

Rol de c-Fos en la diferenciación neuronal

Tesis para optar por el título de

Doctora en Ciencias Químicas

Lic. Lucia Rodríguez

Directora: Dra. Beatriz L. Caputto

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC),
CONICET

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

Diciembre de 2018

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba



Reforma
1918 - 2018

Departamento de
QUÍMICA BIOLÓGICA
Ranwel Caputto



FCQ

Facultad de
Ciencias Químicas

C I Q U I B I C

Comisión Evaluadora de Tesis

Dra. Juana María Pasquini

Dr. Gabriel R. Cuadra

Dr. Pablo H.H. López

Dr. Santiago Quiroga

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Estado argentino, por brindarme una educación pública de excelencia a la cual he accedido desde el jardín de infantes hasta el día de hoy, permitiéndome obtener mi título de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Químicas, por la educación brindada a lo largo de mi carreras de grado y de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, el CONICET, por otorgarme la beca doctoral y financiar mis estudios.

A la Universidad Nacional de Córdoba, por abrirme las puertas del mundo, por su enseñanza de espíritu democrático, y en el año del centenario de la Reforma Universitaria, a los rebeldes estudiantes que la gestaron, por las libertades que, gracias a ellos, no nos faltan.

A la comisión evaluadora de ésta tesis, en especial a la Dra. Pasquini, por tomarse el tiempo no solo para leerla sino también para estar presente al momento de la defensa. Al Dr. Cuadra, al Dr. López y al Dr. Quiroga, por los valiosos aportes realizados durante las reuniones de tesis y por la ayuda en los pedidos burocráticos “para ayer”.

A Betty, por confiar en mí y darme una oportunidad cuando muchos no lo hubiesen hecho. Por su generosidad, por creer en mi trabajo y por alentarme cuando los resultados parecían revelarse en contra de nuestra hipótesis. Por tener la palabra justa en momentos de desánimo.

A todos los integrantes del laboratorio Caputto, a los pasados (que felizmente nunca terminan de irse) y a los presentes, porque no todos tienen la suerte de trabajar con amigos. Por todos esos almuerzos compartidos en el comedor universitario, donde la comida no abundaba pero las risas sobaban. Por los mates y las charlas delirantes entre uno y otro experimento. Por la camaradería, por el apoyo. Por las hermosas caminatas de regreso a casa con Anita, Fabi y poco después con Cele, en las que nunca faltaba conversación. Porque se transformaron en verdaderas amigas. Por las clases de arte, de historia y de no sé cuántas disciplinas más de Rubén y por las cenas en las que nos deleitaba con alguna de sus recetas, en la mayoría de los casos por mi expreso

pedido (aunque más que pedidos, eran órdenes). Por los chistes “de salón” de Rusito y por su sonrisa amable y cómplice, siempre en el momento justo. Por las horas y horas estudiando francés con César y por su humor, su compañía, su amistad. En especial, agradezco a Gabi, porque en el transcurso de mi doctorado no he conocido a ninguna persona tan generosa con su conocimiento como él. Porque me enseñó todo lo que hay que saber y lo que sería preferible no saber sobre esta profesión. Por su espíritu “optimista del resultado”.

A Flor, “mi Marta”, porque pasamos de ser conocidas a prácticamente compañeras de laboratorio, y poco después, a amigas. Por las eternas risas durante los experimentos que hicimos juntas (y los gritos de alegría que se escuchaban en todo el instituto cuando funcionaban) y por nuestros “paseos filosóficos” por los confines de Ciudad Universitaria yendo al Ferreyra a buscar animales.

A los integrantes del laboratorio Valdez/Maccioni, porque solo nos falta una puerta que nos comunique para ser oficialmente del mismo grupo. Por la solidaridad en nuestras búsquedas no solo de reactivos sino también de cualquier tipo de alimento al finalizar el día. Por el buen humor.

Al CIQUIBIC, por transformarse en un segundo hogar, y a todos sus integrantes por la solidaridad, ya que a la hora de pedir algo prestado siempre existe una mano amiga a solo unos pasos en el pasillo. A todo el personal técnico, que hace nuestra tarea mucho más fácil y llevadera. En especial a Rosa, por las charlas compartidas en el bioterio y por su ayuda con los animales, a Ceci y a Carlos, por hacer las horas de microscopía menos solitarias, y a Pitty, por los retos que se transformaban en aprendizaje y por la paciencia.

A mi profesor de química del secundario, Gustavo, porque en parte y sin darse cuenta, fue el quien me guio en este camino gracias a una charla de, llamémosla, “re-orientación” vocacional.

A mis amigos de la Facultad, que se transformaron en mis primeros compañeros en este viaje.

A mis amigos de Bell Ville, mis amigos de la vida y hermanos del corazón. Porque estamos juntos desde hace tanto que aun siendo muy diferentes, somos iguales. Porque

de tanto escucharme ya saben que significan frases como “sacar una beca”, “publicar un paper” o “no me dio el experimento”. Por preguntarme “cómo anda Fos?”. Porque hasta me han acompañado al laboratorio por la madrugada para no estar sola. Por su incondicionalidad, por su nobleza, por estar. Siempre. Al pie del cañón.

A mis abuelas, las famosas Tota y Coca, porque sé que estarían orgullosas de que su nieta estudió química pero cumplió su promesa y “no se dedicó a fabricar bombas”.

A mi familia, por ser mi pilar. A mi hermano, Igna, por los años de convivencia con este “sargento”. Por la paciencia ante cada favor pedido en los que no había nada a cambio. A mis viejos, Silvia y Roberto, por dejarme ser quien yo quisiera. Por demostrarme con su ejemplo el valor del trabajo y del respeto. Por enseñarme a valerme por mi misma. Por su esfuerzo para que hoy esté donde estoy. Porque lo que soy se lo debo a ellos.

Finalmente, pero no por eso menos importante, a Fer, mi compañero de viaje y de emociones. Por la paciencia y por los silencios. Por la franqueza. Por el aprendizaje constante, codo a codo. Por comprender, por respetarme. Por el amor.

A todos, nuevamente, gracias.

“Hagas lo que hagas, ámalo, como amabas

la cabina del Paradiso cuando eras niño”

Alfredo a Totó, Cinema Paradiso

ÍNDICE

Abreviaturas	2
Resumen	4
Resumen en Inglés	5
Introducción	6
Sistema nervioso y la diferenciación neuronal	7
La síntesis y el tráfico de membrana en el desarrollo neuronal	11
c-Fos, una proteína dual	14
No todo pasa por el retículo endoplásmico: activación de síntesis de lípidos en el núcleo mediada por c-Fos	24
c-Fos y su función no genómica en el desarrollo del SNC	25
Objetivos	28
Resultados	30
Objetivo Específico 1	31
Objetivo Específico 2	49
Discusión	61
Trabajos Publicados	76
Materiales y métodos	78
Referencias	92

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Ácidos Grasos

AH: Hélice Anfipática (*Amphipathic helix*)

AP-1: Proteína Activadora 1 (*Activator Protein 1*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASO: Oligonucleótido antisentido (*AntiSense Oligonucleotide*)

BD: Dominio básico (*Basic Domain*)

CDS: CDP-Diacilglicerol Sintasa

CFP: Proteína fluorescente cian (*Cyan Fluorescent Protein*)

DAG: Diacilglicerol

FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

GFP: Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

IDP: Proteína intrínsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Protein*)

IEGs: Genes de expresión temprana (*Immediate Early Genes*)

IL-1: Interleuquina 1

KO: *Knock-out*

LZ: Cierre de leucinas (*Leucine Zipper*)

NGF: Factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*)

NLSP: Péptido señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal Peptide*)

PA: Ácido Fosfatídico

PAP: Fosfatasa de Ácido Fosfatídico

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Fosfoinosítidos

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinasa

PI4KII: Fosfatidilinositol-4-Kinasa II

PIPKs: Fosfatidilinositol-fosfato-kinasas

PIS: Fosfatidilinositol Sintasa

PS: Fosfatidilserina

RE: Retículo Endoplásmico

SM: Esfingomielina

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)

YFP: Proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescent Protein*)

RESUMEN

c-Fos es una proteína intrínsecamente desordenada que pertenece a la familia de proteínas Fos, típicamente involucradas en la formación de los múltiples y diversos factores de transcripción heterodiméricos AP-1. La posibilidad de que dichos factores puedan ser el resultado de muchas combinaciones de monómeros distintos permitió explicar, en parte, la diversidad de las consecuencias fisiológicas de su expresión y su actividad. Sin embargo, muchos efectos causados por la expresión de c-Fos no logran ser explicados por su función como componente de los factores de transcripción AP-1.

Hace ya 20 años, en nuestro laboratorio se describió una función desconocida hasta ese entonces: c-Fos es capaz de activar la síntesis de lípidos de manera no genómica, independiente de su actividad AP-1, gracias a su asociación a membranas del retículo endoplásmico y activación de enzimas claves. El retículo endoplásmico es el principal sitio de síntesis de lípidos, quienes cumplen tanto un rol esencial como componentes de las membranas celulares como un papel fundamental como mensajeros de cascadas de señalización.

En la presente tesis, presentamos evidencias de que c-Fos es capaz de ejercer dicho rol en el sistema nervioso, donde hasta ahora solo había sido vinculado a la actividad y plasticidad neuronal a través de cambios en la expresión génica. Demostramos que c-Fos activa la síntesis de lípidos en neuronas y que esa función es clave para una correcta diferenciación neuronal y el desarrollo normal del sistema nervioso. A través de dicho mecanismo, c-Fos podría participar en procesos de aprendizaje y memoria que involucran plasticidad neuronal o inclusive en eventos de regeneración neuronal.

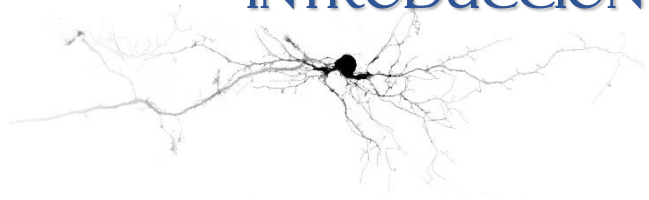
SUMMARY

The intrinsically disordered protein c-Fos is a well characterized member of the multiple, diverse and heterodimeric AP-1 family of transcription factors. These transcription factors have a distinctive attribute that allows them to be formed by a variety of different monomers. This possibility led to an astonishing number of functions related to AP-1 expression that are sometimes related and sometimes completely antagonistic. However, many of the physiological effects of c-Fos expression cannot be explained by its AP-1 role.

In our laboratory, almost twenty years ago, we have described that c-Fos is a moonlighting protein capable of achieving a function that had not been described until that moment: it activates lipid synthesis in a non-genomic AP-1-independent mechanism by its association to the endoplasmic reticulum membranes and the consequent activation of lipid synthesizing enzymes. The endoplasmic reticulum is the main site of lipid synthesis in the cell, the main components of biological membranes and important players in signaling cascades as second messengers.

In this thesis, we present numerous evidences that allow us to affirm that c-Fos is capable of exerting its lipid synthesis activator capacity in the nervous system, where it had been previously associated to neuronal activity and plasticity but only through its genomic AP-1 function. We demonstrate that c-Fos actually activates lipid synthesis in neurons. We also determined that this activity is crucial for a normal neuronal differentiation in culture and the correct development of the nervous system. In this direction, c-Fos could be an active player in different events that require neuronal plasticity, such as those involved in learning and memory formation. Even more, it could be participating in mechanisms related to neuronal regeneration.

INTRODUCCIÓN



Sistema nervioso y la diferenciación neuronal

El sistema nervioso central (SNC) humano contiene alrededor de 100.000 millones de neuronas y un número más de mil veces superior de conexiones sinápticas [1]. En etapas tempranas de la embriogénesis, los neuroblastos, las células precursoras neuronales, se dividen y diferencian en los diferentes componentes celulares del cerebro y del sistema nervioso periférico (SNP). A medida que migran a destinos pre-determinados, desarrollan fenotipos celulares específicos. Esas células pueden transformarse en neuronas o en células gliales [2]. Las neuronas son las encargadas de recibir, conducir y transmitir señales que, independientemente de sus orígenes, en todos los casos resultan en cambios en el potencial eléctrico a través de su membrana plasmática. Las células gliales, que pueden ser células gliales radiales, astrocitos, oligodendrocitos y sus progenitores, o microglia, constituyen aproximadamente la mitad de las células del SNC y llevan a cabo funciones muy diversas que influyen en aspectos de formación y función del sistema nervioso, tales como neurogénesis, migración neuronal, crecimiento axonal, formación de sinapsis y plasticidad neuronal [3].

Para cumplir sus funciones, las neuronas deben llevar a cabo un proceso de diferenciación neuronal, que es un mecanismo celular complejo que comprende una serie de eventos coordinados temporal y espacialmente que incluyen proliferación, migración y diferenciación. Para alcanzar su estructura final y establecer circuitos neuronales funcionales, una neurona debe llevar a cabo diversos procesos como neuritogénesis, elongación de neuritas, polarización, arborización y sinaptogénesis. Durante la polarización, las neuronas establecen diferentes compartimentos estructurales con distintas propiedades fisiológicas y moleculares: el somato-dendrítico y el axón (Figura 1). El soma o cuerpo celular contiene al núcleo y es el principal sitio de biosíntesis de la neurona. Las dendritas son múltiples procesos o prolongaciones que se desarrollan a partir del soma y presentan numerosas ramificaciones; son las encargadas de recibir e integrar las señales provenientes de otras células. El axón, en cambio, es una prolongación celular generalmente única, especializada en transmitir el impulso nervioso y la señal a células o tejidos blanco que pueden ser otras neuronas, órganos, músculos o la piel [4]. Finalmente, la comunicación entre diferentes neuronas se

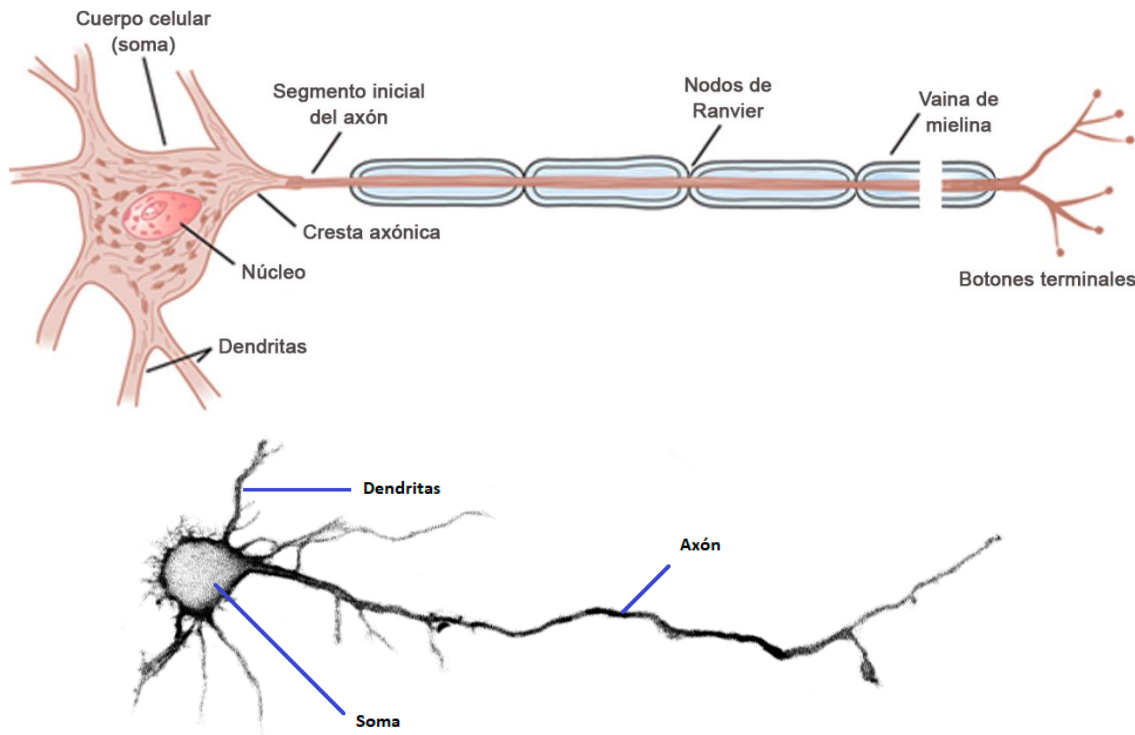


Figura 1. Superior: esquema de una neurona típica con axón mielinizado, adaptado de *Fisiología Médica, 20ª edición, de William F. Ganong* [4]. **Inferior:** Neurona de hipocampo de rata a las 72 horas de cultivo, fijada y procesada para inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β III-tubulina para visualizar su citoesqueleto. Se muestra una imagen en escala de grises invertida.

establece gracias a zonas especializadas de contacto llamadas sinapsis en las que se transmiten entre ellas las señales químicas o eléctricas. El proceso global determinará el patrón de conectividad funcional de los circuitos neuronales que, inclusive durante el desarrollo posnatal y la vida adulta, seguirán adaptándose en respuesta al medio ambiente como sucede en los procesos de aprendizaje o memoria [5].

El funcionamiento normal del sistema nervioso depende del número de contactos sinápticos múltiples y específicos establecidos por cada célula del sistema nervioso. Se estima que hay entre $15-16 \times 10^8$ sinapsis por mm^3 en la neocorteza humana [6]. El desarrollo normal de esas conexiones depende en parte de la correcta regulación de la ramificación axonal, un proceso morfogénico que permite que una misma célula tenga múltiples blancos o “*targets*” [7]. El axón en desarrollo posee en su extremo distal en extensión una región moto-sensora expandida y dinámica llamada cono de crecimiento [8]. Mientras el axón se extiende durante el desarrollo neuronal, el cono de

crecimiento debe “navegar” en respuesta a señales moleculares atrayentes o repulsivas que actúan como guías para que el mismo alcance su blanco correcto [9]. Las semaforinas, por ejemplo, son señales moleculares repelentes del cono de crecimiento de axones de neuronas corticales [10].

Las ramificaciones axonales pueden formarse de dos modos diferentes: a través de la bifurcación del cono de crecimiento en el extremo distal del axón a medida que el mismo se extiende o mediante la formación *de novo* de ramificaciones a lo largo del tracto axonal, normalmente llamada ramificación intersticial (Figura 2) [11]. El método de bifurcación del cono de crecimiento casi no contribuye al refinamiento de los axones en la zona de su blanco o *target*, sino que más bien participa en el direccionamiento del axón y el desarrollo de la organización básica del sistema nervioso [11]. Las ramificaciones intersticiales, en cambio, son consideradas de importancia fundamental en el establecimiento de la arborización de la neurona en la zona de sinápsis con su blanco. Estas últimas surgen independientemente del cono de crecimiento, de manera

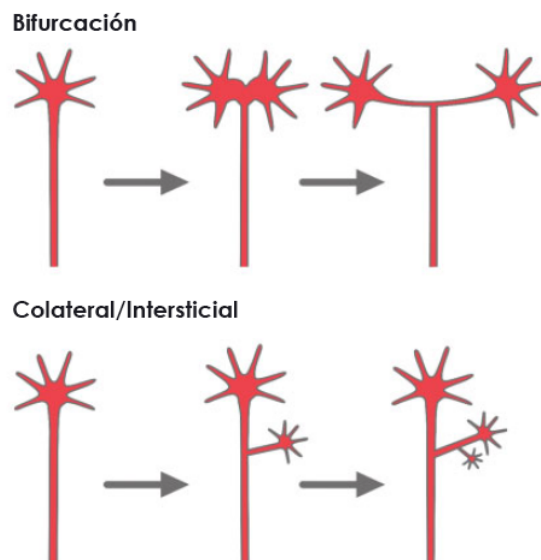


Figura 2. Esquema de los modos de ramificación axonal adaptado de Schmidt y Rathjen, 2010 [8].

transiente, en zonas con pequeñas filopodias o lamelipodias del mismo tracto axonal que se extienden y se retraen [12]. Las filopodias son proyecciones alargadas de la membrana plasmática, compuestas principalmente por haces de filamentos de actina paralelos y proteínas asociadas a actina [12]. Las lamelipodias, en cambio, son

protrusiones de la membrana plásmica más anchas, laminares, enriquecidas en una estructura bidimensional de filamentos de actina ramificados [13]. Se ha observado también que las ramificaciones pueden surgir en sitios donde previamente el cono de crecimiento había detenido el crecimiento del axón por un corto período de tiempo, lo que se denominó *método de pausa del cono de crecimiento* [9, 11]. En todos los casos, la estabilización de estas ramificaciones depende de múltiples señales intracelulares y de la regulación del citoesqueleto neuronal, formado principalmente por filamentos de actina y microtúbulos altamente dinámicos que invaden esas pequeñas protrusiones a medida que las mismas se extienden hasta establecer ramificaciones maduras. En caso de no ser estabilizadas, esas protrusiones pueden retraerse [12].

A pesar de su importancia para comprender el desarrollo de circuitos neuronales, se conoce muy poco sobre la regulación de la formación de ramificaciones axonales. Estudiar la contribución de las *semaforinas* en el proceso de eliminación de ramificaciones axonales no necesarias o *pruning*, por ejemplo, ha permitido tener una mayor comprensión de cómo se refinan los circuitos hipocámpales [14]. Se sabe también que las semaforinas controlan la ramificación axonal durante la formación de mapas de campo visual en el cerebro [15] o que algunos factores de transcripción, tales como Pea3 y Er81, influyen en la ramificación y establecimiento del circuito moto-sensorial [16]. Asimismo, se ha demostrado que el factor de crecimiento nervioso (NGF, de sus siglas en inglés *Nerve Growth Factor*) promueve, a través de una cascada de señalización dependiente de Fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), la formación de “parches” de actina en microdominios donde luego se formarán las protrusiones [12].

Aunque algunos mecanismos moleculares han sido demostrados, el escenario completo de este proceso todavía es poco claro [17] y, si bien tienen gran importancia en el desarrollo normal del sistema nervioso, su conocimiento más acabado podría además tener una gran influencia en el tratamiento de desórdenes del neurodesarrollo, ya que la disrupción de los patrones de conectividad sináptica es la causa de muchas de estas patologías. Además, en el caso de lesiones en el sistema nervioso, promover el mecanismo fisiológico de regeneración mediante el desarrollo de ramificaciones colaterales en los axones de las neuronas sobrevivientes sería potencialmente una estrategia para restaurar su función normal [18, 19].

La síntesis y el tráfico de membrana en el desarrollo neuronal

Los eventos de crecimiento y desarrollo de cada uno de los compartimentos de la neurona involucran un aumento significativo en el volumen y la superficie de la célula, donde el material de membrana necesario debe ser suministrado de acuerdo a las demandas locales y temporales del proceso. Diferentes estudios sugieren que una neurona de un vertebrado en desarrollo aumenta su volumen hasta un 0,6% por día durante la elongación del axón, mientras que la expansión de la membrana plasmática es todavía más importante, pudiendo alcanzar hasta un 20% por día [5, 20].

Durante mucho tiempo se aceptó la hipótesis de que en neuronas la biosíntesis de la mayoría de las macromoléculas estaba confinada al soma celular y se pensaba que, desde el mismo, el axón crecía de manera continua [21]. También se creía que todos los materiales necesarios para el crecimiento axonal eran sintetizados en el cuerpo celular de las neuronas y trasladados por transporte axonal anterógrado a los axones [22, 23]. Sin embargo, en 1958, Palay y colaboradores realizaron experimentos de microscopía electrónica y mostraron que el retículo endoplásmico (RE) está presente en axones formando una estructura continua [24]. Ya en 1976, Tsukita y colaboradores demostraron la estructura tridimensional del RE en procesos axonales y diversos trabajos publicados desde entonces han permitido elucidar esa estructura por completo (revisado por Gonzalez y Couve, 2013) [25, 26]. Al presente, se ha confirmado fehacientemente la presencia de una maquinaria de síntesis localizada en axones y su capacidad de regular los niveles de síntesis de proteínas citoplasmáticas, ácidos ribonucleicos (ARN), lípidos y otras macromoléculas [27].

La descripción más aceptada al presente de la estructura del RE del axón es que el mismo es una prolongación del RE somático y se transforma en la organela membranosa más abundante presente en los axones [28-31]. El RE, principal sitio de síntesis de lípidos, se observa en axones como túbulos interconectados paralelos entre sí de entre 20 y 30 nm de ancho (Figura 3) [32, 33].

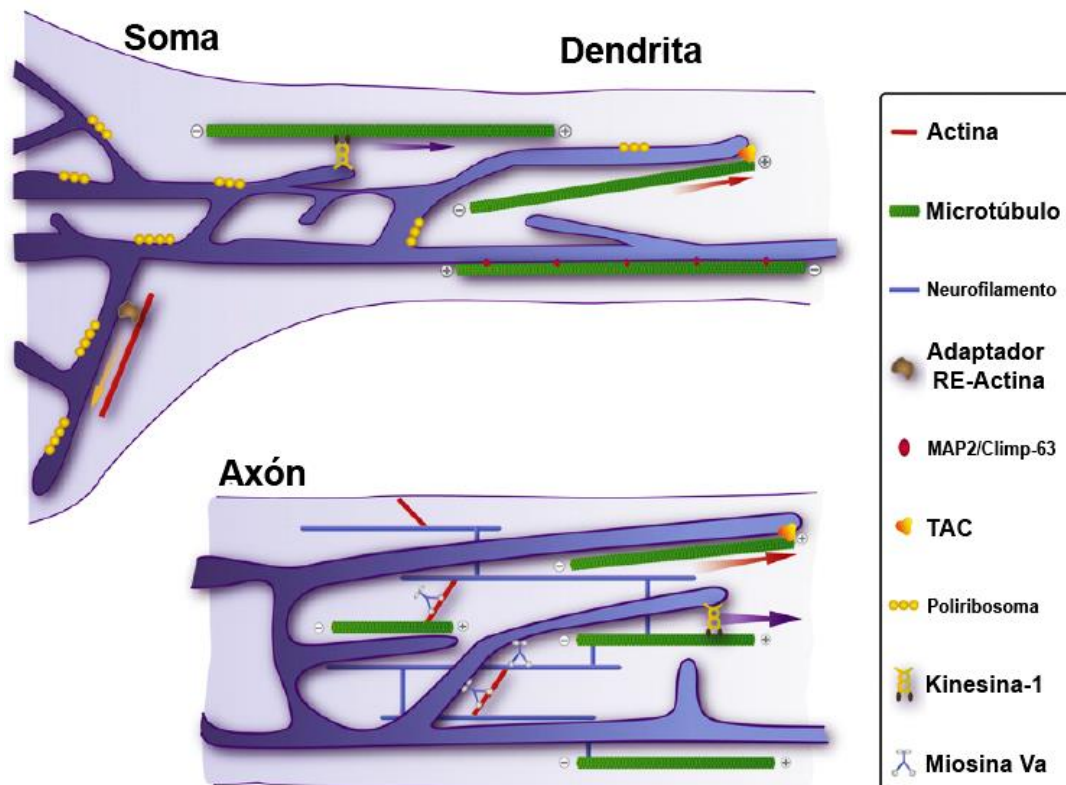


Figura 3. Estructura del retículo endoplásmico en dendritas y axones neuronales, adaptado de Valenzuela, et al, 2011 [31].

Se ha demostrado que el RE se encuentra implicado en el establecimiento de la polaridad axonal y la arborización dendrítica [34]. Si bien hasta ahora no ha sido vinculado con los procesos responsables del establecimiento de las ramificaciones axonales, se sabe que el RE se acumula en la base de las mismas a medida que estas se elongan, sugiriendo que podría ejercer un rol en su estabilización [35]. Algunos estudios incluso sugieren que la relación que existe entre el RE y los microtúbulos del citoesqueleto es fundamental tanto para la ramificación axonal como para su elongación. Por ejemplo, se ha demostrado que silenciar la Proteína 600, una proteína asociada a microtúbulos que se une al RE, desestabiliza los procesos neuronales y la extensión de neuritas que se alcanza es mucho menor que en condiciones normales [36]. Esto indicaría que el RE tendría un rol clave en el mantenimiento de los procesos neuronales a través, probablemente, de la inducción de la formación de ramificaciones o de la estabilización de las mismas.

Tomando en consideración la arquitectura y el tamaño de las neuronas, es razonable pensar en la hipótesis de la necesidad de una organización temporal y

dominio-específica para regular la síntesis de los diversos componentes de membrana de acuerdo a las demandas locales, sin tener que depender del transporte axonal de los mismos desde el soma. En tal sentido, los mecanismos por los cuales las neuronas se aseguran la provisión de componentes de membrana a axones en crecimiento, tales como lípidos (excepto glicolípidos), ha sido objeto de diversos estudios. Recién en los años 90, gracias al uso de sistemas de cultivo en compartimentos, surgió una gran cantidad de evidencia para probar que los axones contienen los elementos necesarios para el metabolismo de lípidos y son, de hecho, capaces de sintetizarlos. En un comienzo se demostró que los axones son capaces de sintetizar fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM) [37]. Evidencias posteriores sugirieron también la síntesis de fosfatidilserina (PS), fosfoinosítidos (PIs) y ácidos grasos (AG) en axones [38]. Inclusive, se demostró la presencia y la actividad de las enzimas de síntesis de estos lípidos a nivel local en axones [38]. Estas observaciones generaron la incógnita de cuál es la proporción de los lípidos de membrana sintetizada en axones *in situ* y como es regulado este metabolismo, un tema que todavía está en discusión.

Los lípidos son unos de los principales componentes del sistema nervioso [39]. Las membranas neuronales contienen diferentes clases de lípidos en diferentes proporciones y su composición varía según el compartimento neuronal [40]. Entre los fosfolípidos, PC representa el 58% de los fosfolípidos de membrana, siendo también el más abundante en la mayoría de las membranas de mamíferos [41, 42]. La homeostasis del contenido de esos lípidos es de vital importancia para la membrana, ya que muchas patologías neurológicas han sido vinculadas a un metabolismo anormal de estos compuestos [43-46]. Por ejemplo, evidencias sugieren que un metabolismo de colesterol aberrante en neuronas puede contribuir a la degeneración progresiva que se observa en pacientes que sufren de enfermedad de Alzheimer [39] o que elevados niveles de gangliósidos influyen en la cinética de agregación de α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson [45].

Los fosfolípidos de membrana como PC, PS, una proporción de PE y además el colesterol son sintetizados en el RE. En el caso de PC se demostró que al menos el 50% del total contenido en axones es sintetizada localmente y que esa síntesis localizada es esencial para la elongación normal del axón [47]. A partir de estas evidencias se sugirió

que el transporte de PC sintetizada en el soma hacia los axones no era lo suficientemente rápido y abundante como para proveer de este y otros lípidos necesarios para la expansión de la membrana axonal, resaltando la importancia de un mecanismo de síntesis localizada de lípidos para el correcto desarrollo neuronal. Si bien se ha avanzado en el conocimiento del sitio sub-celular de síntesis de lípidos en neuronas en desarrollo, existen muchos aspectos sobre la regulación de dicho metabolismo que aún no han sido abordados en profundidad, tales como la selectividad de algunos lípidos de ser o no sintetizados en axones o la influencia de dicha síntesis en la actividad sináptica.

c-Fos, una proteína dual

fos es un oncogen que pertenece a la familia de *genes de expresión temprana* (IEGs, de sus siglas en inglés *Immediate Early Genes*). Diversos estímulos inducen su expresión de manera rápida y transitoria en diferentes tipos celulares. De esta forma, c-Fos, el producto proteico de dicho gen, transforma señales de corta duración, como las

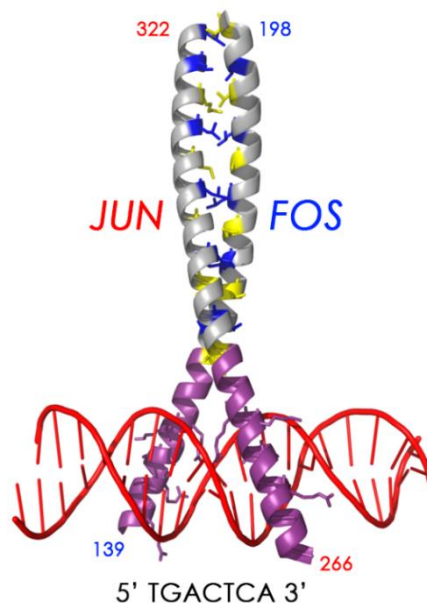


Figura 4. Esquema adaptado de Glover et al., 1995 [49] de la estructura cristalográfica de los dominios bZIP de c-Fos y Jun humanos en su forma de heterodímero unido un dúplex de ADN que contiene la secuencia 5'-TGACTCA-3', específica para la unión de AP-1 al ADN.

