



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización de la neddilación como una verdadera modificación post-traducciona

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Ciencias Biológicas

Lic. Ivana M. Linenberg

Director de tesis: Dr. Damian Refojo

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) - CONICET-
Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2023

Resumen

“Caracterización de la neddilación como una verdadera modificación post-traducciona”

Nedd8 pertenece a la familia de las proteínas similares a Ubiquitina. Al igual que Ubiquitina, Nedd8 se une covalentemente a sus proteínas diana mediante una cascada de conjugación a través de enzimas específicas, proceso que se denomina neddilación. La neddilación es reversible y mediada por dos deneddilasas: el signalosoma COP9, que deconjugua Nedd8 de las Culinas, el blanco de neddilación más estudiado, y Nedp1, la principal proteasa encargada de remover Nedd8 del resto de las proteínas. Sin embargo, la neddilación como una auténtica modificación post-traducciona (MPT) ha sido objeto de controversia. En esta tesis nos propusimos explorar dos de los principales argumentos en contra de la neddilación como una verdadera MPT: 1) qué tan extendido y a qué niveles se da el fenómeno conocido como neddilación atípica y 2) cuál es la relevancia fisiológica de Nedp1 en diversos modelos biológicos. Observamos que la neddilación atípica ocurre en células humanas, pero no murinas y que su intensidad depende del contexto celular y del inductor utilizado, sugiriendo que no es un fenómeno altamente conservado como fuera previamente sugerido. Por otro lado, utilizando modelos invertebrados transgénicos, demostramos, en primer lugar, que la pérdida de función del ortólogo de Nedp1 afecta negativamente la fertilidad y la sobrevivencia en *D. melanogaster*. Observamos, además, que Nedp1 otorga resistencia tanto a *D. melanogaster* como a *C. elegans* frente a condiciones de estrés. Notablemente, demostramos que la deneddilasa Nedp1 es esencial en un modelo murino, señalando que la importancia biológica de esta enzima es mayor en mamíferos. Además, su deleción en células derivadas del tubo neural conduce a una disminución del tamaño cerebral, un aumento en el tamaño de los ventrículos laterales y una reducción en el tamaño relativo del estriado dorsal. Esta deleción, no provoca alteraciones en la complejidad de la arborización dendrítica, en la densidad de espinas ni en el volumen de espinas dendríticas de neuronas de la región CA1 del hipocampo. Finalmente, reportamos que el rol de Nedp1 en la sobrevivencia de fibroblastos embrionarios murinos frente a inductores proapoptóticos varía dependiendo del estímulo utilizado, sugiriendo que Nedp1 no ejerce un único rol general frente al estrés celular, sino que participa de vías específicas.

Los resultados de esta tesis aportan al entendimiento de la relevancia fisiológica de la neddilación en general y de Nedp1 en particular en diversos contextos y modelos sustentando una hipótesis que ha permanecido controversial por largo tiempo: que la neddilación es una verdadera modificación post-traducciona

Abstract

“Characterization of neddylation as a true post-translational modification”

Nedd8 belongs to the Ubiquitin-like protein family. Like Ubiquitin, Nedd8 covalently binds to its target proteins through a conjugation cascade through specific enzymes, a process called neddylation. Neddylation is reversible and is mediated by two deneddylases: the signalosome COP9, which deconjugates Nedd8 from Cullins, the most studied neddylation target, and Nedp1, the main protease responsible for removing Nedd8 from all the other proteins. However, the concept of neddylation as a true post-translational modification (MPT) has been the subject of controversy. In this thesis we set out to explore two of the main arguments against neddylation as a true MPT: 1) how widespread and at what levels does the phenomenon known as atypical neddylation occur and 2) what is the physiological relevance of Nedp1 in various biological models. We observed that atypical neddylation occurs in human but not murine cells and that its intensity depends on the cellular context and the used stimulus, suggesting that it is not a highly conserved phenomenon as previously suggested. On the other hand, using transgenic invertebrate models, we demonstrate, first, that loss of function of the Nedp1 orthologue negatively affects fertility and survival in *D. melanogaster*. We further describe that Nedp1 confers resistance to both *D. melanogaster* and *C. elegans* upon stress conditions. Notably, we show that Nedp1 deneddylase is essential in a murine model, indicating that the biological relevance of this enzyme is greater in mammals. Moreover, its deletion in neural tube-derived cells leads to a decrease in brain size, an increase in the size of the lateral ventricles and a reduction in the relative size of the dorsal striatum. This deletion does not affect the complexity of dendritic arborization, spine density nor dendritic spine volume of neurons in the CA1 region of the hippocampus. Finally, we report that the role of Nedp1 in the survival of murine embryonic fibroblasts against proapoptotic inducers varies depending on the stimulus used, suggesting that Nedp1 does not exert a single general role against cellular stress, but participates in specific pathways.

The results of this thesis contribute to the understanding of the physiological relevance of neddylation in general and of Nedp1, in particular, across diverse contexts and models, supporting a hypothesis that has long remained controversial: that neddylation is a true post-translational modification.

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis solo fue posible por el apoyo que recibí durante todos estos años de mucha gente y por eso quiero agradecerles:

A Damian, por asegurarse de que tenga todo lo necesario para poder avanzar en los proyectos y por enriquecer mi conocimiento sobre el mundo científico con lo que él llama “educación integral”. A Seba Giusti, por la paciencia, el optimismo, la contención tanto a nivel científico como emocional, por guiarme durante todo el doctorado y brindarme las herramientas y estrategias para afrontar las dificultades, siempre con refuerzo positivo.

A mis compañeros de laboratorio originales, Jero y Raque, con quienes compartí muchos momentos en la mesada, en el bioterio, en juntadas y siempre estuvieron ahí para acompañarme, escucharme y aconsejarme. A mis compañeras “nuevas” Cami, Giulia y Nati por generar un ambiente de trabajo relajado y divertido.

A todo el gran grupo Neuro por hacer del lugar de trabajo un ambiente muy cómodo, cálido y lleno de comida. A Anto, por su buena onda. A Nara, por abrirme las puertas de su flyroom, por introducirme en el mundo de las moscas y por siempre estar dispuesta a ayudar en todo lo que necesitara. A Flor por las clases de Illustrator y de llenar palitos de moscas. A Seba Romano por ser el ministro del ministerio más importante de todos, el de tortas, y por su ayuda con Matlab. A Noe, por estar siempre con una sonrisa. A Sol, Macky y Lucca, Agus e Ivi, por ser tan buenos compañeros. A Mari, por todos los genotipados y su amistad. A Mori, por recomendarme este grupo y hacerme sentir bienvenida. A Oli, por todos los tereres que me robó y por darme charla hacia el final del día cuando necesitaba desconectar un poco. A Pedruchis, por todos los mates, la compañía y el aguante durante mi etapa mosquil y no mosquil.

A mis amigas del mundo de la biología, Flor Todero, por todas las birritas y las charlas de labo, labo, labo. A Romi, por su amistad y apoyo sobre todo en esta última etapa y por ser la experta en western

blot. A Del y Maite, por acompañarme desde la licenciatura. A mis amigas de la vida Vale, Vick, Juli y Mar por escucharme hablar del labo tantas veces, hacerme el aguante y darme ánimo.

A mi familia, mi papá, mi hermano y mi madrina por el apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	13
1 UBIQUITILACIÓN Y PROTEÍNAS SIMILARES A UBIQUITINA	14
1.1 UBIQUITILACIÓN	14
1.1.1 Modificaciones por Ubiquitina: el código Ubiquitina	16
1.1.2 El Sistema de Ubiquitilación por Culinas y el Rol de Nedd8 en su Activación	17
2 LA VÍA DE LA NEDDILACIÓN	19
2.1 NEDDILACIÓN ATÍPICA	23
3 DENEDDILACIÓN	25
3.1 NEDP1, LA PRINCIPAL DECONJUGASA DE NEDD8	26
4 LA CONTROVERSIA SOBRE LA NEDDILACIÓN DE BLANCOS NO CULINAS	29
4.1 CARENCIA DE UN MÉTODO ANALÍTICO QUE PERMITA DETECTAR PROTEÍNAS NEDDILADAS DE MANERA ESPECÍFICA	30
4.2 EL FENÓMENO DE NEDDILACIÓN ATÍPICA PONE EN DUDA LOS BLANCOS DE NEDD8 PREVIAMENTE DESCRIPTOS	31
4.3 NEDP1: ¿UNA PROTEASA IRRELEVANTE <i>IN VIVO</i> ?	32
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
1 Reactivos	37

2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	38
2.1	Mantenimiento de líneas de gusanos	38
2.2	Líneas de gusanos utilizadas	38
2.3	Genotipado de <i>C. elegans</i>	39
2.4	Ensayo de sobrevivencia de gusanos	40
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	40
3.1	Mantenimiento de líneas de moscas de la fruta	40
4	Líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas	41
5	Ensayo de desarrollo en moscas	41
6	Ensayos de sobrevivencia en moscas	42
7	Ratones	42
7.1	Mantenimiento de ratones	42
7.2	Cepas y líneas transgénicas de ratones usadas en esta tesis	43
7.3	Genotipado de los ratones	44
8	Cultivos primarios	45
8.1	Preparación de cultivo primario de neuronas	45
8.2	Preparación de cultivo primario de fibroblastos embrionarios	46
9	Líneas celulares	46
10	Análisis de la complejidad de la arborización dendrítica de neuronas primarias en cultivo	46
10.1	Transfección de neuronas primarias (sistema Amaxa)	46
10.2	Inmunohistoquímica de neuronas primarias	47
10.3	Adquisición de imágenes y análisis morfológico neuronal	48
11	Western blot	48
12	RT-qPCR	49
12.1	Extracción de ARN	49
12.2	Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real	50
13	Análisis morfológico cerebral, neuronal y dendrítico <i>in vivo</i>	51
13.1	Preparación de cortes de cerebro de ratones	51
13.1.1	Adquisición de imágenes y análisis de secciones coronales de cerebros	51

13.1.2	Adquisición de imágenes y análisis morfológico neuronal <i>in vivo</i>	53
13.1.3	Adquisición de imágenes y análisis de espinas dendríticas <i>in vivo</i>	53
13.2	Tinción LacZ (X-Gal) de cerebros murinos	54
14	Ensayo de sobrevivencia de MEFs en cultivo	55
15	Análisis estadístico de los datos	55

RESULTADOS	56
-------------------	-----------

Capítulo I. Exploración del fenómeno de neddilación atípica en diversos tipos celulares	57
--	-----------

Conclusiones	62
--------------	----

Capítulo II. Estudio de la relevancia fisiológica de ortólogos de <i>Nedp1</i> en dos modelos de animales invertebrados	63
--	-----------

Estudio del rol de <i>ulp-3</i> en la sobrevivencia de <i>C. elegans</i>	64
--	----

Efecto del estrés osmótico en la sobrevivencia de <i>C. elegans</i> en ausencia de <i>ulp-3</i>	65
---	----

Caracterización fisiológica de la mosca <i>Den1</i> KO	66
--	----

La pérdida de función de <i>Den1</i> reduce la fertilidad en <i>D. melanogaster</i>	67
---	----

La pérdida de función de <i>Den1</i> afecta negativamente la sobrevivencia de <i>D. melanogaster</i>	68
--	----

Conclusiones	72
--------------	----

Capítulo III. <i>Nedp1</i> es un gen esencial en ratones	73
---	-----------

Generación de la línea de ratón trampa génica reportera de <i>Nedp1</i>	73
---	----

La pérdida de función de <i>Nedp1</i> es subletal en ratones con <i>background</i> genético mixto	77
---	----

<i>Nedp1</i> se expresa en todas las células del cerebro	78
--	----

La pérdida de función de <i>Nedp1</i> es letal en ratones C57LB/6	79
---	----

Conclusiones	81
--------------	----

Capítulo IV. La depleción de <i>Nedp1</i> provoca alteraciones morfológicas en el cerebro de ratón	82
---	-----------

<i>Nedp1</i> afecta la arborización dendrítica de neuronas hipocámpales en cultivo	82
--	----

Obtención de la línea de ratón KO condicional de <i>Nedp1</i>	83
---	----

Los cerebros que carecen de <i>Nedp1</i> funcional son más pequeños con ventrículos laterales agrandados	87
--	----

La pérdida de función de <i>Nedp1</i> no afecta la morfología neuronal	91
--	----

La densidad y el volumen de espinas dendríticas no se ve alterada por Nedp1	94
Conclusiones	96
Capítulo V. Nedp1 y la sobrevida a inductores apoptóticos en células en cultivo	97
La pérdida de función de Nedp1 tiene efectos diferenciales en la sobrevida celular ante diferentes estresores	98
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>101</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>109</u>

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
APC/C:	Complejo promotor de anafase
Appbp1:	<i>Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosina trifosfato
bp:	Pares de bases
CRL:	Culinas-RING E3 ligasas
CSN:	Complejo signalosoma Cop9
Cul:	Culina
Den1:	Ortólogo de NEDP1 en <i>D. melanogaster</i>
DMSO:	Dimetilsulfoxido
E1:	Enzima activadora
E2:	Enzima conjugadora
E3:	Enzima ligasa
EGFP:	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
HECT:	<i>C-terminal Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus</i>
HEK:	HEK 293
HS:	Shock térmico
IHQ:	Inmunohistoquímica
K:	lisina
KD:	<i>Knockdown</i>
KO:	<i>Knockout</i>
lacZ:	Gen de <i>Escherichia coli</i> que codifica para la proteína β -galactosidasa
Lys:	lisina
MEF:	Fibroblastos embrionarios murinos
MPT:	Modificación post-traducciona
NAE:	Enzima activadora de Nedd8
NAEi:	Inhibidor de NAE: MLN4294

NEDP1:	NEDD8- <i>specific protease</i> 1, también conocida como SENP8
NGM:	<i>nematode growth medium</i>
Nº:	Número
pb:	pares de bases
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR:	<i>real-time quantitative reverse transcription PCR</i>
R:	Arginina
Rbx:	Proteína RING-Box
RING:	<i>Really Interesting New Gene</i>
SCF:	Complejo Skp1 - Culina1 - <i>F-box</i>
SENP8:	SUMO- <i>specific protease</i> 8, deneddilasa (NEDP1)
SKP1:	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
Ub:	Ubiquitina
UBA1:	Enzima activadora de Ubiquitina 1
UBA3:	Enzima activadora de Ubiquitina 3
UBL:	Proteínas similares a Ubiquitina
ulp-3:	Ortólogo de NEDP1 en <i>C. elegans</i>
w:	<i>white</i>
WB:	Western blot
WT:	<i>wildtype</i>

Introducción

El presente trabajo se enmarca en el contexto de la vía de la neddilación, la conjugación de la proteína Nedd8 a proteínas blanco, y se enfoca en abordar algunas de las controversias en torno a la legitimidad de la neddilación como una auténtica modificación postraduccional (MPT). Dada la estrecha vinculación de Nedd8 con Ubiquitina tanto por homología como por la regulación cruzada de estas vías, comenzaremos exponiendo las relaciones entre la ubiquitilación y la neddilación y luego desarrollaremos los argumentos que hacen a esta MPT controvertida.

1 Ubiquitilación y Proteínas Similares a Ubiquitina

La ubiquitilación es una modificación post-traduccional mediante la cual la proteína Ubiquitina se conjuga a una multitud de proteínas blanco a través de una cascada enzimática. La ubiquitilación de un sustrato promueve su degradación mediada por el proteasoma o cambios en su estructura y/o función [1-4]. Existe un grupo de proteínas similares a Ubiquitina (UBLs) que conforma la familia de UBL. Dentro de esta familia se encuentran Nedd8, SUMO, ISG15, ATG8, Atg12, Urm1 y UFM1 cuyas funciones en general aún permanecen pobremente comprendidas y en algunos casos recién comienzan a dilucidarse [5, 6]. Casi todas las UBLs se conjugan con sus sustratos a través de cascadas enzimáticas de una manera análoga a la ubiquitilación [3, 5, 7-9].

1.1 Ubiquitilación

La Ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que se encuentra en todas las células eucariotas y que se une covalentemente a sus proteínas blanco mediante un enlace isopeptídico entre su glicina en la posición C-terminal y un residuo lisina (Lys) del sustrato aceptor [10]. La Ubiquitina, al igual que la mayoría de las UBLs, sufre un proceso de maduración a través del cual un precursor inactivo es clivado en su extremo C-terminal exponiendo el carboxilato de glicina posibilitando así la conjugación a sus blancos [10].

La ubiquitilación de proteínas ocurre mediante una cascada enzimática que involucra a enzimas activadoras (E1), enzimas conjugadoras (E2) y enzimas ligasas (E3) [11] (Figura I1). Es un proceso secuencial, que puede revertirse mediante reacciones catalizadas por enzimas deubiquitilasas.

En mamíferos existen dos genes que codifican para enzimas E1 de Ubiquitina (UBA1 y UBA6) [12]. Esta clase de enzimas hidrolizan ATP para activar a la molécula de Ubiquitina, un paso requerido para su unión a las enzimas E2. Existen alrededor de 40 genes que codifican para enzimas E2, y cada una coopera individualmente con varias enzimas E3 ligasa [13, 14]. Cada sustrato, a su vez, puede ser reconocido por varias E3 ligasas [10]. Las enzimas E3 ligasas se unen simultáneamente a los sustratos y a las enzimas E2, poniéndolos en contacto. De este modo, la molécula de Ubiquitina es transferida desde la E2 al sustrato directamente, o a través de un paso intermedio en el que la Ubiquitina se une (mediante enlace tioéster) a la E3 ligasa, dependiendo del tipo de E3 ligasa involucrada en la reacción. La superposición estructural entre los sitios de unión E1 y E3 con las E2s da como resultado interacciones E1-E2 y E2-E3 mutuamente excluyentes, lo que garantiza la progresión unidireccional de la cascada E1-E2-E3 [15].

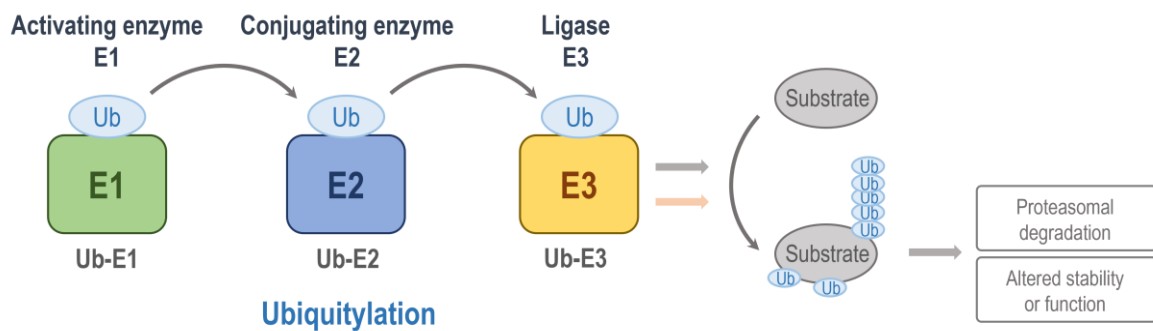


Figura 11. La vía de conjugación de Ubiquitina. La vía de ubiquitinación consiste en tres pasos secuenciales. La Ubiquitina es activada por la enzima activadora E1, de manera dependiente de ATP, luego Ubiquitina es conjugada a una enzima conjugadora E2 y transferida a una enzima E3 ligasa que finalmente media la unión covalente de Ubiquitina a un residuo típicamente lisina de la proteína blanco. Ub: Ubiquitina.

Se conocen alrededor de 700 genes que codifican para enzimas E3 ligasas. Según su mecanismo molecular de acción las mismas pueden dividirse en dos categorías, HECT y RING. Las ligasas de tipo HECT (*C-terminal Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus*) conforman una familia de 30 ligasas (en humanos) que catalizan la transferencia de Ubiquitina a través de una reacción de dos pasos: primero, la Ubiquitina es transferida a una cisteína catalítica en la enzima E3, y de la E3 al sustrato. Mientras que el dominio HECT C-terminal está involucrado en la catálisis, la especificidad del sustrato está determinada por la región N-terminal de la ligasa [16-19]. Las ligasas de tipo RING (*Really Interesting New Gene*) con más de 600 genes que las codifican en humanos, son la familia más prominente de E3

ligasas de Ubiquitina y explican casi el 20% del *turnover* de proteínas en células eucariotas [20]. A diferencia de las HECT, estas enzimas carecen de actividad catalítica intrínseca y funcionan como chaperonas de acoplamiento entre el sustrato, reclutado en un extremo de la enzima a través de adaptadores, y la E2 cargada con Ubiquitina activada, quien proporciona la actividad catalítica. Las Culinas-RING E3 ligasas (CRLs) son el grupo más numeroso de esta clase, dentro de la cual el complejo SCF (Skp1 - Culina1 - *F-box*) es el mejor descrito (ver sección de introducción 1.1.2).

El dominio RING fue inicialmente asociado al sistema proteolítico de Ubiquitina vinculado a la regulación del ciclo a través del complejo APC/C (complejo promotor de anafase) [21, 22] y el complejo SCF [23, 24]. Ambos son complejos multiprotéicos involucrados en la proliferación celular ya que se encargan de ubiquitar sustratos asociados a la progresión del ciclo celular para su posterior degradación por el proteasoma.

1.1.1 Modificaciones por Ubiquitina: el código Ubiquitina

Las modificaciones por Ubiquitina pueden darse de varias maneras y el conjunto de repertorios posibles se denomina “el código de Ubiquitina” (Figura I2). La conjugación de una sola molécula de Ubiquitina (monoubiquitilación) es la más frecuente y se encuentra asociada a la reparación del ADN, la transcripción, la transducción de señales, la endocitosis e incluso la degradación vía el proteasoma [25, 26]. La Ubiquitina es susceptible a ser modificada por otras moléculas de Ubiquitina en sus residuos Met1, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63, pudiendo formar cadenas de largo, combinación y configuración variable (homotípicas, heterotípicas y ramificadas). Las cadenas homotípicas involucran la unión de un mismo residuo de Ubiquitina, siendo las cadenas de poli-Ubiquitina Lys48 el caso más estudiado y predominante de este tipo de cadenas [27, 28]. Este tipo de enlace de Ubiquitina marca a las proteínas para la degradación proteolítica regulando la transducción de señales, la división celular, la respuesta al estrés, el sistema inmune adaptativo y el desarrollo [3, 29, 30]. A su vez, las cadenas de Ubiquitina no ancladas a un sustrato pueden actuar como mensajeros secundarios en las células [31].

Ubiquitina es susceptible a ser modificada por otras UBLs como Nedd8 y SUMO, y viceversa, lo cual agrega un nivel más de complejidad al tipo de cadenas que se pueden formar. Este tipo de cadenas

mixtas ha sido detectado en condiciones de estrés celular, aunque se requieren más estudios para determinar su función biológica [32-37].

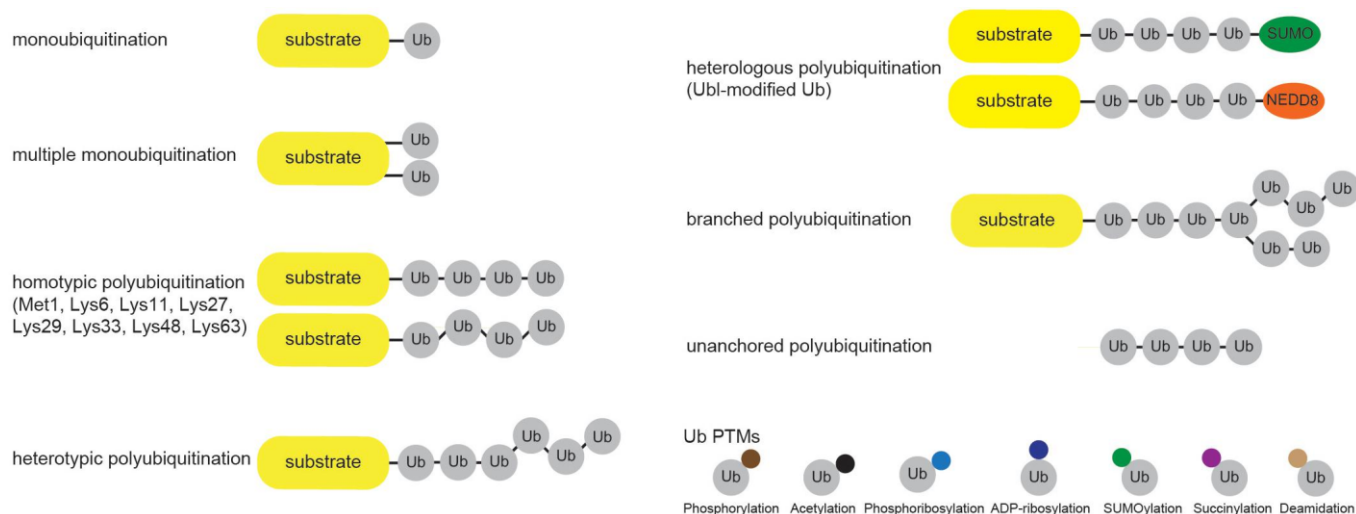


Figura 12. Tipos de ubiquitilación. Las moléculas de Ubiquitina pueden conjugarse a las proteínas en uno (monoubiquitinación) o varios (monoubiquitinación múltiple) residuos Lys. Ubiquitina puede formar ocho enlaces homotípicos distintivos, ya sea a través de Met1 (cadena Ub lineal) o de 7 residuos Lys internos (cadenas Ub conectadas a Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63). Se consigue una complejidad adicional mediante la formación de cadenas de Ubiquitina heterotípicas, que contienen múltiples enlaces y adoptan una topología mixta o ramificada. Además, los polímeros heterólogos contienen UBL adicionales, como SUMO o NEDD8, dentro de las cadenas de Ubiquitina. Las moléculas de Ub son blanco de diversas MPT, como la fosforilación y la acetilación, las cuales regulan sus propiedades de unión y su capacidad para generar cadenas. Ub: Ubiquitina. Figura tomada de Kliza K, Husnjak K. Front Mol Biosci. 2020 [38].

