;34(1):171-5.
- Pagadala P, Park CK, Bang S, Xu ZZ, Xie RG, Liu T, Han BX, Tracey WD Jr, Wang F, Ji RR. (2013). Loss of NR1 subunit of NMDARs in primary sensory neurons leads to hyperexcitability and pain hypersensitivity: involvement of Ca(2+)-activated small conductance potassium channels. *J Neurosci*.;33(33):13425-30.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221–233.
- Parada LF, Tsoulfas P, Tessarollo L, Blair J, Reid SW, Soppet D. (1992). The Trk family of tyrosine kinases: receptors for NGF-related neurotrophins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.;57:43-51.
- Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*.;113(7):867-79.
- Paratcha G and Ledda F. (2008). GDNF and GFR $\alpha$ : a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci*. 31(8):384-91.
- Paratore C, Brugnoli G, Lee HY, Suter U, Sommer L. (2002). The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol* 250:168 –180.
- Park H. and Poo MM. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 7-23.
- Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, Jan YN. (2007). Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu Rev Neurosci*.;30:399-423.
- Patel TD, Jackman A, Rice FL, Kucera J, Snider WD. (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* 25:345–357.
- Patel TD, Kramer I, Kucera J, Niederkofler V, Jessell TM, Arber S, Snider WD. (2003). Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron* 38: 403–416.
- Pazyra-Murphy MF, Hans A, Courchesne SL, Karch C, Cosker KE, Heerssen HM, Watson FL, Kim T, Greenberg ME, Segal RA. (2009). A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w. *J Neurosci* 29:6700–6709.

- Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH. (2001). ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF- $\kappa$ B and cell transformation. *J Biol Chem* 276: 7927–7931.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.*;14(3):285-93.
- Penzes P, Remmers C. (2012). Kalirin signaling: implications for synaptic pathology. *Mol Neurobiol.*;45(1):109-18.
- Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O. (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene.*;14(10):1159-64.
- Petersohn D, Schoch S, Brinkmann DR, Thiel G. (1995). The human synapsin II gene promoter. Possible role for the transcription factor zif268/egr-1, polyoma enhancer activator 3, and AP2. *J Biol Chem.*;270(41):24361-9.
- Pezet S, Malcangio M. (2004). Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 8(5):391-9.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development.*;129(13):3147-60.
- Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. (2003). Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23:7129–7142.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.*;90(3):397-406.
- Purves D, Hume RI. (1981). The relation of postsynaptic geometry to the number of presynaptic axons that innervate autonomic ganglion cells. *J Neurosci* 1:441–452.
- Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H, O'Malley BW, Xu J. (2008). The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEAK3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol.*;28(19):5937-50.
- Qui MS, Green SH. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron.*;9(4):705-17
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Raible F, Brand M. (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev.*;107(1-2):105-17.
- Rajan I, Cline HT. (1998). Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci*;18:7836–7846.
- Rall, W. (1995). The Theoretical Foundation of Dendritic Function, dendritic spines. *J. Neurosci.* 13, 1178–1189.
- Rauskolb S, Zagrebelsky M, Drenznak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, Schaeren-Wiemers N,
- Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB mediated transcription. *Neuron* 34: 999–1010.
- Redmond L, Ghosh A. (2005). Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium.*;37(5):411-6.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1545-1564.
- Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD. (1997). An NGF-TrkA mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277:1097–1100.
- Rice DS, Curran T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci.*; 24():1005-39.
- Robinson MJ, Cobb MH. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180–186.
- Roehl H, Nüsslein-Volhard C. (2001). Zebrafish pea3 and erm are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol.*;11(7):503-7.
- Routh, B. N., Johnston, D., Harris, K., and Chitwood, R. A. (2009). Anatomical and electrophysiological comparison of CA1 pyramidal neurons of the rat and mouse. *J. Neurophysiol.* 102, 2288–2302.
- Roux PP, Barker PA. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.*;67(3):203-33.
- Ruchhoeft ML, Ohnuma S, McNeill L, Holt CE, Harris WA. The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci.* 1999 Oct 1;19(19):8454-63.
- Russ JB and Kaltschmidt JA. (2014). From induction to conduction: how intrinsic transcriptional priming of extrinsic neuronal connectivity shapes neuronal identity *Open Biol.*;4(10). pii: 140144.
- Sariola H, Saarma M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.*;116(Pt 19):3855-62.
- Sato M, Suzuki K, Yamazaki H, Nakanishi S. (2005). A pivotal role of calcineurin signaling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 102(16):5874-9.

- Schecterson LC, Sanchez JT, Rubel EW, Bothwell M. (2012). TrkB downregulation is required for dendrite retraction in developing neurons of chicken nucleus magnocellularis. *J Neurosci.*;32(40):14000-9.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell.*;101(6):657-69.
- Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. (1997). Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF 2/2 mice. reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19:269–281.
- Scott EK, Luo L. (2001). How do dendrites take their shape?. *Nat Neurosci* 4: 359–365.
- Scott, R.H., Currie, K.P.M., Sutton, K.G. & Dolphin, A.C. (1992). Modulation of neuronal Ca(2+)-dependent currents by neurotransmitters, G-proteins and toxins. *Biochem Soc Trans.*;20(2):443-9.
- Segal RA. (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci.* 26:299-330. Epub 2003 Feb 18.
- Segal, R.A., Pomeroy, S.L., and Stiles, C.D. (1995). Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 4970-4981.
- Segev I, London M. (2000). Untangling dendrites with quantitative models. *Science* 290: 744–750.
- Sementchenko VI, Watson DK. (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene.*;19(55):6533-48.
- Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P (1999) Contact dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286: 741–746.
- Sharma S., G. S. Dhaliwal, D. Dadarwal. (2010a). Reproductive efficiency of thoroughbred mares under Indian subtropical conditions: a retrospective survey over 7 years. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 241-248.
- Sharrocks AD. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):827-37.
- Shepherd, T. G., L. Kockeritz, M. R. Szrajber, W. J. Muller, and J. A. Hassell. (2001). The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr. Biol.* 11:1739-1748.
- Shima Y, Kawaguchi SY, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T. (2007). Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nat Neurosci* 10: 963–969.
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science.*;290(5494):1170-4.
- Sholl DA. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.*;87(4):387-406.
- Snider WD, Wright DE. (1996). Neurotrophins cause a new sensation. *Neuron.*;16(2):229-32.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.*;24:1217-81.
- Spinale FG. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.*;87(4):1285-342.
- Spruston N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci.*;9(3):206-21.
- Stuart G, Spruston N, Häusser M (1999) Dendrites. Chapter 1. Oxford: Oxford UP.
- Subbaramaiah, K., L. Norton, W. Gerald, and A. J. Dannenberg. (2002). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J. Biol. Chem.* 277:18649-18657.
- Sun Y, Dykes IM, Liang X, Eng SR, Evans SM, Turner EE. (2008). A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci.*;11(11):1283-93.
- Supèr H, Del Río JA, Martínez A, Pérez-Sust P, Soriano E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex.*; 10(6):602-13.
- Székely G, Matesz C, Antal M. (1980). Different dendritic arborization patterns of motoneurons in various places of the rat's lumbosacral spinal cord. *Acta Biol Acad Sci Hung.*;31(1-3):305-19
- Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. (2004). Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 14:197–204.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A. (1997). Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron.*;19(3):625-34.
- Tojima T, Kobayashi S, Ito E. (2003). Dual role of cyclic AMP-dependent protein kinase in neurite outgrowth and synaptogenesis during neuronal differentiation. *J Neurosci Res.*;74(6):829-37.
- Tolwani RJ, Buckmaster PS, Varma S, Cosgaya JM, Wu Y, Suri C, Shooter EM. (2002). BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 114: 795–805.
- Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2006). Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol.* ;1:243-71.

- Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci.*;17(24):9492-505.
- Trimble MS1, Xin JH, Guy CT, Muller WJ, Hassell JA. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene.*;8(11):3037-42.
- Trojanowska M. (2000). Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* 19:6464–6471.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller L. (2003). Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol.*;553(Pt 2):497-509.
- Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J. (1996). A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extrasosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.*;219(2):608-12.
- Vastani N., Murer K., Koltzenburg M. (2005). Sensitivity of primary afferent fibres innervating rat hairy skin to cold stimuli and transient receptor (TRP) channel agonist. Paper presented at:11<sup>th</sup> World congress on Pain 1573.
- Verger A, Duterque-Coquillaud M. (2002). When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays* 24:362–370.
- Vigers AJ, Amin DS, Talley-Farnham T, Gorski JA, Xu B, Jones KR. (2012). Sustained expression of brain-derived neurotrophic factor is required for maintenance of dendritic spines and normal behavior. *Neuroscience.*;212:1-18.
- Vogel W & Scholz A. (2000). Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain* 89, 47–52.
- von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K. (2008). TrkB but not trkC receptors are necessary for postnatal maintenance of hippocampal spines. *Neurobiol Aging.*;29(8):1247-55.
- Vrieseling E, Arber S. (2006). Target-induced transcriptional control of dendritic patterning and connectivity in motor neurons by the ETS gene *Pea3*. *Cell.*;127(7):1439-52.
- Waite P.M.E and Tracey D.J. (1995). Somatosensory system. In: *The Rat Nervous System*, edited by Paxinos G. San Diego, CA: Academic Press, p. 689–704.
- Wakamatsu Y, Maynard TM, Weston JA. (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* 127:2811–2821.