El dominio LZ y el dominio básico de cada proteína se muestran coloreados en gris y violeta, respectivamente.

promovidas por factores de crecimiento, en señales de larga duración, como las necesarias para inducir la proliferación celular. c-Fos es una proteína que contiene 380 aminoácidos, intrínsecamente desestructurada y su transcripción, traducción y degradación son procesos estrictamente regulados [48]. Distintas proteínas integran la familia que se conoce como familia Fos: c-Fos, Fos-B, Δ Fos-B, Fra-1 y Fra-2 [49, 50]. Todas ellas forman heterodímeros mediante un cierre de leucinas preponderantemente con proteínas de la familia Jun, conformando los conocidos factores de transcripción AP-1 (Figura 4). c-Fos heterodimeriza con la proteína Jun a través de su dominio cierre de leucinas (LZ, del inglés *Leucine Zipper*) y ambas se asocian a la secuencia de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) blanco a través del dominio básico (BD, del inglés *Basic Domain*). Además, contiene un dominio de trans-activación que se encuentra en su extremo C-terminal (Figura 5). Si bien siempre se consideró que c-Fos no podía generar homodímeros, evidencias recientes utilizando un método combinado de microscopía de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), espectroscopía de correlación de fluorescencia,

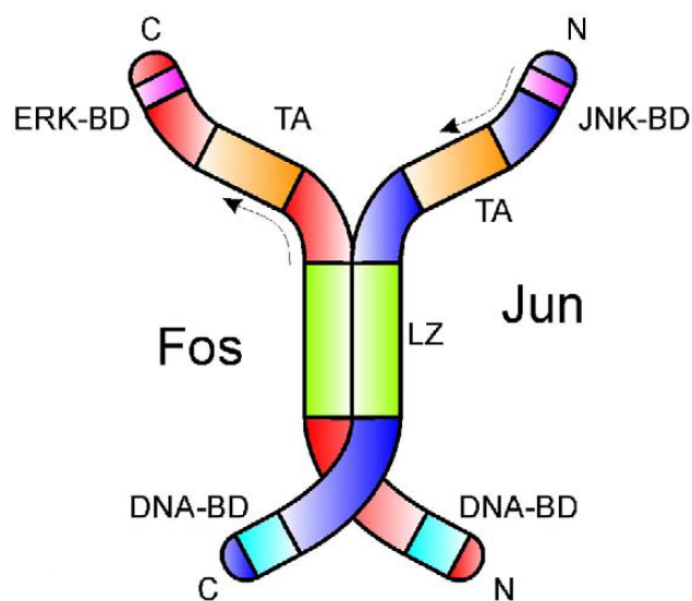


Figura 5. Esquema del heterodímero AP-1 clásico c-Jun/c-Fos, extraído y adaptado de Raivich y Behrens, 2006 [50]. Contiene los dominios de unión a ADN (DNA-BD), las regiones de cierre de leucinas (LZ), los módulos de trans-activación (TA) y los dominios de unión a proteínas quinasas (ERK-BD en el caso de c-Fos, JNK-BD en el caso de c-Jun). Nótese la orientación anti-paralela de los monómeros.

inmunofluorescencia y simulaciones de dinámica molecular sugieren su existencia. Los mismos se forman a través de su dominio LZ, al igual que los heterodímeros, y además son estables y tienen capacidad de unión a la cromatina a través de su dominio BD [51].

Los factores de transcripción del tipo AP-1 fueron descritos hace ya más de 30 años [52-54]. Sin embargo, las consecuencias de su actividad siguen siendo elucidadas aún en la actualidad. En un principio, se identificó a AP-1 como un factor de transcripción que contribuía a la expresión basal de genes [54]. Sin embargo, muy pronto surgieron evidencias que reconocían a muchos otros estímulos, tales como suero [55, 56], factores de crecimiento [48, 56-58] u onco-proteínas como v-Src o Ha-Ras [48] como potentes inductores de la actividad AP-1. Estos descubrimientos incentivaron más investigaciones, que poco tiempo después demostraron que la actividad AP-1 es también inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF- α) [59, 60] y la interleuquina 1 (IL-1) [61, 62]. Estos hallazgos, sumados al hecho de que tanto c-Jun como c-Fos están codificados por proto-oncogenes, inmediatamente sugirieron que la actividad AP-1 cumple un rol importante en el control del crecimiento y en la transformación celular. Inclusive, se demostró que su activación está vinculada a procesos de inflamación y a la respuesta de inmunidad innata [62, 63].

Desde entonces, múltiples trabajos aportaron evidencias que demostraban la participación fundamental de c-Fos en el crecimiento celular y en la transformación neoplásica. Sorprendentemente, se evidenció que, a diferencia de otros oncogenes estudiados hasta ese entonces, no es necesario que c-Fos sufra de mutaciones en su secuencia para adquirir su poder oncogénico sino que la sobre-expresión de la proteína normal es suficiente para, por ejemplo, inducir la transformación de fibroblastos de rata inmortalizados [64]. También se encontró una función inusual de AP-1 como factor regulador del crecimiento: además de responder a factores de crecimiento, su expresión también se ve incrementada en respuesta a diferentes tipos de estrés genotóxicos, tales como exposición de células a UV o agentes alquilantes, que normalmente provocan arresto del crecimiento o muerte celular. Inclusive, se demostró que la activación de AP-1 parece depender del tipo celular: mientras en algunas células promueve apoptosis, en otras se requiere para su supervivencia [65].

Si bien a partir de estas evidencias se demostraron la importancia de c-Fos y las consecuencias fisiológicas de la inducción de su expresión, muchos mecanismos celulares en los que esta proteína participa siguen siendo una incógnita. En nuestro laboratorio hemos demostrado que, además de su reconocida función como miembro de la familia de factores de transcripción tipo AP-1, c-Fos se asocia al RE donde activa enzimas particulares de síntesis de fosfolípidos [66-69] y de glicolípidos [70] por un mecanismo independiente de su actividad nuclear como factor de transcripción (revisado en Cardozo Gizzi y Caputto, 2013; Caputto, et al., 2014) [71, 72] .

Los primeros trabajos de nuestro grupo demostraron que la transcripción y traducción de c-Fos participan en la regulación de la síntesis de glicerofosfolípidos *in vivo* en la retina de pollo durante la estimulación sensorial: si se inhibe específicamente la expresión de c-Fos en fotorreceptores y células ganglionares, las diferencias en la síntesis de fosfolípidos promovidas por la exposición de los animales a luz u oscuridad se ven abolidas [66, 67]. Más tarde, demostramos que la activación de la síntesis de fosfolípidos por c-Fos se observa también en fibroblastos inmortalizados NIH 3T3 en cultivo inducidos a re-ingresar al ciclo celular [68]. En estas células, la expresión del ARN mensajero (ARNm) de c-Fos, que precede a la correspondiente expresión de la proteína, es inducida de manera rápida y transiente, mostrando dos picos de expresión que coinciden con un incremento en el marcado metabólico de los fosfolípidos. El pico de expresión del ARNm de c-Fos a los 5 minutos se traduce en un incremento en el marcado metabólico de fosfolípidos a los 7.5 minutos, mayoritariamente lípidos que actúan como segundos mensajeros en cascadas de transducción de señales (particularmente PI y sus derivados fosforilados). Lo mismo sucede a los 60 minutos, tiempo en el que se evidencia una mayor síntesis de lípidos que componen membranas biológicas (Figura 6) [68].

Esta activación de la síntesis de lípidos dependiente de c-Fos también ha sido observada en otros tipos celulares. En células T98G, que derivan de un glioblastoma multiforme humano, bloquear la expresión de c-Fos provoca una disminución en el marcado metabólico de fosfolípidos e inhibición de la proliferación celular [73, 74]. La activación de la síntesis de fosfolípidos no genómica también se observa en células PC12 en cultivo inducidas a diferenciar a un fenotipo semejante al de neuronas simpáticas [69], donde c-Fos también activa la síntesis de glicolípidos [70]. Este último modelo

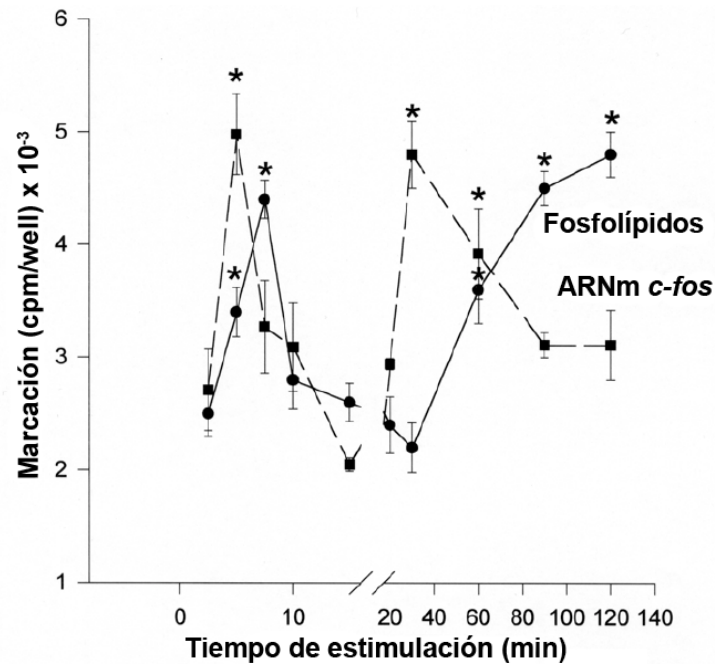


Figura 6. Curva de tiempo de marcación metabólica de fosfolípidos (círculos, línea continua) y expresión del ARNm de c-Fos (cuadrados, línea discontinua) en fibroblastos NIH 3T3 quiescentes estimulados a re-ingresar al ciclo celular, adaptado de Bussolino et al., 2001 [68]. Los resultados son el promedio de 6 experimentos realizados de manera independiente, llevados a cabo por duplicado. Se muestran los valores respecto a tiempo 0 de estimulación \pm DE. * $p < 0.025$.

celular tiene la particularidad de permitir distinguir la función dual de c-Fos: inicialmente, cuando las células son estimuladas a diferenciar a un fenotipo de neuronas simpáticas mediante la adición de NGF al medio de cultivo, c-Fos es necesario en el núcleo en su forma de factor de transcripción AP-1 para desencadenar el programa genómico de diferenciación. Sin embargo, una vez que las células han sido inducidas a iniciar dicho proceso, c-Fos solo es requerido en el citoplasma, asociado al RE, donde activa la síntesis de fosfolípidos [69].

En nuestro laboratorio también se determinó que existe una regulación de la asociación de c-Fos al RE y, consecuentemente, de su capacidad para activar la síntesis de lípidos. Se describió por primera vez que c-Fos se fosforila sobre residuos de tirosina (Tyr): el estado de fosforilación de las Tyr 10 y 30 de la proteína determina que ésta se asocie o no a la fracción de membranas del RE [73]. Células quiescentes muestran niveles de expresión muy bajos de c-Fos, que se encuentra fosforilada en estos residuos y no unida a membrana, coincidiendo con bajos niveles de síntesis de fosfolípidos. Al inducir el crecimiento de las células, se promueve una mayor expresión de c-Fos, que se

encuentra defosforilada y asociada a membranas del RE promoviendo la consecuente activación de síntesis de lípidos. Al medir la incorporación de [^{32}P] en fosfolípidos a partir de [^{32}P]-ATP *in vitro*, solo c-Fos defosforilado es capaz de activar la síntesis de fosfolípidos (Figura 7). Inclusive, experimentos de fraccionamiento sub-celular evidenciaron la presencia de c-Fos defosforilado asociado a membranas, en contraste con el contenido de c-Fos fosforilado que se recupera en la fracción del sobrenadante. Posteriormente, se identificó a c-Src como la enzima responsable de fosforilar los residuos Tyr de c-Fos y a TC45-PTP como la fosfatasa que los defosforila (Figura 7) [74]. Esta modificación post-traduccional reversible es regulada principalmente a nivel de la defosforilación: cuando células quiescentes son inducidas a re-ingresar al ciclo celular, concomitante a la inducción de la expresión de c-Fos, se observó que TC45-PTP trasloca desde el núcleo al citoplasma, se activa y forma complejos c-Fos/TC45 que resultan en la defosforilación de c-Fos. Al cesar la inducción, TC45-PTP retro-trasloca al núcleo y la mayor parte de c-Fos presente en las células es degradada, mientras que pequeñas

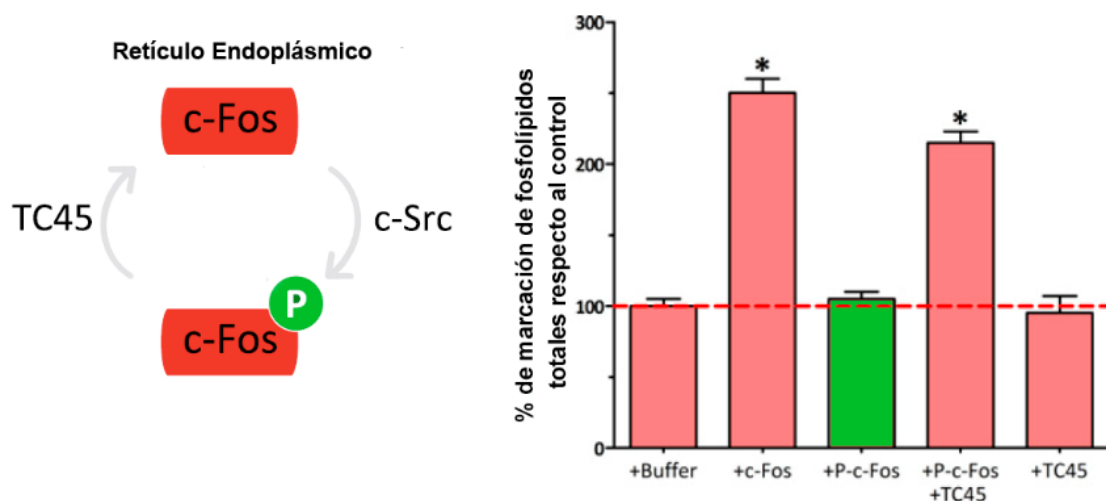


Figura 7. Izquierda: Representación esquemática del ciclo de fosforilación/defosforilación de residuos de tirosina de c-Fos: c-Src es la quinasa y TC45-PTP la fosfatasa involucradas en el ciclo. c-Fos defosforilado se encuentra asociado a membranas del RE mientras que c-Fos fosforilado no. **Derecha:** Marcación metabólica de fosfolípidos totales en presencia de c-Fos fosforilado y defosforilado. c-Fos recombinante fue incubado en ausencia (+c-Fos) o presencia (+P-c-Fos) de c-Src recombinante. c-Fos fosforilado (+P-c-Fos) fue entonces incubado con TC45 (+P-c-Fos/+TC45). Se incluyó un control con TC45 incubada sola (+TC45). Luego, en todos los incubados se ensayó su capacidad de incorporar [^{32}P] a fosfolípidos a partir de [^{32}P]-ATP *in vitro*. Solo c-Fos defosforilada fue capaz de activar la incorporación de [^{32}P] a fosfolípidos. Los resultados son el promedio \pm DE de dos experimentos independientes, llevados a cabo por triplicado. *p < 0.002, de acuerdo a test de t de Student de dos colas. Esquema adaptado de resultados de Ferrero et al., 2012 [74].

cantidades remanentes son fosforiladas por c-Src, resultando inactivas para promover la síntesis de lípidos.

Los esfuerzos de nuestro laboratorio fueron luego orientados a determinar el mecanismo molecular mediante el cual c-Fos ejerce esta función no genómica como activador de síntesis de lípidos. Para ello, diversas vías de síntesis fueron evaluadas. El ácido fosfatídico (PA) es el sustrato común de dos vías principales de síntesis de fosfolípidos que culminan en la síntesis de PI y sus derivados fosforilados o en PC y PE, los cuales son sintetizados por la vía de Kennedy (Figura 8). En caso de que el PA sea sustrato de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), se convertirá en diacilglicerol (DAG), intermediario en la síntesis de PC, PE y triacilglicérol; y en caso de que sea sustrato de la enzima CDP-diacilglicerol sintasa (CDS), formará CDP-DAG, el primer intermediario de la vía de síntesis de los PIPs.

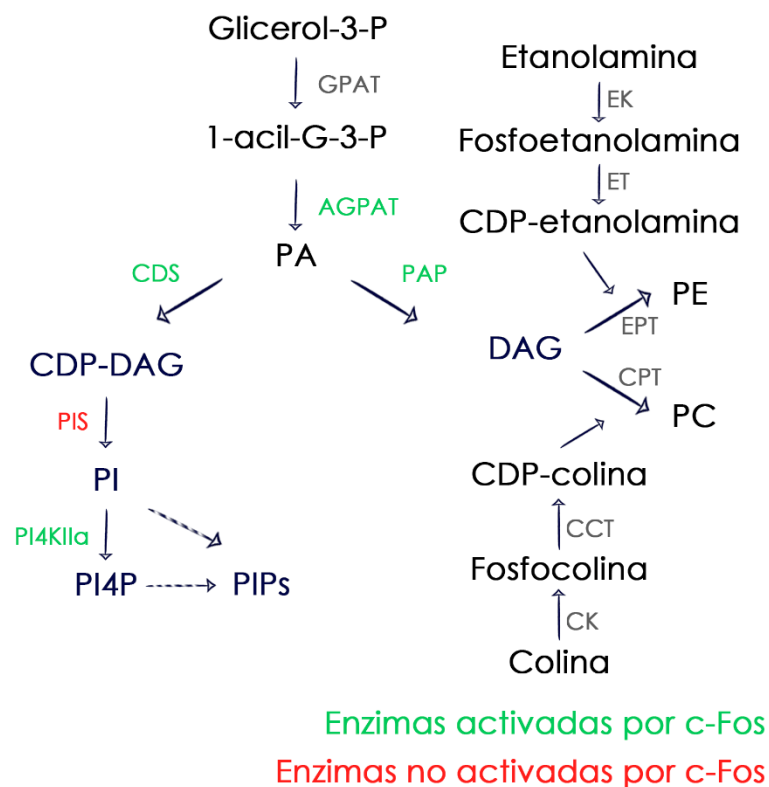


Figura 8. Esquema de las vías de biosíntesis de glicerofosfolípidos en células de mamífero.

Se evaluó si todas las enzimas que participan de las vías de síntesis de fosfolípidos y de glicolípidos son activadas por dicha proteína. De las enzimas examinadas, se encontró que en el caso del metabolismo de fosfolípidos, c-Fos regula la capacidad catalítica de solo algunas enzimas claves (Figura 8, indicadas en verde) sin afectar a otras

(Figura 8, indicadas en rojo). *In vitro*, c-Fos recombinante activa a las enzimas CDS y a la isoforma α de la fosfatidilinositol-4-Kinasa II (PI4KII α), enzimas que catalizan la primera y la tercera etapa de la vía de síntesis de PIPs, respectivamente. En presencia de c-Fos, la V_{max} de ambas enzimas se duplica, mientras que el K_m no se ve afectado, lo que implica que no modifica la afinidad de las mismas por sus sustratos. La actividad de fosfatidilinositol sintasa (PIS), la enzima que cataliza la segunda etapa, no mostró cambios en presencia o ausencia de c-Fos [75]. Si bien c-Fos solo activa determinadas enzimas de síntesis de lípidos, todos los lípidos marcados metabólicamente se ven incrementados ya que las enzimas que activa son las limitantes en las vías de síntesis en las que participan. Además, se demostró que en células PC12 c-Fos activa la síntesis global de gangliósidos al activar a la primera glicosiltransferasa de su vía biosintética, la glucosilceramida sintasa, sin modificar la actividad de las enzimas glucosilceramida galactosiltransferasa 1 o lactosilceramida sialiltransferasa 1 [70].

Nuestra hipótesis de trabajo fue que para que exista activación de las enzimas, debe existir algún tipo de interacción directa entre las mismas y c-Fos. Para confirmarla, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación y de microscopía FRET entre c-Fos y las enzimas en estudio. FRET es una técnica en la cual las dos proteínas de interés se expresan mediante plásmidos unidas a dos *tags* fluorescentes diferentes, con la particularidad de que el espectro de emisión de uno de ellos (donor) debe solaparse con el espectro de absorción del otro (aceptor) (Figura 9). De este modo, cuando los fluoróforos se encuentran lo suficientemente cerca, al excitar el fluoróforo donador con una longitud de onda específica, la emisión del mismo provocará la excitación del fluoróforo aceptor y se generará la consiguiente señal en el canal correspondiente a la longitud de onda de emisión del aceptor [76]. La técnica puede ser utilizada para inferir interacciones proteína-proteína dado que la distancia necesaria para que haya transferencia de energía entre los dos fluoróforos debe ser menor a 10 nm, por lo que se considera entonces que cuando se encuentran valores positivos de FRET entre dos proteínas, las mismas están interaccionando físicamente. Ambas técnicas, co-inmunoprecipitación y microscopía FRET, consistentemente demostraron que c-Fos efectivamente interacciona físicamente con CDS y PI4KII α , mientras que no lo hace con

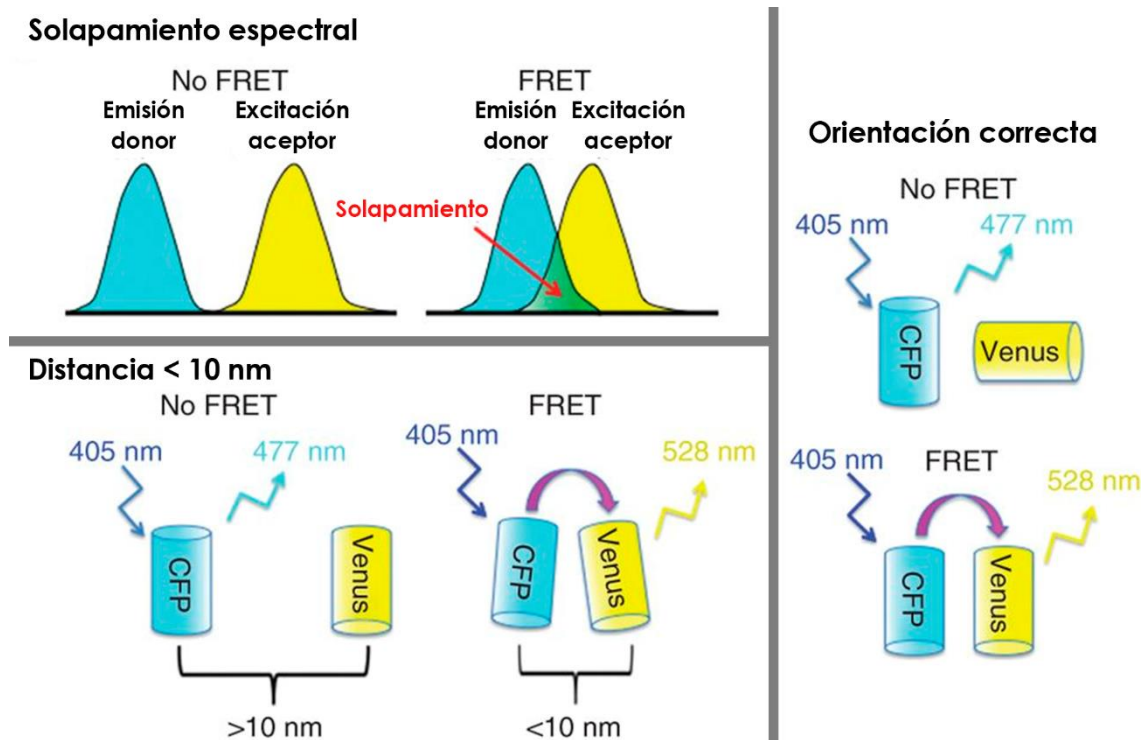


Figura 9. Esquema de las condiciones requeridas para la técnica de FRET. Solapamiento entre el espectro de emisión del fluoróforo donador y el espectro de excitación del fluoróforo aceptor. La distancia necesaria que debe existir entre ambos fluoróforos para que haya solapamiento y, por lo tanto, exista fenómeno de transferencia de energía entre ellos, debe ser menor a 10 nm. De este modo, se puede inferir que ambas proteínas están interactuando entre ellas. La cercanía espacial necesaria entre los dos fluoróforos debe corresponderse con una orientación molecular adecuada de los mismos.

PIS o con la isoforma β de PI4KII [75]. Lo mismo se observó evaluando la vía de síntesis de glicolípidos: c-Fos interacciona con glucosilceramida sintasa pero no con la glucosilceramida galactosiltransferasa 1 o con la lactosilceramida sialiltransferasa 1 [70].

Además de las enzimas ya mencionadas, c-Fos activa también a la enzima PAP tanto *in vitro* como *in vivo*. Se estudió a una PAP tipo I denominada Lipin 1, responsable de la síntesis *de novo* de DAG, y particularmente a la isoforma Lipin 1 β , dado que esta reside mayormente en el citoplasma/RE. Se determinó que c-Fos activa a esta enzima tanto en fibroblastos NIH 3T3 en cultivo como en un sistema modelo purificado *in vitro* de micelas mixtas de Tritón-X-100/PA y la enzima recombinante purificada. Además, también se probó que existe interacción física entre c-Fos y Lipin 1 β y que la misma promueve un incremento en su capacidad catalítica (incrementa $\sim 50\%$ la k_{cat}) sin modificar la afinidad entre Lipin 1 β y PA, su sustrato [77].

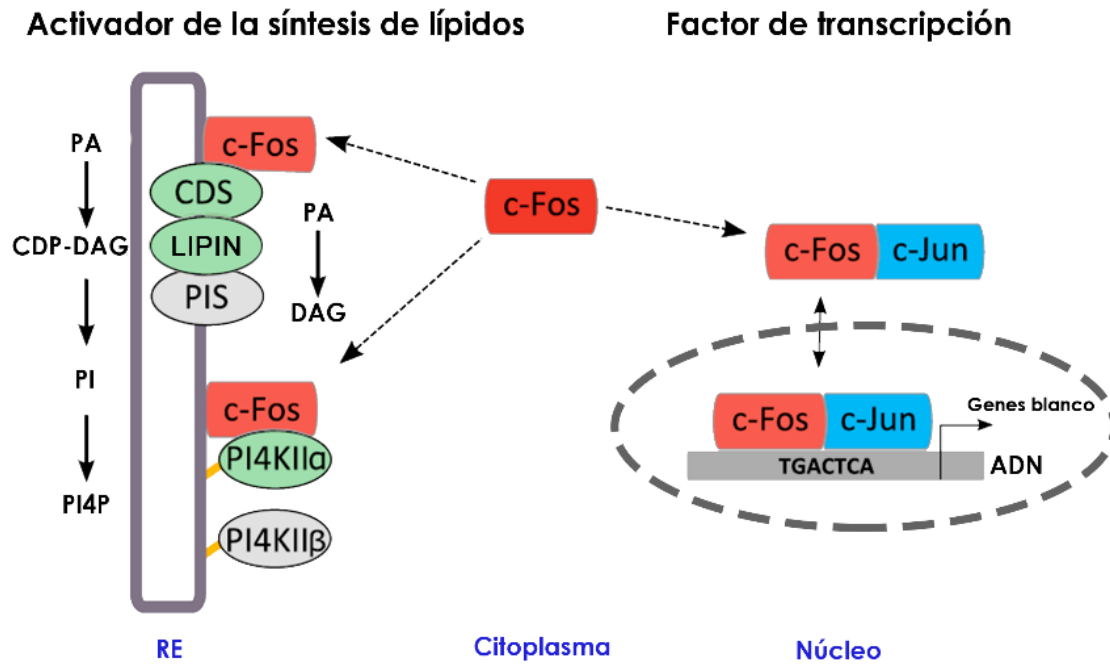


Figura 10. Esquema de la función dual de c-Fos, adaptado de Caputto et al., 2014 [72]. **Izquierda:** c-Fos actúa como activador de la síntesis de fosfolípidos mediante interacción física con enzimas específicas en membranas del RE. Las enzimas indicadas en verde son activadas por c-Fos, mientras que las grises no lo son. **Derecha:** función canónica de c-Fos como factor de transcripción tipo AP-1. Los dímeros ingresan al núcleo, donde reconocen secuencias blanco de ADN a través del dominio básico bipartito [49].

Para avanzar en el conocimiento del mecanismo molecular mediante el cual c-Fos ejerce esta función no genómica, se examinó cuáles son los dominios de c-Fos relevantes para la activación de la síntesis de lípidos mediante su interacción con las enzimas que activa. Se encontró que aquellas mutantes truncadas de c-Fos que contienen el dominio BD (comprende los 20 aminoácidos 139-159, 12 de los cuales son aminoácidos básicos) activan la síntesis de fosfolípidos *in vitro* mientras que aquellos que no poseen el BD no lo hacen [75]. Así, la mutante NA (aminoácidos 1-138) de c-Fos o la mutante LZC (contiene los 163 aminoácidos del dominio C-terminal de la proteína) no activan la síntesis de lípidos, mientras que la mutante NB (aminoácidos 1-159), que incluye el BD, sí lo hace y con una eficiencia semejante a la de c-Fos (Figura 11). Por el contrario, todas las mutantes que contienen el extremo N-terminal pero que carecen del BD se asocian a las enzimas que c-Fos activa pero sin activarlas. Esto nos permitió inferir que c-Fos se une a las enzimas a través de su dominio N-terminal pero es necesario su dominio BD para lograr la activación de las mismas.

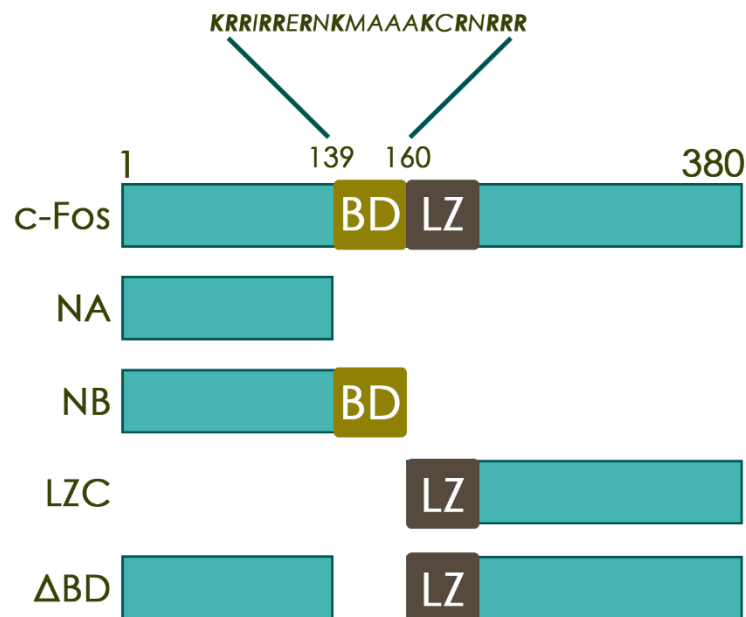


Figura 11. Esquema de las mutantes de c-Fos estudiadas, adaptado de Alfonso Pecchio et al., 2011 [75].