1.1.2 El sistema de Ubiquitilación por Culinas y el rol de Nedd8 en su activación

La neddilación cumple un rol fundamental en regular la ubiquitilación. En esta sección, se detallarán los complejos CRLs y el proceso mediante el cual Nedd8 regula su actividad.

Los complejos CRLs poseen una proteína de la familia de las Culinas (Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 o Cul7) como andamiaje que hace de puente entre el sustrato y la enzima E2 (Figura I3). El primer complejo en ser caracterizado fue el SCF que está compuesto por una subunidad Culina (Cdc53 en levaduras/CUL1 en mamíferos), que cumple el rol de andamiaje necesario para la formación del complejo, e incluye a la proteína Rbx1 RING-H2 *finger* [23, 39] y a la proteína SKP1 (*S-phase kinase-*

associated protein 1), un adaptador de sustrato que se une a un segmento N-terminal de CUL1/Cdc53, y a una variedad de subunidades de reconocimiento de sustrato denominadas proteínas F-box [40, 41]. A través de su porción C-terminal CUL1/Cdc53 se une a Rbx1, que actúa como un sitio de acoplamiento para la enzima E2 conjugada a Ubiquitina (Figura I3). La transferencia de Ubiquitina al blanco asociado al complejo ocurre únicamente una vez que Nedd8 se conjuga a la Culina, ya que la neddilación de Culina provoca un cambio conformacional acercando el sustrato y la enzima E2-Ubiquitina [39], permitiendo así la catálisis de la reacción de ubiquitilación entre la E2 y el sustrato (Figura I3). Las proteínas RING-Box Rbx1 y Rbx2 se unen preferentemente a Cul1-2-3 y Cul4A-4B-5, respectivamente, y actúan como E2 de Nedd8 para la neddilación de estas Culinas. Si se eliminan estas proteínas, la neddilación de las Culinas se ve afectada [42-44].

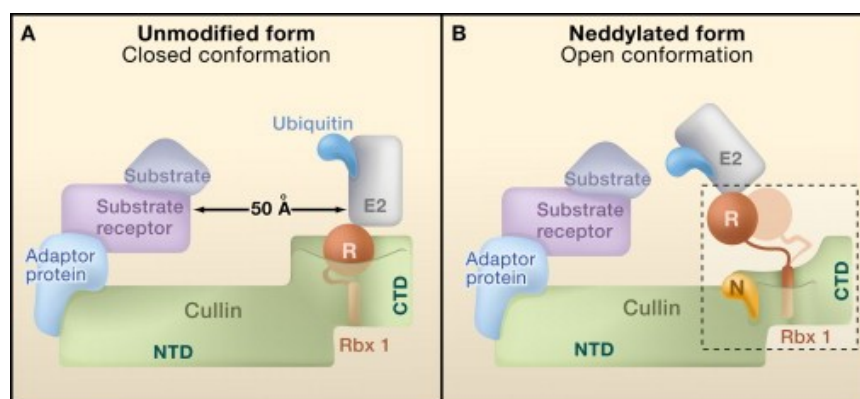


Figura I3. La neddilación de Culinas controla la actividad del complejo CRL. Las Culinas-RING E3 ligasas (CRL) son complejos enzimáticos que median la transferencia de Ubiquitina de enzimas E2 conjugadas de Ubiquitina (E2) a sus proteínas targets. La neddilación de la lisina conservada del dominio C-terminal de Culina provoca un cambio conformacional que favorece transferencia de la Ubiquitina conjugada a E2 al sustrato. Esquema que muestra el complejo CRL con la subunidad Culina no neddilada (A) y neddilada (B). N: Nedd8, CTD: dominio C-terminal, R: Rbx1. Figura tomada de Saifee NH, Zheng N. Cell. 2008 [45].

La región N-terminal de cada tipo de Culina se asocia a una proteína adaptadora que contiene un dominio que interactúa con una serie de subunidades de reclutamiento de sustratos variables, proteínas F-box (de las cuales se conocen cerca de 60 en humanos) [46], específicas para cada tipo de Culina. En la Figura I4 se indican las proteínas adaptadoras conocidas para cada complejo CRL. En todo complejo CRL la neddilación de Culina es esencial para que se catalice la ubiquitilación del sustrato [39, 47].

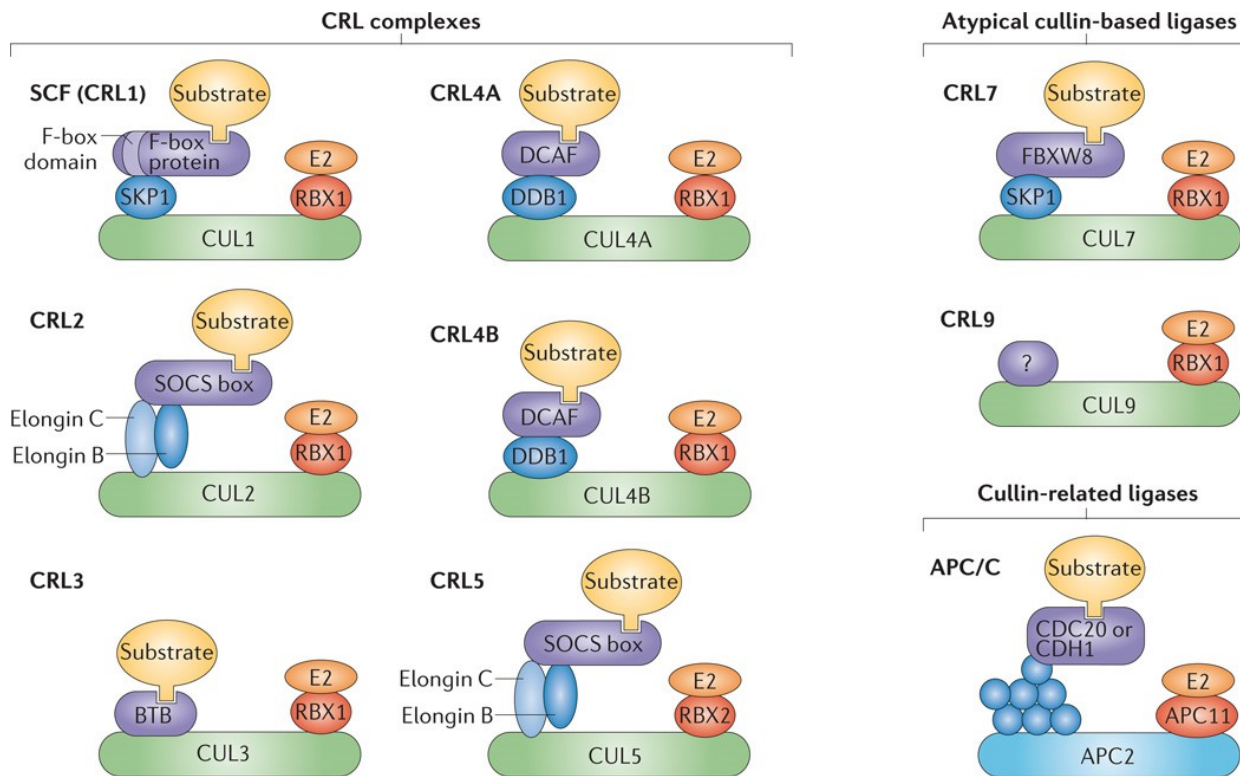


Figura 14. Los complejos CRLs. Las Culinas son las proteínas de andamiaje de los complejos CRLs. Los complejos CRLs son modulares y poseen adaptadores de sustrato variables dependiendo de la Culina involucrada, que se describen a continuación. El complejo CRL1 (mejor conocido como SCF) utiliza SKP1 y proteínas F-box como adaptadores, los complejos CRL2 y CRL5 utilizan las proteínas Elongin B, Elongin C y la proteína SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) box. Los adaptadores de sustrato de CRL3 son la proteínas BTB (*bric-a-brac-tramtrack-broad complex*). CRL4A y CRL4B poseen las proteínas DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*) y DCAF (*DDB1- and CUL4-associated factor*) como adaptadores. CRL7 utiliza SKP1 y la proteína F-box FBXW8 (F-box and WD40 domain 8). Los adaptadores de CRL9 aún no han sido identificados. La configuración del complejo APC/C (*anaphase promoting complex*) aún no ha sido totalmente descrita. Figura tomada de Skaar JR, Pagan JK, Pagano M. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 [48].

2 La vía de la neddilación

Nedd8 es la UBL con mayor homología en estructura y secuencia (60 %) con Ubiquitina [49]. Al igual que la Ubiquitina, Nedd8 es sintetizada como un precursor de 81 aminoácidos que es hidrolizado en su extremo C-terminal dejando también dos glicinas C-terminales. Este proceso es llevado a cabo por NEDP1 (también conocida como SENP8 o DEN1), enzima específica para Nedd8, y UCH-L3, otra proteasa que también puede procesar Ubiquitina [50].

Como la mayoría de las UBLs, Nedd8 se conjuga a sus blancos de manera análoga a la vía de ubiquitilación a través de una cascada enzimática de E1, E2 y E3 específicas para Nedd8 [51] (Figura I5). La enzima activadora E1 de Nedd8 (NAE) es un heterodímero compuesto por NAE1, también conocida como Appbp1 (*Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1*), y UBA3 (*Ubiquitin-Activating Enzyme 3*). NAE activa Nedd8 mediante una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP [52-54]. Nedd8 activa es transferida a Ubc12, la enzima E2 conjugadora de Nedd8, también conocida como Ube2M, formando un enlace tioéster [54]. Ube2F es otra enzima conjugadora de Nedd8 que promovería preferencialmente la neddilación de Culina 5 [55]. Finalmente, mediante la intervención de enzimas E3 ligasas aún poco descriptas, Nedd8 es conjugado al grupo ϵ de la cadena lateral de lisinas de sus blancos mediante un enlace isopeptídico. Este proceso puede llevar a la mono- o poli-neddilación, ya que las lisinas de Nedd8 pueden ser neddiladas [33, 56, 57].

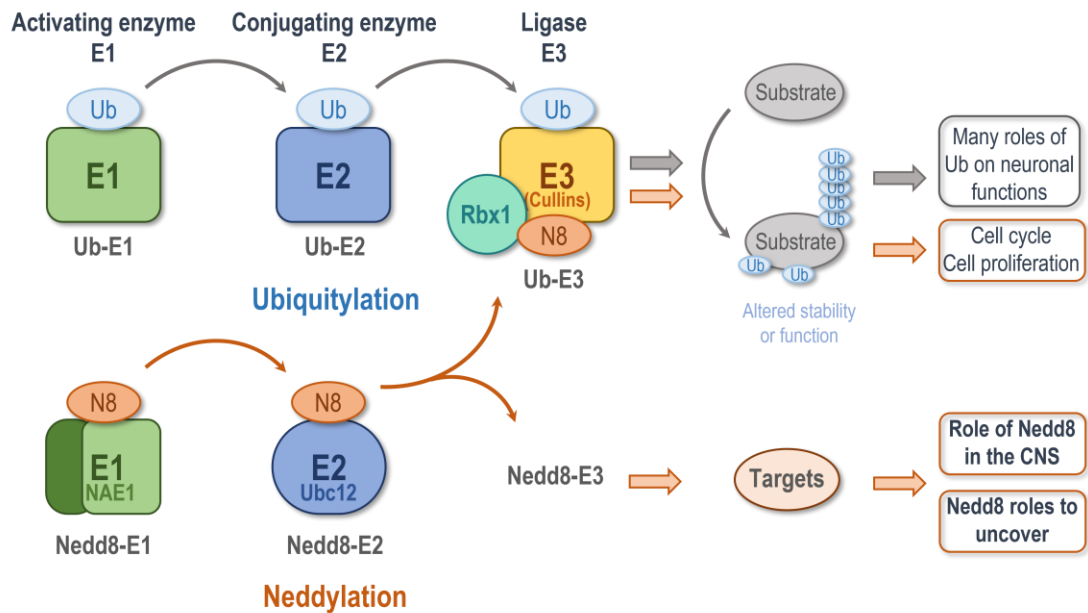


Figura I5. Interacción de la vía de conjugación de Nedd8 con el sistema de ubiquitilación. La vía de la neddilación es análoga a la conjugación de Ubiquitina, pero depende de sus propias enzimas específicas: activadora (E1), conjugasas (E2) y ligasas (E3). En el concepto clásico Nedd8 es transferido por Ubc12 directamente a las Culinas induciendo su actividad de Ubiquitina E3 ligasa. Sin embargo, Nedd8 también se une a otros blancos, muchos aún sin identificar. Ub: Ubiquitina; N8: Nedd8.

Los primeros y más descriptos blancos de Nedd8 fueron las Culinas, las chaperonas de los complejos CRLs mencionadas en la sección anterior. La neddilación de Culinas promueve la actividad de CRLs y por ende estimula la degradación mediada por el proteasoma de blancos de CRLs [45, 58, 59]. De los complejos CRL, el más estudiado es el SCF, que controla la tasa de degradación de varios factores del ciclo celular y otros factores relacionados con la división celular en sí misma [60-63].

La vía de la neddilación se encuentra en todas las células de la mayoría de los organismos eucariotas y se reportó que su expresión es indispensable para la viabilidad en *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis* y *Mus musculus* [53, 64]. La inactivación de la vía de neddilación ya sea mediante el bloqueo de Nae1 o Ubc12 o la depleción de Nedd8, resulta en alteraciones en la mitosis y anormalidades en el desarrollo que, en la mayoría de los casos, derivan en la muerte en los modelos biológicos estudiados tales como líneas celulares, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *A. thaliana* [65-70]. De estos resultados se desprende la idea de inhibir la vía de la neddilación como potencial terapia anti-cáncer y surge la búsqueda de drogas que bloqueen la neddilación. En 2009 Millenium Pharmaceuticals desarrolló MLN4924, un inhibidor de la enzima E1 activadora de Nedd8 con una constante K_i en rango nanomolar y con el cual se han generado y continúan en desarrollo varios ensayos clínicos para linfomas y tumores sólidos [71, 72].

Con el tiempo se fueron describiendo nuevos blancos de Nedd8 utilizando la expresión exógena de NEDD8 con un *tag* en líneas celulares seguida de proteómica como estrategia de identificación. Entre estos blancos se encuentran p53, p73, Mdm2, la proteína von Hippel Lindau (pVHL), *breast cancer associated gene 3* (BCA3), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor inducible de hipoxia (HIF) α , L11 y otras proteínas ribosomales [64, 73-77]. Gran parte de los blancos de Nedd8 fueron descubiertos en líneas celulares, que se caracterizan por una alta tasa de división, y los blancos identificados eran en su mayoría proteínas supresoras de tumores, por ende, la función de la neddilación continuaba principalmente asociada a la regulación del ciclo celular. Estos estudios sugirieron que la función de Nedd8 no era exclusivamente la modificación y activación de Culinas sino que esta ubicua UBL podría en efecto tener muchos otros blancos moleculares. Sin embargo, el hecho de que todos estos sustratos fueran hallados mediante la expresión forzada de Nedd8 exógena arrojaba dudas técnicas sobre este punto como será comentado en las secciones 2.1 y 4.1.

Curiosamente, un hecho que es escasamente comentado en la literatura es que a pesar de que clásicamente se ha visto a Nedd8 como una proteína funcionalmente asociada a la proliferación celular (a través de su requerimiento para la activación de Culina 1), en realidad Nedd8 fue inicialmente identificada en cerebro, un órgano básicamente poblado por células postmitóticas que abandonaron el ciclo celular. El ARNm de Nedd8 se identificó originalmente como uno de varios genes cuya expresión en neuronas decae a lo largo del desarrollo del cerebro del ratón, de allí su nombre: *Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8 (Nedd8)* [78]. Sin embargo, nuestro laboratorio demostró en 2015 que esto no se verifica a nivel proteico donde, aunque los niveles de la proteína Nedd8 se mantienen estables, la neddilación general no solo no decae, sino que aumenta con el desarrollo, tanto en neuronas en cultivo como en el cerebro murino [79]. Además, Nedd8 es la UBL que más se expresa en neuronas de ratón en cultivo, incluso más que los tres tipos de SUMO (1, 2 y 3), considerados independientemente [79]. En este mismo estudio Vogl y colaboradores reportaron por primera vez que la neddilación ejerce un rol esencial en la maduración y estabilidad sináptica en neuronas y que esta función no depende de Culinas. Se identificó a través de varios métodos que la chaperona sináptica PSD-95 es blanco de Nedd8 y que su neddilación es necesaria para la estabilidad sináptica en el ratón adulto [79]. En otro conjunto de estudios, nuestro grupo demostró que la inhibición de la neddilación en neuronas afecta el citoesqueleto de actina y el desarrollo de neuritas, y comprobó que la neddilación de Cofilina, un regulador clave de la dinámica de actina, es crucial para el normal desarrollo dendrítico en modelos *in vivo* [33].

La potenciación de largo término (LTP), y su correlato inhibitorio, la depresión de largo tiempo (LTD) son procesos de plasticidad neuronal que se consideran los sustratos moleculares de cambios prolongados en el cerebro y la conducta [80, 81]. La memoria, el aprendizaje, las adicciones y algunos procesos psiquiátricos requieren de estos procesos de plasticidad sináptica. A partir de estudios electrofisiológicos en secciones de hipocampo, se demostró que la inhibición de la neddilación con MLN4924 bloquea tanto la LTP como la LTD [82], lo que indica que la neddilación media fenómenos adaptativos río abajo de la activación neuronal disparada por neurotransmisores excitatorios. Esto pone de manifiesto que el rol de Nedd8 no está confinado al desarrollo, sino que también tiene relevancia sobre aspectos centrales de la fisiología de neuronas adultas.

En conjunto, estos estudios muestran la relevancia de la neddilación sobre varios aspectos del desarrollo y la función neuronal. En la mayoría de los casos, se comprobó que estas funciones no dependen de la neddilación de Culinas, dejando en evidencia una vez más la existencia de sustratos de Nedd8 que podrían explicar molecularmente estos efectos.

2.1 Neddilación atípica

La expresión exógena de Nedd8 con un *tag* en líneas celulares seguida de espectrometría de masas ha sido la principal estrategia utilizada para identificar la mayoría de los blancos de Nedd8 que no son Culinas [73, 83, 84]. Sin embargo, ha sido reportado que estas condiciones podrían provocar una forma atípica de neddilación, es decir, un artefacto técnico que plantea dudas sobre la existencia estos blancos en contextos fisiológicos [85]. En esta sección, nos enfocaremos en el fenómeno de la neddilación atípica, explorando los contextos en los que ha sido detectada y detallando sus características.

La vía de neddilación canónica implica la conjugación de Nedd8 a las lisinas de sus blancos a través de la cascada enzimática de E1 (NAE), E2 (Ubc12) y E3 específicas para Nedd8. Sin embargo, en ciertos contextos celulares Nedd8 es capaz de ser activada por la E1 de Ubiquitina (UBA1, también llamada UBE1 o UAE) y conjugarse a sustratos a través de la vía de ubiquitilación. A este tipo de neddilación se le llama neddilación atípica y se evidencia por una acumulación de conjugados de Nedd8 que no se ve afectada por el inhibidor MLN4924, ya que no depende de la enzima NAE [36] (Figura I6).

La mayor evidencia de la existencia de la neddilación atípica surge de modelos de líneas celulares humanas tratadas con inhibidores del proteasoma (como MG132, Bortezomib, MG262 y Lactasina), *shock* térmico y con peróxido de hidrógeno. En particular, la neddilación atípica ha sido reportada en las líneas celulares HeLa [73], MCF7 [36, 85], U2OS [85] y HTC116 [32].

El factor común de los tratamientos que inducen neddilación atípica es que disminuyen el *pool* de Ubiquitina libre ya que esta queda secuestrada conjugada a los sustratos [85, 86]. Hjerpe *et al.* postularon que un aumento en la relación Nedd8:Ubiquitina libre, ya sea por acumulación de Nedd8 libre o por disminución de Ubiquitina libre, fomenta la activación de Nedd8 por UBA1 [85]. Ellos

establecieron que Nedd8 y Ubiquitina libre se encuentran a una concentración intracelular similar en las líneas MCF7 y U2OS, con una relación Nedd8:Ubiquitina libre de 1:1 aproximadamente y demostraron a partir de ensayos de competencia *in vitro*, que Nedd8 es capaz de conjugarse a UBA1 en presencia de Ubiquitina cuando la concentración de Nedd8 es al menos 7 veces mayor que la de Ubiquitina [85]. Tanto la sobreexpresión de Nedd8 [85] como el silenciamiento de Ubiquitina [36] dan lugar a la neddilación atípica en líneas celulares, lo cual sustenta que la hipótesis de que el aumento en la relación Nedd8:Ubiquitina libre es suficiente para inducir la neddilación atípica.

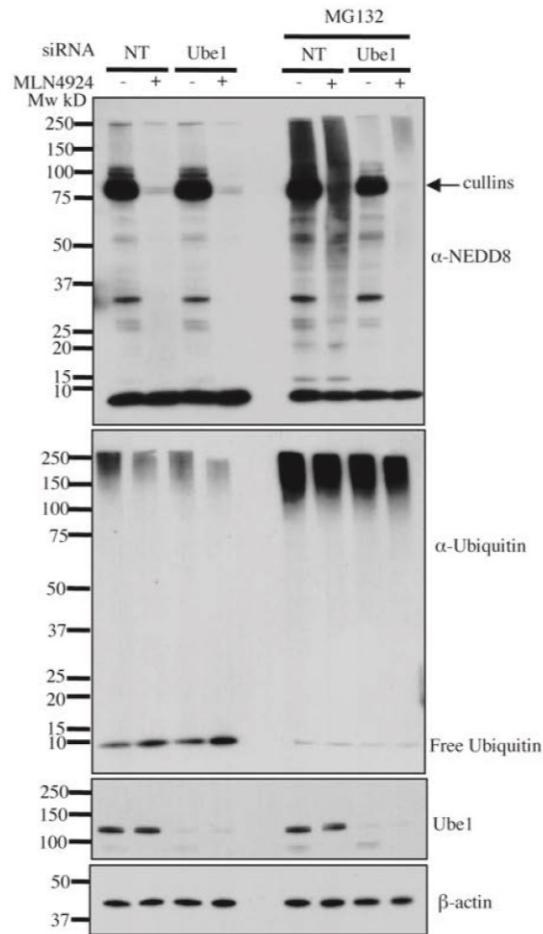


Figura I6. MG132 induce la neddilación atípica en la línea celular MCF7. En condiciones basales las deconjugasas de Nedd8 mantienen los niveles de sustratos neddilados bajos, observándose unas pocas bandas correspondientes a conjugados de Nedd8 por Western blot (WB). La inhibición del proteasoma con MG132 deriva en la acumulación de sustratos ubiquitilados, disminuyendo así el pool de Ubiquitina libre. Esto provoca una alteración en el ratio Nedd8:Ubiquitina libre y

conduce a la neddilación de sustratos vía la cascada de ubiquitilación que se acumula en las células (detectable mediante WB). Células MCF7 *knockdown* (KD) o no de Ube1 (E1 de Ubiquitina) fueron tratadas o no con MLN132 30 μ M durante 4 horas. Se realizaron WB a partir de lisados celulares. Se reveló contra Nedd8, Ubiquitina. Ube1 y b-actina como *house keeper*. Figura tomada de Xirodimas DP et al. EMBO reports 2008 [73].

La bibliografía sugiere que los sustratos de la vía de la neddilación atípica difieren de los de la vía de neddilación canónica. Entre los sustratos acumulados conjugados a Nedd8 en líneas celulares sujetas a estrés proteostático abundan las cadenas mixtas de Nedd8-Ubiquitina [32, 36, 87-89]. En un trabajo reciente se describieron 132 potenciales blancos de Nedd8 asociados al tratamiento por MG132 en células HTC116 [32].

Ha sido sugerido que la neddilación atípica es un mecanismo conservado desde levaduras hasta mamíferos [85], no obstante, este fenómeno fue reportado principalmente en líneas celulares humanas altamente transformadas: MCF7, HeLa, U2OS y HTC116 [32, 36, 73, 85, 90]. Por lo tanto, si la neddilación atípica es un fenómeno extendido a otras especies o si está presente en células no transformadas es una pregunta aún abierta (ver sección 4.2 y Objetivo I).

3 Deneddilación

Como toda modificación post-traducciona, la neddilación es reversible. En este caso, mediante proteasas específicas para Nedd8, denominadas deneddilasas. En particular, han sido descritas dos deneddilasas: el complejo signalosoma Cop9 (CSN), que remueve Nedd8 únicamente de Culinas, y NEDP1 (*NEDD8-specific protease 1*), que hidroliza Nedd8 de otros sustratos. CSN es una metaloproteasa de zinc compuesta por ocho subunidades (CSN1-8) de las cuales la CSN5 es la que posee actividad catalítica [91, 92]. Se demostró que el ciclo de conjugación y deconjugación de Nedd8 es crítico para mantener la actividad del CRL, ya que la delección de cualquier subunidad de CSN provoca una disminución de la función del CRL y afecta los procesos que regulan [59, 93, 94].