- Wasyluk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. (1998). Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23:213–216.
- Watakabe A, Ichinohe N, Ohsawa S, Hashikawa T, Komatsu Y, Rockland KS, Yamamori T. (2007). Comparative analysis of layer-specific genes in Mammalian neocortex. *Cereb Cortex.*;17(8):1918-33.
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4:981–988.
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of *Wnt-2*. *Neuron* 50: 897–909.
- Wayman, G.A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *P Natl Acad Sci Usa* 105, 9093–9098.
- Wei GH, Badis G, Berger MF, Kivioja T, Palin K, Enge M, Bonke M, Jolma A, Varjosalo M, Gehrke AR, Yan J, Talukder S, Turunen M, Taipale M, Stunnenberg HG, Ukkonen E, Hughes TR, Bulyk ML, Taipale J. (2010). Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J.*;29(13):2147-60.
- Wenner P, Frank E. (1995). Peripheral target specification of synaptic connectivity of muscle spindle sensory neurons with spinal motoneurons. *J Neurosci.*;15(12):8191-8.
- Westerink RH1, Ewing AG. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf).*;192(2):273-85.
- Whitford K.L., Dijkhuizen P., Polleux F., and Ghosh A. (2002). Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25, 127-149.
- Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science.*;269(5222):403-7.
- Wickramasinghe SR, Alvania RS, Ramanan N, Wood JN, Mandai K, Ginty DD. (2008). Serum response factor mediates NGF-dependent target innervations by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* 58:532–545.
- Williams DW, Truman JW. (2004). Mechanisms of dendritic elaboration of sensory neurons in *Drosophila*: insights from in vivo time lapse. *J Neurosci* 24: 1541–1550.
- Wirth MJ, Brun A, Grabert J, Patz S, Wahle P. (2003). Accelerated dendritic development of rat cortical pyramidal cells and interneurons after biolistic transfection with BDNF and NT4/5. *Development* 130: 5827–5838.

- Withers GS, Higgins D, Charette M, Banker G. (2000). Bone morphogenetic protein-7 enhances dendritic growth and receptivity to innervation in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 12: 106–116.
- Wong RO, Ghosh A. (2002). Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803–812.
- Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS. (2004). Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3973–3978.
- Wu GY, Zou DJ, Rajan I, Cline H. (1999) Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J Neurosci* 19:4472–4483
- Xin JH, Cowie A, Lachance P, Hassell JA. (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev.*;6(3):481-96.
- Xu, B., Zang, K., Ruff, N. L., Zhang, Y. A., McConnell, S. K., Stryker, M. P. and Reichardt, L. F. (2000). Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26, 233-245.
- Yacoubian TA, Lo DC. (2000). Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci.*;3:342–349.
- Yan C, Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 211:19 –26.
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. (2003). Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 39:57– 68.
- Yoneshima H., Yamasaki S, Voelker CC, Molnár Z, Christophe E, Audinat E, Takemoto M, Nishiwaki M, Tsuji S, Fujita I, Yamamoto N. (2008). Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience.*;137(2):401-12.
- Yordy JS, Muise-Helmericks RC. (2000). Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 19:6503– 6513.
- Yu, T., L. Calvo, B. Anta, S. Lopez-Benito, R. Lopez-Bellido, C. Vicente-Garcia, L.Tessarollo, R. E. Rodriguez and J. C. Arevalo (2014). *J Neurosci* 34(17): 6098-6106.
- Yu X, Malenka RC (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6: 1169–1177.
- Yu X, Malenka RC. ( 2004). Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology.*;47(5):779-86.
- Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM, Mobley WC. (1996) Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain Dev.*;18(5):362-8.
- Zhang Z, Verheyden JM, Hassell JA, Sun X. (2009). FGF-regulated Etv genes are essential for repressing Shh expression in mouse limb buds. *Dev Cell* 16:607– 613.
- Zhong J, Li X, McNamee C, Chen AP, Baccarini M, Snider WD. (2007). Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo. *Nat Neurosci* 10:598–607.
- Zhou F, Leder P, Martin SS. (2006.) Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2. *Exp Cell Res* 312: 1119–1126.
- Zhu H, Luo L (2004) Diverse functions of N-cadherin in dendritic and axonal terminal arborization of olfactory projection neurons. *Neuron* 42: 63–75.
- Zimmer C, Lee J, Griveau A, Arber S, Pierani A, Garel S, Guillemot F. (2010). Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development.*;137(2):293-302.
- Znosko WA, Yu S, Thomas K, Molina GA, Li C, Tsang W, Dawid IB, Moon AM, Tsang M. (2010). Overlapping functions of Pea3 ETS transcription factors in FGF signaling during zebrafish development. *Dev Biol* 342:11– 25.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. (2005). Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6:615– 625.
- Zweifel LS. et al, 2005. Lallemand F, Ernfors P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* 35:373–381.