No todo pasa por el retículo endoplásmico: activación de síntesis de lípidos en el núcleo mediada por c-Fos

La presencia en el núcleo de diferentes fosfolípidos, particularmente PI y sus derivados fosforilados, ha sido extensamente documentada [78, 79]. Sin embargo, muchas de sus funciones y los mecanismos regulatorios relacionados a la localización nuclear no han sido determinados con precisión. De todos ellos, el más analizado es el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), que participa en la regulación de diversos procesos nucleares como la respuesta a estrés, el control del ciclo celular, la transcripción, el procesado y la exportación del ARNm, la reparación del ADN, el remodelado de la cromatina y la expresión génica [79-84]. Se ha demostrado que las enzimas fosfatidilinositol-fosfato-kinasas (PIPKs) también se encuentran presentes en el núcleo y allí producen PI(4,5)P₂ en respuesta a diferentes señales internas o externas [82].

Teniendo en cuenta que en muchos casos la expresión de c-Fos induce cambios transcripcionales en genes que no contienen secuencias consenso para AP-1 en sus promotores y que las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos en el núcleo

son las mismas que las que se encuentran en el citoplasma, se evaluó si c-Fos es capaz de activar la síntesis de lípidos a nivel nuclear.

En experimentos realizados durante el transcurso de la presente tesis, se encontró que c-Fos activa la enzima PI4P5K1 α en el núcleo, produciendo un aumento de la síntesis de PI(4,5)P₂ que favorece la relajación de la cromatina y permite que, además de AP-1, otros factores de transcripción tengan acceso a sus genes blanco [85]. Esto proporciona una explicación de porqué se observan cambios transcripcionales en presencia de c-Fos en genes que no contienen secuencias AP-1 en sus promotores. Nuestras evidencias permiten inferir que c-Fos puede ejercer su actividad como regulador de la transcripción de dos maneras: a través de un mecanismo AP-1 dependiente y a través de un mecanismo AP-1 independiente mediante su capacidad de activar la síntesis de lípidos a nivel nuclear.

c-Fos y su función no genómica en el desarrollo del SNC

Con la intención de estudiar la participación de c-Fos en el desarrollo neuronal, en el laboratorio se destinaron esfuerzos a caracterizar las consecuencias de la falta de su expresión en el desarrollo del SNC utilizando animales *knock-out* (KO). Los antecedentes conocidos de estudios del modelo de ratones *fos* *-/-* demostraron que solo un 40% sobrevive hasta su nacimiento logrando alcanzar una edad promedio de entre 6 y 7 meses. A diferencia de sus hermanos de camada *fos* *+/+* o *fos* *+/-*, los ratones KO muestran deficiencias en el crecimiento corporal, alcanzando un tamaño final entre un 40 y un 60% menor al de animales *wild type* y poseen también alteraciones en el sistema hematopoyético, severa osteopetrosis y cambios conductuales [86, 87]. Además, presentan deficiencia o ausencia de gametogénesis, por lo que no son fértiles y solo se los obtiene por cruce entre animales heterocigotas *fos* *+/-*.

En la caracterización realizada en nuestro laboratorio de aspectos que no habían sido abordados en los ratones *fos* *-/-*, se encontró que la reducción en el tamaño que alcanzan estos ratones es debida a que contienen un número reducido de células respecto a los animales *wild-type*, tanto en el SNC como en sus diversos órganos [88, 89]. Al examinar que ocurre con la neocorteza durante el desarrollo de estos animales, se encontró una reducción en el espesor de la corteza cerebral de embriones de 14,5 días de gestación KO con respecto a la de los animales *wild-type*, lo que se observa

inclusive hasta la edad adulta. Esta reducción correlaciona con una menor diferenciación neuronal de las células madre/progenitoras neurales (determinada midiendo marcadores moleculares de diferenciación tales como Tbr1, β III-tubulina, NeuN, MAP2) y un incremento en los niveles de apoptosis en la zona ventricular de los embriones *fos*^{-/-}. Además, el ángulo de división mitótico resultó ser predominantemente vertical en los progenitores apicales *fos*^{-/-}, lo que indica una menor tendencia a diferenciar de las células madre/progenitoras neurales, en concordancia con los resultados obtenidos con los marcadores moleculares de diferenciación.

En ensayos realizados por el Dr. Gabriel Ferrero en el laboratorio utilizando cerebros de ratas Wistar *wild type*, se obtuvieron resultados preliminares que demostraron que c-Fos se expresa en cerebro en grandes cantidades en etapas embrionarias del desarrollo y su presencia disminuye conforme avanza el desarrollo del adulto (Figura 12). Esto coincide con lo descrito por Jean François Caubet en la literatura para ratones ya en el año 1989, quien informó que en diferentes etapas del desarrollo embrionario se expresan grandes cantidades de ARNm de c-Fos en el sistema nervioso, mientras que en el adulto los niveles de la proteína son casi indetectables [90]. Sin embargo, se ha observado que c-Fos se expresa en niveles muy elevados en el cerebro adulto bajo diferentes situaciones de estimulación o de estrés [90], tales como la estimulación sensorial de la médula espinal [91], la inducción de convulsiones por metrazol [92, 93] o la estimulación eléctrica del hipocampo [94].

El hecho de que c-Fos se exprese en tan variadas situaciones y en condiciones tanto de diferenciación como de estimulación neuronal, sugiere que juega un rol importante en la regulación de la organización y plasticidad neuronal. En este sentido, se ha propuesto que c-Fos ejerce esta función a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en la organización del citoesqueleto o en la liberación de neurotransmisores [90, 95].

En un intento por estudiar el rol de c-Fos y su función no genómica como activador de la síntesis de lípidos en la diferenciación neuronal, experimentos realizados por el Dr. Gabriel Ferrero arrojaron evidencias preliminares que permiten inferir que c-Fos ejerce su función de activador de la síntesis de lípidos en cerebro: el agregado de c-Fos recombinante a la fracción de membrana de homogenatos de cerebro depletados

de c-Fos endógeno produce un aumento en el marcado radiactivo de fosfolípidos (Figura 12).

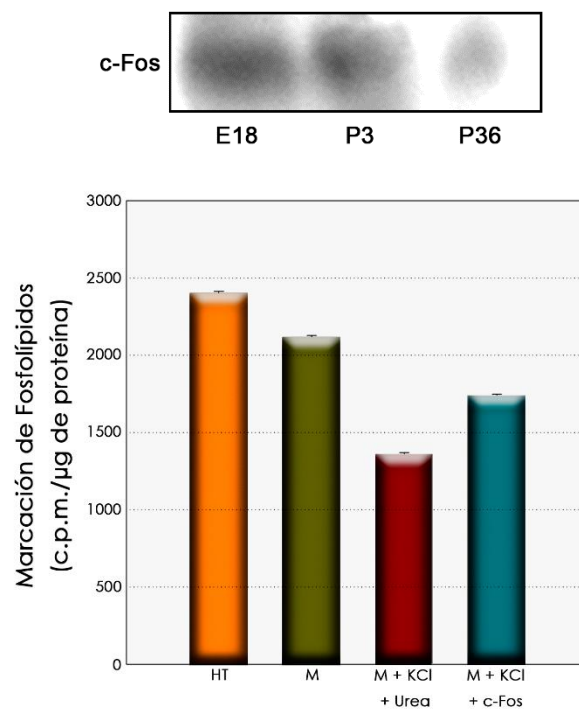
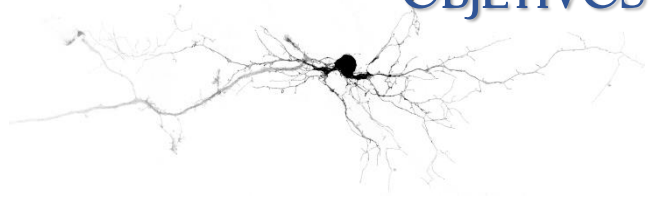


Figura 12. Resultados preliminares obtenidos por el Dr. Gabriel Ferrero. **Superior:** Western Blot revelado con anticuerpos específicos para c-Fos de muestras de homogenato total de cerebro de ratas Wistar de 18 días de gestación (E18), de 3 días pos-natal (P3) y adulto de 36 días (P36). **Inferior:** Marcación metabólica de fosfolípidos totales en homogenatos de cerebro de ratas Wistar medidos mediante incorporación de $[^{32}\text{P}]$ a partir de $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ *in vitro*. HT: Homogenato total de cerebro; M: fracción microsomal o de membrana; M+KCl+Urea: fracción microsomal depletada de c-Fos endógeno y posterior adición de Urea (vehículo) como control; M+KCl+c-Fos: fracción microsomal depletada de c-Fos endógeno y posterior adición de c-Fos recombinante.

Los antecedentes mencionados en cuanto a la falta de comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis de lípidos en neuronas en desarrollo, respecto a los conocimientos generales de la función AP-1-independiente de c-Fos como activador de la síntesis de lípidos y los resultados preliminares respecto a dicha función en el sistema nervioso, nos permiten postular la hipótesis de que c-Fos podría estar contribuyendo a la diferenciación neuronal regulando la síntesis de lípidos localizada necesaria para dicho proceso. El estudio de dicha posibilidad fue objetivo principal de la presente tesis.

OBJETIVOS

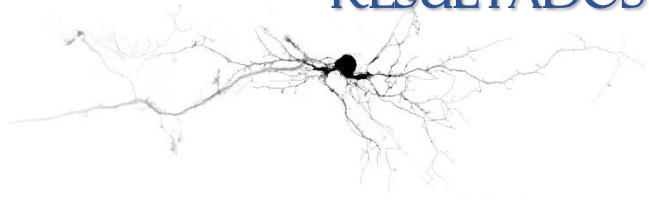


El **objetivo general** de la presente tesis fue avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares mediante los cuales c-Fos ejerce la función crítica de activar la síntesis de lípidos y así posibilitar una mayor tasa de génesis de membrana necesaria para los complejos eventos de diferenciación y crecimiento neuronal.

OBJETIVO ESPECÍFICO I: Estudiar el requerimiento de c-Fos para la diferenciación de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones de rata.

OBJETIVO ESPECÍFICO II: Estudiar el sitio sub-celular y los mecanismos moleculares mediante los cuales c-Fos participa en la regulación de los niveles de síntesis de lípidos en neuronas en diferenciación.

RESULTADOS



OBJETIVO ESPECÍFICO I: Estudios del requerimiento de *c-Fos* para la diferenciación de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones de rata.

La diferenciación neuronal es uno de los ejemplos más claros y extremos de polarización celular, proceso que ha sido ampliamente estudiado en el caso de las neuronas de hipocampo y que ha permitido establecer un patrón clásico de estadios de diferenciación neuronal en cultivo (Figura 13) [96, 97]. Cuando se disgrega el hipocampo y los neuroblastos son sembrados en cultivo, estos se adhieren al sustrato y muestran una morfología esférica. Muy poco tiempo después, la célula desarrolla lamelipodias altamente dinámicas alrededor de su cuerpo, momento que corresponde con el

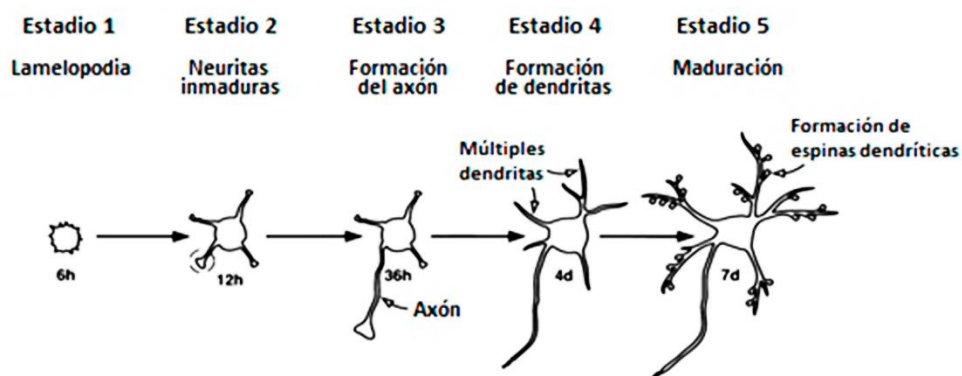


Figura 13. Esquema del establecimiento de polaridad neuronal y los estadios de diferenciación de neuronas de hipocampo basado en el modelo descrito por Dotti, et al. en 1988 y adaptado de Govek et al., 2005 [96,97].

denominado *estadio 1 de diferenciación*. A continuación, la célula entra en el *estadio 2 de diferenciación*: las lamelipodias se transforman en pequeños procesos que se prolongan desde la membrana plasmática llamados neuritas, que en pocas horas alcanzan una longitud de entre 10 y 15 μm . Luego de varias horas, una de esas neuritas sufrirá un cambio y comenzará a elongar a una velocidad entre 5 y 10 veces mayor a la del resto para convertirse en el axón. En este punto, la célula ya está polarizada y se encuentra en un *estadio 3 de diferenciación*. Luego de 4-5 días en cultivo, comienzan a crecer las otras neuritas, las dendritas, pero lo hacen a una velocidad mucho menor: mientras que el axón crece hasta 70 μm por día, la máxima velocidad de crecimiento que alcanza una dendrita es de 12 μm por día. En esta etapa, la neurona ya ha alcanzado

un *estadio 4 de diferenciación*. Finalmente, en el *estadio 5*, se produce la maduración del árbol dendrítico y la formación de las espinas dendríticas, la especialización sináptica y el establecimiento de los contactos [96, 98]. Así, luego de 7 días en cultivo, el axón de las neuronas alcanzará una longitud aproximada de 300 μm y sus dendritas unos 75 μm .

Estos estadios son claramente observables en neuronas en cultivo fijadas a diferentes tiempos y marcadas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β III-tubulina para visualizar su citoesqueleto y su estructura (Figura 14).

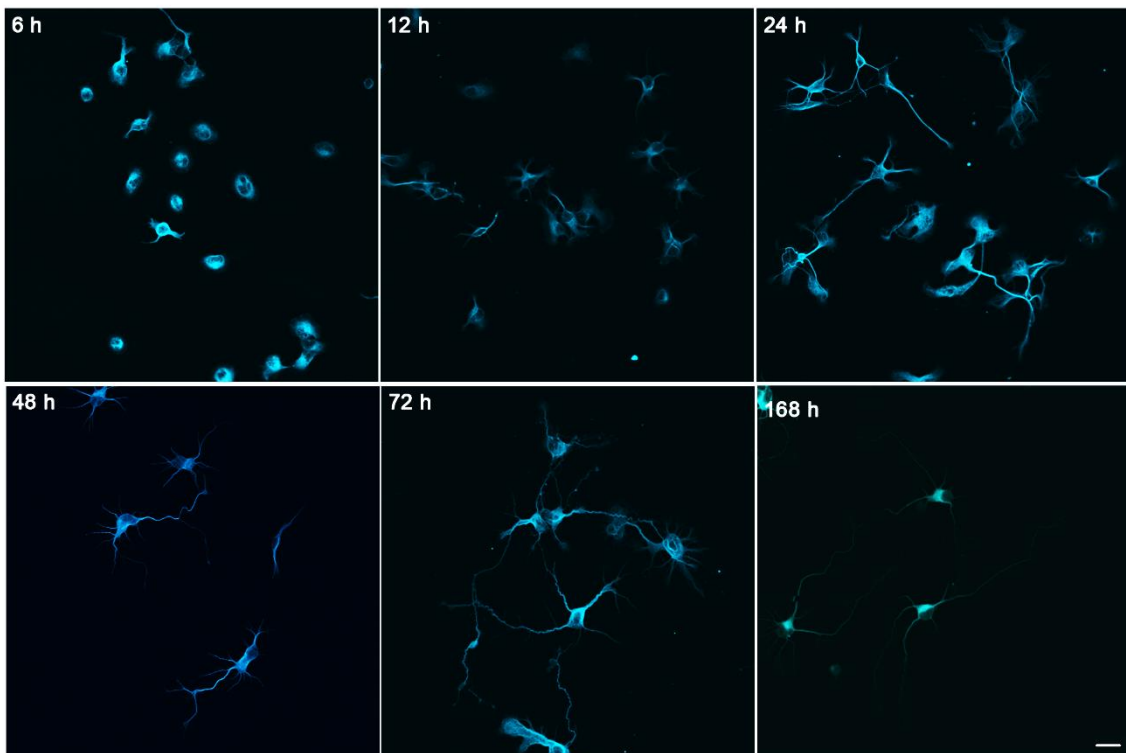


Figura 14. Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de rata fijadas a diferentes tiempos de cultivo y marcadas con un anticuerpo anti- β III-tubulina. Barra de referencia: 20 μm . Nótese que la morfología de las células coincide con el esquema del establecimiento de polaridad neuronal y los estadios de diferenciación de neuronas de hipocampo del modelo descrito por Dotti, et al. en 1988 (96).

La presencia de c-Fos en cerebro, y más específicamente en el hipocampo, ha sido demostrada hace casi 30 años por Dragunow y sus colaboradores [99]. Antes de iniciar nuestros estudios, nos propusimos evaluar la expresión de c-Fos a distintos tiempos en cultivos primarios de hipocampo de rata. Tanto por inmunofluorescencia

como por Western Blot (Figura 15) se observa que c-Fos se expresa en niveles similares en todos los tiempos evaluados.

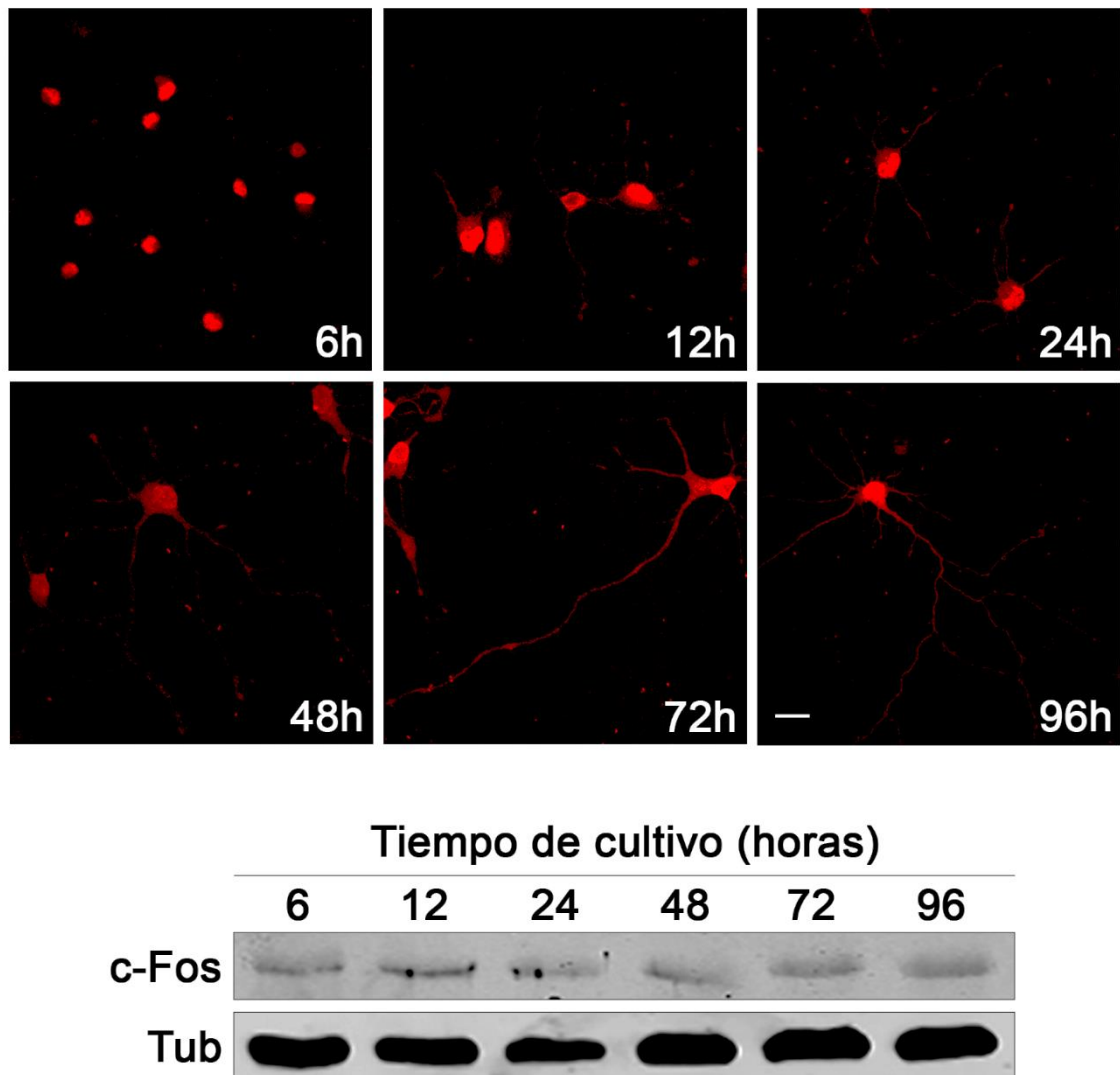


Figura 15. Expresión de c-Fos en cultivos primarios de hipocampo de rata. Superior: Neuronas de hipocampo de rata fueron fijadas a diferentes tiempos y marcadas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-c-Fos (rojo). Barra de referencia: 20 μ m. **Inferior:** Western Blot de homogenatos obtenidos a partir de células totales de hipocampo a diferentes tiempos de cultivo. Las membranas fueron inmunomarcadas con anticuerpos primarios anti-c-Fos (panel superior) y anti-Tubulina (panel inferior) como control de carga y posteriormente con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Como se mencionó anteriormente, la adición de NGF al medio de cultivo de células PC12 desencadena un programa genómico de diferenciación de las mismas hacia un fenotipo de neuronas simpáticas acompañado de un aumento en la expresión de c-Fos [69]. En dicho trabajo, se demostró que el tratamiento de células PC12 con NGF junto con el péptido señal de localización nuclear (NLSP, del inglés *Nuclear Localization Signal Peptide*, que impide el ingreso de c-Fos al núcleo) a tiempos cortos es capaz de impedir la neuritogénesis, aun cuando la expresión de c-Fos es normal. Si, en cambio, el tratamiento con NLSP se realiza después de 16 horas de la inducción con NGF, la diferenciación es normal. Por el contrario, si en este tiempo se bloquea la expresión de c-Fos con un oligonucleótido antisentido (ASO, del inglés *AntiSense Oligonucleotide*), se produce una disminución en la síntesis de lípidos y retracción de neuritas aún en presencia de NGF. Solo basta con sobre-expresar c-Fos para restaurar el crecimiento y la elongación de las neuritas, aún en ausencia de NGF [69]. Estos resultados ponen de manifiesto la función dual de c-Fos: es requerida al comienzo de la diferenciación para iniciar el programa genómico correspondiente y a tiempos más avanzados a nivel citoplásmico activando la síntesis de lípidos para sostener el crecimiento neurítico.

Si bien las células PC12, desarrolladas a partir de un feocromocitoma de médula adrenal de rata, son ampliamente utilizadas como modelo de diferenciación neuronal y procesos neurobiológicos *in vitro*, al ser una línea celular inmortalizada pueden no recapitular exactamente lo que ocurre en neuronas en desarrollo. Tomando esto en consideración, decidimos evaluar cuál es el efecto de bloquear c-Fos en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata en diferenciación.

En primer lugar, evaluamos el efecto de bloquear la actividad de la proteína. Para ello, la estrategia experimental empleada fue la *profeción* mediante el kit *BioPorter*, una técnica que permite ingresar proteínas a la célula a través de la formación de complejos de las mismas con una mezcla específica de lípidos, similar a lo que ocurre en la técnica de transfección de ADN. A las 2 horas de iniciado el cultivo, las células fueron *profectadas* con anticuerpos específicos para c-Fos para bloquear la actividad de la proteína endógena o con anticuerpos anti IgG de la misma especie como control. Veinticuatro horas más tarde, las células se fijaron y se procedió a realizar inmunofluorescencia. Cabe aclarar que en las células profectadas con anticuerpos anti c-Fos solo se utilizaron anticuerpos secundarios para su marcación por

inmunofluorescencia. Como se puede observar en la Figura 16, bloquear la acción de c-Fos impide la correcta diferenciación neuronal: la mayoría de las neuronas analizadas permanecieron en un estadio 2 de diferenciación aún luego de 48 horas de cultivo.

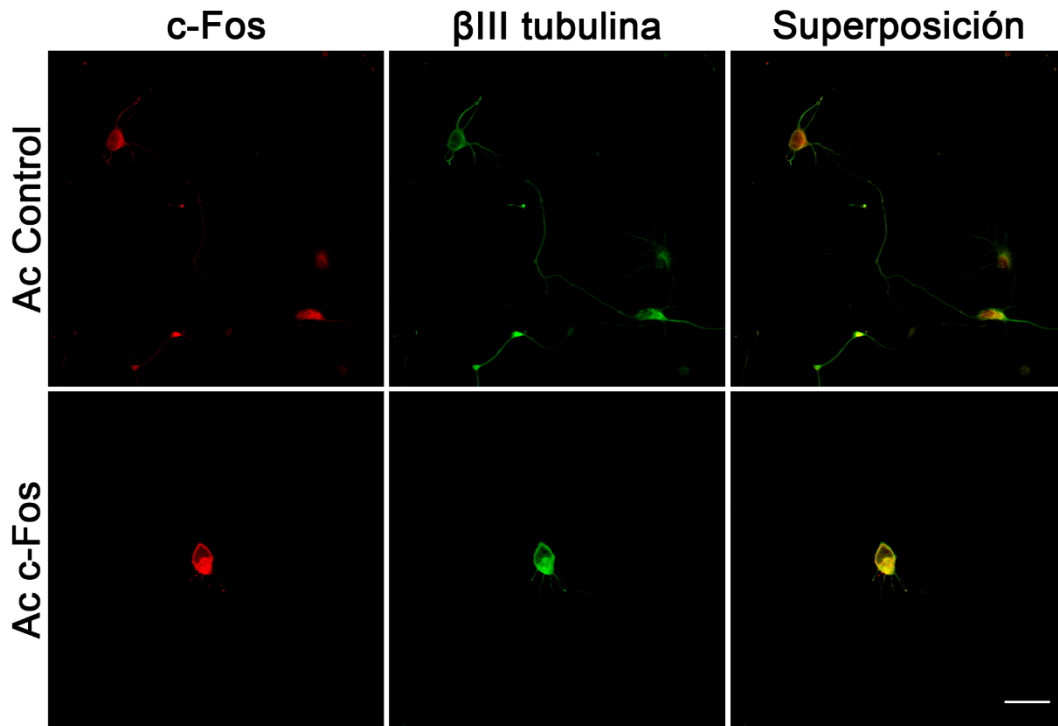


Figura 16. El bloqueo de la actividad de c-Fos impide la correcta polarización y diferenciación neuronal. Neuronas de hipocampo de rata fueron prefectadas a las 2 horas de iniciado el cultivo con un anticuerpo anti-c-Fos (fila inferior) o con un anticuerpo anti-IgG de ratón como control (fila superior) utilizando el kit BioPorter. Las células fueron fijadas después de 48 horas y marcadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti- β III-tubulina (verde, segunda columna) y con un anticuerpo anti-c-Fos (rojo, primera columna) en el caso de la condición control. En las células prefectadas con el anticuerpo anti-c-Fos, la tinción se realizó de manera directa con un anticuerpo secundario. Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

El fenómeno de diferenciación se puede cuantificar morfológicamente teniendo en cuenta la estructura de las neuronas. Los parámetros morfológicos que se midieron fueron tamaño de soma celular, número de neuritas por célula, longitud promedio de los procesos neuríticos y longitud del axón en el caso de que el mismo fuera distinguible. En este punto, cabe destacar que para que un proceso pueda ser considerado el axón

de una neurona, se aplicó una convención aceptada en la literatura, que implica que el mismo posea una longitud al menos 20 μm mayor a la del resto de las neuritas [96]. La cuantificación permite confirmar lo observado en las imágenes: el bloqueo de la actividad de c-Fos impide la correcta polarización y/o diferenciación neuronal, lo que se evidencia principalmente a partir de la ausencia de un axón claramente distinguible (Tabla 1). Además, no se ven modificados ni el diámetro promedio del soma ni el número promedio de neuritas por célula.

	Ab Control	Ab c-Fos	p
Diámetro soma celular (μm)	12.81 \pm 1.21 (n=40)	13.52 \pm 2.35 (n=37)	ns
Nº neuritas por célula	5.20 \pm 1.76 (n=40)	5.56 \pm 2.42 (n=37)	ns
Extensión promedio de neuritas (μm)	49.15 \pm 23.31 (n=40)	13.24 \pm 4.84 (n=37)	<0.001
Extensión proceso más largo (axón) (μm)	139.65 \pm 39.70 (n=40)	n.d.	

Tabla 1. Cuantificación de características morfológicas de neuronas de hipocampo al bloquear la actividad de c-Fos. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente, con análisis de t de *Student*. n.s: no significativo; n.d.: no distinguible.

También evaluamos que sucede si en lugar de bloquear su actividad, se bloquea la expresión de c-Fos. Para ello, utilizamos partículas lentivirales específicamente diseñadas para expresar shRNA específicos contra c-Fos, clonados en vectores pLKO.1-CMV-tGFP (Mission®, Sigma Aldrich) que permiten visualizar cuales células han sido infectadas observando la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*). Además de la ventaja del método de permitir bloquear la expresión de una única proteína por interferencia con su shRNA mensajero, el mismo permite obtener un alto grado de células infectadas: en los experimentos realizados se logró alcanzar valores de entre un 60 y un 70% de eficiencia de infección sobre el total de células. Para ello, primero se comprobó que efectivamente las partículas lentivirales fueran capaces de bloquear la expresión de c-Fos por Western Blot (Figura 17).

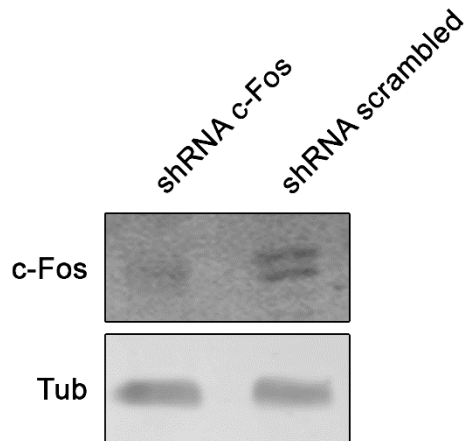


Figura 17. Disminución en la expresión de c-Fos en neuronas mediante shRNA. Neuronas de hipocampo de rata fueron infectadas al momento de la siembra con partículas lentivirales específicamente diseñadas para expresar shRNA contra c-Fos o con un shRNA control (scrambled). Luego de 72 horas en cultivo, las células fueron cosechadas y los homogenatos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida y Western Blot. Las membranas fueron inmunomarcadas con anticuerpos primarios anti-c-Fos (panel superior) y anti-Tubulina (panel inferior) como control de carga y posteriormente con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

La infección fue realizada al momento de la siembra de las células y, luego de 48 horas en cultivo, nuevamente se realizó una cuantificación de parámetros morfológicos y en base a los mismos se realizó una clasificación de las neuronas en diferentes estadios. El fenómeno que se observa es el mismo que el obtenido mediante la profecía de las células: las neuronas no progresan en el proceso de diferenciación aún 48 horas después de la infección (Figura 18 y cuantificación en Figura 19). La ausencia de expresión de c-Fos provoca un aumento en la proporción de células que permanecen en estadios tempranos de diferenciación (1 y 2) (Figura 19). En cambio, las neuronas sometidas a infección con partículas lentivirales del shRNA Scrambled (condición control, contiene la secuencia desordenada del shRNA de c-Fos) muestran el patrón de diferenciación neuronal esperado para los tiempos de cultivo analizados [96].

