



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

# **Efectos de la señalización de la Neurogenina3 y su localización intracelular en el desarrollo de las neuronas del hipocampo.**

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología Molecular  
realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección de la  
Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo

V<sup>o</sup> Bueno de la Directora

V<sup>o</sup> Bueno de la Tutora

M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo

Elena Bogónez

La interesada

Julia M. Simón Martín

Madrid 2011



M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo. Doctora en Ciencias Químicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que Dña. Julia M. Simón Martín Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

***“Efectos de la señalización de la Neurogenina 3 y su localización intracelular en el desarrollo de las neuronas del hipocampo.”***

Considero que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a 25 de Agosto de 2011.

Fdo. M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo

Científico Titular CSIC



Hace 5 años, en una galaxia muy cercana, empezó mi primera aventura científica, así que, creo que va siendo hora de que tenga un final feliz. Final que por otra parte veía cerca y a la vez inalcanzable, menos mal que no he estado sola sino que muy bien acompañada:

Por Ángeles, jefa y madrina científica, que ha estado ahí para enseñarme, animarme, reprenderme, pero siempre con libertad para equivocarme y aprender lo duro y gratificante que es hacer ciencia, aunque pocos lo valoren. Me ha dado mucha fuerza verte casi tan ilusionada como yo con mi tesis.

Por Luis Miguel, con paciencia infinita, que me ha dado la oportunidad de estar en un laboratorio envidiable, del que nadie quiere irse, y que no ha tenido más que palabras amables y sabias.

Por los excompis: Marta: la chica más trabajadora que conozco, doctora por méritos propios. Pedro: el mayor culo inquieto de todos, “zalerozo” doctor. Josué: la tesis más brillante en la que he estado, una que era mozuela e impresionable. Silvi: sus despistes con el microondas pasarán de generación en generación. George: chico serio hasta que llegamos a la “jump the FENS”. Miguel: el inventor del “portuñol”, quisquilloso con los resultados y becario con turno de noche. Amaya: ha sido un honor heredar el sitio de la reina del WB y la chica que ve la vida con la ilusión e ingenuidad de una niña pequeña. Daniela: italiana con acento ruso, maestra del criostato, con la que he compartido momentos imborrables e impagables, me descubrió la gianduja, ¡qué ilusión tenerte en mi tesis!. Eze: han pasado otros chicos por el Coi, Joep, Hendrik, Ronie, Juan “pelota de trapo”, y ninguno ha aguantado mucho, pero éste ha sido el único con valor para repetir, y eso que es el blanco perfecto de una “guacha” como yo, una pena que te pierdas la fiesta. Carmen: mi asturiana, simpática, detallista y excelente científica, junto con Isa R.P. hubo un tiempo en que éramos invencibles. Marie: la francesa más españolizada, compartimos la pasión por Egipto y nos enfrentamos juntas al mayor peligro de los bares madrileños: los viejos verdes; te debo una visita. Anita: mi compi de suite, mi conciencia en los congresos, la constancia personalizada, maestra de origami, autora de la maquetación de tesis que me ha inspirado y lianta como ninguna para hacer peñas del huevo. Olga: la más espiritual, una pena que te tuvieras que ir justo cuando empezaba a pillarte el tranquilo, gracias por esas tardes de desahogo en el “rinconcito”. Sandra: siempre dispuesta a aprender y ayudar sin esperar nada a cambio, lástima que nos saliera “rana”. Irene: récord de IC y mejor alumna de ese verano, a ver, con Ronie de contrincante ;p. Betta: becaria meticulosa dónde las haya, buena compañera y reina del mohito.

Por las compis actuales: María M.: aventurera de vocación y encantadora de cultivos, sé que soy una egoísta pero no te jubiles nunca. Paloma: la sargento de aluminio, porque parece dura pero en el fondo no lo es tanto, y lo que mola regañar..., gracias por tus consejos extra laborales. Cris: la chica “¡qué genial!”, el lado fashion de la ciencia, decoradora oficial del labo y la mayor lianta del Cajal. Isa C. y Nat: inseparables, creativas, manifestantes profesionales, nunca sabes con qué te van a sorprender, sobre todo si les dejas escoger música. Anita: la becaria con más arte, curranta infatigable, con “alma de pollo” y pequeñita pero matona. Ale: la más despistada, miedo me da cuando empiece en el CAB, sufridora de incontables sustillos. Ali: la nueva, una loca más para la colección “y yo que me alegro”, no hay quién se aburra contigo ni quién se concentre para escribir la discusión ;p. Isa R.P.: la “heavy pija”, a la que he intentado llevar por el buen camino pero se perturba con facilidad, no conoce el sentido del ridículo ni falta que hace porque nos habríamos perdido fotos impagables, seguidora a pies juntillas de mis planes más descabellados, como debe ser. María S.: la más acelerá y vocinglera, compi de “anti-peña” y futura socia de catering, la reina de los culos inquietos, si está sin hacer nada colapsa, da igual que esté en dos bandas, en teatro, con la oposición y con el doctorado..., que siempre le queda tiempo para gansear en el labo, te he echado de menos estos meses en Alemania. Yolanda: “ay paya”, buena consejera, trabajadora imparable incluso embarazada de Braisiño, la más gansa de todas, ahí dónde la veis, una postdoc tan seria y sofisticada, fue la inspiración del “baile del pincel en la boca”, me siento afortunada por compartir estos años contigo y por demostrarme que el trabajo bien hecho no está reñido con la diversión. Jolín: “¿está el enemigo?” ya sé que soy una “bobocha e hinchahuevos”, mi argentina preferida, con poroto incluido, tan divina, casi tan borde como yo, experta en clonaciones y desastrosa con la laca de uñas, es un placer haber pasado tantos momentos especiales contigo, ¡viva estar “al pedo”! Gracias por enseñarme lo importante que es sentirse satisfecho con uno

mismo y por estar a años luz de ser una científico mediocre, aunque pongas un océano de por medio no te librarás de mí fácilmente. Estefanía: casi más lechuza que yo, “cagüen la cría”, la gran incorporación de los últimos años, “es que es tan alucinante”, asesora cromática de la tesis “más mona” y padawan destacada en transformaciones “common baby light my fire!”:p. Estoy feliz por haber coincidido contigo y por tantos ratos memorables dentro y fuera del labo, no sé lo que voy a hacer con mi vida tras la tesis pero espero tenerte cerca, ¡Gora Tufi! Salamanca va a ser legen...

Por mis compis de doctorado Leo: despistado y generoso a partes iguales y Paty: compañera excelente y gurú del word, a las bioquímicas recién llegadas al Cajal Gema “la espabilada” y compi de fatigas en el antiguo B14, Eli “la desgracia”, increíble ¿verdad? y Ale “la responsable” ánimo que todo llega, por esos ratos de risas en mis primeras sobremesas del Cajal. Por Cris “gomaespuminglis” compi de la aventura yankee y celestina de UCP2 KO. La segregadora de “estupidina” Vir, digna de mención porque no olvida nunca un cumple y por interesarse siempre.

Por toda la gente del Cajal que siempre ha tenido una sonrisa y me ha echado una mano cuando la necesitaba, servicio de microscopía, Silvia, Concha, Fide, Ángel, Joaquín...y las barbacoas ;)

Aunque no lo parezca hay vida después del labo, y si hay vida, hay esperanza, y nunca podré perderla si tengo amigos como Ire “la suiza” y Sergio “Chuache”. Sólo se me ocurren cosas buenas, esto de la tesis me ha afectado a la cabeza más de lo que pensaba, y es que serán dos, pero son los mejores amigos que podría desear, siempre están cuando los necesitas para apoyarte, aconsejarte, animarte, sacarte una sonrisa con un chiste o un lenguatrabas, chateando al otro lado del charco a horas intempestivas, aguantando la música satánica y celestial o lo que haga falta. Esos ratos en Santoto, las quedadas gastronómicas, las esperas heladeras, los paseos sin destino, no son de los que se olvidan. Mil gracias, intentaré estar a la altura, empezaré mejorando mis chistacos.

El que no ha tenido más remedio que acompañarme (una, que es irresistible) y espero que siga haciéndolo durante mucho más tiempo es Marcos: “que guerrita me das” sobre todo este verano ;) Ha hecho de editor, algo obligado, pero que ya lo quisiera Stephen King, de técnico informático, de creador de la figura3, de cocinillas, ha aguantado mi modo cansino, las derrotas con el frisbee y voldo ;p, y además, ha desplegado sus artes de novio, cosa que no se le da mal del todo, es el único con poderes para cambiar mis bufidos por sonrisas, también tengo mis momentos buenos pero esos no requieren esfuerzo. Estos años habrían sido mucho más duros sin ti. Ahora viene lo mejor.

Por mi familia, a mis abuel@s, ti@s y prim@s por sentirse tan orgullos@s de mí como yo de ell@s.

A mis padres “cansinitos”, que me han dado todo lo que podría pedir, incluido mi polillo, para que sólo me preocupara de hacer la tesis y de ser feliz, que no es poco. De mi padre, experimentado roncadador, he heredado la tranquilidad, la cabezonería y el gusto por la lectura y de mi madre, experta en comunicaciones (incluso transatlánticas), los rizos, y ser detallista y cariñosa, gracias por aguantar mis enfados, gansadas e “indignaciones” y por compartir mis alegrías.

A mi mamita Jovi, la mejor maestra de todas, por ser la que mejor me entendía, mi refugio y consejo siempre que lo necesitaba, no sabes lo que me entristece que no estés conmigo, no hay día que no te eche de menos.

A mi hermana favorita Noelia, quitapenas sin par, la chica a la que todo se le da bien, vamos, una artista, músico sublime (eso sí, un poco vaga), a la que quiero más que nada en el mundo y que tiene la mención más honorífica por estar siempre de 10 cuando la necesito, por sus masajitos, por su paciencia como estilista, por apoyarme aunque le quite la razón y se frustre y porque lleva aguantándome toda su vida y lo que le queda.

### **Gracias a todos**

Espero que no se os hayan quitado las ganas de seguir leyendo porque me ha quedado una tesis preciosísima, ya sabéis mi lema: “las cosas o se hacen bien o no se hacen” ;).

Madrid, Agosto de 2011.

**La felicidad no consiste en todo  
tener, si no en saber sacar,  
lo bueno que te dan.**

**(El atrapasueños, Mägo de Oz).**

*A mi sol y estrellas que no pueden ser más generosos*

Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-05629), de la Comunidad de Madrid (CCG08-CSIC/SAL-3617) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-02950-C03-01).

Julia M. Simón Martín ha recibido financiación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, dentro del Programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional (I3P/2006).



## ÍNDICE

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

11

#### 1. EL HIPOCAMPO

13

1.1. Definición 13

1.2. Estructura 13

1.3. Función 15

1.3.1. *El hipocampo y la memoria* 16

1.4. Desarrollo hipocampal 17

#### 2. NEUROPLASTICIDAD

17

#### 3. DESARROLLO DE LAS NEURONAS DE HIPOCAMPO

18

3.1. Crecimiento y morfología dendríticos 19

3.2. Citoesqueleto 20

3.3. Desarrollo neuronal y citoesqueleto 21

#### 4. FORMINAS

22

#### 5. NEUROGENINA3

24

5.1. Definición 24

5.2. Función 25

5.3. Expresión intracelular 26

5.4. Regulación 26

#### 6. MITOCONDRIA

28

6.1. Estructura 28

6.2. Función 28

#### 7. UCP2

29

7.1. Función 30

### OBJETIVOS

33

OBJETIVO GENERAL 33

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

### MATERIALES Y MÉTODOS

35

#### 1. ANIMALES

37

#### 2. CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

37

#### 3. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES VIRALES SINDBIS

38

3.1. Clonación de la Neurogenina3 en el plásmido viral pSinRep5 38

3.2. Producción de las partículas virales 38

4. CLONACIÓN DE LAS SEÑALES DE EXPORTACIÓN NUCLEAR PRESENTES EN LA NEUROGENINA 3	39
4.1. Mutagénesis puntual dirigida	39
5. siARN	41
6. TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO	42
6.1. Transfección	42
6.2. Infección viral	42
6.3. Nucleofección	42
6.4. Tratamiento con Leptomycin B	43
6.5. Tratamiento con drogas alteradoras del citoesqueleto	43
6.5.1. <i>Nocodazol</i>	43
6.5.2. <i>Citocalasina D</i>	43
6.5.3. <i>Taxol</i>	43
6.6. Tratamiento con Genipina	43
7. INMUNOCITOQUÍMICA	44
7.1. Otros marcajes	46
8. DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	46
9. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	46
10. INMUNOHISTOQUÍMICA	48
11. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	48
12. ENSAYO DE ASOCIACIÓN A MICROTÚBULOS	49
13. INMUNOPRECIPITACIÓN	50
14. INMUNOBLOT	51
15. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	52
15.1. Extracción del ARN total	52
15.2. Síntesis del ADN copia	52
15.3. PCR cuantitativa a tiempo real	52
16. MICROARRAYS	53
<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
1. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA NGN3 Y SU IMPLICACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DEL HIPOCAMPO	57
1.1 DISTRIBUCIÓN DE LA NGN3	57
1.1.1. Patrón de expresión de la Ngn3 en el hipocampo de cerebro de ratón	57
1.1.2. Patrón de expresión de la Ngn3 durante el desarrollo del hipocampo de ratón	58

1.1.3. Expresión de <i>ngn3</i> y <i>HES1</i> durante el desarrollo del cerebro de ratón y de neuronas de hipocampo en cultivo	60
1.1.4. La distribución subcelular de la Ngn3 depende del desarrollo neuronal	62
1.2. RUTA INTRACELULAR DE LA NGN3	63
1.2.1. Translocación de la Ngn3 del núcleo al citoplasma	63
1.2.2. La exportación nuclear de la Ngn3 depende de la exportina CRM1	65
1.2.3. La inhibición de CRM1 por la LMB produce alteraciones en el desarrollo de las neuronas hipocampales	66
1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA DE EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA NGN3	66
1.3.1. Mutaciones puntuales sobre la Ile11 y la Leu125 no afectan a la exportación de neurogenina3	66
1.3.2. Clonación de las secuencias de exportación nuclear de NGN3	67
1.3.3. La leucina 135 es el aminoácido clave para la exportación nuclear de EGFP-NES2	70
1.3.4. Efectos de la mutación L135A de Ngn3 en la morfología neuronal	70
1.4. FUNCIÓN CITOPLASMÁTICA DE LA NGN3	72
1.4.1. La Ngn3 colocaliza con los microtúbulos pero no con los filamentos de actina en las neuronas del hipocampo	72
1.4.2. La Ngn3 protege a los MTs de la despolimerización	74
2. ESTUDIO DE LOS GENES CONTROLADOS POR LA NGN3	75
2.1. ANÁLISIS DE MICROARRAYS	75
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN NGN3-FMN1	76
2.2.1. La Ngn3 regula la expresión génica de <i>fmn1</i>	76
2.2.2. La sobreexpresión de <i>fmn1</i> cambia la morfología dendrítica de las neuronas del hipocampo	77
2.2.3. La sobreexpresión de <i>fmn1</i> aumenta el número de sinapsis glutamatérgicas sin modificar el número de terminales inhibitorios	79
2.2.4. La formina1 media los efectos de la Ngn3 sobre la morfología y aporte sináptico en neuronas de hipocampo en cultivo	79
2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>fmn1</i> EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO DE RATÓN	82
3. RELACIÓN ENTRE UCP2 Y NGN3 Y SU IMPORTANCIA DURANTE EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO	83

3.1. EFECTOS DE LA CARENCIA DE UCP2 EN LA EXPRESIÓN DE <i>ngn3</i> EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO	83
3.2. EXPRESIÓN DE <i>UCP2</i> DURANTE EL DESARROLLO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO	84
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FUNCIONES DE UCP2 EN NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO	85
3.3.1. Efectos de la inhibición de la UCP2 sobre la expresión del ARNm de <i>UCP2</i> y de <i>ngn3</i> durante el desarrollo de las neuronas del hipocampo	85
3.3.2. Efectos de la inhibición de la UCP2 sobre la densidad neuronal	86
3.3.3. Efectos de la inhibición de la UCP2 sobre la diferenciación de las neuronas de hipocampo en cultivo	86
3.3.3.1. <i>Efecto de la inhibición de la UCP2 sobre el tamaño neuronal</i>	86
3.3.3.2. <i>La inhibición de la UCP2 modifica el número de neuritas primarias</i>	87
3.3.3.3. <i>Efecto de la inhibición de la UCP2 sobre la aportación sináptica neuronal</i>	87
3.3.4. UCP2 y Ngn3 modifican los niveles de ROS en neuronas de hipocampo	91
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>





**ABREVIATURAS**

**A:** Alanina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia

**ADP:** Adenosín difosfato

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**Arp:** Actin-Related Proteins

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BHK:** Baby hamster kidney

**bHLH:** basic helix-loop-helix

**CA:** Cuerno de Amón

**CRM1:** Cromosoma region maintenance 1

**DAPI:** Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DG:** Giro dentado

**DHE:** Dihidroetidio

**DIV:** Días *in vitro*

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**E:** Día embrionario

**EGFP:** Enhanced green fluorescence protein

**FH:** Dominio de homologia de formina

***fmn1*:** Gen formina 1

**Fmn1:** proteína formina 1

**G:** Genipina

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico

**GAPDH:** Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

**GDP:** Guanosín difosfato

**GFP:** Green fluorescence protein

**GTP:** Guanosín trifosfato

**H<sup>+</sup>:** Protones

**HBSS:** Hank's Balanced Salt Solution

**HES:** Hairy/Enhancer-of-split

**I:** Isoleucina

**KO:** Knock out

**L:** Leucina

**LMB:** Leptomicina B

**MAP:** Proteína asociada a los microtúbulos

**NAD<sup>+</sup>, NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido

***ngn3:*** Gen neurogenina 3

**Ngn3:** Proteína neurogenina 3

**NES:** Secuencia de exportación nuclear

**NGF:** Factor de crecimiento neuronal

**NLS:** Secuencia de localización nuclear

**NZ:** Nocodazol

**MTs:** Microtúbulos

**P:** Dias postnatales

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehído

**Pi:** Fosfato inorgánico

**PL:** Capa piramidal

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**Sch:** Colaterales de Schaffer

**SDS:** Dodecilo sulfato sal sódica

**siARN:** ARN de interferencia

**SNC:** Sistema nervioso central

**Sy38:** Sinaptofisina I

**TA:** Temperatura ambiente

**TBS:** Tampón tris salino

**TTBS:** Tampón tris salino con Tween 20

**Tub:** Tubulina

**UCP2:** Uncoupling protein 2

***UCP2:*** Gen uncoupling protein 2

**VGAT:** Transportador de vesículas de GABA

**VGluT1:** Transportador de vesículas de glutamato



**ABSTRACT**

The proneural gene *Ngn3* is expressed in the pyramidal layer of all hippocampal areas and in the granule cell layer of the dentate gyrus. Our studies showed that Ngn3 is localized not only in the nucleus, as expected since it is a transcription factor, but also in the cytoplasm. Time course experiments with neurons infected with a virus expressing myc-Ngn3, show that protein is first localized into the nucleus and then at the cytoplasm. The subcellular localization analysis of Ngn3 in the stages of development of that neurons indicated that endogenous Ngn3 is mostly cytoplasmic at stages of dendritogenesis and treatment with LMB, induces an accumulation of Ngn3 into the nucleus and a decrease of the number of dendrites, thus indicating a role of the Ngn3 in the dendritogenesis events and that its nuclear exportation is mediated by CRM1 since Ngn3 has a specific NES in its sequence. Mutation of an essential leucine residue in this NES motif to alanine (L135A) resulted in a decrease of the number of dendrites and synapses. In the cytoplasm Ngn3 is associated to microtubules and prevented their depolymerisation. Our goal deals with the study of the signalling pathway triggered by Ngn3 which produces dendrite and synaptic changes. In this work we evaluated the influence of neurogenin 3 in formin 1 expression and the participation of formin 1 in hippocampal neuron differentiation. Cultured neurons infected with a Sindbis virus that overexpresses neurogenin 3 showed an increase in the formin 1 mRNA and protein expression and the overexpression of formin 1 increased the number of primary dendrites. These effects on gene expression and dendrite formation were counteracted by expression of formin 1-siRNAs. Furthermore, neurons coexpressing neurogenin 3 and formin 1-siRNAs showed less dendrites than those overexpressing neurogenin 3 only. Altogether, these results suggest that neurogenin 3, as a transcription factor, controls formin 1 expression, and that formin 1 promotes dendritogenesis, by its interaction with the neural cytoskeleton, in cultured hippocampal neurons. This study shows that in mice, chemical inhibition or genetic ablation of UCP2 leads to diminished neuronal number and size, dendritic growth and synaptogenesis suggesting a critical role for this mitochondrial protein in the proper development of hippocampal neurons and circuits.



# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudia la localización subcelular de la neurogenina 3 (Ngn3) durante el desarrollo del hipocampo de ratón así como los efectos de la señalización de dicha proteína en la morfología dendrítica y sináptica de las neuronas y en la activación de genes específicos de la regulación citoesquelética. Asimismo se explora la posible asociación entre la proteína mitocondrial UCP2 (uncoupling protein 2) y la Ngn3 en el desarrollo hipocampal.

### 1. EL HIPOCAMPO

#### 1.1. Definición

Es una de las principales estructuras del cerebro en mamíferos y su nombre, que procede del griego *hippos* que significa caballo y *kampos*, del monstruo marino *Campe*, le fue dado por el anatomista Giulio Cesare Aranzio por su semejanza con el caballito de mar o hipocampo, aunque este parecido se encuentra sólo en primates y en ratones tiene forma de plátano. Es una estructura pareada, con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales, localizada en el interior de la parte medial o interna del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical.

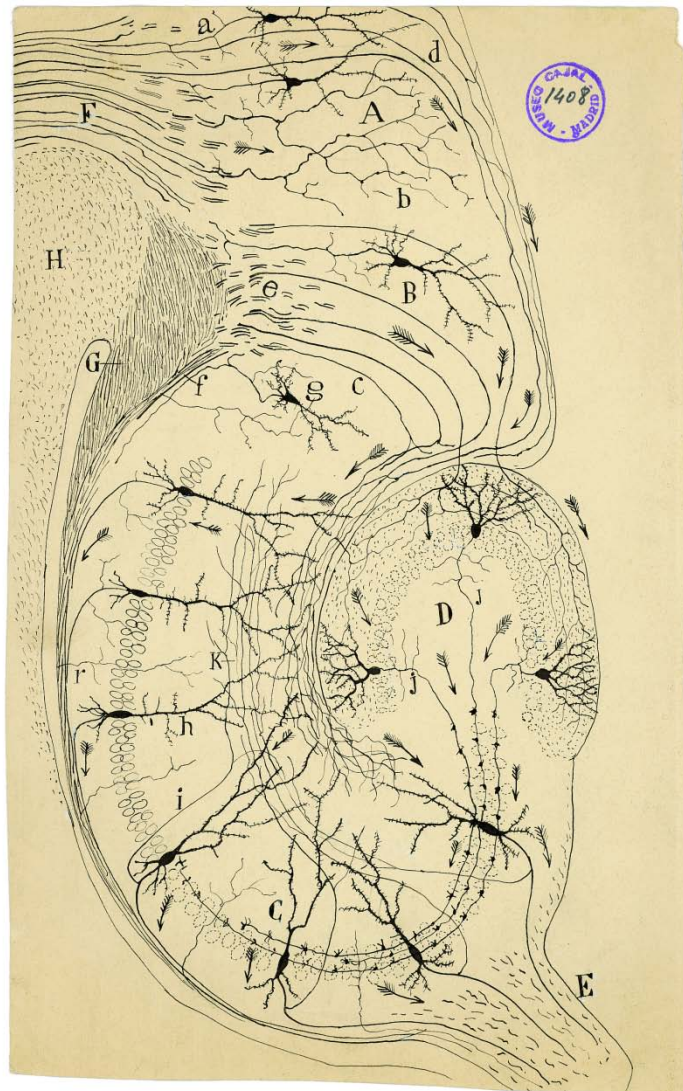
#### 1.2. Estructura

La formación hipocampal pertenece al sistema límbico y consta de seis regiones citoarquitectónicas que incluyen el giro dentado, el hipocampo, propiamente dicho, subdividido en tres campos: CA1, CA2 y CA3, el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal. En el sistema límbico existen distintas estructuras implicadas en los procesos de aprendizaje, memoria, emociones, etc. (Geinisman, 2000).

Dentro de la formación hipocampal existen algunas conexiones unidireccionales que merecen ser destacadas, ya que son extremadamente atípicas entre las conexiones cortico-corticales. La corteza entorrinal inerva el giro dentado a través de la vía perforante, y las células

de la capa granular del giro dentado inervan a través de las fibras musgosas en el campo CA3 del hipocampo. Además, se observa otro patrón unidireccional similar en las conexiones del campo CA3 al CA1 vía las colaterales de Schaffer, y desde el campo CA1 al subiculum. En el hipocampo propiamente dicho la organización celular es laminar. La principal capa celular es la de las neuronas piramidales. Inmediatamente debajo de la capa piramidal está el *Stratum oriens*, una fina capa con pocas células, y por debajo de éste, está el *alveus*, que contiene los axones de las neuronas del hipocampo. Por encima de la capa piramidal de CA3 se encuentra una pequeña capa llamada *Stratum lucidum*, ocupada por los axones de las fibras musgosas del giro dentado. Por encima del *Stratum lucidum* en CA3 y por encima de la capa piramidal en CA1 y CA2, se encuentra el *Stratum radiatum*, que puede definirse como la región supra-piramidal donde se localizan las conexiones de CA3 a CA3 y de CA3 a CA1 por las colaterales de Schaffer. La parte más superficial del hipocampo recibe el nombre de *Stratum lacunosum-moleculare* y es aquí donde finalizan su recorrido las fibras de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal (Fig. 1).

Las células del hipocampo, propiamente dicho, son mayoritariamente las neuronas piramidales de la capa piramidal. Estas células tienen un árbol dendrítico basal que se extiende por el *Stratum oriens* y otro árbol dendrítico apical en el *Stratum lacunosum-moleculare*. Sin embargo, en la capa piramidal hay también una pequeña población de células en cesto. Estas neuronas también tienen un árbol dendrítico basal y otro apical, aunque apenas tienen espinas dendríticas, y su axón transcurre transversalmente desde el soma y forma un plexo que inerva los cuerpos celulares o somas de las neuronas piramidales.



**Figura 1. Dibujo esquemático de la estructura y conexiones del hipocampo.** A ganglio del polo occipital, B subículo, C asta de Ammón, D fascia dentada, E fimbria, F cíngulo, G paquete angular cruzado, H cuerpo calloso, a axones que penetran en el cíngulo, b fibras cingulares que terminan en el foco del polo occipital, c fibras perforantes esfeno-amónicas, d fibras perforantes cingulares, e plano de las fibras esfeno-amónicas superiores, g células del subículo, h células piramidales de la región superior del asta de Ammón, i colaterales ascendentes de las células piramidales grandes, j axón de una célula granular, r, colaterales de las fibras del estrato *alveus*. Legado Cajal. Instituto Cajal. CSIC, Madrid.

### 1.3. Función

Históricamente se pensaba que el hipocampo era esencial en respuestas olfativas ya que tiene su origen en una estructura del cerebro de los vertebrados denominada palio y se creía que el

hipocampo recibía aferencias directas del bulbo olfatorio, hoy en día existe interés en lo referente al papel del hipocampo sobre la memoria de los olores (Eichenbaum y cols., 1991; Davis, 2001).

Las funciones que se le atribuyen al hipocampo tienen que ver con la memoria y la percepción espacial, debido a que sus neuronas presentan actividad relacionada con el entorno en el que se encuentra el animal en estudio, habiéndose definido un mapa cognitivo del hipocampo (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Jacobs, 2003; Jacobs y Schenk, 2003). También se le relaciona con la inhibición de la conducta (Nadel y cols., 1975), dado que animales con lesiones hipocámpales son hiperactivos y presentan problemas para inhibir respuestas previamente aprendidas, aunque actualmente es la teoría menos aceptada.

### ***1.3.1. El hipocampo y la memoria***

En un principio, las investigaciones sobre el papel del hipocampo en la memoria se debieron al efecto inesperado de amnesia causado en un paciente epiléptico sometido a la extirpación quirúrgica del hipocampo, así como de las estructuras mediales temporales vecinas (Scoville y Milner, 1957). Los trabajos realizados demuestran que, tanto en animales como en humanos, el hipocampo y otras estructuras del lóbulo temporal ventromedial son necesarios para la memoria y el aprendizaje, ya que la destrucción bilateral de estas áreas está asociada a una profunda pérdida de la memoria que afecta a cualquier tipo de aprendizaje (Hyman y cols., 1984).

El hipocampo juega un papel central en la consolidación de la memoria, es decir, en la conversión de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo que se almacena en la corteza. Este hecho está avalado por estudios moleculares que indican que tras el aprendizaje inicial, es necesaria la reactivación de la memoria hipocámpal para la plasticidad cortical. El hipocampo es por tanto una estructura esencial para la memoria, pero dispensable una vez que ésta se ha consolidado en la corteza. La memoria a largo plazo se plasma, a nivel molecular, en forma de cambios en la estructura sináptica (Wittenberg y Tsien, 2002) siendo el receptor NMDA una molécula crucial en la plasticidad sináptica y en la formación de la memoria. Cuando las



neuronas de CA1 carecen de dicho receptor, la formación de memoria a largo plazo se ve gravemente afectada (Shimizu y cols., 2000).

#### **1.4. Desarrollo hipocampal**

Los hemisferios cerebrales comienzan a formarse en humanos a partir de la quinta semana del desarrollo embrionario, en forma de evaginaciones a cada lado de la pared externa del prosencéfalo. Hacia la segunda mitad del segundo mes estas evaginaciones comienzan a aumentar de tamaño y en el tercer mes las evaginaciones sobresalen por encima del diencefalo de tal manera que ya son identificables como los hemisferios cerebrales.

Esta nueva región de los hemisferios cerebrales está unida al techo del diencefalo por las comisuras del cuerpo calloso. Es muy delgada porque posee una sola capa de células endimarias cubiertas por mesénquima vascularizado que dará origen al plexo coroideo. El plexo coroideo sobresale en el ventrículo lateral siguiendo la fisura coroidea y por encima de esta fisura se forma el hipocampo.

En el pasado estaba ampliamente aceptado el hecho de que el desarrollo de nuevas neuronas (neurogénesis) en el cerebro de mamíferos estaba limitado a las etapas iniciales del desarrollo y terminaba con la pubertad. Sin embargo, el desarrollo de neuronas en la región del hipocampo, concretamente en el giro dentado, continúa durante toda la edad adulta (Rakic, 1985) siendo una característica fundamental en la implicación del hipocampo en las funciones de aprendizaje y memoria.

## **2. NEUROPLASTICIDAD**

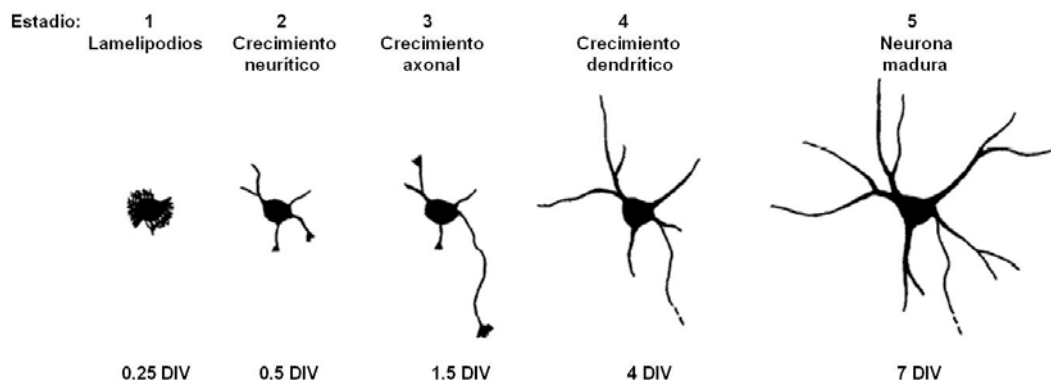
La neuroplasticidad o plasticidad neuronal es uno de los principales sujetos de investigación en neurobiología. En sentido amplio, y sin considerar aspectos del desarrollo neuronal tardío, se entiende por neuroplasticidad la capacidad de las neuronas de cambiar su morfología tanto somática como dendrítica así como sus conexiones con otras neuronas, de tal forma que las

sinapsis pueden sufrir modificaciones a nivel cuantitativo, cualitativo, topográfico y estructural. Siendo así responsable la neuroplasticidad de la capacidad de adaptación al medio ya que estos cambios intervendrían en procesos de aprendizaje, memoria y conducta (Cooke y Bliss, 2006; Garcia-Segura, 2009).