NEDP1 es la única enzima conocida capaz de deneddilar sustratos que no sean Culinas. En la siguiente sección describiremos la estructura, conservación evolutiva y roles celulares conocidos de esta proteasa.

3.1 Nedp1, la principal deconjugasa de Nedd8

NEDP1 (también conocida como SENP8 o DEN1) es una cisteína-proteasa que pertenece a la familia de proteasas de SUMO (*SUMO-specific protease*, SENP) [95, 96]. Su dominio catalítico, que se encuentra ubicado en el extremo C-terminal, está compuesto por la triada histidina (H), ácido aspártico (D) y cisteína (C), siendo la cisteína 163 el sitio catalítico (Figura I7) [97]. A pesar de su homología con la familia de proteasas de SUMO, NEDP1 tiene especificidad por Nedd8 por sobre SUMO y Ubiquitina [96, 98-101]. Inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, NEDP1 se describió como una proteasa que deconjugua Nedd8 de Culinas [97, 102] a pesar de ser tres órdenes de magnitud menos eficiente que CSN [103]. Estudios posteriores demostraron que, en condiciones fisiológicas, NEDP1 no remueve Nedd8 de Culinas en un modelo de moscas *in vivo* [104] y que su depleción provoca una acumulación de proteínas neddiladas detectable por Western blot (WB) [104-107] (Figura I7). Con el tiempo se fueron identificando sustratos de NEDP1 como p53, TAp73 y proteínas ribosomales [75, 76] y NEDP1 se estableció como la principal deneddilasa de blancos no Culinas [64, 108]. Como se mencionó en la sección 2, NEDP1 también cumple la función de hidrolizar del precursor de Nedd8 dejando dos glicinas en el extremo C-terminal, proceso indispensable para que la neddilación sea posible [50].

A pesar del alto grado de similitud entre NEDD8 y Ubiquitina, NEDP1 exhibe una preferencia 60000 veces mayor por Nedd8 que por Ubiquitina [108]. Estudios estructurales, mutacionales y bioquímicos identificaron una única diferencia entre el residuo 72 del extremo C-terminal de Nedd8 y Ubiquitina que contribuye significativamente al reconocimiento molecular de NEDP1 para diferenciarlas [99]. Esto sugiere que las consecuencias funcionales asociadas a la conjugación de Ubiquitina y Nedd8 son distintas y que se requieren mecanismos altamente específicos que permitan su discriminación.

Como se mencionó previamente, los modelos KD/KO de NEDP1 descritos se caracterizan por mostrar una acumulación de sustratos conjugados a Nedd8 evidenciada mediante WB (Figura I7) [104-107]. Esta acumulación de conjugados es prevenible por el tratamiento con el inhibidor de NAE, MLN4924, lo cual evidencia que Nedd8 se une a los sustratos mediante la vía canónica de la neddilación y no a través de UBA1, como en el caso de la neddilación atípica [88]. Esta acumulación de conjugados de Nedd8 sugiere que existen múltiples blancos de la vía de la neddilación. También se

puede inferir que la tasa de deconjugación de los sustratos de NEDP1 es alta ya que, en presencia de NEDP1 la mayoría de los sustratos neddilados no son detectables.

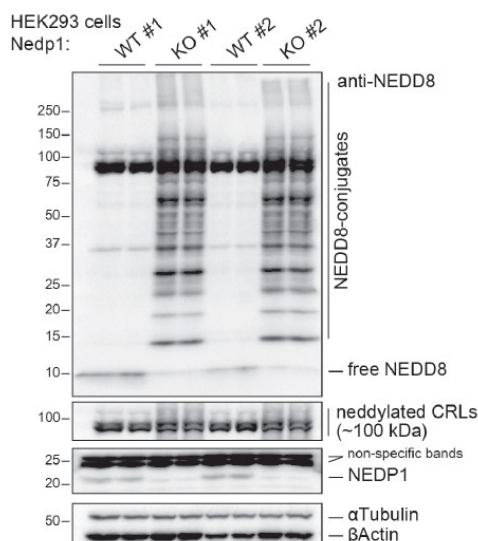


Figura 17. Acumulación de conjugados de Nedd8 en células KO de NEDP1. Western blot representativo de lisados totales de células HEK293 *wildtype* o KO para NEDP1. El blot anti-Nedd8 revela una acumulación de conjugados de Nedd8 en ambos clones NEDP1-KO y una disminución en los niveles de Nedd8 libre (~10 kDa). Figura tomada de Vogl AM, Phu L, Becerra R, *et al.* Nat Struct Mol Biol. 2020 [33].

NEDP1 es una enzima conservada en la evolución con ortólogos en especies que van desde levaduras hasta humanos, como por ejemplo en *S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *M. musculus* [56, 97, 104-107]. Los ortólogos más distantes evolutivamente, *S. pombe* y *H. sapiens*, presentan una homología de secuencia aminoacídica de alrededor del 40% y en todos los ortólogos los residuos de la triada catalítica H/D/C mencionada previamente se encuentran conservados (Figura 18) [56, 97, 104-107]. El hecho de que NEDP1 esté conservada evolutivamente sugiere que esta enzima es fisiológicamente relevante y por asociación, también lo es la regulación de la neddilación de sus blancos moleculares.

Hs_NEDP1	-----MDPVVLSYMDSLLRQSDVSLL-DPPSWLNDHIIGFAFEYFANSQFHDCSDHVSF	53
Mm_NEDP1	-----MDPVVLSYMDSLLRQSDVSLL-DPPSWLNDHIIGFAFEYFANSQFHDCSDHVSF	53
Dm_DEN1	MGSNSKADPISLTFHDSCLRMSDVQLL-HGPHWLNDQILSFYYEYLAHMKYKTN-ADLHF	58
Ce_ULP-3	---MSVPPDFRLSYESVVLTAADVITILEHTGCWFNDKLLTFCAEFLEQHN--SAAAEIQI	55
	. *: . * .** :* . * :***: * * : : : . : :	
Hs_NEDP1	ISPEVTQFIKCTSNPAEIAMFLEPLDLPNKRNVFLAINDNSN--QAAGGTHWSLLVYLQD	111
Mm_NEDP1	ISPEVTQFIKCTSSPAEIAMFLEPLDLPNKRNVFLAINDNSN--QAAGGTHWSLLVYLQD	111
Dm_DEN1	IAPETITQCMKMGD-QELKQLDQSNTTGKPFIFALNDNET--TDAGGSHWSLLVFSRP	115
Ce_ULP-3	FTPPQTEMIRHSTCDEEVDVYFGCLDVNSKDLIAFIVNDNQDVRVNGGSHWSLLIFDRK	115
	::* * : : : * : : : * : : :***. ** :*****: : :	
Hs_NEDP1	KNSFFHYD [↓] SHSRSNSVHAKQVAEKLEAFLGRKGDKLAFVEEKAPAQQNSYDCGMYVICNT	171
Mm_NEDP1	KNSFFHYD [↓] SHSRSNSIHAQVAEKLEAFLGSKGDKLVFVEEKAPAQENSYDCGMYVICNT	171
Dm_DEN1	EKTFYHFD [↓] SYGNNNTGNSLELMNKIKDLLGVMAK--FRPMRCLQQANGYDCGIHVICMT	173
Ce_ULP-3	IDKFRHFD [↓] SARGHNLKIAENLMQKSRKLVQRQSQRNLEPELCLQQKNASDCGLHVAQYL	175
	..* * :*** * : : : : * : : : : : . * * .***:*	
Hs_NEDP1	EALCQNFRQQTESLLQLLTPAYITKKRGEWKDLITTLAKK-----	212
Mm_NEDP1	EALCQSLFRRQPESPLQLLTPTYITKKRGEWKDLIARLAKKNEVATEECS	221
Dm_DEN1	DHIADYLNRYEVIDGLPSLHIDTVKAKRTELLKLILSLGGKG-----	215
Ce_ULP-3	AVLAEQK-----SADAIGKLEKIDKTRGFWRDLIVNFEAK-----	210
	::: . : : * .** : *	

Figura 18. La triada de aminoácidos correspondientes al sitio catalítico de NEDP1 se encuentra conservada entre sus ortólogos. Alineación por ClustalWS [109] de las secuencias de aminoácidos de NEDP1 humano (Hs_NEDP1) y sus ortólogos *Nedp1* murino (Mm_NEDP1), *Den1* de *Drosophila melanogaster* (Dm_DEN1) y *ulp-3* del gusano *Caenorhabditis elegans* (Ce_ULP-3). La triada catalítica de histidina (H), ácido aspártico (D) y cisteína (C) se señala con puntas de flecha rojas. '*' Residuo totalmente conservado, ':' Residuos que conservan propiedades altamente similares, '.' Residuos con similitud débil.

La relevancia molecular de NEDP1 ha sido estudiada fundamentalmente en líneas celulares humanas. A pesar de que se ha establecido una conexión entre NEDP1 y la respuesta a diversos tipos de estrés celular, no hay un consenso sobre su función. A continuación, se exponen los roles celulares adjudicados a la deneadilasa NEDP1 y sus discordancias asociadas.

Se reportó que NEDP1 es necesaria para limitar la propagación del virus de hepatitis B en células Huh7 y HepG2, líneas derivadas de carcinomas hepáticos humanos [110]. Existen discrepancias en los informes sobre la función de NEDP1 en respuesta al estrés oxidativo en células HEK293. Guan *et al.* sugieren que NEDP1 proporciona resistencia a las células ante el estrés oxidativo [111], mientras que Keuss *et al.* argumentan que NEDP1 aumenta la sensibilidad ante el mismo [105]. NEDP1 ha sido asociada a una mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por roturas doble cadena del ADN (DSBs)

bajo distintos tratamientos por radiación y Etopósido, un fármaco inductor de apoptosis mediante DSBs [56]. Sin embargo, según Keuss *et al.*, NEDP1 confiere resistencia a las células frente al tratamiento con Camptotecina, un fármaco que estabiliza los enlaces de la Topoisomerasa I al ADN causando DSBs [105]. Estas discrepancias sugieren que se necesita acumular más evidencia para adjudicar con un mayor nivel de certeza un rol específico de Nedp1 frente al estrés celular. Nuevamente, estos estudios se han llevado a cabo casi exclusivamente en líneas celulares transformadas y, por lo tanto, el rol de Nedp1 en células normales permanece también desconocido (ver Objetivo V).

4 La controversia sobre la neddilación de blancos no Culinas

A pesar de las decenas de blancos moleculares descritos, el consenso en el campo de las UBLs hasta hace relativamente poco era que el rol de Nedd8 estaba confinado a activar Culinas. Esta visión preponderante puede verse reflejada en dos trabajos de revisión escritos por tres prestigiosos investigadores del campo (M. Peter, ETH Basel; B. Schulman, Max Planck Inst. of Biochemistry, Martinsried y S. Jackson, Cambridge University, Cambridge) bajo el argumento fundamental de que la neddilación de sustratos distintos de Culinas era poco verosímil o, con alta probabilidad, un artefacto producto de errores técnicos [108, 112]. Los argumentos centrales esgrimidos como justificación fueron los siguientes:

- a. La carencia de un método analítico que permita detectar proteínas neddiladas de manera específica
- b. Los blancos de Nedd8 identificados hasta la fecha podrían haber sido producto de neddilación atípica y no canónica
- c. La falta de relevancia biológica de NEDP1, la principal deneddilasa de sustratos no Culinas

En las siguientes subsecciones se abordarán los detalles específicos de estos argumentos.

4.1 Carencia de un método analítico que permita detectar proteínas neddiladas de manera específica

La función de Nedd8 como una verdadera modificación post-traducciona ha sido muy cuestionada debido a la carencia de un método analítico que permita detectar proteínas neddiladas de manera específica [108, 112].

La conjugación covalente de Ubiquitina y UBLs a lisinas es usualmente identificada mediante espectrometría de masa por medio de la detección del desplazamiento de masa (*mass shift*) de los péptidos modificados que llevan un motivo di-Glicina (diGly) adicional tras la digestión con tripsina [113]. El peso molecular y el tiempo de retención en el espectrómetro de masas de los péptidos que se obtienen a partir de la digestión con tripsina del proteoma de líneas celulares es conocido [114, 115]. El remanente conjugado de diGly en los péptidos incrementa la masa predicha resultando en un aumento en el tiempo de retención en el espectrómetro de masas, provocando un desplazamiento característico respecto del péptido sin diGly [113]. Sin embargo, esta metodología no permite la discriminación entre péptidos modificados por Ubiquitina, ISG-15 o Nedd8 debido a la completa homología de sus extremos C-terminales ya que todas estas MPTs dejan el mismo remanente diGly luego de la tripsinización [116] (Figura I9). Esto sugiere que una proporción de los cientos de blancos de Ubiquitina descriptos mediante esta metodología podrían ser en realidad, o también, blancos de Nedd8.

Para resolver este problema nuestro laboratorio desarrolló sNUSP (*serial NEDD8-ubiquitin substrate profiling*) una estrategia basada en el reemplazo de la Arginina 74 de Nedd8 por una lisina (R74K), modificación que no altera la conjugación de Nedd8 y que permite detectar (tras la digestión con Lys-C) restos de diGly exclusivamente en los péptidos neddilados [33] (Figura I9). Con esta técnica se logró identificar 607 sitios de neddilación dinámicamente regulados correspondientes a 321 posibles proteínas blanco en un modelo celular ampliamente utilizado y aceptado en el campo de las UBLs, las células HEK293 [33]. Al identificar cientos de sitios de neddilación de blancos a través de un método fiable queda establecido que la neddilación de no Culinas existe. Resta validar los potenciales blancos identificados y estudiar la relevancia fisiológica de la neddilación de estos nuevos sustratos no Culinas.

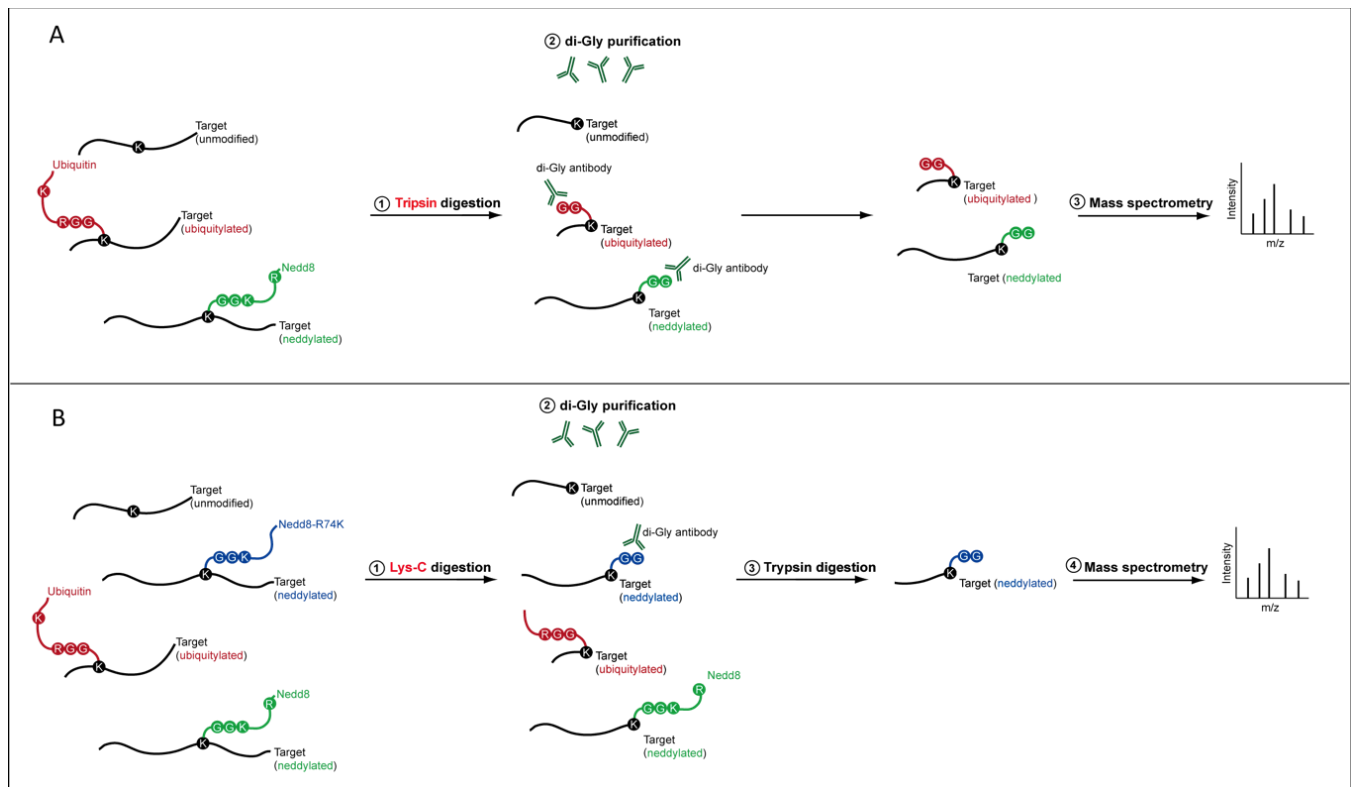


Figura I9. Nueva estrategia que permite la discriminación de blancos de Nedd8 por espectrometría de masa. A. Procedimiento estándar de detección de ubiquitilación: 1) Los extractos se digieren con tripsina, 2) Los péptidos modificados son purificados con anticuerpos anti-diGly y 3) son detectados por EM pero los péptidos unidos a Nedd8 o UB no pueden ser discriminados. **B.** Método sNUSP: 1) La digestión con Lys-C genera dipéptidos diGly remanentes sólo en proteínas modificadas por Nedd8-R74K. 2) Purificación de péptidos originalmente neddilados con anticuerpos anti-diGly. 3) Una nueva ronda de tratamiento con tripsina reduce el tamaño de los péptidos para mejorar la detección por 4) MS. Figura adaptada de Vogl AM, Phu L, Becerra R, *et al.* Nat Struct Mol Biol. 2020 [33].

4.2 El fenómeno de neddilación atípica pone en duda los blancos de Nedd8 previamente descriptos

Como se describió en la sección 2.1, una desregulación en las proporciones Nedd8:Ubiquitina, como la sobre expresión de Nedd8, puede dar lugar al fenómeno de neddilación atípica [36, 85] lo cual arrojó dudas a la veracidad de los blancos de Nedd8 distintos de Culinas previamente descriptos.

Dado que el método estándar de detección de blancos de MPTs (descrito en la sección anterior) no permite discriminar entre Ubiquitina, ISG-15 y Nedd8, el método originalmente utilizado para identificar sustratos conjugados a Nedd8 fue el de la expresión exógena de la Nedd8 con un *tag* en líneas celulares, seguida de inmunoprecipitación y posterior detección mediante espectrometría de masas [73, 83, 84]. Puesto que la neddilación atípica ha sido reportada en líneas celulares que sobre expresan NEDD8 [85], se ha cuestionado la validez de los blancos de Nedd8 encontrados utilizando este método, sugiriendo que Nedd8 no es una MPT legítima [85, 108, 112]. La neddilación atípica inducida por la sobreexpresión de Nedd8 ha sido reportada únicamente por Hjerpe *et al.* [85]. Otros trabajos donde se expresa Nedd8 exógeno en líneas celulares no reportan neddilación atípica en condiciones basales [32, 88]. Además, a lo largo de ya más de 15 años trabajando en Neddilación, nuestro laboratorio ha sobre expresado Nedd8 *wildtype* y con numerosos *tags* (Biotin, HA, His, Myc) en una multitud de líneas celulares (HEKs, HeLa, COS, HT22, S5SHY, PC12) así como en cultivos primarios de neuronas y fibroblastos) y nunca hemos observado neddilación atípica inducida por dicha sobre expresión.

A pesar de que la neddilación atípica fue descrita principalmente en líneas celulares humanas, en el campo de las UBLs quedó establecida como un fenómeno altamente conservado desde levaduras hasta mamíferos [85, 89, 117]. Sin embargo, hay escasa evidencia que respalde esta hipótesis, por lo que se requieren estudios que examinen la prevalencia del fenómeno de la neddilación atípica en diversos modelos celulares (ver objetivo I).

4.3 Nedp1: ¿una proteasa irrelevante *in vivo*?

En general, todas las modificaciones post-traduccionales (MPTs) son dinámicas y reversibles. Su tasa de recambio (o *turnover*) está determinada por el cociente entre la velocidad y eficiencia con la que una enzima agrega una MPT (*tag writer*) a un blanco y la velocidad y eficacia con la que otra enzima remueve esa misma MPT (*tag eraser*). Estos pares de *writers/erasers* (quinasas/fosfatasas, Ubiquitin ligasas/deubiquitilasas, acetilasas/deacetilasas) definen un equilibrio dinámico entre los diferentes estados de unión de MPT, susceptible a cambios inducidos por señales internas o externas, determinando así las propiedades funcionales y estructurales de una proteína [118].

Es interesante remarcar que estos equilibrios no son alcanzados mediante una distribución simétrica de “*writers* y *erasers*”. En general, los *writers* son más numerosos, con una regulación más específica y más activos enzimáticamente. Mientras que los *erasers* suelen ser más escasos (un mismo *eraser* actúa sobre varios blancos), menos regulables y con menor, aunque más estable, actividad basal. Esto tiene dos consecuencias, una mayor relación señal/ruido y una mayor velocidad en la respuesta, dos características esenciales de las vías de transducción de señales [119, 120]. Esta mayor sensibilidad, actividad y complejidad de los *writers* respecto de los *erasers* ha llevado a que se estudien más los primeros que los segundos. El caso de la neddilación no es la excepción puesto que el conocimiento actual sobre los roles de la neddilación es relativamente abundante y detallado mientras que la función fisiológica de la deneddilación, particularmente la mediada por Nedp1, permanece casi totalmente inexplorada.

Nedp1 es la principal deneddilasa de sustratos no Culinas y se encuentra conservada evolutivamente [104-107]. A pesar de que se identificaron decenas de sustratos de NEDP1 y de que en todos los modelos KO/KD de esta proteasa se registra una acumulación de conjugados de Nedd8, su relevancia fisiológica es muy cuestionada [108, 112].

Estudios de silenciamiento o depleción de NEDP1 en *S. pombe* [107], *A. thaliana* [106], *C. elegans* [56] y *D. melanogaster* [104] no han evidenciado un rol fisiológico muy significativo de esta deneddilasa. Todos estos modelos son viables, fértiles y no presentan defectos evidentes. Estos reportes sugieren que la neddilación de sustratos no Culinas pareciera no ser relevante en levaduras, plantas e invertebrados en condiciones basales. Es importante destacar que entre los modelos fisiológicos estudiados no se encuentran los mamíferos (ver objetivos III y IV).

Como se expuso en la sección 3.1, NEDP1 pareciera tener una función relacionada a la respuesta al estrés celular [56, 105, 111]. Baily *et al.* reportaron que las células gonadales de gusanos *C. elegans* KO de *ulp-3* (ortólogo de NEDP1) son más resistentes a la apoptosis inducida por daño al ADN por radiación. Este estudio sugiere que bajo condiciones de estrés se podrían revelar funciones fisiológicas relevantes de NEDP1 en los modelos biológicos antes mencionados (ver objetivo II).

Nuestro laboratorio demostró fehacientemente que existen blancos de Nedd8 utilizando un método molecular novedoso y confiable, refutando así el primero de los argumentos mencionados arriba. El trabajo de esta tesis se enfocará en abordar los últimos dos argumentos en contra de Nedd8 como una verdadera modificación post-traducciona.