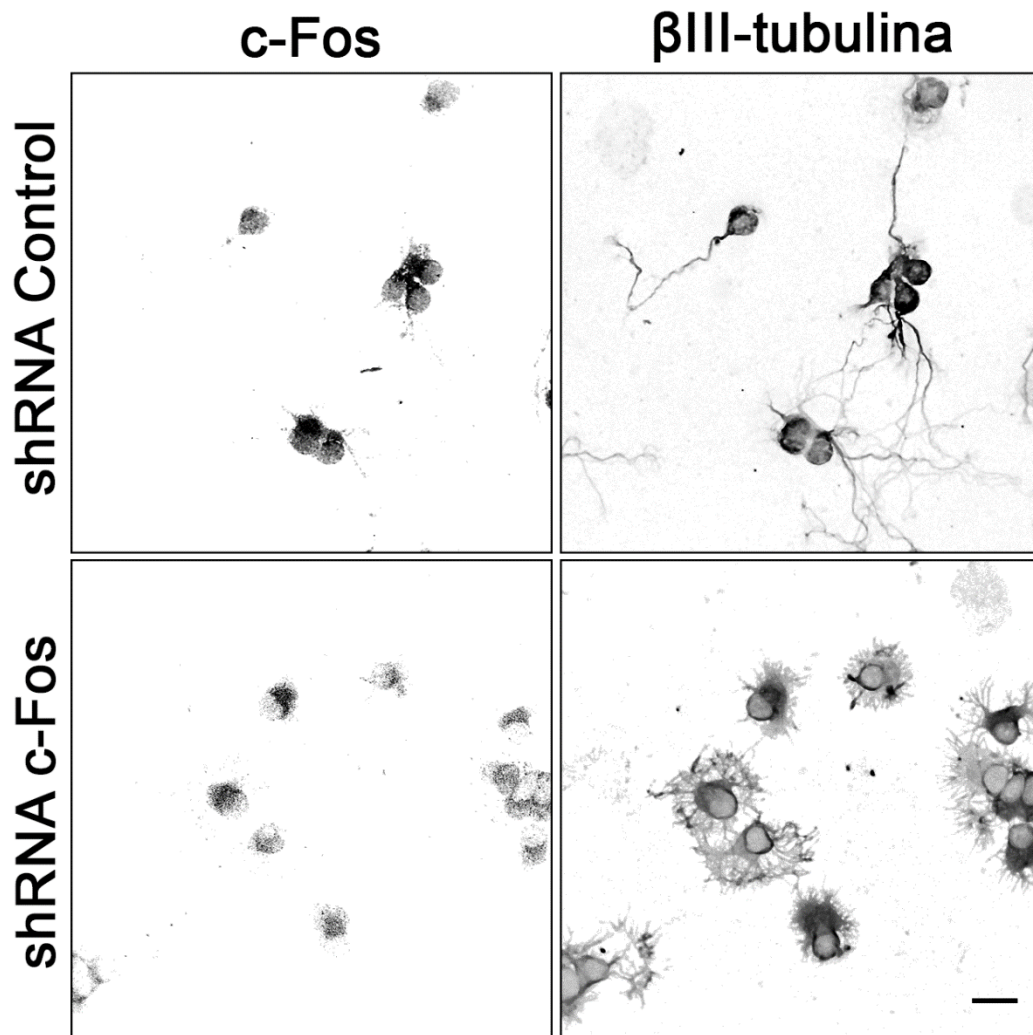


Figura 18. Bloquear la expresión de c-Fos impide la diferenciación neuronal. Neuronas de hipocampo de rata fueron infectadas al momento de la siembra con partículas lentivirales específicamente diseñadas para expresar shRNA contra c-Fos o con un shRNA control (scrambled). Después de 48 horas de cultivo, las células fueron fijadas y marcadas con un anticuerpo anti-c-Fos (primera columna) y un anticuerpo anti- β III-tubulina (segunda columna). Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas. Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que c-Fos es necesaria para completar normalmente los eventos de diferenciación, pero no permiten discernir si el efecto se debe a su función nuclear o su función citoplásmica, dado que hasta ahora los experimentos realizados podrían interferir en ambas funciones.

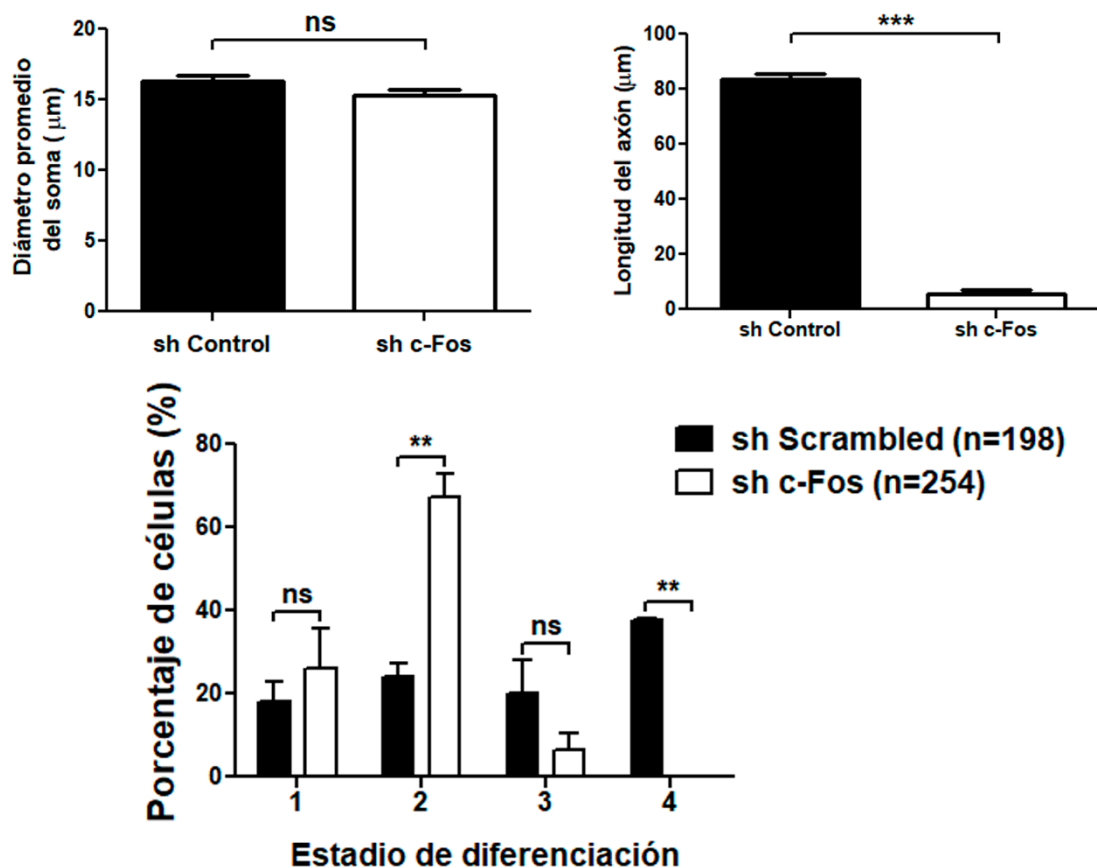


Figura 19. Cuantificación morfológica de las neuronas infectadas con un shRNA específico para c-Fos o un shRNA control. Las células fueron tratadas como se explica en la leyenda de la Figura 18. Nótese la ausencia de un axón distinguible en la mayoría de los casos de las células infectadas con el shRNA específico para bloquear la expresión de c-Fos. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente, con análisis de *t Student*. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: no significativo. N= número de células cuantificadas en el experimento.

Como se mencionó anteriormente, hemos demostrado que c-Fos activa diferentes enzimas de síntesis de fosfolípidos y glicolípidos en el RE y, para ejercer esta actividad, se asocia a las mismas a través de su dominio N-terminal (NA, aminoácidos 1-138) (Figura 11) [69, 70, 75]. Sin embargo, esta porción de la proteína no es suficiente para lograr la activación de las enzimas ya que no cuenta con la presencia del dominio básico (BD, aminoácidos 139-159) necesario para esta activación. Esto se observa claramente en células PC12 inducidas a diferenciarse que al ser transfectadas con c-Fos o con mutantes de delección capaces de activar la síntesis de fosfolípidos (dominio NB,

aminoácidos 1-159) muestran extensión y crecimiento de neuritas aún en ausencia de NGF. De estos resultados surge la posibilidad de utilizar mutantes que no contienen el BD como dominantes negativas de c-Fos para interferir en su función como activador de la síntesis de lípidos y mantenerla (junto con la biogénesis de membrana) en niveles basales. La principal ventaja de esta estrategia reside en el hecho de que, como el dominio N-terminal no está involucrado en ninguna de las funciones nucleares de c-Fos (Figura 5), es razonable proponer el uso del dominio NA como dominante negativo exclusivamente de la función citoplásmica de c-Fos: se asocia a las enzimas, desplazando a c-Fos endógena, pero no las activa y no interfiere en su actividad genómica como factor de transcripción AP-1 [50]. Esta estrategia está siendo utilizada *in vivo* en nuestro laboratorio en modelos tumorales murinos de sistema nervioso central y de mama, obteniéndose resultados prometedores que muestran una reducción en el crecimiento de los tumores al ser tratados con los péptidos recombinantes del dominio NA (Racca A.C., et al., *manuscrito en revisión*; Prucca C.G., et al., *manuscrito en redacción*).

Tomando estos resultados en consideración, evaluamos si la inhibición en la diferenciación neuronal es causada por la ausencia de actividad citoplásmica de c-Fos o por la falta de su actividad como factor de transcripción AP-1. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se utilizó el dominio NA como dominante negativa. Para ello, neuronas de hipocampo de rata fueron transfectadas al momento de la siembra con un plásmido que codifica para el dominio NA fusionado a la proteína fluorescente amarilla (YFP, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*) o con el vector vacío como control y se analizó el grado de diferenciación de las células 48 horas después. Como se observa en la Figura 20 y a través del análisis morfológico de las células transfectadas, la expresión del dominio NA provoca una inhibición en la diferenciación neuronal si se las compara con células transfectadas con el vector control o inclusive con las células sin transfectar del mismo campo. Estos resultados indican que los efectos observados en la diferenciación son consecuencia de la ausencia de actividad de c-Fos citoplásmico y no de su función nuclear como factor de transcripción AP-1.

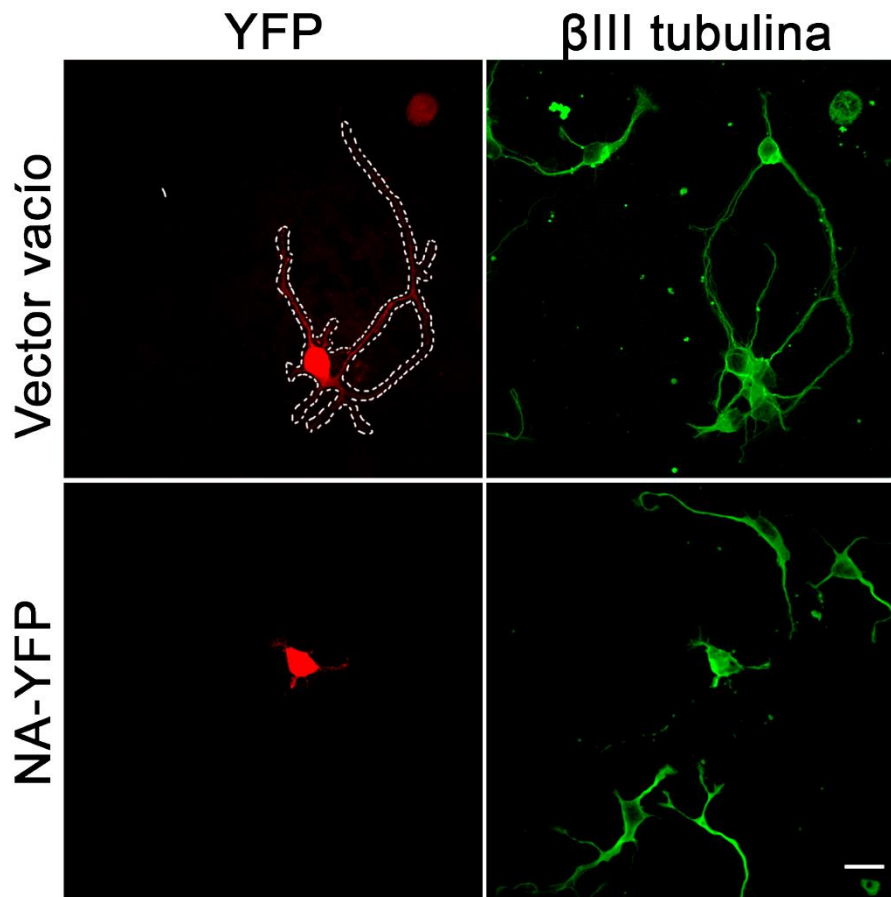
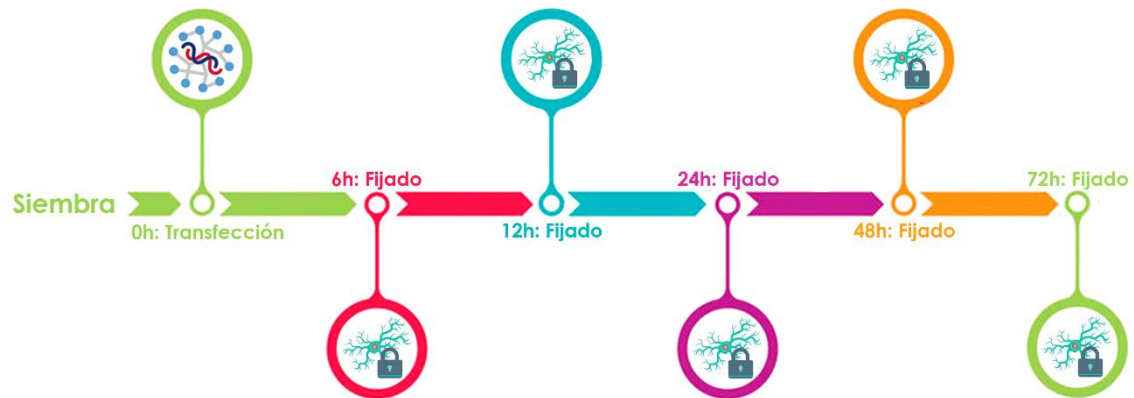


Figura 20. La expresión del dominio NA impide la correcta diferenciación neuronal.

Cultivos de neuronas de hipocampo de rata fueron transfectados al momento de la siembra con el vector NA-YFP (pseudocoloreado en rojo, fila inferior) y el vector vacío como control (pseudocoloreado en rojo, fila superior) y fueron fijadas a las 48 horas de cultivo. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti- β III-tubulina (verde, segunda columna). Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Para confirmar estos resultados, realizamos el mismo experimento pero fijando las células a diferentes tiempos de cultivo y utilizando como control un vector diseñado para expresar el dominio NB fusionado a YFP, tal como se esquematiza a continuación:



Al cuantificar los parámetros morfológicos antes mencionados (Figura 19) y determinar el estadio de diferenciación en el que se encontraban las neuronas fijadas a cada tiempo, se observó claramente la detención en estadios 1 y 2 de diferenciación de las neuronas transfectadas con el vector que expresa el dominio NA, aún luego de 72 horas en cultivo (Figura 21 y su cuantificación en Figura 22). Esto no sucedió con aquellas células que fueron transfectadas con el vector diseñado para expresar el dominio NB fusionado a YFP que, al igual que c-Fos, activa la síntesis de lípidos.

Estos resultados apoyan fuertemente nuestra hipótesis: c-Fos citoplásmico es necesario para que una neurona en cultivo diferencie de manera acorde a los patrones antes mencionados. Sin embargo, si bien con el método de cultivo de neuronas *in vitro* logramos una mayor aproximación a lo que sucede a nivel fisiológico que con células PC12, este método no puede recrear fehacientemente la dinámica y la función neuronal tal cual ocurre en un ambiente natural sin alteraciones.

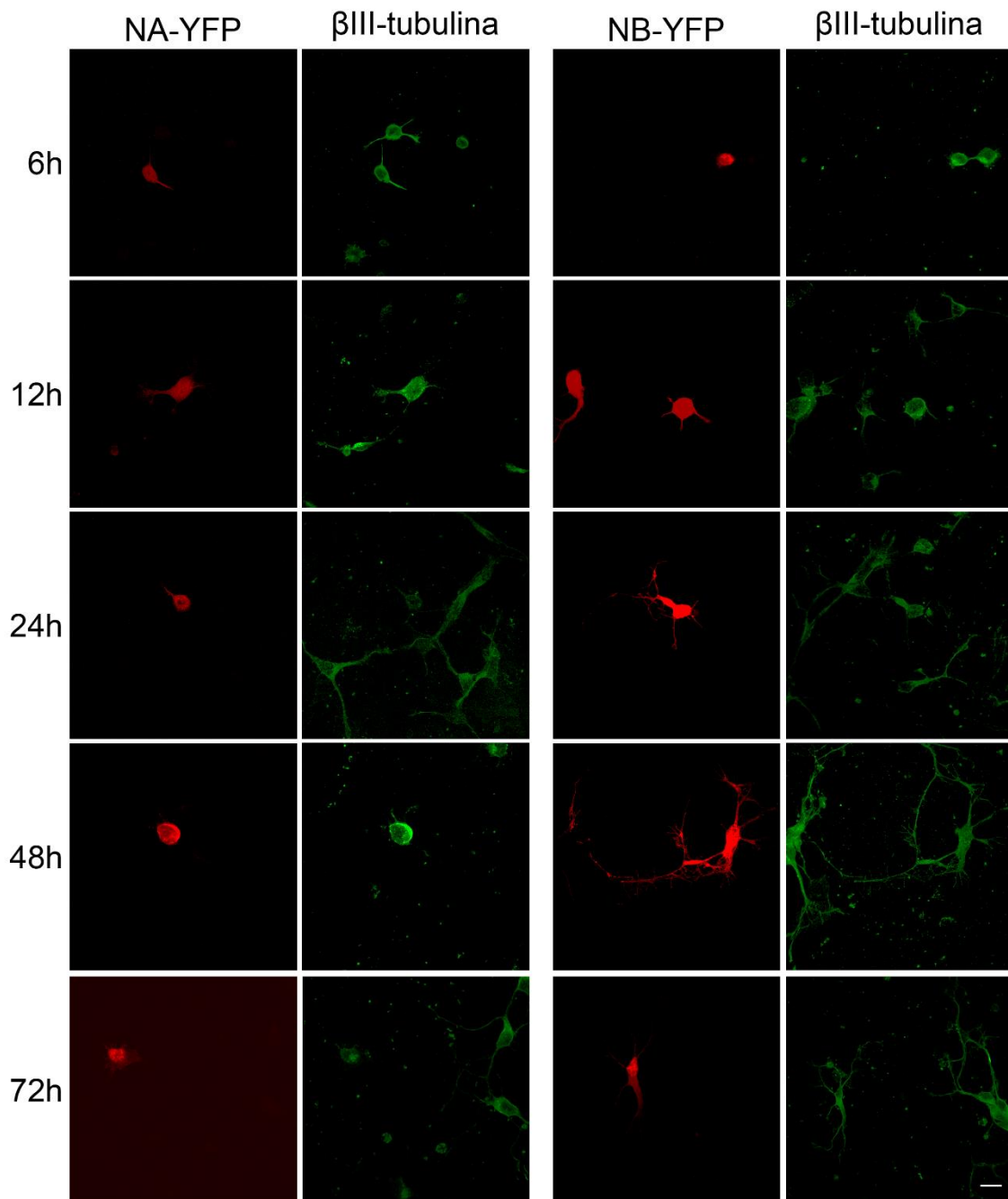


Figura 21. La expresión del dominio NA impide la correcta diferenciación neuronal.

Cultivos de neuronas de hipocampo de rata fueron transfectados al momento de la siembra con el vector NA-YFP (pseudocoloreado en rojo, panel izquierdo) y el vector NB-YFP como control (pseudocoloreado en rojo, panel derecho) y fueron fijadas a los tiempos de cultivo indicados. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti- β III-tubulina para evidenciar el perfil de la neurona (verde, segunda columna en ambos casos). Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

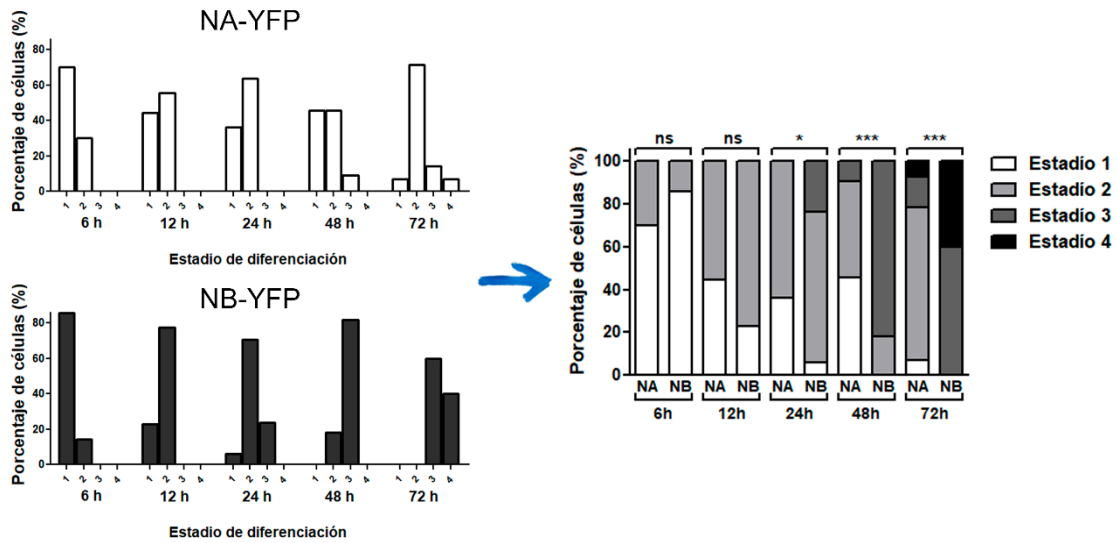


Figura 22. Cuantificación de estadios de diferenciación en base a parámetros morfológicos de neuronas transfectadas para expresar el dominio NA o el dominio NB de c-Fos. Nótese que la expresión de NA impide la correcta diferenciación neuronal. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente. Análisis estadístico de normalidad mediante test de Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns: no significativo. En este caso, se evaluó cuanto se desvía la distribución de los estadios de las células transfectadas con el dominio NA respecto de la de las células transfectadas con el dominio NB.

Para conocer con mayor profundidad cuales son las consecuencias de bloquear la expresión de c-Fos e impedir el desarrollo neuronal, realizamos experimentos de electroporación *in utero* en colaboración con la Lic. Florentyna Bustos Plonka, del laboratorio del Dr. Santiago Quiroga, que permiten visualizar patrones de migración de precursores corticales y de desarrollo de la corteza.

La corteza cerebral de los vertebrados es responsable de las funciones cognitivas superiores. A lo largo de la evolución, la corteza cerebral humana ha sufrido una expansión considerable comparada con otras especies, pero las etapas iniciales del desarrollo cerebral muestran semejanzas entre ellas [100]. La corteza cerebral se encuentra subdividida en capas que tienen diferentes características morfológicas e identidades funcionales y la misma se forma mediante procesos coordinados de neurogénesis y migración [101, 102]. La neurogénesis ocurre a través de una

combinación de diferentes modos de división celular: la división simétrica de células progenitoras que expanden el *pool* de precursores neuronales, la división asimétrica de esos progenitores para dar lugar a neuronas individuales y la división simétrica “terminal” en la que un progenitor se divide para generar dos neuronas y depletar así el *pool* de células proliferativas [102]. Esto sucede en la zona ventricular (VZ), una región neuroepitelial pseudo-estratificada que limita con los ventrículos laterales. Luego, las neuronas migran radialmente hacia la zona marginal a través de las zonas sub-ventricular (SVZ) e intermedia (IZ) (Figura 23). En la SVZ, las neuronas se transforman en multipolares, extendiendo y retrayendo múltiples proyecciones al azar [103]. Luego desarrollan el axón, de manera concomitante a la retracción del resto de los procesos, y orientan los centrosomas y el Aparato de Golgi hacia la superficie, transformándose en bipolares y migrando a lo largo de las fibras gliales hacia la zona superior de la IZ. Finalmente, las neuronas alcanzan su posición final en la placa cortical (CP) y establecen los contactos con sus blancos específicos. El desarrollo normal de estos pasos

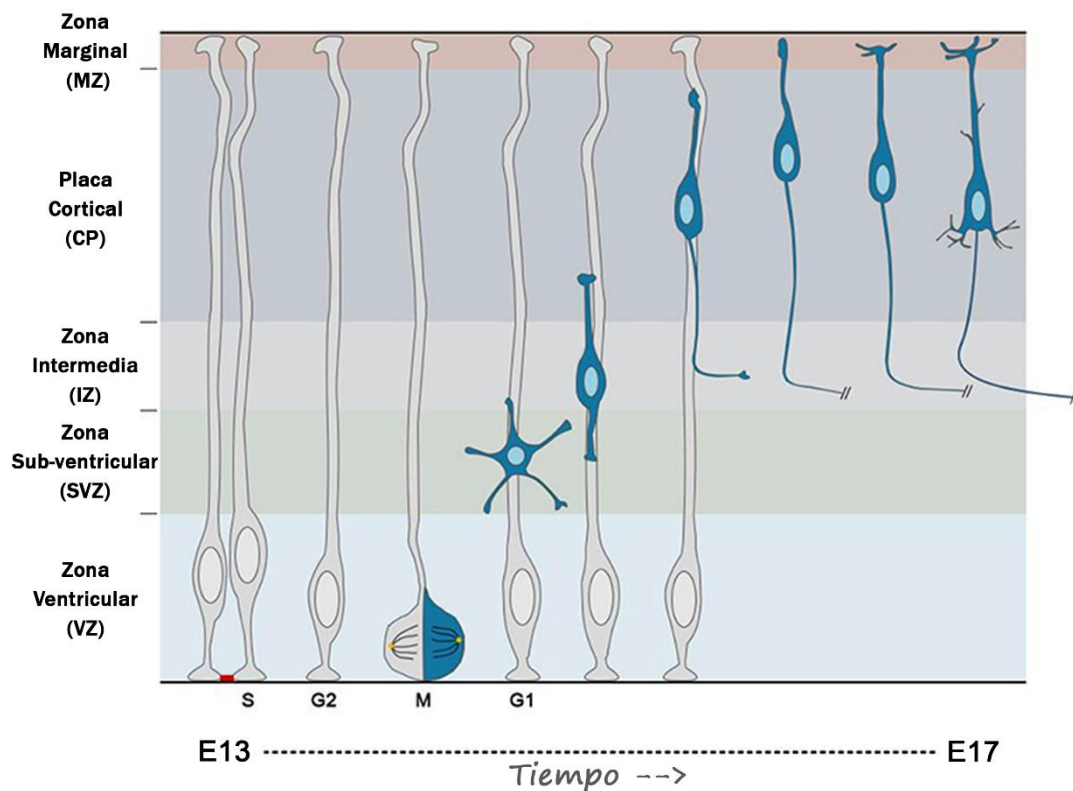


Figura 23. Esquema de la migración cortical neuronal radial. Las neuronas (azul) se generan en la zona ventricular (VZ) y migran sobre células gliales radiales (gris) hacia la zona sub-ventricular (SVZ), la zona intermedia (IZ) y la placa cortical (CP).

dependerá, entonces, de la capacidad de cada célula de establecer polaridad, migrar hacia su destino final y allí diferenciar y establecer conexiones para transmitir y recibir información [100, 104]. En ratones en desarrollo embrionario, el proceso ocurre entre los días de gestación E11 a E18, ocupando la fase proliferativa los días E11 a E13 y la fase migratoria el período entre E14 y E18 [101].

La electroporación *in utero* es una técnica cada vez más utilizada para estudiar aspectos del desarrollo cerebral. La misma consiste en electroporar ADN en una subpoblación de células progenitoras en la VZ del cerebro embrionario, que luego sufrirán los procesos de neurogénesis, migración y diferenciación final para transformarse en las neuronas maduras que conforman cada capa de la corteza. Luego de inyectar el ADN, el pulso eléctrico provoca una breve apertura de los canales de la membrana plasmática, permitiendo la entrada a la célula de pequeñas moléculas. Como el ADN posee carga negativa, el constructo inyectado se moverá en dirección al ánodo del campo eléctrico generado, lo que permite que sea selectivamente introducido en una región específica (Figura 24). La simplicidad del método lo transforma en una técnica conveniente de transferencia génica: puede evaluarse la función de un gen a través de la alteración de la misma por expresión ectópica, bloqueo de su expresión, interferencia mediante

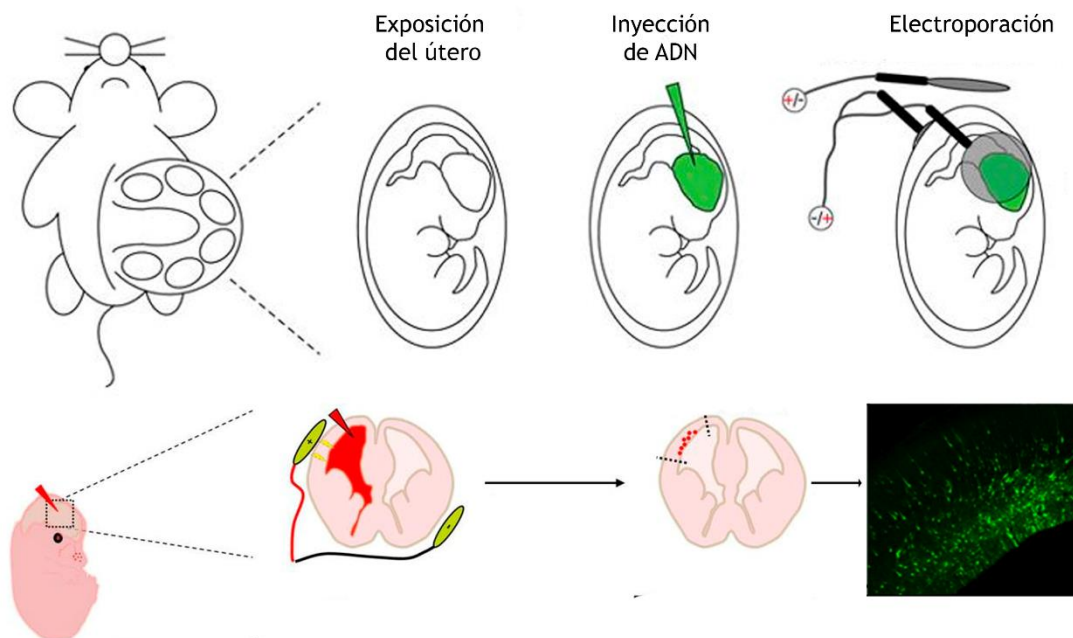


Figura 24. Esquema de la técnica de electroporación *in utero* adaptado de dal Maschio et al., 2012, y DeBoer et al., 2014 [108, 109].

dominantes negativas o mapeo del destino final con genes marcadores, sin remover los embriones del útero y con una eficiencia de hasta un 80%. El sistema es entonces muy útil para el estudio de genes involucrados en diferentes aspectos del desarrollo cerebral, complementando estrategias como la generación de ratones *knock out* transgénicos [105-109].