Existen dos grandes clases de mecanismos que determinan la neuroplasticidad: procesos inductivos por parte de una neurona aferente y dependientes de la actividad sináptica y procesos parcialmente autónomos de la propia neurona. Entre estos últimos se encontrarían las cascadas de señalización intracelulares que conllevan cambios transcripcionales y cuyo resultado final es la transformación morfológica de la célula (Bear y cols., 2008).

### **3. DESARROLLO DE LAS NEURONAS DE HIPOCAMPO**

El desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo presenta cinco estadios morfológicos (Fig. 2) bien diferenciados (Dotti y cols., 1988). En primer lugar las neuronas, aun sin polarizar, extienden lamelipodios ricos en actina que se convierten en cortas neuritas indiferenciadas (estadios 1 y 2, correspondientes a 0.25 y 0.5 DIV). Una de esas neuritas, que se diferenciará en axón, se elonga rápidamente generando la primera señal morfológica de polarización neuronal (estadio 3; 1.5 DIV). Las neuritas restantes se elongan lentamente hasta diferenciarse en dendritas que se consideran maduras en el momento en que las neuronas son capaces de sinaptar (estadio 4; 4 DIV). En el estadio final, el axón y las dendritas continúan elongándose y presentan numerosas ramificaciones (estadio 5; 7 DIV).



**Figura 2. Estadios de desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo.** Dotti y col. *J Neurosci.* 1988 (4):1454-68.

### 3.1. Crecimiento y morfología dendríticos

El crecimiento dendrítico es extraordinariamente dinámico y responde a señales del entorno, ya sean factores autónomos, celulares o señales extracelulares. En general, las neuronas presentan patrones de arborización dendrítica específicos de cada tipo neuronal, con propiedades de membrana altamente específicas que definen la capacidad computacional de cada célula (Rall, 1995; Stuart y cols., 1999). El correcto crecimiento y arborización dendrítica son cruciales para el buen funcionamiento del sistema nervioso.

El desarrollo del sistema nervioso comprende varias etapas. Primero las neuronas nacen y migran hasta sus posiciones finales, seguidamente emiten sus axones y dendritas con patrones característicos según el tipo celular y finalmente se forman las sinapsis, que son conexiones interneuronales altamente especializadas. Estas conexiones sinápticas tempranas son generalmente remodeladas por la actividad neuronal para alcanzar el patrón maduro de conectividad del cerebro (Goodman y Shatz, 1993; Katz y Shatz, 1996). En la mayoría de los tipos neuronales, el crecimiento dendrítico es lento en un principio, pero aumenta su ritmo de manera espectacular tras una sobreproducción transitoria de dendritas hasta adquirir la arborización dendrítica madura (Ramón y Cajal, 1911; Miller, 1988; Koester y O'Leary, 1992).

La actividad neuronal también modula finamente el crecimiento y la ramificación dendríticos. La diferenciación de las dendritas ocurre simultáneamente a la formación de las

sinapsis, lo que sugiere que las terminales axónicas aferentes pueden estimular el crecimiento dendrítico (Purves y Hume, 1981).

La base estructural de las dendritas la componen la actina y los microtúbulos. El citoesqueleto de actina dirige la actividad exploratoria mientras que los microtúbulos estabilizan las prolongaciones recién formadas. Por lo tanto, la regulación de estos dos componentes es la base del crecimiento dendrítico y su remodelado.

### 3.2. Citoesqueleto

Las células han de organizarse espacialmente e interactuar mecánicamente con su entorno por lo que han de disponer de una morfología correcta, ser físicamente robustas y poseer una estructura interna adecuada. Además muchas de ellas deben sufrir cambios de forma y han de desplazarse de un lugar a otro y todas ellas han de reordenar sus componentes internos al crecer, dividirse o adaptarse a las circunstancias que cambian. Las células eucariotas desarrollan todas estas funciones espaciales y mecánicas en un grado muy alto, dependiendo de un entramado tridimensional de proteínas denominado citoesqueleto. El citoesqueleto se compone de tres tipos de filamentos básicos: filamentos intermedios, filamentos de actina o microfilamentos y microtúbulos.

Los *filamentos intermedios*, llamados neurofilamentos en neuronas, son estructuras que se asemejan a cuerdas de 10 nm de diámetro y que proporcionan estabilidad mecánica a las células. A diferencia de los microfilamentos y microtúbulos, los neurofilamentos se componen de largas moléculas proteicas individuales, cada una de las cuales está firmemente enrollada. Este tipo de filamento promueve el incremento del diámetro axonal determinante para la velocidad de la señalización eléctrica.

Los *filamentos de actina* son polímeros helicoidales formados por dímeros de actina globular soluble. Aparecen como estructuras flexibles y dinámicas, con un diámetro de 5 nm, que se organizan en una gran variedad de estructuras, formando haces, redes bidimensionales o geles tridimensionales. Estos filamentos se encuentran a lo largo de toda la neurona, pero son

particularmente numerosos en las neuritas, concentrándose en el córtex, inmediatamente debajo de la membrana plasmática y en neuronas forman los conos de crecimiento esenciales en la elongación neurítica. Los filamentos de actina se pueden encontrar asociados a proteínas reguladoras de la polimerización y proteínas estructurales que permiten la unión de los filamentos de actina.

Los *microtúbulos* (MTs) son el componente predominante del citoesqueleto neuronal constituyendo un 20% del total de las proteínas cerebrales. Son polímeros cilíndricos y huecos con un diámetro externo de 24 nm y poseen mayor rigidez que los otros dos tipos de filamentos, proporcionando a la neurona un soporte para el transporte activo de orgánulos y macromoléculas esenciales para su desarrollo. La unidad estructural de los MTs es un heterodímero de las proteínas globulares tubulina  $\alpha$  y tubulina  $\beta$ , dichos heterodímeros se unen formando protofilamentos. Trece protofilamentos unidos lateralmente forman un MT. La alternancia de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  confieren al MT su característica polaridad estructural, donde las tubulinas  $\alpha$  constituyen el extremo negativo (-) próximo al centro organizador de MTs y las  $\beta$  el extremo positivo (+) que presenta una mayor tasa de crecimiento. La polimerización de los MTs requiere gasto energético, por lo que los heterodímeros de tubulina libres se unen a GTP (Laferriere y cols., 1997). No obstante los MTs son capaces de polimerizarse y despolimerizarse rápidamente, característica conocida como inestabilidad dinámica.

### **3.3. Desarrollo neuronal y citoesqueleto**

Las neuronas, durante su desarrollo, sufren cambios morfológicos esenciales para el establecimiento de la polaridad celular y de un circuito funcionalmente activo. Los procesos mediante los que las neuronas adquieren su polaridad son la neuritogénesis, axonogénesis y dendritogénesis. Durante la neuritogénesis los lamelipodios son invadidos por pequeños haces de MTs con orientación unidireccional (sólo presentan el extremo (-) cercano al soma), de forma que cuando se condensa la membrana del lamelipodio en su base, cerca del soma, se genera una neurita, tras lo cual los MTs promueven su elongación y estabilización generando el

axón. Tras la formación del axón, existe una segunda etapa de elongación y ramificación del resto de neuritas para formar el árbol dendrítico. En esta segunda etapa los MTs presentan una orientación bidireccional, hay extremos (-) cerca del soma y extremos (+) lejos del soma, para permitir el transporte retrógrado y anterógrado de orgánulos y macromoléculas (Poulain y Sobel, 2010). Estos cambios morfológicos y funcionales se encuentran perfectamente regulados y dirigidos por la señalización intracelular y son altamente dependientes de la organización y coordinación del citoesqueleto neuronal. Para llevar a cabo sus funciones los MTs deben ser capaces de responder a los estímulos extracelulares e intracelulares, siendo esencial para ello la inestabilidad dinámica y su regulación que depende de: i) la accesibilidad y estado conformacional de los dímeros de tubulina (niveles intracelulares de tubulina unida a GTP), ii) la estabilización por modificaciones enzimáticas (acetilación y detirosinación de la tubulina  $\alpha$ ), iii) las proteínas de unión a MTs (Etienne-Manneville, 2010). Estas últimas, que han sido especialmente estudiadas, se dividen en dos grupos principales: aquellas que se unen a lo largo del microtúbulo y regulan la polimerización y estabilidad de los MTs (proteínas de unión a microtúbulos o MAPs) y aquellas que se unen al extremo (+) y que controlan su dinamismo y asociación a los orgánulos intracelulares, macromoléculas y al citoesqueleto de actina. Alteraciones en estas proteínas se asocian a numerosas e importantes patologías del sistema nervioso.

## 4. FORMINAS

Las forminas son una familia de proteínas extensamente expresada que regula la morfología celular, la adhesión, la citoquinesis y la morfogénesis mediante la remodelación de los filamentos de actina y microtúbulos citoesqueléticos. Estas proteínas desempeñan sus funciones bien por asociación con una amplia variedad de factores celulares o bien por unión directa a los filamentos celulares para promover su nucleación y polimerización (Goode y Eck, 2007). En eucariotas las forminas regulan la citoquinesis y determinan el crecimiento polarizado y la

formación de fibras de estrés (Zeller y cols., 1999). Una característica general de las forminas es la presencia de un dominio altamente conservado, denominado dominio de homología de formina 2 (FH2), necesario para inducir la nucleación de la actina (Pruyne y cols., 2002). Asimismo la mayoría de las forminas poseen un dominio de homología 1 (FH1) rico en residuos de prolina cuya función es acelerar la elongación de los filamentos de actina mediante el reclutamiento de la profilina (Romero y cols., 2004). Algunas forminas presentan un dominio FH3 en su extremo amino terminal que establece interacciones autoinhibitorias con la región DAD (Dominio de Autoregulación Dia) del extremo carboxilo terminal, mediando así la localización, la iniciación y la longitud de los filopodios y determinando la formación de distintos tipos de protuberancias celulares (Homem y Peifer, 2009).

El gen de mamíferos que codifica para la proteína formina 1 (Fmn1) se encuentra mutado en el ratón con deformidad en las extremidades (Mass y cols., 1990; Woychik y cols., 1990; Wang y cols., 1997). Se ha demostrado que la proteína Fmn1 es capaz de nuclear *in vitro* la polimerización de los filamentos de actina no ramificados e *in vivo* funciona de forma dependiente de catenina en la formación de los filamentos radiales de actina (Kobielak y cols., 2004).

El gen *fmn1* presenta seis isoformas de ARN mensajero (Ia, Ib, II, III, IV y V), que muestran diferentes niveles relativos de expresión en las extremidades, el riñón y el cerebro (Wang y cols., 1997). Respecto a su localización intracelular la Fmn1 se localiza en el citoplasma de fibroblastos y células epiteliales y se concentra en puntos situados a lo largo de los MTs. La isoforma Ib de la formina 1 (Fmn1-Ib), expresada de forma exógena es casi exclusivamente citoplasmática y se localiza específicamente en los MTs en interfase. Esta localización es regulada por el péptido codificado por el exón 2 de la Fmn1-Ib y no depende de los dominios proteicos FH1 ni FH2, lo que sugiere que regiones independientes de la proteína Fmn1-Ib son responsables de su asociación con los citoesqueletos de actina y MTs (Zhou y cols., 2006).

## 5. NEUROGENINA 3

### 5.1. Definición

La Ngn3 es una proteína de 214 aminoácidos y 23,5 kDa perteneciente al grupo A de la familia de las bHLH (basic helix-loop-helix). Estas proteínas presentan dos dominios funcionales: un dominio básico de unión al ADN de 15 aminoácidos y un dominio HLH en el extremo carboxilo terminal compuesto por 40 aminoácidos que forman dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas conectadas por un lazo de longitud variable. Se ha observado mediante cristalización que las proteínas de esta familia dimerizan por medio de los dominios HLH, adoptando una conformación en tijera y uniéndose al ADN mediante los dominios básicos (Han y cols., 2006).

Todas las proteínas de la familia bHLH son importantes reguladores transcripcionales con funciones esenciales y bien conocidas, en la determinación y diferenciación de numerosos tipos celulares y en el desarrollo del sistema nervioso, tanto en vertebrados como en invertebrados. Los genes proneurales *achaete-scute* y *atonal*, pertenecientes a la familia bHLH, son necesarios para la determinación de los precursores neurales en *Drosophila* (Moore y cols., 2000).

La subfamilia de las neurogeninas se compone de tres genes de la familia bHLH relacionados con el gen proneural *atonal*: neurogenina 1 (*ngn1*), neurogenina 2 (*ngn2*) y neurogenina 3 (*ngn3*). Se identificaron por primera vez en la línea celular de la cresta neural Monc-1 mediante PCR degenerada que tenía por objetivo la caracterización de los genes bHLH que intervienen en las etapas tempranas de determinación neuronal y su expresión fue definida mediante hibridación *in situ* en distintas etapas (E8.5-E14) del desarrollo embrionario de *Xenopus* (Bellefroid y cols., 1996; Sommer y cols., 1996). Los genes murinos *ngn1* y *ngn2*, son esenciales en la determinación de los linajes sensoriales del sistema nervioso periférico (Fode y cols., 1998; Ma y cols., 1998). El gen *ngn3* se expresa en determinadas regiones del sistema nervioso central en desarrollo, mayoritariamente en la hipotalámica, y en el hipocampo (Salama-Cohen y cols., 2006). También se expresa abundantemente en el páncreas embrionario



(Sommer y cols., 1996; Gradwohl y cols., 2000) así como en las espermatogonias (Yoshida y cols., 2004) donde define la espermatogénesis temprana.

## 5.2. Función

La función de la Ngn3 ha sido estudiada mayoritariamente en el páncreas, siendo una proteína esencial en la diferenciación embrionaria de las células progenitoras de los islotes de Langerhans (Apelqvist y cols., 1999; Gradwohl y cols., 2000; Gu y cols., 2002). Recientemente se ha observado que la Ngn3 también está implicada en la diferenciación de todos los progenitores postembrionarios de las diferentes células que forman los islotes (Xu y cols., 2008).

Por el contrario, su función en el sistema nervioso no está totalmente esclarecida, pero se conoce que la Ngn3 promueve la neurogénesis e inhibe la gliogénesis (Korzh y Strahle, 2002), y promueve la neurogénesis retinal temprana en embriones de pollo (Ma y cols., 2009). En roedores, la Ngn3 se expresa en los precursores gliales en la medula espinal en desarrollo (Liu y cols., 2002) y regula la diferenciación glial (Lee y cols., 2003).

El gen *ngn3* se expresa en ratones adultos en determinadas zonas del hipocampo y su sobreexpresión en cultivos de neuronas hipocámpales de ratones E17, conlleva a un aumento considerable del número de dendritas. Paralelamente, modifica el número de sinapsis aferentes de las neuronas transfectadas, lo que supone un aumento en la relación excitación/inhibición en las terminales sinápticas y por tanto un aumento en la actividad neuronal (Salama-Cohen y cols., 2006). El correcto funcionamiento del cerebro requiere un balance excitatorio/inhibitorio finamente regulado y se ha sugerido que desórdenes del desarrollo tales como la epilepsia, el autismo y ciertos retrasos mentales reflejan una distorsión de dicho balance durante la ontogenia de la corteza cerebral e hipocámpal (Rubenstein y Merzenich, 2003).

### 5.3. Expresión intracelular

Las proteínas que contienen en su secuencia señales nucleares son transportadas a través de la membrana nuclear ya sea hacia el interior del núcleo (señales de localización nuclear) o hacia el citoplasma (señales de exportación nuclear) (Lange y cols., 2007). La secuencia de diana nuclear mejor caracterizada es la señal de localización clásica (NLS<sub>c</sub>) que puede aparecer como una señal continua o bipartita (Kalderon y cols., 1984; Robbins y cols., 1991). La primera contiene un único grupo de 4-6 aminoácidos básicos, mientras que la bipartita se compone de dos grupos de aminoácidos básicos separados por unos 8-10 residuos espaciadores (Dingwall y Laskey, 1991; Robbins y cols., 1991). Las señales de exportación nuclear se componen de una secuencia consenso (Pemberton y Paschal, 2005). La mayoría de las proteínas que se transportan desde el núcleo poseen un tipo de señal de exportación nuclear (NES) rico en leucinas similar al descrito originalmente en la proteína Rev del HIV (Fornerod y cols., 1997). Este tipo de NES es reconocido específicamente por la exportina CRM1 (cromosoma region maintenance 1, Fornerod et al., 1997). El CRM1 es un exportador nuclear cuya función requiere gasto energético (Fornerod y cols., 1997) y una secuencia de exportación nuclear consenso rica en leucinas:  $\emptyset X_1-3 \emptyset X_2-3 \emptyset X \emptyset X$ , donde  $X$  es cualquier aminoácido y  $\emptyset$  son residuos hidrofóbicos grandes como valina, leucina, isoleucina o metionina, siendo estos últimos los residuos críticos para la exportación (Han y cols., 2008).

La secuencia de la Ngn3 presenta tanto NLS como NES. La señal NLS permite que la Ngn3 permanezca en el núcleo celular y que lleve a cabo su función como factor de transcripción, mientras que hasta el momento no había estudios acerca de la funcionalidad de las secuencias NES y las consecuencias de la salida de la Ngn3 del núcleo.

### 5.4. Regulación

En todos los casos, la expresión de *ngn3* es inhibida por la actividad del receptor Notch y viceversa (Kageyama y Nakanishi, 1997). La señalización del receptor transmembrana Notch, se inicia cuando se une a él un ligando de la familia Delta o Jagged, que están anclados en la membrana de las células adyacentes. Tal interacción desencadena en el receptor una doble

ruptura proteolítica en la cual parte del dominio intracelular de Notch (ICNotch) se libera y se transloca al núcleo, donde se une a CSL (un homólogo de Supresor-of-hairless). Por un proceso complejo que implica la desactivación de represores, ICNotch-CSL induce la expresión de factores de transcripción homólogos del Hairy/Enhancer-of-split, familia Hes y proteínas relacionadas con Hes (HERP) (Mumm y Kopan, 2000; Iso y cols., 2003). Este proceso fue estudiado inicialmente en el desarrollo, donde la mayoría de los fenómenos de inhibición lateral son mediados por receptores de membrana de la familia Notch. No obstante, dicha señalización no se restringe al desarrollo, ya que, como se ha observado posteriormente, la activación de Notch controla la morfología de neuronas adultas. En neuronas de hipocampo de cerebro de ratón en cultivo, la activación de Notch da lugar a una disminución del número de dendritas y a un aumento de su longitud, mientras que la inhibición de Notch produce el efecto contrario (Salama-Cohen y cols., 2005). Los efectos de la activación/inhibición de Notch sobre el patrón dendrítico se asocian con el aumento/disminución de la expresión de *Hes1* y *Hes5* (Salama-Cohen y cols., 2005; Salama-Cohen y cols., 2006). *Hes1* controla negativamente la expresión de una serie de análogos de Achaete scute y Atonal. Son los llamados genes proneurales, de la superfamilia de los genes bHLH y que en el desarrollo definen con su expresión diversas etapas de la diferenciación celular e incluso el fenotipo neuronal (Bertrand y cols., 2002). La actividad de la vía de Notch es determinante para la morfología dendrítica de las neuronas de hipocampo en cultivo (Salama-Cohen y cols., 2005).

La Ngn3 necesita ser poliubiquitinada para su degradación por el proteasoma. Como factor de transcripción, la Ngn3 se asocia a proteínas E (E12 o E47) formando un complejo heterodimérico de unión al ADN. La fosforilación sobre el residuo de treonina 188 (T188) de la Ngn3 (Vosper y cols., 2007) incrementa la estabilidad de la unión del complejo al ADN, confiriéndole una mayor vida media. La T188 se sitúa en el lazo entre los dominios helicoidales y es un residuo altamente conservado en mamíferos (Rukstalis y Habener, 2009).

## 6. MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático esencial para la supervivencia celular ya que juega un papel crítico en el metabolismo y el almacenamiento de energía. Su número varía según las necesidades energéticas de las células, presenta un ADN propio y son estructuras muy plásticas que se deforman, se dividen y se fusionan. Normalmente se representa en forma alargada y su tamaño oscila entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud (Alberts y cols., 2004).

### 6.1. Estructura

Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas claramente diferenciadas en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial.

La *membrana externa* es una bicapa lipídica permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos. Esta permeabilidad se debe a la existencia de poros formados por porinas o por proteínas de canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que permiten el paso de moléculas de hasta 10 kDa y un diámetro aproximado de 20 Å. La membrana externa posee relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte conocidas.

La *membrana interna* contiene más proteínas, carece de poros, es altamente selectiva, y está enriquecida en complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana, implicados en la translocación de moléculas. Esta membrana forma invaginaciones o pliegues, llamados crestas mitocondriales, que aumentan significativamente la superficie disponible para el asentamiento de complejos, como la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa o las proteínas desacoplantes.

### 6.2. Función

Las principales funciones de las mitocondrias son la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones; la mitocondria produce

la mayor parte del ATP total sintetizado por la célula. También sirve de almacén de sustancias como iones, agua y algunas partículas como restos de virus y proteínas.

Tanto las mutaciones del ADN mitocondrial, como del ADN cromosómico se asocian a ciertas enfermedades genéticas mitocondriales, cuyo origen está en un mal funcionamiento de procesos que se desarrollan en las mitocondrias por efecto de la alteración de enzimas, ARN, componentes de la cadena de transporte de electrones y sistemas de transporte de la membrana interna, muchas de las cuales afectan al sistema nervioso central.

El ADN mitocondrial puede ser dañado por los radicales libres formados en la mitocondria; así, enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y ciertas cardiopatías pueden relacionarse con lesiones mitocondriales (Alberts y cols., 2004).

## 7. UCP2

Las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs, uncoupling proteins) pertenecen a la superfamilia de transportadores aniónicos mitocondriales. Se localizan en las crestas mitocondriales y su función es desacoplar la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP. Las UCPs facilitan el transporte de protones ( $H^+$ ) del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial interna, disipando, en forma de calor, el gradiente de  $H^+$  generado por la cadena transportadora mitocondrial y reduciendo el potencial de membrana en la mitocondria (Fig. 3).

La proteína UCP2 se identificó en 1997 a partir de estudios en extractos mitocondriales de levaduras, músculo esquelético y pulmón. Se codifica por el gen homónimo ubicado en el cromosoma 11 humano y el cromosoma 7 del ratón en un *locus* relacionado con la diabetes y la obesidad. La UCP2 se expresa en el tejido adiposo, el músculo esquelético y cardíaco, el cerebro, el bazo, el intestino y en las células  $\beta$  pancreáticas. En el sistema nervioso se localiza en el hipotálamo, en el tálamo, en el núcleo dorsal motor del nervio vago y en el hipocampo (Richard y cols., 2001) siendo crítica para la utilización de energía por las neuronas adultas.

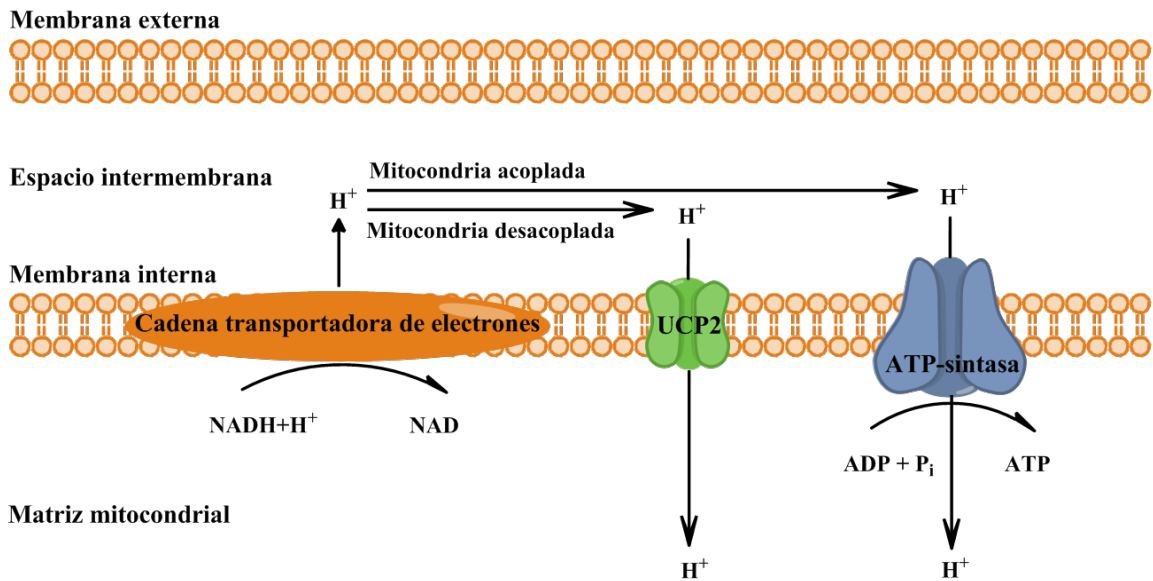


Figura 3. Esquema de la localización y función de la proteína UCP2 en la membrana mitocondrial interna.

### 7.1. Función

En un principio a la UCP2 se le asignó un papel en la regulación del balance energético, en el control del peso corporal y termorregulación y en respuestas frente a estímulos inflamatorios (Fleury y cols., 1997).

Posteriormente se observó que la UCP2 está implicada en la regulación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, (Richard y cols., 2001)). Durante el estado IV de la respiración mitocondrial el gradiente de protones y el ATP aumentan, disminuyendo la disponibilidad de ADP, lo que genera una disminución del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial facilitando la transferencia de dichos electrones al oxígeno y promoviéndose la formación de ROS (Richard y cols., 2001). La UCP2 también desempeña un papel esencial en el metabolismo mitocondrial al disminuir los productos perjudiciales para las neuronas durante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Además, cuando la UCP2 está activa disminuye el gradiente de H<sup>+</sup>, la producción de ATP y ROS, aumenta el flujo de calcio mitocondrial y se disipa la energía en forma de calor. Sin embargo, a pesar de que disminuye la producción mitocondrial individual de ATP, las neuronas disponen de más ATP ya que el desacoplamiento promueve la proliferación mitocondrial cerebral (Horvath y cols., 2003).

En el sistema nervioso central la UCP2 presenta un efecto neuroprotector, ya que en la mayoría de enfermedades degenerativas intervienen ROS, y en casos de daño cerebral agudo se induce su expresión suprimiendo la activación de la caspasa 3 debido a los efectos a nivel de la regulación del potencial de calcio mitocondrial (Andrews y cols., 2005). Además de la neuroprotección, la UCP2 es fundamental para la sinaptogénesis en el hipocampo adulto. Los efectos de UCP2 en sinapsis se deben a cambios de temperatura en la terminal presináptica. Asimismo, se ha observado en el hipocampo una adaptación mitocondrial al ejercicio al comparar ratones silvestres con ratones *UCP2* KO, siendo los primeros los que presentan un aumento en la respiración mitocondrial, en el número de mitocondrias y en la sinaptogénesis tras el ejercicio (Dietrich y cols., 2008). En células  $\beta$ -pancreáticas de ratones *UCP2* KO aumentan los niveles de ATP y ADP asociados a una subida temporal de la secreción de insulina (Horvath y cols., 2003).

La expresión de UCP2 está regulada por hormonas, diferentes según el tejido, por el ácido retinoico, la dieta o la coenzima Q, pero el factor regulatorio más importante son los niveles de ROS (Horvath y cols., 2003).





## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Partiendo de toda la información expuesta anteriormente, entre la que destacamos la capacidad de la Ngn3 de alterar la morfología del árbol dendrítico de las neuronas del hipocampo en cultivo, nos planteamos analizar los mecanismos mediante los que actúa dicha proteína.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la distribución subcelular de la Ngn3 y su implicación en la diferenciación de neuronas del hipocampo.
- Identificar el mecanismo mediante el cual la Ngn3 es exportada fuera del núcleo.
- Estudiar los genes que controla la Ngn3, especialmente aquellos que codifican o regulan constituyentes del citoesqueleto.
- Evaluar la posible relación entre UCP2 y Ngn3 y su importancia durante el desarrollo del hipocampo.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. ANIMALES

Para el desarrollo de los experimentos *in vivo*, se utilizaron siempre ratones de la cepa CD1 de distintas edades, procedentes del animalario del Instituto Cajal del CSIC. Los animales se mantuvieron a 22°C y 60% de humedad, con ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12 horas y sin restricciones de comida ni de agua. El número de animales se redujo al mínimo necesario para cada experimento y fueron manipulados conforme a las normativas de la Unión Europea (86/609/EEC, 2010/63/UE) y de España (Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: RD. 223/88, de 14 de Marzo, BOE), teniendo especial cuidado en evitar su sufrimiento. Los ratones silvestres y *knock out* (KO) para el gen *UCP2* pertenecen a la cepa C57BL6, procedentes del animalario de la Universidad de Yale y fueron manipulados conforme a las normativas del *Institutional Animal Care and Use Committee of Yale University*.

### 2. CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

Los hipocampos de embriones de ratón de 17 días de gestación fueron disecados en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen) sin cationes  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . El tejido fue cortado en trozos de 1 mm aproximadamente y disociado con 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tripsina (Worthington Biochemicals) durante 15 minutos a 37°C y posteriormente tratado con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de DNasa (Sigma-Aldrich) tal y como se describe en (Goslin y Banker, 1989). Las neuronas se sembraron sobre placas de seis pocillos o sobre cubres de vidrio de 1  $\text{cm}^2$  de superficie, previamente recubiertos con 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y fueron cultivadas en medio Neurobasal suplementado con B-27, GlutaMAX I (Invitrogen) y los antibióticos penicilina y estreptomina. La densidad del cultivo fue de 150-400 neuronas. $\text{mm}^{-2}$ . Los cultivos así obtenidos no contienen células gliales, ya que apenas existen en el hipocampo de los embriones de ratón de 17 días de gestación.

### 3. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES VIRALES SINDBIS

#### 3.1. Clonación de la Neurogenina 3 en el plásmido viral pSinRep5

La construcción pCS2-Ngn3, en la que la Ngn3 se clonó incluyendo en su extremo amino terminal una secuencia de seis epítomos myc, fue usada como molde para amplificar por PCR la secuencia 6xmyc-Ngn3. Para ello se diseñaron los siguientes cebadores específicos:

6xmyc-Ngn3-ApaI\_sentido      5'-**CCGGGCC**CCATCGATTAAAGCTATGG-3'

6xmyc-Ngn3-ApaI\_antisentido    5'-**CCGGGCC**CCCTCACAAGAAGTCTGAGAA-3'

Estos cebadores introducen dos dianas de la enzima de restricción ApaI (en negrita) flanqueando ambos extremos de la secuencia. Tras la PCR, la mezcla de reacción fue analizada en gel de agarosa al 1% desde donde se purificó la banda correspondiente al producto de amplificación. El fragmento de 6xmyc-Ngn3, junto con el vector pSinRep5 se cortaron con ApaI y el vector resultante fue desfosforilado. Con ambas muestras purificadas y cuantificadas se llevó a cabo la reacción de ligación mediante la ligasa T4 y el producto de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los plásmidos purificados a partir de varias colonias empleando el kit Jetquick (Genomed), fueron analizados mediante la digestión con ApaI y aquellos que tenían el inserto del tamaño adecuado fueron secuenciados; la autenticidad de la secuencia fue confirmada usando el algoritmo BLASTn alojado en el servidor del NCBI. La expresión de la proteína fue confirmada mediante análisis por inmunoblot de extractos de células BHK (baby hamster kidney) transformadas con el plásmido mediante electroporación.