Objetivos

- I. El fenómeno de neddilación atípica ha sido propuesto como un fenómeno conservado a pesar de que se ha reportado principalmente en líneas celulares humanas. Con el fin de contrastar esta teoría, **exploraremos el fenómeno de neddilación atípica en diversos tipos celulares de mamíferos.**

- II. La pérdida de NEDP1 en plantas, gusanos y moscas no provoca alteraciones evidentes bajo condiciones basales. Sin embargo, estudios a nivel celular sugieren que NEDP1 ejerce una función frente a diversos estreses. **Estudiaremos la relevancia fisiológica de ortólogos de NEDP1 en dos modelos animales invertebrados en condiciones basales y bajo estrés.**

- III. Se han descrito modelos KO/KD de ortólogos de NEDP1 en levaduras, gusanos, plantas y moscas, aunque aún se desconoce la importancia de esta enzima en mamíferos. **Estudiaremos la relevancia fisiológica de NEDP1 *in vivo* utilizando modelos murinos transgénicos.**

- IV. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio han demostrado un rol crucial de la conjugación de Nedd8 en blancos independiente de Culinas en el desarrollo y la función neuronal. De manera complementaria con estos estudios previos ahora **exploraremos la función de Nedp1 en el sistema nervioso murino.**

- V. NEDP1 ha sido vinculado con la respuesta a diversos tipos de estrés celular. Estos estudios se realizaron fundamentalmente en líneas celulares humanas. Aun no se ha estudiado si NEDP1 se encuentra involucrado en la respuesta al estrés en un contexto fisiológico, por lo que **estableceremos el rol de NEDP1 en la sobrevivencia de fibroblastos murinos primarios frente a distintos estresores proapoptóticos.**

Materiales y Métodos

1 Reactivos

REACTIVO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Anticuerpos		
Rabbit mAb anti-NEDD8 (Y297)	Abcam	ab81264; RRID:AB_1640720
Rabbit anti-Ub (FL-76), polyclonal	Santa Cruz	sc-9133; RRID:AB_2180553
Sheep anti-SENP8/NEDP1, polyclonal	Ron Hay lab	N/A
Chicken anti-GFP, polyclonal	Abcam	ab13970; RRID:AB_300798
Mouse mAb anti-Cullin1 (2H4C9)	Invitrogen	32-2400; RRID:AB_2533070
Rabbit anti- β -Actin (13E5) HRP conjugate	Cell Signaling Technology	#5125; RRID:AB_1903890
Rabbit mAb anti- α -Tubulin (11H10) HRP conjugate	Cell Signaling Technology	#9099; RRID:AB_10695471
Rabbit anti-GAPDH (14C10) HRP conjugate	Cell Signaling Technology	#3683; RRID:AB_1642205
Goat anti-Rabbit IgG HRP conjugate	Cell Signaling Technology	#7074; RRID:AB_2099233
Goat anti-Mouse IgG HRP conjugate	Cell Signaling Technology	#7076; RRID:AB_330924
Donkey anti-Sheep IgG (H+L) HRP conjugate	Abcam	Ab6900; RRID:AB_955452
Goat anti-Chicken IgY (H+L) Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11039; RRID:AB_2534096
Sustancias químicas y Peptidos		
MLN4924	Active Biochem	A-1139
MG132	Calbiochem	474790
Doxorubicin hydrochloride	Sigma Aldrich	D1515
Etoposide	Sigma Aldrich	E1383
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma Aldrich	04259
Dimethyl sulfoxido (DMSO), Hybri-Max™, steril-filtrado	Sigma Aldrich	D2650-5X5ML
4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma Aldrich	10236276001
Paraformaldehído	Sigma Aldrich	P6148
VectaShield	Vector Laboratories	H-1500
Alamar Blue	Invitrogen	DAL1025
Albumina de Suero Bovino	Sigma Aldrich	A7906
Biotina	Sigma Aldrich	B4639
Bromhidrato de poli-D-lisina	Sigma Aldrich	P7886
Laminina	Gibco	23017015
Medio Neurobasal-A	Gibco	10888022
Suplemento B27	Gibco	17504044
HEPES	Sigma Aldrich	H4030
Metanol	Sigma Aldrich	34860

2 *Caenorhabditis elegans*

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo ampliamente utilizado como modelo de estudio debido a que presenta múltiples ventajas para el trabajo en laboratorio. El gusano *C. elegans* posee un ciclo de vida corto que consiste en las siguientes etapas: a partir del huevo eclosiona una larva L1 que, en condiciones ambientales favorables, se desarrolla a través de tres sucesivos estadios larvales (L2, L3 y L4) para finalmente convertirse en un adulto capaz de generar progenie. Este ciclo de vida es conocido como desarrollo reproductivo y, a 20°C, se completa en 3.5 días. Frente a condiciones ambientales adversas tales como hambreado, altas temperaturas o alta densidad poblacional, *C. elegans* puede optar por una vía alternativa de desarrollo conocida como diapausa, en la cual se genera un arresto en el desarrollo reproductivo [121]. Los tipos más estudiados de diapausas son los correspondientes al arresto en L1 por ausencia de alimento o el desarrollo de una larva de resistencia llamada larva dauer, que es alternativa a la larva L3 [122-124]. Los gusanos pueden ser hermafroditas o machos (alrededor del 0.1%). Un solo hermafrodita genera típicamente una progenie de entre 250 y 300 gusanos y la vida media del gusano con ciclo reproductivo suele ser de 3 semanas aproximadamente [121].

2.1 Mantenimiento de líneas de gusanos

Las cepas fueron crecidas y mantenidas a 15°C en medio de crecimiento de nematodos (NGM: *nematode growth medium*) suplementadas con 100 ug/ml estreptomicina y 100 U/ml de nistatina. Se utilizaron cultivos de la cepa OP50-1 de *E. coli* como fuente de alimento. Los ensayos llevados a cabo con el modelo animal *C. elegans* fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Daniel Hochbaum.

2.2 Líneas de gusanos utilizadas

Las cepas de *C. elegans* utilizadas en esta tesis fueron N2 y ulp-3(tm1827). N2 es una cepa *wildtype* comúnmente utilizada como control. ulp-3 es el ortólogo de Nedp1, la línea ulp-3(tm1827), también denominada ulp-3 KO en este trabajo, presenta una delección de 360 pb que resulta en una versión no

funcional de *ulp-3* (ver Resultados, Capítulo II), esta cepa fue obtenida del repositorio NRBP (*National Bioresource Project for the Experimental Animal "Nematode C. elegans"*). Previo a los ensayos, *ulp-3* se retrocruzó 5 veces con la cepa *wildtype* N2 para homogeneizar el background genético.

2.3 Genotipado de *C. elegans*

El genotipado consiste en la lisis de un solo gusano, extracción de su ADN y una PCR para amplificar el fragmento de ADN de interés. La lisis fue llevada a cabo en un tubo de PCR con 10µl de Worm Lysis Buffer (Tris pH 8,8 30mM, EDTA 100mM, NaCl 0.7%, NP-40 0.7%) y Proteinasa K (20mg/ml). Los tubos se congelaron a -80°C por 15min y luego se incubaron a 60°C por 1h. El shock térmico y la Proteinasa K contribuyen a la disociación de la cutícula y a la liberación del ADN. Finalmente se incubó el tubo a 95°C para inactivar la Proteinasa K. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento en que se utilizaron como molde para la realización de una PCR con el fin de conocer el genotipo de cada gusano. Para esto, 2 µl de la preparación de ADN genómico se usó en una reacción de PCR de 25 µl, que contenía 2.5 µl de buffer PCR 10x (PB-L), 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM (PB-L), 0,5 µl de dNTPs (10 mM cada uno, Termofisher), 0.5 µl de cada *primer* 10mM (ver Tabla M1) y 0.5 ul de Taq ADN polimerasa (5 unidades (U) /ul, PB-L). Los programas de PCR utilizados fueron ajustados según los *primers* y el amplicón: 95°C 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55-62°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto/kb de producto, seguido de 72°C durante 10 minutos y luego se mantuvo a 8°C. Los productos de PCR se mezclaron posteriormente con Buffer de carga Orange G 6X y fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa 2%. Los geles fueron preparados con buffer TAE y se les agregó Gel Red (Biotium) (1 ul/50 ml solución) para posterior visualización de las bandas bajo luz UV. El buffer de corrida utilizado fue el mismo buffer TAE. Para la visualización de las bandas se utilizó el Gel Doc GBox XT4 (SYNGENE).

Primer	Secuencia 5'-3'
ulp-3_F	ACCGAAATGATACGGCATTC
ulp-3-WT_R	TTGCAGCATTCAAAAATTCG
ulp-3-KO_R	CCGCTGTTTTATCGATTTTC

Tabla M1. *Primers* utilizados para el genotipado de *ulp-3* de *C. elegans*.

2.4 Ensayo de sobrevida de gusanos

Para todos los experimentos de longevidad los animales se desarrollaron a 15°C y al llegar a adultos jóvenes, se mantuvieron una temperatura de 20°C durante el resto del experimento. Se utilizaron placas de NGM con *E. coli* OP50-1 excepto en los ensayos de estrés osmótico donde además se suplementaron las placas con NaCl 400 mM. Entre 100 y 200 adultos jóvenes de cada cepa fueron distribuidos en 4 placas y se observaron a intervalos de 48hs para documentar animales vivos, muertos o censados (animales que explotaron o se desecan en los bordes de las placas). Los animales se consideraron muertos al no responder a un suave toque en la zona de la cabeza con un alambre de platino. Para evitar que la progenie interfiera con el ensayo se transfirió la totalidad de los adultos a nuevas placas cada 48hs hasta que cesó la producción de huevos. Se registró el número de gusanos vivos/muertos/censados hasta que el total de la población murió.

3 *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un modelo ampliamente utilizado para el trabajo en el laboratorio. La mosca de la fruta posee un ciclo de vida relativamente corto, compuesto por cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Una vez fertilizado, el embrión se desarrolla en el huevo por aproximadamente un día (a 25°C) antes de convertirse en larva. La larva se alimenta y crece (atravesando tres estadios) durante 5 días hasta que se convierte en pupa y comienza el proceso de metamorfosis para convertirse en una mosca adulta 4 días más tarde. En total, a 25°C, el ciclo de vida dura aproximadamente 10 días y la expectativa de vida de la mosca adulta ronda los 60 días [125-127].

3.1 Mantenimiento de líneas de moscas de la fruta

Se utilizaron líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster* importadas del repositorio Bloomington. Las líneas se mantuvieron en viales de plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de alto conteniendo comida a base de harina de maíz, levadura, ácido propiónico, sacarosa, agar y Nipagin como antifúngico.

En todos los casos los animales fueron criados y mantenidos bajo un ciclo de luz/oscuridad controlado (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Para el mantenimiento de los stocks del laboratorio las líneas se conservaron en un cuarto a 21°C, repicándose cada tres semanas. Los experimentos fueron llevados en incubadoras a 25°C con el ciclo de luz/oscuridad previamente indicado.

Los cruzamientos se realizaron en viales de plástico con el medio antes descrito con la adición de una pequeña cantidad de pasta de levadura fresca (levadura granulada hidratada con agua), a fin de estimular la ovipuesta. Para ello se seleccionaron hembras vírgenes colectadas post-eclosión. Los cruzamientos se realizaron en una relación de 5 hembras: 3 machos, previamente anestesiados con CO₂. Los cruzamientos se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12hs a 25°C.

Los ensayos llevados a cabo con el modelo animal *D. melanogaster* fueron realizados en colaboración con la Dra. Nara Muraro.

4 Líneas transgénicas de *D. melanogaster* utilizadas

Las líneas utilizadas en esta tesis fueron *white1118* y *Den1* KO (RRID:BDSC_15348) [128]. Ambas líneas fueron obtenidas del repositorio de *Drosophila melanogaster* Bloomington. Como línea control se utilizó *white1118* (*w*). Esta es una cepa mutante carente del gen *white1118*, el que les da pigmentación roja a los ojos de la mosca, y por ende tiene ojos blancos. Como se expone en el Capítulo II de Resultados, *w* es utilizada comúnmente para la generación de líneas transgénicas.

La línea *Den1* KO posee inserto un transposón que contiene el una versión del gen *w* denominada *mini-white* que interrumpe el gen *Den1* resultando en una versión truncada de esta enzima, y restituye el color rojo de la mosca. Esta línea de mosca fue generada en el contexto de Berkeley Drosophila Genome Project [128].

5 Ensayo de desarrollo en moscas

Para realizar los ensayos de desarrollo en la mosca de la fruta se utilizaron hembras de 5 a 7 días de edad. Los cruzamientos se realizaron en una relación de 5 hembras: 3 machos, previamente

anestesiados con CO₂. Los cruzamientos se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12hs a 25°C durante 4 días y luego se descartaron los parentales. 10 días más tarde, se descartó la descendencia F1 del vial y se contó el número de pupas vacías pegadas a la pared del vial que equivale al número de moscas eclosionadas por vial. Se realizaron 5 cruzamientos por grupo experimental por experimento. Se realizaron 3 experimentos independientes.

6 Ensayos de sobrevida en moscas

Se colectaron moscas adultas 3 días post-eclosión. Se colocaron 20 machos por vial en 5 viales por cada grupo experimental y se mantuvieron a mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12hs a 25°C. Se registró el número de moscas muertas dos veces por semana y las moscas vivas se pasaron a viales con comida fresca una vez por semana hasta que todas las moscas hubieran muerto. En el caso de ensayos de estrés el número de moscas muertas se registró dos veces por día. En los ensayos de sobrevida en condiciones normales, los viales contenían la comida descrita en la sección 3.1. En los ensayos de estrés el contenido de los viales se describe a continuación.

Estrés osmótico: Al alimento normalmente utilizado se le adicionó cloruro de sodio 4% m/v.

Estrés oxidativo: Para estos ensayos el sustrato disponible en el vial consistió en peróxido de hidrógeno (Biopack) 5% m/v, sacarosa (Biopack) 5% m/v y agar 2% m/v en agua.

Hambreando: En los ensayos de hambreando se colocó un algodón humedecido con agua en el fondo del vial cubierto con papel secante, permitiendo que las moscas se hidraten sin tener fuente de alimento.

7 Ratones

7.1 Mantenimiento de ratones

Para todos los experimentos, los ratones se alojaron en condiciones estándar de laboratorio (22 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$ de humedad) con comida y agua ad libitum. A la edad de 3 a 4 semanas, los ratones de la misma camada se separaron de los padres, se numeraron mediante perforaciones en las orejas obteniéndose una biopsia que se utilizará luego para su genotipado (ver más abajo). Para determinar la

edad de los embriones, el mediodía del día de la aparición de un tapón vaginal fue tomado como día embrionario 0.5 (E0.5), y el día de nacimiento se consideró día postnatal 0 (P0).

El mantenimiento de los animales, los cruzamientos y el sacrificio de las crías fueron realizados bajo las normas internacionales y los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo N° 000/2017).

7.2 Cepas y líneas transgénicas de ratones usadas en esta tesis

Se utilizaron indistintamente hembras de cepas exocriadas de ratones CD1 o CF1 con embarazos programados para la preparación de cultivos primarios de neuronas y fibroblastos a partir de sus embriones.

En este trabajo se generó la línea KO reportera de *Nedp1* (Figura R10) detallada en el capítulo III de resultados. A partir de esta línea se derivó la línea KO condicional de *Nedp1* (*Nedp1* CKO) (Figura R17) descrita en el capítulo IV de Resultados. Para la generación de la línea *Nedp1* CKO fueron utilizadas las líneas *FLPo* [129] (RRID:IMSR_JAX:012930) y *Nestin-Cre* [130] (RRID:IMSR_JAX:003771).

FLPo (B6 ROSA26Flpo) es una línea que expresa *FLPo*, una variante de la recombinasa *Flpasa* (*FLP*), bajo el promotor del gen *ROSA* [129] (situado en el cromosoma 6). *FLPo* se expresa en células germinales lo cual permite que los eventos de recombinación sobre regiones flanqueadas por secuencias consenso FRT se trasmitan a la descendencia.

Nestin-Cre [130] es una línea de ratón que expresa la recombinasa *Cre* bajo el promotor de rata *Nestin*. El transgén se encuentra en el cromosoma 12. *Nestin* es un filamento intermedio que se expresa transientemente en el tubo neural de embriones a partir de E11 [131]. La combinación de esta línea con secuencias flanqueadas por sitios consenso flx, deriva en la recombinación de estas secuencias en células derivadas del tubo neural, principalmente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Thy1EGFP [132] (RRID:IMSR_JAX:007788) es una línea que expresa la proteína fluorescente *enhanced GFP* bajo una versión modificada del promotor *Thy1*. Esta versión modificada contiene las secuencias

necesarias para la expresión en neuronas y carece de las secuencias necesarias para la expresión en células no neuronales. Esto deriva en la expresión dispersa de EGFP en neuronas lo cual permite obtener neuronas fluorescentes aisladas *in vivo*. El transgén se encuentra en el locus ROSA (cromosoma 6).

7.3 Genotipado de los ratones

El ADN genómico se obtuvo a partir de una biopsia de la oreja del ratón, tomada a la edad de 3 a 4 semanas, por lisis alcalina del tejido. Se añadieron 100 µl de NaOH 50 mM a las muestras de aproximadamente 1-2 mm de longitud y se calentaron a 95 °C durante 30 minutos hasta que el tejido se lisó. Después de la lisis, las muestras se incubaron en hielo y se neutralizaron mediante el agregado de 30 µl de Tris-HCl 1 M (pH 7.5, conteniendo EDTA 4 mM), se agitaron en vortex a baja intensidad y se centrifugaron a 4 °C a velocidad máxima durante 1 minuto. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento en que se utilizaron como molde para la realización de una PCR con el fin de conocer el genotipo de cada animal. Para esto, 2 µl de la preparación de ADN genómico se usó en una reacción de PCR de 25 µl, que contenía 2.5 µl de buffer PCR 10x (PB-L), 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM (PB-L), 0,5 µl de dNTPs (10 mM cada uno, Termofisher), 0.5 µl de *forward primer* 10mM, 0.5 µl de *reverse primer* 10mM (en la Tabla M2 figuran las secuencias de los *primers* utilizados) y 0.5 ul de Taq ADN polimerasa (5 unidades (U) /ul, PB-L). Los programas de PCR utilizados fueron ajustados según los *primers* y el amplicón: 95°C 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55-62°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto/kb de producto, seguido de 72°C durante 10 minutos y luego se mantuvo a 8°C. Los productos de PCR se mezclaron posteriormente con Buffer de carga Orange G 6X y fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa 2%. Los geles fueron preparados con buffer TAE y se les agregó Gel Red (Biotium) (1 ul/50 ml solución) para posterior visualización de las bandas bajo luz UV. El buffer de corrida utilizado fue el mismo buffer TAE. Para la visualización de las bandas se utilizó el Gel Doc GBox XT4 (SYNGENE).

Primer	Secuencia 5'-3'
lacZ_Fw	GGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAG
lacZ_Rv	CGCCATTTGACCACTACCATCAATCCGGTAG
388_Fw	AGACTATGTGGCGAGTGAATTTAAGG
385_Rv	TCCCCAAGTCAGGACTGACCCAGAGC
97_Rv	ACCAGCTGGGGCTCGATCCTCTAG
Cre_Fw	GATCGCTGCCAGGATATACG
Cre_Rv	AATCGCCATCTTCCAGCAG
Thy1_Fw	TCTGAGTGGCAAAGGACCTTAGG
EGFP_Rv	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC

Tabla M2. Secuencia de *primers* utilizados para el genotipado de ratones transgénicos utilizados.

8 Cultivos primarios

Los reactivos utilizados en la realización y manutención de los cultivos celulares fueron adquiridos de Gibco y las placas donde estos se realizaron fueron adquiridas de Greiner Bio-One, salvo el suero que fue adquirido en Natocor.

8.1 Preparación de cultivo primario de neuronas

El hipocampo o el cerebro anterior de ratones CD1 de día embrionario E16.5 fueron separados y digeridos con tripsina 0.25% conteniendo 1mM EDTA por 20 minutos a 37°C. Se lavaron los trozos de tejido con DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y se prosiguió con su disgregación mediante el uso de una pipeta Pasteur para obtener células disociadas. Se centrifugó a 1000 g por 5 minutos y el precipitado fue resuspendido en Neurobasal-A suplementado con 2 % de B27 y 0.5 mM GlutaMAX-I (Gibco). Se determinó el número de células y la viabilidad mediante un conteo con azul de Tripano. A continuación, las células fueron plaqueadas en la densidad requerida (25×10^3 o 15×10^4 células/*well* para placas de 24 *wells*) en las placas de cultivo que contenían o no *coverslips* de vidrio de 12 mm (ThermoFisher Scientific) previamente cubiertos de Poly-D-lisina (0.05 mg/ml, 30.000-70.000 PM, Sigma Aldrich) y Laminina (1 µg/ml, Invitrogen). Las neuronas se mantuvieron en medio de cultivo en incubadora a 37°C y 5% CO₂.

8.2 Preparación de cultivo primario de fibroblastos embrionarios

Las carcasas de ratones CD1 o CF1 de día embrionario E13.5 o 14.5 fueron separados y digeridos con tripsina 0.25% conteniendo 1mM EDTA por 20 minutos a 37°C. Se lavaron los trozos de tejido con DMEM suplementado con 10% FBS y se prosiguió con su disgregación mediante el uso de una pipeta Pasteur para obtener células disociadas. Se centrifugó a 1000 g por 5 minutos y el precipitado fue resuspendido en DMEM (alta glucosa) suplementado con 10% de FBS, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 ug/ml (DMEM completo). Las células provenientes de cada embrión fueron plaqueadas en una placa de 100 mm (Greiner Bio-One). Al llegar a 90% de confluencia las células fueron repicadas, se lavaron una vez con PBS, se incubaron a 37 °C por 1 minuto con tripsina 0.05%, se resuspendieron en DMEM completo y fueron plaqueadas en la densidad requerida (25×10^4 células/*well* para placa de 24 *wells*; 10^4 células/*well* para placas de 96 *wells*). Las células se mantuvieron en medio de cultivo en incubadora a 37°C y 5% CO₂.

9 Líneas celulares

En esta tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas: HEK293T (embrionarias renales), MCF7 (adenocarcinoma mamario RE+/RP+) y la línea celular murina Neuro2a o N2a (neuroblastoma). Todas ellas fueron cultivadas rutinariamente con medio DMEM (alta glucosa) penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 ug/ml y suero fetal bovino (FBS) al 10% y repicadas utilizando Tripsina 0.05%.

10 Análisis de la complejidad de la arborización dendrítica de neuronas primarias en cultivo

10.1 Transfección de neuronas primarias (sistema Amaxa)

Plásmidos de expresión (Tabla M3) fueron transfectados en neuronas DIV0 previo al plaqueo. Se preparó una suspensión de 100 µl con $4-5 \times 10^6$ células por tratamiento. A esta suspensión celular se le adicionaron 3 µg de ADN y la mezcla se transfirió a cubetas de transfección. Las cubetas se colocaron en porta cubetas del Nucleofector® (Amaxa) y nucleofectaron utilizando el programa 0-003, específico para neuronas primarias. Se adicionaron 500 µl de medio de cultivo pre-equilibrado (20 min a 37°C y

5%CO₂) a la cubeta y delicadamente se transfirió a tubos de 15 o 50 ml con el resto de medio de cultivo pre-equilibrado para plaquear. Las células transfectadas fueron plaqueadas (2.5×10^4 células/well) en placas de 24 wells con coverslips.

Plásmido	Fuente
pcDNA3.1	Invitrogen
guideRNA/Cas9 mouse Nedp1 #1	clonado
guideRNA/Cas9 mouse Nedp1 #3	clonado
CAG-GFP	Invitrogen

Tabla M3. Plásmido utilizados para la transfección de neuronas murinas primarias.

10.2 Inmunohistoquímica de neuronas primarias

Con el fin de potenciar la señal de fluorescencia de las neuronas transfectadas en cultivo, se realizó una inmunohistoquímica anti-GFP. Los cultivos neuronales fueron fijados a día in vitro (DIV)21 empleando una solución de PFA 4%, sacarosa 4% en PBS. En primera instancia se realizó una permeabilización con PBS-TritonX-100 0.1% v/v para los cultivos primarios neuronales durante 15 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente cambiando la solución cada 5 min. A continuación, se lavó con PBS por 5 minutos en agitación y se bloqueó con una solución de BSA 5% en 0.01% v/v PBS-TritonX-100 por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario Chicken anti-GFP (1:1000) disuelto en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente u O.N. a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados en agitación cada 5 minutos con PBS-TritonX-100 0,01% (v/v). A continuación, se incubó el anticuerpo secundario Goat anti-Chicken IgY (H+L) Alexa Fluor 488 (1:20000) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo se lavó el anticuerpo secundario con 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS-TritonX-100 0.01% v/v. Se realizó a continuación una tinción con DAPI (Sigma Aldrich, #D8417, 20 mg/ml) diluido 1:10000 en agua milliQ durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se lavó posteriormente con PBS por 5 minutos en agitación. Finalmente, las muestras fueron colocadas sobre un portaobjetos cubiertas con medio de montaje Vectashield (Life Technologies) y los bordes fueron sellados con esmalte de uñas.

10.3 Adquisición de imágenes y análisis morfológico neuronal

Las fotografías de neuronas DIV21 previamente transfectadas fueron tomadas con un objetivo de aire 20X de un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD AxioCam HRm3 digital. La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss). Las ramificaciones neuronales de las imágenes adquiridas fueron trazadas manualmente utilizando el *plugin* NeuronJ del *software* ImageJ. Se analizó el nivel de complejidad de la arborización dendrítica a partir del análisis de Sholl: círculos concéntricos fueron trazados a incrementos de 10 μm a alrededor del soma de la neurona y se registró el número de intersecciones por distancia del soma.

11 Western blot

Para la obtención de las muestras proteicas de los cultivos primarios y líneas celulares, se lavaron las células en PBS y se lisaron en 100 μl , para placas de 24 *wells*, o 200 μl , para placas de 12 *wells*, de buffer Laemmli 2X diluido al medio en buffer RIPA incubándose a 95°C durante 5 minutos. Para la obtención de proteínas de moscas se colocaron 10 moscas, previamente anestesiadas por CO₂, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 200 μl de buffer Laemmli 2X sobre hielo. Las moscas fueron aplastadas mecánicamente con el fin de romper el exoesqueleto y favorecer el contacto de las células con el buffer Laemmli y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. En el caso de tejido animal para la extracción de proteínas se colocaron los tejidos en tubos de 2 mL con RIPA suplementado con 20% de NEM para evitar la deconjugación de Nedd8. Los tejidos se homogeneizaron con el ULTRA-TURRAX T 10 (IKA), se determinó la concentración de proteínas por Bradford, se realizaron las diluciones necesarias para equiparar las concentraciones entre muestras. Se agregó buffer Laemmli 5X con una concentración final 1X y se incubaron a 95°C durante 5 minutos.