Decidimos entonces estudiar si c-Fos está cumpliendo algún rol en el desarrollo normal de la corteza. Para ello, embriones de ratones C57BL/6J de 15 días de gestación (E15) fueron electroporados en sus ventrículos con el shRNA específico para bloquear la expresión de c-Fos o el shRNA scrambled como control para manipular y visualizar la localización final después de la diferenciación *in vivo* de los progenitores corticales destinados a poblar las capas superiores (III y IV) de la corteza. En ambos casos se realizó una co-electroporación con el constructo pCAG-DsRed, para su posterior visualización al

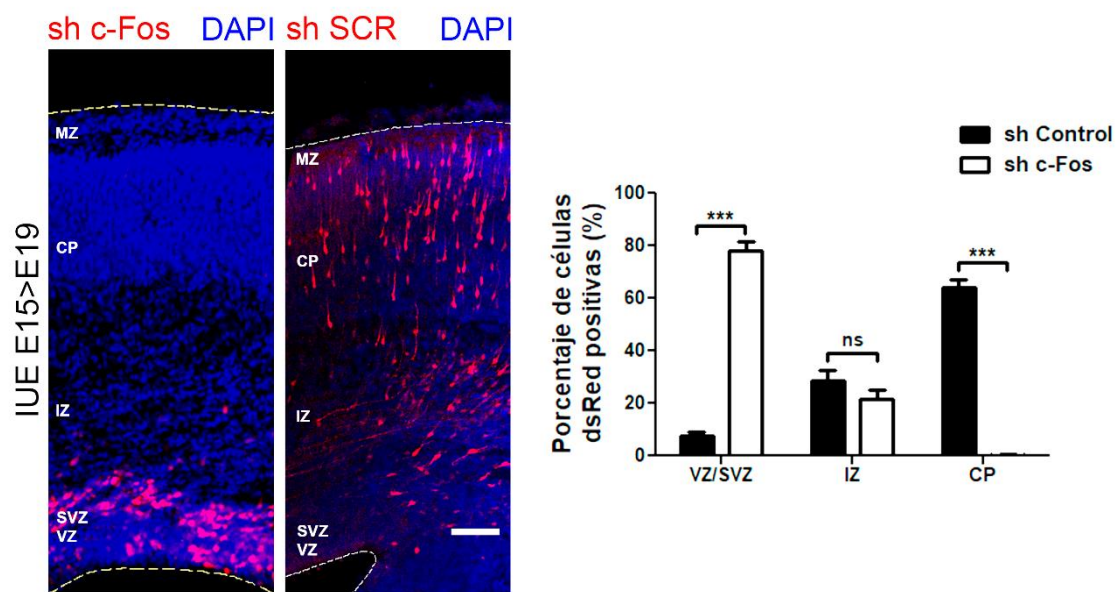


Figura 25. La expresión de c-Fos ejerce un rol a nivel de desarrollo cortical. Izquierda: Cerebros embrionarios fueron electroporados con un shRNA específico para c-Fos o con su shRNA Scrambled como control al día E15 y analizados al día E19. Nótese que solo unas pocas células dsRed positivas logran migrar fuera de las zonas ventricular (VZ) y sub-ventricular (SVZ) cuando se bloquea la expresión de c-Fos. Barra de referencia: 100 μ m. **Derecha:** Cuantificación de la distribución de las células dsRed positivas en cada zona, tal como se indica en las imágenes. Se muestra el promedio \pm DE de 3 experimentos realizados de manera independiente que mostraron los mismos resultados, con análisis ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. *** $p < 0.001$; ns = no significativo.

microscopio y evaluación de las células que incorporaron los plásmidos. Además, los mismos se diluyeron en una solución de Azul de Tripán para evidenciar más fácilmente la inyección y distinguir los embriones que fueron electroporados de aquellos que no lo fueron. A los 19 días de gestación (E19), la madre fue sacrificada, los embriones extraídos y sus cerebros fijados para su posterior procesamiento para inmunofluorescencia para visualizar las células electroporadas y los núcleos por tinción con DAPI.

Se observó que las células cuya expresión de c-Fos ha sido bloqueada no logran poblar las capas superiores de la corteza y se acumulan en las zonas VZ y SVZ, efecto que no se observa en los animales que fueron electroporados con el shRNA scrambled (Figura 25). Estos resultados nos permiten confirmar que c-Fos cumple un rol fundamental *in vivo* en el correcto desarrollo cortical y están en línea con aquellos observados en ratones *fos* ^{-/-}, en los que se observó una disminución en el espesor de la corteza cerebral [83]. Sin embargo, no nos permiten aseverar que dicho papel sea dependiente de su rol como activador de la síntesis de lípidos.

OBJETIVO ESPECÍFICO II: *Estudiar el sitio sub-celular y los mecanismos moleculares mediante los cuales c-Fos participa en la regulación de los niveles de síntesis de lípidos en neuronas en diferenciación*

Localización sub-celular de c-Fos en neuronas de hipocampo

Numerosas evidencias moleculares han confirmado la hipótesis de que el RE es funcional en axones e inclusive han demostrado que hay síntesis activa de proteínas en conos de crecimiento y axones de neuronas simpáticas [27, 110-112].

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado una fuerte asociación de c-Fos con el RE en gradientes continuos de sucrosa y co-localización de c-Fos con marcadores de RE, un fenómeno que es regulado por el estado de fosforilación de los

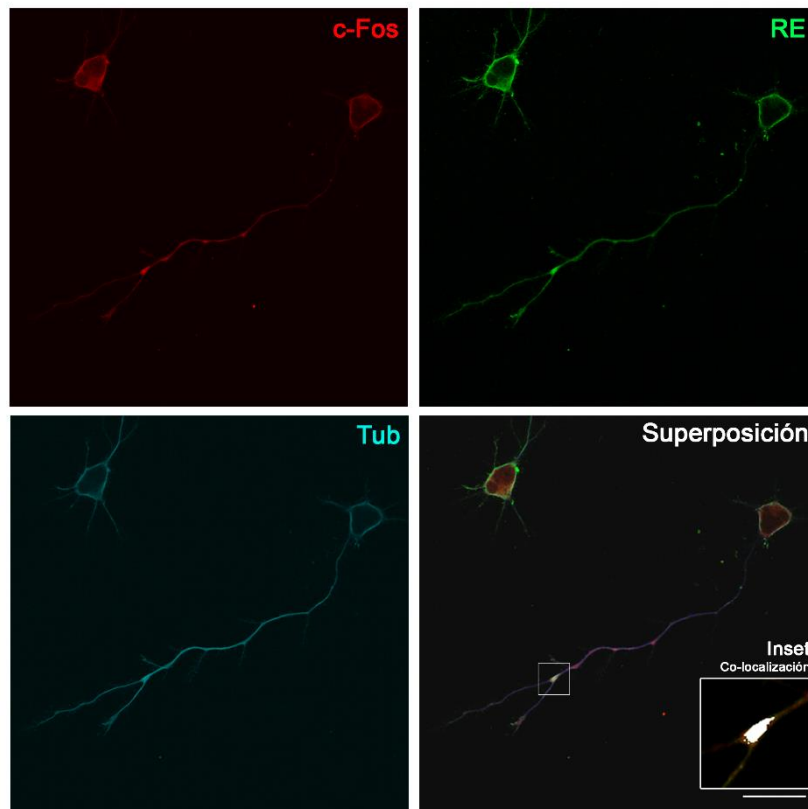


Figura 26. c-Fos co-localiza con marcadores del RE. Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de rata marcadas con anticuerpos anti-c-Fos (rojo), anti-Calnexina, marcador del RE (verde), y anti- β III-Tubulina (cian). El cuarto panel muestra la superposición de todas las anteriores. Se muestra un inset con análisis de co-localización entre c-Fos y el RE en el que los pixels que co-localizan se observan coloreados en blanco (Colocalization Finder, ImageJ). Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

residuos Tirosina 10 y 30 de c-Fos [68, 73, 74]. Estos antecedentes nos llevaron a examinar si esta co-localización observada en otros tipos celulares también ocurre en neuronas. Para ello, junto con el Dr. Gabriel Ferrero, realizamos ensayos de inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo de rata de 48 horas de cultivo utilizando anticuerpos específicos para c-Fos, para marcadores del RE (Calnexina) y para Tubulina para evidenciar la estructura neuronal. Tal como lo planteamos, se observó una fuerte co-localización de ambas marcas y, sorprendentemente, c-Fos y el RE parecen co-localizar en estructuras puntuales confinadas a sitios de ramificación axonal (Figura 26). Al cuantificar este fenómeno, encontramos que el **70.86% ± 19.15%** (n=123) de los acúmulos c-Fos/RE de axones se encuentran en un sitio de ramificación y que el **78.32% ± 13.30%** (n=113) de los sitios totales de ramificación poseen uno de dichos acúmulos en su origen.

Esto podría indicar que c-Fos, tal como se ha descrito en otros modelos celulares, estaría interaccionando con membranas del RE donde podría contribuir a un mecanismo de síntesis localizada mediante su función como activador de síntesis de lípidos.

Además, se evaluó la posible co-localización con marcadores del Aparato de Golgi, que también ha sido descrito como relevante para el mantenimiento de la polaridad neuronal y de la plasticidad sináptica a través de la formación de estructuras



Figura 27. c-Fos no co-localiza con marcadores del Aparato de Golgi. Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de rata marcadas con anticuerpos anti-c-Fos (rojo) y anti-GM130, marcador del Aparato de Golgi (verde). El tercer panel muestra la superposición de las anteriores. Barra de referencia: 20 μ m. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

satélite de tipo tubular designadas como *Golgi outposts* [113-115]. Estos *outposts* han sido implicados en la morfogénesis de dendritas y como enclaves para la inserción de receptores de membrana post-sinápticos. Se realizó inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo de rata a las 48 horas de cultivo con anticuerpos específicos para marcar Aparato de Golgi (GM130) y no se observó co-localización con c-Fos (Figura 27), por lo cual inferimos que c-Fos no estaría ejerciendo su función como activador de la síntesis de lípidos en esta organela.

Interacción de c-Fos con CCT β 2, la enzima limitante de la síntesis de PC en cerebro

Como se mencionó anteriormente, junto con la comprensión de las complejas características estructurales del RE axonal, diversos estudios han proporcionado evidencias de la existencia de una síntesis activa y localizada de lípidos en dicho compartimento [37, 38]. Resultados de nuestro laboratorio han aportado evidencias de que enzimas específicas de la síntesis de lípidos, tales como CDS, PI4KII α y Lipin1, interaccionan físicamente con c-Fos y son activadas por dicha proteína [75, 77]. Es por ello que decidimos estudiar la posibilidad de que c-Fos esté interaccionando con enzimas de la síntesis de lípidos en nuestro modelo de neuronas de hipocampo de rata.

PC es el fosfolípido más abundante en células eucariotas y juega un rol estructural y funcional en las bicapas de membranas [116]. Principalmente es sintetizada por la **vía de Kennedy**, en la que la enzima CTP-fosfocolina citidiltransferasa (CCT) cataliza el paso limitante de la misma, que involucra la conversión de fosfocolina y CTP a CDP-colina (Figura 28) [117].

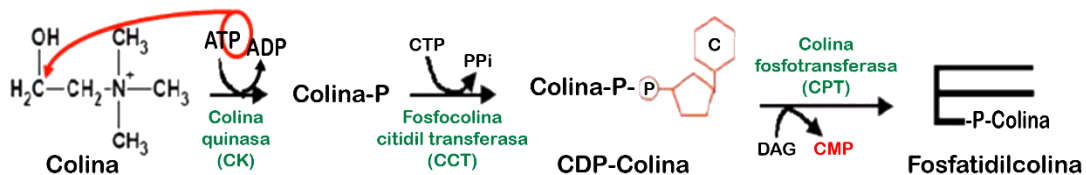


Figura 28. Esquema de la vía de Kennedy de síntesis de fosfatidilcolina.

CCT responde a la variación en el contenido relativo de PC respecto a otros fosfolípidos en membranas asociándose de manera reversible a las mismas y activándose, generando así un mecanismo de regulación de su actividad y del mantenimiento de la homeostasis de PC [118]. Existen dos genes que codifican las diferentes isoformas de CCT descritas hasta ahora: *Pcyt1a* codifica para la isoforma α y *Pcyt1b* codifica para los diferentes transcritos de la isoforma β , siendo CCT β 2 la isoforma expresada predominantemente en cerebro (Figura 29) [119-122]. Mientras que CCT α contiene en su estructura una secuencia señal de localización nuclear que la lleva a esa ubicación, CCT β 2 se expresa en el citoplasma.

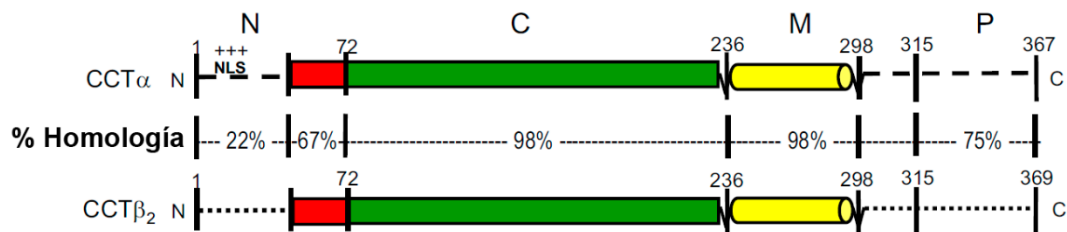


Figura 29. Esquema de los dominios y las diferencias entre las isoformas α y β de la enzima CTP-fosfocolina citidiltransferasa (CCT), adaptado de Dennis et al., 2011 [122]. Nótese la elevada homología en el dominio catalítico (C), el dominio de unión a membrana (M) y el dominio de fosforilación del extremo C-terminal (P), y la ausencia de la secuencia señal de localización nuclear (NLS) en el extremo N-terminal (N) de la isoforma β .

Se ha demostrado que tanto el ARNm de *Pcyt1b* como la proteína CCT β 2 se encuentran abundantemente en la región distal de axones de neuronas simpáticas de rata, donde la enzima ha sido involucrada en el *sprouting* o nacimiento de neuritas y en la ramificación axonal, proveyendo PC para la biogénesis de membrana localizada [123, 124]. Es por ello que nos propusimos entonces estudiar si c-Fos podría estar involucrada en la diferenciación neuronal a través de un mecanismo de activación de lípidos mediante su interacción con CCT β 2.

Para ello, evaluamos primero la expresión de CCT β 2 a lo largo del tiempo en neuronas en cultivo por inmunofluorescencia, observando que la expresión de dicha proteína muestra un patrón de expresión relativamente constante a lo largo del tiempo (Figura 30).

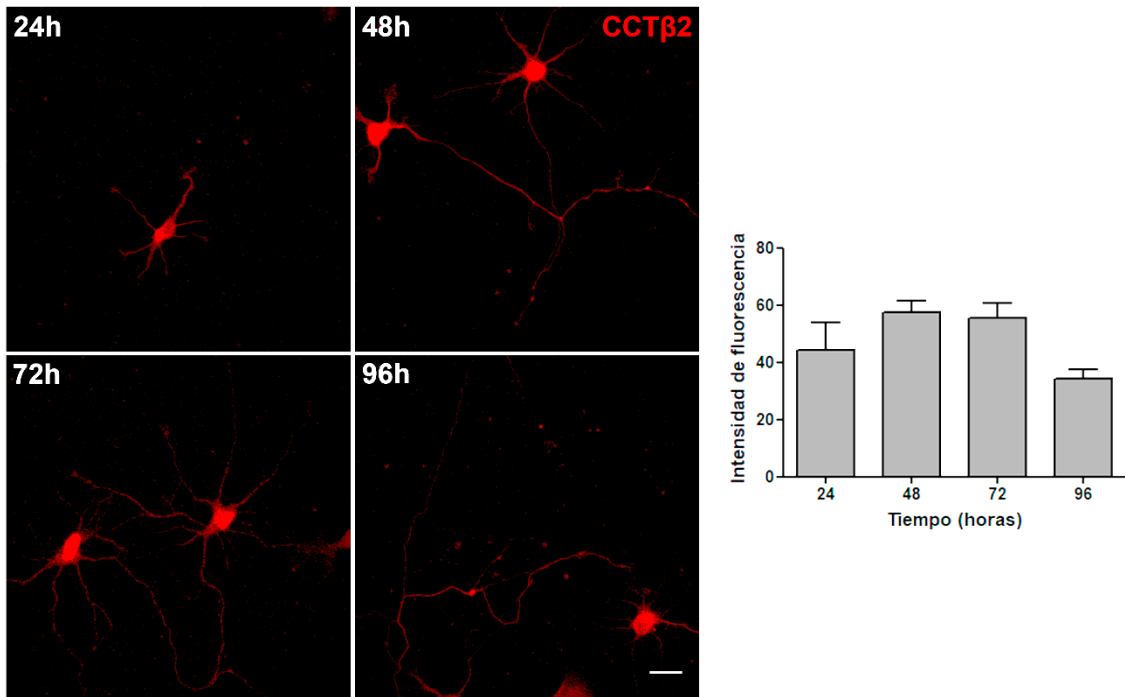


Figura 30. Expresión de CCT β 2 en el tiempo. Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de rata marcadas con un anticuerpo anti-CCT β 2 (rojo) a 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Barra de referencia: 20 μ m. Se muestra una cuantificación de la intensidad de fluorescencia, con análisis estadístico de Anova de una vía con post-test de Tukey. No se encontraron diferencias significativas en las intensidades de los tiempos analizados. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Una vez establecido que CCT β 2 se expresa en neuronas en cultivo, evaluamos si c-Fos interacciona con dicha proteína. Primero, c-Fos fue inmunoprecipitada de homogenatos totales de neuronas utilizando un anticuerpo específico y las muestras obtenidas fueron sometidas a SDS Page y Western Blot, revelando las membranas con anticuerpos específicos para CCT β 2 (Figura 31). Además, se observó la inmunotinción para CCT β 2 en neuronas fijadas a 48 horas en cultivo. Como se puede observar en dicha figura, c-Fos co-inmunoprecipita y co-localiza con CCT β 2, lo que estaría indicando una interacción entre ambas proteínas.

Para confirmar que c-Fos interacciona con CCT β 2 en neuronas, realizamos experimentos de FRET entre dichas proteínas para evaluar, a través del porcentaje de eficiencia de FRET, si se puede evidenciar la interacción entre ambas.

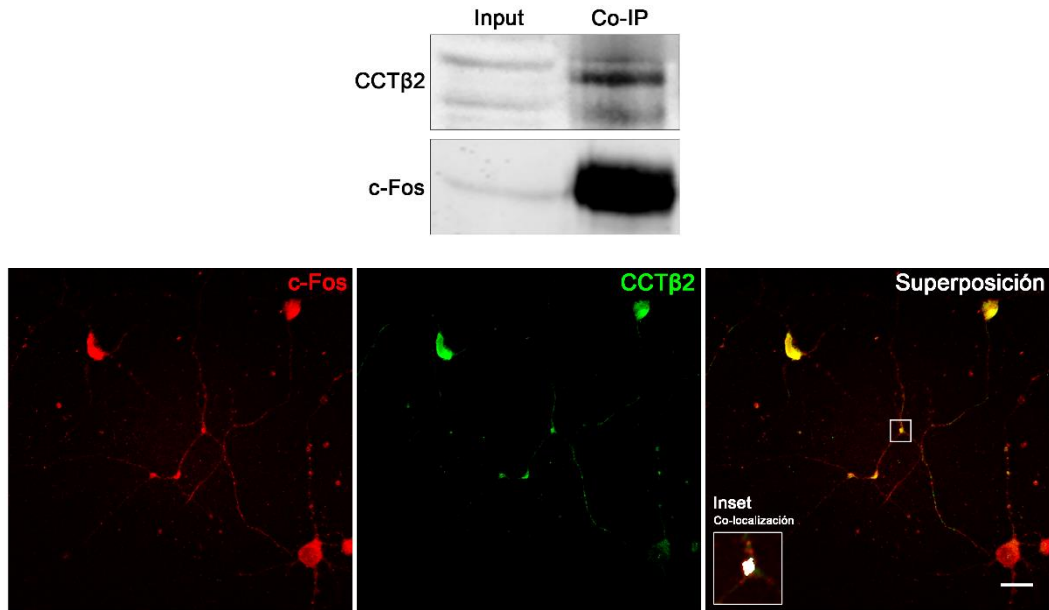


Figura 31. c-Fos co-immunoprecipita y co-localiza con la enzima CCTβ2. *Arriba:* c-Fos fue inmunoprecipitada de homogenatos totales de neuronas de hipocampo utilizando un anticuerpo específico. Las muestras fueron sometidas a SDS Page y Western Blot y las membranas fueron reveladas con un anticuerpo anti-CCTβ2 y posteriormente con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas. Una fracción del 10% de las muestras fue extraída antes de la inmunoprecipitación y usada como control de la presencia de la proteína (input). El panel inferior muestra el revelado con anticuerpos anti-c-Fos. *Abajo:* Neuronas de hipocampo de rata de 48 horas en cultivo fueron sometidas a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-c-Fos (rojo) y anti-CCTβ2 (verde). El tercer panel muestra la superposición entre ambas imágenes. Se muestra un inset con análisis de co-localización en el que los pixels que co-localizan se observan coloreados en blanco (Colocalization Finder, ImageJ). Barra de referencia: 20 μm. Se muestran los resultados de 1 experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Neuronas de hipocampo de rata fueron entonces transfectadas a las 24 horas de cultivo con los plásmidos CCTβ2-YFP y c-Fos-CFP (proteína fluorescente cian, del inglés *Cyan Fluorescent Protein*) o con los plásmidos codificantes para los fluoróforos solos como controles, y se evaluó la eficiencia de transferencia de energía entre ambas proteínas utilizando el método de emisión sensibilizada (ver sección *Materiales y Métodos*). Como control positivo para la normalización de la técnica se utilizó un

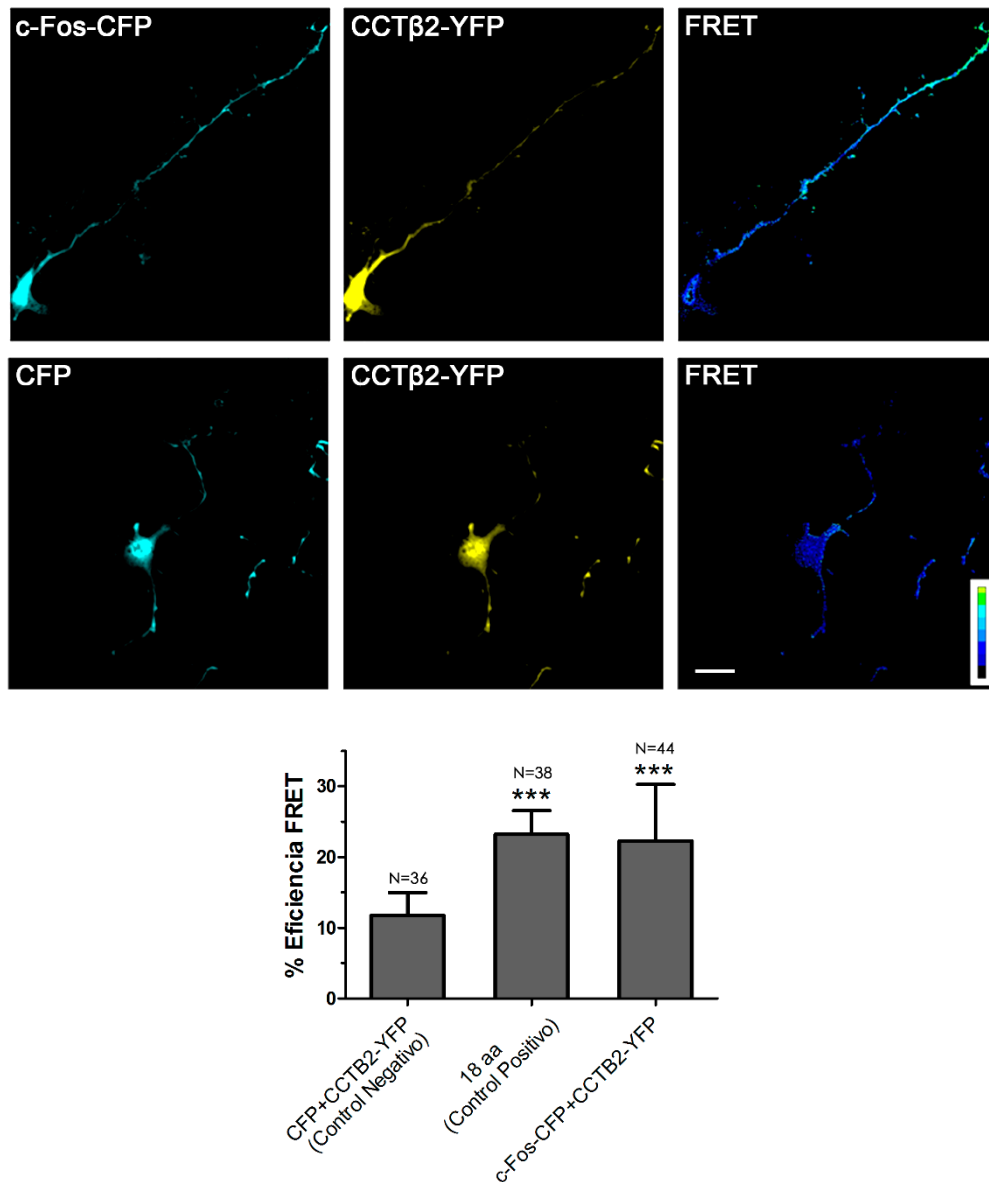


Figura 32. c-Fos muestra valores positivos de FRET con la enzima CCTβ2. *Arriba:* Neuronas de hipocampo de rata fueron co-transfectadas para expresar las proteínas quimeras c-Fos-CFP (primer panel) y CCTβ2-YFP (segundo panel) a las 24 horas de cultivo y examinadas por microscopía confocal a las 48 horas. Las imágenes de FRET fueron obtenidas utilizando el método de emisión sensibilizada y pseudo-coloreadas utilizando el software ImageJ. La fila inferior muestra un control negativo de células co-transfectadas con el vector CFP vacío y CCTβ2-YFP. La escala inicia en valores de ausencia de FRET (negro) a valores máximos de FRET (amarillo). Barra de referencia: 20 μm. *Abajo:* Cuantificación de los promedios de eficiencias de FRET ± DE para los pares donador/aceptor mostrados en las imágenes. Se muestran los resultados de 1 de 3 experimentos realizados de manera independiente, con análisis de Anova de 1 vía, con post-análisis de Tukey's. ***p<0.001 (diferencias respecto del control negativo).

plásmido que codifica para ambas proteínas fluorescentes, CFP e YFP, separadas por una secuencia flexible de 18 aminoácidos entre ellas. Dicha secuencia genera una distancia menor a 10 nm entre los fluoróforos, permitiendo que haya fenómeno de transferencia de energía entre ellas, lo que resulta en valores positivos de eficiencia de FRET. Como se observa en la Figura 32, en la cual la escala de colores oscila entre el color negro para la ausencia de FRET y el amarillo para una eficiencia de FRET del 100%, existe un fenómeno de FRET entre c-Fos y CCT β 2, lo que indica que existe interacción entre ambas proteínas. Además, al cuantificar el fenómeno (Figura 32, panel inferior), la eficiencia de FRET entre CCT β 2-YFP y c-Fos-CFP muestra diferencias significativas con el control negativo, confirmando el resultado.

Inclusive, esta interacción se observa aún si los ensayos de FRET se realizan en neuronas de estadíos de diferenciación más maduros luego de 1 semana en cultivo (Figura 33). En este caso, además, las células fueron co-transfectadas con el par de construcciones PIS-YFP y c-Fos-CDS. La enzima PIS se utilizó como control porque, como se mencionó anteriormente, no es activada por c-Fos. Se observa que los valores de eficiencia de FRET entre ambas proteínas son semejantes a los del control negativo.

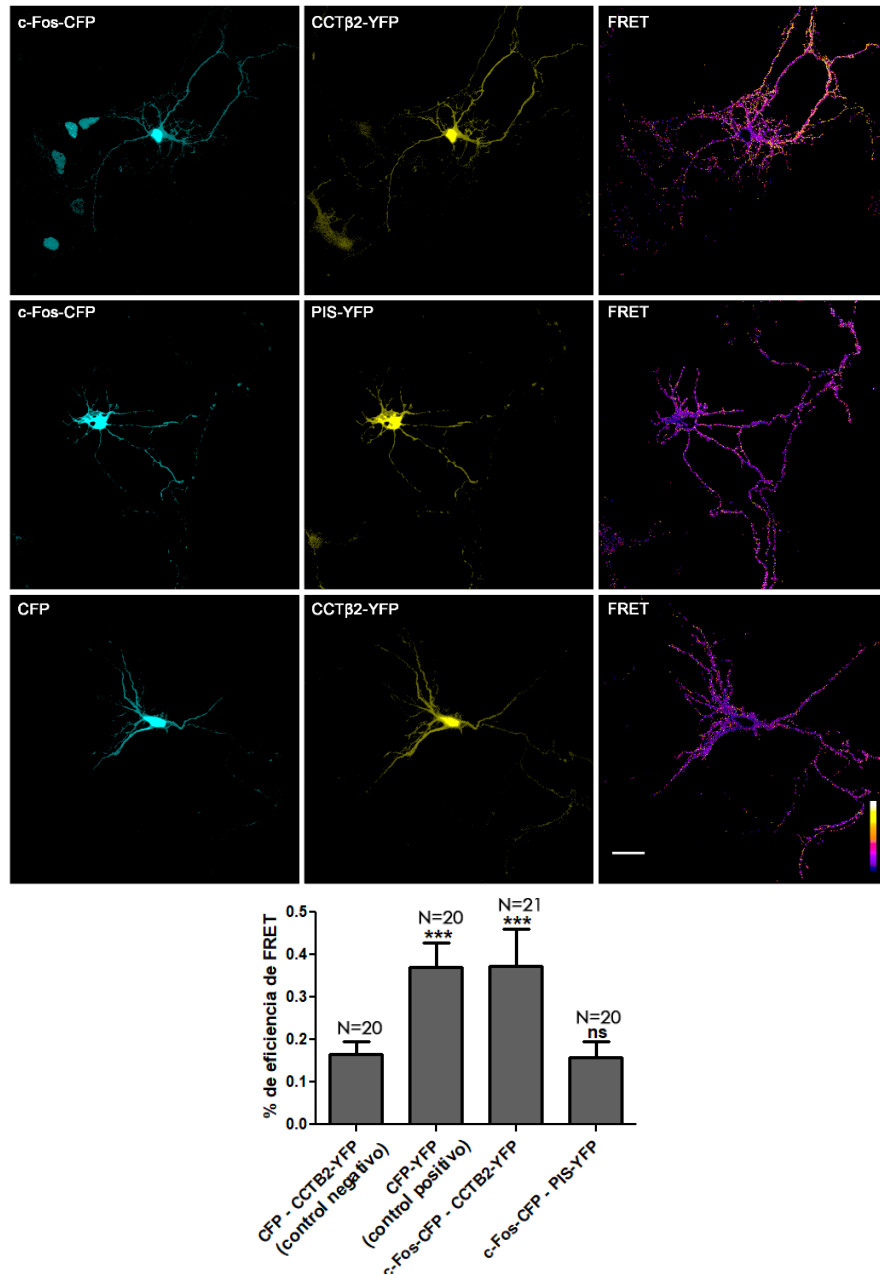


Figura 33. c-Fos muestra valores positivos de FRET con la enzima CCTβ2 en neuronas de estadios de diferenciación avanzados. *Arriba:* Neuronas de hipocampo de rata fueron co-transfectadas para expresar las proteínas quimeras c-Fos-CFP y CCTβ2-YFP o c-Fos-CFP y PIS-YFP a los 6 días de cultivo y examinadas por microscopía confocal 24 horas después. Las imágenes de FRET fueron obtenidas utilizando el método de emisión sensibilizada y pseudo-coloreadas utilizando el software ImageJ. La escala inicia en valores de ausencia de FRET (negro) a valores máximos de FRET (amarillo/blanco). Barra de referencia: 20 μm. *Abajo:* Se muestra la cuantificación de los promedios de eficiencias de FRET ± DE para los pares donador/aceptor de 1 de 3 experimentos realizados de manera independiente, con análisis de Anova de 1 vía, con post-análisis de Tukey's. ***p<0.001 (diferencias respecto del control negativo); n.s.: no significativo.