#### 3.2. Producción de las partículas virales

Los plásmidos pSinRep5-Ngn3, pSinRep5-GFP (green fluorescence protein, que fue cedido amablemente por el Prof. J. Lerma, IN, Alicante) y un DNA helper DH (26S), que contiene los genes de las cuatro proteínas estructurales requeridas para el empaquetamiento del virus, fueron



las isoleucinas 132 y 141 y las leucinas 135 y 139 de la Ngn3. Todos estos aminoácidos se sustituyeron por alaninas. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada mutación usando el programa del *QuickChange* (Qiagen):

I132A	5'-CTCAGATCTCGAGCTTACGCCTGGGCACTGACTCAGAC-3'
I132A_antisentido	5'-GTCTGAGTCAGTGCCCAGGCGTAAGCTCGAGATCTGAG-3'
L135A	5'-GCTTACATCTGGGACAGCGACTCAGACGCTGCG-3'
L135A_antisentido	5'-CGCAGCGTCTGAGTCGCTGCCAGATGTAAGC-3'
L139A	5'-GGCACTGACTCAGACGGCGCGCATAGCGTGAATT-3'
L139A_antisentido	5'-AATTCACGCTATGCGCGCCGTCTGAGTCAGTGCC-3'
I141A	5'-GACTCAGACGCTGCGCGCAGCGTGAATTCTGCAG-3'
I141A_antisentido	5'-CTGCAGAATTCACGCTGCGCGCAGCGTCTGAGTC-3'

A partir del plásmido pCS2-myc-Ngn3 se realizaron mutaciones puntuales en los aminoácidos potencialmente claves para la exportación nuclear, que se corresponden con la isoleucina 11 y las leucinas 125 y 135 de la Ngn3. Los cebadores utilizados en este caso fueron:

I11A	5'-CTTGATGCGCTCACCGCCCAAGTGTCCTCCAGAG-3'
I11A_antisentido	5'-CTCTGGGGACACTTGGGCGGTGAGCGCATCCAAG-3'
L125A	5'-TACAAAGATCGAGACCGCGCGCTTCGCCACAAC-3'
L125A_antisentido	5'-GTTGTGGGCGAAGCGCGGGTCTCGATCTTTGTA-3'
L135A	5'-CAACTACATCTGGGACAGCGACTCAGACGCTGCGC-3'
L135A_antisentido	5'-GCGCAGCGTCTGAGTCGCTGCCAGATGTAGTTG-3'



El producto de PCR obtenido siguiendo las instrucciones del kit *QuickChange site-directed mutagenesis*, se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se escogieron varias colonias a partir de las cuales se purificó el plásmido con el kit Jetquick (Genomed), se seleccionaron las positivas mediante secuenciación y la autenticidad de la secuencia fue confirmada usando el algoritmo BLASTn alojado en el servidor del NCBI.

## 5. siARN

Los ARNs de interferencia se adquirieron en Applied Biosystems/Ambion y se transfectaron usando una concentración de 30 nM. Se utilizaron los siguientes siARNs (en minúsculas se representan las bases desapareadas):

Nombre	Secuencia	Diana
siARN1 sentido	GGAUGAACUGACUAAAAUAtt	<i>fmn1</i>
siARN1 antisentido	UAUUUUAGUCAGUUCAUCCtc	<i>fmn1</i>
siARN2 sentido	GGCGACAUAUUUUCAAACtt	Exón 2 de <i>fmn1</i>
siARN2 antisentido	GUUUGAAAAUAUGUCGCCtg	Exón 2 de <i>fmn1</i>
siARN3 sentido	CCUUUGUAUUGGACCAGAAtt	Exón 6 de <i>fmn1</i>
siARN3 antisentido	UUCUGGUCCAUAACAAAGGtt	Exón 6 de <i>fmn1</i>
siARN2 sentido	AACUACAUCUGGGCACUGAtt	<i>ngn3</i>
siARN2 antisentido	UCAGUGCCCAGAUGUAGUUgt	<i>ngn3</i>
siARN3 sentido	GCUUCUCAUCGGUACCCUUtt	<i>ngn3</i>
siARN3 antisentido	AAGGGUACCGAUGAGAAGCct	<i>ngn3</i>

Los controles incluyeron un siARN sin diana (control negativo) y un siARN cuya diana es la  $\beta$ -actina (control positivo). La especificidad de los mencionados siARNs se comprobó mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

## 6. TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

### 6.1. Transfección.

Cultivos de neuronas del hipocampo de ratón fueron lipofectados a 1, 2 ó 3 días *in vitro* (DIV) dependiendo del experimento, con el kit *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lipofectaron 0,65 µg de los correspondientes plásmidos o siARNs. Los cultivos permanecieron en presencia de los correspondientes liposomas durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se lavaron las células con medio Neurobasal y, se permitió la expresión de las proteínas durante 16-20 horas. Para el análisis morfológico de las neuronas y de la distribución de la expresión de la Ngn3 se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) para proceder con la inmunocitoquímica.

### 6.2. Infección viral.

Cultivos de neuronas del hipocampo de ratón fueron infectados a 5 días *in vitro* (DIV) con virus Sindbis que expresaban *GFP* o *ngn3*. La concentración viral óptima fue determinada utilizando diferentes diluciones del sobrenadante que contenía las partículas virales que expresaban GFP, siendo la dilución 1/10 la que produjo una mayor tasa de infección y una muerte celular mínima, obteniéndose una eficiencia de transducción del 60-80%. Para el análisis de la expresión génica y de la distribución de la expresión de la Ngn3, los cultivos permanecieron en presencia del correspondiente virus durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se lavaron las células con medio Neurobasal y se permitió la expresión de las proteínas durante los tiempos indicados en cada ensayo.

### 6.3. Nucleofección.

Las neuronas de hipocampo de ratón fueron nucleofectadas mediante el electroporador Amaxa con el kit de neuronas de ratón (Amaxa, Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se electroporaron ARNs de interferencia (siARNs) dirigidos a disminuir los niveles del ARNm de *fmn1* o *ngn3*, con sus correspondientes controles negativo y positivo. Tras

la electroporación se sembraron las neuronas a la densidad indicada y se permitió su expresión durante 5 ó 24 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajo el ARN total y se procedió a su cuantificación mediante PCR a tiempo real e inmunoblot.

#### **6.4. Tratamiento con Leptomicina B.**

Cultivos de neuronas del hipocampo fueron tratados a 3 DIV con Leptomicina B (LMB) 20 nM durante 5, 15 ó 22 horas. La LMB es un inhibidor específico de la exportación nuclear que impide la salida de proteínas del núcleo al unirse, inactivando, al receptor de la exportación nuclear CRM-1 (Ben Fredj y cols., 2004). Tras el tratamiento la distribución subcelular de la Ngn3 fue analizada mediante inmunocitoquímica.

#### **6.5. Tratamiento con drogas alteradoras del citoesqueleto.**

Para determinar la posible colocalización de Ngn3 y tubulina o Ngn3 y actina se realizaron los siguientes tratamientos en neuronas a 3 DIV:

**6.5.1. Nocodazol** (Calbiochem) a 17  $\mu$ M durante 20 minutos, es un agente que promueve la despolimerización de los MTs.

**6.5.2. Citocalasina D** (Calbiochem) a 4  $\mu$ M durante 20 minutos, es un agente que inhibe la polimerización de los filamentos de actina.

**6.5.3. Taxol** (Sigma-Aldrich) a 20  $\mu$ M con GTP 1 mM durante 40 minutos, es un agente que promueve la polimerización de los MTs.

#### **6.6. Tratamiento con Genipina.**

Las neuronas del hipocampo de embriones de ratón de 17 días de gestación fueron tratadas antes de ser plaqueadas con genipina (inhibidor de UCP2; (Zhang y cols., 2006); Wako Chemicals, USA) a una concentración final de 20  $\mu$ M y se mantuvieron en cultivo el tiempo correspondiente a los diferentes estadios del desarrollo hipocampal. Tras el tratamiento se

analizaron los cambios morfológicos mediante inmunocitoquímica y PCR cuantitativa a tiempo real.

### 7. INMUNOCITOQUÍMICA

Una vez tratados los cultivos de neuronas sembradas en cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% (v/v) durante 20 minutos. En el caso de las neuronas tratadas con las drogas que afectan al citoesqueleto se realizaron lavados con tampón PEM (PIPES 80 mM, EGTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,8) y permeabilizados durante 3 minutos a 37°C con el mismo tampón suplementado con Triton X-100 al 0,05% (v/v). Tras dos lavados con tampón fosfato salino (PBS), las células fueron fijadas con metanol a -20°C durante 5 minutos. En todos los casos, una vez fijadas, se lavaron tres veces con PBS y, en los casos en que era necesaria la amplificación con tiramida, se realizó un tratamiento previo de 5 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v). De nuevo se lavaron dos veces con PBS y otras dos veces más con PBS/gelatina 0,12% (p/v). La gelatina se usó en este caso en vez de suero o de albúmina como agente bloqueante, para evitar el marcaje inespecífico. Las células fueron permeabilizadas con tritón X-100 al 0,12% (v/v) en PBS/gelatina durante 4 minutos y lavadas tres veces con PBS/gelatina antes de incubarlas con el/los anticuerpo/s primario/s (Tabla 1) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo se hicieron tres lavados con PBS/gelatina y se incubaron las células con el/los anticuerpo/s secundario/s (Tabla 1) durante 45 minutos a TA. Se hicieron de nuevo tres lavados con PBS/gelatina y otros dos con PBS. Se dejaron secar antes de ser montados los cubreobjetos con vectashield-DAPI y sellados con laca de uñas. En el caso de la amplificación con tiramida, los anticuerpos secundarios estaban unidos a biotina. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, las células fueron tratadas durante 15 minutos con estreptavidina-peroxidasa, lavadas tres veces con PBS e incubadas durante 10 minutos con la tiramida que lleva unida un fluoróforo. Tras ser lavadas tres veces con PBS se procedió al secado y montaje de los cubreobjetos.

**Tabla 1. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios usados en la técnica de inmunocitoquímica.**

**Anticuerpos primarios:**

Antígeno	Especie	Dilución	Nombre del clon Casa comercial
Ngn3	Ratón	1:2000	F25A13B, Hybridoma Bank
Ngn3	Conejo	1:1000	M-80 , Santa Cruz
$\beta$ III-Tubulina	pollo	1:500	Abcam
$\beta$ III-Tubulina	Ratón	1:500	TUJ1, BabCO
Tubulina Péptido N-terminal	Conejo	1:200	Dr. I. Barasoain, CIB, CSIC
GFP	Conejo	1:500	Molecular Probes
GFP	Cabra	1:1000	Abcam
GFP	Pollo	1:1000	Chemicon
c-myc	Pollo	1:250	Abcam
c-myc	Ratón	1:250	9E10 Roche
VGAT	Conejo	1:250	Millipore Corporation
VGLuT1	Cobaya	1:500	Millipore Corporation
Sinaptofisina I	Ratón	1:500	SY38, Progen

**Anticuerpos secundarios:**

Antígeno	Especie	Dilución	Casa comercial
Ratón (biotinilado)	Cabra	1:500	Jackson Immuno Research
Ratón	Cabra	1:1000	Jackson Immuno Research
Conejo (biotinilado)	Cabra	1:500	Jackson Immuno Research
Conejo	Cabra	1:1000	Jackson Immuno Research
Pollo	Burro	1:500	Jackson Immuno Research
Cabra	Burro	1:500	Molecular Probes
Cobaya	Cabra	1:1000	Jackson Immuno Research

## 7.1. Otros marcajes

-TSA (Tyramide Signal Amplification) unida a cyanine3 (Perkin Elmer) usada a 1:200 para amplificar la señal de los anticuerpos anti-Ngn3.

-Faloidina (BODIPY FL phalloidin, Molecular Probes) usada a 1:1000 para marcar los filamentos de actina.

## 8. DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Con el propósito de conocer la producción local de especies reactivas de oxígeno (ROS), se usó dihidroetidio (DHE, Invitrogen) ya que el DHE es oxidado específicamente por el superóxido de oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ) generando fluorescencia roja. En neuronas de hipocampo de 4 DIV tratadas con genipina o sobreexpresando Ngn3 se añadió al medio de cultivo DHE a una concentración final de 3,2  $\mu$ M. Las neuronas permanecieron en presencia del DHE 10 minutos a 37°C y 5%  $CO_2$  y posteriormente se fijaron con PFA al 4% (v/v) y se montaron con vectashield-DAPI para proceder con la adquisición y análisis de imágenes.

## 9. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Se disecaron los cerebros de ratones de 3 meses de edad en PBS con dietilpirocarbonato (PBS-DEPC) para inhibir la actividad ribonucleasa, se fijaron en PBS-DEPC con PFA 4% (v/v) y se incubaron a 4°C durante la noche. Tras la fijación, los cerebros se lavaron con Tritón X-100 0,1% (v/v) (PBT). Se embebieron los cerebros en bloques de agarosa de bajo punto de fusión al 7.5% (p/v), se hicieron secciones frontales de 100  $\mu$ m con el vibratomo VT1000S (Leica, Heidelberg, Alemania) y se incubaron en PFA 4% (v/v) durante la noche. La expresión génica se examinó con una ribosonda marcada con digoxigenina que reconoce los nucleótidos 194-798 del gen *ngn3* (MMU76208). La especificidad de la señal de hibridación se confirmó mediante una ribosonda control. Tras lavar las secciones en PBS-DEPC, se retiró la agarosa que rodeaba el tejido y se procedió a la deshidratación con una serie de lavados en PBS-DEPC conteniendo concentraciones crecientes de metanol (25%, 50%, 75%) y finalmente en metanol puro. Se

hidrató el tejido repitiendo la misma serie a la inversa hasta lavar con PBS-DEPC. Para inhibir la actividad peroxidasa endógena se incubaron las secciones en  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% (v/v) durante 5 minutos y se lavaron de nuevo con PBS-DEPC. Para permeabilizar el tejido y permitir así la entrada de la sonda, se trataron las secciones con proteinasa K (Roche) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 3 minutos a TA. Tras lavar, se fijó el tejido con PFA 4% (v/v) en PBT durante 20 minutos a TA y se lavó dos veces con PBT. Finalmente, las secciones se incubaron en agitación a 60°C durante la noche en solución de hibridación: formamida 50% (v/v), 5X SSC (0,6 M NaCl, citrato de sodio 0,06 M, pH 7,0), Roche Blocking Powder 2% (p/v), Tritón X-100 0,1% (v/v), heparina 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , ARN de la levadura *Torula* 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM y 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 0,1% (p/v), en  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC). Tras desnaturalizar la sonda a 70°C durante 3 minutos, la solución de hibridación se sustituyó por solución fresca que contenía 1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de sonda desnaturalizada y se dejaron las secciones en la nueva solución en agitación y a 60°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron los siguientes lavados en agitación: tres lavados de 30 minutos con SSC 2X, CHAPS 0,1% (p/v) a 60°C, tres lavados de 30 minutos con 0,2X SSC, CHAPS 0,1% (p/v) a 60°C y tres lavados de 5 minutos con KTBT Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) a TA. Posteriormente se bloquearon las secciones con suero de oveja 15% (v/v), Roche Blocking Powder 0,7% (p/v) en KTBT durante 2 horas a 4°C, antes de incubarlas durante toda la noche con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1:1000 en la solución de bloqueo. Tras la incubación, las secciones fueron lavadas con KTBT y Tritón X-100 0,3% (v/v). La actividad fosfatasa alcalina se detectó mediante la incubación con nitroazultetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) (Boehringer Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente las secciones se lavaron con PBS-glicerol (1:1) y se montaron en PBS-glicerol (1:1) con azida sódica 0,02% (p/v). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Leica (Bensheim, Alemania).

## 10. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los ratones fueron perfundidos transcárdialmente con PFA 4% (v/v) en tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2. Los cerebros se cortaron con un vibratomo VT1000S en secciones seriadas de 50 µm de grosor. Las secciones se lavaron 10 minutos en PBS y la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó incubándolas durante 20 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) en PBS. Las secciones se lavaron en PBS 0,1 M y se incubaron en tampón de bloqueo compuesto por PBS conteniendo agente bloqueante *Tyramide Reagent Pack* 0,5% (p/v) (PerkinElmer Life Sciences). Posteriormente las secciones se incubaron durante 16 horas a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-Ngn3 (Tabla 2) en tampón de bloqueo. Pasado este tiempo se lavaron tres veces en PBS y se incubaron durante 1 hora a TA con un anticuerpo secundario contra ratón unido a biotina, y posteriormente con estreptavidina unida a peroxidasa, tiramida y por último con estreptavidina (Molecular Probes) unido a Alexa 488 para amplificar la señal fluorescente. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio Leica (Bensheim, Alemania).

**Tabla 2. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los anticuerpos usados en la técnica de inmunohistoquímica.**

Antígeno	Especie	Dilución	Nombre del clon Casa comercial
Ngn3	Ratón	1:2000	F25A1B3, Hybridoma Bank
Ratón (biotinilado)	Cabra	1:500	Jackson Immuno Research

## 11. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes se adquirieron digitalmente usando un objetivo 40x de inmersión en aceite y con los correspondientes filtros de fluorescencia en un microscopio con cámara digital Leica (Leica, Heidelberg, Alemania). El análisis de microscopía confocal se realizó en un microscopio Leica (Bensheim, Alemania).



Para determinar la localización subcelular de la Ngn3 se cuantificó la señal producida por inmunocitoquímica. Con este fin se seleccionaron campos neuronales al azar y utilizando el programa *ImageJ 1.37v*, se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia del núcleo marcado con DAPI, del citoplasma y del fondo de cada imagen. Se consideró que la Ngn3 o la GFP, en el caso de las secuencias NES, presentaba una localización nuclear si la intensidad de fluorescencia en el núcleo era mayor que la citoplasmática.

El recuento del número de dendritas, sus ramificaciones y sinapsis se realizó manualmente. El número de sinapsis se contó en una sección circular de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. La longitud dendrítica y el tamaño del soma se midió usando el programa *ImageJ 1.37v*. Los datos cuantitativos se representaron como la media de los valores de al menos tres experimentos independientes con su correspondiente error estándar, y las diferencias estadísticas se determinaron mediante el test t de Student's usando el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Para cuantificar la fluorescencia debida a la oxidación del DHE se seleccionaron campos neuronales al azar de las correspondientes inmunocitoquímicas y utilizando el programa *ImageJ 1.37v* se evaluó la densidad integrada de fluorescencia en la zona perinuclear.

## **12. ENSAYO DE ASOCIACIÓN A MICROTÚBULOS**

Para analizar la posible interacción entre Ngn3 y MTs *in vivo*, los cultivos de neuronas hipocampales fueron tratadas con taxol o con DMSO (como control) tras lo cual se homogeneizaron las células en tampón PEM con Triton X-100 0,05% (v/v) e inhibidores de proteasas (Roche) y se centrifugaron a 100.000 x g a 4°C durante 30 minutos. Los precipitados que contenían los MTs y sus proteínas asociadas, además de los núcleos y membranas, se disolvieron directamente en tampón de carga de SDS-PAGE 1X, mientras que a los sobrenadantes, que contenían las proteínas solubles, se les añadió tampón de carga SDS-PAGE 5X. Ambas fracciones se separaron por electroforesis en SDS-PAGE y a continuación se realizó el inmunoblot utilizando anticuerpos frente a Ngn3 y tubulina.

Para evaluar una posible interacción entre Ngn3 y MTs *in vitro*, se homogeneizaron los cerebros de ratón E17 en 10 volúmenes de tampón PEM con Triton X-100 0,05% (v/v) e inhibidores de proteasas, dando 50 pases en un homogeneizador de teflón-cristal. El homogeneizado se centrifugó a 16.000 x g a 4°C durante 30 minutos para separar las membranas y núcleos celulares (precipitado) y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g a 4°C durante 30 minutos. El nuevo precipitado se resuspendió y se separó en dos alícuotas, una fue tratada con taxol 20  $\mu$ M (suplementado con 1 mM GTP) durante 40 minutos a TA y la otra con DMSO, y a continuación se realizó una última centrifugación a 100.000 x g a 4°C durante 30 minutos. Los precipitados y sobrenadantes finales se analizaron por inmunoblot utilizando anticuerpos frente a Ngn3 y  $\beta$ -III-tubulina. Asimismo los sobrenadantes fueron en un posterior análisis de la interacción de la Ngn3 con los monómeros de la tubulina mediante inmunoprecipitación.

### 13. INMUNOPRECIPITACIÓN

El objetivo de esta técnica es dilucidar interacciones, en nuestro caso entre la Ngn3 y la tubulina. Los sobrenadantes, procedentes de la centrifugación de alta velocidad del ensayo de asociación, se incubaron 16 horas con 3  $\mu$ g del anticuerpo anti-  $\beta$ -III-tubulina o con suero preinmune de ratón, en el caso de los controles, a 4°C y en agitación. Pasado este tiempo se añadió proteína G-sefarosa y se mantuvo en agitación suave a 4°C durante 2 horas. Los complejos formados se lavaron 3 veces con tampón PEM. Por último y para proceder con la electroforesis en SDS-PAGE y el inmunoblot se disociaron los posibles complejos con tampón de SDS-PAGE en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol para que las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo usado en la inmunoprecipitación no se separaran, ya que al tener pesos moleculares muy similares a las proteínas de estudio podrían confundirse con las correspondientes bandas generadas por la electroforesis.

## 14. INMUNOBLOT

Tras la electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12% para la detección de Ngn3, myc-Ngn3 y tubulina y al 8% para la detección de Fmn1, se realizó la transferencia semiseca a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore) que fueron bloqueadas durante 1 hora con leche en polvo 5% (p/v) en tampón Tris salino (TBS) con Tween 0,3% (v/v) (TBS-T). A continuación se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C en agitación, con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 3) y se lavaron con TBS-T 0,3% (v/v). Finalmente se incubaron durante 1 hora a TA en agitación con el anticuerpo secundario (Tabla 3) unido a peroxidasa (HRP) y se lavaron con TBS-T 0,3% (v/v) y posteriormente con TBS. El revelado se realizó con ECL Advance™ (Amersham) que produce quimioluminiscencia. La densitometría y cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el programa Quantity One de BioRad.

**Tabla 3. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los diferentes anticuerpos usados en la técnica de inmunoblot.**

Antígeno	Especie	Dilución	Nombre del clon Casa comercial
$\beta$ III-Tubulina	Ratón	1:50000	TUJ1, BabCO
Ngn3	Ratón	1:5000	F25A1B3, Hybridoma Bank
c-myc	Ratón	1:100	9E10, Roche
Fmn1	Cabra	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Ratón (HRP)	Cabra	1:50 000	Jackson Immuno Research
Cabra (HRP)	Burro	1:2000	Jackson Immuno Research

### 15. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para analizar los cambios en la expresión de los genes de interés provocados por los distintos tratamientos que se aplicaron a las neuronas de hipocampo se siguieron los siguientes pasos:

#### 15.1. Extracción del ARN total

A partir de los cultivos o tejidos se obtuvo el ARN total utilizando para ello el kit *illustra RNAspin Mini RNA isolation* de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

#### 15.2. Síntesis del ADN copia

Partiendo del ARN total purificado se sintetizó el ADN copia mediante el kit *First Strand Synthesis* de Fermentas GMBH (St Leon-Rot, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 15.3. PCR cuantitativa a tiempo real

El análisis de los niveles de expresión de distintos genes se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el *ABI Prism 7000 Sequence Detector* (Applied Biosystems). El ADN copia se usó directamente como molde para la PCR. Se utilizaron sondas y primers comerciales TaqMan (Applied Biosystems) dirigidos a amplificar los genes *ngn3*, *UCP2*, *fnm1*, *actina* y *GAPDH* (Gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa, gen constitutivo) como control. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante usando como polimerasa la presente en la *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron por triplicado a partir del ARN obtenido en tres cultivos independientes. La expresión de los diferentes genes analizados se normalizó usando la expresión de *GAPDH*. Los datos se analizaron con el test ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni usando el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), y se expresaron en forma de media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (ESM).

## 16. MICROARRAYS

Se transdujeron neuronas de hipocampo de 5 DIV con virus Sindbis que sobreexpresaban *6xmyc-ngn3* o *GFP* como control. Las neuronas permanecieron en presencia del virus durante 1 hora, se lavaron y se permitió la expresión durante 16 horas, transcurridas las cuales se lisaron para extraer el ARN total. La calidad del ARN fue evaluada en un gel de agarosa al 1% (p/v). Para el análisis de la expresión génica diferencial se usó el *CodeLink Whole Mouse Genome Bioarrays* (Applied Microarrays, Tempe, AZ, antes GE/Amersham, Piscataway, NJ) a partir de cuatro ensayos con tres réplicas cada uno. Estos microarrays contienen  $3,3 \times 10^4$  oligonucleótidos de cadena simple, sondas para los genes murinos y transcritos. El ADNc biotinilado fue sintetizado a partir del ARN extraído usando el kit *CodeLink Expression Assay Reagent* (GE-Amersham Biosciences). Para escanear los microarrays se utilizó un escáner *Agilent Microarray Scanner* (G2565BA, Agilent Technologies). La adquisición y comparativa de imágenes del microarray se realizó con el programa *GenePix Pro* (MDS, Inc., Toronto, ON). Con el programa *CodeLink* (Applied Microarrays, Tempe, AZ) se llevó a cabo la corrección del fondo de las imágenes. Todos los datos obtenidos de los análisis de los microarrays de ADN fueron depositados en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus) con el número de acceso [GEO: GSE26911]. El análisis estadístico de todos los datos de los microarrays se realizó con los paquetes de programas del proyecto *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/>). El programa *codelink* (Diez y cols., 2007) se utilizó para el pre-procesamiento, el programa *genefilter* (Gentleman y cols., 2007) se usó para filtrar los datos y el programa *limma* (Smyth, 2004) para el análisis estadístico. Para el pre-procesamiento se corrigió el fondo mediante el método de *normexp* y la normalización de *quantile*. Los datos se consideraron dentro de la escala log<sub>2</sub>. Se ajustó el valor p usando la corrección de *Benjamini and Hochberg False Discovery Rate* (Benjamini y Hochberg, 1995). Los genes con un valor p inferior a 0,05 fueron seleccionados por su expresión diferencial. El perfil de expresión de las neuronas que expresan *6xmyc-ngn3* se comparó con el correspondiente control de neuronas que expresan *GFP*. Los genes fueron clasificados de acuerdo a su función usando el programa

*Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Con este análisis se identificaron las funciones e implicaciones en enfermedades más significativas que se extraían de los datos, y para ello se tuvieron en cuenta los genes asociados a funciones biológicas y enfermedades presentes en la base de datos del *Ingenuity knowledge*. Por último se usó el test de Fisher para calcular el valor p que determinó la probabilidad de que la función biológica asignada se debiera a la casualidad.

# RESULTADOS





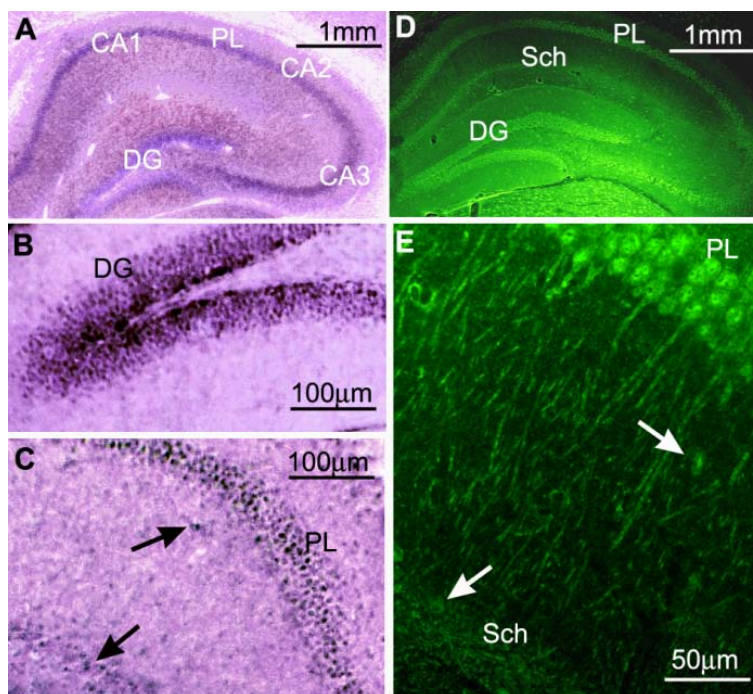
## RESULTADOS

## 1. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA NGN3 Y SU IMPLICACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DEL HIPOCAMPO

### 1.1. DISTRIBUCIÓN DE LA NGN3

#### 1.1.1. Patrón de expresión de la Ngn3 en el hipocampo de cerebro de ratón

Antes de dilucidar las posibles funciones de la Ngn3 en el hipocampo, es importante conocer si dicha proteína se expresa o no en el hipocampo intacto, por ello nos propusimos determinar el perfil de expresión de la Ngn3 en el cerebro adulto de ratón. Experimentos previos de hibridación *in situ*, de secciones coronales de ratones de 3 meses de edad, empleando una ribosonda específica habían demostrado la expresión del gen *ngn3* en la capa piramidal (PL) de todas las regiones hipocampales y en la capa granular del giro dentado (DG) (Salama-Cohen y cols., 2006) (Fig. 4A-C).



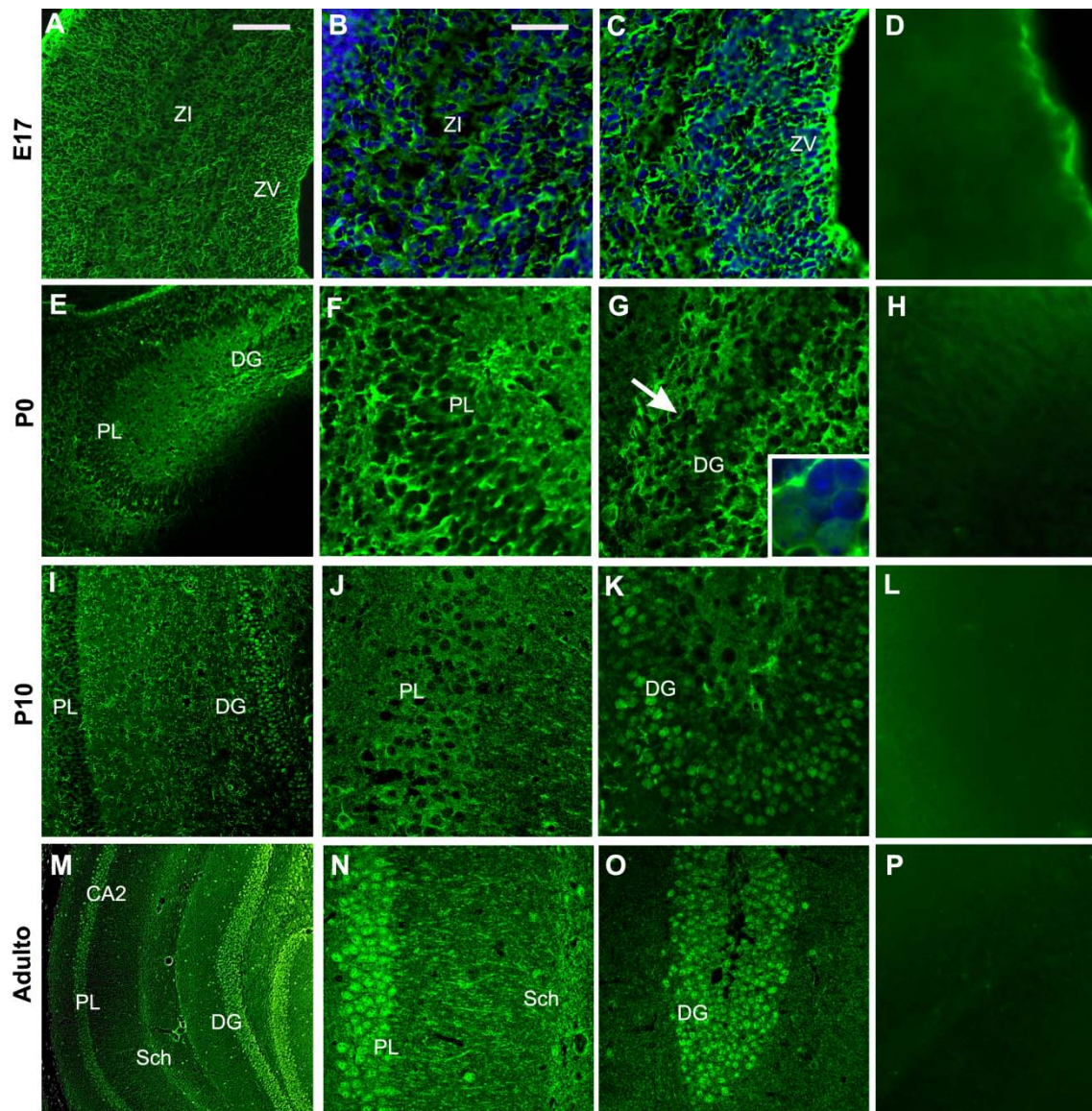
**Figura 4. Expresión de la Ngn3 en el hipocampo adulto.** A: La distribución del ARNm de *ngn3* se estudió por hibridación *in situ* y visualización mediante el marcaje con digoxigenina. B: Detalle de la capa granular del giro dentado (DG) y C de la capa piramidal (PL) de CA1-CA3. D: Inmunohistoquímica frente a Ngn3. La señal se amplificó con tiramida; el marcaje de Ngn3 se puede observar en las neuronas piramidales de CA1-CA3, en las células granulares del DG, en las células del neuropilo que presumiblemente se corresponderían con células gliales (señaladas mediante flechas), en las dendritas apicales de las neuronas piramidales y en las colaterales de Schaffer (Sch). E: Detalle del marcaje nuclear y dendrítico de las neuronas piramidales del hipocampo y de las Sch.