Para la inmunohistoquímica, las muestras de proteínas fueron separadas en geles de agarosa 10 % SDS-PAGE. En los casos que se utilizaron geles TGX Stain-Free (Bio-Rad), los geles se activaron en el Chemidoc. Luego las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF de 0,2 μm utilizando el Kit de transferencia y Transblot Turbo (BioRad). Se obtuvieron imágenes de proteínas totales de membranas provenientes de geles TGX Stain-Free previo al bloqueo en el Chemidoc. Las membranas fueron bloqueadas en leche 5% en buffer TBS-Tween 20 0,01% (Sigma Aldrich) durante una hora a

temperatura ambiente seguida de la incubación overnight a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en leche 5% en buffer TBS-Tween 20 0,01%. Se utilizaron los anticuerpos de la siguiente manera: anti-Nedd8 (1:250, rabbit, Abcam 81264), anti-Ubiquitina (1:200, rabbit, Santa Cruz 9133), anti-Culina1 (1:500, mouse, Invitrogen 322400). Se lavaron las membranas con TBS-T 0,01% 3 veces durante 10 min y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante 2h a temperatura ambiente. Se utilizaron los anticuerpo secundarios anti-rabbit-IgG HRP (1:2000, goat, Cell Signaling 7074) y anti-mouse-IgG HRP (1:2000, goat, Cell Signaling 7076) según correspondía. Se lavaron nuevamente las membranas 3 veces por 10 min en TBS-T 0,01% y se revelaron por quimioluminiscencia en el equipo G-BOX o en la estación Chemidoc. En los casos en los que no se utilizó el sistema TGX Stain Free, se incubaron las membranas en una solución 1,5 % m/v glicina, 0,1 % m/v SDS y 1% Tween 20 en agua a pH 2,2 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas con TBS-T 0.01% 3 veces durante 10 min. Las membranas fueron bloqueadas en leche 5% en buffer TBS-Tween 20 0,01% (Sigma Aldrich) durante media hora a temperatura ambiente seguida de la incubación de 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos house-keeper conjugados a HRP de la siguiente manera: anti-Histona3 (1:4000, rabbit, Cell Signaling 12648), anti-GAPDH (1:4000, rabbit, Cell Signaling 3884) y anti- β actina (1:4000, rabbit, Cell Signaling 12620). Se lavaron nuevamente las membranas 3 veces por 10 min en TBS-T 0,01% y se revelaron por quimioluminiscencia en el equipo G-BOX o en la estación Chemidoc. La intensidad de las señales fue medida con el software ImageJ. Las señales fueron normalizadas a sus respectivas bandas de las proteínas *housekeeper* o Stain-Free blot.

12 RT-qPCR

12.1 Extracción de ARN

Tejido de cerebro de ratón fue recolectado en 1000 uL de Trizol (Invitrogen) y homogeneizado con el ULTRA-TURRAX T 10 (IKA). El ARN total se extrajo utilizando el mini kit de columnas y buffers RNeasy (QIAGEN) con tratamiento con ADNasa en columna (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

12.2 Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Se obtuvo ADN copia (ADNc) derivado del ARN extraído, utilizando la enzima Transcriptasa Reversa Superscript III de Invitrogen y oligonucleótidos (oligo-dT) como *primers* de la reacción y se siguió el protocolo del fabricante. Como templado para la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) se utilizaron diluciones en agua Ampuwa de las alícuotas de ADNc obtenidas. La qPCR se llevó a cabo utilizando SYBR Green I Master (Roche). Se configuró una reacción de mezcla maestra de la siguiente manera (volumen por muestra): 1 µL de *forward primer* (10 µM), 1 µL de *reverse primer* (10 µM), 5 µL de SYBR Green I Master y 1 µL de H₂O (Los *primers* utilizados se encuentran en la Tabla M5). Se pipetearon 8 µL de mezcla maestra en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Sarstedt). Posteriormente, se agregaron 2 µL de ADNc molde diluido, la placa de pocillos se selló con una película transparente (Sarstedt) y se centrifugó rápidamente antes de colocarla en la máquina. Cada muestra (ADNc molde diluido) siempre se analizó por triplicado. Los niveles de expresión relativos se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [133] normalizados al gen *housekeeper Gapdh* y normalizados a la muestra de control. Las qPCR se realizaron en una termocicladora CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de Bio-Rad bajo el siguiente protocolo de ciclado (Tabla M4):

Programa	Ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
Pre-incubación	1	5 min	95
Desnaturalización	40	10 seg	95
<i>Annealing</i>		10 seg	60
Elongación		30 seg	72
Curva de <i>melting</i>	1	0.5 °C cada 5 seg	65 a 95

Tabla M4. Programa utilizado para las RT-qPCR realizadas en la termocicladora CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad).

Primer	Secuencia 5'-3'
Nedp1-qPCR_Fw	TTTAGACGACAGCCAGAATCC
Nedp1-qPCR_Rv	CATCACAAGCATTCTTCAGTAG
Gapdh-qPCR_Fw	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG
Gapdh-qPCR_Rv	GATGGCATGGACTGTGGTCATGAG

Tabla M5. Secuencia de *primers* utilizados para las RT-qPCR realizadas a partir de tejido de cerebro de ratón.

13 Análisis morfológico cerebral, neuronal y dendrítico *in vivo*

13.1 Preparación de cortes de cerebro de ratones

Ratones de 12 semanas de edad según fueron anestesiados con isoflurano (Piramal Critical Care) y perfundidos transcárdialmente con una bomba peristáltica durante 1 minuto con PBS, 5 minutos con solución de fijación (4% PFA p/v en PBS, pH 7.4) y 1 minuto con PBS a un flujo de 10 ml/min. Se extrajeron los cerebros, se mantuvieron en solución de fijación a 4°C durante 24 horas y luego se conservaron en PBS, pH 7.6 a 4 °C hasta su procesamiento. Los cerebros fueron integrados en una solución tibia de agarosa 4% p/v (Invitrogen) en PBS con el fin de realizar cortes transversales de 120 µm de espesor con vibrátomo (VT1000 S, Leica). Los cortes se almacenaron a -20 °C en solución de crioconservación (20% v/v de glicerol, 30% v/v etilenglicol en PBS). Previo al montaje, se lavaron los cortes en PBS, se tiñeron con DAPI (Sigma Aldrich, #D8417, 20 mg/ml) diluido 1:10000 en agua MQ y se lavaron 3 veces en PBS. Se montaron los cortes en portaobjetos utilizando el medio VectaShield (Vector Laboratories) y se sellaron los bordes del con esmalte de uñas.

13.1.1 Adquisición de imágenes y análisis de secciones coronales de cerebros

Con el fin de analizar el tamaño total y de regiones de cerebro, se tomaron fotografías de los cortes transversales de cerebros de ratones: 1) *Nestin*^{+/Cre} (*Nestin-Cre*), 2) *Nedp1*^{flx/flx} (*Nedp1* floxed), 3) *Nedp1*^{+/flx}; *Nestin*^{+/Cre} (*Nedp1* CHet) y 4) *Nedp1*^{flx/flx}; *Nestin*^{+/Cre} (*Nedp1* CKO) de 12 semanas de edad con una lupa estereoscópica SZX10 (Olympus). Las imágenes se obtuvieron bajo aumento de 2X, con un

filtro de iluminación Oblicua que provee un mayor contraste y utilizando la cámara digital CCD MicroPublisher 6 (QImaging) en conjunto con el software Ocular Imaging. Bajo estas mismas condiciones se fotografió una hoja milimétrica con el fin de setear la escala de las imágenes de los cortes. De todas las imágenes obtenidas de cada cerebro, se seleccionaron las correspondientes a los cortes con distancia de Bregma 2.34, 0.98, -0.22, -2.06 y -3.08 mm (Figura M1). Utilizando el *software* ImageJ, se seteó la escala y se obtuvo el área total de cada corte coronal (Figura M2 B). Se determinaron tres parámetros más en los cortes coronales Bregma 0.98: 1) el espesor de la corteza, 2) el área promedio de los ventrículos laterales y 3) el área del estriado dorsal como se indica en la Figura M2 C. Para determinar el espesor de la corteza se trazaron y midieron 6 líneas como la representada en color naranja en la Figura M2 C. Se promediaron todas las mediciones y el promedio se relativizó al área total de la sección coronal correspondiente (Figura M2 B). El área relativa del ventrículo lateral se reportó como el promedio de los dos ventrículos en la sección Bregma 0.98 sobre el área total de dicha sección (Figura M2 C). Finalmente, el área relativa del estriado dorsal se determinó como el promedio del área del estriado dorsal derecho e izquierdo relativizado al área total de la sección coronal.



Figura M1. Esquema ilustrativo indicando las secciones coronales seleccionadas con las distancias de Bregma indicadas para el análisis morfológico del cerebro de ratón de 12 semanas de edad. Figura creada con BioRender.com.



Figura M2. Esquema de los parámetros analizados en las secciones coronales Bregma 0.98 de cerebro de ratón. **A.** Foto representativa de un corte coronal. **B.** Se muestra en rojo el área total de la sección coronal. **C.** Se indican un trazo representativo de los realizados para determinar el espesor coronal (naranja), el contorno del ventrículo lateral (rojo) y el contorno del estriado dorsal (verde). La barra de escala representa 1 mm.

13.1.2 Adquisición de imágenes y análisis morfológico neuronal *in vivo*

Para el análisis morfológico de neuronas piramidales del CA1 del hipocampo *in vivo* se tomaron imágenes de cortes coronales de cerebros de ratones *Nedp1* floxed (*Nedp1^{flx/flx}*, *Thy1^{EGFP}*) y *Nedp1* CKO (*Nedp1^{flx/flx}*; *Nestin-Cre*, *Thy1^{EGFP}*) con un microscopio confocal Zeiss LSM 710 y el *software* Zen Blue. Las imágenes se capturaron con un objetivo 20x/0.8 M27 Plan-Apochromat. Las neuronas fueron excitadas a 488 nm (GFP) y la emisión fue colectada a 500-545 nm. Se colectaron imágenes *Z-stack* con *Z-steps* de 0.5 μm y 2048 x 2048 pixels de tamaño. Las imágenes adquiridas fueron procesadas utilizando el *software* Neurolucida 360 (MBF Bioscience) donde se realizó el traceado manual asistido de las neuronas. Los datos de la complejidad del árbol dendrítico se obtuvieron mediante el análisis de *Sholl* que consiste en determinar la cantidad de intersecciones entre las ramificaciones de la neurona y una serie de círculos concéntricos distanciados 10 μm entre si partiendo desde el soma (distancia del soma). También se adquirió el volumen del soma y la longitud dendrítica total de cada neurona.

13.1.3 Adquisición de imágenes y análisis de espinas dendríticas *in vivo*

Para el análisis de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo *in vivo* se tomaron imágenes de cortes coronales de cerebros de ratones *Nedp1* floxed (*Nedp1^{flx/flx}*,

Thy1^{EGFP}) y *Nedp1* CKO (*Nedp1^{flx/flx}*; *Nestin-Cre*, *Thy1^{EGFP}*) con un microscopio confocal Zeiss LSM 710 y el *software* Zen Blue. Primeramente, se realizó una exploración de las neuronas sobre los cortes de cerebro con el fin de seleccionar neuronas con altos niveles de fluorescencia cuyas dendritas estuvieran lo suficientemente separadas unas de otras con el fin de poder fotografiarlas individualmente. Esta exploración se realizó utilizando un objetivo 20x/0.8 M27 Plan-Apochromat. Las dendritas individuales se fotografiaron con el objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27 realizando un zoom digital. Las dendritas fueron excitadas a 488 nm (GFP) y la emisión capturada fue de 500-545 nm. Se colectaron imágenes *Z-stack* con 848 x 246 pixels de tamaño y *Z-steps* 0.1 μm de forma tal que todo el espesor de la dendrita se encuentre contenido en el Z de la imagen. Las imágenes fueron sometidas a un proceso de deconvolución el cual mejora la definición y nitidez utilizando el plugin “Iterative Deconvolve 3D” del *software* ImageJ. A partir de las imágenes deconvolucionadas se realizó una reconstrucción tridimensional de las dendritas y sus espinas con el *software* Neurolucida 360 (MBF Bioscience) basándose en parámetros previamente establecidos para neuronas piramidales del CA1 del hipocampo [134]. Se exportaron los siguientes datos a una planilla de Excel: la longitud de las dendritas, el número de espinas presentes y su volumen (voxel y μm^3), a partir de los cuales se calculó la densidad de espinas dendríticas expresada como el número de espinas dendríticas sobre 10 μm de longitud de dendrita.

13.2 Tinción LacZ (X-Gal) de cerebros murinos

Ratones de 12 semanas de edad según fueron anestesiados con isoflurano (Piramal Critical Care) y perfundidos transcárdialmente con una bomba peristáltica durante 1 minuto con PBS, 5 minutos con solución de fijación LacZ (4% PFA m/v, 0.005M EGTA, 0.001M MgCl en PBS, pH 7.4) y 1 minuto con PBS a un flujo de 10 ml/min. Se extrajeron los cerebros, se mantuvieron en sacarosa 15% m/v en solución de fijación LacZ a 4°C durante 24 horas. Los cerebros fueron congelados y cortados con crióstato HM550 (Thermo Scientific). Los cortes se lavaron 3 veces con solución de lavado LacZ (Deoxicolato 0,01%, NP40 0.02% en PBS, pH7.4) y se tiñeron entre 3 y 24 horas en solución de tinción LacZ (X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Genaxxon Bioscience) 0.1% m/v, ferrocianuro de potasio 0.005 M en solución de lavado LacZ) en agitación a 37°C. Los cortes fueron lavados con PBS, incubados en PFA 4% m/v en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, vueltos a lavar con PBS y

deshidratados para finalmente ser montados con medio DPX (Roth), protegidos con cubreobjetos y sellados con esmalte de uñas.

14 Ensayo de sobrevida de MEFs en cultivo

Se sembraron 1×10^4 MEFs por *well* en placas de 96 *wells*. Dos días después se les cambió el medio por DMEM completo suplementado con distintas concentraciones de MG132, Etopósido o Doxorubicina. Luego de 24 horas de tratamiento con MG132 o Doxorubicina o 48 horas de tratamiento con Etopósido, se lavaron las células una vez con PBS y se adicionó 100 μ l de medio DMEM completo con Alamar Blue (Roche) 30 μ M. La viabilidad de las células correlaciona positivamente con los niveles de actividad metabólica a través de la cual se reduce el reactivo Alamar Blue resultando en un indicador fluorescente y colorimétrico. Se utilizaron como blanco wells carentes de células que contenían medio con Alamar Blue. Se incubaron las placas entre 3 y 4 horas a 37°C y se procedió a la detección de la fluorescencia con el lector de placas Enspire (PerkinElmer, Inc.) con una longitud de onda de excitación de 545 nm y de emisión de 590 nm.

15 Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Graphpad prism. Se aplicaron estudios test de t de dos colas, ANOVA de una vía o dos vías (paramétrico) seguidos o no de post-test de Tukey o Bonferroni según el caso, o el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn's para evaluar diferencias entre tratamientos. Se utilizó el test de chi cuadrado (χ^2) para comparar las frecuencias observadas y esperadas de la descendencia de cruzamientos de ratones de la línea KO de Nedp1. Finalmente, los datos de sobrevida de *C. elegans* y *D. melanogaster* se analizaron mediante el método de Kaplan-Meier. La estadística se calculó con el programa OASIS2 [135] utilizando el método Mantel-Cox de rango logarítmico no paramétrico.

Resultados

Capítulo I. Exploración del fenómeno de neddilación atípica en diversos tipos celulares

La neddilación atípica ha sido utilizada como uno de los argumentos centrales en contra de la existencia de la neddilación como verdadera modificación post-traducciona más allá de Culinas. Como se mencionó en la sección 2.1 de la introducción, la neddilación atípica se manifiesta como una acumulación de conjugados de Nedd8 detectable por WB que es prevenible por la inhibición de la enzima activadora de Nedd8, NAE, ya que este proceso ocurre mediante la vía de ubiquitinación [36, 85]. La neddilación atípica se reportó en ciertos contextos celulares donde se ve alterada la proporción de Ubiquitina:Nedd8 libre, en particular, cuando hay una disminución de Ubiquitina libre y/o un aumento de Nedd8 libre [36, 85]. Varios trabajos reportan que tanto la inhibición del proteasoma (con MG132) o el shock térmico (HS) resultan en una disminución de Ubiquitina libre que deriva en la activación de la vía no canónica de la neddilación. En efecto, el hecho de que la neddilación observada bajo estos tratamientos no se prevenga cuando se inhibe la enzima E1 activadora de Nedd8 NAE (por MLN4924), confirma que la neddilación es atípica [36, 85]. Este fenómeno fue observado principalmente en líneas celulares como MCF7 y U2OS. Sin embargo, un trabajo reportó que la neddilación atípica es un mecanismo conservado desde levaduras hasta mamíferos [85]. Con el fin de poner a prueba esta afirmación, sometimos varios tipos de células de mamíferos (líneas celulares humanas y murinas, transformadas, immortalizadas y cultivos primarios) a tratamiento con MG132 o HS en combinación o no con MLN4924 para evaluar qué tan conservado es el fenómeno de la neddilación atípica.

Cada tipo celular fue sometido a 6 tratamientos que denominamos “DMSO”, “NAEi”, “DMSO + MG132”, “NAEi + MG132”, “DMSO + HS” y “NAEi + HS” (Figura R1). Brevemente, todas las células fueron sometidas a 5 horas de tratamiento con el inhibidor de NAE, MLN4924 1 μ M, (NAEi) o con su vehículo (DMSO 1 μ M) previo a la lisis total y extracción de proteínas. A su vez, estos dos tratamientos se combinaron con una incubación de 4 horas con el inhibidor del proteasoma (MG132 30 μ M) o con una incubación a 43°C durante 15 minutos previo a la extracción de proteínas (Figura R1). Los niveles de neddilación fueron determinados como la señal de Nedd8 de alto peso molecular comprendida

entre los 130 y los 180 kDa relativa a señal de proteína total del Stain free blot comprendida entre el mismo rango de peso molecular.

Las líneas celulares humanas MCF7 y HEK 293, y la línea celular murina N2a fueron sometidas a los tratamientos mencionados previamente. Realizamos WB a partir de lisados celulares revelando contra Nedd8 y Ubiquitina y cuantificamos el nivel de neddilación de alto peso molecular para cada condición relativo al Stain free blot. Se normalizaron los niveles de neddilación al tratamiento con DMSO. Niveles de neddilación significativamente mayores a los de DMSO fueron considerados como neddilación atípica (Figura R2).

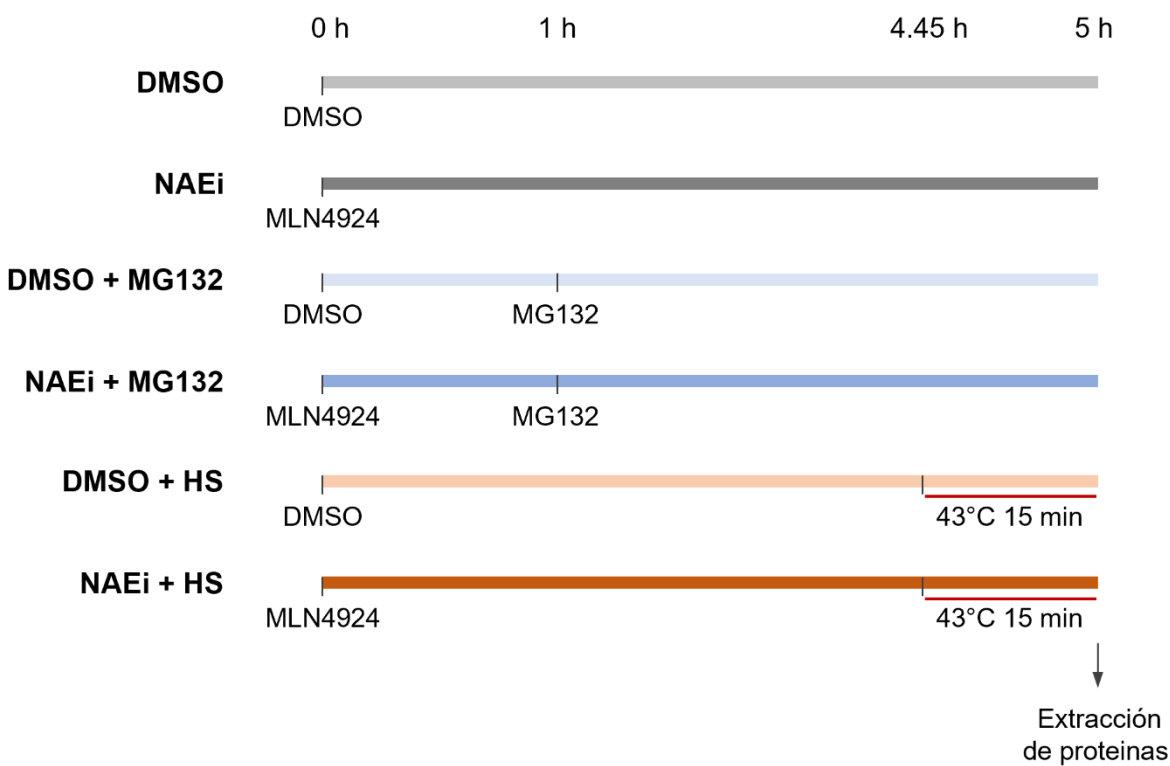


Figura R1. Tratamientos realizados para evaluar la neddilación atípica en distintos tipos celulares. Esquema representativo de los tiempos de estímulos realizados en cada grupo experimental con el fin de evaluar los niveles de neddilación atípica.

Como era de esperar, en la línea MCF7 observamos un incremento significativo de 8 veces de la neddilación bajo el tratamiento con MG132 respecto de la condición basal (DMSO) que persiste cuando se lo combina con NAEi (Figura R2 A). Este resultado coincide con los previamente reportado en esta línea celular lo cual confirma que los tratamientos realizados son los correctos para evaluar la

neddilación atípica en otros tipos celulares [36, 85]. Al analizar la línea HEK, la inhibición del proteasoma deriva en la acumulación de conjugados de Nedd8 que no llega a ser estadísticamente significativo. Sin embargo, en combinación con la inhibición de NAE, los niveles de neddilación atípica aumentan 8 veces respecto del basal (Figura R2 B).

Es interesante notar que en células MCF7 el tratamiento con MG132 induce los niveles de neddilación atípica máximos, pero en HEK sólo el agregado de NAEi en combinación con MG132 induce neddilación atípica a pesar incluso de que NAEi inhibe significativamente la neddilación general. Curiosamente, en N2a, una línea murina de neuroblastoma, no se observó el fenómeno de neddilación atípica ni con el tratamiento de MG132 individualmente ni en combinación con NAEi (Figura R2 C).

Luego, continuamos con la exploración de la neddilación atípica en células derivadas de cultivos primarios (Figura R3). Se realizaron los mismos tratamientos mencionados previamente. En fibroblastos humanos la neddilación aumento tres veces respecto de DMSO al tratar con MG132 y 6 veces en combinación con NAEi (Figura R3 A). En fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) no se detecta neddilación atípica bajo la condición clásica de su inducción (MG132) pero se observa un gran aumento de alrededor de 14 veces respecto al basal cuando se combina MG132 con NAEi (Figura R3 B). Finalmente, neuronas corticales obtenidas a partir de cultivos primarios de embriones de ratón E16.5 no exhibieron neddilación atípica y presentaron un perfil de neddilación muy similar al obtenido en la línea N2A (Figura R3 C).

El tratamiento HS no indujo neddilación atípica en ninguno de los tipos celulares testeados, excepto en MCF7 donde hay una tendencia a la neddilación atípica de poco más del doble, aunque no llega a ser significativa.