Activación de la enzima CDS mediada por c-Fos en neuronas de hipocampo de rata

Por otro lado, analizamos si c-Fos interacciona y activa a CDS, una enzima para la cual se ha demostrado un mecanismo de activación mediado por c-Fos. Para ello, realizamos nuevamente experimentos de FRET para confirmar si existe interacción entre c-Fos y la enzima. Para realizar estos ensayos, nuevamente elegimos el par de fluoróforos CFP-YFP y neuronas de hipocampo de rata fueron co-transfectadas a las 24 horas de cultivo con los plásmidos c-Fos-CFP y CDS-YFP o con sus respectivos controles, fijadas a las 48 horas y evaluadas por microscopía confocal para medir la eficiencia de transferencia de energía mediante el método de emisión sensibilizada, como se mencionó anteriormente. Como se observa en la Figura 34 y en su cuantificación, se observan valores positivos de FRET significativamente diferentes al control negativo entre ambas proteínas, confirmando entonces que existe interacción física entre c-Fos y la enzima CDS en neuronas de hipocampo de rata, tal como se había demostrado en líneas celulares inmortalizadas NIH-3T3 [75] y en células MCF-7 provenientes de un adenocarcinoma epitelial mamario (Racca A.C., et al., *manuscrito en revisión*).

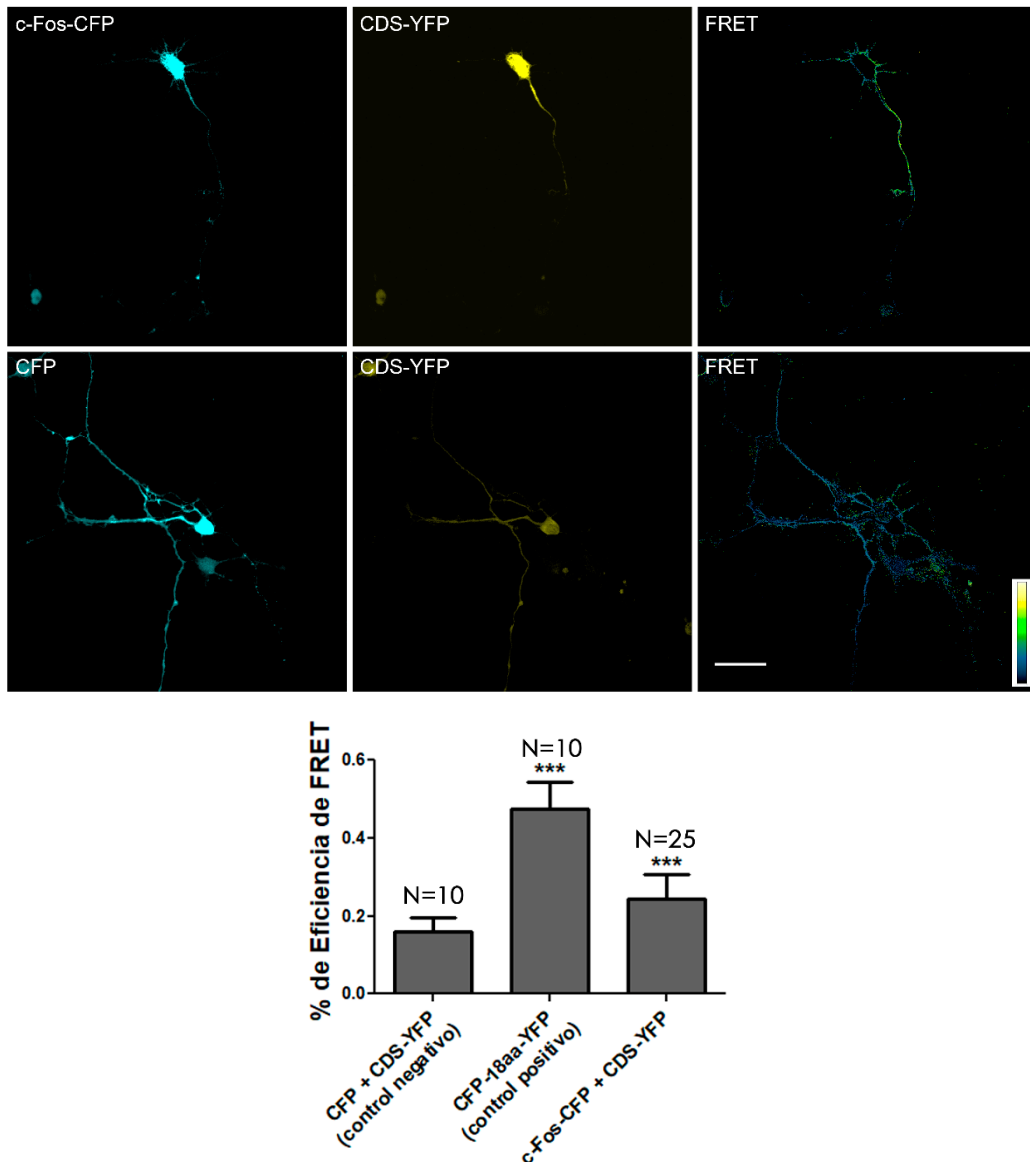


Figura 34. c-Fos muestra valores positivos de FRET con la enzima CDS. Arriba: Neuronas de hipocampo de rata fueron co-transfectadas a las 24 horas de cultivo para expresar las proteínas quimeras c-Fos-CFP (primer panel) y CDS-YFP (segundo panel) y examinadas por microscopía confocal a las 48 horas. La fila inferior muestra un control negativo de células co-transfectadas con el vector CFP vacío y CDS-YFP. Las imágenes de FRET fueron obtenidas por el método de emisión sensibilizada y pseudo-coloreadas utilizando el software ImageJ.

La escala inicia en valores de ausencia de FRET (negro) a valores máximos de FRET (amarillo). Barra de referencia: 30 μ m. **Abajo:** Cuantificación de los promedios de eficiencias de FRET \pm DE para los pares donador/aceptor mostrados en las imágenes. Se muestran los resultados de 1 de 3 experimentos realizados de manera independiente, con análisis de Anova de 1 vía, con post-análisis de Tukey's. *** $p < 0.001$ (diferencias respecto del control negativo).

Por otro lado, evaluamos si c-Fos, además de interactuar con CDS, también la activa en neuronas. Para ello, homogenatos totales de neuronas fueron utilizados como fuente de enzima para medir la actividad enzimática de CDS utilizando el precursor radiactivo [^3H]-CTP y PA, según lo descrito por Lykidis et al., 1997 [125], y midiendo la incorporación del radiactivo al producto de reacción, CDP-diacilglicerol, mediante cuantificación por centelleo. Como se observa en la Figura 35, la adición de c-Fos recombinante es capaz de activar la enzima CDS. Esto indica que c-Fos estaría cumpliendo su función como activador de la síntesis de lípidos también en neuronas.

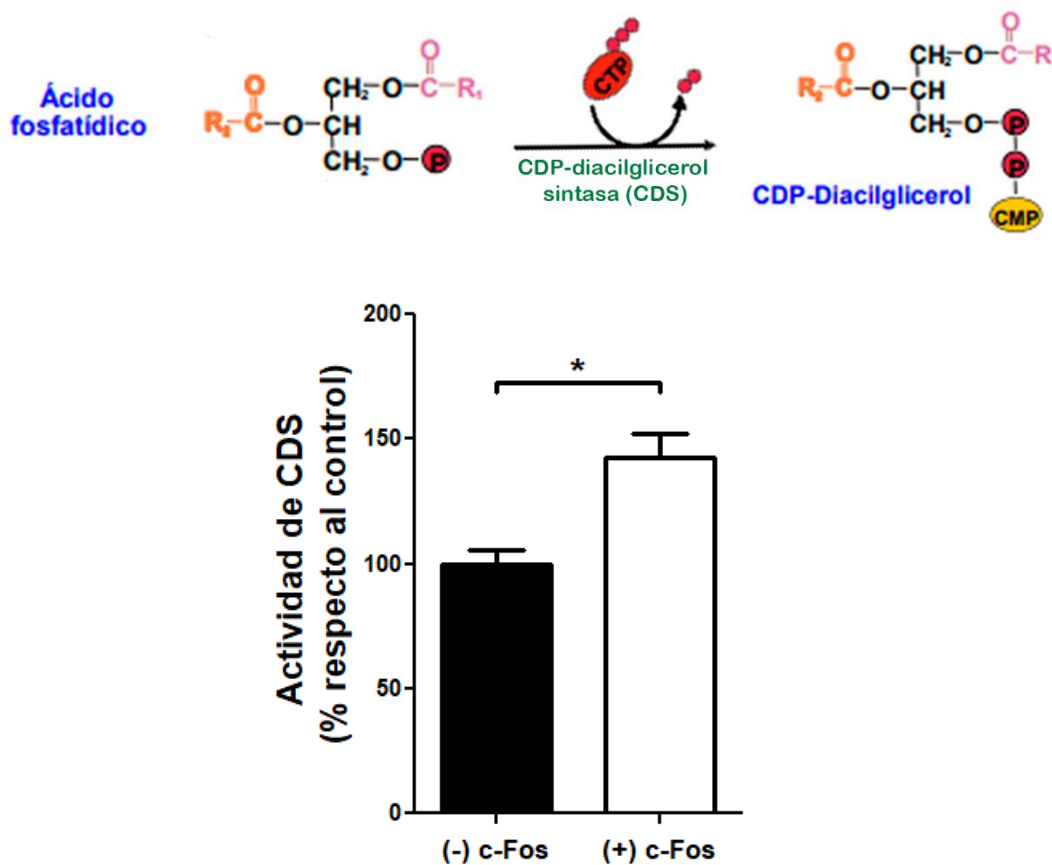


Figura 35. Efecto de la adición de c-Fos recombinante sobre la actividad de la enzima CDS en homogenatos de neuronas. Se midió la formación de CDP-DAG radiactivo incorporado a partir de [^3H]-CTP en presencia de c-Fos recombinante (+ c-Fos). Como control se utilizó el buffer de elución empleado para la obtención de c-Fos recombinante (- c-Fos). Semuestran los resultados de 1 de 3 experimentos realizados de manera independiente desarrollados en triplicado. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE, con análisis estadístico de *t* de Student. * $p < 0,05$. En la parte superior se observa la etapa de la vía de síntesis analizada.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

c-Fos y sus funciones... ¿Todos los caminos conducen a Roma?

Hace ya más de 100 años, a comienzos del siglo XX, investigadores descubrieron que existen agentes “no celulares” presentes en tejidos tumorales que pueden inducir nuevos tumores si se los inyecta en otros organismos susceptibles [126]. Más tarde se descubrió que ese agente “no celular” era de origen viral y se le daría especial atención al virus murino de **OsteoSarcoma Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ)**, que pronto se transformó en el más ampliamente descrito [127] y que pasó luego a llamarse gen *fos* [128]. Años más tarde, con el desarrollo de las técnicas de clonado y biología molecular, pudieron aislarse diversos genes presentes en los genomas virales que eran capaces de inducir la formación de tumores, razón por la cual se los llamó *oncogenes* [129, 130]. Lo que llamó la atención es que estos genes resultaron ser versiones virales modificadas de genes celulares: el gen Fos fue aislado hace ya 35 años como la versión viral (*v-fos*) del gen celular *c-fos* [131].

El proto-oncogen *fos*, la contraparte celular de *v-fos*, fue luego descrito como un gen que codifica para una proteína de 55 kDa, de 380 aminoácidos, que en ciertas circunstancias es capaz de inducir la transformación celular [64]. Muy pronto se demostró que c-Fos se asocia a otra proteína del mismo origen: c-Jun [132, 133]. Estudios sobre la regulación de la transcripción identificaron una “proteína” que podía activar dicho proceso en múltiples sitios: la llamaron **Activator Protein-1 (AP-1)** [134, 135]. Finalmente, se encontraría que, juntos, c-Jun y c-Fos constituyen uno de los heterodímeros AP-1 [136, 137]. Luego se describirían diferentes proteínas de las mismas familias capaces de formar una gran variedad de heterodímeros con actividad como factores de transcripción AP-1 [138].

Se ha descrito que la actividad de AP-1 es inducida por un amplio rango de estímulos fisiológicos y patológicos, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés e infecciones, así como estímulos oncogénicos. La actividad de AP-1 puede ser regulada de múltiples formas: a través de la regulación de la transcripción de las proteínas que la componen, regulando la estabilidad de sus ARNm, sus modificaciones post-traduccionales, el *turnover* de sus proteínas pre-existentes o

nuevamente sintetizadas, mediante las interacciones específicas entre las diferentes sub-unidades de AP-1 o mediante interacciones con otros factores de transcripción y co-factores [65]. Las funciones de AP-1 han sido estudiadas en profundidad, pero conocer el panorama general es complejo por su capacidad de ejercer funciones completamente antagónicas. Esto es particularmente evidente en el sistema nervioso adulto, donde AP-1 está involucrado en procesos tanto degenerativos como regenerativos, ya sea como jugadores fisiológicos neuroprotectivos o como efectores involucrados en degeneración [138].

Cuando se estimula una célula (ya sea con factores tróficos, neurotransmisores, hormonas, etc., dependiendo del tipo celular en cuestión) c-Fos muestra una expresión rápida y transiente [68]. La capacidad de inducción de c-Fos declina con la progresión de la edad, lo que apoya la noción de que su expresión es un reflejo de la capacidad de respuesta de las células a nivel transcripcional [139]. Se sabe que c-Fos se expresa en el tejido del mesodermo, en células precursoras hematopoyéticas y en cerebro durante el desarrollo e inclusive en precursores de células óseas, de dientes y en médula ósea en la etapa adulta [48]. Esto permitió inferir que c-Fos cumple una función en diferentes células y tejidos en diferenciación, pero aún existen muchas incógnitas respecto a los alcances de dichas funciones. ¿Qué tan universales son? ¿Cómo se coordinan entre ellas? ¿En qué momento la función normal de c-Fos deja de serlo para favorecer la carcinogénesis?

Algunas de esas preguntas pueden ser respondidas, al menos en parte, por la existencia de la función no genómica como activador de la síntesis de lípidos descrita en nuestro laboratorio. De hecho, en la literatura siempre se consideró que los factores de transcripción AP-1 podían ejercer su función a través de la inducción o la represión de la transcripción, a través de la modulación de la misma por interacción con otros factores más allá de la interface entre el ADN y la ADN polimerasa y, notablemente, a través de los que se denominaron "*efectos no transcripcionales*", siendo esta última opción la menos estudiada en profundidad [138]. Esta hipótesis surgió gracias a diferentes estudios que describieron, por ejemplo, que c-Fos, junto con Fra-1, se encuentran presente en sinaptosomas y en la membrana plasmática de fracciones sinápticas de corteza cerebral e hipocampo de rata [140]. Sin embargo, en ese momento solo atribuyeron esa localización a una función señal entre la sinapsis y el núcleo,

uniendo los *inputs* sinápticos a la expresión génica neuronal. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis conjuntamente con los reportados en el transcurso de los últimos 20 años por nuestro grupo permiten asignar esa localización de c-Fos a una función independiente de los factores de transcripción de tipo AP-1.

En nuestro laboratorio se ha demostrado de manera contundente que c-Fos se asocia a membranas del RE, donde activa enzimas específicas de diferentes vías de síntesis de lípidos, contribuyendo a la homeostasis celular de los mismos. Particularmente, se han destinado muchos esfuerzos al estudio de la función de c-Fos como activador de la síntesis de lípidos en el sistema nervioso. De hecho, tal como se mencionó en la Introducción, los primeros reportes de la función dual de c-Fos fueron obtenidos en retina de pollos sometidos a estimulación sensorial: las diferencias en la síntesis de fosfolípidos promovidas normalmente por la exposición a luz u oscuridad en células fotorreceptoras y ganglionares son abolidas cuando se bloquea c-Fos [66, 67]. Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten confirmar que efectivamente c-Fos está cumpliendo un rol importante en el sistema nervioso no solo del animal adulto sino también durante el desarrollo y que lleva a cabo ese papel a través de una función AP-1-independiente. Si bien esta posibilidad había sido evaluada y confirmada en el modelo de células PC12 [69], los resultados que obtuvimos en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata permiten extrapolar dicha función a un nivel fisiológico, ya que el desarrollo de neuronas de hipocampo en cultivo refleja de manera más aproximada lo que estaría ocurriendo en un cerebro en desarrollo que un modelo de línea celular inmortalizada.

El hecho de que c-Fos se exprese en cultivo mientras las neuronas diferencian, cuando no lo hace de manera constitutiva en cerebro adulto, implica que su expresión está vinculada a eventos que ocurren durante el desarrollo. Durante esta etapa, los efectos derivados del silenciamiento de su expresión o del bloqueo de su actividad así lo confirman: las neuronas no muestran el patrón de diferenciación clásico cuando c-Fos no está presente y permanecen en estadios de diferenciación tempranos aún después de 48 horas en cultivo, tiempo en el cual un axón debería distinguirse del resto de las neuritas.

La expresión de c-Fos ha sido relacionada en la literatura a procesos que involucran la memoria y el aprendizaje, lo que transformó a esta proteína en un

marcador de cambios plásticos que favorecen el establecimiento de memoria a largo plazo y el mantenimiento de poblaciones neuronales específicas [141, 142]. De hecho, la inhibición de la expresión de AP-1 afecta negativamente la formación de la memoria o procesos adaptativos fisiológicos como la sincronización del reloj endógeno [143, 144]. Todos estos antecedentes son consistentes con una función de c-Fos en la fisiología cerebral que involucra procesos de plasticidad celular y, en general, siempre han sido vinculados a la expresión génica, pero ¿y si se encuentran en cambio relacionados a procesos de plasticidad que involucren cambios en la homeostasis de lípidos? Al menos en parte, esta sería la función de c-Fos en el sistema nervioso y nuestros resultados así lo confirman: al bloquear específicamente la función citoplásmica de c-Fos mediante el uso de dominantes negativas que solo impiden su función no genómica y no interfieren en su función como factor de transcripción AP-1, se observan los mismos efectos de fallas en la diferenciación sin un correcto establecimiento de la polaridad neuronal.

Si bien los resultados son contundentes, surge el interrogante de por qué los animales KO *fos* *-/-* son viables, mientras que los animales *c-jun* *-/-* no lo son. Esto podría explicarse por la redundancia que existe entre las proteínas que componen los factores de transcripción AP-1 y entre ellas las de la familia Fos. Se ha determinado, por ejemplo, que el fenotipo de osteopetrosis observado en los ratones KO de c-Fos puede ser restaurado mediante la expresión de Fra-1 utilizando la estrategia de *knock-in* [145, 146]. Fra-1 es una proteína de la familia Fos que también posee la capacidad de activar la síntesis de lípidos utilizando un mecanismo similar al de c-Fos [147] (Racca A.C. et al., *manuscrito en revisión*). Sin embargo, en ensayos realizados en el laboratorio por la Dra. Fabiola Velázquez durante el transcurso de su tesis doctoral, al caracterizar aspectos del sistema nervioso de animales *fos* *-/-*, no se encontró mayor expresión de Fra-1 en animales KO respecto de animales *wild-type*. En este sentido, se requerirán más experimentos para intentar determinar si alguna de las otras proteínas de la familia Fos es capaz de rescatar la función de c-Fos en cultivos de neuronas de hipocampo de rata.

Para confirmar el rol fundamental de c-Fos en el desarrollo y la diferenciación neuronal, llevamos a cabo experimentos de electroporación *in utero* en colaboración con la Lic. Florentyna Bustos y el Dr. Santiago Quiroga, de nuestra institución. Esta técnica fue descrita inicialmente en el año 2001 y desde entonces ha adquirido cada vez más adeptos gracias a su fácil implementación respecto de la generación de

animales transgénicos, su alta eficiencia y su potencial para analizar mediante transferencia génica unidireccional los efectos de ganancia o pérdida de un gen en el neurodesarrollo. Todas estas características la han transformado en un gran complemento de otras técnicas de modificación génica, como la generación de ratones transgénicos, dado que además posee la ventaja de no generar efectos de compensación de función por otras proteínas capaces de ejercer roles similares al de la proteína codificada por el gen analizado. En este caso, al bloquear la expresión de c-Fos, las neuronas destinadas a poblar las capas superiores de la corteza permanecen en las zonas ventricular y sub-ventricular, lo que implica una grave falla en el desarrollo de la corteza y del SNC. Esto podría deberse a defectos en la migración, a fallas en la diferenciación de progenitores o a un aumento en los niveles de apoptosis. Lo que vuelve interesante este resultado es el hecho de que, en ausencia de compensación de función por otras proteínas, la falta de c-Fos se vuelve más determinante en la generación de un fenotipo aberrante, lo que complementa los resultados obtenidos en ratones transgénicos.

Al realizar una caracterización del SNC de animales *fos* *-/-*, se encontró una reducción en el espesor de la neocorteza cerebral de embriones de 14,5 días de gestación KO para *fos* con respecto a los animales *wild type*, lo cual se observa inclusive en la edad adulta [88]. Dados los resultados obtenidos con la electroporación *in utero*, parece lógico pensar entonces que en dichos animales exista un mecanismo de compensación de función favorecido por la redundancia de función entre las proteínas de la familia Fos. En ese caso, la reducción en el espesor de la corteza correlacionó con una menor diferenciación neuronal de las células madre/progenitoras neurales, un incremento en los niveles de apoptosis en la zona ventricular de los embriones *fos* *-/-* y una menor tendencia a diferenciar de las células madre/progenitoras neurales. Ese aumento en la apoptosis coincide con lo observado en otros trabajos, en los que se demostró que c-Fos es necesario para la supervivencia neuronal, que una reducción en su expresión promueve la muerte de neuronas corticales y de neuronas granulares del cerebelo y que su sobre-expresión puede protegerlas de la muerte inducida por diferentes estímulos [148]. Por ejemplo, ratones con ausencia de expresión de c-Fos en el hipocampo muestran una mayor sensibilidad a la excito-toxicidad inducida por ácido kaínico [149]. En este sentido, resta confirmar si el bloqueo de la expresión de c-Fos

mediante electroporación *in utero* genera efectos similares de fallas en apoptosis o en diferenciación de progenitores tal como se observa en los animales transgénicos.

Los resultados obtenidos en la presente tesis no solo confirman el rol principal y la necesidad de c-Fos tanto para la diferenciación de neuronas de hipocampo como para el correcto desarrollo cortical, sino que también, a través de los resultados obtenidos utilizando mutantes negativas de la función citoplásmica de c-Fos, demuestran que ese papel lo cumple mediante la activación de la síntesis de lípidos en neuronas. Inclusive, observamos esta activación de la síntesis de lípidos dependiente de c-Fos en neuronas de hipocampo, lo que podría implicar que dicha actividad de c-Fos participa en la homeostasis de lípidos neuronal y, gracias a ello, probablemente colabora en los mecanismos de plasticidad neuronal y sináptica.

Esta función de c-Fos podría tener implicancias en múltiples procesos fisiológicos normales relacionados al SNC. c-Fos fue el primer factor de transcripción para el cual se describió que su inducción depende de la actividad neuronal [150, 151]. Es por ello que normalmente se lo ha utilizado como un marcador de actividad neuronal. De hecho, se ha demostrado que su expresión incrementa en el SNC de animales luego de entrenamientos de comportamientos específicos de aprendizaje, rendimiento o de recuperación de aspectos de la memoria [152]. Interesantemente, los cambios en la expresión de c-Fos fueron observados principalmente durante las primeras sesiones de los protocolos de entrenamiento, lo que indica que es más bien una respuesta adaptativa. Quizás, a partir de nuestros resultados, es posible plantear la hipótesis de que esa respuesta adaptativa está vinculada a procesos de plasticidad neuronal y sináptica que involucran la acción no genómica de c-Fos: una vez establecidos y formados los nuevos circuitos relacionados con procesos de aprendizaje o memoria, las células requieren una menor cantidad de lípidos ya que establecen pocos nuevos contactos y, por lo tanto, requieren solo pequeñas ráfagas de expresión de c-Fos. En el caso de animales KO para *fos*, se encontró que los mismos poseen déficits en tareas conductuales complejas. Por otro lado, utilizando el sistema *cre/loxP*, investigadores desarrollaron un ratón *knock out* para c-Fos selectivo del SNC [153], el cual mostraba locomoción y respuestas relacionadas a emociones normales, pero presentaba graves déficits en tareas de aprendizaje asociativo y espacial, dependientes del hipocampo. Al estudiar específicamente lo que sucedía en el hipocampo, encontraron que el mismo

posee una reducción en los mecanismos de plasticidad sináptica. Esto fue consistente con lo descrito en experimentos realizados con oligonucleótidos *antisense* (ASO) para c-Fos, en los cuales se halló que su administración en el hipocampo produce déficits en la memoria espacial a largo plazo [154, 155].

Gracias a estas evidencias, el rol de c-Fos en el aprendizaje y la memoria es ya ampliamente aceptado. Sin embargo, múltiples trabajos se publican año a año vinculando a c-Fos con funciones completamente antagónicas. Por ejemplo, si bien mencionamos anteriormente que c-Fos tiene un rol protector en neuronas corticales, en fotorreceptores de la retina muestra una función completamente opuesta: la degeneración inducida por exposición prolongada a luz de alta intensidad induce la expresión de c-Fos mientras que el bloqueo de su expresión genera neuroprotección [156]. Son muchos los interrogantes que existen aún sobre las funciones de c-Fos. Claramente es una familia pleiotrópica de genes claves que genera cambios en la morfología y el ciclo celular, controlando así aspectos del desarrollo [65]. Conociendo que puede ejercer sus funciones de manera genómica a través de su actividad como factor de transcripción AP-1 o de manera no genómica en el citoplasma activando la síntesis de lípidos, ¿cómo se coordinan entre sí dichas funciones? ¿En qué momento dichas funciones dejan de ejercerse en un contexto normal para pasar a ser patológicas? ¿Cómo es posible que la misma proteína pueda generar tanto neuroprotección como neurodegeneración y muerte celular?

En parte, respuestas aproximadas a esas preguntas pueden proceder de la gran diversidad de combinaciones que existen para formar los factores de transcripción AP-1, que pueden derivar en funciones biológicas opuestas entre sí dependiendo del tipo celular. Se postula entonces que AP-1 tiene una función homeostática que reacciona a cambios en las condiciones del ambiente y de crecimiento para ajustar el patrón de expresión de genes de manera de lograr que la célula se adapte al nuevo contexto [95]. Si a ese panorama añadimos ahora la función no nuclear, citoplásmica, de c-Fos como activador de la síntesis de lípidos, la perspectiva debe necesariamente tornarse mucho más amplia. Cabe preguntarse en este punto cuales son las señales que culminan en la activación de una u otra función. Se sabe que la regulación transcripcional de c-Fos es mediada por la cascada de quinasas ERKs. Por otro lado, se sabe que en neuronas la expresión de c-Fos es estimulada por AMPc y Ca^{2+} a través de la activación del complejo

CREB/CRE [152]. Resta establecer si estas señales son universales para activar todas las funciones de c-Fos o solo algunas. A partir de los antecedentes acerca de funciones antagónicas suena lógico pensar que la función activada dependerá del estímulo que desencadene la señal. En este sentido, las señales que conllevan a la activación de la función citoplásmica de c-Fos siguen siendo una incógnita. Lo que sí está claro a partir de nuestros resultados es que dicha función es ejercida en neuronas y que la misma cumple un rol clave en el correcto establecimiento de la polaridad y la estructura neuronal y, consecuentemente, en la formación de la corteza cerebral. Esto implica entonces que c-Fos es de vital importancia para el desarrollo de los circuitos neuronales que determinarán un correcto funcionamiento del sistema nervioso.

De certezas e incógnitas: La regulación de la síntesis de lípidos mediada por c-Fos

La posibilidad de que c-Fos ejerza múltiples funciones puede atribuirse a su plasticidad estructural dada su naturaleza intrínsecamente desordenada (IDP, del inglés *Intrinsically Disordered Protein*), posibilidad que ya ha sido descrita para otras proteínas de la misma naturaleza [157]. Estas proteínas poseen grandes regiones que no muestran una estructura tridimensional definida en su estado nativo [158]. En el caso de c-Fos, el porcentaje de desorden en su estructura varía entre un 40 a un 60%, dependiendo del algoritmo que se utilice para calcularlo [71]. La principal ventaja para una proteína de poseer una plasticidad conformacional es que dicha característica le permite reconocer y asociarse con múltiples blancos con alta especificidad [159].

Si bien ya hemos descrito que el dominio N-terminal de c-Fos (NB, aminoácidos 1-159) interacciona con las enzimas que activa y que dicha activación se establece a partir del dominio básico (BD), aún no hemos determinado si en dicha interacción c-Fos sufre una transición de ser una proteína desordenada a una ordenada para asociarse a sus proteínas blanco. Se ha probado que el dominio BD muestra este tipo de transición al unirse al ADN como complejo AP-1, formando una α -hélice que interacciona directamente con el ADN [49]. De hecho, este es el único dominio de c-Fos que ha logrado ser cristalizado hasta el momento y ha sido posible solo en su forma unida al ADN. Determinar si c-Fos adquiere una estructura particular al unirse a las enzimas que activa será de vital importancia para conocer con precisión el mecanismo molecular por el que lleva a cabo dicha función.

Otra característica determinada por la naturaleza intrínsecamente desordenada de c-Fos es su comportamiento interfacial. Se ha demostrado, mediante estudios biofísicos en monocapas lipídicas, que c-Fos posee una elevada afinidad por las mismas y que es capaz de sensor y responder a cambios en la composición lipídica y cambios en de fases de la mismas [160, 161], lo que la transforma en una proteína anfipática que es capaz de ejercer actividad de superficie.

Todas estas propiedades apoyan la noción de que c-Fos posee las características moleculares necesarias para ejercer un rol regulador en la síntesis de lípidos: alta actividad de superficie, capacidad de sensor lípidos de membrana y desorden estructural para favorecer su promiscuidad y así interaccionar con múltiples y diversas proteínas blanco. Es en este punto donde surge el interrogante acerca de cuáles son las características estructurales particulares del conjunto de enzimas que activa. ¿Por qué CDS es activada y PIS no lo es? ¿Por qué c-Fos activa la isoforma α de PI4KII y no la isoforma β ? Hasta ahora, nuestros estudios dirigidos a intentar encontrar dominios de alta homología en común entre dichas enzimas no arrojaron resultados positivos. Es por ello que nos planteamos la posibilidad de que las mismas estén formando complejos estructurales para así favorecer el mecanismo en común de activación por interacción con c-Fos.