Además, se detectaron algunas células que expresaban *Ngn3* en el *Stratum oriens*, en el *Stratum radiatum*, en el *Stratum lacunosum moleculare* de la región CA1 y en la capa molecular del DG. Estas células presumiblemente se corresponden con células gliales (Fig. 4B, C).

Para definir la distribución proteica en el cerebro adulto se realizó un análisis inmunohistoquímico usando el anticuerpo anti-*Ngn3* F25A1B3 (Zahn y cols., 2004). Los resultados pusieron de manifiesto que la *Ngn3* se encuentra en todas las regiones representativas cerebrales estudiadas y, en concordancia con los experimentos de hibridación *in situ*, su expresión también se localiza en la capa piramidal de las regiones CA1, CA2 y CA3, en la capa granular del DG, en las células del neuropilo de CA1 y en la capa molecular del DG (Fig. 4D, E). Examinando las secciones hipocámpales a mayor aumento, se observó que la *Ngn3* no sólo se expresaba en el núcleo neuronal como era de esperar ya que es un factor de transcripción, sino también en el citoplasma, incluyendo axón y dendritas (Fig. 4E). Las dendritas apicales de las neuronas piramidales se ven claramente inmunoreactivas para la *Ngn3*, al igual que sus contactos con las colaterales de Schaffer (Sch) procedentes de la región CA3. (Fig. 4D, E).

### **1.1.2. Patrón de expresión de la *Ngn3* durante el desarrollo del hipocampo de ratón**

Con el propósito de comprender mejor la localización de la *Ngn3* en neuronas se analizó el patrón de expresión de dicha proteína en distintas etapas del crecimiento cerebral del ratón. Para ello se realizó un análisis inmunohistoquímico comparativo en las siguientes edades: embrionaria 17 (E17), postnatal 0 (P0), postnatal 10 (P10) y adulto (Fig. 5). En E17 la *Ngn3* se detectó exclusivamente en el citoplasma de las células que forman la eminencia hipocámpal (Fig. 5A-D). En P0 la *Ngn3* se localizó en el citoplasma de las neuronas piramidales (Fig. 5F) y de las células granulares del giro dentado y en los núcleos de algunas neuronas granulares (Fig. 5G). En P10 la diferencia en la distribución de *Ngn3* entre neuronas piramidales y granulares resultó más evidente (Fig. 5I-K).



**Figura 5. Expresión de la Ngn3 durante el desarrollo del hipocampo.** Las secciones se marcaron doblemente, la Ngn3 se muestra en verde (amplificada con tiramida) y el marcador nuclear DAPI en azul. **A, E, I, M:** Microscopía de fluorescencia frente a Ngn3 en el hipocampo de ratones E17 (A), P0 (E), P10 (I) y adultos (M). **B, C, F, G, J, K, N, O:** Microscopía confocal de la zona intermedia (B, ZI), de la capa piramidal (F, J, N), de la zona ventral (C, ZV) y del giro dentado (G, K, O, DG) del hipocampo de ratón. Como se puede observar, el marcaje de Ngn3 es mayoritariamente citoplasmático en las neuronas piramidales de E17 (B), P0 (F) y P10 (J) mientras que en el adulto es nuclear (N). Sin embargo, desde P0 el marcaje de la Ngn3 en algunas neuronas granulares del DG es nuclear. La flecha en el panel G muestra las células ampliadas en las que el marcaje de la Ngn3 es nuclear (verde) o extranuclear (azul). Es más, en ratones P10 y adultos, el marcaje de la Ngn3 se puede observar en las dendritas apicales de las neuronas de la PL (J, N) y su intersección con las colaterales de Schaffer (Sch, N). **D, H, L, P:** Imágenes del giro dentado en las diferentes etapas del desarrollo del control de la inmunohistoquímica en el que el anticuerpo anti-Ngn3 fue preincubado con su inmunógeno. Barra de escala en A 100  $\mu$ m, aplicable a E, I y M; barra de escala en B 50  $\mu$ m, aplicable al resto de los paneles.

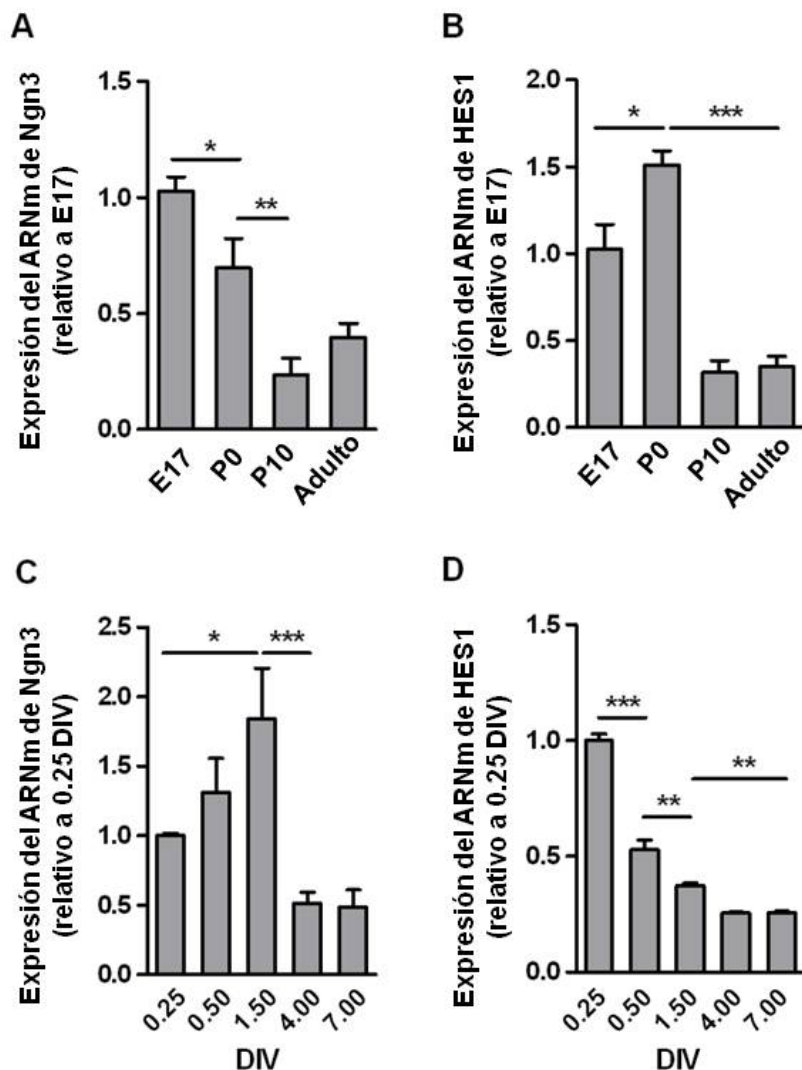


En las neuronas granulares la localización fue nuclear mientras que en las neuronas piramidales la inmunoreactividad se detectó extranuclearmente, en el pericarion y en las dendritas apicales (Fig. 5J). En contraste, en la formación hipocampal adulta se observó en el núcleo de las neuronas piramidales y granulares (Fig. 5M-O). La Ngn3 se detectó asimismo en las dendritas apicales de las células piramidales y en las colaterales de Schaffer (Fig. 5N). En las pruebas realizadas con el anticuerpo primario preabsorbido con su correspondiente inmunógeno no se detectó señal alguna en ninguna de las etapas estudiadas (Fig. 5D, H, L y P).

### **1.1.3. Expresión de *ngn3* y *HES1* durante el desarrollo del cerebro de ratón y de neuronas de hipocampo en cultivo**

Para evaluar el posible papel de la Ngn3 durante el desarrollo perinatal y la madurez, se analizaron los niveles de ARNm de *ngn3* en el hipocampo de ratones E17, P0, P10 y adultos. Como se observa en la figura 6A, los niveles del ARNm de *ngn3* disminuyeron al avanzar en el desarrollo del hipocampo. Asimismo, se analizó durante las mismas etapas del desarrollo la expresión de *HES1*, uno de los efectores primarios de la ruta de Notch (Fig. 6B), se hallaron resultados opuestos a los de *ngn3* en las dos primeras etapas y tanto en P10 como en adulto la expresión de los dos genes es mínima. En cultivos, las neuronas de hipocampo muestran una transición a lo largo de una secuencia de cinco etapas morfológicas que se corresponden con los siguientes DIV: 0.25, 0.5, 1.5, 4 y 7. Se analizaron por tanto los niveles de los mensajeros de *ngn3* y *HES1* durante estas etapas utilizando la técnica de PCR cuantitativa. Estos resultados mostraron que la expresión del ARNm de la *ngn3* aumentaba durante la polarización neuronal, alcanzando un máximo de expresión en el estadio 3 correspondiente a 1.5 DIV (Fig. 6C).

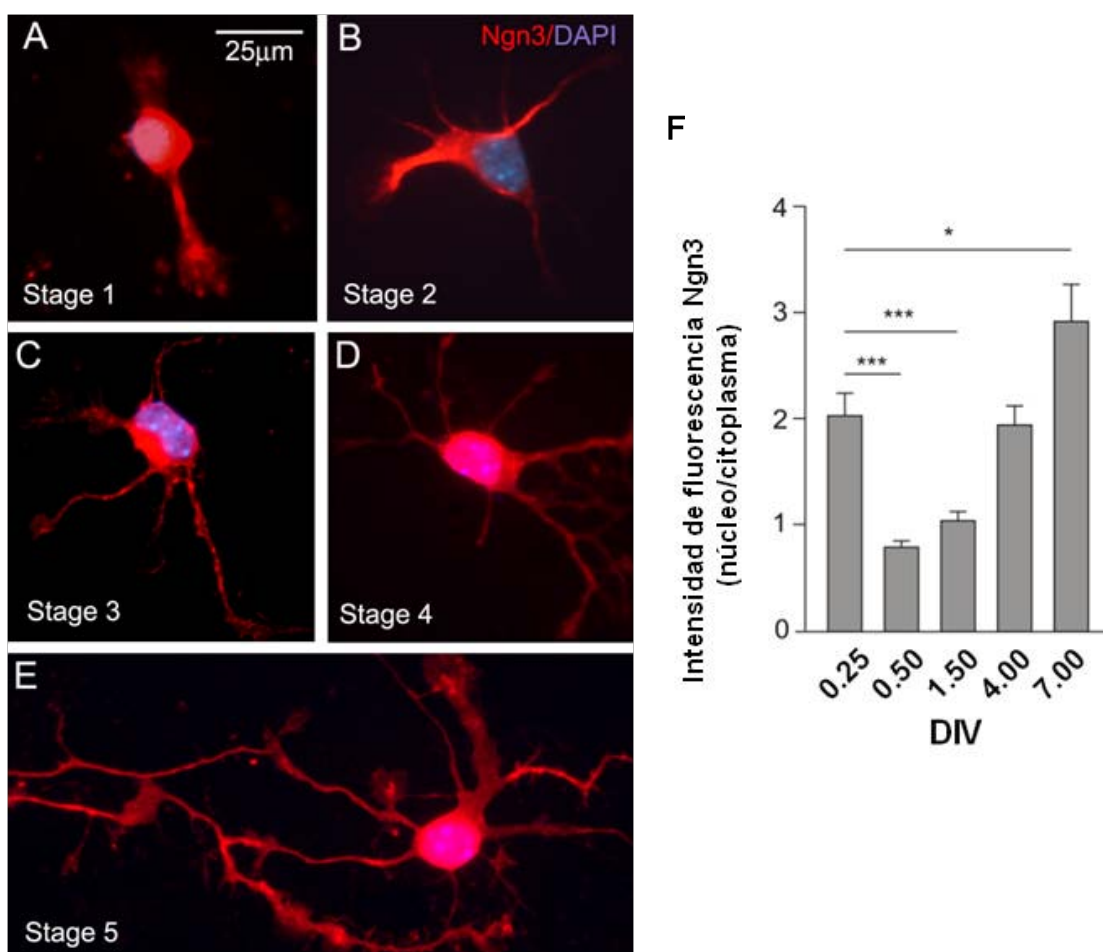
Posteriormente la expresión de *ngn3* disminuyó bruscamente. Sin embargo, el ARNm de *HES1* decayó desde el estadio 1 de 0.25 DIV hasta el estadio 4 de 4 DIV (Fig. 6D). En conjunto los resultados sugieren que la ruta de señalización de Notch y por consiguiente la expresión de *ngn3* está realzada durante la diferenciación neuronal y posteriormente se atenúa.



**Figura 6. Niveles de expresión de *ngn3* y *HES1* durante las diferentes etapas del desarrollo del hipocampo y de las neuronas de hipocampo en cultivo.** **A, B:** Se extrajo el ARN total del hipocampo, se sintetizó el ADNc y la expresión del ARNm de *ngn3* (A) y de *HES1* (B) fue analizada mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. **C, D:** Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>2</sup>. Se extrajo el ARN total a los tiempos en cultivos indicados y se determinaron los niveles del ARNm de *ngn3* (C) y *HES1* (D) por PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* se usó como control interno. Como se puede observar, los cambios de expresión de *ngn3* son opuestos a los de *HES1* durante la diferenciación morfológica de las neuronas y después ambas expresiones disminuyen. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar de la expresión de *ngn3* y *HES1* como porcentaje respecto de la etapa 1. Los niveles de significación representados como \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 proceden de una n=5 y se analizaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni.

### 1.1.4. La distribución subcelular de la Ngn3 depende del desarrollo neuronal

Adicionalmente, se caracterizó la localización subcelular de la Ngn3 en las diferentes etapas de desarrollo de las neuronas del hipocampo en cultivo. El análisis inmunocitoquímico reveló cambios en la distribución de Ngn3 entre el núcleo de la célula y las neuritas durante su desarrollo. En la figura 7 (A-E) se muestran ejemplos de las neuronas expresando Ngn3 en las diferentes etapas de desarrollo del cultivo.



**Figura 7. Distribución subcelular de la Ngn3 durante el desarrollo de las neuronas de hipocampo.** A-E: Se fijaron neuronas hipocámpales de los distintos estadios y se analizaron inmunocitoquímicamente marcando Ngn3 (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Los núcleos color magenta en A, D y E se atribuyen a una elevada concentración nuclear de la Ngn3 en esos estadios. F: Cuantificación de la localización subcelular neuronal de la Ngn3 en citoplasma y en núcleo. Se seleccionaron campos al azar mediante el marcaje con DAPI y se analizó la intensidad del marcaje nuclear de la Ngn3 mediante el programa *Image J 1.37v*. Se consideró expresión nuclear si la intensidad de la fluorescencia fue mayor que la citoplasmática. Se contabilizaron entre 50 y 112 células por estadio procedentes de tres experimentos independientes. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar. Los cambios significativos se determinaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Barra de escala en A aplicable a B-E.

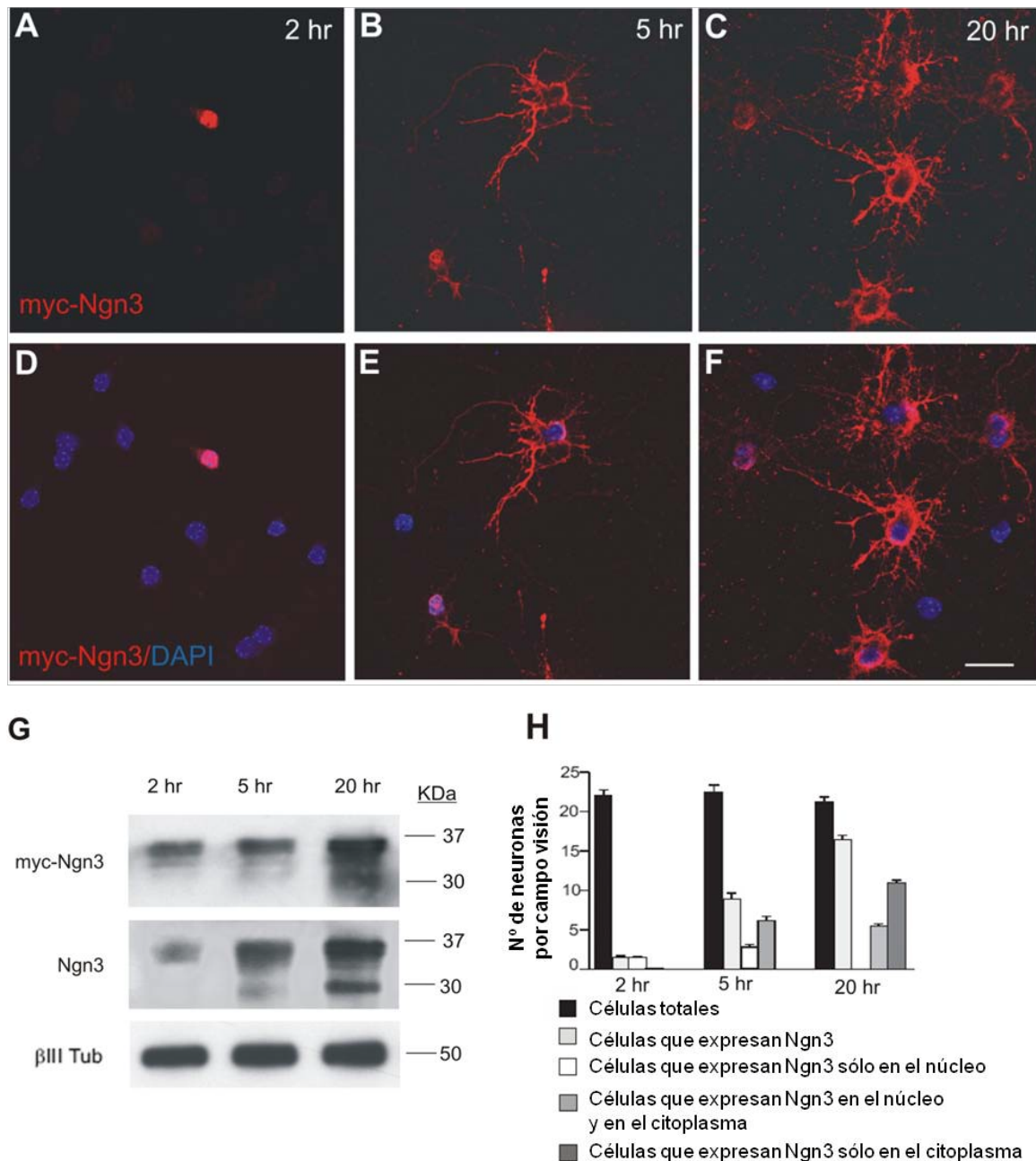
La cuantificación de la intensidad de la inmunoreactividad para Ngn3 en el núcleo y en el citoplasma (Fig. 7F) mostró que la cantidad relativa de proteína en el citoplasma aumenta durante el proceso de polarización neuronal, alcanzando el nivel máximo en el estadio 2 (Fig. 7B) que se corresponde con el inicio de la diferenciación axonal. Al avanzar en el desarrollo, la localización nuclear aumenta progresivamente y al finalizar el mismo, es casi exclusivamente nuclear (Fig. 7E). Este resultado está de acuerdo con el hecho experimental de que en el hipocampo adulto todas las neuronas presenten marcaje de la Ngn3 en el núcleo (Fig. 5N).

## **1.2. RUTA INTRACELULAR DE LA NGN3**

### **1.2.1. Translocación de la Ngn3 del núcleo al citoplasma**

Tras observar que la localización subcelular de la Ngn3 mostraba cambios asociados a la iniciación de la polarización neuronal, el siguiente objetivo fue estudiar la ruta intracelular que sigue la Ngn3. Para ello analizamos el curso temporal de la translocación núcleo-citoplasma de la Ngn3 en neuronas en cultivo infectadas con un virus que produce la sobreexpresión de la proteína myc-Ngn3 (Fig. 8A-F). La producción de la proteína fue confirmada por inmunoblot empleando un anticuerpo anti-myc y otro anti-Ngn3; con ambos anticuerpos se observó el mismo patrón de bandas demostrándose la especificidad de la detección (Fig. 8G). La movilidad de la proteína coincide con la esperada para la proteína recombinante. La presencia de múltiples bandas para la Ngn3 sobreexpresada se había descrito previamente (Wang y cols., 2009), y aunque sugiere la posibilidad de modificaciones postraduccionales de la Ngn3, ni las bases ni las implicaciones de estos hallazgos se conocen en la actualidad.

La observación y cuantificación de las células fijadas a distintos tiempos postinfección 2, 5 y 20 horas y marcadas con el anticuerpo anti-myc, mostró que el número total de neuronas transfectadas no se modifica entre las 2 y 20 horas post-infección, sin embargo, se incrementa el número de neuronas que expresan Ngn3, lo que indica que la sobreexpresión de la proteína no es nociva para estas células (Fig. 8H).



**Figura 8. La localización de la Ngn3 en las neuronas de hipocampo depende de la maduración proteica.** Las neuronas de hipocampo en cultivo se infectaron a los 5 DIV con el virus Sindbis que codifica la myc-Ngn3, tras diferentes tiempos post-transducción (2, 5 y 20 horas) se fijaron las células y se determinó la localización de la expresión mediante el marcaje con un anticuerpo anti-myc, seguido del análisis por microscopía confocal. **A-C:** Imágenes representativas de microscopía confocal de las neuronas transfectadas, marcaje con anti-myc y combinación de este marcaje con DAPI (**D-F**). **G:** Inmunoblot para myc-Ngn3 y Ngn3 en extractos de proteína total procedentes de cultivos paralelos. Se utilizó  $\beta$ -III-tubulina como control de carga interno. **H:** La gráfica representa el número total de neuronas, aquellas que expresan la Ngn3 por campo de visión y una evaluación de la localización subcelular que puede ir desde la exclusiva localización nuclear hasta la citoplasmática. Barra de escala en F 25  $\mu$ m, aplicable a A-E.

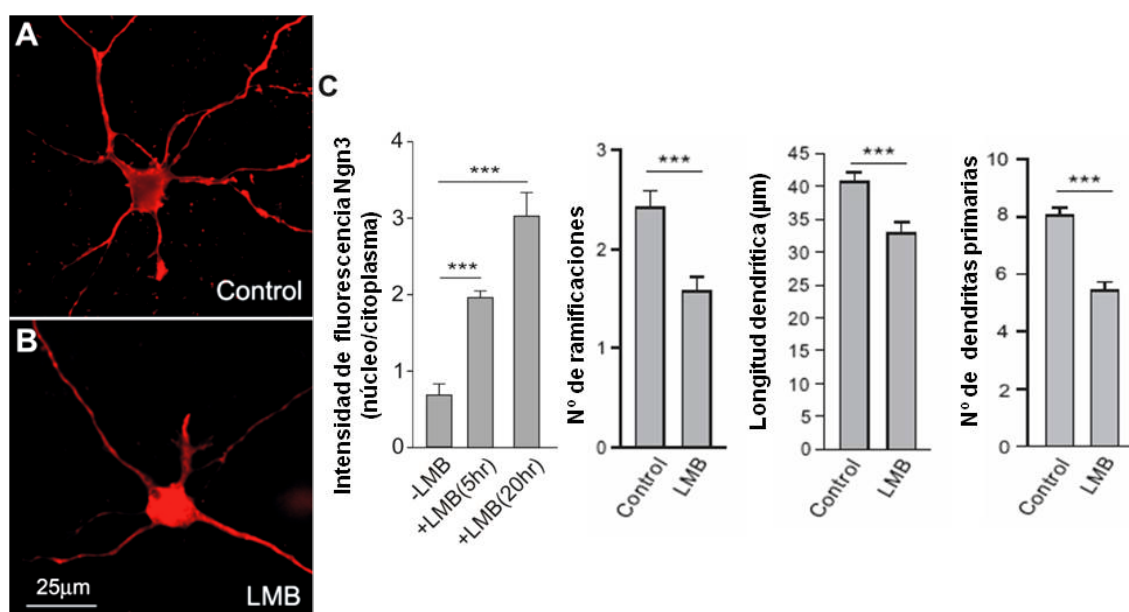
A las dos horas tras la infección la myc-Ngn3 se localizó exclusivamente en el núcleo (Fig. 8A, D), a las cinco horas la expresión de la Ngn3 fue nuclear y citoplasmática (Fig. 8B, E) y, finalmente, veinte horas después de la infección la Ngn3 se localizó mayoritariamente en el



citoplasma (Fig. 8C, F). Estos resultados sugieren que, tras su síntesis en el citoplasma, la Ngn3 sufre una rápida translocación hacia el núcleo y más tarde se re-exporta progresivamente al citoplasma.

### 1.2.2. La exportación nuclear de la Ngn3 depende de la exportina CRM1

La mayoría de las proteínas que se transportan desde el núcleo poseen un tipo de señal de exportación nuclear (NES) rico en leucinas similar al descrito originalmente en la proteína Rev del HIV, que es reconocida específicamente por la exportina CRM1 (Fornerod y cols., 1997). Haciendo uso del programa de predicción de NES, *NetNes* (la Cour y cols., 2004), se identificaron dos posibles aminoácidos claves en la exportación nuclear de la Ngn3, lo que sugería que el transporte nuclear de la proteína es dependiente de CRM1. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la localización subcelular de la Ngn3 en presencia de leptomicina B (LMB), potente inhibidor específico del receptor de la exportación nuclear CRM1 (Nishi y cols., 1994).



**Figura 9. La leptomicinaB induce una acumulación nuclear de la Ngn3 y produce cambios en la morfología de las dendritas primarias en neuronas de hipocampo en cultivo.** Se trataron neuronas de 2 DIV con leptomicinaB (LMB) 20nM durante los tiempos indicados y, posteriormente se realizó una inmunocitoquímica frente a la Ngn3. **A, B:** Micrografías representativas de neuronas control y tratadas con LMB durante 20 horas. **C:** Análisis de la cantidad relativa de Ngn3 en neuronas en cultivo tratadas (+LMB) o no (-LMB) con LMB. Se analizaron entre 50 y 70 células por cada tiempo. En las gráficas se observa un claro descenso del número, ramificaciones y longitud de las dendritas primarias en las neuronas tratadas, así como la acumulación nuclear de Ngn3 dependiente del tiempo de tratamiento con LMB. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar del número de dendritas primarias (las que parten del soma), de las ramificaciones y de la longitud dendrítica de entre 70 y 90 neuronas de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ .

Cuando se trataron las neuronas de 2 DIV con LMB, se observaron cambios en la distribución intracelular de la Ngn3, que se acumulaba progresivamente en el núcleo, y 20 horas después del tratamiento la mayoría de las células presentaban el núcleo ocupado por la Ngn3 (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la ruta principal de exportación nuclear utilizada por la Ngn3 es dependiente de CRM1.

### **1.2.3. La inhibición de CRM1 por la LMB produce alteraciones en el desarrollo de las neuronas hipocampales**

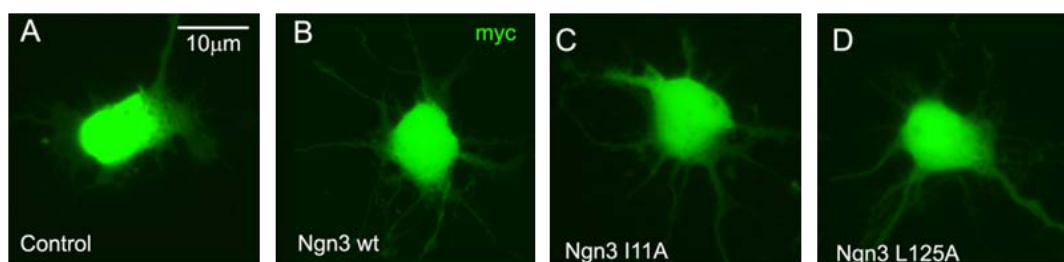
Para determinar si el transporte entre núcleo y citoplasma vía CRM1 interviene en la maduración neuronal, se realizó un análisis microscópico a nivel dendrítico en cultivos de 3 DIV. Las imágenes mostradas en la figura 9 son ejemplos representativos del marcaje con el anticuerpo anti-Ngn3. El análisis cualitativo sugiere que las neuronas tratadas con LMB sufrieron una reducción de su arborización dendrítica (Fig. 9B). Esta observación cualitativa se confirmó mediante análisis cuantitativos del número de dendritas primarias, de sus ramificaciones y de su longitud, realizados a partir de imágenes ampliadas de neuronas aisladas de al menos tres cultivos independientes. Los resultados de este último análisis (Fig. 9C) revelaron que la inhibición de la exportación nuclear vía CRM1 está asociada a la disminución del número, ramificaciones y longitud dendríticas.

## **1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA DE EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA NGN3**

### **1.3.1. Mutaciones puntuales sobre la Ile11 y la Leu125 no afectan a la exportación de la Ngn3**

Con el objetivo de definir la señal de exportación nuclear de la Ngn3 reconocida por CRM1, se realizaron en un primer abordaje dos mutaciones puntuales en los aminoácidos esenciales para la exportación nuclear predichos por el programa *NetNES*, la isoleucina 11 (I11) y la leucina 125 (L125). Ambos fueron sustituidos por alaninas mediante la técnica de PCR usando cebadores diseñados específicamente y el plásmido pCS2-myc-Ngn3 como molde. El producto

de la PCR se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  para su amplificación, se purificó y las mutaciones I11A y L125A se confirmaron por secuenciación.



**Figura 10. Mutaciones puntuales sobre la I11A y la L125A no afectan al exporte nuclear de la Ngn3.** Se transfectoron cultivos de neuronas de hipocampo con plásmidos control (A), que sobreexpresaban la Ngn3 silvestre (B) o la Ngn3 mutante (C, D) y se evaluó si las mutaciones I11A (C) o L125A (D) modificaban la localización subcelular de la Ngn3. Las células transfectoradas se marcaron mediante inmunocitoquímica usando un anticuerpo anti-myc para detectar únicamente la proteína exógena. Ninguna de las mutaciones se asoció con cambios en la localización subcelular. Barra de escala aplicable en B-D.

Estas nuevas construcciones se transfectoraron en cultivos de neuronas del hipocampo y se evaluó si la Ngn3 mutante modificaba su localización subcelular (Fig. 10). Para ello se marcaron mediante inmunocitoquímica las células transfectoradas usando un anticuerpo anti-myc de forma que se pudiese distinguir la proteína exógena mutante de la endógena silvestre. Los resultados mostraron que ninguna de las mutaciones produjo diferencias en la localización subcelular de las Ngn3 mutantes en comparación con la silvestre, por lo que se concluyó que ni la I11 ni la L125 son esenciales para la exportación nuclear.