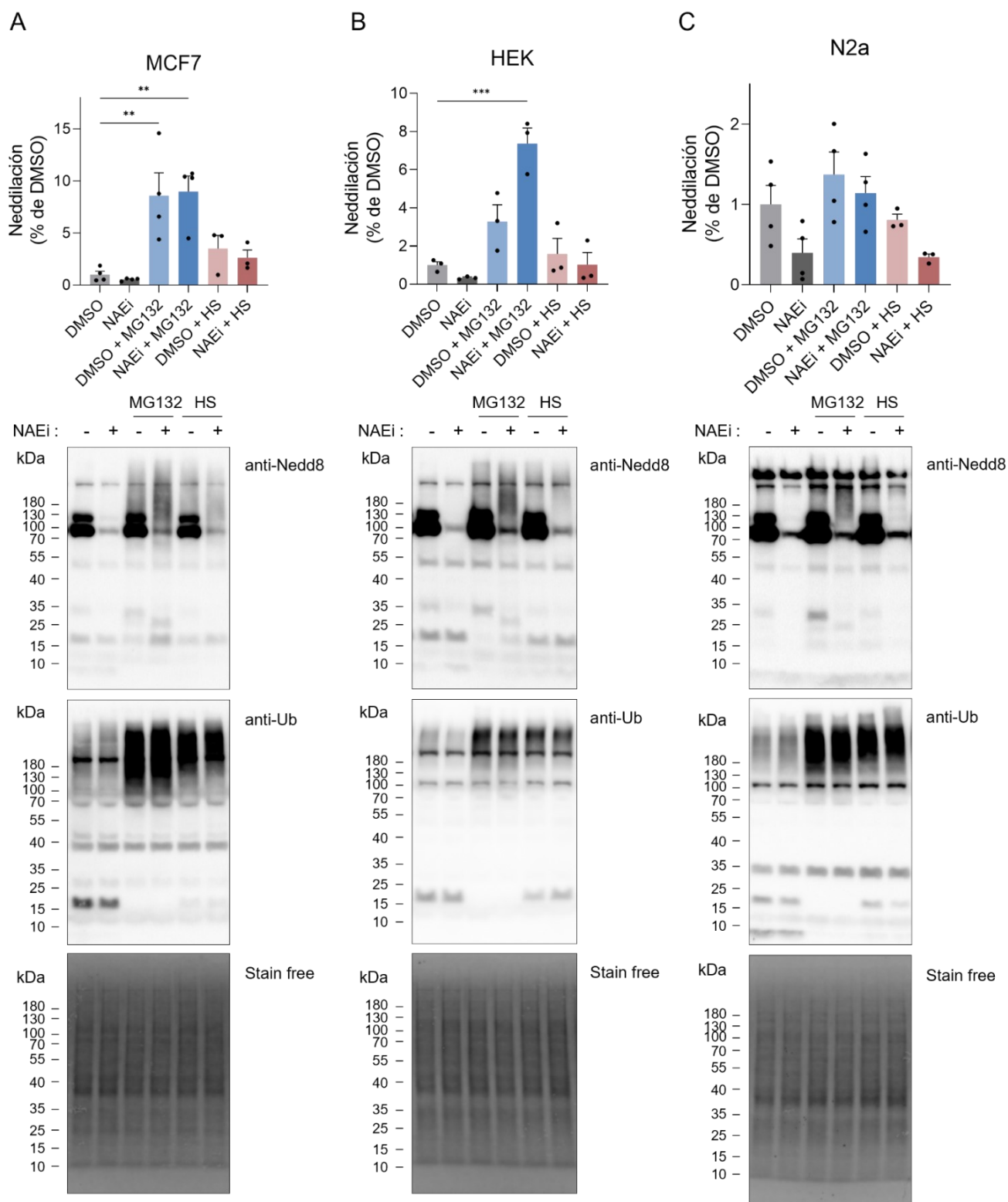


Figura R2. Los niveles de neddilación atípica varían entre líneas celulares. Líneas celulares humanas y de ratón fueron tratadas con el inhibidor de proteasoma por 4 horas (MG132) o shock de calor durante 15 minutos (HS) en combinación o no con inhibición de la vía de la neddilación (NAEi). Se muestra la cuantificación de neddilación atípica y WB representativos a partir de lisado total de células MCF7 (A), HEK 293 (B) y Neuro2A (C). Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Tukey. $**p < 0.01$, $***p < 0.005$. $n = 3-4$ por grupo experimental.

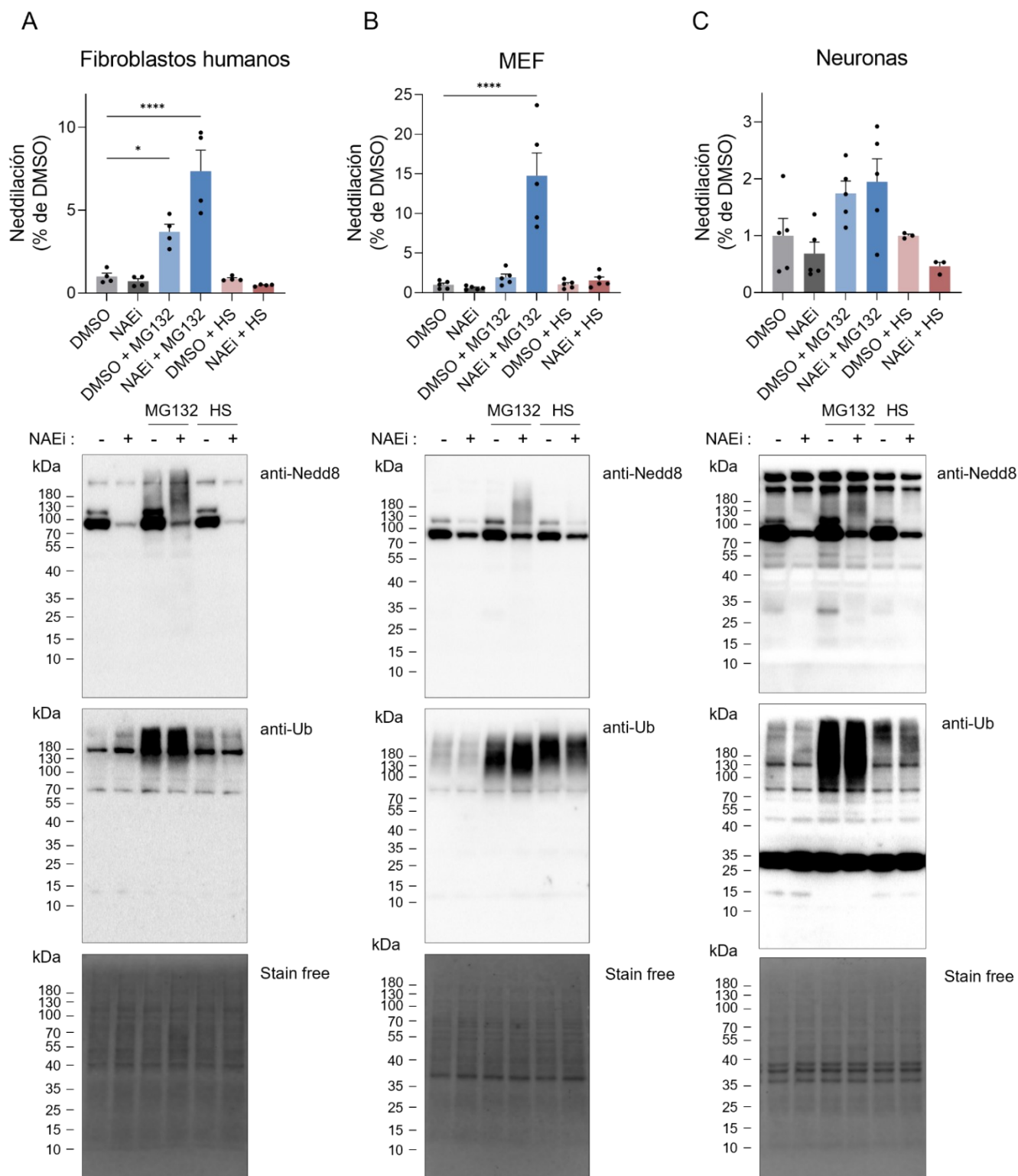


Figura R3. Los niveles de neddylation atípica varían entre células primarias de distintos orígenes. Células derivadas de cultivos primarios de humano y ratón fueron tratadas con el inhibidor de proteasoma por 4 horas (MG132) o shock de calor durante 15 minutos (HS) en combinación o no con inhibición de la vía de la neddylation (NAEi). Cuantificación de neddylation atípica y Western blot representativos a partir de lisado total de cultivo celular de fibroblastos humanos (A), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (B) y cultivo primario de neuronas de ratón (C). Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Tukey. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. $n = 3-5$ por grupo experimental provenientes de dos cultivos primarios independientes.

Conclusiones

En células humanas el tratamiento con MG132 basta para inducir neddilación atípica. En MCF7 MG132 parece ser suficiente para lograr el nivel máximo de neddilación atípica posible, ya que en combinación con NAEi, no se detecta un aumento de neddilación atípica. Sin embargo, en HEK y fibroblastos el tratamiento combinado MG132 + NAEi exhibe mayores niveles de neddilación atípica que los observados únicamente con MG132. Esto podría deberse a que en algunas células se requiera de un mayor desbalance de la relación Nedd8:Ubiquitina libre que en otros para exhibir la respuesta de neddilación atípica máxima. En células murinas se observa una leve tendencia al aumento de la neddilación de alto peso molecular en presencia de MG132 que no llega al doble del nivel basal. Si bien en MEFs la combinación de MG132 y NAEi induce neddilación atípica, tanto en neuronas como en N2a este tratamiento no provoca un aumento en la neddilación de alto peso molecular. Analizando estos resultados podemos concluir que el fenómeno de neddilación atípica no se encuentra altamente conservado en mamíferos, que su existencia no es una constante ubicua en todas las células y que sus niveles dependen del tipo celular y combinación de estímulos.

Capítulo II. Estudio de la relevancia fisiológica de ortólogos de *Nedp1* en dos modelos de animales invertebrados

La neddilación es un proceso conservado evolutivamente [64]. El correcto equilibrio tanto de la conjugación de Nedd8 como su deconjugación es importante para la homeostasis celular. Como se mencionó en la sección 2 de la introducción, CSN y Nedp1 son las deconjugasas de Nedd8, siendo la segunda la encargada de remover Nedd8 de blancos no Culinas. A lo largo de los años se generaron varios modelos de organismos *knockouts*, *knockdown* o de pérdida de función de ortólogos de Nedp1 en entre los cuales se encuentran *S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans* y *D. melanogaster* [56, 104, 106, 107]. Curiosamente, los *knockouts* de Nedp1 en estos organismos son viables y sin alteración del fenotipo evidente. Ha de subrayarse, no obstante, que en estos estudios no llevaron a cabo ningún estudio fenotípico detallado, sino que esencialmente se restringieron a reportar la falta de letalidad o de efectos evidentes sobre la reproducción. Sin embargo, estos reportes han sido utilizados asiduamente como uno de los argumentos más fuertes en contra de la relevancia de la neddilación de blancos distintos de Culinas [108]. En esta sección nos propusimos estudiar la relevancia fisiológica de ortólogos de Nedp1 realizando una búsqueda fenotípica más profunda en dos modelos de invertebrados: *C. elegans* y *D. melanogaster*. En particular, estudiamos la sobrevivencia en condiciones basales y de estrés tanto en el gusano como en la mosca, y el desarrollo en la mosca.

Tanto *C. elegans* como *D. melanogaster* tienen una expectativa de vida relativamente corta, de aproximadamente 20 y 60 días respectivamente, por lo cual son buenos modelos de estudio para ensayos de longevidad [125, 136-138]. Además, debido su corto ciclo de vida, la mosca de la fruta es un gran modelo para el estudio de fertilidad y desarrollo [127, 139].

Estudio del rol de ulp-3 en la sobrevida de *C. elegans*

Baily *et al.* identificaron a la enzima ulp-3 como el ortólogo de NEDP1 en *C. elegans* por su homología de secuencia, la conservación de la triada catalítica His/Asp/Cys, y su función como deneddilasa de blancos conocidos de Nedd8 [56].

Para el análisis de sobrevida se utilizó la cepa N2 como línea *wildtype* de referencia. Esta línea posee ambos alelos de ulp-3 sin mutaciones (ulp-3^{+/+}) y en este trabajo la denominaremos ulp-3 WT. El alelo tm1287 de ulp-3 presenta una delección de 360 pares de bases que abarca parte el intrón 1 y del exón 2 de ulp-3 (Figura R4). Los gusanos que poseen los dos alelos tm1287 de ulp-3 mutados (ulp-3^{-/-}) se denominan ulp-3 KO en esta tesis.

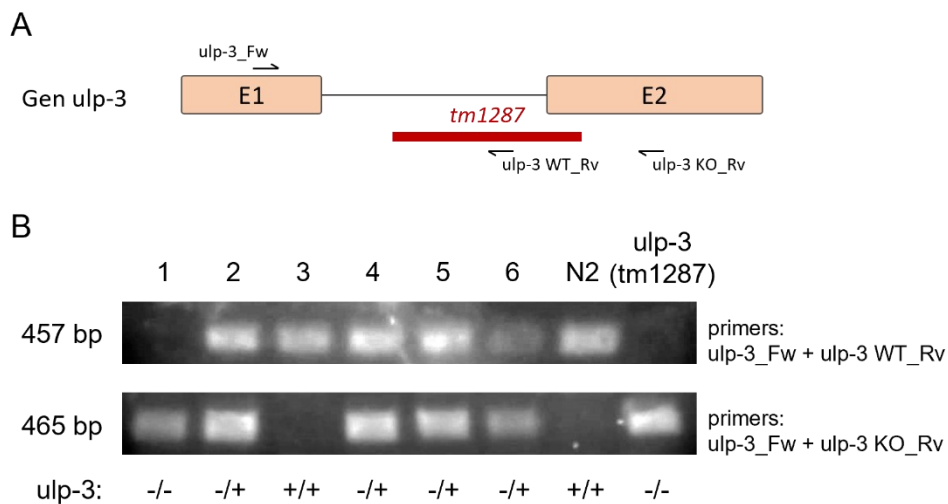


Figura R4. Identificación de gusanos ulp-3 WT y ulp-3 KO. **A.** Esquema del gen ulp-3 de *C. elegans*: En rojo se representa la región eliminada (tm1287) en el gusano ulp-3 KO y se indican los *primers* utilizados (secuencias en la Tabla M1). **B.** Genotipado representativo de 6 gusanos junto a dos controles: un gusano N2 (ulp-WT) y ulp-3(tm1287) (ulp-3 KO). E: exón. Esquema adaptado de Bailly AP *et al.* Cell Rep. 2019 Baily *et al.* [56].

Se realizaron cinco retrocruzas de la cepa ulp-3 KO contra la cepa ulp-3 WT con el fin de homogeneizar el background genético. La cepa ulp-3 KO fue previamente utilizada y caracterizada por el laboratorio del Dr. Dimitri Xirodimas donde se verificó el aumento de la neddilación de sustratos conocidos [56]. Se realizaron dos experimentos independientes de sobrevida bajo condiciones normales (Tabla R1). No se verificaron diferencias en la sobrevida entre los gusanos ulp-3 WT y ulp-3 KO como se puede observar en las curvas de Kaplan-Meier (Figura R5 A).

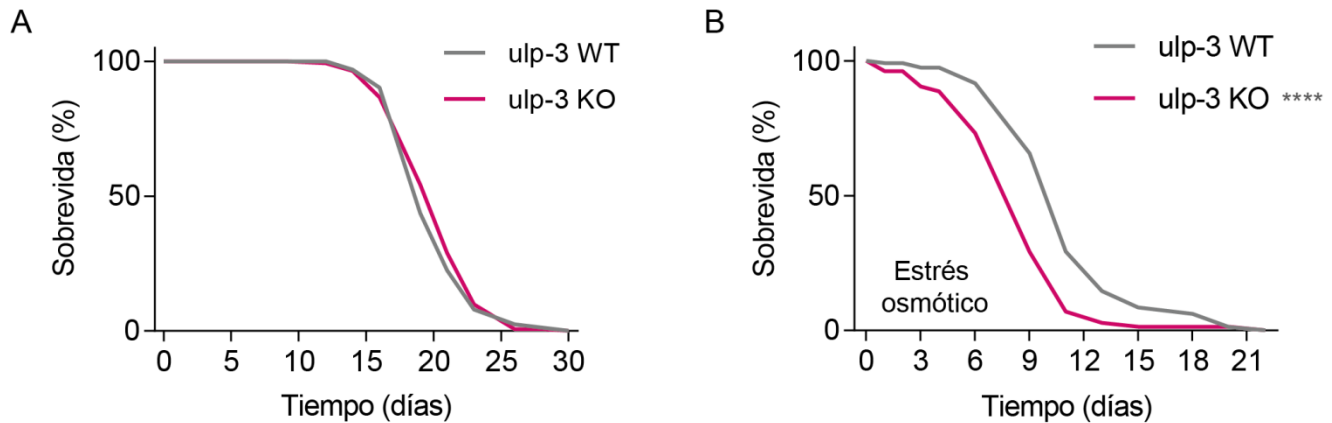


Figura R5. ulp-3 afecta la sobrevivencia de *C. elegans* bajo estrés osmótico. Gráficos representativos de ensayos de sobrevivencia de *C. elegans*. **A.** Sobrevivencia en condiciones normales. **B.** Sobrevivencia bajo condiciones de estrés osmótico. Los datos fueron analizados utilizando el test de Kaplan-Meier. Los asteriscos en color representan el grupo de referencia para el análisis estadístico. **** $p < 0.0001$ comparando con la línea ulp-3 WT. $n = 92 - 164$ por genotipo.

Genotipo	Animales	LS media	LS máx.	p valor	Cepa ref.	Réplica
ulp-3 WT	183/201	17.82 $\pm$ 0.27	34	0.1256	vs ulp-3 WT	1
ulp-3 KO	132/160	17.2 $\pm$ 0.26	27			
ulp-3 WT	164/171	20.28 $\pm$ 0.22	30	0.3354	vs ulp-3 WT	2
ulp-3 KO	142/170	20.5 $\pm$ 0.25	30			

Tabla R1. ulp-3 no afecta la sobrevivencia de *C. elegans* bajo condiciones normales. Se muestra el resumen de ambas réplicas experimentales de sobrevivencia. Los datos fueron analizados utilizando el Log-rank test. Animales: indica el N° de animales evaluados/ N° de animales inicial, LS: sobrevivencia (*lifespan*), SEM: Error estándar medio, Cepa ref.: grupo de referencia para el análisis estadístico.

Efecto del estrés osmótico en la sobrevivencia de *C. elegans* carentes de ulp-3

En un estudio precedente se reportó que en los gusanos ulp-3 las células gonadales presentaban una mayor resistencia a la apoptosis frente a la exposición a radiación ionizante [56]. Dado este antecedente, nos preguntamos si la pérdida de función de ulp-3 podría tener un efecto en la sobrevivencia del gusano bajo alguna condición de estrés. La homeostasis osmótica es crítica para la vida en general. El gusano *C. elegans* habita normalmente en medios en los que es expuesto a estrés osmótico constantemente por lo cual la resistencia a este tipo de estrés es una característica fisiológicamente

relevante en este organismo [140-143]. Para estudiar si *ulp-3* afecta la resistencia al estrés osmótico en *C. elegans*, los gusanos *ulp-3* WT y KO fueron expuestos crónicamente a una concentración 400 nM de cloruro de sodio y censados cada 48 horas para determinar el número de muertes.

Observamos en tres experimentos independientes que la sobrevivida de los gusanos *ulp-3* KO se vio significativamente acortada en comparación con los *ulp-3* WT frente al estrés osmótico (Tabla R2, Figura R5 B).

Genotipo	Animales	LS media	LS máx.	p valor	Cepa ref.	Réplica
<i>ulp-3</i> WT	92/124	11.26 ± 0.36	22	<0.0001	vs <i>ulp-3</i> WT	1
<i>ulp-3</i> KO	93/106	8.67 ± 0.33	22			
<i>ulp-3</i> WT	119/163	11.49 ± 0.26	21	<0.0001	vs <i>ulp-3</i> WT	2
<i>ulp-3</i> KO	146/157	7.38 ± 0.25	17			
<i>ulp-3</i> WT	81/121	12.07 ± 0.48	23	<0.0001	vs <i>ulp-3</i> WT	3
<i>ulp-3</i> KO	165/194	8.53 ± .3	16			

Tabla R2. La falta de *ulp-3* afecta negativamente la sobrevivida de *C. elegans* frente al estrés osmótico. Se muestra el resumen de tres réplicas experimentales de sobrevivida bajo estrés osmótico. Los datos fueron analizados utilizando el test de Kaplan-Meier. Animales: indica el N° de animales evaluados/ N° de animales inicial, LS: sobrevivida (lifespan), SEM: Error estándar medio, Cepa ref.: grupo de referencia para el análisis estadístico.

Estos resultados indican que mientras *ulp-3* no afecta la longevidad del gusano bajo condiciones normales, sí juega un rol en la sobrevivida de *C. elegans* bajo una condición de estrés ambiental fisiológicamente relevante para el gusano como el estrés osmótico.

Caracterización fisiológica de la mosca *Den1* KO

Chan *et al.* identificaron a *Den1* como el ortólogo de NEDP1 en la mosca *D. melanogaster* [104]. Demostraron que *Den1* es capaz de procesar el precursor inmaduro de Nedd8 *in vitro* y que su depleción deriva en la acumulación de conjugados de Nedd8 en la mosca de la fruta [104]. Si bien la mosca con pérdida de función de *Den1* fue reportada como viable y fértil [104], nos propusimos explorar potenciales roles fisiológicos de *Den1* en la mosca de la fruta. Para ello obtuvimos la línea de mosca *Den1* KO (RRID:BDSC_15348) del repositorio Bloomington de líneas de *D. melanogaster*. Esta

línea fue desarrollada en el marco del Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) en el que se generaron miles de líneas mutantes a través de la inserción de un elemento transponible que contiene el gen de pigmentación de ojos, *mini-white*, en moscas carentes del gen de pigmentación de ojos, *white (w)* [128]. Confirmamos la pérdida de función de *Den1* a través de WB revelando contra Nedd8 a partir de lisado total de moscas (Figura R6).

En las moscas *Den1* KO se observa el patrón característico de acumulación de conjugados de Nedd8 tanto en machos como hembras. Realizamos 10 retrocruzas de *Den1* KO con la línea *w*, línea control, con el fin de homogeneizar el background genético. En este trabajo, llamamos *Den1* WT a la línea de mosca *w* comúnmente utilizada como control genético.

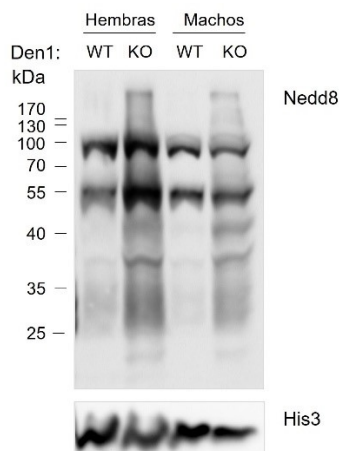


Figura R6. Validación molecular de la línea de mosca transgénica *Den1* KO. Western blot representativo de lisado total de moscas hembra y macho de *Den1* WT y *Den1* KO, revelado con anticuerpo anti-Nedd8 y anti-Histona3 como control de carga. El aumento de conjugados de Nedd8 refleja la ausencia de la enzima Den1 en las moscas *Den1* KO.

La pérdida de función de *Den1* reduce la fertilidad en *D. melanogaster*

Durante el mantenimiento de las líneas notamos sistemáticamente un menor número de moscas en los repiques de *Den1* KO que en los de *Den1* WT. Nos preguntamos si esto podía deberse a alguna alteración en el desarrollo debido a la falta de Den1. Para responder esta pregunta en experimentos controlados, realizamos los siguientes cruzamientos: (*Den1* WT x *Den1* WT), (*Den1* WT x *Den1* KO) y (*Den1* KO x *Den1* KO), y analizamos el porcentaje de moscas eclosionadas por cruzamiento *Den1* WT, *Den1* Het y *Den1* KO, respectivamente relativizado a *Den1* WT (Figura R7). Observamos que hay una

disminución significativa en el porcentaje de eclosiones de *Den1* KO (100 ± 2.815 *Den1* WT, 97.07 ± 4.036 *Den1* Het, 84.58 ± 4.514 *Den1* KO, Kruskal-Wallis test, $p = 0.01247$).

Esta disminución en la descendencia a partir de cruzamientos *Den1* KO x *Den1* KO podría contribuir a explicar, aunque sea parcialmente, el menor número de moscas observadas en los repiques durante el mantenimiento del *stock*.

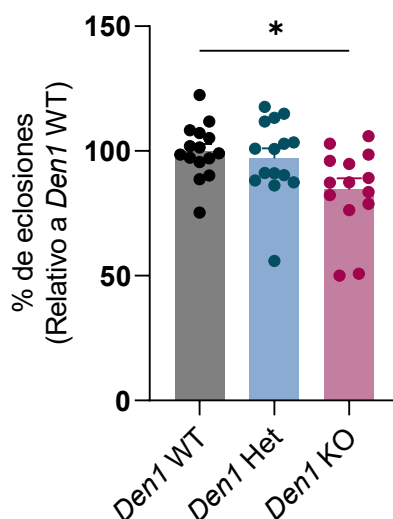


Figura R7. La pérdida de función de Den1 reduce el número de moscas eclosionadas por cruzamiento en *D. melanogaster*. Gráfico del porcentaje de eclosiones a partir de cruzamientos de moscas. Se contaron las moscas eclosionadas de cada uno de los cinco cruzamientos independientes por grupo experimental y se relativizaron al promedio de eclosiones *Den1* WT. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, $n=15$ por grupo experimental provenientes de tres experimentos independientes.

La pérdida de función de Den1 afecta negativamente la sobrevivencia de *D. melanogaster*

Con el fin de estudiar si Den1 tiene un rol en la longevidad de la mosca de la fruta, realizamos experimentos de sobrevivencia utilizando individuos machos. En primer lugar, analizamos la sobrevivencia bajo condiciones normales, comida *ad libitum* a 25°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs. Se registró una disminución en alrededor de 5 días (12 %) en la vida media de moscas *Den1* KO en comparación con moscas *Den1* WT en tres experimentos independientes (Tabla R3, Figura R8 A). No observamos

diferencias significativas entre la sobrevivencia de moscas heterocigotas para *Den1* y *Den1* WT en la curva de Kaplan-Meier (Figura R8 A) ni en la vida media (Tabla R3) lo que sugiere que *Den1* es haplosuficiente.