La célula lleva a cabo numerosas reacciones enzimáticas de manera temporal y espacialmente coordinada, y garantizar la fidelidad de dicha coordinación ante las diferentes demandas celulares es de vital importancia para la supervivencia celular. En el caso de las glicosiltransferasas, por ejemplo, se ha demostrado que las mismas tienden a formar complejos funcionalmente relevantes (ya sea homómeros o heterómeros), principalmente entre aquellas enzimas que actúan de manera secuencial, en los que la actividad de las mismas se ve aumentada o disminuida de manera armónica, lo que revela un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis de glicolípidos [162, 163]. Fallas o la ausencia en la formación de dichos complejos han sido vinculadas a diferentes tipos de cáncer [163]. Estos antecedentes nos llevaron a plantear la posibilidad de que, ante el estímulo mitogénico, las enzimas activadas por c-Fos formen complejos que favorezcan la activación conjunta de todas ellas por una proximidad

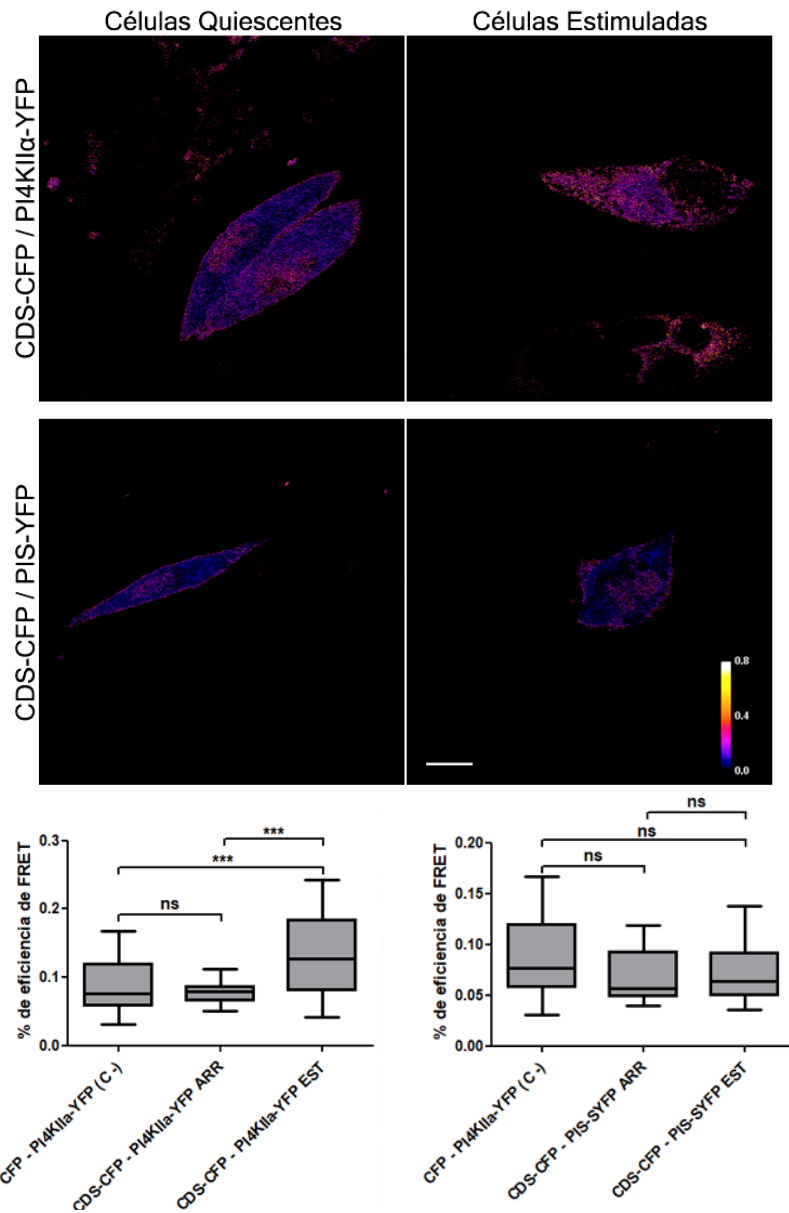


Figura 36. Ensayos de FRET entre los pares de enzimas CDS/PI4KII α (ambas activadas por c-Fos, panel superior) y CDS/PIS (activada y no activada por c-Fos, respectivamente, panel inferior). Células tumorales T98G fueron co-transfectadas para expresar las proteínas quimeras CDS-CFP y PI4KII α -YFP o CDS-CFP y PIS-YFP o con los vectores vacíos como control. Luego de 24 horas en cultivo, se indujo la quiescencia mediante ausencia de suero en el medio de cultivo por al menos 24 horas. Finalmente, se estimuló a las células a re-ingresar al ciclo celular mediante la adición de suero al medio de cultivo durante 7,5 minutos y fueron fijadas para su posterior examinación por microscopía confocal. Las imágenes de FRET fueron obtenidas utilizando el método de emisión sensibilizada y pseudo-coloreadas utilizando el software ImageJ. La escala inicia en valores de ausencia de FRET (negro) a valores máximos de FRET (amarillo/blanco). Barra de referencia: 10 μ m.

Se muestra la cuantificación de los promedios de eficiencias de FRET \pm DE para los pares donador/aceptor de 1 de 3 experimentos independientes, con análisis de Anova de 1 vía, con post-análisis de Tukey's. *** $p < 0.001$. ns: no significativo.

espacial. Para probar esta hipótesis, durante el transcurso de esta tesis, realizamos ensayos en los que células T98G quiescentes fueron transfectadas con diferentes pares de enzimas unidas a variantes espectrales de GFP y se llevaron a cabo ensayos de FRET. Los resultados obtenidos indican que ante el estímulo mitogénico (inducción de re-ingresso al ciclo celular mediante adición de suero fetal bovino al medio), el par de enzimas activadas por c-Fos (CDS y PI4KII α) muestra un aumento en la eficiencia de FRET entre ellas, lo que no ocurre cuando se examina la eficiencia de FRET entre una enzima que es activada por c-Fos y una que no lo es (CDS y PIS, Figura 36).

Cabe destacar que el estímulo tuvo una duración de 7,5 minutos, tiempo en el cual la expresión de c-Fos se asocia a una localización principalmente citoplásmica [68], dificultando que el fenómeno sea debido a la función nuclear AP-1 de c-Fos. Si bien estos resultados corresponden a una línea celular inmortalizada (la sobre-expresión de los pares de enzimas resultó tóxica para cultivos primarios de neuronas), resulta prometedor dirigir estudios en pos de determinar si es efectivamente la expresión de c-Fos la que induce la formación de los complejos enzimáticos, dado que el estímulo utilizado (adición de suero al medio) es un estímulo mitogénico general que provoca múltiples cascadas de señalización. Si es así, restará también determinar si la formación de los complejos es consecuencia de la expresión de c-Fos o si los mismos se forman por otro tipo de estímulo y ello provoca una proximidad espacial que permite la activación de las enzimas por parte de c-Fos.

Al considerar la función regulatoria de c-Fos en la homeostasis de lípidos, necesariamente debemos contemplar los aspectos regulatorios de las enzimas con las que interacciona. En tal sentido, existen múltiples mecanismos utilizados por la célula para regular la actividad enzimática [71]. El producto de una reacción puede inhibir su propia síntesis, como sucede en enzimas de las vías de síntesis de PS. También puede existir regulación cruzada entre diferentes vías de síntesis, en la cual los lípidos de una determinada vía pueden afectar positiva o negativamente la actividad de enzimas de otras vías. O, como describiremos a continuación, la actividad de las enzimas puede ser regulada a través de la calidad y la composición de las membranas.

Como se mencionó anteriormente, c-Fos interacciona y activa a la enzima PAP Lipin1 (Figura 10) [77]. Las enzimas de la familia Lipin no son integrales de membrana, sino que traslocan desde el citoplasma a membranas del RE para participar en la

biosíntesis de fosfolípidos [164]. El dominio polibásico (PBD) de Lipin1, una corta secuencia de 9 aminoácidos básicos consecutivos, está involucrado en la unión selectiva a PA para promover su traslocación a membranas. CCT, otra enzima que demostramos en esta tesis que interacciona con c-Fos en neuronas, es la enzima limitante en la síntesis de PC y es un ejemplo clásico dentro de las consideradas enzimas anfitróficas. El dominio mejor caracterizado que brinda a las proteínas la capacidad de sentir la curvatura y composición de membranas es la hélice anfipática (AH, del inglés *Amphipathic Helix*). En el caso de CCT, su dominio AH, también llamado dominio M, se localiza hacia el extremo C-terminal (Figura 29) y es seguida de una cola desordenada rica en aminoácidos ácidos (serinas y prolinas) [165, 166]. En su forma inactiva y soluble, CCT es silenciada por interacciones débiles entre su dominio catalítico (C) y el dominio M, que actúa como un dominio auto-inhibitorio. En su forma activa, el dominio M adopta la estructura AH y se inserta en la bicapa de las membranas con contenido deficiente de PC. Cuando se une a membranas, el eje de la hélice se ubica de forma paralela a la superficie de la membrana. Cuando el contenido de PC en membranas disminuye, CCT se asocia a las mismas, se activa y las provee de más PC, balanceando el contenido de dicho lípido. Como los sustratos y los productos de la reacción catalizada por CCT son solubles, la traslocación de la enzima a la membrana no facilita su acceso, sino que es el medio para sentir la composición de lípidos [167].

Como la isoforma α de CCT es expresada en una mayor cantidad de tejidos, existen más estudios acerca de su función. Se ha descrito, por ejemplo, que su dominio AH, al unirse a membranas, puede inducir la curvatura de las mismas [168]. CCT β 2, la isoforma analizada en esta tesis, se expresa en muy bajos niveles en tejidos con la excepción del cerebro y tejidos gonadales. En general, su expresión es mayor en tejidos embrionarios respecto de tejidos adultos, lo que indica que podría tener un rol selectivo durante el desarrollo [165].

El rol de CCT β 2 en la síntesis de PC para membranas en tejidos neuronales ha sido ampliamente estudiado. Utilizando como modelo células PC12 y Neuro2a, se encontró que el crecimiento y ramificación de neuritas inducido por NGF o ácido retinóico produce un incremento en la expresión de CCT β 2 localizado en dichas neuritas, a diferencia de CCT α , cuya localización en dicho trabajo fue atribuida exclusivamente al cuerpo celular. Inclusive, el tratamiento con NGF promueve la actividad y la traslocación

a membranas de CCT β 2, y luego de retirarlo del medio tanto la expresión de la enzima como los niveles de PC disminuyen [169]. En este punto existen controversias, ya que otros investigadores describieron que el tratamiento de células Neuro2a con ácido retinóico induce la expresión de CCT α [170]. Más tarde, utilizando cultivos primarios en cápsulas compartimentalizadas, se demostró que existe una relación directa entre la síntesis de PC dependiente de CCT β 2 en axones distales y la ramificación de neuritas [123, 124].

Si bien se conocen dichas funciones de CCT β 2 en el desarrollo de la estructura neuronal, los mecanismos moleculares que se pueden asignar a dichas funciones aún son poco claros. Como se mencionó anteriormente, CCT α puede inducir la curvatura de membranas. También mencionamos que una de las principales características del RE de axones es que el mismo adopta una estructura mayoritariamente tubular, es decir, de membranas de alta curvatura, y que está involucrado en el establecimiento de la polaridad neuronal y el direccionamiento de los axones [34-36]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, surge la hipótesis de que CCT β 2 podría mostrar mayor afinidad por la alta curvatura de membranas del RE, lo que derivaría en su localización en axones. O inclusive, CCT β 2 podría estar induciendo esa alta curvatura para favorecer la entrada del RE en nuevas ramificaciones y así contribuir con la síntesis localizada de PC para la membrana en expansión. La mayoría de los aspectos descritos molecularmente respecto a la ramificación axonal involucran principalmente a componentes del citoesqueleto, tales como la remodelación de actina o la polimerización de microtúbulos [12]. Algunos estudios han sugerido que la relación que existe entre el RE y los microtúbulos del citoesqueleto es fundamental tanto para la ramificación axonal como para su elongación [36]. Sin embargo, la mayoría de los enfoques son dirigidos hacia la síntesis de proteínas y el transporte de las mismas, y no a la síntesis de lípidos.

¿Podría ser la curvatura de las membranas del RE la responsable de generar su distribución selectiva en sitios de ramificación, tal como observamos en la presente tesis? ¿Podría ser CCT β 2 la generadora de dicha curvatura? Quizás c-Fos *per se* muestra mayor afinidad por membranas de mayor curvatura y el mecanismo molecular por el cual activa ciertas enzimas particulares de la síntesis de lípidos está más bien vinculado a una afinidad compartida entre ellas por membranas del mismo tipo de curvatura y no a dominios homólogos entre las mismas.

En este sentido, muchos son los ensayos que restan para determinar la causa de la selectividad de c-Fos por algunas enzimas particulares. Lo que sin duda se ha demostrado es que c-Fos participa activamente en la síntesis de lípidos en neuronas y su localización sugiere que este mecanismo podría contribuir a la síntesis localizada necesaria para la biogénesis de membrana de neuronas en activa diferenciación y desarrollo.

Entre las perspectivas fisiológicas de esta función no genómica de c-Fos, resulta interesante plantear la posibilidad de evaluar que ocurre con la síntesis de lípidos en la regeneración neuronal, luego de una injuria, para analizar si c-Fos se encuentra vinculado a dicho proceso.

Conclusiones generales

En el transcurso de la presente tesis, se obtuvieron numerosas evidencias que confirman el rol fundamental de c-Fos en el correcto desarrollo neuronal. Los experimentos de bloqueo de su actividad y expresión en neuronas en cultivo demostraron claramente la necesidad de dicha proteína para el normal proceso de diferenciación. Inclusive, los ensayos realizados utilizando mutantes de delección capaces de actuar como dominantes negativas de c-Fos indicaron que dicho papel, además de llevarlo a cabo a través de la regulación génica como componente de factores de transcripción AP-1, lo ejerce a través de su función no genómica como activador de la síntesis de lípidos. Los experimentos de bioquímica nos permitieron confirmar que, efectivamente, c-Fos es capaz de activar de la síntesis de lípidos en neuronas. Además, a todas estas evidencias se suma la obtenida en experimentos *in utero*, que revelaron que c-Fos es necesario también en procesos de desarrollo cortical.

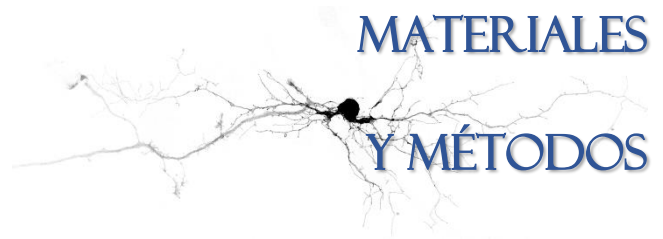
En conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis y expuestos a lo largo del manuscrito, permiten concluir que el rol citoplásmico de c-Fos es de vital importancia para el desarrollo neuronal, lo que le permitiría contribuir a la activación de la síntesis de membrana necesaria para la extensión de los diferentes procesos neuronales que concluirán en la polarización de la misma y en el establecimiento de las conexiones sinápticas adecuadas para el correcto funcionamiento del sistema nervioso.



TRABAJOS
PUBLICADOS

Durante el transcurso de la presente tesis, se publicaron los siguientes trabajos:

- Ferrero G.O., Renner M.L., Gil G.A., Rodriguez-Berdini L. and Caputto B.L. "*c-Fos-activated synthesis of nuclear PtdIns(4,5)P₂ promotes global transcriptional changes*". Biochem J. **2014**. 461(3):521-30
- Rodriguez-Berdini L. and Ferrero G.O. "*A Technique for the Measurement of in vitro Phospholipid Synthesis via Radioactive Labeling*". **2016**. Bio-protocol 6(2): e1705. DOI: 10.21769/BioProtoc.1705.
- Rodriguez-Berdini L., Ferrero G.O., Cardozo Gizzi A.M. and Caputto B.L. "*c-Fos in neuronal differentiation: a new function involving phosphatidylcholine synthesis*". Manuscrito en preparación.



**MATERIALES
Y MÉTODOS**

Animales

Los protocolos de alojamiento, manipulación y eutanasia de los animales se rigen por las regulaciones detalladas en *Guide for the care and use of laboratory animals (Eighth Edition)* del *National Research Council* (Washington, USA) y los lineamientos descritos en la *Guía para cuidado y uso de animales de experimentación* emitida por el INTA (Morón, Buenos Aires, Argentina). Los mismos han sido aprobados por el *Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Protocolo aprobado en Res. 738/2018, expediente UNC 000891 8/2018; Acreditación Dra. Beatriz L. Caputto Categoría C aprobada en Res. 722/2018, expediente UNC 0008901/2018; Acreditación Lic. Lucía Rodríguez Categoría B aprobada en Res. 723/2018, expediente UNC 0008924/2018).

Cultivos celulares

Las neuronas piramidales de hipocampo se obtuvieron de cerebros de embriones de rata como se describe en Banker y Cowan, 1977 [171] y fueron cultivadas en placas. Brevemente, ratas hembras Wistar fueron sometidas a toma de muestras de frotis vaginales para confirmar la etapa del ciclo estral/reproductivo en la que se encontraban y aquellas que por citología demostraron estar en etapa “estro” (de aceptación del macho o copulación) fueron cruzadas con machos durante una noche. Al día siguiente, se confirmó la copulación mediante la presencia de espermatozoides en frotis vaginales y se separaron de los machos. A los 18 días de gestación, las hembras preñadas fueron sacrificadas de acuerdo al protocolo propuesto en *“Guide for the care and use of laboratory animals”* (8th Edition, USA) al ser sometidas a eutanasia en cámara de CO₂.

Los embriones se extrajeron del útero con material quirúrgico estéril. Los mismos fueron entonces decapitados en esterilidad en una cabina de flujo laminar y las cabezas obtenidas se colocaron placas con buffer *Hank's Balance Salt Solution* (HBSS, Sigma Aldrich) estéril a 4°C para facilitar su visualización en estereoscopio (Stemi DV4, Zeiss). Luego de la separación de los hipocampos con material quirúrgico limpio y estéril y disociación con Tripsina 0,25% (Life Technologies), los mismos fueron disgregados utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetros decrecientes.

Las células obtenidas fueron sembradas en placas o cubreobjetos previamente lavados con ácido y cubiertos con poly-lisina y mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero de caballo (Thermo Fisher Scientific) al 10% v/v por 2 horas. Luego el medio fue reemplazado por Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) sin suero suplementado con N2 y B27 (Thermo Fisher Scientific). Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37°C, con 5% de CO₂ y en condiciones adecuadas de humedad durante el tiempo indicado para cada experimento.

Las células epiteliales embrionarias de riñón (HEK 293T, ATCC), utilizadas para la obtención de partículas lentivirales, fueron mantenidas en DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific) al 10% v/v e incubadas a 37°C, con 5% de CO₂ y en condiciones adecuadas de humedad, acorde a lo sugerido por el proveedor.

Plásmidos y construcciones

Los plásmidos utilizados pertenecen al stock general de biología molecular del laboratorio. Aquellos que fueron clonados en el laboratorio fueron debidamente secuenciados para comprobar su correcto marco de lectura. Los mismos se encuentran enumerados en la Tabla 2.

Nombre	Vector	Promotor	Técnica
shRNA c-Fos 1	pLKO.1-CMV-tGFP	CMV	Producción de partículas lentivirales/ <i>In utero</i>
shRNA c-Fos 2	pLKO.1-CMV-tGFP	CMV	Producción de partículas lentivirales/ <i>In utero</i>
shRNA scrambled	pLKO.1-CMV-tGFP	CMV	Producción de partículas lentivirales/ <i>In utero</i>
VSV-G	pMD2.G	CMV	Producción de partículas lentivirales
psPAX2	psPAX2	SV40	Producción de partículas lentivirales
CFP	pcDNA3-CFP	CMV	FRET
YFP	pcDNA3-CFP	CMV	FRET
CFP-18aa-YFP	pcDNA3-CFP	CMV	FRET

Tabla 2. Lista de plásmidos utilizados.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la presente tesis se encuentran enumerados en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Anticuerpo	Marca	Catálogo	Origen	Técnica	Concentración
c-Fos	Sigma	F7799	Conejo	WB	1:500
c-Fos	Santacruz	sc-8047	Ratón	IF	1:300
c-Fos	Santacruz	sc-52	Conejo	IF	1:300
c-Fos	Santacruz	sc-8047	Ratón	IP	1:400
β III-tubulina	Sigma	T5076	Ratón	IF	1:1500
β III-tubulina	Sigma	T2200	Conejo	IF	1:1500
α -tubulina	Sigma	T9026	Ratón	WB	1:3000
α -tubulina	Sigma	T9026	Ratón	IF	1:1000
Calreticulina	ThermoFisher	PA3-900	Ratón	IF	1:800
GM130	BD	610822	Ratón	IF	1:500
CCT β 2	Sigma	HPA006367	Conejo	WB	1:800
CCT β 2	Sigma	HPA006367	Conejo	IF	1:300

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados. IF: Inmunofluorescencia. WB: Western Blot. IP: Inmunoprecipitación.

Anticuerpo	Marca	Especificidad	Origen	Técnica	Concentración
Alexa 488	Molecular Probes	Rabbit	Goat	IF	1:1000
Alexa 546	Molecular Probes	Mouse	Goat	IF	1:1000
Alexa 633	Molecular Probes	Rabbit	Goat	IF	1:1000
IRDye 680	LI-COR	Mouse	Goat	WB	1:25000
IRDye 800	LI-COR	Rabbit	Goat	WB	1:25000

Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios utilizados. IF: Inmunofluorescencia. WB: Western Blot.

Transfecciones transientes

Las transfecciones fueron realizadas utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se diluyeron los plásmidos y la Lipofectamine 2000 en OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) en dos soluciones separadas (a volumen final recomendado por el protocolo del fabricante). Luego de 5 minutos de incubación, se mezclaron ambas soluciones (preferentemente añadiendo la solución de ADN gota a gota sobre la solución de Lipofectamine 2000) y se incubaron durante otros 20 minutos. Finalmente, la mezcla fue

añadida al medio de cultivo, con la precaución de que el mismo no contenga antibióticos y realizando la adición gota a gota, según lo sugerido por el fabricante. Para neuronas en particular, dada la toxicidad de la transfección, una vez transcurridas dos horas se cambió el medio por medio fresco.

Las concentraciones óptimas de ADN y de Lipofectamine 2000 fueron optimizadas para cada plásmido en particular mediante curvas de variación de concentración de ambos componentes. A continuación, se detallan las concentraciones de ADN y la cantidad de Lipofectamine 2000 elegidas según la optimización para cada ensayo:

- *Expresión de dominio NA*: **1,5 µg de ADN** de cada uno de los plásmidos (YFP, NA-YFP, NB-YFP) y **2 µL Lipofectamine 2000** por cada pocillo de una placa de 24 wells. Volumen final de la mezcla: 100 µL de OptiMEM.
- *Ensayos de FRET*: **2 µg de ADN** de cada plásmido, **3 µg de ADN** para el vector utilizado como control positivo (CFP-18aminoácidos-YFP) y **2,4 µL Lipofectamine 2000** por cada pocillo de una placa de 24 wells. Volumen final de la mezcla: 100 µL de OptiMEM.

Profesión

Las profesiones fueron realizadas utilizando el kit BioPORTER Protein Delivery Reagent (Genlantis) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, la proteína de interés fue diluida en buffer PBS 10 mM, pH 7,4. La solución de la proteína se utilizó para hidratar el reactivo BioPORTER, previamente secado por evaporación. Finalmente, la solución obtenida se diluyó en medio de cultivo (DMEM) libre de suero alcanzando el volumen final recomendado para el ensayo. Las concentraciones óptimas de la proteína y del reactivo BioPORTER fueron optimizadas mediante curvas de concentración de ambos.

Producción de partículas lentivirales e infecciones

Una vez alcanzada la confluencia requerida, células epiteliales embrionarias de riñón (HEK 293T, ATCC), mantenidas en DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific) al 10% v/v,

fueron co-transfectadas con plásmidos comerciales que contienen shRNA específicos contra la secuencia de c-Fos de ratón clonados en vectores pLKO.1-CMV-tGFP (MISSION®, clones TRCN0000042680 y TRCN0000042678, Sigma Aldrich) o con la correspondiente secuencia control al azar del shRNA y con plásmidos empaquetadores compatibles (pMD2.G, donados por Didier Trono, Addgene #12259, y Pax2, donados por Malin Parmar, Addgene #35002) utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). La confluencia adecuada se alcanzó sembrando 500.000 células por placa y transfectando a las 24 horas pos-siembra. Las condiciones seleccionadas para la transfección en placa de 3,5 según la optimización fueron:

- | | | |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - shRNA-c-Fos 1 (clon 42680): 1 µg de ADN - shRNA-c-Fos 2 (clon 42678): 1 µg de ADN <li style="text-align: center;">o - shRNA scrambled: 2 µg de ADN | } | <p>En ambos casos: 1,5 µg de ADN de Pax2 y 0,5 µg de ADN de pMD2.G, y 10 µL de Lipofectamine 2000.</p> |
|--|---|---|

Volumen final de la mezcla: **500 µL** (OptiMEM).

Las partículas lentivirales fueron obtenidas del medio celular a las 48 horas post-transfección y el título de las mismas fue determinado mediante el método de diluciones seriadas en neuronas de hipocampo de rata. Las neuronas fueron infectadas a las 24 horas de la siembra con diferentes diluciones de la solución de partículas lentivirales obtenida en medio de cultivo completo para neuronas (1:2; 1:5; 1:10; 1:50; 1:100) y a las 72 horas se cuantificó el número de células GFP positivas para cada una de ellas. La eficiencia de infección se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de células GFP positivas respecto de la cantidad de células totales.

Las partículas lentivirales, las mismas fueron congeladas y conservadas a -80°C. De esta manera la funcionalidad y eficiencia de las mismas se extiende a aproximadamente 1 mes. Para la infección, las mismas fueron adicionadas al medio de cultivo de las células en una dilución determinada de acuerdo a la titulación obtenida en cada lote. Todos los trabajos con partículas lentivirales fueron llevados a cabo en mesas de flujo de bioseguridad tipo 2 y con las precauciones necesarias establecidas para dicha tarea.

Preparación de c-Fos recombinante

c-Fos unido a un *tag* His fue expresado y recuperado de bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21 transformadas con el plásmido de expresión procariota pET15b-His-Fos, que contiene una secuencia de c-Fos optimizada para expresión en procariotas unida a 6 residuos de histidina, tal como se describió anteriormente [160]. Brevemente, una colonia de bacterias transformadas con el plásmido fue inoculada en 5 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) suplementado con Ampicilina (100µg/mL) y se incubó a 37°C en agitación constante a 180 r.p.m. durante toda la noche. Al día siguiente, los 5 mL del cultivo obtenido se inocularon en 100 mL de medio suplementado con Ampicilina y se incubó en agitación constante a 180 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. Una vez alcanzado dicho valor se extrajo una muestra de 500 µL, se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto y se conservó el pellet a -20°C como “muestra no inducida”. En el resto del cultivo se indujo la expresión de la proteína con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, Promega) a una concentración de 1mM por 4 horas en agitación a 37°C. Luego de este tiempo, se tomó nuevamente una muestra de 500 µL y se conservó el pellet como “muestra inducida”. El resto de las bacterias fueron centrifugadas durante 10 minutos a 5000 r.p.m. a 4°C y el pellet fue re-suspendido en 12 mL de Binding Buffer SIN UREA (ver composición de buffers más adelante). Las bacterias fueron lisadas por 3 pulsos de sonicación en Emulsiflex. El lisado obtenido fue centrifugado durante 15 minutos a 10000 r.p.m. a 4°C; en este paso las proteínas solubles permanecen en el sobrenadante y los cuerpos de inclusión en el pellet. Dado que c-Fos se obtiene a partir de cuerpos de inclusión, la proteína fue purificada del pellet. De todas formas, se conservó una muestra de 500 µL del sobrenadante como control. El pellet se re-suspendió en 5 mL de Binding Buffer CON UREA y se incubó durante 1 hora a 4°C con agitación constante para que se solubilicen los cuerpos de inclusión.

Mientras tanto, columnas de afinidad HisTrap (GE Healthcare) fueron equilibradas. Para ello, la columna se conectó a una bomba peristáltica y fue equilibrada con 5 mL de Binding Buffer CON UREA a un flujo de 1 mL/minuto. Luego, se pasó el homogenato obtenido por la columna a un flujo de 0,3 mL/minuto y se realizó un nuevo lavado con 5 mL de Binding Buffer CON UREA a un flujo de 0,3 mL/minuto.

La columna cargada con la proteína de interés fue insertada en el sistema Akta Purifier (GE Healthcare), previamente lavado con H₂O MilliQ y con los buffers de lavado y de elución (según la bomba que corresponda). La presencia de las proteínas en las fracciones de elución esperadas fue visualizada por el lector UV del equipo.

Finalmente, la correcta inducción y la purificación de la proteína recombinante fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida teñidos con una solución del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y la concentración de las proteínas obtenidas determinada por el método de Bradford (BioRad).

La composición de los buffers utilizados se detalla a continuación:

BINDING BUFFER:	NaCl 0,5 M
	Tris-HCl 20 mM pH 8
	Imidazol 5 mM
	Urea 6 M
WASH BUFFER (A):	NaCl 0,5 M
	Tris-HCl 20 mM pH 8
	Imidazol 20 mM
	Urea 6 M (Opcional)
ELUTION BUFFER (B):	NaCl 0,5M
	Tris-HCl 20 mM pH 8
	Imidazol 500 mM
	Urea 6 M (Opcional)

Electroforesis y Western Blot (WB)

Las células destinadas a separación electroforética de proteínas fueron cosechadas en Buffer RIPA modificado (Na₂HPO₄ 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; NP-40 1% v/v; Deoxicolato de Na 1% v/v; SDS 0,1% v/v; NaF 10 mM) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas 1X. Los lisados fueron centrifugados a 13200 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante que contiene las proteínas solubilizadas. En dicho sobrenadante, se midió la concentración de proteínas por el

método de Bradford y se ajustó a volumen final la concentración adecuada con Buffer de siembra Laemmli.

Para la electroforesis, 50 μg de proteínas fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V. Luego, las proteínas separadas en el gel fueron electrotransferidas a membranas de Nitrocelulosa a 300 mA durante 65 minutos. Luego de 3 lavados de 10 minutos con buffer fosfato (PBS) 10 mM, las membranas fueron bloqueadas con PBS 10 mM y leche descremada al 5% p/v durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas durante toda la noche (ON, del inglés *overnight*) a 4°C con los anticuerpos especificados. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con PBS 10 mM con Tween-20 al 0,1% v/v e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios para detección IR. Finalmente, las membranas fueron lavadas nuevamente y la inmunodetección se realizó utilizando el sistema *ODYSSEY Infrared Imaging System* (LI-COR). El peso molecular de cada banda fue calculado por extrapolación a un marcador de pesos moleculares conocidos sembrado en cada del (BioRad). Las imágenes obtenidas fueron transformadas a escala de grises y luego invertidas.

Co-inmunoprecipitación (co-IP)

Para los ensayos de co-IP, cultivos de neuronas de hipocampo de rata fueron lavados dos veces con PBS 10 mM frío y cosechadas en 100 μL de Buffer RIPA (composición antes mencionada) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas 1X utilizando una escobilla. Los lisados fueron centrifugados a 13200 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante con las proteínas solubilizadas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Al mismo tiempo, 25 μL de Proteína G–Sepharose (GE Healthcare Biosciences) fueron lavados con Buffer RIPA y centrifugados a 4600 r.p.m. por 30 segundos a 4°C. Este procedimiento se repitió 3 veces. Luego, la Proteína G–Sepharose fue incubada en agitación a 4°C con el anticuerpo elegido para la inmunoprecipitación en la dilución indicada. Una vez concluido este tiempo, se repitió el procedimiento de lavado 3 veces, se adicionaron al menos 100 μg de proteínas del lisado y se incubó 16 horas en agitación orbital a 4°C. Un 10% del homogenato total fue separado previo a la

inmunoprecipitación (*input*) para confirmar la presencia de la proteína en el mismo y evitar falsos negativos.