### 1.3.2. Clonación de las secuencias de exportación nuclear de la Ngn3

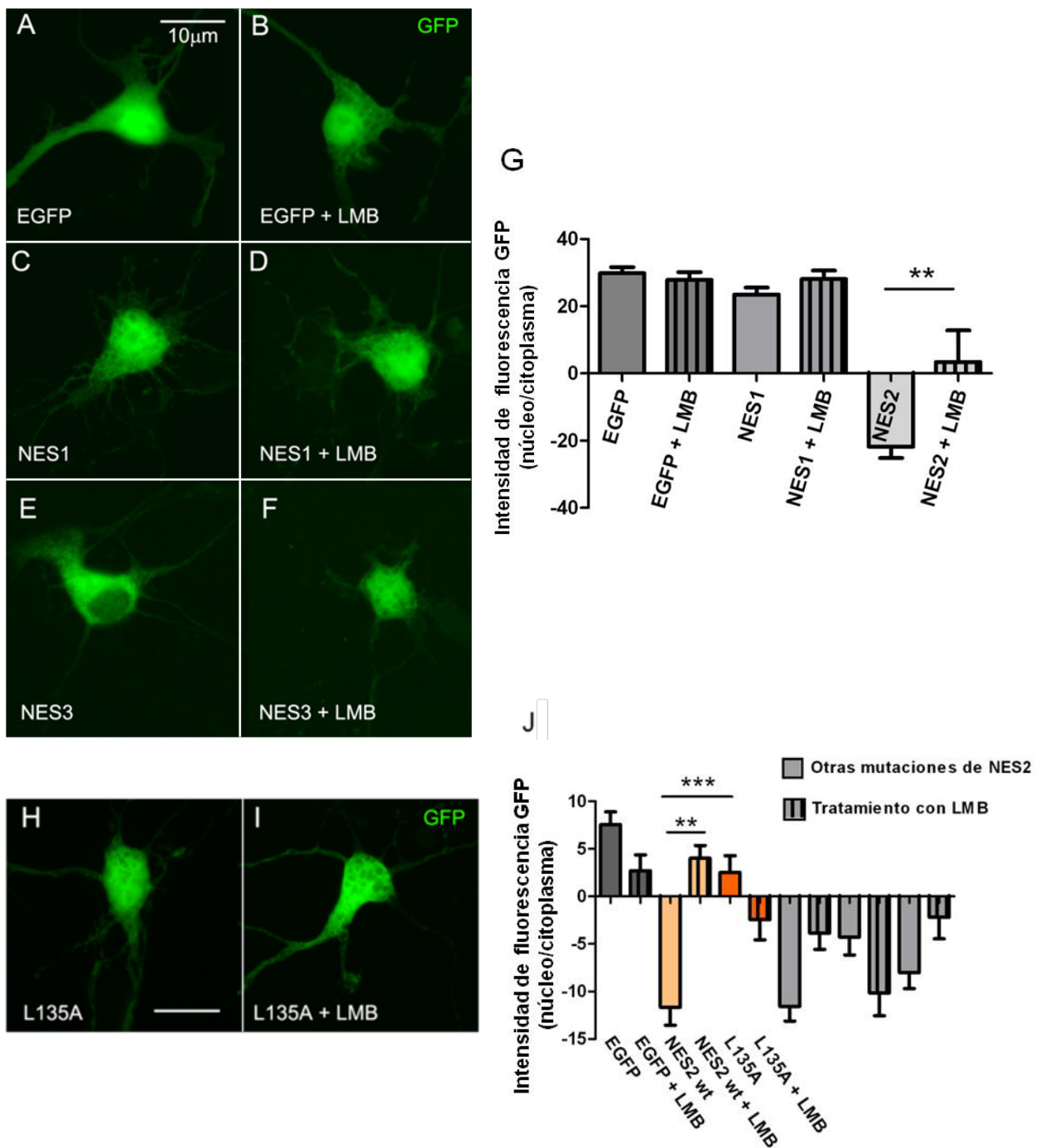
Dado que la mutación de los dos aminoácidos predichos como claves para la exportación nuclear de la Ngn3 no tuvo ningún efecto sobre el transporte de la proteína, se abordó una estrategia diferente consistente en identificar el fragmento o fragmentos completos de la proteína que se unen al receptor CRM1. En concordancia con la definición de las NES mediadas por el receptor CRM1, secuencias de 11 aminoácidos ricas en leucinas, y teniendo en cuenta las predicciones del programa *NetNES*, se realizó un profundo estudio de la secuencia de la Ngn3 con el fin de identificar las posibles NES. Se identificaron dos regiones en la secuencia que se

ajustaban al consenso y que se correspondían con los fragmentos 5-14 y 131-142 de la secuencia de Ngn3 (Fig. 11).

Secuencia consenso	$\Phi_1$ X 2-3	$\Phi_2$ X 2-3	$\Phi_3$ X	$\Phi_4$	
<b>Ngn3-NES1</b>					
Mus Musculus	5	P	L	D A L T I Q V S	14
Rattus norvegicus	5	P	L	D A P T I Q V S	14
<b>Ngn3-NES2</b>					
Mus Musculus	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Rattus norvegicus	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Homo sapiens	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Pongo abelii	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Callithrix jacchus	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Macaca mulatta	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Bos taurus	131	Y	I	W A L T Q T L R I A	142
Ailuropoda melanoleuca	131	Y	I	W A L T Q A L R I A	142
Canis familiaris	131	Y	I	W A L T Q A L R I A	142
Danio rerio	131	Y	I	W A L S E T L R I A	142
Psammomys obesus	132	Y	I	W A P T Q T L R I A	143

**Figura 11. Secuencia consenso de exportación nuclear mediada por CRM1 y conservación evolutiva de las NES presentes en la Ngn3.** X representa a cualquier aminoácido y  $\Phi$  a residuos hidrofóbicos grandes como valina (V), leucina (L) o isoleucina (I), críticos para la exportación nuclear.

Ambos fragmentos fueron clonados en el vector pEGFP-C1 y se transfectaron en neuronas de hipocampo de 2 DIV con el plásmido que sobreexpresa EGFP como control, o con aquellos que sobreexpresan EGFP-NES1 o EGFP-NES2 (Fig. 12 A-F). Al cabo de 16 horas de expresión los cultivos fueron tratados con LMB 10 nM durante 3 horas (Han y cols., 2008) y se realizó un inmunomarcaje frente a EGFP. Se analizó la intensidad relativa de fluorescencia en el núcleo respecto a la citoplasmática, observándose que mientras en las neuronas transfectadas con pEGFP-C1 la fluorescencia se distribuye por igual en núcleo y citoplasma independientemente del tratamiento con LMB, en las neuronas transfectadas con pEGFP-NES1 la intensidad de fluorescencia en el núcleo se incrementaba tras el tratamiento con LMB y en las transfectadas con pEGFP-NES2 en ausencia de LMB se acumula mayoritariamente en el citoplasma, experimentando un desplazamiento hacia el núcleo en presencia del tratamiento con LMB (Fig. 12G), lo que indicaría que la señal de exportación nuclear activa en la Ngn3 es la NES2, constituida por los residuos 131-142



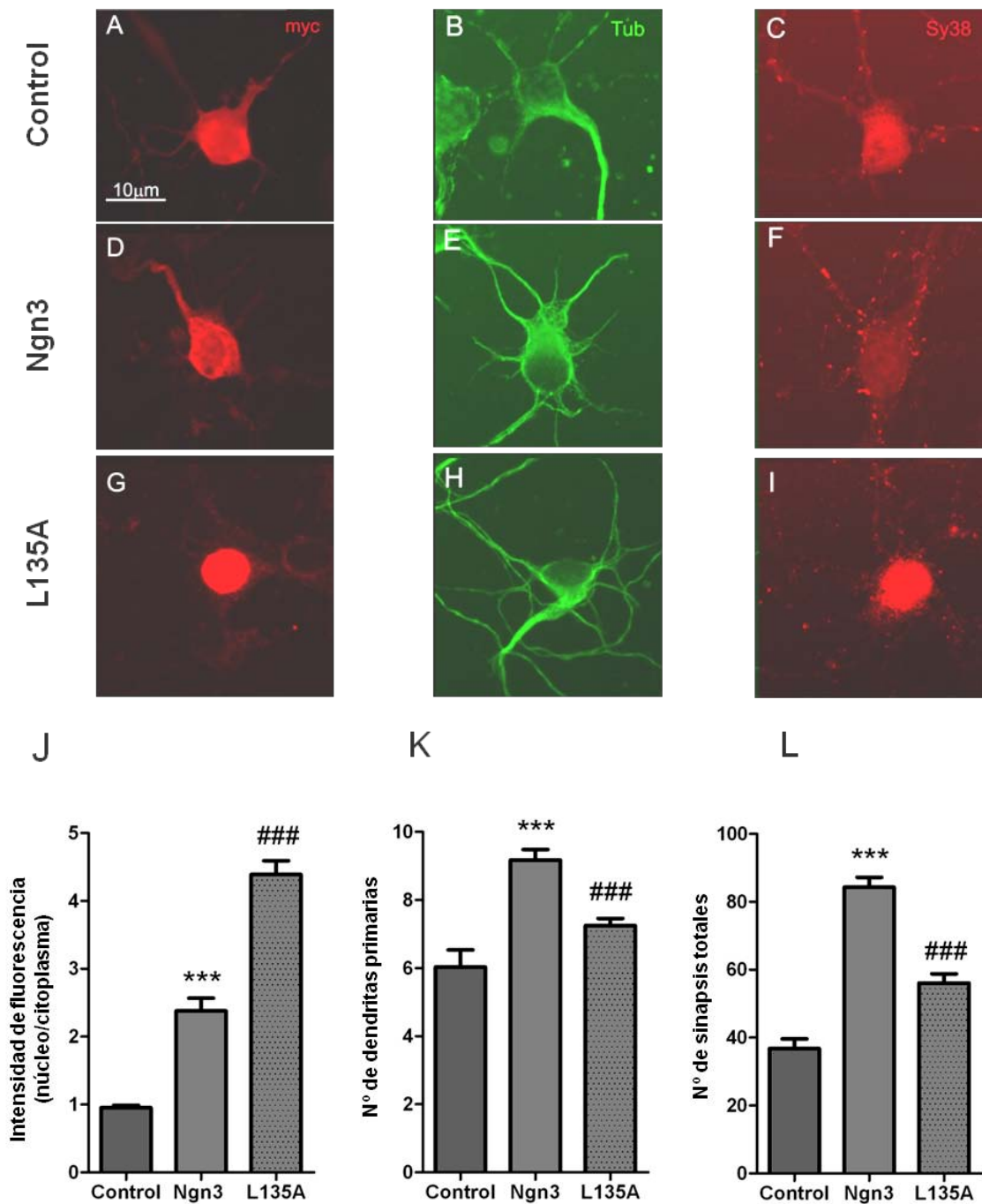
**Figura 12. La L135 es el aminoácido clave para la exportación nuclear.** Se transfectaron cultivos de neuronas de hipocampo a 2 DIV con plásmidos control EGFP (A, B) o plásmidos con las construcciones EGFP-NES1/2 (C-F) o EGFP-NES2 mutantes (H, I), se permitió la expresión durante 16 horas y se trataron 3 horas con LMB 10 nM. Finalmente se analizó la intensidad relativa de fluorescencia en el núcleo respecto a la citoplasmática mediante inmunocitoquímica frente a GFP. En ausencia de LMB (E) la NES2 se acumuló mayoritariamente en el citoplasma cambiando su localización a nuclear en presencia del tratamiento con LMB (F), lo que indicaría que la señal de exportación nuclear activa en la neurogenina3 es la NES2 (G). En el caso de las mutaciones sobre la NES2, la única que consiguió modificar la distribución subcelular de la EGFP-NES2 es la correspondiente a la L135 (H), en el resto de las mutaciones realizadas la localización de la proteína de fusión EGFP-NES2 continuó siendo citoplasmática (J). Barra de escala en A aplicable a B-F, en H 10  $\mu$ m aplicable a I. Los cambios significativos se determinaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.3.3. La leucina 135 es el aminoácido clave para la exportación nuclear de EGFP-NES2

A fin de identificar el aminoácido clave para la exportación nuclear de la Ngn3 se realizaron mutaciones puntuales, de sustitución, en la proteína de fusión EGFP-NES2 sobre las leucinas e isoleucinas, teóricamente fundamentales para el reconocimiento de la NES2 por el CRM-1. Una vez clonadas las secuencias con las correspondientes mutaciones se transfectaron en neuronas de hipocampo a 2 DIV con el plásmido que sobreexpresaba EGFP y EGFP-NES2 como controles, o con aquellos que sobreexpresaban los correspondientes mutantes de EGFP-NES2 (Fig. 12H, I). Se permitió la expresión durante 16 horas, transcurridas las cuales, las neuronas se trataron con LMB 10 nM durante 3 horas y finalmente se procedió al inmunomarcaje frente a EGFP. Tras la adquisición de imágenes de fluorescencia se llevó a cabo el análisis de la intensidad relativa de fluorescencia en el núcleo respecto al citoplasma. Como se puede observar en la figura 12J, la única mutación que consiguió modificar la distribución subcelular de la EGFP-NES2 fue la que se realizó sobre la leucina 135 de la secuencia de la Ngn3 o la leucina 1 de la NES2, sin que se observara ningún efecto del resto de mutantes sobre la localización de la proteína de fusión EGFP-NES2, en los que continuó siendo citoplasmática.

### 1.3.4. Efectos de la mutación L135A de Ngn3 en la morfología neuronal

Para corroborar la identificación del aminoácido clave para la exportación nuclear se sustituyó la leucina 135 por una alanina (variante L135A) en la secuencia completa de la Ngn3 utilizando como molde el plásmido pCS2-myc-Ngn3. El plásmido con el mutante de la Ngn3 fue transfectado en cultivos de neuronas de hipocampo de 3 DIV y 4 DIV (Fig. 13 A-I) y se procedió al análisis inmunocitoquímico de la localización subcelular de la proteína, observándose que la localización nuclear de la Ngn3 mutante era mayor que la Ngn3 silvestre. Asimismo, la expresión de la Ngn3-L135A indujo en las neuronas cambios morfológicos muy significativos en el número de dendritas primarias y en el número de sinapsis totales, siendo éstos notablemente inferiores a los presentes en la neuronas que sobreexpresaban la Ngn3 silvestre aunque mayores que los del control (Fig. 13 J-L).



**Figura 13. La mutación puntual en la L135A de Ngn3 afecta a la morfología de las neuronas de hipocampo.** Se transfectoron en cultivos de neuronas de hipocampo plásmidos control que sobreexpresaban myc (A-C), o plásmidos que sobreexpresaban la myc-Ngn3 silvestre (D-F) o la variante myc-Ngn3-L135A (G-I) y se evaluó, mediante inmunocitoquímica frente a myc, si dicha mutación modificaba el exporte núcleo-citoplasma. Se observó que la localización nuclear de la Ngn3 mutante fue superior que en la Ngn3 silvestre (J) lo que llevó asociados cambios morfológicos que afectaron al número de dendritas primarias (K) y sinapsis (L) siendo éstos notablemente inferiores a los presentes en las neuronas que sobreexpresaban la Ngn3 silvestre aunque mayores que los del control. Barra de escala en A aplicable a B-I. Los cambios significativos se determinaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni, \*\*\*p<0.001 respecto de las neuronas control, ###p<0.001 respecto de las neuronas que sobreexpresan Ngn3.

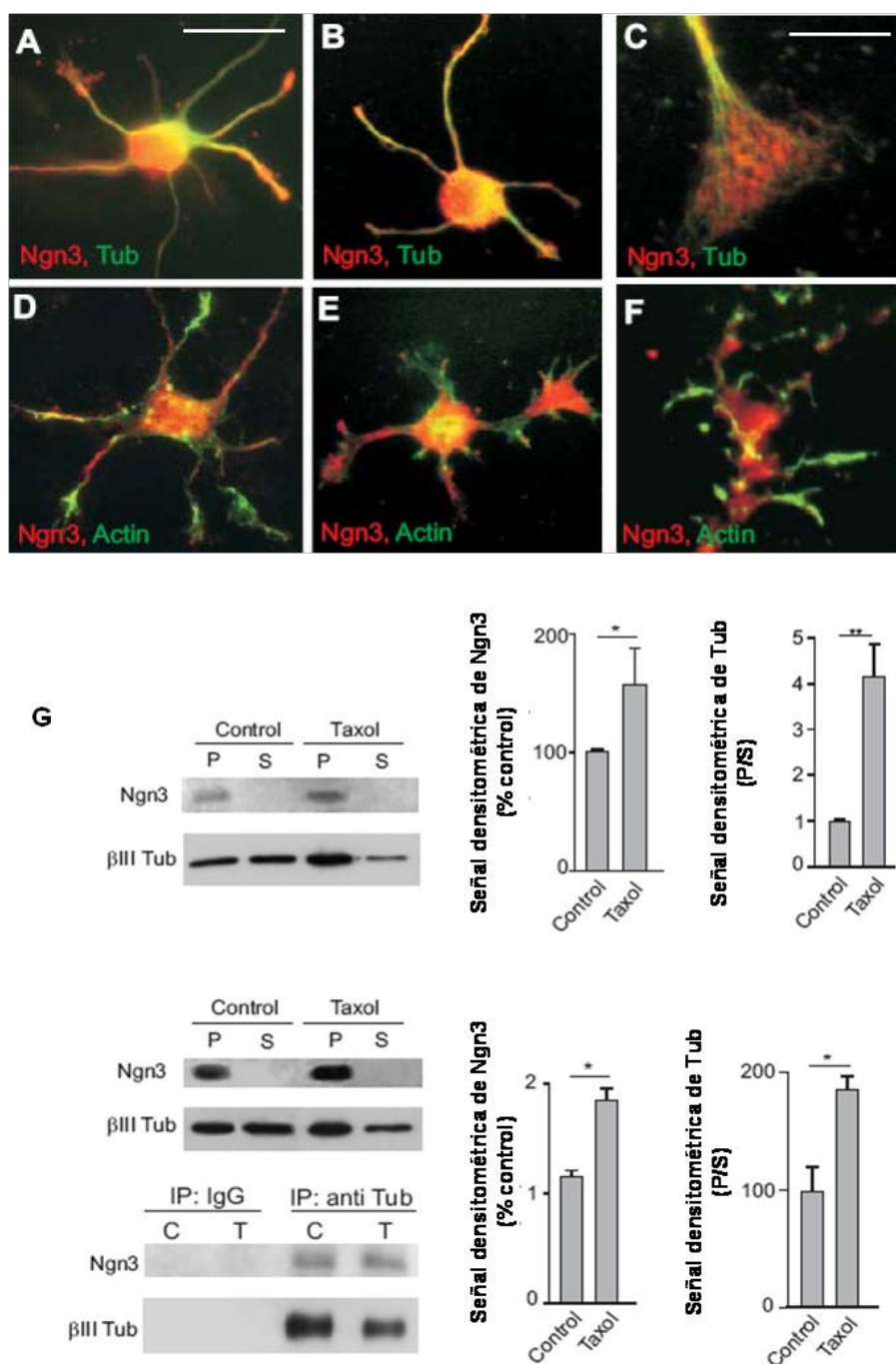


## 1.4. FUNCIÓN CITOPLASMÁTICA DE LA NGN3

### 1.4.1. La Ngn3 colocaliza con los MTs pero no con los filamentos de actina en las neuronas del hipocampo

La secuencia primaria de la Ngn3 se analizó con el programa *PSORTII*, alojado en el servidor del NCBI. obteniéndose una predicción moderada de localización citoesquelética. Este dato, junto con la demostración experimental de su localización e impacto sobre las dendritas, nos llevó a analizar si la Ngn3 se asocia con componentes del citoesqueleto. Mediante inmunocitoquímica se halló que la Ngn3 colocaliza con los MTs (Fig. 14 A) pero no con los filamentos de actina (Fig. 14 D), que se encuentran en mayor cantidad en los conos de crecimiento neuronales. La perturbación farmacológica del citoesqueleto de los conos de crecimiento producida por el tratamiento con citocalasina D, que despolimeriza los filamentos de actina y permite el avance de los MTs a la periferia del cono de crecimiento, indujo una fuerte focalización de la Ngn3 a lo largo de las dendritas y de sus extremos (Fig. 14B, C). Sin embargo, tras el tratamiento con nocodazol, que despolimeriza los MTs, no se detectó asociación alguna entre la Ngn3 y los filamentos de actina (Fig. 14E, F). Para confirmar la asociación entre la Ngn3 y los MTs, se trataron los cultivos neuronales con taxol, que estabiliza los MTs polimerizados, y la presencia de la Ngn3 se determinó en la fracción soluble e insoluble de los lisados celulares. El tratamiento provocó un aumento de la concentración de la Ngn3 en la fracción insoluble, lo que indica que la Ngn3 se asocia a los MTs (Fig. 14G, panel superior). Para correlacionar la localización de la Ngn3 con el grado de polimerización de la tubulina, las muestras se analizaron utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina. Los resultados mostraron que en condiciones control la  $\beta$ -III-tubulina se distribuye por igual en la fracción soluble e insoluble, mientras que en las muestras tratadas con taxol la fracción insoluble está enriquecida en  $\beta$ -III-tubulina (Fig. 14G, panel inferior). En ambas condiciones la Ngn3 fue detectada sólo en la fracción insoluble. Resultados similares se obtuvieron analizando la distribución de ambas proteínas en la fracción soluble e insoluble de homogeneizados de cerebros completos tratados y no tratados con taxol (Fig. 14H).



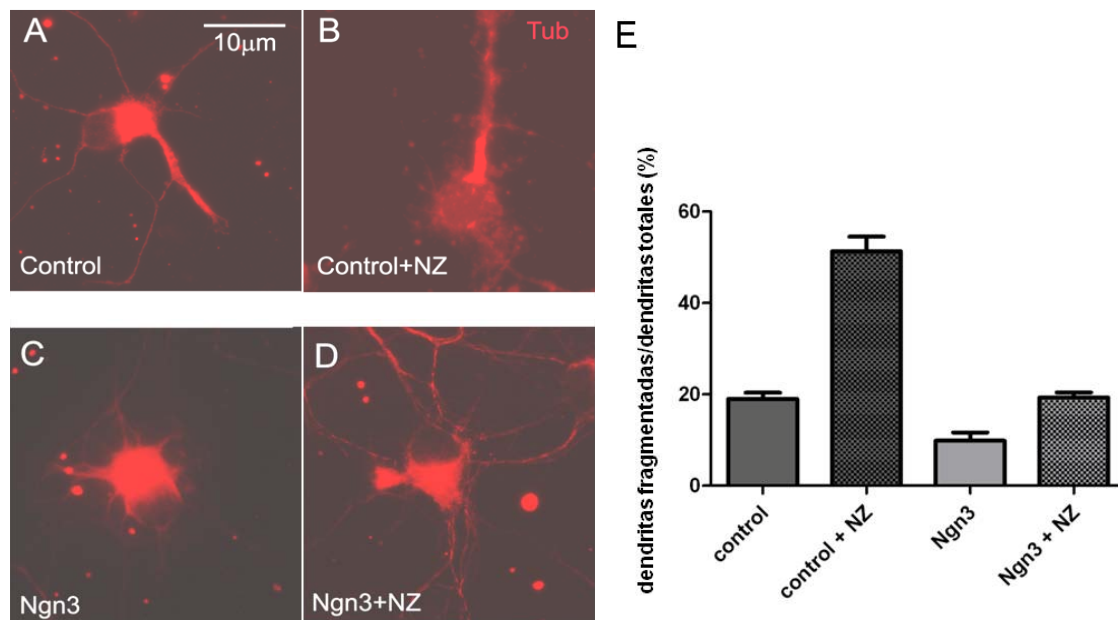


**Figura 14. La interrupción farmacológica del citoesqueleto indica que la Ngn3 se asocia a la tubulina y a los MTs.** (A-F) Se trataron neuronas de 3 DIV con: DMSO (control), nocodazol 17  $\mu$ M o citocalasina D 4  $\mu$ M durante 20 minutos. Tras el tratamiento se realizó la inmunocitoquímica frente a la Ngn3 (rojo) y tubulina (verde), los filamentos de actina se marcaron con faloidina (verde). (A, D) Controles, (B) Neurona tratada con citocalasina D y (E) tratada con nocodazol. Barra de escala 25  $\mu$ m. (C, F) Detalle de los conos de crecimiento de neuronas tratadas con citocalasina D (C) y nocodazol (F). Barra de escala 10  $\mu$ m. Se observó asociación de la Ngn3 con los MTs en las neuronas tratadas con citocalasina D. Tras el tratamiento con nocodazol no se observó asociación alguna entre los filamentos de actina y la Ngn3. (G) Se trataron neuronas en cultivo con taxol 20  $\mu$ M durante 40 minutos, se lisaron y centrifugaron. Las proteínas presentes en el sedimento, que contiene los MTs y las proteínas asociadas (P) y el sobrenadante (S) se analizaron por inmunoblot. La Ngn3 se encuentra sólo en la fracción insoluble y su concentración aumenta al hacerlo la tubulina polimerizada. (H) Los cerebros de embriones de ratón homogeneizados se centrifugaron a alta velocidad y se resuspendieron para tratarlos o no con taxol y analizar por inmunoblot la fracción soluble (S) y la insoluble (P). (I) La interacción Ngn3-Tubulina soluble se analizó por inmunoprecipitación (IP) de los sobrenadantes (S) con un anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina (o IgG en el caso del control) y el inmunoprecipitado se analizó por inmunoblot con el anticuerpo anti-Ngn3. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la cuantificación densitométrica de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante *t*-test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

En ambos casos la Ngn3 fue detectada en los precipitados y estuvo ausente en los sobrenadantes, lo que se debió a que la concentración de la proteína en los sobrenadantes se encontraba por debajo del límite de detección. La interacción entre la tubulina soluble y la Ngn3 se observó mediante un ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina a partir de los sobrenadantes de alta velocidad, tras el cual se realizó un inmunoblot de los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Ngn3. (Fig. 14I). Las gráficas de la figura 14 representan la cantidad relativa de la Ngn3 y la distribución de  $\beta$ -tubulina en las fracciones solubles e insolubles bajo las dos condiciones experimentales estudiadas. Todas estas observaciones sugieren que la Ngn3 endógena se asocia a los MTs.

#### 1.4.2. La Ngn3 protege a los MTs de la despolimerización

Con el fin de indagar en la función de la Ngn3 en su asociación con el citoesqueleto, y más concretamente con los MTs, nos propusimos analizar los posibles efectos de la sobreexpresión de la Ngn3 en neuronas de 3 DIV y posteriormente tratadas con nocodazol.



**Figura 15. La Ngn3 protege de la despolimerización provocada por el nocodazol.** Se transfectaron neuronas de hipocampo de 3 DIV con plásmidos control que sobreexpresaban myc (A, B) o plásmidos que sobreexpresaban *myc-ngn3* (C, D) y posteriormente se trataron con nocodazol (NZ, B y D). En las neuronas que sobreexpresaban el plásmido control y en ausencia del nocodazol se observó un 20% de dendritas fragmentadas (A). En las neuronas que sobreexpresaban *ngn3* y en ausencia de nocodazol (C) este porcentaje se redujo a la mitad. Entre las neuronas control tratadas con nocodazol (B) y las neuronas que sobreexpresaban *ngn3* tratadas con nocodazol (D) las diferencias fueron muy significativas. Barra de escala en A 10 μm aplicable a B-D. Los cambios significativos se determinaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni, \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto de neuronas control, #  $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  respecto de neuronas que sobreexpresan *ngn3*.

La despolimerización de los microtúbulos se cuantificó mediante un análisis de la fragmentación de las dendritas primarias frente al número total de dendritas primarias. En las neuronas que sobreexpresaban el plásmido control y en ausencia del nocodazol había un 20% de dendritas fragmentadas (Fig. 15A), mientras que en las neuronas que sobreexpresaban *ngn3* y en ausencia de nocodazol (Fig. 15C) el porcentaje se redujo a la mitad. Entre las neuronas control tratadas con nocodazol (Fig. 15B) y las neuronas que sobreexpresaban *ngn3* tratadas con nocodazol (Fig. 15D) las diferencias fueron aun más llamativas, tal y como se observa en la figura 15E.

## 2. ESTUDIO DE LOS GENES CONTROLADOS POR LA NGN3

### 2.1. ANÁLISIS DE MICROARRAYS

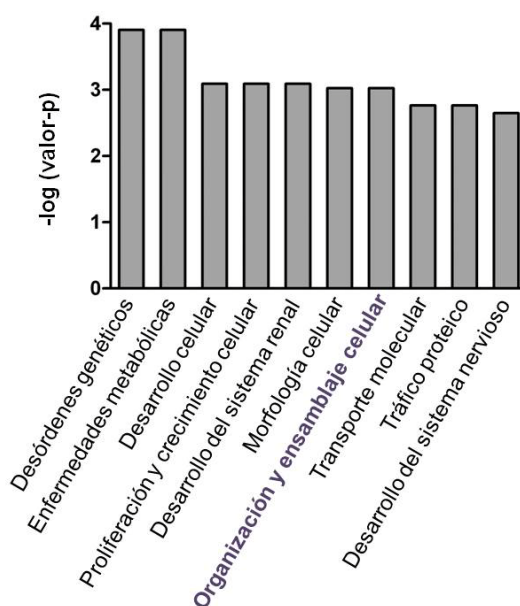
La Ngn3 localizada en el núcleo, actúa como un factor de transcripción que puede activar o reprimir genes relacionados con la diferenciación de las neuronas. Para investigar este aspecto funcional, se construyó un vector viral, que expresaba *ngn3* con una alta tasa de infección en neuronas en cultivo para realizar estudios de transcriptómica. Con el ARN total extraído de dichas neuronas y el de un cultivo paralelo infectado con el mismo virus expresando la proteína verde fluorescente (GFP) como control, se realizó un estudio comparado de la expresión génica utilizando microarrays de ADN. Asumiendo una tasa de falsos positivos del 5%, los resultados mostraron que la expresión de 324 genes estaba significativamente alterada, siendo 86 de ellos activados y 138 reprimidos.

Posteriormente, los genes regulados por la Ngn3 se organizaron según las funciones que éstos realizan, para comprender mejor el perfil regulatorio de la Ngn3. La caracterización funcional de los datos se representa en la figura 16 que muestra las diez principales rutas de señalización que regula la Ngn3.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN NGN3-FMN1

### 2.2.1. La Ngn3 regula la expresión génica de forminal

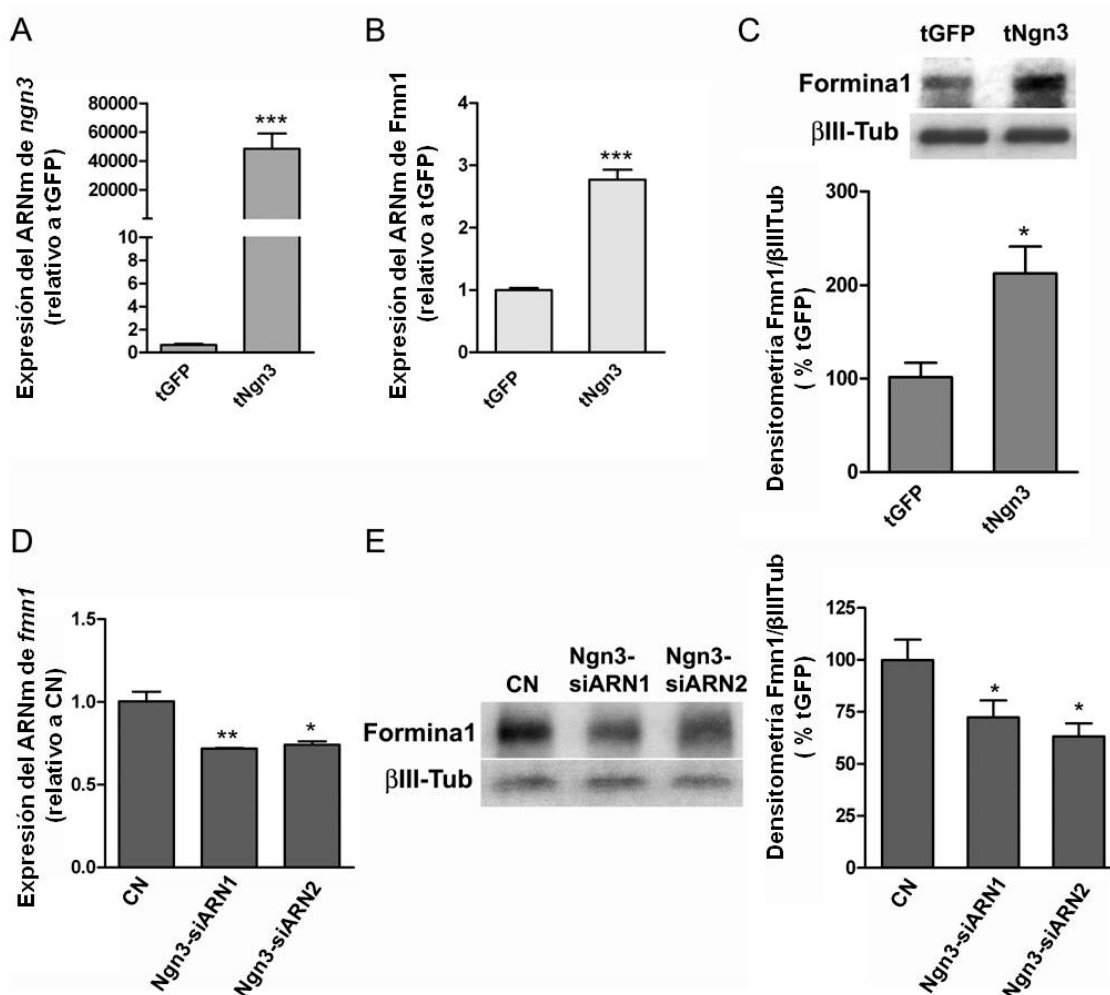
Tras el análisis de los microarrays se observó que uno de los genes controlados por el factor de transcripción Ngn3 es *fmn1*, que pertenece al grupo de genes asociados con la organización y ensamblaje celular (Fig. 16).