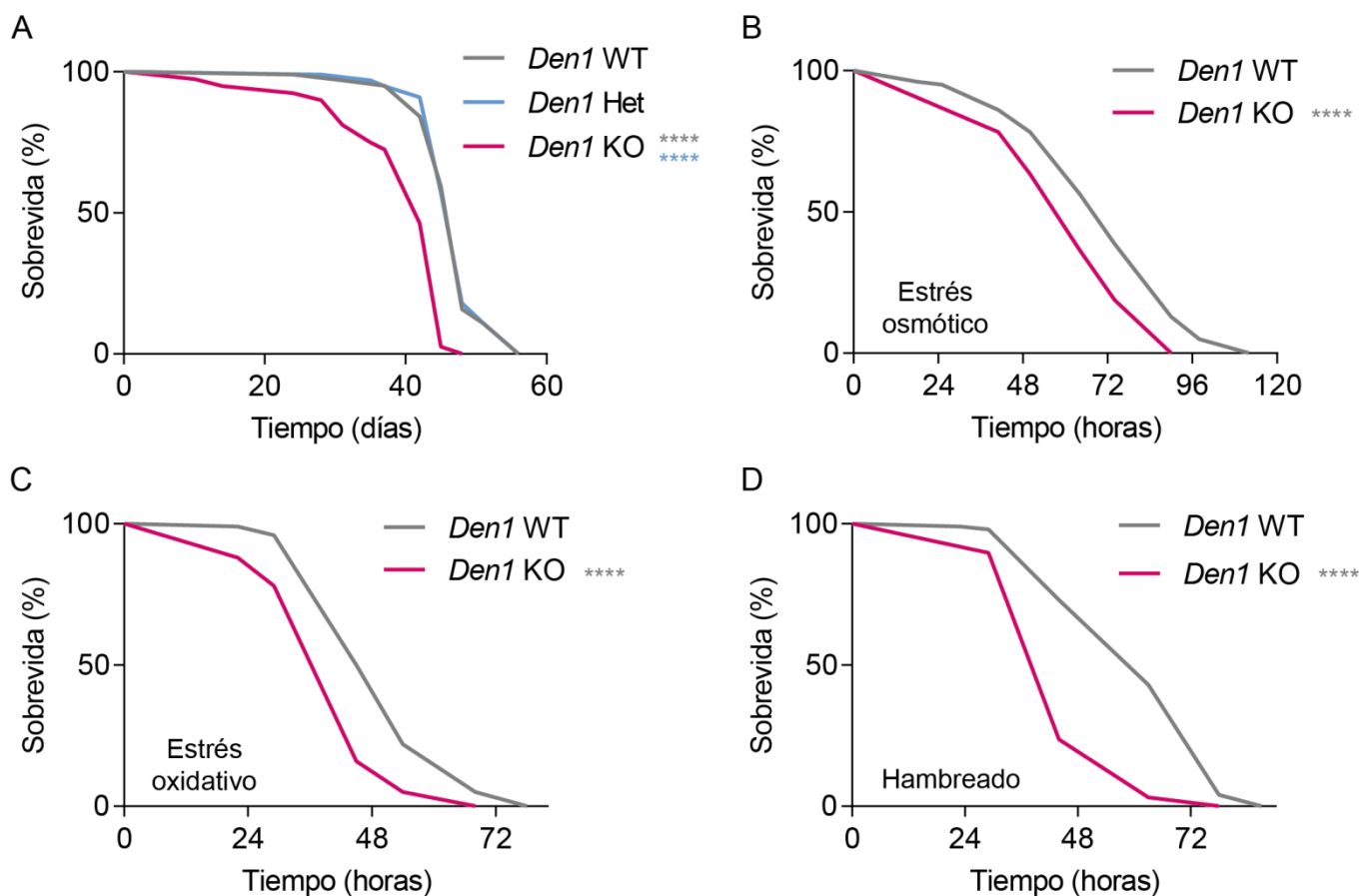


Figura R8. La delección de *Den1* disminuye la sobrevivencia de *D. melanogaster* en condiciones normales y frente a diversos estreses. Gráficos representativos de sobrevivencia de *D. melanogaster* bajo condiciones normales (A), de estrés osmótico (B), de estrés oxidativo (C) y hambreado (D). Los datos fueron analizados utilizando el test de Kaplan-Meier. El asterisco en color representa el grupo de comparación en el análisis estadístico. **** $p < 0.0001$ con *Den1* WT como línea de referencia. n entre 95 y 100. N=3.

Como la pérdida de un solo alelo de *Den1* no afecta la longevidad de las moscas (Tabla R3, Figura R8 A), continuamos explorando los efectos de *Den1* en la sobrevivencia frente a diversos estreses utilizando únicamente individuos *Den1* KO.

Genotipo	Animales	Sobrevida media	Sobrevida máx.	p valor	Cepa ref.	Réplica
<i>Den1</i> WT	95	47.66 ± 0.57	56			1
<i>Den1</i> Het	97	46.98 ± 0.64	56	0.9861	vs <i>Den1</i> WT	
<i>Den1</i> KO	94	42.26 ± 0.81	48	2.1x10 ⁻⁸	vs <i>Den1</i> WT	
<i>Den1</i> WT	98	40.01 ± 0.8	50			2
<i>Den1</i> Het	79*	40.73 ± 0.98	50	0.1452	vs <i>Den1</i> WT	
<i>Den1</i> KO	94	37.8 ± 0.79	45	0.0033	vs <i>Den1</i> WT	
<i>Den1</i> WT	98	46.83 ± 0.51	56			3
<i>Den1</i> Het	94	47.15 ± 0.46	56	0.8792	vs <i>Den1</i> WT	
<i>Den1</i> KO	80*	39.64 ± 0.95	56	0	vs <i>Den1</i> WT	

Tabla R3. Las moscas *Den1* KO viven menos que las *Den1* WT. Resumen de tres experimentos independientes de sobrevida de la mosca de la fruta bajo condiciones normales. Se analizó la sobrevida media por réplica experimental a partir de 5 viales con 17-20 moscas por genotipo. La sobrevida media se representa como la media ± SEM. La unidad de Sobrevida es días. Los datos fueron analizados utilizando el test de Kaplan-Meier. Animales: indica el N° total de animales evaluados, Cepa ref.: grupo de referencia para el análisis estadístico. *Se analizaron 4 de 5 viales únicamente.

Sometimos a moscas macho a tres condiciones de estrés y evaluamos la sobrevida en función del tiempo (Tabla R4, Figura R8 B, C y D). Los desafíos elegidos fueron: 1) Estrés osmótico, dado que los *ulp-3* KO de *C. elegans* exhibieron mayor letalidad frente a este estrés; 2) Estrés oxidativo, ya que es un tipo de estrés relevante y frecuente [144] y 3) Estrés por hambre, también frecuentemente empleado y con sentido fisiológico/etológico también [144].

Las moscas *Den1* KO sobreviven menos tiempo que las *Den1* WT frente al estrés osmótico (cloruro de sodio 4 % m/v) (Tabla R4, Figura R8 B), al estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno 5% m/v) (Tabla R4, Figura R8 C) y al hambre (Tabla R4, Figura R8 D). La sobrevida media de las moscas disminuyó entre 6 y 17 horas (alrededor del 20 %) frente a condiciones de hambre y estrés oxidativo debido a la pérdida de función de *Den1*. Bajo estrés osmótico la disminución de la sobrevida media de moscas *Den1* KO respecto de *Den1* WT osciló entre 9 y 22 horas (aproximadamente 27%) entre las distintas réplicas experimentales. Cabe destacar que la exposición de moscas durante 36 horas a los tratamientos de estrés utilizados no alteró los patrones de conjugados de Nedd8 (Figura R9).

Estrés osmótico

Genotipo	Animales	Sobrevida media	Sobrevida máx.	p valor	Réplica
<i>Den1</i> WT	100	68.38 ± 2.77	137	0	1
<i>Den1</i> KO	100	47.83 ± 1.71	124		
<i>Den1</i> WT	98	57.54 ± 2.81	136	0	2
<i>Den1</i> KO	100	35.81 ± 1.13	93		
<i>Den1</i> WT	100	72.18 ± 2.21	112	0.0001	3
<i>Den1</i> KO	99	63.58 ± 1.69	90		

Estrés oxidativo

Genotipo	Animales	Sobrevida media	Sobrevida máx.	p valor	Réplica
<i>Den1</i> WT	100	61.55 ± 1.55	98	0	1
<i>Den1</i> KO	99	45.55 ± 1.35	64		
<i>Den1</i> WT	100	54.66 ± 1.23	87	0.0003	2
<i>Den1</i> KO	100	48.85 ± 1.06	72		
<i>Den1</i> WT	100	52.37 ± 1.12	78	1.2x10 ⁻⁸	3
<i>Den1</i> KO	100	42.78 ± 1.09	68		

Hambreado

Genotipo	Animales	Sobrevida media	Sobrevida máx.	p valor	Réplica
<i>Den1</i> WT	100	64.32 ± 1.51	87	0	1
<i>Den1</i> KO	100	47.42 ± 1.12	78		
<i>Den1</i> WT	100	55.85 ± 1.17	79	0.0196	2
<i>Den1</i> KO	97	48.03 ± 1.19	79		
<i>Den1</i> WT	100	56.39 ± 1.17	77	0	3
<i>Den1</i> KO	100	43.05 ± 1.9	62		

Tabla R4. La pérdida de función de *Den1* afecta negativamente la sobrevida de *D. melanogaster* frente al estrés. Moscas fueron sometidas a estrés osmótico, oxidativo y hambreado y se analizó la sobrevida en tres experimentos independientes para cada condición. Se obtuvo la sobrevida media a partir de 5 viales con 19-20 moscas por genotipo. Se muestra el resumen de tres experimentos independientes. La sobrevida media se representa como la media ± SEM. La unidad de Sobrevida es horas. Los datos fueron analizados utilizando el test de Kaplan-Meier. Animales: indica el N° total de animales evaluados.

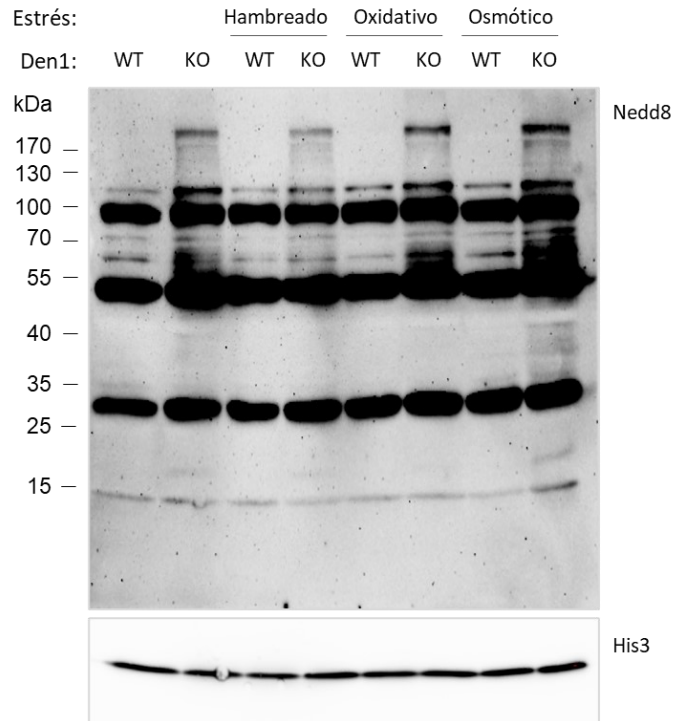


Figura R9. Los patrones de conjugados de Nedd8 no se ven alterados por el estrés en la mosca de la fruta. Western blot a partir de lisado de moscas de genotipo Den1 WT y Den1 KO sometidas durante 36 horas a distintos estreses. Se reveló contra anti-Nedd8 y anti Histona3 como control de carga.

Conclusiones

En la mosca de la fruta la falta de *Den1* provoca una disminución en el porcentaje de moscas eclosionadas a partir de cruzamientos. La interrupción del ortólogo de *Nedp1* afecta diferencialmente a *C. elegans* y *D. melanogaster* en cuanto a la longevidad bajo condiciones normales. En el gusano, la pérdida de *ulp-3* no afecta la sobrevivencia. Sin embargo, en la mosca la falta de *Den1* provoca una disminución de alrededor de 4 días en la sobrevivencia media en condiciones basales. Sin embargo, en ambos modelos animales *Nedp1* es relevante frente a condiciones de estrés ya que la sobrevivencia se ve afectada en el contexto de la pérdida de función de su ortólogo.

Capítulo III. *Nedp1* es un gen esencial en ratones

Con el fin de continuar investigando la relevancia *in vivo* de *Nedp1* pero ahora en modelos vertebrados se desarrolló una línea de ratón KO de *Nedp1* pasible de actuar como línea KO y reportera al mismo tiempo.

Generación de la línea de ratón trampa génica reportera de *Nedp1*

Obtuvimos del Consorcio Alemán de Trampas Genéticas (*Gene Trap Consortium*) un clon de células madre embrionarias murinas (ESC) que posee un *cassette* de trampa génica (β -Geo) [145] inserto en el intrón 2 del gen *Nedp1* de ratón (ENSMUS00000051705) (Figura R10). β -Geo consiste en una fusión del gen reportero β -Galactosidasa y el gen de resistencia a la Neomicina, un sitio aceptor de *splicing* (SA) y una secuencia de corte y poliadenilación (pA), flanqueada por secuencias de reconocimiento de enzimas de recombinación: secuencias *frt/f3* (para recombinación por Flipasa) y *loxP/lox5171* (para recombinación con Cre) (Figura R10). Las ESC mutantes se utilizaron para generar ratones 129P2 quiméricos mediante inyecciones de blastocitos. La generación de estos ratones se realizó en colaboración con el Dr. Ralf Kühn del Institute of Developmental Genetics del Helmholtz-Zentrum München. Los machos quiméricos se cruzaron con hembras CD1 y la transmisión germinal del alelo mutado de *Nedp1* se confirmó mediante PCR a partir de biopsias de cola de la descendencia F1 (Figura R11 A). Los ratones que heredaron la mutación son KO heterocigotas de *Nedp1* y a la vez, reporteros LacZ de *Nedp1* ya que la inserción de β -Geo interrumpe el alelo de *Nedp1* a causa del *splicing* entre el exón 2 de *Nedp1* y el aceptor de *splicing* de β -Geo, resultando en la expresión del gen reportero β -Galactosidasa bajo el promotor de *Nedp1*.

Los ratones se mantuvieron en un background genético mixto (129P2 x CD1) durante la verificación molecular de la línea KO reportera de *Nedp1*. Para determinar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de *Nedp1* se realizó la técnica RT-qPCR a partir de ARN obtenido de cerebros de ratones de 5 semanas provenientes de un apareo heterocigota de *Nedp1* (*Nedp1*^{+/-} x *Nedp1*^{+/-}). Se detectó una disminución (80% respecto de *Nedp1* WT) en la cantidad de ARNm de *Nedp1* en ratones *Nedp1* KO (*Nedp1*^{-/-}) confirmando la disrupción de *Nedp1* a causa de la inserción de la trampa génica

(Figura R11 B). La presencia de un remanente de ARNm de *Nedp1* en el ratón *Nedp1* KO podría deberse a que el sitio aceptor de *splicing* de β -Galactosidasa sea salteado durante la transcripción.

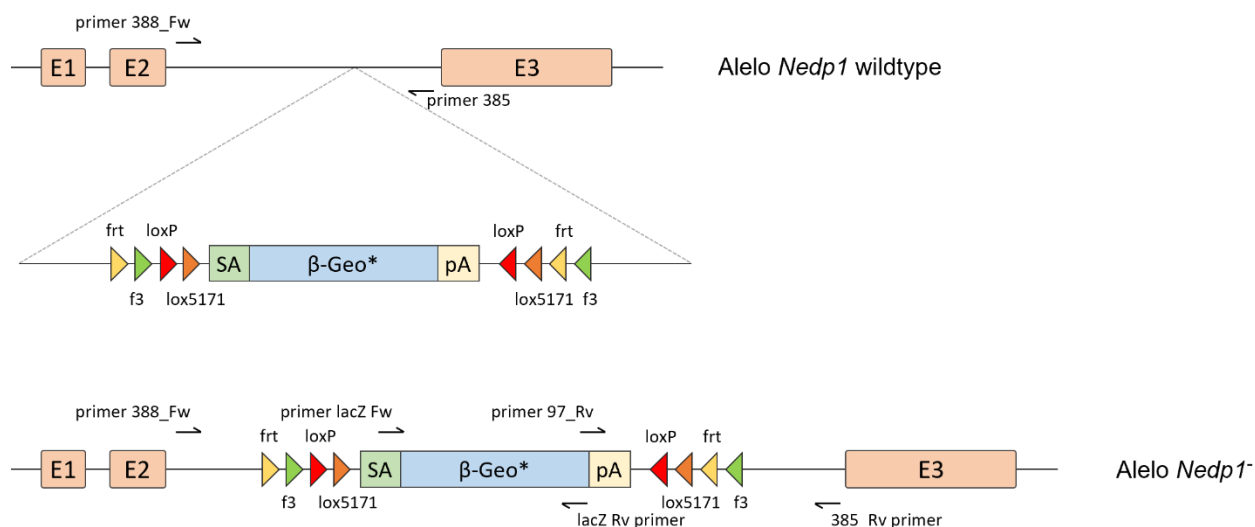


Figura R10. Generación del alelo de trampa génica de *Nedp1*. El *cassette* de trampa génica que contiene el gen reportero β -Galactosidasa fue insertado en el intrón 2 del gen *Nedp1* wildtype (ENSMUS0000051705) de ESC. El alelo resultante es el KO de *Nedp1* (*Nedp1*^{-/-}). E: exón; SA: sitio aceptor de *splicing*; β -Geo*: β -Galactosidasa más resistencia a Neomicina; pA: sitio de corte y poliadenilación.

Como se mencionó en la sección 3.1 de la introducción, la pérdida de función de *Nedp1* provoca una acumulación de sustratos conjugados a Nedd8 y una disminución en los niveles de Nedd8 libre que se evidencia mediante WB [104-107]. Utilizamos esta propiedad para continuar con la validación de la línea generada. Evaluamos los patrones de conjugados de Nedd8 en distintos tejidos de ratones *Nedp1*^{+/+} (*Nedp1* WT), *Nedp1*^{+/-} (*Nedp1* Het) y *Nedp1*^{-/-} (*Nedp1* KO) mediante WB (Figura R12). Se corroboró el aumento de conjugados de Nedd8 en cerebro, hígado y bazo de ratones *Nedp1* KO respecto de *Nedp1* WT. En los tejidos de *Nedp1* Het no se registró un aumento en los conjugados de Nedd8 sugiriendo la haplosuficiencia de *Nedp1* en este contexto. Los anticuerpos anti-*Nedp1* comerciales disponibles son inespecíficos por lo cual el anticuerpo anti-*Nedp1* que utilizamos fue donado por el laboratorio de Ron Hay. En WB este anticuerpo permite distinguir una banda correspondiente al peso molecular predicho de *Nedp1* (~25 kDa) en tejidos de ratones *Nedp1* wildtype y heterocigotas por debajo de una banda inespecífica, que se encuentra en todas las muestras

analizadas. A su vez, en la mayoría de los WB se puede detectar la disminución de Nedd8 libre a causa de la pérdida de función de Nedp1 (Figura R12).

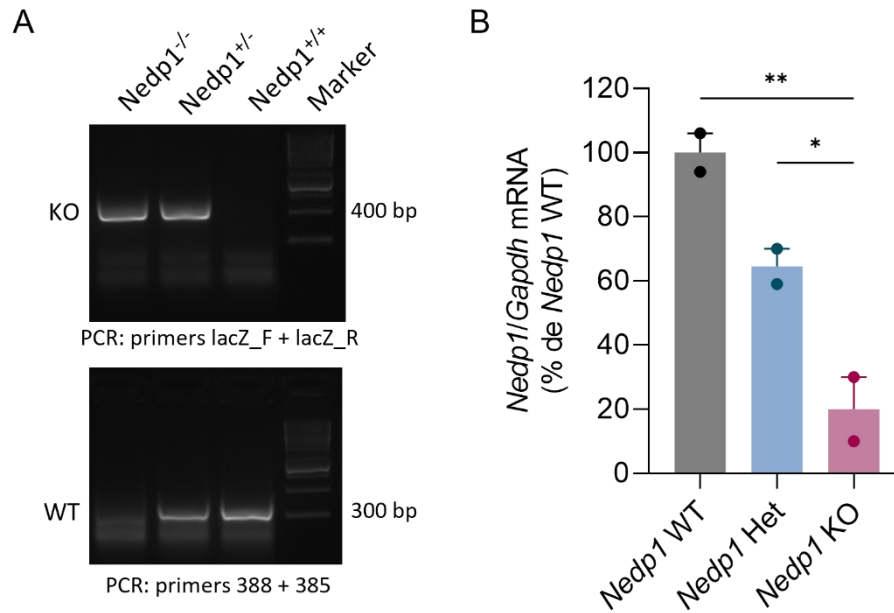


Figura R11. Validación de la línea de ratón KO reportera de *Nedp1*. **A.** Genotipado representativo de biopsia de cola de ratones de la línea KO reportera de *Nedp1*. **B.** Análisis de expresión de ARNm de *Nedp1* en cerebro de ratones *Nedp1*^{+/-} (*Nedp1* WT), *Nedp1*^{+/-} (*Nedp1* Het) y *Nedp1*^{-/-} (*Nedp1* KO) mediante RT-qPCR. El ARNm de *Nedp1* fue normalizado al de *Gapdh* y se expresa como porcentaje de *Nedp1* WT. Se realizaron triplicados técnicos. Las secuencias de los *primers* utilizados se encuentran en la Tabla M5. Los datos se representan como la media ± SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 factor seguido de comparación múltiple de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01. n = 2.

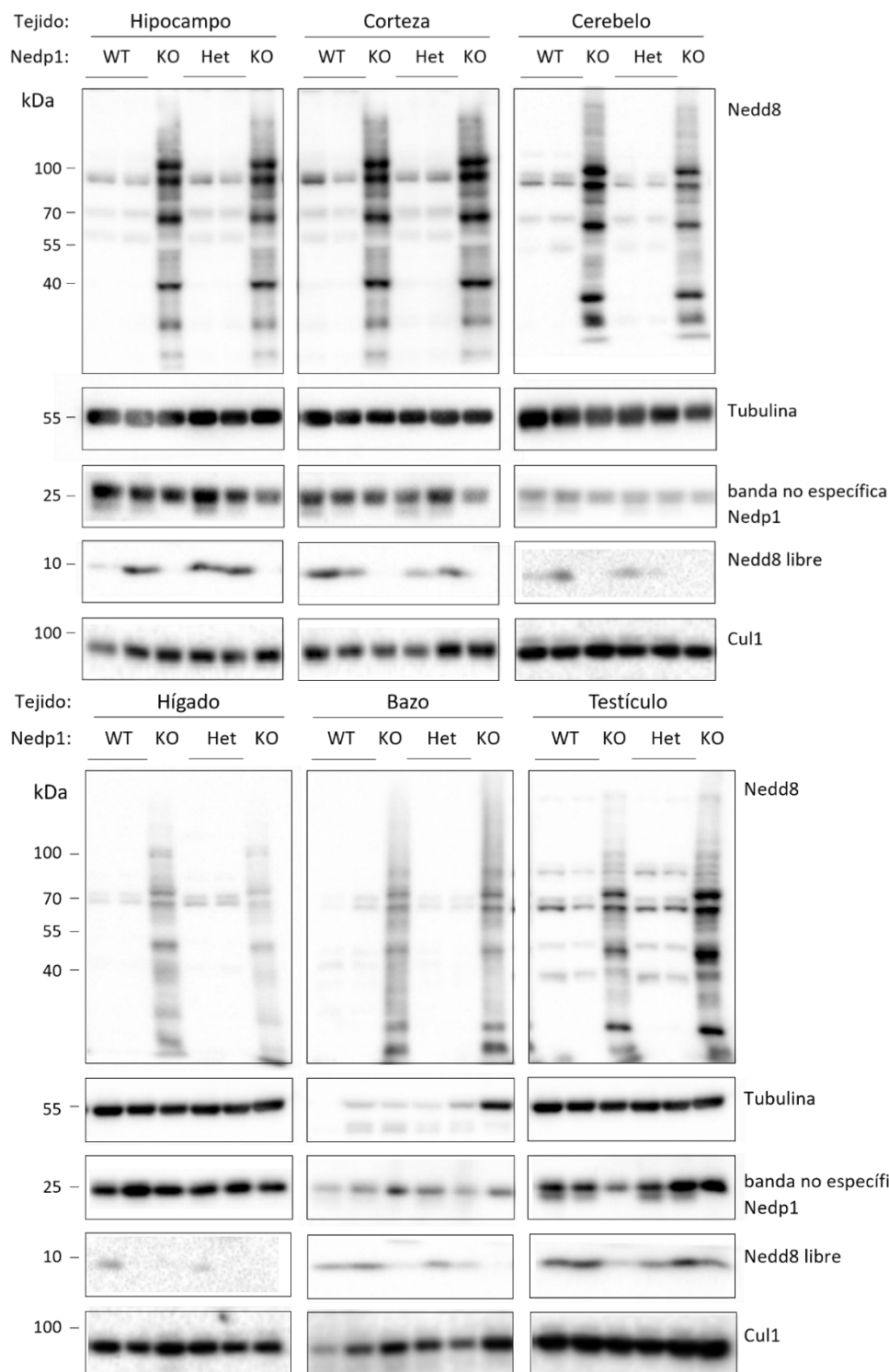


Figura R12. Validación molecular del ratón KO reportero de *Nedp1*. Se evidencia la acumulación de conjugados de Nedd8 en cerebro, hígado, bazo y testículo en ratones *Nedp1* KO debido a la pérdida de función de la enzima Nedp1. Se extrajo proteína de tejidos de ratones con background genético mixto de 5 semanas de edad y se realizaron WB. Se reveló contra Nedd8, Culina 1 (Cul1), Nedp1 y Tubulina, como control de carga. El anticuerpo anti-Nedp1 detecta una banda inespecífica por encima de la banda específica de Nedp1.