Posteriormente, se lavó la Proteína G–Sepharose 5 veces con Buffer RIPA y se re-suspendió en 25 μ L de H₂O MilliQ y 25 μ L de Buffer de siembra Laemli 2X. Finalmente, las muestras obtenidas se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y liberarlas de las interacciones con los anticuerpos y sometidas a SDS-Page y Western Blot.

Inmunofluorescencia

Las células crecidas en cubreobjetos previamente lavados con ácido y cubiertos con poly-lisina fueron lavadas tres veces con PBS 10 mM frío y fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma Aldrich), sucrosa 4% (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 10 mM a 37°C durante 10 minutos. Luego las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma Aldrich) en 10 mM PBS durante 10 minutos y bloqueadas con Suero de Caballo 2% (v/v) y Albúmina Sérica Bovina 3% (p/v) en 10 mM PBS por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en buffer de bloqueo conteniendo los diferentes anticuerpos, lavadas tres veces con 10 mM PBS e incubadas con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente, se lavaron nuevamente con 10 mM PBS tres veces, 2 veces con agua MilliQ y se montaron utilizando medio de montaje FluorSave (Millipore). En caso de indicarlo, se utilizó la droga DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Life Technologies) para visualizar la estructura nuclear. Las imágenes se obtuvieron utilizando microscopios confocales Olympus FV300, Olympus FV1000 y Olympus FV1200 y utilizando el software Olympus Fluoview. El análisis y la preparación de las imágenes se realizaron con el software ImageJ.

Análisis de FRET

Células crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con los siguientes vectores: c-Fos-CFP-N1, CCT β 2-pSYFP2, CFP-YFP o los vectores vacíos utilizando Lipofectamine 2000 con el método mencionado anteriormente. Luego de 24 horas de la

transfección, las células fueron lavadas dos veces con 10 mM PBS frío y fijadas con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma Aldrich), sucrosa 4% (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 10 mM a 37°C durante 10 minutos. Las células fueron lavadas tres veces con 10 mM PBS y 2 veces con agua MilliQ, los cubres fueron montados con FluorSave (Millipore) y visualizadas con microscopios confocales Olympus FV1000 o FV300, utilizando el software Olympus Fluoview. Las proteínas quiméricas eCFP (donor) y eYFP (aceptor) fueron excitadas con láser de argón a 458 y 515 nm, respectivamente. La detección de la emisión del donador fue en la ventana de 470-500 nm y la del aceptador de 530-560 nm. Se obtuvieron entonces 3 imágenes por cada foto:

- Dex/Dem = Excitación del donador, emisión del donador (D).
- Aex/Aem = Excitación del aceptador, emisión del aceptador (A).
- Dex/Aem = Excitación del donador, emisión del aceptador (FRET).

Las imágenes fueron obtenidas utilizando objetivos 60X con apertura numérica de 1,42, con tamaño de 1024x1024 pixels. Las condiciones de adquisición se ajustaron para minimizar el fotoblanqueo y el tiempo de escaneo, pero maximizando la relación señal/ruido en las diferentes condiciones.

Para las determinaciones de FRET, se utilizó el método de emisión sensibilizada [172]. El análisis de las imágenes fue realizado célula por célula utilizando el software de distribución gratuita ImageJ. Los valores de *background* fueron determinados independientemente para cada canal mediante células no transfectadas y luego restados. El sangrado espectral del donador (SED) y la excitación directa del aceptador (EDA), que contaminan la señal de FRET, fueron calculados y removidos utilizando células de simple transfección [76]. Luego, la imagen de precisión de FRET (cFRET), que muestra los niveles de transferencia corregidos, fue obtenida mediante el algoritmo propuesto por Elangovan y colaboradores [76]:

$$cFRET = FRET - D \times SED - A \times EDA$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{cFRET}{cFRET + D}$$

Los promedios de los valores de eficiencia de FRET (%E) en cada célula fueron obtenidos en una base pixel por pixel [77]. Las imágenes obtenidas fueron pseudo-coloreadas para una mejor comprensión de la distribución de las eficiencias de FRET en cada célula.

Ensayos de actividad enzimática de CDS

La actividad total de CDS fue determinada como se describe en Lykidis et al., 1997 [125]. Los ensayos enzimáticos fueron realizados en tubos de vidrio en un volumen final de 40 μL conteniendo 40 μg de homogenatos de proteínas obtenidos de neuronas de 1 semana en cultivo, con inhibidores de proteasas y conservados a -70°C como fuente de enzima. Los homogenatos fueron incubados en hielo durante 30 minutos y lisados en sonicador de baño durante 3 ciclos de 30 segundos. La mezcla de reacción fue preparada de la siguiente manera:

- $[\text{^3H}]$ -CTP 0,69 μM (actividad específica 14,5 Ci/mmol)
- MgCl_2 10mM
- Ácido Fosfatídico (PA) 2mM*
- Tris-Maleato 50mM pH 6,5
- 40 μg de lisado proteico
- c-Fos recombinante (0,5 μg c-Fos/mg de homogenato proteico)**

* El stock de PA se encuentra a una concentración de 5mg/mL en Metanol/Cloroformo. Para utilizarlo, se debe alicuotar la cantidad necesaria para el ensayo y secar con Nitrógeno hasta eliminar todo el solvente y obtener un sólido blanco. Luego, se debe re-suspender con agua y sonicar hasta homogeneizar.

** Primero mezclar el PA y c-Fos recombinante y dejar interaccionar a 37°C en baño termostático durante 5 minutos. Luego, agregar el $[\text{^3H}]$ -CTP, el Tris-Maleato y el homogenato proteico. Finalmente, agregar el MgCl_2 para iniciar la reacción, que es dependiente de Mg.

Como control se utilizó el correspondiente volumen de buffer de elución. La reacción se inició con la adición de MgCl_2 (cofactor) y se incubó durante 1 hora a 37°C .

Luego, la misma se detuvo mediante el agregado de 180 μL de una solución de cloroformo/metanol/HCl (1:2:0,02%v/v). Se agregaron a continuación 60 μL de cloroformo y 60 μL de KCl 2 M, se mezcló por vórtex y se separaron las fases orgánica y acuosa por centrifugación. La cantidad de [^3H]-CDP-diacilglicerol formada se determinó por cuantificación de radiactividad por centelleo en la fase orgánica obtenida.

Electroporación *in utero*

La electroporación *in utero* fue realizada según lo descrito anteriormente en Nieto Guil et al., 2017 [103]. Brevemente, ratones hembra C57BL/6J preñadas de 15 días de gestación (E15) fueron anestesiadas con isofluorano (Piramal). Las agujas para inyección fueron obtenidas con Puller a partir de capilares P-97 Flaming/Brownglass (World Precision Instruments). Los plásmidos de los shRNA y dsRed fueron diluïdos en buffer Tris 10 mM, pH 8, y Azul de Tripán e inyectados a concentraciones finales de cada uno de entre 0,5 y 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se aplicaron luego 5 pulsos de 38V (50 ms ON, 950 OFF) utilizando electrodos de 5 mm y un electroporador adaptado para tal fin (LIADE). Los embriones fueron re-introducidos en la cavidad abdominal de la hembra para evitar una disminución brusca de temperatura y la misma fue suturada.

A los 19 días de gestación, la madre fue sacrificada y se extrajeron los cerebros de aquellos embriones que habían sido electroporados. Los cerebros fueron fijados en paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma Aldrich) durante toda la noche. Posteriormente, para realizar secciones cornales de los mismos, fueron crio-protegidos por inmersión en una solución de sucrosa 30% p/v (Sigma Aldrich) y luego inmersos en una solución acuosa viscosa de alcohol polivinil y polietilenglicol (OCT). Se obtuvieron secciones de 30 μm en criostato, que fueron montadas en vidrios tratados con Xileno y las mismas fueron permeabilizadas con Tritón-X100 0,5% v/v en PBS 10mM y teñidas con DAPI. Finalmente, fueron montadas en FluorSave (Millipore) y observadas en microscopio confocal Olympus FV300 utilizando el software Olympus Fluoview.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism. En todos los casos se realizaron al menos 3 experimentos independientes, por triplicado cuando se indica.

En aquellos casos en los que fue posible se utilizaron tests paramétricos. En caso de obtener varianzas significativamente diferentes, se optó por análisis no paramétricos.

Los análisis estadísticos utilizados fueron t de Student, test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, Anova de una vía con post-test de Tukey y Anova de dos vías con post-test de Bonferroni, según se indica en cada ensayo. En todos los casos:

* $p < 0.05$

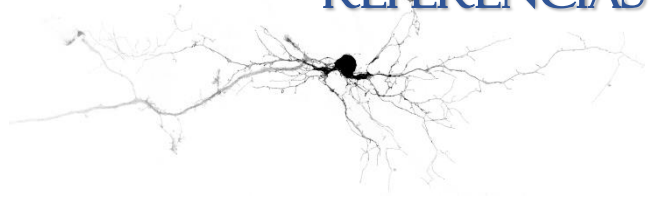
** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

n.s.: no significativo

La prueba de Kolmogorov-Smirnov es un análisis no paramétrico de "bondad de ajuste" que permite medir el grado de concordancia existente entre la distribución de un conjunto de datos y una distribución teórica específica, o entre dos distribuciones de probabilidad entre sí.

REFERENCIAS



1. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, 2015.
2. Millet, L.J. and M.U. Gillette, *Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices*. *Yale J Biol Med*, 2012. **85**(4): p. 501-21.
3. Allen, N.J. and D.A. Lyons, *Glia as architects of central nervous system formation and function*. *Science*, 2018. **362**(6411): p. 181-85.
4. Ganong, W.F., *Fisiología Médica*. 20th Edition, 2006.
5. Winkle, C.C. and S.L. Gupton, *Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016. **322**: p. 247-80.
6. DeFelipe, J., et al., *Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations*. *Cereb Cortex*, 1999. **9**(7): p. 722-32.
7. Gibson, D.A. and L. Ma, *Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system*. *Development*, 2011. **138**(2): p. 183-95.
8. Schmidt, H. and F.G. Rathjen, *Signalling mechanisms regulating axonal branching in vivo*. *Bioessays*, 2010. **32**(11): p. 977-85.
9. Dent, E.W., F. Tang and K. Kalil, *Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms*. *Neuroscientist*, 2003. **9**(5): p. 343-53.
10. Bagnard, D., et al., *Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections*. *Development*, 1998. **125**(24): p. 5043-53.
11. Gallo, G., *The cytoskeletal and signaling mechanisms of axon collateral branching*. *Dev Neurobiol*, 2011. **71**(3): p. 201-20.
12. Armijo-Weingart, L. and G. Gallo, *It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches*. *Mol Cell Neurosci*, 2017. **84**: p. 36-47.
13. Rikitake, Y. and Y. Takai, *Directional cell migration regulation by small G proteins, nectin-like molecule-5, and afadin*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011. **287**: p. 97-143.
14. Bagri, A., et al., *Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family*. *Cell*, 2003. **113**(3): p. 285-99.
15. Feldheim, D.A. and D.D. O'Leary, *Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(11): p. a001768.
16. Dasen, J.S., *Transcriptional networks in the early development of sensory-motor circuits*. *Curr Top Dev Biol*, 2009. **87**: p. 119-48.
17. Bilimoria, P.M. and A. Bonni, *Molecular control of axon branching*. *Neuroscientist*, 2013. **19**(1): p. 16-24.
18. Hagg, T. and M. Oudega, *Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury*. *J Neurotrauma*, 2006. **23**(3-4): p. 264-80.

19. Hagg, T., *Collateral sprouting as a target for improved function after spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2006. **23**(3-4): p. 281-94.
20. Pfenninger, K.H., *Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(4): p. 251-61.
21. Weiss, P. and H.B. Hiscoe, *Experiments on the mechanism of nerve growth*. J Exp Zool, 1948. **107**(3): p. 315-95.
22. Ledeen, R.W., *Transport, exchange, and transfer of phospholipids in the nervous system*. Phospholipids in Nervous Tissues, ed. J. Eichberg. 1985, New York: John Wiley & Sons Inc . 135-72.
23. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell* 2nd Edition ed. 1989, Garland, New York and London.
24. Palay, S.L., *The morphology of synapses in the central nervous system*. Exp Cell Res, 1958. **14**(Suppl 5): p. 275-93.
25. Tsukita, S. and H. Ishikawa, *Three-dimensional distribution of smooth endoplasmic reticulum in myelinated axons*. J Electron Microsc (Tokyo), 1976. **25**(3): p. 141-9.
26. Gonzalez, C. and A. Couve, *The axonal endoplasmic reticulum and protein trafficking: Cellular bootlegging south of the soma*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **27**: p. 23-31.
27. Luarte, A., et al., *The axonal endoplasmic reticulum: One organelle-many functions in development, maintenance, and plasticity*. Dev Neurobiol, 2018. **78**(3): p. 181-208.
28. Rambourg, A. and B. Droz, *Smooth endoplasmic reticulum and axonal transport*. J Neurochem, 1980. **35**(1): p. 16-25.
29. Broadwell, R.D. and A.M. Cataldo, *The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. I. Cell bodies and dendrites*. J Histochem Cytochem, 1983. **31**(9): p. 1077-88.
30. Lindsey, J.D. and M.H. Ellisman, *The neuronal endomembrane system. III. The origins of the axoplasmic reticulum and discrete axonal cisternae at the axon hillock*. J Neurosci, 1985. **5**(12): p. 3135-44.
31. Valenzuela, J.I., M. Jaureguiberry-Bravo and A. Couve, *Neuronal protein trafficking: emerging consequences of endoplasmic reticulum dynamics*. Mol Cell Neurosci, 2011. **48**(4): p. 269-77.
32. Terasaki, M., *Axonal endoplasmic reticulum is very narrow*. J Cell Sci, 2018. **131**(4).
33. Goyal, U. and C. Blackstone, *Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11): p. 2492-8.

34. Renvoise, B. and C. Blackstone, *Emerging themes of ER organization in the development and maintenance of axons*. *Curr Opin Neurobiol*, 2010. **20**(5): p. 531-7.
35. Spillane, M., et al., *Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis*. *Cell Rep*, 2013. **5**(6): p. 1564-75.
36. Shim, S.Y., et al., *Protein 600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons*. *J Neurosci*, 2008. **28**(14): p. 3604-14.
37. Vance, J.E., et al., *Biosynthesis of membrane lipids in rat axons*. *J Cell Biol*, 1991. **115**(4): p. 1061-8.
38. Vance, J.E., et al., *Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons*. *J Neurochem*, 1994. **62**(1): p. 329-37.
39. Karten, B., et al., *Neuronal models for studying lipid metabolism and transport*. *Methods*, 2005. **36**(2): p. 117-28.
40. Vance, J.E., R.B. Campenot and D.E. Vance, *The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1486**(1): p. 84-96.
41. Kadowaki, H. and M.A. Grant, *Relationship of membrane phospholipid composition, lactosylceramide molecular species, and the specificity of CMP-N-acetylneuraminase:lactosylceramide alpha 2,3-sialyltransferase to the molecular species composition of GM3 ganglioside*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(6): p. 1274-82.
42. Paoletti, L., et al., *Role of phosphatidylcholine during neuronal differentiation*. *IUBMB Life*, 2011. **63**(9): p. 714-20.
43. Ahmed, M.Y., et al., *A mutation of EPT1 (SELENOI) underlies a new disorder of Kennedy pathway phospholipid biosynthesis*. *Brain*, 2017. **140**(3): p. 547-54.
44. Yu, Q., et al., *Lipidome alterations in human prefrontal cortex during development, aging, and cognitive disorders*. *Mol Psychiatry*, 2018.
45. Gaspar, R., et al., *Ganglioside lipids accelerate alpha-synuclein amyloid formation*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2018.
46. Valadas, J.S., et al., *ER Lipid Defects in Neuropeptidergic Neurons Impair Sleep Patterns in Parkinson's Disease*. *Neuron*, 2018. **98**(6): p. 1155-69 e6.
47. Posse de Chaves, E., et al., *Axonal synthesis of phosphatidylcholine is required for normal axonal growth in rat sympathetic neurons*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(5): p. 913-8.
48. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
49. Glover, J.N. and S.C. Harrison, *Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA*. *Nature*, 1995. **373**(6511): p. 257-61.

50. Raivich, G. and A. Behrens, *Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain*. Prog Neurobiol, 2006. **78**(6): p. 347-63.
51. Szaloki, N., et al., *Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(21): p. 3785-98.
52. Angel, P., et al., *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced gene sequences in human primary diploid fibroblasts and their expression in SV40-transformed fibroblasts*. J Cell Biochem, 1985. **29**(4): p. 351-60.
53. Angel, P., et al., *12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(6): p. 2256-66.
54. Lee, J., et al., *Expression of c-fos, c-myb, and c-myc in human monocytes: correlation with monocytic differentiation*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1542-5.
55. Lamph, W.W., et al., *Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA*. Nature, 1988. **334**(6183): p. 629-31.
56. Ryder, K. and D. Nathans, *Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(22): p. 8464-7.
57. Quantin, B. and R. Breathnach, *Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts*. Nature, 1988. **334**(6182): p. 538-9.
58. Wu, B.Y., et al., *Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 9000-3.
59. Brenner, D.A., K.S. Koch and H.L. Leffert, *Transforming growth factor-alpha stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes*. DNA, 1989. **8**(4): p. 279-85.
60. Brenner, D.A., et al., *Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 661-3.
61. Goldgaber, D., et al., *Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7606-10.
62. Muegge, K., et al., *Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1*. Science, 1989. **246**(4927): p. 249-51.
63. Serfling, E., et al., *Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes*. EMBO J, 1989. **8**(2): p. 465-73.
64. Miller, A.D., T. Curran and I.M. Verma, *c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene*. Cell, 1984. **36**(1): p. 51-60.

65. Hess, J., P. Angel and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
66. Guido, M.E., et al., *Immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides*. J Neurosci Res, 1996. **43**(1): p. 93-8.
67. Bussolino, D.F., et al., *Light affects c-fos expression and phospholipid synthesis in both retinal ganglion cells and photoreceptor cells in an opposite way for each cell type*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **58**(1-2): p. 10-5.
68. Bussolino, D.F., et al., *c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism*. FASEB J, 2001. **15**(3): p. 556-8.
69. Gil, G.A., et al., *c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(4): p. 1881-94.
70. Crespo, P.M., et al., *c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31163-71.
71. Cardozo Gizzi, A.M. and B.L. Caputto, *Mechanistic insights into the nongenomic regulation of phospholipid synthesizing enzymes*. IUBMB Life, 2013. **65**(7): p. 584-92.
72. Caputto, B.L., A.M. Cardozo Gizzi and G.A. Gil, *c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(9): p. 1241-6.
73. Portal, M.M., G.O. Ferrero and B.L. Caputto, *N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation*. Oncogene, 2007. **26**(24): p. 3551-8.
74. Ferrero, G.O., F.N. Velazquez and B.L. Caputto, *The kinase c-Src and the phosphatase TC45 coordinately regulate c-Fos tyrosine phosphorylation and c-Fos phospholipid synthesis activation capacity*. Oncogene, 2012. **31**(28): p. 3381-91.
75. Alfonso Pecchio, A.R., et al., *c-Fos activates and physically interacts with specific enzymes of the pathway of synthesis of polyphosphoinositides*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(24): p. 4716-25.
76. Elangovan, M., et al., *Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy*. Methods, 2003. **29**(1): p. 58-73.
77. Cardozo Gizzi, A.M., et al., *The Catalytic Efficiency of Lipin 1beta Increases by Physically Interacting with the Proto-oncoprotein c-Fos*. J Biol Chem, 2015. **290**(49): p. 29578-92.
78. Keune, W., et al., *Phosphoinositide signalling in the nucleus*. Adv Enzyme Regul, 2011. **51**(1): p. 91-9.

79. Barlow, C.A., R.S. Laishram and R.A. Anderson, *Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(1): p. 25-35.
80. D'Santos, C.S., J.H. Clarke and N. Divecha, *Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signalering in de nucleus*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1436**(1-2): p. 201-32.
81. Bunce, M.W., K. Bergendahl and R.A. Anderson, *Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(5-6): p. 560-9.
82. Gonzales, M.L. and R.A. Anderson, *Nuclear phosphoinositide kinases and inositol phospholipids*. J Cell Biochem, 2006. **97**(2): p. 252-60.
83. Irvine, R.F., *Nuclear lipid signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 349-60.
84. Bultsma, Y., W.J. Keune and N. Divecha, *PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha*. Biochem J, 2010. **430**(2): p. 223-35.
85. Ferrero, G.O., et al., *c-Fos-activated synthesis of nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P(2)] promotes global transcriptional changes*. Biochem J, 2014. **461**(3): p. 521-30.
86. Johnson, R.S., B.M. Spiegelman and V. Papaioannou, *Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene*. Cell, 1992. **71**(4): p. 577-86.
87. Wang, Z.Q., et al., *Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos*. Nature, 1992. **360**(6406): p. 741-5.
88. Velazquez, F.N., et al., *Brain development is impaired in c-fos -/- mice*. Oncotarget, 2015. **6**(19): p. 16883-901.
89. Velazquez, F.N., B.L. Caputto and F.D. Boussin, *c-Fos importance for brain development*. Aging (Albany NY), 2015. **7**(12): p. 1028-9.
90. Caubet, J.F., *c-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(5): p. 2269-72.
91. Hunt, S.P., A. Pini and G. Evan, *Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation*. Nature, 1987. **328**(6131): p. 632-4.
92. Dragunow, M. and H.A. Robertson, *Seizure-inducible c-fos protein(s) in mammalian neurons*. Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(1): p. 5-6.
93. Morgan, J.I., et al., *Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure*. Science, 1987. **237**(4811): p. 192-7.
94. Dragunow, M. and H.A. Robertson, *Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus*. Nature, 1987. **329**(6138): p. 441-2.

95. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2390-400.
96. Dotti, C.G., C.A. Sullivan and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture*. *J Neurosci*, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
97. Govek, E.E., S.E. Newey and L. Van Aelst, *The role of the Rho GTPases in neuronal development*. *Genes Dev*, 2005. **19**(1): p. 1-49.
98. Caceres, A., B. Ye and C.G. Dotti, *Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(4): p. 547-53.
99. Dragunow, M., M.R. Peterson and H.A. Robertson, *Presence of c-fos-like immunoreactivity in the adult rat brain*. *Eur J Pharmacol*, 1987. **135**(1): p. 113-4.
100. Heng, J.I., A. Chariot and L. Nguyen, *Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development*. *Trends Neurosci*, 2010. **33**(1): p. 38-47.
101. Bielas, S., et al., *Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 593-618.
102. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(2): p. 136-44.
103. Nieto Guil, A.F., et al., *IGF-1 receptor regulates dynamic changes in neuronal polarity during cerebral cortical migration*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 7703.
104. Kawauchi, T., *Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 394.
105. Osumi, N. and T. Inoue, *Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation*. *Methods*, 2001. **24**(1): p. 35-42.
106. Tabata, H. and K. Nakajima, *Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex*. *Neuroscience*, 2001. **103**(4): p. 865-72.
107. Saito, T. and N. Nakatsuji, *Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation*. *Dev Biol*, 2001. **240**(1): p. 237-46.
108. dal Maschio, M., et al., *High-performance and site-directed in utero electroporation by a triple-electrode probe*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 960.
109. DeBoer, E.M., et al., *Prenatal deletion of the RNA-binding protein HuD disrupts postnatal cortical circuit maturation and behavior*. *J Neurosci*, 2014. **34**(10): p. 3674-86.
110. Merianda, T.T., et al., *A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **40**(2): p. 128-42.

111. Davis, L., et al., *Protein synthesis within neuronal growth cones*. J Neurosci, 1992. **12**(12): p. 4867-77.
112. Eng, H., K. Lund and R.B. Campenot, *Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures*. J Neurosci, 1999. **19**(1): p. 1-9.
113. Horton, A.C., et al., *Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis*. Neuron, 2005. **48**(5): p. 757-71.
114. Ye, B., et al., *Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway*. Cell, 2007. **130**(4): p. 717-29.
115. Quassollo, G., et al., *A RhoA Signaling Pathway Regulates Dendritic Golgi Outpost Formation*. Curr Biol, 2015. **25**(8): p. 971-82.
116. Fagone, P. and S. Jackowski, *Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 523-32.
117. Kennedy, E.P. and S.B. Weiss, *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides*. J Biol Chem, 1956. **222**(1): p. 193-214.
118. Cornell, R.B. and I.C. Northwood, *Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(9): p. 441-7.
119. Lykidis, A., K.G. Murti and S. Jackowski, *Cloning and characterization of a second human CTP:phosphocholine cytidyltransferase*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 14022-9.
120. Lykidis, A., I. Baburina and S. Jackowski, *Distribution of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) isoforms. Identification of a new CCTbeta splice variant*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26992-7001.
121. Karim, M., P. Jackson and S. Jackowski, *Gene structure, expression and identification of a new CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta isoform*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1633**(1): p. 1-12.
122. Dennis, M.K., S.G. Taneva and R.B. Cornell, *The intrinsically disordered nuclear localization signal and phosphorylation segments distinguish the membrane affinity of two cytidyltransferase isoforms*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12349-60.
123. Carter, J.M., et al., *Phosphatidylcholine biosynthesis via CTP:phosphocholine cytidyltransferase 2 facilitates neurite outgrowth and branching*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 202-12.
124. Strakova, J., et al., *Involvement of CTP:phosphocholine cytidyltransferase-beta2 in axonal phosphatidylcholine synthesis and branching of neurons*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(10): p. 617-25.

125. Lykidis, A., et al., *The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33402-9.
126. Rous, P., *A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells*. J Exp Med, 1911. **13**(4): p. 397-411.
127. Finkel, M.P., B.O. Biskis and P.B. Jinkins, *Virus induction of osteosarcomas in mice*. Science, 1966. **151**(3711): p. 698-701.
128. Curran, T., et al., *Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(5): p. 914-21.
129. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
130. Alfonso-Gonzalez, C. and J.R. Riesgo-Escovar, *Fos metamorphoses: Lessons from mutants in model organisms*. Mech Dev, 2018.
131. Curran, T., et al., *FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA*. J Virol, 1982. **44**(2): p. 674-82.
132. Curran, T. and N.M. Teich, *Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus*. Virology, 1982. **116**(1): p. 221-35.
133. Rauscher, F.J., 3rd, et al., *Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1010-6.
134. Lee, W., et al., *Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40*. Nature, 1987. **325**(6102): p. 368-72.
135. Lee, W., P. Mitchell and R. Tjian, *Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements*. Cell, 1987. **49**(6): p. 741-52.
136. Curran, T. and B.R. Franza, Jr., *Fos and Jun: the AP-1 connection*. Cell, 1988. **55**(3): p. 395-7.
137. Angel, P., et al., *Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor*. Cell, 1987. **49**(6): p. 729-39.
138. Herdegen, T. and V. Waetzig, *AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2424-37.
139. Salehi, M., et al., *Fluorescence in situ hybridization analysis of the fos/jun ratio in the ageing brain*. Mech Ageing Dev, 1999. **107**(1): p. 61-71.
140. Paratcha, G., et al., *Experience-dependent decrease in synaptically localized Fra-1*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **78**(1-2): p. 120-30.

141. Rosen, J.B., et al., *Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning*. Brain Res, 1998. **796**(1-2): p. 132-42.
142. Minatohara, K., M. Akiyoshi and H. Okuno, *Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace*. Front Mol Neurosci, 2015. **8**: p. 78.
143. Grimm, R. and W. Tischmeyer, *Complex patterns of immediate early gene induction in rat brain following brightness discrimination training and pseudotraining*. Behav Brain Res, 1997. **84**(1-2): p. 109-16.
144. Wollnik, F., et al., *Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(3): p. 388-93.
145. Matsuo, K., et al., *Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 184-7.
146. Fleischmann, A., et al., *Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice*. Genes Dev, 2000. **14**(21): p. 2695-700.
147. Motrich, R.D., G.M. Castro and B.L. Caputto, *Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53211.
148. Rawat, V., et al., *c-Fos Protects Neurons Through a Noncanonical Mechanism Involving HDAC3 Interaction: Identification of a 21-Amino Acid Fragment with Neuroprotective Activity*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1165-80.
149. Zhang, J., et al., *c-fos regulates neuronal excitability and survival*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 416-20.
150. Morgan, J.I. and T. Curran, *Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons*. Cell Calcium, 1988. **9**(5-6): p. 303-11.
151. Sagar, S.M., F.R. Sharp and T. Curran, *Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level*. Science, 1988. **240**(4857): p. 1328-31.
152. Gallo, F.T., et al., *Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc*. Front Behav Neurosci, 2018. **12**: p. 79.
153. Fleischmann, A., et al., *Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS*. J Neurosci, 2003. **23**(27): p. 9116-22.
154. Guzowski, J.F., *Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches*. Hippocampus, 2002. **12**(1): p. 86-104.

155. Kemp, A., W. Tischmeyer and D. Manahan-Vaughan, *Learning-facilitated long-term depression requires activation of the immediate early gene, c-fos, and is transcription dependent*. Behav Brain Res, 2013. **254**: p. 83-91.
156. Wenzel, A., et al., *Fra-1 substitutes for c-Fos in AP-1-mediated signal transduction in retinal apoptosis*. J Neurochem, 2002. **80**(6): p. 1089-94.
157. Tompa, P., *The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins*. FEBS Lett, 2005. **579**(15): p. 3346-54.
158. Dyson, H.J. and P.E. Wright, *Intrinsically unstructured proteins and their functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 197-208.
159. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Linking folding and binding*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(1): p. 31-8.
160. Borioli, G.A., B.L. Caputto and B. Maggio, *c-Fos is surface active and interacts differentially with phospholipid monolayers*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 9-13.
161. Gaggiotti, M.C., et al., *The immediate-early oncoproteins Fra-1, c-Fos, and c-Jun have distinguishable surface behavior and interactions with phospholipids*. Biopolymers, 2009. **91**(9): p. 710-8.
162. Giraud, C.G. and H.J. Maccioni, *Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40262-71.
163. Kellokumpu, S., A. Hassinen and T. Glumoff, *Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: long-known, prevalent but still unrecognized*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(2): p. 305-25.
164. Csaki, L.S. and K. Reue, *Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins*. Annu Rev Nutr, 2010. **30**: p. 257-72.
165. Cornell, R.B. and N.D. Ridgway, *CTP:phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis*. Prog Lipid Res, 2015. **59**: p. 147-71.
166. Cornell, R.B., *Membrane lipid compositional sensing by the inducible amphipathic helix of CCT*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1861**(8 Pt B): p. 847-61.
167. Huang, H.K., et al., *The membrane-binding domain of an amphitropic enzyme suppresses catalysis by contact with an amphipathic helix flanking its active site*. J Mol Biol, 2013. **425**(9): p. 1546-64.
168. Chong, S.S., et al., *The curvature sensitivity of a membrane-binding amphipathic helix can be modulated by the charge on a flanking region*. Biochemistry, 2014. **53**(3): p. 450-61.

169. Carter, J.M., et al., *Enhanced expression and activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta2 during neurite outgrowth*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44988-94.
170. Marcucci, H., et al., *Phosphatidylcholine biosynthesis during neuronal differentiation and its role in cell fate determination*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25382-93.
171. Banker, G.A. and W.M. Cowan, *Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture*. Brain Res, 1977. **126**(3): p. 397-42.
172. Gordon, G.W., et al., *Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy*. Biophys J, 1998. **74**(5): p. 2702-13.