**Figura 16. Principales rutas de señalización reguladas por Ngn3.** Para el análisis funcional de los genes se calculó mediante el test de Fischer el valor p (representado por barras) que determina la probabilidad de que la función biológica asignada sea debida a la casualidad.

La proteína Fmn1 interviene en la nucleación y polimerización de los filamentos de actina, funciones directamente asociadas a la dendritogénesis, por lo que se seleccionó el gen *fmn1* de entre todos los posibles genes regulados por la Ngn3. No obstante, la función de la Fmn1 en el sistema nervioso aun no está completamente esclarecida. La expresión diferencial de *fmn1* detectada en el microarray se confirmó mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real o inmunoblot en el caso del nivel proteico de Fmn1. Para ello se transdujeron neuronas de hipocampo en cultivo con virus Sindbis que expresaban *ngn3* o *GFP* y se analizaron los niveles de expresión de ARNm y proteína en extractos de ambas muestras. Mediante la técnica de PCR cuantitativa se verificó que los virus que expresaban *ngn3* produjeron un aumento muy significativo en los niveles de expresión del ARNm de *ngn3* (Fig. 17A). Además indujeron un aumento en la expresión del ARNm de *fmn1* y en la cantidad de la proteína Fmn1 (Fig. 17B, C).

Inversamente, el bloqueo del gen *ngn3* mediante oligonucleótidos interferentes siARNs condujo a una reducción significativa de los niveles del ARNm de *fmn1* y de la proteína forminal1 (Fig. 17D, E).

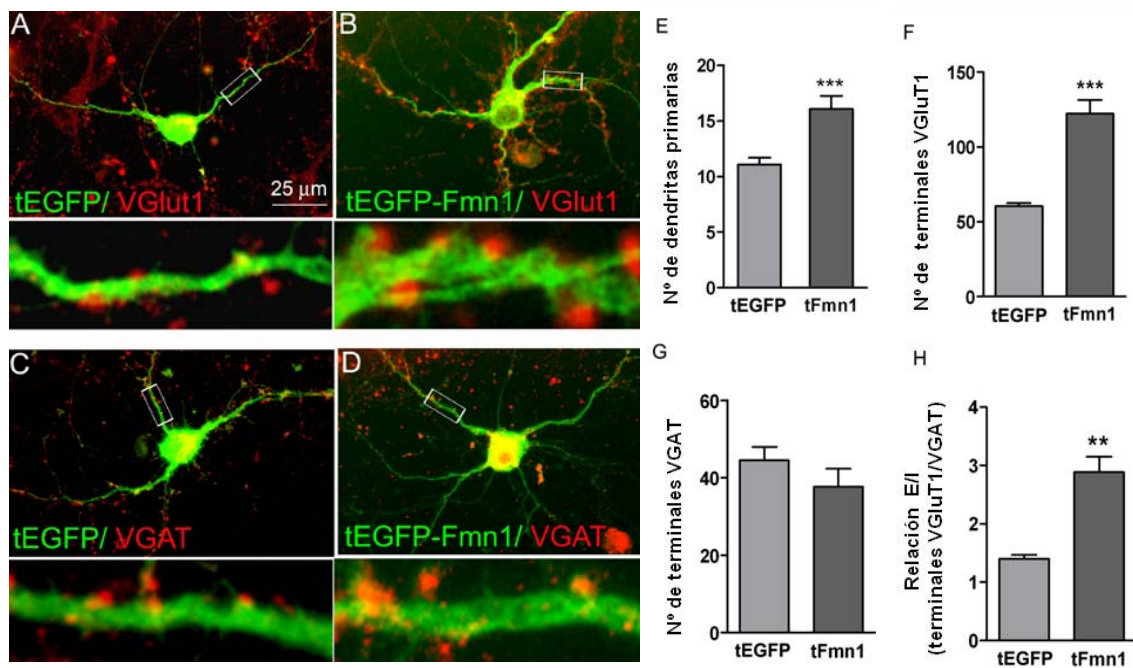


**Figura 17. Expresión diferencial del ARNm y proteína codificados por *fmn1* en neuronas que sobreexpresan *GFP* o *ngn3*.** Se infectaron neuronas de hipocampo de 5 DIV con virus Sindbis que expresaban *Ngn3* o *GFP* y se analizaron los niveles de expresión de los ARNm de *ngn3* y *fmn1* en extractos de ambos cultivos. (A, B) Expresión genética relativa de *ngn3* y *fmn1* determinada por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. (C) Los niveles de la proteína *Fmn1* tras la sobreexpresión de *ngn3* se determinaron por inmunoblot, empleando como control de carga se utilizó la β-III-tubulina. (D) De forma paralela se nucleofectaron mediante el electroporador Amaxa en neuronas de hipocampo en cultivo siARNs dirigidos frente al gen *ngn3* o sus correspondientes controles negativos (CN) y posteriormente se evaluó la expresión del ARNm de *fmn1*. (E) Los niveles de la proteína *Fmn1* tras la bajada de *ngn3* se determinaron por inmunoblot, empleando como control de carga se utilizó la β-III-tubulina. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante el test t de Student; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### 2.2.2. La sobreexpresión de *fmn1* cambia la morfología dendrítica de las neuronas del hipocampo

En estudios previos se había observado que la sobreexpresión de *ngn3* estimula el desarrollo de nuevas dendritas en neuronas de hipocampo en cultivo (Salama-Cohen y cols., 2006).

Además, la adición de NGF a los cultivos inhibe la expresión del ARNm de *ngn3* y consecuentemente las neuronas desarrollan menos dendritas primarias y secundarias. Puesto que la sobreexpresión de *ngn3* eleva la expresión de *fmn1*, se decidió analizar los posibles efectos de la Fmn1 sobre el desarrollo de las neuronas de hipocampo. Con este propósito, se transfectaron neuronas de hipocampo en cultivo con los vectores que expresaban *EGFP-fmn1-Ib* o *EGFP* (Fig. 18A-D). Como era de esperar la proteína de fusión EGFP-Fmn1 no presentó localización nuclear. Sin embargo se observó una clara estimulación de la iniciación dendrítica, puesto que tras 16 horas de expresión proteica el número de dendritas primarias fue un 50% mayor en las células que expresaban *EGFP-fmn1* respecto del control que expresaba *EGFP* (Fig. 18E).



**Figura 18. Efectos de la sobreexpresión de *fmn1-Ib* en la morfología y sinaptogénesis de neuronas de hipocampo en cultivo.** Se transfectaron neuronas de 3 DIV con plásmidos que expresaban *EGFP* (A, C) o *EGFP-fmn1-Ib* (B, D) y se analizaron los cambios en las sinapsis y en la morfología neuronal mediante marcaje inmunocitoquímico frente a GFP, VGlut1 o VGAT. (A-D) Imágenes representativas de las inmunofluorescencias, en verde (GFP) se marcaron las neuronas transfectadas y sus contactos sinápticos se marcaron en rojo (VGlut1 o VGAT). Barra de escala de 25 μm. Los paneles inferiores detallan la zona seleccionada. (E) Representación del número de dendritas primarias. El recuento de las terminales VGlut1 positivas (F) y VGAT positivas (G) de las neuronas de las imágenes se realizó dentro de una región circular de 50 μm de diámetro centrada en el soma neuronal. (H) Relación de excitación/inhibición (E/I) del número de terminales sinápticos. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar de 60-75 neuronas por condición de cultivo y de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante el test t de Student; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

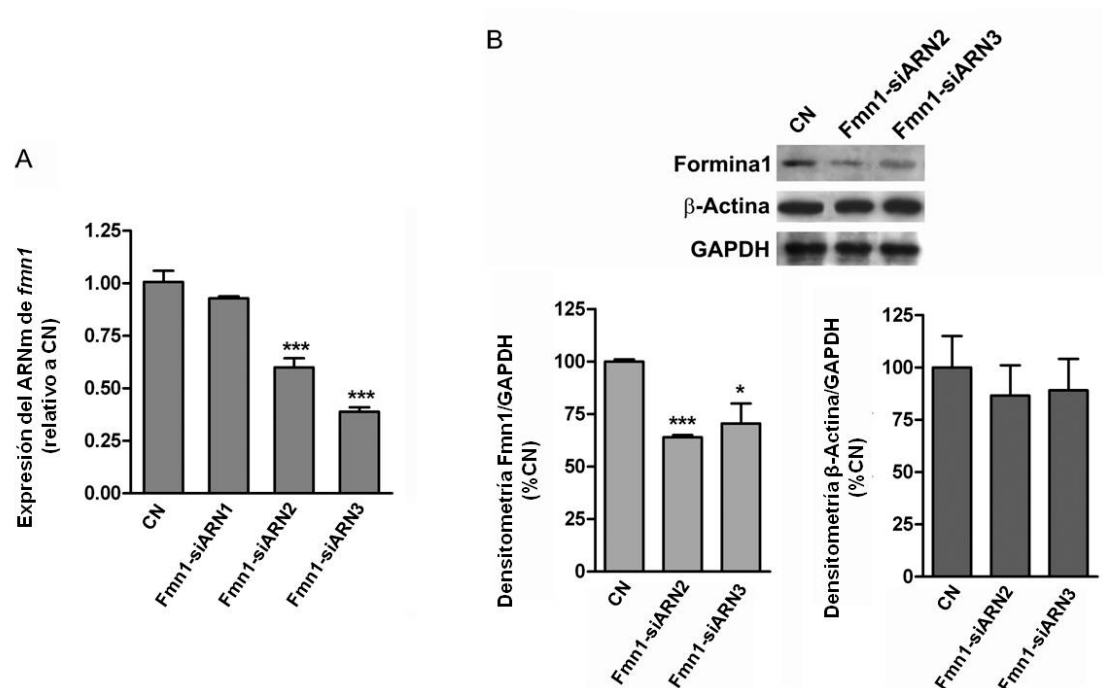


### **2.2.3. La sobreexpresión de *fmn1* aumenta el número de sinapsis glutamatérgicas sin modificar el número de terminales inhibitorios**

Puesto que la sobreexpresión de *ngn3* modificaba tanto el número de dendritas primarias como el número de sinapsis y además aumentaba la expresión de *fmn1* y la sobreexpresión de ésta modificaba el número de dendritas primarias, nos propusimos estudiar si la sobreexpresión de *fmn1* afectaba también a las conexiones sinápticas presentes en dichas neuronas. El estudio se realizó mediante inmunomarcaje específico de los transportadores de las vesículas de los terminales glutamatérgicos (VGLUT1) o GABAérgicos (VGAT) en neuronas que sobreexpresaban *EGFP* o *EGFP-fmn1*. Para que el número de sinapsis no se viera afectado por cambios en la densidad del cultivo, todos los experimentos se realizaron con una densidad celular que permitía a las neuronas tener una red sináptica apropiada y equivalente en todos los casos (Fig. 18A-D). Las neuronas respondieron a la sobre-expresión de *EGFP-fmn1* con un aumento significativo del número de los terminales sinápticos glutamatérgicos (Fig. 18F), mientras que los GABAérgicos (Fig. 18G) no se vieron afectados. Esto supone un incremento en la razón excitación/inhibición de estas neuronas y por tanto un aumento en su actividad neuronal (Fig. 18H).

### **2.2.4. La *Fmn1* media los efectos de la *Ngn3* sobre la morfología y aporte sináptico en neuronas de hipocampo en cultivo**

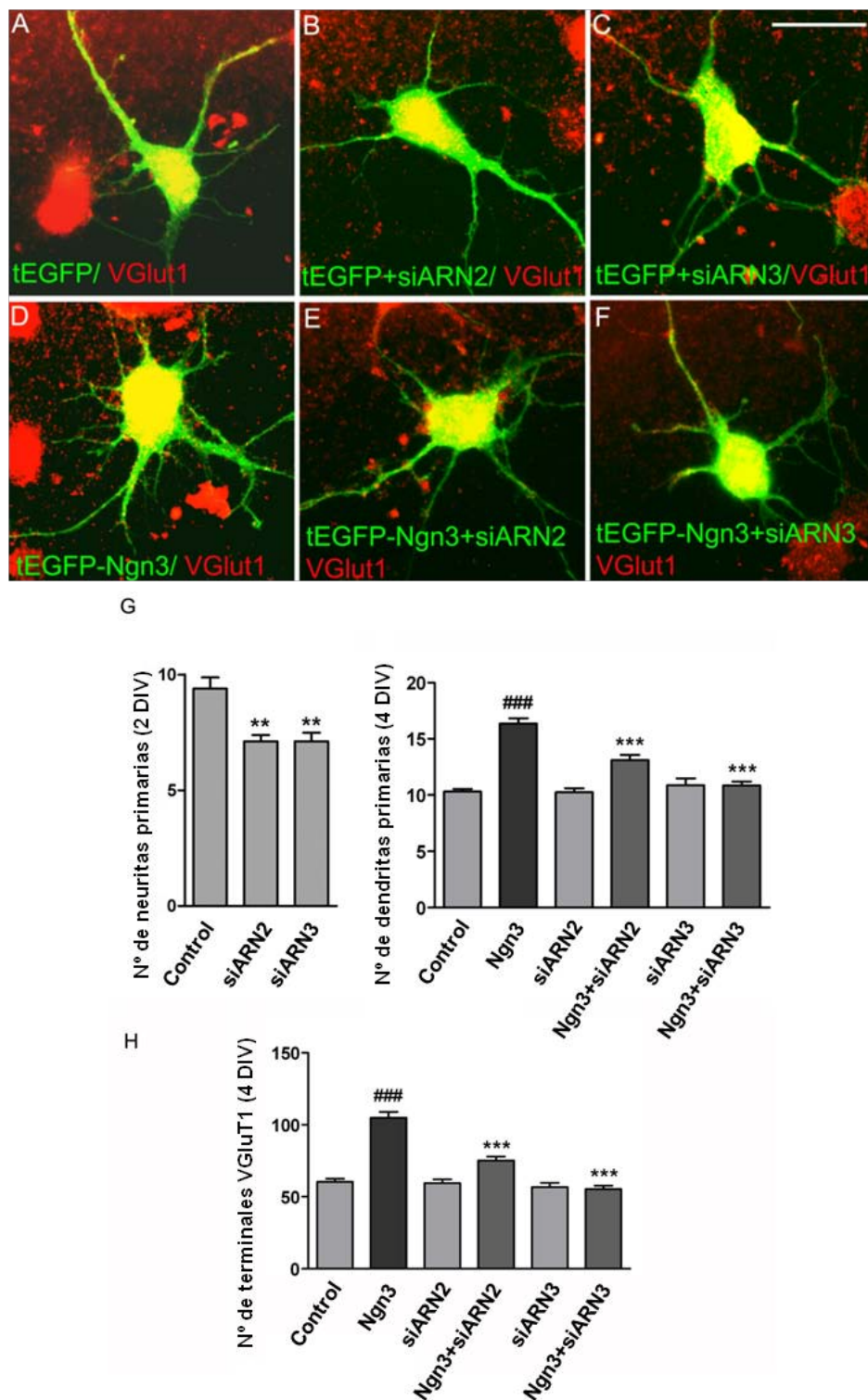
Los datos anteriores nos sugerían que los cambios observados en las neuronas que sobreexpresan *ngn3* podrían ser atribuidos, al menos en parte, a cambios en la expresión de *fmn1*. Para confirmar esta hipótesis modificamos la expresión de la formina1 mediante el uso de siARNs y analizamos la morfología y aporte sináptico de las neuronas transfectadas con los siARNs del gen *fmn1*. Se utilizaron tres siARNs dirigidos hacia distintas secuencias del gen de la formina1 para determinar su capacidad de disminuir la expresión génica. Dos de los tres siARNs (siARN2 y siARN3) fueron capaces de disminuir significativa y específicamente la expresión del ARNm del *fmn1* (Fig. 19A), y la cantidad de la proteína Fmn1 (Fig. 19B).



**Figura 19. Efectos de los siARNs en los niveles de expresión de los ARNm de *fmn1-Ib* y de  $\beta$ -Actina.** Se nucleofectaron células disociadas de hipocampos de ratón de E17 con siARNs dirigidos contra el gen *fmn1* (siARN1, siRNA2 and siARN3) y un siARN sin diana como control negativo (CN) de la interferencia. **(A)** Expresión del ARNm de *fmn1* en las diferentes condiciones experimentales. Los *Fmn1*-siARN2 y *Fmn1*-siARN3 disminuyeron la expresión del gen diana, al contrario que el *Fmn1*-siARN1. **(B)** Representación de los niveles de las proteínas formina1 y  $\beta$ -actina después de la interferencia del gen *fmn1* analizadas mediante inmunoblot, empleando como control de carga se utilizó la GAPDH. En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica como la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante el test t de Student; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Seguidamente los cultivos fueron cotransfectados con los siARNs y plásmidos que expresaban *EGFP* (Fig. 20A-C) o *EGFP* y *ngn3* (Fig. 20E-F) y se realizó un análisis morfológico y sináptico de dichos cultivos neuronales. La evaluación morfológica reveló que la adición a 1DIV de los interferentes específicos de *fmn1* a neuronas que expresaban únicamente *EGFP* indujo un descenso en el número de neuritas en neuronas de 2 DIV (Fig. 20G). Para analizar el aporte sináptico la transfección de los siARNs se realizó a 3 DIV y las evaluaciones morfológicas y sinápticas se realizaron a 4 DIV (Fig. 20A-F). Bajo estas condiciones la sobreexpresión de *ngn3* provocó un aumento en el número de dendritas primarias (Fig. 20G) y de las sinapsis glutamatérgicas. (Fig. 20H). La adición de los interferentes siARN2 y siARN3 en las neuronas que sobreexpresaban sólo *EGFP* no produjo cambios en los parámetros analizados, mientras que la adición de dichos interferentes a neuronas que sobreexpresaban *EGFP* y *ngn3* contrarrestó los efectos inducidos por la sobreexpresión de *ngn3*, lo que indicaría que la *Fmn1* media la función que la *Ngn3* tiene en el desarrollo de las neuronas de hipocampo.

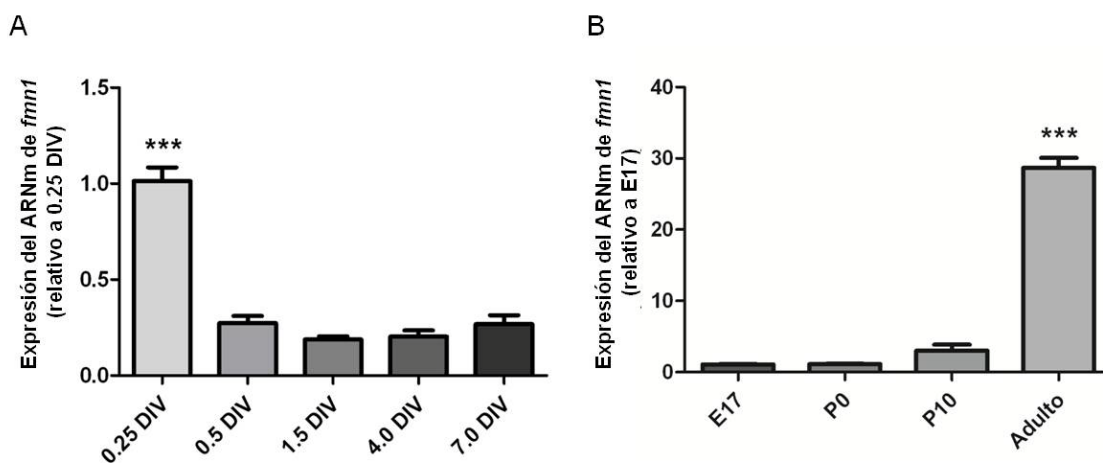




**Figura 20. Efectos de los Fmn1-siARNs en neuronas que sobreexpresan *ngn3*.** Se transfectoron neuronas de hipocampo a 1 ó 3 DIV con la construcción pEGFP-C2 (control), con la construcción pEGFP-C2 y pCS2-6xmyc-*ngn3* (*Ngn3*) o uno de los *fmn1*-siARNs (siARN) o con la construcción pEGFP-C2, pCS2-6xmyc-*Ngn3* y uno de los *fmn1*-siARNs (siRNA-*Ngn3*). Tras 16 horas de expresión se fijaron las neuronas para el análisis de la morfología neurítica, dendrítica y la determinación de las sinapsis glutamatérgicas (VGluT1). (A-F) Imágenes representativas de las inmunofluorescencias. En verde (GFP) se marcaron las neuronas transfectadas y en rojo las terminales glutamatérgicas (VGluT1). Barra de escala de 25  $\mu$ m. (G) Representación del número de neuritas primarias a 2 DIV y del número de dendritas primarias a 4 DIV. (H) El recuento de las terminales VGluT1 positivas se realizó dentro de una región circular de 50  $\mu$ m de diámetro centrada en el soma neuronal. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Los cambios significativos se determinaron mediante la ANOVA seguida del test de Bonferroni; \*\*\*  $p < 0.001$  respecto de las neuronas que sobreexpresaban *ngn3*; ###  $p < 0.001$  respecto de las neuronas control.

### 2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *FORMINA 1* EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO DE RATÓN

Debido a las diferencias observadas en los resultados de los ensayos con los siARNs de *fmn1* a 2 y 4 DIV, se decidió estudiar mediante la técnica de PCR cuantitativa si dichas diferencias en la sensibilidad a los interferentes se debían a posibles cambios en la expresión de *fmn1* durante el desarrollo del hipocampo de ratón. Para ello se analizó la expresión de *fmn1* tanto *in vitro* como *in vivo*. En el estudio *in vitro* (Fig. 21A) se analizó la expresión de *fmn1* a partir del ARNm purificado de las neuronas de hipocampo en cultivo en los diferentes estadios del desarrollo, en este caso la expresión es máxima a 0.25 DIV y a partir de este punto, la expresión decae drásticamente hasta 0.5 DIV, donde se mantiene constante hasta que las neuronas alcanzan la madurez a los 7 DIV. Entre el estadio de 0.5 DIV y 1.5 DIV hay una ligera disminución en la expresión de *fmn1* y entre el estadio de 4 DIV y 7 DIV hay un leve aumento de la expresión de *fmn1*, sin embargo, ambos cambios de expresión no son lo suficientemente significativos.



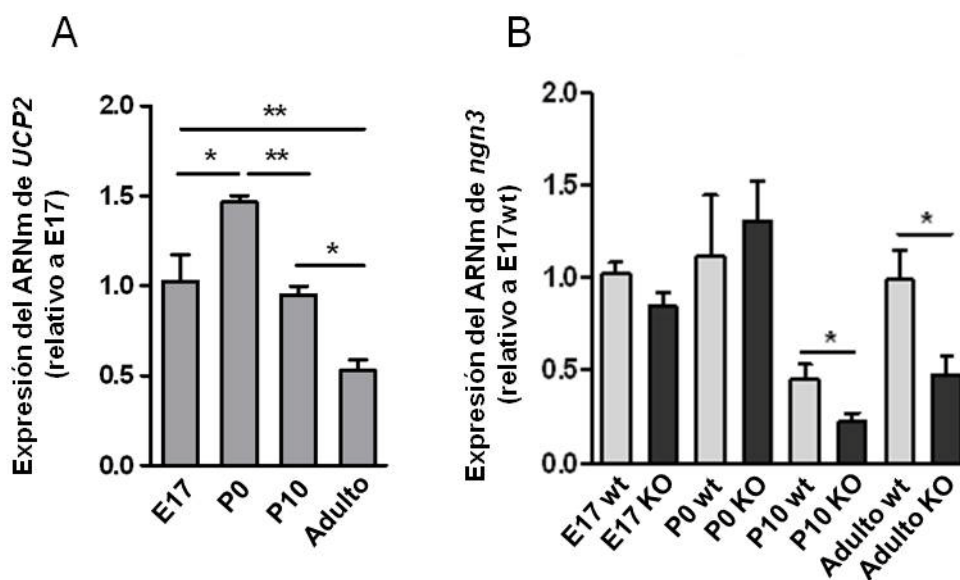
**Figura 21. Niveles de expresión del ARNm de *fmn1* durante las diferentes etapas del desarrollo del hipocampo y de las neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Se extrajo el ARN total del hipocampo, se sintetizó el ADNc y la expresión del ARNm de *fmn1* fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se observó que la expresión de *fmn1* era máxima a 0.25 DIV, y posteriormente la expresión decaía drásticamente hasta 0.5 DIV, a partir de donde se mantiene constante hasta el final del desarrollo. (B) Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup>. Se extrajo el ARN total a los tiempos de cultivo indicados y se determinaron los niveles del ARNm de *fmn1* por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. *In vivo* la expresión de *fmn1* aumentó según se avanzaba en el desarrollo, alcanzándose el máximo en el adulto. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* se usó como control interno. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar de la expresión de *fmn1* como porcentaje de la etapa 1 en cada caso. Los niveles de significación representados como \*\*\*p<0.001 proceden de una n=4 y se analizaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni.

En el estudio *in vivo* (Fig. 21B) el ARNm se extrajo a partir de los encéfalos de ratones de distintas etapas del desarrollo: E17, P0, P10, y adulto, y se observó que la expresión de *fmn1* aumentó según se avanza en el desarrollo siendo máxima en el adulto. Los niveles de expresión hallados en las neuronas en cultivo y en el estadio embrionario son equivalentes.

### 3. RELACIÓN ENTRE UCP2 Y NGN3 Y SU IMPORTANCIA DURANTE EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO

#### 3.1. EFECTOS DE LA CARENCIA DE UCP2 EN LA EXPRESIÓN DE NGN3 EN EL DESARROLLO DEL HIPOCAMPO

Para evaluar la posible relación entre UCP2 y Ngn3 durante el desarrollo del hipocampo de ratón se analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión del ARNm de *ngn3* y de *UCP2* en distintas etapas del crecimiento de ratones que iban desde E17 hasta la edad adulta, pasando por P0 y P10.



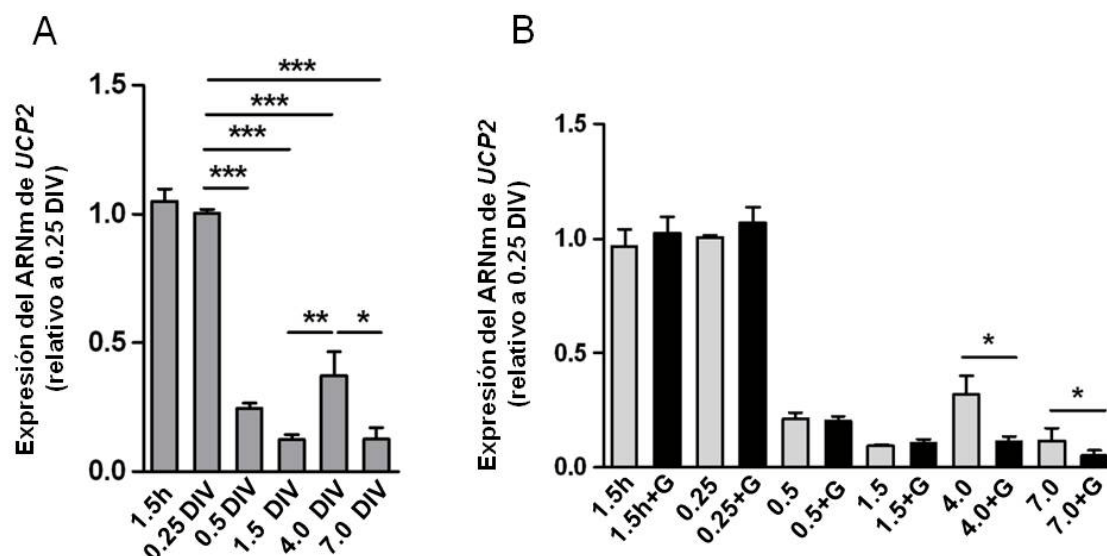
**Figura 22.** Cambios en los niveles de expresión de los ARNm de *UCP2* durante el desarrollo del hipocampo de ratón y de *ngn3* durante el desarrollo de ratones *UCP2* KO. Se extrajo el ARN total del hipocampo, se sintetizó el ADNc y se analizó la expresión del ARNm de *UCP2* (A) y *ngn3* (B) mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* se usó como control interno. Los niveles de expresión del ARNm de ambas proteínas presentaron un pico en P0 y posteriormente decrecieron hasta alcanzar valores inferiores a los de E17. En los niveles de expresión del ARNm de *ngn3* en los ratones *UCP2* KO se observó un descenso significativo en los niveles del ARNm de *ngn3* en p10 y adulto respecto a los ratones silvestres. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la expresión de *fmn1* como porcentaje de la etapa 1 en cada caso. Los niveles de significación representados como \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , proceden de una  $n=4$  y se analizaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni.

Como se observa en la figura 22, los niveles de expresión del ARNm de ambos genes presentaban un pico en el primer día postnatal, cuando las fibras musgosas comienzan a establecer contactos sinápticos con las dendritas de las células piramidales durante el desarrollo del hipocampo del ratón (Amaral y Dent, 1981), y posteriormente decayeron hasta alcanzar valores por debajo de los embrionarios.

También se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *ngn3* en los ratones *UCP2* KO (Fig. 22B) y se observó un descenso significativo en los niveles del ARNm de *ngn3* en P10 y adulto respecto a los ratones silvestres.

### **3.2. EXPRESIÓN DE UCP2 DURANTE EL DESARROLLO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO**

Con el propósito de analizar si los cambios de expresión de *UCP2* y de *ngn3* observados durante el desarrollo del hipocampo *in vivo* se mantenían en el desarrollo de las neuronas del hipocampo en cultivo, se analizó la expresión del ARNm de dichos genes en los cinco estadios del desarrollo y a 1,5 horas tras la siembra. La figura 23A muestra que los niveles del ARNm de *UCP2* disminuyeron en los estadios de diferenciación neuronal (0.5 y 1.5 DIV) y se incrementaron en el estadio de 4 DIV, que se corresponde con la definición de las dendritas y el inicio del establecimiento de los contactos sinápticos. Sin embargo, los niveles de expresión de *ngn3* se incrementaron progresivamente durante la polarización neuronal (Fig. 6C).



**Figura 23. Niveles de expresión del ARNm de *UCP2*, en los diferentes estadios del desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo.** Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup>. Se extrajo el ARN total a los tiempos en cultivos indicados y se determinaron los niveles del ARNm de *UCP2* por PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* se usó como control interno. (A) Los niveles del ARNm de *UCP2* disminuyeron en los estadios de diferenciación neuronal (0.5 y 1.5 DIV) y se incrementaron en el estadio de 4 DIV, en el que se definen las dendritas. (B) Los resultados mostraron que la expresión del ARNm de *UCP2* disminuyó significativamente con el tratamiento con genipina en los estadios de 4 y 7 DIV, sin observar alteraciones en estadios tempranos. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar de la expresión de *UCP2* como porcentaje del estadio 0.25 DIV en cada caso. Los niveles de significación representados como \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , proceden de una  $n=5$  y se analizaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FUNCIONES DE *UCP2* EN NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO

#### 3.3.1. Efectos de la inhibición de *UCP2* sobre la expresión del ARNm de *UCP2* y de *ngn3* durante el desarrollo de las neuronas del hipocampo

Se analizaron los niveles de expresión de *UCP2* y *ngn3* durante el desarrollo de neuronas de hipocampo en cultivos tratados con genipina, un inhibidor específico de la *UCP2* (Zhang y cols., 2006), y sus correspondientes controles sin tratar. Los resultados mostraron que la expresión del ARNm de *UCP2* disminuyó significativamente con el tratamiento con genipina en los estadios de 4 DIV y 7 DIV (Fig. 23B), mientras que en estadios tempranos del desarrollo de las neuronas de hipocampo no se vieron alterados los niveles de expresión de *UCP2*. El tratamiento con genipina provocó un aumento de la expresión de *ngn3*, cuando las neuronas ya han establecido sus contactos sinápticos. No obstante, en estadios tempranos del desarrollo

neuronal, la inhibición de la actividad de la UCP2 no alteró los niveles de expresión de su ARNm (Fig. 23B). Además el tratamiento con genipina provocó un aumento de la expresión del ARNm de *ngn3* en el momento inmediatamente posterior a la siembra neuronal y en el estadio de 0.25 DIV (Fig. 24F), tras lo cual dicho tratamiento produjo el efecto contrario, disminuyendo la expresión del ARNm de *ngn3* conforme se avanzó en el desarrollo.

### **3.3.2. Efectos de la inhibición de UCP2 sobre la densidad neuronal**

Para comprobar si el tratamiento con genipina y sus efectos se debían a una muerte neuronal masiva se llevó a cabo un análisis comparativo del número de neuronas presente en los cultivos control frente a los cultivos tratados con genipina. El número de neuronas disminuyó significativamente en los cultivos tratados con genipina entre los estadios de 0.5 y 4 DIV (Fig. 24B), comparados con los controles no tratados. A los 7 DIV el número de neuronas fue similar en ambos cultivos (Fig. 24A), lo que se podría atribuir a una pérdida de eficacia del tratamiento.

### **3.3.3. Efectos de la inhibición de la UCP2 sobre la diferenciación de las neuronas de hipocampo en cultivo**

La inhibición de la UCP2, ya fuera parcial mediante el tratamiento con genipina o total mediante el cultivo procedente de ratones *UCP2* KO, produjo cambios en la morfología de las neuronas de hipocampo en cultivo en las neuritas y sinapsis fundamentales para la correcta diferenciación neuronal. Asimismo, se vio afectado el tamaño del soma neuronal. A continuación se describen en detalle los cambios observados.

#### ***3.3.3.1. Efecto de la inhibición de la UCP2 sobre el tamaño neuronal***

A lo largo del desarrollo las neuronas de hipocampo en cultivo incrementan el tamaño de su soma con el fin de aumentar la capacidad para albergar orgánulos y macromoléculas claves para el correcto funcionamiento neuronal. En los cultivos tratados con genipina se observó un crecimiento proporcional al avance en el desarrollo, sin embargo, en comparación con las neuronas procedentes de cultivos no tratados este crecimiento (medido como área somática) resultó ser significativa y constantemente menor (Fig. 24C, D).

En las neuronas procedentes de cultivos de ratones *UCP2* KO (Fig. 25A, B) se observó un crecimiento proporcional hasta que alcanzaron el estadio de 4 DIV, pero posteriormente las neuronas no sólo disminuyeron su tamaño sino que detuvieron su crecimiento, de forma que el tamaño a los 4 DIV era el mismo que a los 7 DIV, y en consecuencia la diferencia de tamaño con respecto a las neuronas procedentes de ratones *UCP2* silvestres fue más evidente que con el tratamiento con genipina.

### ***3.3.3.2. La inhibición de la UCP2 modifica el número de neuritas primarias***

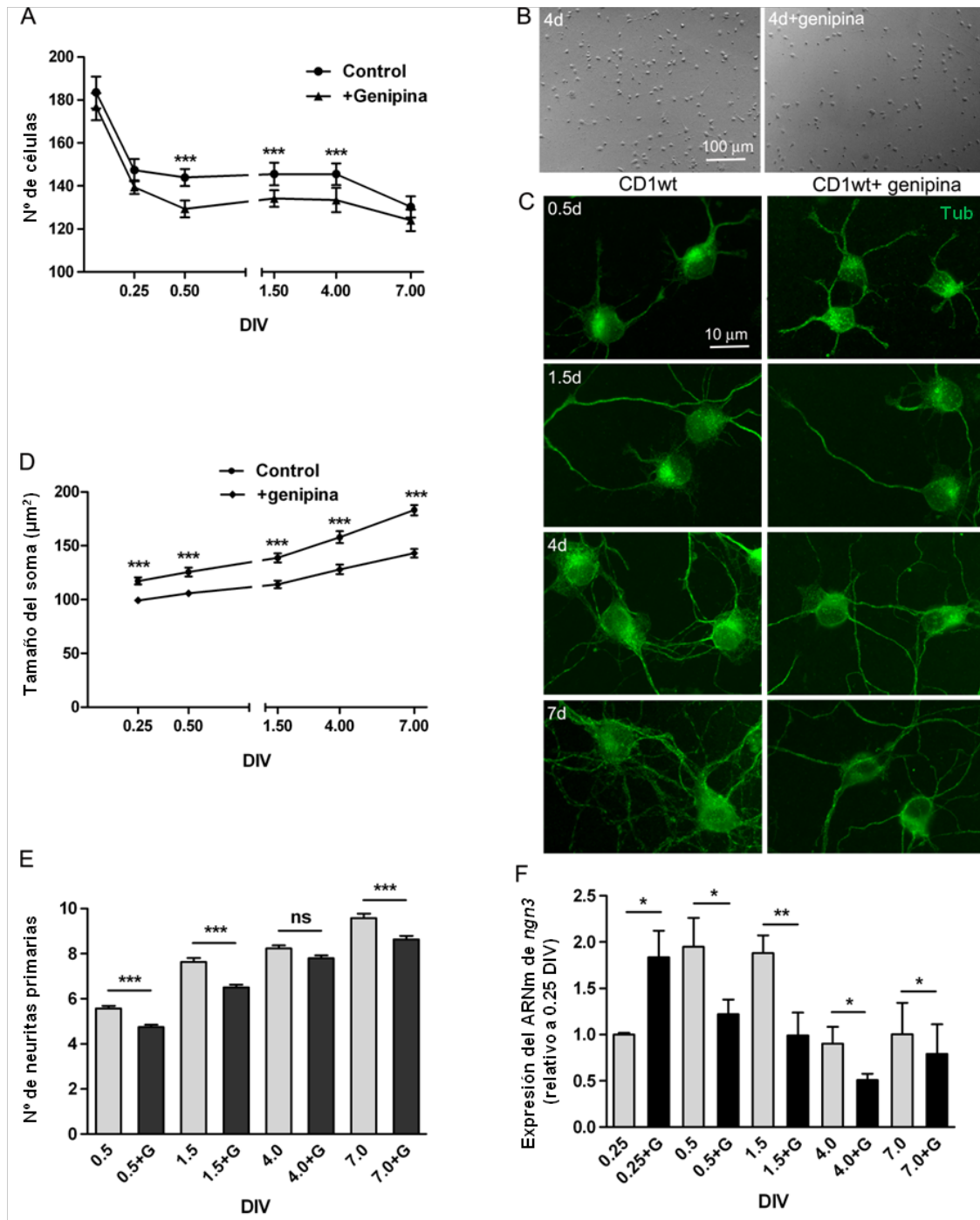
El tratamiento con genipina resultó en un significativo descenso en el número de neuritas primarias en los estadios de 0.5 DIV, 1.5 DIV y 7 DIV. En este último estadio podemos referirnos a disminución de dendritas primarias ya que la neurona ha completado su desarrollo (Fig. 24C).

En los cultivos procedentes de ratones *UCP2* KO, como cabría esperar debido a la inhibición total del gen, el número de neuritas primarias disminuyó de forma más marcada que con el tratamiento con genipina, manteniéndose constante dicho efecto conforme se avanzó en el desarrollo neuronal (Fig. 25C).

### ***3.3.3.3. Efecto de la inhibición de la UCP2 sobre la aportación sináptica neuronal***

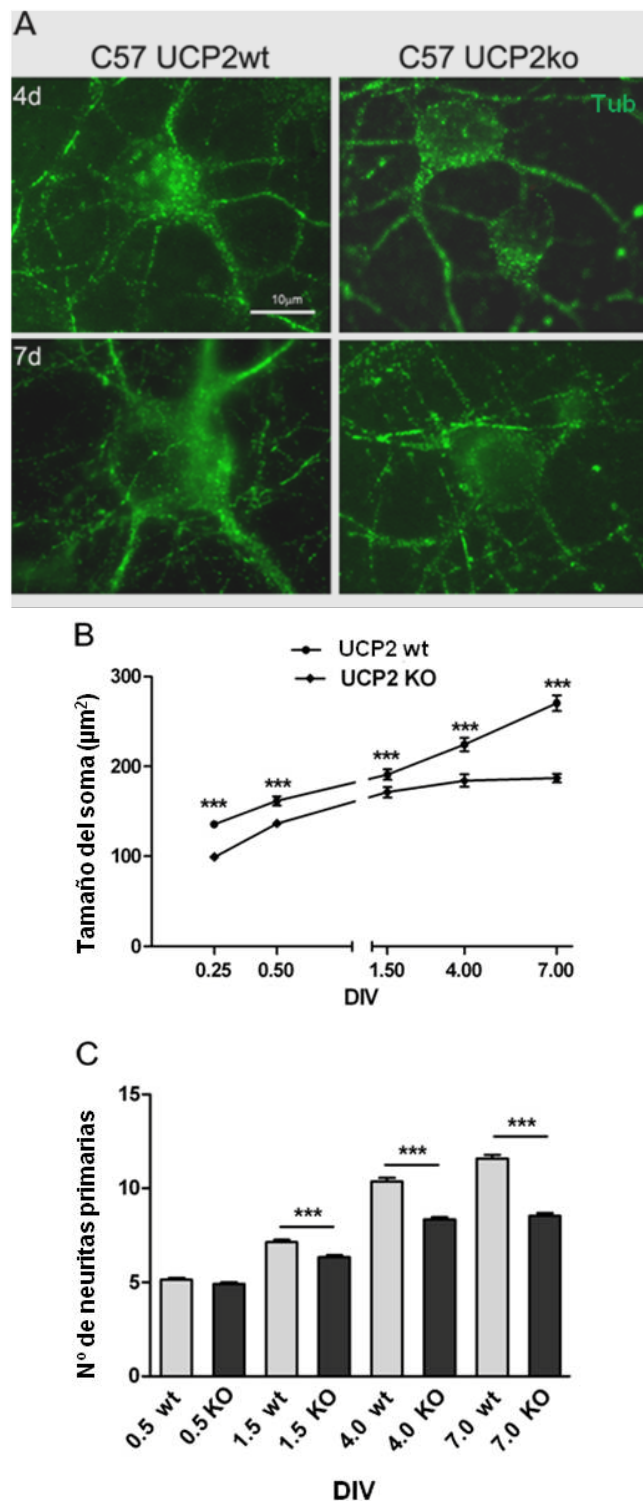
Por último se evaluó el impacto de la inhibición parcial o ausencia de la *UCP2* sobre el número de sinapsis totales, mediante el marcaje y posterior recuento del número de vesículas de sinaptofisina sobre el soma y dendritas de las neuronas postsinápticas. Se obtuvieron resultados similares tanto en los cultivos tratados con genipina (Fig. 26A, B) como en los procedentes de ratones *UCP2* KO (Fig. 26C, D), disminuyendo drásticamente el número de sinapsis en ambos casos, siendo inferior al 50% de las que presentaban las neuronas control.



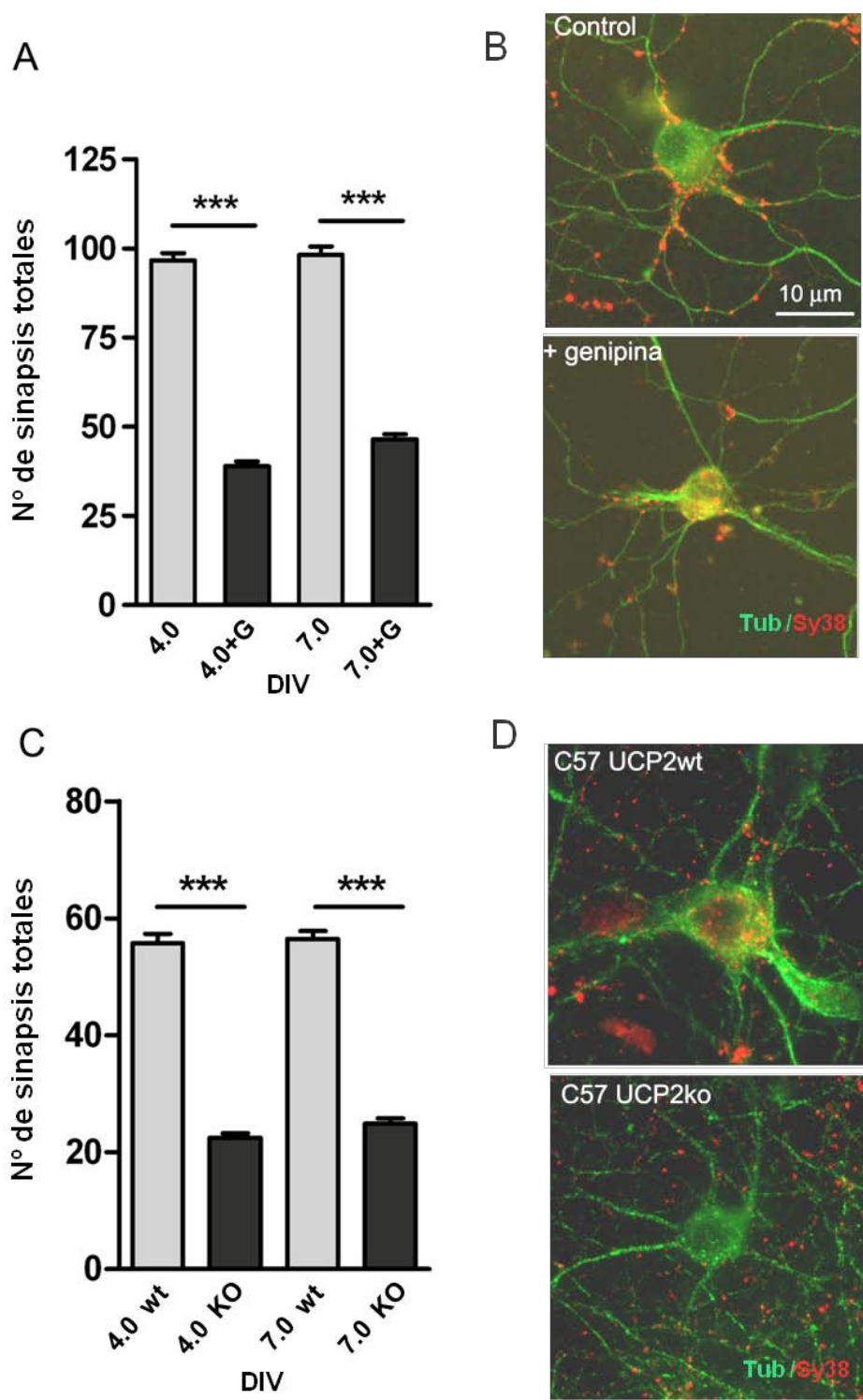


**Figura 24. Efectos del tratamiento con genipina sobre el número de células y la morfología de las neuronas de hipocampo en cultivo y sobre los niveles de expresión de *ngn3* en los diferentes estadios del desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo.** Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup>. Los cultivos se trataron o no con genipina 20  $\mu$ M y se analizaron imágenes de contraste de fases (B) y de fluorescencia mediante marcaje con un anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina (C). (A) Representación del número de células por campo de visión en los diferentes estadios. (D) Representación del cambio en el tamaño del soma neuronal durante el desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo. (E) Número de neuritas primarias en los diferentes estadios del desarrollo. (F) Se extrajo el ARN total a los tiempos en cultivos indicados y se determinaron los niveles del ARNm de *ngn3* por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* se usó como control interno. El tratamiento con genipina provocó un aumento de la expresión del ARNm de *ngn3* tras la siembra neuronal y en el estadio de 0.25 DIV (F), posteriormente el tratamiento produjo el efecto contrario, disminuyendo la expresión del ARNm de *ngn3* al avanzar en el desarrollo. Las gráficas se representan como la media  $\pm$  el error estándar. Los niveles de significación representados como \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , proceden de una  $n = 4$  y se analizaron mediante el test t de Student.





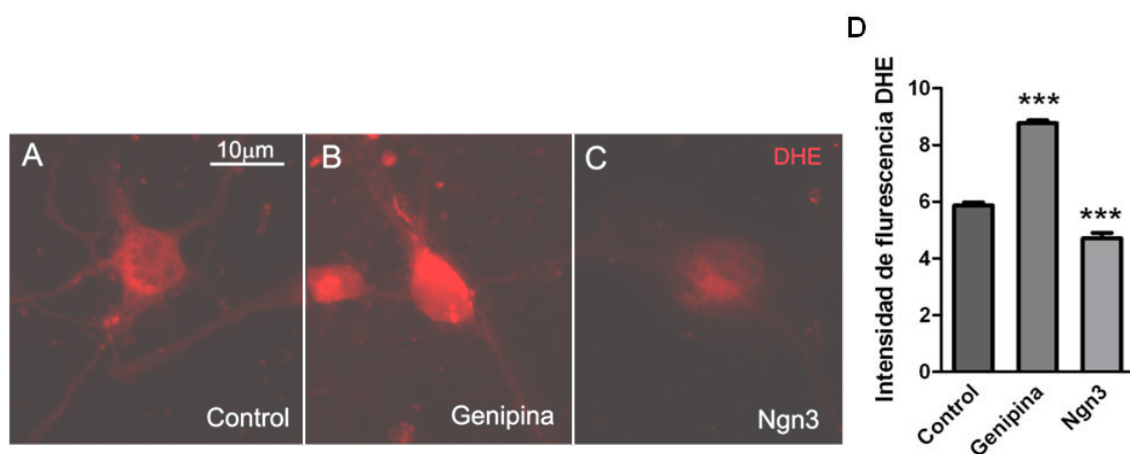
**Figura 25. Efectos de la delección génica de *UCP2* sobre la morfología de las neuronas de hipocampo en cultivo.** Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup> y incubaron durante los diferentes estadios del desarrollo. (A) Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de 4 y 7 DIV de ratones *UCP2* silvestres y KO marcadas con un anticuerpo anti-β-III-tubulina. (B) Representación del análisis cuantitativo del tamaño del soma neuronal. En las neuronas procedentes de cultivos de ratones *UCP2* KO se observó un crecimiento proporcional hasta que alcanzaron el estadio de 4 DIV y posteriormente las neuronas detuvieron su crecimiento (C) Número de neuritas primarias. El número de neuritas primarias disminuyó de forma más marcada que con el tratamiento con genipina, manteniéndose dicho efecto constante al avanzar en el desarrollo neuronal. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar. Los niveles de significación representados como \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, proceden de una n=4 y se analizaron mediante el test t de Student.



**Figura 26.** Efectos de la inhibición de la UCP2 y de la delección génica de *UCP2* sobre la sinaptogénesis de las neuronas de hipocampo en cultivo. Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup>, se fijaron a 4 y 7 DIV y se analizaron los contactos sinápticos mediante el marcaje con anticuerpos anti-sinaptofisina (Sy38, en rojo) y anti-β-III-tubulina (Tub, en verde). **(A, C)** Número de sinapsis totales por neurona. **(B, D)** Imágenes representativas de las inmunofluorescencias. El recuento de las terminales Sy38 positivas se realizó dentro de una región circular de 100 µm de diámetro centrada en el soma neuronal. Las gráficas se representan como la media ± el error estándar. Los niveles de significación representados como \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, proceden de una n=4 y se analizaron mediante el test t de Student.

### 3.3.4. La UCP2 y la Ngn3 modifican los niveles de ROS en neuronas de hipocampo en cultivo

Puesto que una de las principales funciones de la UCP2 es la regulación del estrés oxidativo y se conoce que los niveles de ROS influyen en la expresión de dicho gen, se evaluó la presencia de la misma relación en nuestros cultivos neuronales y si la sobreexpresión de *ngn3* protegía frente a la producción de ROS. Para ello se realizaron análisis inmunocitoquímicos a partir de cultivos tratados, o no, con genipina y que sobreexpresaban o no *ngn3*. Las ROS se marcaron con el compuesto DHE, que en contacto con el superóxido de oxígeno genera fluorescencia intrínseca, y en neuronas de 4 DIV, ya que como se describió anteriormente, en este estadio la inhibición de la UCP2 por medio de la genipina alcanza su punto máximo. En los cultivos neuronales en los que la actividad y la expresión de *UCP2* se encontraban reprimidas por el tratamiento con genipina (Fig. 27B) los niveles de ROS y por tanto el estrés oxidativo fue mayor que en los cultivos control (Fig. 27A). Sin embargo, en los cultivos neuronales que sobreexpresaban *ngn3* (Fig. 27C) los niveles de ROS fueron considerablemente menores que los controles (Fig. 27C), lo que indicaría que tanto la UCP2 como la Ngn3 presentan en nuestros cultivos un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo.



**Figura 27. Efectos de la inhibición de UCP2 y de la sobreexpresión de *ngn3* sobre los niveles de ROS en neuronas de hipocampo en cultivo.** Se plaquearon neuronas de hipocampo de E17 a una densidad celular de 300 neuronas.mm<sup>-2</sup>, se trataron, o no, con genipina o se transfectaron con el plásmido que sobreexpresaba *ngn3*. A los 4 DIV se trataron con DHE y se fijaron para proceder al análisis de la intensidad de fluorescencia en el rojo debida a la oxidación del DHE por el superóxido de oxígeno mediante el programa ImageJ. (A, B y C) Imágenes representativas de la fluorescencia de DHE oxidado. (D) Representación de la intensidad de fluorescencia relativa en las diferentes condiciones. Las gráficas muestran la media ± el error estándar. Los niveles de significación representados como \*\*\*p<0.001, proceden de una n=4 y se analizaron mediante ANOVA seguida del test post-hoc de Bonferroni.



## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. Localización celular y subcelular de la Ngn3 en el hipocampo de ratón adulto y durante su desarrollo

Previamente se había demostrado que el receptor Notch y genes relacionados con él, como *ngn3*, se expresan en todas las regiones de la capa piramidal del hipocampo y en la capa granular del giro dentado (Salama-Cohen y cols., 2006). En este trabajo se describe por primera vez la distribución anatómica de la proteína Ngn3 en el hipocampo de ratón adulto y en desarrollo. La función mejor caracterizada de la Ngn3 es la de factor de transcripción en las células endocrinas, especialmente pancreáticas. De acuerdo con dicha función, la Ngn3 se localiza en el núcleo de diferentes células (Lee y cols., 2003; Sarkar y cols., 2008). Nuestros estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indican que la Ngn3 también se localiza en el núcleo de las neuronas de hipocampo y además se ha observado su expresión en el citoplasma de las neuronas de hipocampo en determinadas etapas del desarrollo.

En neuronas hipocámpales en cultivo, la localización citoplasmática de la Ngn3 alcanza su nivel máximo a 0.5 DIV, estadio que se corresponde con la iniciación del desarrollo neurítico. Posteriormente, la Ngn3 desaparece progresivamente del citoplasma para llegar casi exclusivamente a una localización nuclear en la etapa final de maduración neuronal *in vitro*. Resultados similares se obtuvieron en los estudios *in vivo*. Únicamente en algunas células granulares del giro dentado la Ngn3 presenta localización nuclear a la edad de P0, mientras que su número aumenta en la edad de P10 y en el adulto. La localización nuclear de la Ngn3 se observada también en neuronas piramidales en el adulto, mientras que en P0 y P10 la localización es citoplasmática. Estos cambios en la localización subcelular de la Ngn3 coinciden con el transcurso del desarrollo de las neuronas piramidales y granulares. La formación de la capa piramidal se completa de forma temprana a los 18 días de gestación, un día antes del nacimiento. La capa granular empieza a establecerse durante la embriogénesis, pero más del 80% de las células granulares del giro dentado se generan después del nacimiento y, en el ratón,

esta capa finaliza su formación a P20 (Angevine, 1965; Altman y Bayer, 1990). Sin embargo, una célula no llega a ser una neurona madura hasta que no establece contactos con otras neuronas. Como consecuencia, las células piramidales destinadas a asentarse en la región de CA3, que serán contactadas por los axones de las células granulares (fibras musgosas), deben esperar a la formación de la capa granular para su maduración completa. Las fibras musgosas establecen los contactos sinápticos con las dendritas de las células piramidales en el período postnatal temprano (Amaral y cols., 1981), pero varias de las características del adulto como la densidad de espinas dendríticas en las dendritas distales de las neuronas piramidales y la mielinización de los axones aferentes tienen lugar durante un extenso período postnatal (Seress y Ribak, 1995). La región hipocampal CA3, junto con el giro dentado, representa una de las zonas con mayor dinámica en sus circuitos neuronales tanto en estado embrionario como adulto (Pelkey y McBain, 2008).

Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados indican que la Ngn3 se localiza principalmente en el citoplasma durante el desarrollo neuronal en contraste con la Ngn2, que durante este período se encuentra en el núcleo (Galichet y cols., 2008). No obstante, en etapas tardías del desarrollo la Ngn3 se ha detectado en el núcleo de las células granulares, mientras que la Ngn2 se ha observado solamente en progenitores neuronales en proliferación (Ozen y cols., 2007).

Sirviéndonos de la infección de neuronas piramidales con el virus que sobreexpresa *ngn3* marcada con la secuencia *myc*, se pudo seguir la progresión de la distribución subcelular de la proteína a lo largo del tiempo de cultivo. Estos resultados indican que la proteína se acumula rápidamente en el núcleo celular y posteriormente se exporta progresivamente al citoplasma. De acuerdo con este fenómeno, se ha detectado una señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES) en la Ngn3. Actualmente se ha descrito que la mayoría de las proteínas que se exportan al citoplasma presentan una NES rica en leucinas similar a la secuencia original encontrada en la proteína Rev del VIH, y que este tipo de NES es reconocido por la exportina CRM1 (Formerod y cols., 1997; Han y cols., 2008). El transporte nuclear de estas proteínas está dirigido por la unión del motivo NES a la exportina CRM1, ya que el



inhibidor específico de la CRM1, LMB, bloquea la exportación de dichas proteínas. En los procesos de exportación nuclear activa, las proteínas con NES específicas forman un complejo ternario con la exportina CRM1 y RanGTP en el núcleo celular (Yoneda y cols., 1999). Dicho complejo puede ser entonces translocado al citoplasma donde la molécula de GTP se hidroliza, liberándose la proteína con la señal NES.

El complejo exportina-RanGDP vuelve a entrar en el núcleo por difusión y una vez allí el GDP es intercambiado por GTP por medio de factores de intercambio de nucleótidos de guanina específicos. Por lo tanto, este proceso es dependiente de energía ya que en cada ciclo se consume una molécula de GTP y el coste energético asociado a la salida de la Ngn3 del núcleo pone de manifiesto la importancia de su función citoplasmática. Algunos autores indican que el transporte núcleo-citoplasma supone un mecanismo nuevo de regulación para aquellas proteínas que participan en la diferenciación e inhibición de la muerte celular (Tanno y cols., 2007). La cascada de señalización involucrada en la translocación de la Ngn3 deberá ser objeto de futuros estudios.

## **2. Función citoplasmática de la Ngn3**

La translocación entre núcleo y citoplasma de la Ngn3 está mediada por la exportina CRM1, lo que plantea de si este transporte vía CRM1 es necesario para el desarrollo neurítico. El tratamiento de los cultivos neuronales con LMB sugiere que es así, ya que la inhibición de CRM1 se asocia a un descenso en el número, longitud y ramificación dendrítica. Estos resultados apuntan a que, durante el desarrollo de las neuronas de hipocampo, la exportina CRM1 está implicada en el transporte proteico entre núcleo y citoplasma para regular la diferenciación dendrítica. Por otra parte, la presencia de una NES en la secuencia de la Ngn3 y los efectos morfológicos (a nivel dendrítico y sináptico) que derivan de su mutación indica que la salida del núcleo es un factor clave para el desarrollo neuronal. Por sí solas las NES son capaces incluso de concentrar la expresión de GFP en el citoplasma y, en el caso de la Ngn3 con la secuencia NES2 mutada no sólo hay cambio en la localización subcelular de la Ngn3, sino

que dicho cambio lleva asociado alteraciones en la diferenciación dendrítica y sináptica. De igual manera, otras modificaciones postraduccionales podrían controlar la localización subcelular de la Ngn3 interfiriendo con la función de las NLS y/o NES, y a este respecto, se sabe que la fosforilación ejerce un papel fundamental (Xu y Massague, 2004). Otros autores sugieren que la Ngn3 es translocada al citoplasma vía exportina CRM1, ya que se ha observado acumulación citoplasmática de Ngn3 en células tumorales pancreáticas (Lejonklou y cols., 2009), donde el tamaño tumoral se relaciona directamente con el nivel de expresión de CRM1 (Huang y cols., 2009).

La expresión de *ngn3* en el hipocampo adulto es semejante a la de Notch, un conocido regulador de la neuritogénesis que se expresa en todos los astrocitos y neuronas virtualmente maduros de esta región cerebral (Breunig y cols., 2007). Estudios previos han demostrado que Notch, mediante la activación del factor de transcripción HES1, inhibe la expresión de *ngn3* en neuronas de hipocampo (Salama-Cohen y cols., 2006). De acuerdo con esto, nuestros resultados que indican que la expresión de *HES1* decae en los estadios 2 y 3 respecto del estadio 1, junto con el incremento de la expresión de *ngn3* y su acumulación citoplasmática, son consistentes con el aumento de la diferenciación dendrítica asociados al descenso de la actividad y de la localización nuclear del receptor Notch en neuronas en desarrollo (Sestan y cols., 1999; Redmond y cols., 2000; Breunig y cols., 2007). Además, estudios anteriores han demostrado que la sobreexpresión de *ngn3* en neuronas de hipocampo en cultivo estimula la dendritogénesis (Salama-Cohen y cols., 2006). No obstante, en el presente trabajo se describe que las dendritas apicales de las neuronas piramidales inmunoreactivas para la Ngn3 contactan con las colaterales de Schaffer procedentes del CA3, observándose un claro marcaje en la zona de contacto, lo que sugeriría una posible relación de la Ngn3 con la formación de sinapsis, en concordancia con los datos acerca de la implicación de la Ngn3 en la sinaptogénesis GABAérgica en cultivos neuronales de hipocampo (Salama-Cohen y cols., 2006).

La localización de la Ngn3 en el núcleo de las neuronas de hipocampo maduras es compatible con su función transcripcional, aunque la función de la Ngn3 en el SNC adulto se

desconoce. La localización de la Ngn3 en el citoplasma planteó una posible función extranuclear de la misma y nuestros estudios al respecto sugieren que la función citoplasmática de la Ngn3 en las neuronas de hipocampo en desarrollo podría estar relacionada con el proceso de polarización neuronal, puesto que es en los estadios 2 y 3, de establecimiento axonal y dendrítico, cuando la expresión de *ngn3* es mayor. En los estadios 2, 3 y 4 la Ngn3 se encuentra principalmente en el citoplasma. Dichos estadios se corresponden con el desarrollo de neuritas indiferenciadas (estadio 2), una de las cuales presenta una tasa de crecimiento mayor y adquiere características axonales (estadio 3) y el resto de las neuritas se elongan lentamente hasta diferenciarse en dendritas (estadio 4) (Dotti y cols., 1988). Mediante el uso de agentes estabilizadores o desestabilizadores del citoesqueleto observamos que la Ngn3 es una proteína de asociación a los microtúbulos, al menos en el cerebro. En las imágenes de inmunocitoquímica la Ngn3 exhibe colocalización con los MTs en axones, dendritas e incluso en los conos de crecimiento y los ensayos de cosedimentación refuerzan esta hipótesis poniendo de manifiesto una asociación Ngn3-tubulina, sin que se observe colocalización con los filamentos de actina. Además, la sobreexpresión de *ngn3* protege de la desestabilización que el nocodazol provoca en los MTs. Los motivos clásicos de unión a MTs presentes en las proteínas asociadas al citoesqueleto, MAP y Tau (Dehmelt y Halpain, 2005) no se encuentran en la Ngn3, no obstante, otras proteínas asociadas a los MTs, como kinesinas y miosinas, también carecen de dichos motivos (Woehlke y cols., 1997; Cao y cols., 2004; Hirokawa y Takemura, 2005). A pesar de la falta de evidencias acerca de una posible interacción directa entre la Ngn3 y los MTs, no se puede descartar que la Ngn3 se una a los MTs a través de otra/s proteína/s. Actualmente hay evidencias de que la estabilidad de los MTs es determinante en la polarización neuronal (Witte y cols., 2008), por lo que nuestros resultados indican una posible contribución de la Ngn3 a la estabilidad de los MTs. La acumulación citoplasmática de la Ngn3 en etapas críticas para el desarrollo, como la iniciación de la polaridad neuronal, sugiere una posible función de la misma durante la diferenciación neuronal temprana.

### 3. *ngn3* activa la expresión de *fmn1*

La comparación de la expresión génica de cultivos de neuronas del hipocampo que sobreexpresaban *ngn3* y de cultivos control que sobreexpresaban *GFP* mediante la técnica de microarrays permitió identificar un conjunto de genes regulados por la Ngn3. Esta proteína regula genes asociados con el desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular, morfología celular y la asociación y organización celular, así como los genes asociados con el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. De entre los diferentes grupos de genes regulados por la Ngn3 nos centramos en los relacionados con la dinámica del citoesqueleto, con la intención de dilucidar los mecanismos moleculares mediante los que la Ngn3 controla la morfología y las conexiones sinápticas de las neuronas de hipocampo (Salama-Cohen y cols., 2006). Uno de esos genes es *fmn1*, que codifica la proteína homónima (Fmn1), cuya función es la nucleación de los filamentos de actina y la asociación con los MTs (Zhou y cols., 2006; Dettenhofer y cols., 2008). La activación de *fmn1* por *ngn3* se confirmó analizando los niveles del ARNm y de la proteína mediante la técnica de PCR cuantitativa e inmunoblot, respectivamente.

### 4. La morfología y la sinaptogénesis de las neuronas de hipocampo están reguladas por la Fmn1

La formación y mantenimiento del árbol dendrítico de las neuronas del hipocampo depende del citoesqueleto subyacente, compuesto por un núcleo de MTs y una corteza de microfilamentos de actina (Scott y Luo, 2001). El presente trabajo demuestra que la sobreexpresión del gen *fmn1-Ib* en cultivos de neuronas de hipocampo, que deriva en la expresión de la proteína Formina1 en el citoplasma neuronal, aumenta el número de dendritas primarias. Por el contrario, la reducción de la expresión génica de *fmn1* mediante el uso de ARN interferente conlleva un descenso en el número de dendritas primarias. Estos resultados, junto con las funciones desempeñadas por la Fmn1 en la nucleación de actina y la asociación a MTs (Fifkova y Delay, 1982; Kobiela y cols., 2004), sugieren que la Fmn1 participa en el control de la morfología neuronal. La diferenciación neuronal requiere del dinamismo del citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento, que se manifiesta en la formación de filopodios y lamelipodios

ricos en actina. Los filopodios contienen haces de filamentos de actina y los lamelipodios una malla de filamentos de actina (Svitkina y Borisy, 1999; Strasser y cols., 2004). Se han descrito diferentes factores de unión a la actina y existen numerosos estudios cuyo objetivo es determinar el papel que estos factores desempeñan durante el crecimiento neurítico; por ejemplo, el complejo Arp2/3 promueve la nucleación de los filamentos de actina ramificados en otros tipos celulares (Pollard, 2007) y está implicado en la morfogénesis del axón en varios tipos neuronales (Zallen y cols., 2002; Korobova y Svitkina, 2008; Gupton y Gertler, 2010; You y Lin-Chao, 2010). Las forminas promueven normalmente la formación de filamentos de actina no ramificados (Goode y cols., 2007) y algunos miembros de la familia de las forminas están también implicados en la regulación del crecimiento neuronal. Es el caso del factor mDia2, que se ha relacionado con la elongación axonal en cultivos de células granulares del cerebelo (Arakawa y cols., 2003), y que es capaz de mantener la formación de filopodios, requisito indispensable para la neuritogénesis en neuronas corticales (Dent y cols., 2007). También la formina de *Drosophila* Daam1 desempeña un papel crucial en la morfogénesis axonal e induce la formación de proyecciones semejantes a las neuritas cuando se expresa en la línea celular murina P19 (Matusek y cols., 2008). Se ha demostrado que la formina 2, que se expresa en neuronas de todo el sistema nervioso central, se encuentra regulada transcripcionalmente por la edad y su función es necesaria para el desarrollo normal de la memoria en ratones (Peleg y cols., 2010). Los resultados de este estudio identifican a la Fmn1 como un factor de unión a la actina implicado en la diferenciación de las neuronas del hipocampo.

Nuestros resultados indican también que el número de conexiones glutamatérgicas presinápticas es mayor en neuronas transfectadas con *EGFP-fmn1-Ib* que en las neuronas transfectadas sólo con *EGFP*. El incremento en el número de conexiones glutamatérgicas presinápticas podría, al menos en parte, ser una consecuencia de la generación de nuevas espinas dendríticas en las neuronas postsinápticas que sobreexpresan *fmn1-Ib*. Las espinas dendríticas son pequeñas proyecciones del citoplasma dendrítico ricas en actina y que constituyen el emplazamiento principal de las sinapsis excitatorias neuronales. El desarrollo de las espinas comienza con la iniciación de los filopodios dendríticos y su elongación es seguida

por la formación de la cabeza. Un trabajo reciente ha propuesto que el mecanismo de ensamblaje de la actina cambia gradualmente desde la polimerización de filamentos no ramificados mediada por mDia2 hasta la nucleación de filamentos ramificados mediada por Arp2/3, lo que conlleva el crecimiento de las cabezas de las espinas dendríticas (Hotulainen y cols., 2009). Además, se ha visto que la sobreexpresión de Daam1 disminuye la densidad de espinas dendríticas y aumenta su longitud y su área (Salomon y cols., 2008). Nuestros resultados sugieren que la Fmn1 también podría modular las estructuras sinápticas dependientes de actina.

### **5. La pérdida de función de la Fmn1 revierte los efectos de la Ngn3 en la morfología neuronal y en las conexiones sinápticas**

En el presente trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de *ngn3* lleva asociado un incremento del número de dendritas primarias y del número de sinapsis glutamatérgicas excitatorias en neuronas de 4 DIV, de acuerdo con estudios previos que indicaban que la Ngn3 incrementaba la dendritogénesis y la relación entre sinapsis excitatorias e inhibitorias (Salama-Cohen y cols., 2006). Además se ha demostrado que dichos efectos de la Ngn3 se encuentran revertidos por la reducción de la expresión del gen *fmn1*. No obstante, cuando el bloqueo de la expresión génica se realizó a 1 DIV disminuyó el número de neuritas en los cultivos de neuronas de hipocampo en reposo sin observarse efectos significativos sobre la dendritogénesis ni la sinaptogénesis a 3 DIV. Esto podría deberse a que los niveles de expresión de *fmn1* a 1 DIV son mayores que a 3 DIV y por lo tanto la adición de los interferentes de Fmn1 en esta etapa no tiene consecuencias morfológicas en los cultivos que no sobreexpresan *ngn3*. En consecuencia, el hecho de que la bajada del gen *fmn1* afecte sólo a neuronas que sobreexpresan *ngn3* evidencia que la Fmn1 forma parte de una de las rutas de señalización mediante la cual la Ngn3 regula la morfología y la sinaptogénesis neuronal. Asimismo, sugiere que la Fmn1 es necesaria para la iniciación de nuevas dendritas y sinapsis dependientes de la expresión de *ngn3* pero no para el mantenimiento de las anteriormente generadas, lo que explicaría que los niveles

del ARNm de *fmn1* sean constantes a lo largo del desarrollo de las neuronas del hipocampo en cultivo.

## 6. Papel de la UCP2 en el desarrollo de las neuronas de hipocampo

Al analizar la relevancia de la función de la proteína UCP2 en el desarrollo neuronal, se observó que la supresión de la función (tratamiento con genipina) o de la expresión (KO), alteraba muy significativamente la supervivencia neuronal, el tamaño del soma y la conectividad sináptica. Los niveles de expresión del ARNm de *UCP2* o de la actividad de la UCP2 son inversamente proporcionales al número de dendritas, al tamaño neuronal y al aporte sináptico que presentan las neuronas de hipocampo en cultivo. El hecho de que *UCP2* se encuentre altamente inducida en el día postnatal 1 y en los estadios tempranos de desarrollo neuronal está en línea con la demostración de que a dicha edad las fibras musgosas inician el establecimiento de los contactos sinápticos con las dendritas de las neuronas piramidales (Amaral y cols., 1981). En ratones adultos, en condiciones de activación de la sinaptogénesis, como la inducida por el ejercicio voluntario, la ausencia de *UCP2* no sólo impide la sinaptogénesis sino que además disminuye el número de espinas dendríticas tanto en las neuronas granulares del giro dentado como en las neuronas piramidales de CA1 (Dietrich y cols., 2008). El papel de la UCP2 favoreciendo la neutralización de los ROS en neuronas (Bechmann y cols., 2002; Andrews y cols., 2005; Andrews y cols., 2008) contribuye eficazmente al crecimiento dendrítico y a la sinaptogénesis, ya que se sabe que las ROS son esenciales en la inhibición del correcto desarrollo del circuito del hipocampo (Tsai y cols., 2009) y contribuyen considerablemente al metabolismo lipídico en neuronas (Andrews y cols., 2008), proceso que determina la fluidez de la membrana plasmática y por tanto las funciones fisiológicas que dependen de ella. Asimismo, la *Ngn3* por sí sola es capaz de disminuir los niveles de ROS en las neuronas del hipocampo en cultivo.

La inducción de UCP2 parece estar por encima en la cascada de señalización de la *Ngn3* ya que cuando UCP2 se inhibe químicamente mediante el tratamiento con genipina o se elimina

genéticamente mediante el uso de la cepa KO, el perfil transcripcional de la Ngn3 se modificó en el transcurso del desarrollo neuronal.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La Ngn3 se expresa nuclear y citoplasmáticamente en el hipocampo del ratón adulto y en su desarrollo.
2. La localización subcelular de la Ngn3 depende del estadio de desarrollo neuronal, acumulándose en el citoplasma en etapas críticas de la diferenciación temprana, hecho fundamental para el inicio de la polarización neuronal.
3. La Ngn3 es transportada activamente desde el núcleo hacia al citoplasma vía exportina CRM1, que reconoce la NES, rica en leucinas, constituida por los residuos 131-142 de la secuencia proteica de la Ngn3.
4. Fuera del núcleo, la Ngn3 colocaliza y se asocia con la tubulina, favoreciendo la estabilización de los MTs axónicos y dendríticos para impulsar el crecimiento neurítico, contribuyendo así al desarrollo neuronal.
5. La Ngn3 es esencial en la dendritogénesis y en la sinaptogénesis.
6. La Ngn3, como factor de transcripción, controla la expresión del gen *fmn1*, y la proteína homónima codificada por él forma parte de una ruta de señalización de la Ngn3 que regula la morfología y sinaptogénesis neuronal.
7. La UCP2 es esencial para el desarrollo de neuronas de hipocampo ya que interviene en la determinación del tamaño del soma neuronal, en la neuritogénesis y en la sinaptogénesis.
8. La UCP2 y la Ngn3 neutralizan la formación de ROS en neuronas de hipocampo en cultivo.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2004). "Biología molecular de la célula. 4ª Edición. ". Ediciones Omega, Barcelona.
- Altman, J. y Bayer, S. A. (1990) "Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods." *J Comp Neurol*, **301**(3): 365-381.
- Amaral, D. G. y Dent, J. A. (1981) "Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions." *J Comp Neurol*, **195**(1): 51-86.
- Andrews, Z. B., Horvath, B., Barnstable, C. J., Elsworth, J., Yang, L., Beal, M. F., Roth, R. H., Matthews, R. T. y Horvath, T. L. (2005) "Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease." *J Neurosci*, **25**(1): 184-191.
- Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschop, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I., Coppola, A., Gao, X. B., Horvath, T. L. y Diano, S. (2008) "UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals." *Nature*, **454**(7206): 846-851.
- Angevine, J. B., Jr. (1965) "Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse." *Exp Neurol Suppl*: Suppl 2:1-70.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U. y Edlund, H. (1999) "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." *Nature*, **400**(6747): 877-881.
- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N. y Narumiya, S. (2003) "Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons." *J Cell Biol*, **161**(2): 381-391.
- Bear, M. F., Connors, B. y Paradiso, M. (2008). ""Neurociencia, la exploración del cerebro"". Lippincott Williams & Wilkins, Barcelona.
- Bechmann, I., Diano, S., Warden, C. H., Bartfai, T., Nitsch, R. y Horvath, T. L. (2002) "Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury." *Biochem Pharmacol*, **64**(3): 363-367.
- Bellefroid, E. J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D. J., Kintner, C. y Pieler, T. (1996) "X-MyT1, a Xenopus C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation." *Cell*, **87**(7): 1191-1202.
- Ben Fredj, N., Grange, J., Sadoul, R., Richard, S., Goldberg, Y. y Boyer, V. (2004) "Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons." *J Cell Sci*, **117**(Pt 7): 1079-1090.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995) "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." *J Roy Stat Soc* **57**: 289-300.
- Bertrand, N., Castro, D. S. y Guillemot, F. (2002) "Proneural genes and the specification of neural cell types." *Nat Rev Neurosci*, **3**(7): 517-530.
- Breunig, J. J., Silbereis, J., Vaccarino, F. M., Sestan, N. y Rakic, P. (2007) "Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(51): 20558-20563.
- Cao, T. T., Chang, W., Masters, S. E. y Mooseker, M. S. (2004) "Myosin-Va binds to and mechanochemically couples microtubules to actin filaments." *Mol Biol Cell*, **15**(1): 151-161.
- Cooke, S. F. y Bliss, T. V. (2006) "Plasticity in the human central nervous system." *Brain*, **129**(Pt 7): 1659-1673.
- Davis, J. T. (2001) "Gone but not forgotten: declarative and nondeclarative memory processes and their contributions to resilience." *Bull Menninger Clin*, **65**(4): 451-470.
- Dehmelt, L. y Halpain, S. (2005) "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins." *Genome Biol*, **6**(1): 204.
- Dent, E. W., Kwiatkowski, A. V., Mebane, L. M., Philippar, U., Barzik, M., Rubinson, D. A., Gupton, S., Van Veen, J. E., Furman, C., Zhang, J., Alberts, A. S., Mori, S. y Gertler, F. B. (2007) "Filopodia are required for cortical neurite initiation." *Nat Cell Biol*, **9**(12): 1347-1359.
- Dettenhofer, M., Zhou, F. y Leder, P. (2008) "Formin 1-isoform IV deficient cells exhibit defects in cell spreading and focal adhesion formation." *PLoS One*, **3**(6): e2497.
- Dietrich, M. O., Andrews, Z. B. y Horvath, T. L. (2008) "Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation." *J Neurosci*, **28**(42): 10766-10771.
- Diez, D., Alvarez, R. y Dopazo, A. (2007) "Codelink: an R package for analysis of GE healthcare gene expression bioarrays." *Bioinformatics*, **23**(9): 1168-1169.

- Dingwall, C. y Laskey, R. A. (1991) "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci*, **16**(12): 478-481.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. y Banker, G. A. (1988) "The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture." *J Neurosci*, **8**(4): 1454-1468.
- Eichenbaum, H., Otto, T. A., Wible, C. G. y Piper, J. M. (1991). ""Cap. 7. Building a model of the hippocampus in olfaction and memory". En: Olfaction.". Davis J. L., Eichenbaum H. MIT Press., Massachusetts.
- Etienne-Manneville, S. (2010) "From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players." *Current Opinion in Cell Biology*, **22**(1): 104-111.
- Fifkova, E. y Delay, R. J. (1982) "Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity." *J Cell Biol*, **95**(1): 345-350.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. y Warden, C. H. (1997) "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia." *Nat Genet*, **15**(3): 269-272.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C. y Guillemot, F. (1998) "The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons." *Neuron*, **20**(3): 483-494.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. y Mattaj, I. W. (1997) "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." *Cell*, **90**(6): 1051-1060.
- Galichet, C., Guillemot, F. y Parras, C. M. (2008) "Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus." *Development*, **135**(11): 2031-2041.
- Garcia-Segura, L. M. (2009). ""Hormones and Brain Plasticity"". Oxford University Press Oxford.
- Geinisman, Y. (2000) "Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning." *Cereb Cortex*, **10**(10): 952-962.
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W. y Hahne, F. (2007) "Genefilter: methods for filtering genes from microarray experiments." <http://bioconductor.org/packages/2.2/bioc/html/genefilter.html>.
- Goode, B. L. y Eck, M. J. (2007) "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." *Annu Rev Biochem*, **76**: 593-627.
- Goodman, C. S. y Shatz, C. J. (1993) "Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity." *Cell*, **72 Suppl**: 77-98.
- Goslin, K. y Banker, G. (1989) "Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture." *J Cell Biol*, **108**(4): 1507-1516.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. y Guillemot, F. (2000) "neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(4): 1607-1611.
- Gu, G., Dubauskaite, J. y Melton, D. A. (2002) "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." *Development*, **129**(10): 2447-2457.
- Gupton, S. L. y Gertler, F. B. (2010) "Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis." *Dev Cell*, **18**(5): 725-736.
- Han, X., Saito, H., Miki, Y. y Nakanishi, A. (2008) "A CRM1-mediated nuclear export signal governs cytoplasmic localization of BRCA2 and is essential for centrosomal localization of BRCA2." *Oncogene*, **27**(21): 2969-2977.
- Han, Z., Yi, P., Li, X. y Olson, E. N. (2006) "Hand, an evolutionarily conserved bHLH transcription factor required for Drosophila cardiogenesis and hematopoiesis." *Development*, **133**(6): 1175-1182.
- Hirokawa, N. y Takemura, R. (2005) "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons." *Nat Rev Neurosci*, **6**(3): 201-214.
- Homem, C. C. y Peifer, M. (2009) "Exploring the roles of diaphanous and enabled activity in shaping the balance between filopodia and lamellipodia." *Mol Biol Cell*, **20**(24): 5138-5155.
- Horvath, T. L., Diano, S. y Barnstable, C. (2003) "Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector." *Biochem Pharmacol*, **65**(12): 1917-1921.
- Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpaa, K., Faix, J., Rivera, C. y Lappalainen, P. (2009) "Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis." *J Cell Biol*, **185**(2): 323-339.
- Huang, W. Y., Yue, L., Qiu, W. S., Wang, L. W., Zhou, X. H. y Sun, Y. J. (2009) "Prognostic value of CRM1 in pancreas cancer." *Clin Invest Med*, **32**(6): E315.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R. y Barnes, C. L. (1984) "Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation." *Science*, **225**(4667): 1168-1170.



- Iso, T., Kedes, L. y Hamamori, Y. (2003) "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." *J Cell Physiol*, **194**(3): 237-255.
- Jacobs, L. F. (2003) "The evolution of the cognitive map." *Brain Behav Evol*, **62**(2): 128-139.
- Jacobs, L. F. y Schenk, F. (2003) "Unpacking the cognitive map: the parallel map theory of hippocampal function." *Psychol Rev*, **110**(2): 285-315.
- Kageyama, R. y Nakanishi, S. (1997) "Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system." *Curr Opin Genet Dev*, **7**(5): 659-665.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. y Smith, A. E. (1984) "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." *Nature*, **311**(5981): 33-38.
- Katz, L. C. y Shatz, C. J. (1996) "Synaptic activity and the construction of cortical circuits." *Science*, **274**(5290): 1133-1138.
- Kobiela, A., Pasolli, H. A. y Fuchs, E. (2004) "Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables." *Nat Cell Biol*, **6**(1): 21-30.
- Koester, S. E. y O'Leary, D. D. M. (1992) "Functional classes of cortical projection neurons develop dendritic distinctions by class-specific sculpting of an early common pattern." *J. Neurosci.*, **12**: 1382-1393.
- Korobova, F. y Svitkina, T. (2008) "Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells." *Mol Biol Cell*, **19**(4): 1561-1574.
- Korzh, V. y Strahle, U. (2002) "Proneural, prosensory, antiglial: the many faces of neurogenins." *Trends Neurosci*, **25**(12): 603-605.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. y Brunak, S. (2004) "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." *Protein Eng Des Sel*, **17**(6): 527-536.
- Laferriere, N. B., MacRae, T. H. y Brown, D. L. (1997) "Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons." *Biochem Cell Biol*, **75**(2): 103-117.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. y Corbett, A. H. (2007) "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." *J Biol Chem*, **282**(8): 5101-5105.
- Lee, J., Wu, Y., Qi, Y., Xue, H., Liu, Y., Scheel, D., German, M., Qiu, M., Guillemot, F., Rao, M. y Gradwohl, G. (2003) "Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord." *Dev Biol*, **253**(1): 84-98.
- Lejonklou, M. H., Edfeldt, K., Johansson, T. A., Stalberg, P. y Skogseid, B. (2009) "Neurogenin 3 and neurogenic differentiation 1 are retained in the cytoplasm of multiple endocrine neoplasia type 1 islet and pancreatic endocrine tumor cells." *Pancreas*, **38**(3): 259-266.
- Liu, Y., Wu, Y., Lee, J. C., Xue, H., Pevny, L. H., Kaprielian, Z. y Rao, M. S. (2002) "Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development." *Glia*, **40**(1): 25-43.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L. y Anderson, D. J. (1998) "neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia." *Neuron*, **20**(3): 469-482.
- Ma, W., Yan, R. T., Mao, W. y Wang, S. Z. (2009) "Neurogenin3 promotes early retinal neurogenesis." *Mol Cell Neurosci*, **40**(2): 187-198.
- Mass, R. L., Zeller, R., Woychik, R. P., Vogt, T. F. y Leder, P. (1990) "Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles." *Nature*, **346**(6287): 853-855.
- Matusek, T., Gombos, R., Szecsenyi, A., Sanchez-Soriano, N., Czibula, A., Pataki, C., Gedai, A., Prokop, A., Rasko, I. y Mihaly, J. (2008) "Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth." *J Neurosci*, **28**(49): 13310-13319.
- Miller, M. W. (1988). "Development of projection and local circuit neurons in neocortex". En: *Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York.
- Moore, A. W., Barbel, S., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. (2000) "A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(19): 10436-10441.
- Mumm, J. S. y Kopan, R. (2000) "Notch signaling: from the outside in." *Dev Biol*, **228**(2): 151-165.
- Nadel, L., O'Keefe, J. y Black, A. (1975) "Slam on the brakes: A critique of Altman, Brunner, and Bayer's response-inhibition model of hippocampal function." *Behavioral Biology*, **14**(2): 151-162.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. y Beppu, T. (1994) "Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression." *J Biol Chem*, **269**(9): 6320-6324.
- O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971) "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." *Brain Res*, **34**(1): 171-175.

- Ozen, I., Galichet, C., Watts, C., Parras, C., Guillemot, F. y Raineteau, O. (2007) "Proliferating neuronal progenitors in the postnatal hippocampus transiently express the proneural gene Ngn2." *Eur J Neurosci*, **25**(9): 2591-2603.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R. C., Cota, P., Wittnam, J. L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kang, H., Farinelli, L., Chen, W. y Fischer, A. (2010) "Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice." *Science*, **328**(5979): 753-756.
- Pelkey, K. A. y McBain, C. J. (2008) "Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites." *J Physiol*, **586**(6): 1495-1502.
- Pemberton, L. F. y Paschal, B. M. (2005) "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." *Traffic*, **6**(3): 187-198.
- Pollard, T. D. (2007) "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **36**: 451-477.
- Poulain, F. E. y Sobel, A. (2010) "The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players." *Mol Cell Neurosci*, **43**(1): 15-32.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. y Boone, C. (2002) "Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association." *Science*, **297**(5581): 612-615.
- Purves, D. y Hume, R. I. (1981) "The relation of postsynaptic geometry to the number of presynaptic axons that innervate autonomic ganglion cells." *J. Neurosci.*, **1**: 441-452.
- Rakic, P. (1985) "DNA synthesis and cell division in the adult primate brain." *Ann N Y Acad Sci*, **457**: 193-211.
- Rall, W. (1995). "The theoretical foundation of dendritic function". MIT Press, Massachusetts.
- Ramón y Cajal, S. (1911). "Histologie du système nerveux d l'homme et des vertébrés". A. Maloine, Paris.
- Redmond, L., Oh, S. R., Hicks, C., Weinmaster, G. y Ghosh, A. (2000) "Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development." *Nat Neurosci*, **3**(1): 30-40.
- Richard, D., Clavel, S., Huang, Q., Sanchis, D. y Ricquier, D. (2001) "Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function." *Biochem Soc Trans*, **29**(Pt 6): 812-817.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. y Dingwall, C. (1991) "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell*, **64**(3): 615-623.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. y Carlier, M. F. (2004) "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis." *Cell*, **119**(3): 419-429.
- Rubenstein, J. L. y Merzenich, M. M. (2003) "Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems." *Genes Brain Behav*, **2**(5): 255-267.
- Rukstalis, J. M. y Habener, J. F. (2009) "Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration." *Islets*, **1**(3): 177-184.
- Salama-Cohen, P., Arevalo, M. A., Grantyn, R. y Rodriguez-Tebar, A. (2006) "Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3." *J Neurochem*, **97**(5): 1269-1278.
- Salama-Cohen, P., Arevalo, M. A., Meier, J., Grantyn, R. y Rodriguez-Tebar, A. (2005) "NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch." *Mol Biol Cell*, **16**(1): 339-347.
- Salomon, S. N., Haber, M., Murai, K. K. y Dunn, R. J. (2008) "Localization of the Diaphanous-related formin Daam1 to neuronal dendrites." *Neurosci Lett*, **447**(1): 62-67.
- Sarkar, S. A., Kobberup, S., Wong, R., Lopez, A. D., Quayum, N., Still, T., Kutchma, A., Jensen, J. N., Gianani, R., Beattie, G. M., Jensen, J., Hayek, A. y Hutton, J. C. (2008) "Global gene expression profiling and histochemical analysis of the developing human fetal pancreas." *Diabetologia*, **51**(2): 285-297.
- Scott, E. K. y Luo, L. (2001) "How do dendrites take their shape?" *Nat Neurosci*, **4**(4): 359-365.
- Scoville, W. B. y Milner, B. (1957) "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **20**(1): 11-21.
- Seress, L. y Ribak, C. E. (1995) "Postnatal development of CA3 pyramidal neurons and their afferents in the Ammon's horn of rhesus monkeys." *Hippocampus*, **5**(3): 217-231.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. y Rakic, P. (1999) "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." *Science*, **286**(5440): 741-746.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C. y Tsien, J. Z. (2000) "NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation." *Science*, **290**(5494): 1170-1174.

- Smyth, G. K. (2004) "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat Appl Genet Mol Biol*, **3**: Article3.
- Sommer, L., Ma, Q. y Anderson, D. J. (1996) "neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS." *Mol Cell Neurosci*, **8**(4): 221-241.
- Strasser, G. A., Rahim, N. A., VanderWaal, K. E., Gertler, F. B. y Lanier, L. M. (2004) "Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation." *Neuron*, **43**(1): 81-94.
- Stuart, G., Spruston, N. y Hausser, M. (1999). ""Dendrites"". Oxford University Press, Oxford.
- Svitkina, T. M. y Borisy, G. G. (1999) "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." *J Cell Biol*, **145**(5): 1009-1026.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K. y Horio, Y. (2007) "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1." *J Biol Chem*, **282**(9): 6823-6832.
- Tsai, S. Y., Hayashi, T., Harvey, B. K., Wang, Y., Wu, W. W., Shen, R. F., Zhang, Y., Becker, K. G., Hoffer, B. J. y Su, T. P. (2009) "Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(52): 22468-22473.
- Vosper, J. M., Fiore-Herich, C. S., Horan, I., Wilson, K., Wise, H. y Philpott, A. (2007) "Regulation of neurogenin stability by ubiquitin-mediated proteolysis." *Biochem J*, **407**(2): 277-284.
- Wang, C. C., Chan, D. C. y Leder, P. (1997) "The mouse formin (Fmn) gene: genomic structure, novel exons, and genetic mapping." *Genomics*, **39**(3): 303-311.
- Wang, S., Jensen, J. N., Seymour, P. A., Hsu, W., Dor, Y., Sander, M., Magnuson, M. A., Serup, P. y Gu, G. (2009) "Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(24): 9715-9720.
- Witte, H., Neukirchen, D. y Bradke, F. (2008) "Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization." *J Cell Biol*, **180**(3): 619-632.
- Wittenberg, G. M. y Tsien, J. Z. (2002) "An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus." *Trends Neurosci*, **25**(10): 501-505.
- Woehlke, G., Ruby, A. K., Hart, C. L., Ly, B., Hom-Booher, N. y Vale, R. D. (1997) "Microtubule interaction site of the kinesin motor." *Cell*, **90**(2): 207-216.
- Woychik, R. P., Maas, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F. y Leder, P. (1990) "Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene." *Nature*, **346**(6287): 850-853.
- Xu, L. y Massague, J. (2004) "Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers." *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(3): 209-219.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Castele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., Bouwens, L., Scharfmann, R., Gradwohl, G. y Heimberg, H. (2008) "Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas." *Cell*, **132**(2): 197-207.
- Yoneda, Y., Hieda, M., Nagoshi, E. y Miyamoto, Y. (1999) "Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran." *Cell Struct Funct*, **24**(6): 425-433.
- Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T. y Nabeshima, Y. (2004) "Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis." *Dev Biol*, **269**(2): 447-458.
- You, J. J. y Lin-Chao, S. (2010) "Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons." *J Biol Chem*, **285**(15): 11652-11666.
- Zahn, S., Hecksher-Sorensen, J., Pedersen, I. L., Serup, P. y Madsen, O. (2004) "Generation of monoclonal antibodies against mouse neurogenin 3: a new immunocytochemical tool to study the pancreatic endocrine progenitor cell." *Hybrid Hybridomics*, **23**(6): 385-388.
- Zallen, J. A., Cohen, Y., Hudson, A. M., Cooley, L., Wieschaus, E. y Schejter, E. D. (2002) "SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in Drosophila." *J Cell Biol*, **156**(4): 689-701.
- Zeller, R., Haramis, A. G., Zuniga, A., McGuigan, C., Dono, R., Davidson, G., Chabanis, S. y Gibson, T. (1999) "Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of the polarising region." *Cell Tissue Res*, **296**(1): 85-93.
- Zhang, C. Y., Parton, L. E., Ye, C. P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C. T., Porco, J. A., Jr. y Lowell, B. B. (2006) "Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets." *Cell Metab*, **3**(6): 417-427.
- Zhou, F., Leder, P. y Martin, S. S. (2006) "Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2." *Exp Cell Res*, **312**(7): 1119-1126.