La línea KO reportera de *Nedp1* generada fue validada a nivel genético por PCR (Figura R11 A), a nivel de expresión génica por RT-qPCR (Figura R11 B) y a nivel proteico (Figura R12) en un background genético mixto (129P2 x CD1). Podemos confirmar que los ratones *Nedp1* KO presentan pérdida de función de *Nedp1*.

La pérdida de función de *Nedp1* es subletal en ratones con *background* genético mixto

Bajo un background genético mixto (129P2 x CD1), la proporción de ratones *Nedp1* KO obtenidos en la descendencia es significativamente menor a la esperada: únicamente un 5.93 % a partir de cruzamientos heterocigotas y 21.33% cuando el apareo es heterocigota por *Nedp1* KO (Tabla R5). Los ratones *Nedp1* KO que nacen son más pequeños y pesan menos que los *Nedp1* WT y *Nedp1* Het de su misma camada (Figura R13).

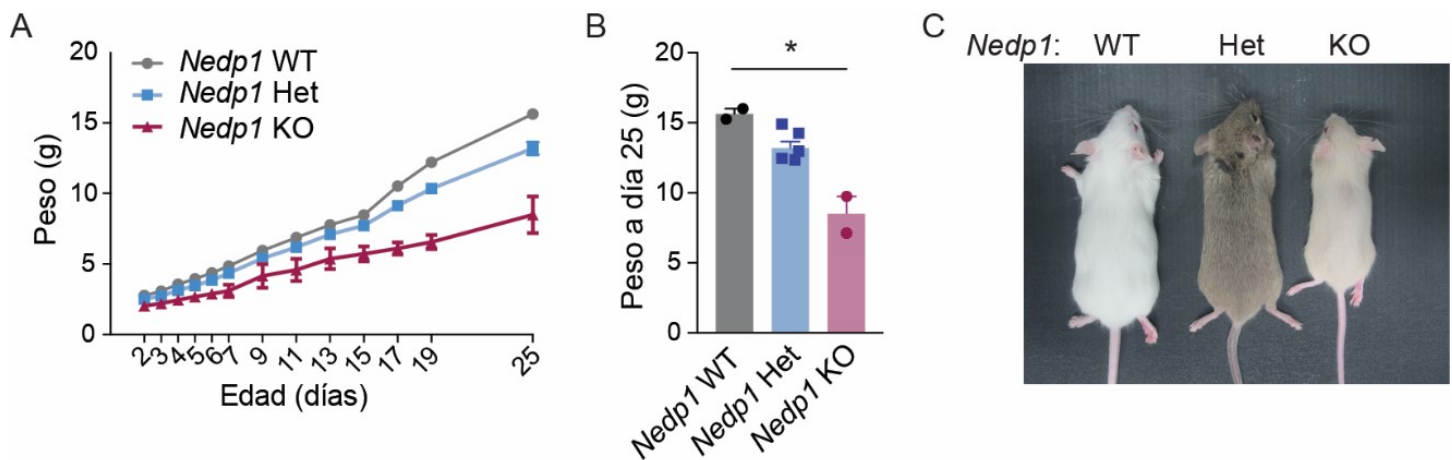


Figura R13. La falta de *Nedp1* da lugar a ratones con menor peso y tamaño corporal en un background genético mixto. Para el análisis se determinó el peso corporal de ratones provenientes de cruzamientos heterocigotas de *Nedp1* (*Nedp1* Het X *Nedp1* Het). **A.** Se registraron los pesos de ratones macho de una misma camada a lo largo del tiempo a partir del día post natal 2. **B.** Gráfico de peso de ratones macho a los 25 días de edad. **C.** Foto de ratones macho representativos de cada genotipo. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado en (B) fue ANOVA de 1 factor seguido de comparación múltiple de Tukey. * $p < 0.05$. $n = 1-5$ ratones por genotipo.

Descendencia de <i>Nedp1</i> ^{+/-} x <i>Nedp1</i> ^{+/-}	Observado		Esperado ^a	X ² test ^b
	Nº de animales	%	%	
<i>Nedp1</i> ^{+/+}	280	48,87	25	216.5, p < 0.0001
<i>Nedp1</i> ^{+/-}	259	45,20	50	
<i>Nedp1</i> ^{-/-}	34	5,93	25	
Total	573	100	100	

Descendencia de <i>Nedp1</i> ^{+/-} x <i>Nedp1</i> ^{-/-}	Observado		Esperado ^a	X ² test ^b
	Nº de animales	%	%	
<i>Nedp1</i> ^{+/+}	0	0	0	24.65, p < 0.0001
<i>Nedp1</i> ^{+/-}	59	78,67	50	
<i>Nedp1</i> ^{-/-}	16	21,33	50	
Total	75	100	100	

Tabla R5. La pérdida de *Nedp1* es subletal en ratones con un background genético mixto. Número y porcentaje de animales por genotipo obtenidos a partir de cruzamientos heterocigotas y de heterocigotas por homocigotas *knockout*. ^aPorcentaje esperado asumiendo proporciones de herencia Mendeliana. ^b Test de Chi-cuadrado comparando los porcentajes esperados con los observados.

***Nedp1* se expresa en todas las células del cerebro**

Como establecimos previamente, *Nedp1* se expresa en el cerebro ya que se observa un aumento en los sustratos conjugados a Nedd8 en este órgano en ratones carentes de *Nedp1* funcional (Figura R12). Nos preguntamos entonces cual sería la distribución espacial de la proteína en el cerebro. Con ese fin nos propusimos primero realizar inmunohistoquímica (IHQ) contra *Nedp1* en cortes de cerebro. Sin embargo, como se discutió antes los anticuerpos comerciales son inespecíficos y el único anticuerpo útil es el desarrollado por el laboratorio del Dr. Ron Hay, con el que igualmente en WB la banda preponderante detectada es inespecífica (Figura R12). Por estas razones técnicas nos vimos obligados a descartar la IHQ para el mapeo de la localización cerebral. Para resolver este inconveniente, nos valimos del gen reportero LacZ, que codifica la enzima β -Galactosidasa, incluido en el *cassette* β -Geo del alelo *Nedp1*⁻ (Figura R10). La β -Galactosidasa es capaz de hidrolizar X-Gal, un análogo a la lactosa, derivando en un producto azul insoluble [146]. En ratones de 8 semanas, observamos que *Nedp1* se expresa de manera ubicua en todas las áreas del cerebro (Figura R14). Las

regiones de azul más intenso coinciden con zonas de mayor densidad de somas por lo que no pareciera haber una expresión diferencial de *Nedp1*.

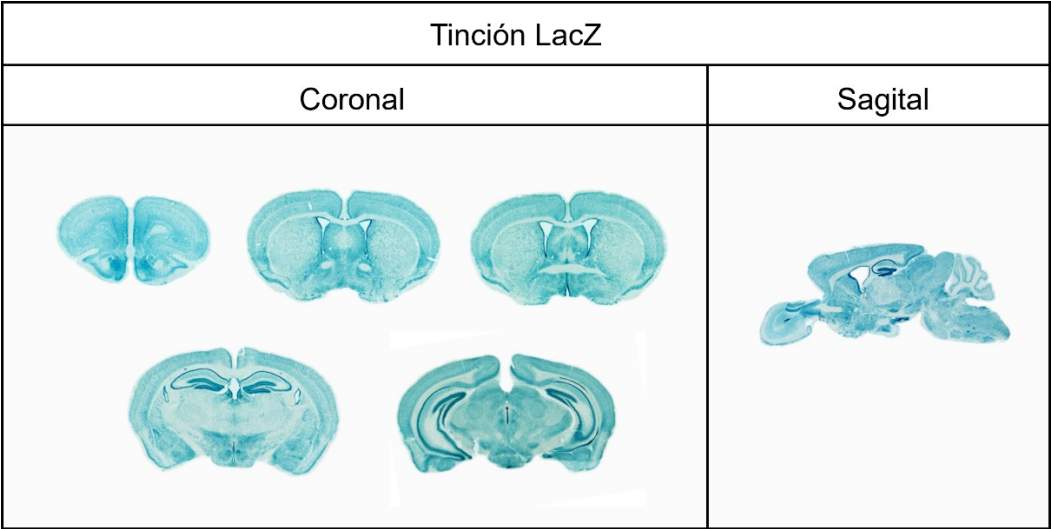


Figura R14. *Nedp1* se expresa en todas las células del cerebro. Los ratones *Nedp1* KO heterocigotas (*Nedp1*^{+/-}) poseen el gen reportero LacZ, que codifica la enzima β-Galactosidasa, bajo el promotor de *Nedp1*. Se incubaron cortes coronales y sagitales de cerebros de ratones de 8 semanas de edad con X-Gal. Las células que expresan la enzima β-Galactosidasa se tiñen de azul por la degradación de X-Gal.

La pérdida de función de *Nedp1* es letal en ratones C57LB/6

Como se mencionó antes, la línea *Nedp1* se obtuvo en un *background* 129P2 x CD1. Para evitar sesgos debidos a la influencia de variantes alélicas diferenciales en individuos de *background* mixto, se realizaron 10 retrocruzas de la línea KO reportera de *Nedp1* con la cepa endocriada C57BL/6 con el fin de llevar la línea a un *background* genético homogéneo. Utilizamos embriones E19.5 para validar la línea mediante WB y efectivamente, se observa una acumulación de conjugados de Nedd8 en corazón, hígado y cerebro de ratones *knockout* homocigotas de *Nedp1* (Figura 15 B). Sorprendentemente, en un *background* C57BL/6, todos los ratones *Nedp1* KO mueren a día post natal 0 (Tabla R6). Sin embargo, en estadios embrionarios la distribución de genotipos es la esperada según proporciones mendelianas clásicas (Tabla R6). Esto indicaría que *Nedp1* se vuelve esencial en el ratón en alguna etapa del desarrollo del ratón alrededor del día de nacimiento.

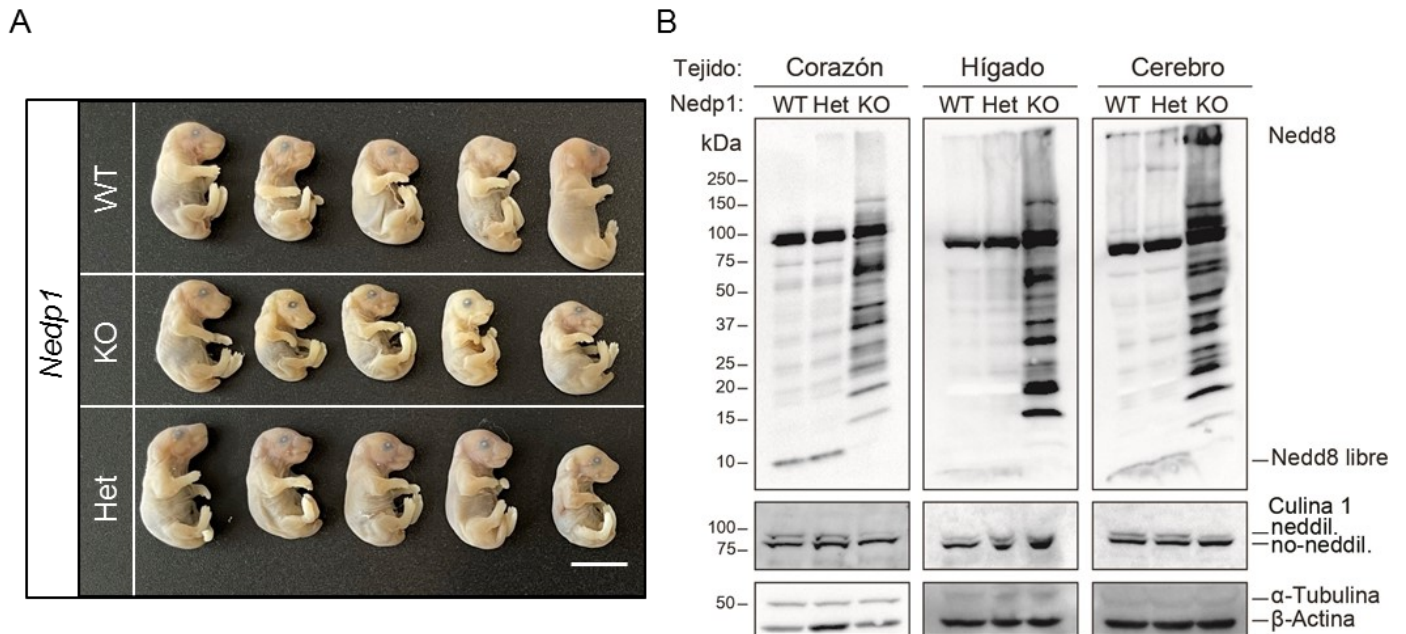


Figura R15. Validación molecular del ratón *Nedp1* KO en background C57BL/6. **A.** Foto de embriones de día gestacional 19.5 *Nedp1* WT, KO y heterocigotas. **B.** Se realizaron WB a partir de tejido de corazón, hígado y cerebro de embriones E16.5 y fueron revelados con anticuerpos anti- Nedd8, Culina 1, Tubulina y Actina, estos dos últimos como control de carga.

Descendencia de <i>Nedp1</i> ^{+/-} x <i>Nedp1</i> ^{+/-}	Observado		Esperado ^a	X ² test ^b
	Nº de animales	%	%	
<i>Nedp1</i> ^{+/+}	164	41.84	25	147.7 p < 0.0001
<i>Nedp1</i> ^{+/-}	228	58.16	50	
<i>Nedp1</i> ^{-/-}	0	0	25	
Total	392	100	100	

Embriones de <i>Nedp1</i> ^{+/-} x <i>Nedp1</i> ^{+/-}	Observado		Esperado ^a	X ² test ^b
	Nº de animales	%	%	
<i>Nedp1</i> ^{+/+}	26	27.37	25	0.8526 p = 0.6529
<i>Nedp1</i> ^{+/-}	43	45.26	50	
<i>Nedp1</i> ^{-/-}	26	27.37	25	
Total	95	100	100	

Tabla R6. El ratón *Nedp1* KO es letal en el background homogéneo C57BL/6. Número y porcentaje de animales adultos y embrionarios por genotipo a partir de cruzamientos heterocigotas. ^a Porcentaje esperado asumiendo proporciones de herencia Mendeliana. ^b Test de Chi-cuadrado comparando los porcentajes esperados con los observados.

Conclusiones

En este capítulo se estableció y validó el ratón KO reportero de *Nedp1* y se comparó la viabilidad de esta línea en dos contextos genéticos. Como era de esperar para una vía que tiene una expresión ubicua, encontramos que *Nedp1* se expresa en todos los tejidos testeados: cerebro, hígado, bazo, corazón y testículos (Figura R12 y R15 B) ya que, en su ausencia, provoca una acumulación de sustratos neddilados en ambos *backgrounds* genéticos tanto en el ratón adulto (Figura R12) como en embriones (Figura R15 B). A su vez, a través del gen reporteo pudimos establecer que *Nedp1* está presente en todas las células del cerebro de ratones de 8 semanas (Figura R14).

En este trabajo mostramos que en un contexto genético heterogéneo de la línea exocriada (129P2 x CD1) únicamente un pequeño porcentaje de ratones que expresan una versión de *Nedp1* truncada son viables (Tabla R5) y que estos presentan defectos en tamaño y peso corporal (Figura R13 y Tabla R5). Sin embargo, en la línea endocriada C57BL/6, los ratones *Nedp1* KO mueren indefectiblemente a día 0 post natal (Tabla R6). Como se mencionó previamente, hay una expresión residual de *Nedp1* en los ratones KO (Figura R11 B). Es posible que en bajo el *background* exocriado se den combinaciones alélicas que, junto con la expresión residual de *Nedp1*, compensen la letalidad.

Podemos decir que *Nedp1* es un gen subletal en ratones bajo un *background* heterogéneo y letal en una cepa endocriada como C57BL/6 sugiriendo que la neddilación independiente de Culinas (que es controlada por *Nedp1*) cumpliría también un rol esencial en el desarrollo murino.

Capítulo IV. La depleción de *Nedp1* provoca alteraciones morfológicas en el cerebro de ratón

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se estableció que la neddilación de sustratos diferentes a las Culininas afecta el desarrollo neuronal y la formación de espinas dendríticas [33, 79]. Dado que *Nedp1* es la deneddilasa de sustratos no Culininas y, como reportamos en este trabajo, se expresa de manera ubicua en el cerebro, hipotetizamos que puede tener un rol fisiológico relevante en el sistema nervioso. Para explorar esta hipótesis, realizamos ensayos en cultivos primarios de neuronas y desarrollamos la línea de ratón KO condicional de *Nedp1* a partir de la línea KO reportera de *Nedp1*.

Nedp1 afecta la arborización dendrítica de neuronas hipocampales en cultivo

Nos propusimos evaluar el rol de *Nedp1* sobre el desarrollo de neuronas en cultivo. Para ello, se transfectaron neuronas hipocampales de ratón E16.5 antes de plaquear con RNA guías *Nedp1* y Cas9 junto con GFP para *knockear* el gen de *Nedp1*. En total se transfectaron 3 ug de ADN y las neuronas control se transfectaron con el vector pcDNA3 y GFP únicamente. No se observaron diferencias en el desarrollo temprano ni intermedio de neuronas *Nedp1* KO. A DIV21 las neuronas fueron fijadas, se realizó una inmunohistoquímica anti-GFP y analizó la arborización dendrítica mediante Sholl análisis. Las neuronas *Nedp1* KO presentan una disminución en la arborización dendrítica a DIV21 (Figura R16).

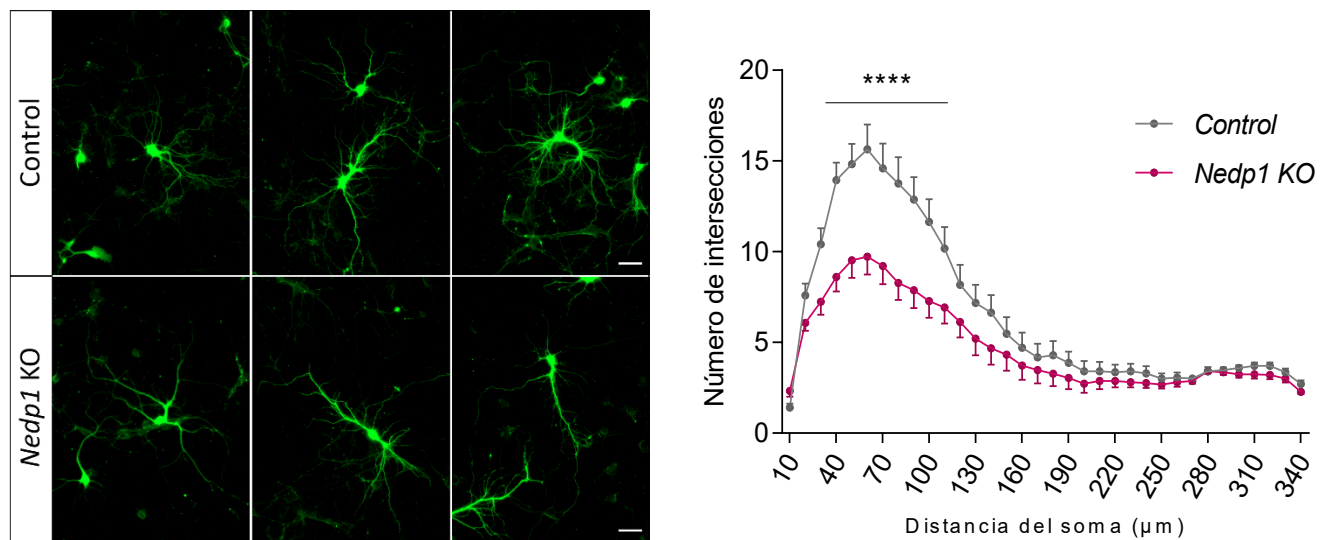


Figura R16. Nedp1 afecta la arborización dendrítica de neuronas en cultivo a DIV21. Se transfectaron neuronas hipocámpales de ratón con ARN guías Nedp1, Cas9 y GFP (*Nedp1* KO) o GFP (Control) antes de plaquear. A DIV21 se fijaron las células y se realizó una inmunohistoquímica anti-GFP. Se muestran fotos representativas de neuronas *Nedp1* KO y Control y un gráfico de complejidad de arborización dendrítica. Las barras de escala representan 50 µm. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Bonferroni. Hay un efecto significativo del genotipo sobre el número de intersecciones ($p = 0.0098$). **** $p < 0.0001$. $n = 17-25$ neuronas provenientes de 2 experimentos independientes.

Obtención de la línea de ratón KO condicional de *Nedp1*

Con el objeto de obtener una línea KO condicional de *Nedp1*, se cruzaron ratones C57BL/6 heterocigotas de la línea KO reportera de *Nedp1* (portadores del alelo *Nedp1*⁻) con la línea FLPo, que expresa una variante de la recombinasa Flipasa (FLP), bajo el promotor del gen ROSA [129]. En la descendencia de este cruzamiento se obtuvo el alelo *Nedp1*^{flx} (Figura R17). Este alelo posee el *cassette* β -Geo invertido, y por ende no funcional, flanqueado por sitios consenso loxP/lox5171 de la recombinasa Cre. La línea *Nedp1*^{flx} se combinó con la línea *Nestin-Cre* [130], generando ratones KO condicionales de *Nedp1* en los derivados del tubo neural, fundamentalmente neuronas, astrocitos y oligodendrocitos donde el *cassette* β -Geo fue invertido nuevamente generando la versión truncada de la enzima *Nedp1* (Figura R17). Los ratones homocigotas para el alelo *Nedp1*^{flx} que no poseen Cre

(*Nedp1^{flx/flx}*) fueron denominados *Nedp1* floxed y los KO condicionales (*Nedp1^{flx/flx}; Nestin-Cre*) *Nedp1* CKO. En la figura R18 se muestra un genotipado de ratones de la línea KO condicional de *Nedp1*.

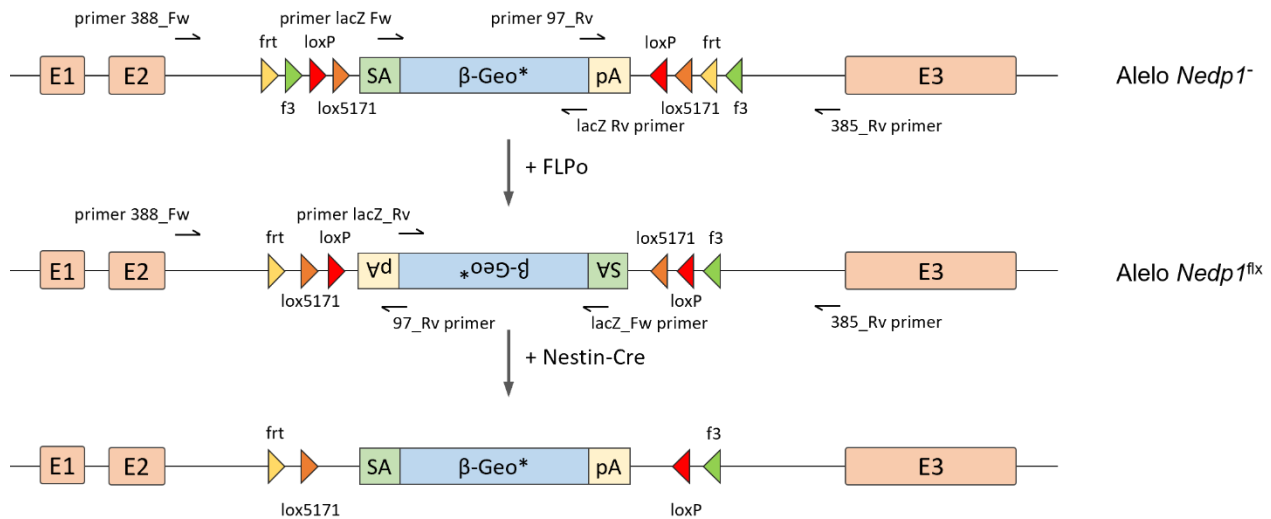


Figura R17. Desarrollo de la línea de ratón *Nedp1* floxed. Ratones portadores del alelo *Nedp1⁻* fueron cruzados con la línea FLPo. El evento de recombinación resultante da lugar al alelo *Nedp1^{flx}* en células germinales y, por ende, este alelo se transmite a la descendencia. El alelo *Nedp1^{flx}* posee el gen reportero β -Geo invertido flanqueado por sitios loxP/lox5171 para la recombinasa Cre. En presencia de Cre, el alelo *Nedp1^{flx}* sufre un evento de recombinación que deriva en la inversión de β -Geo nuevamente disruptiendo el gen de *Nedp1*. E: exón; SA: sitio aceptor de *splicing*; β -Geo*: β -Galactosidasa más resistencia a Neomicina; pA: sitio de corte y poliadenilación.

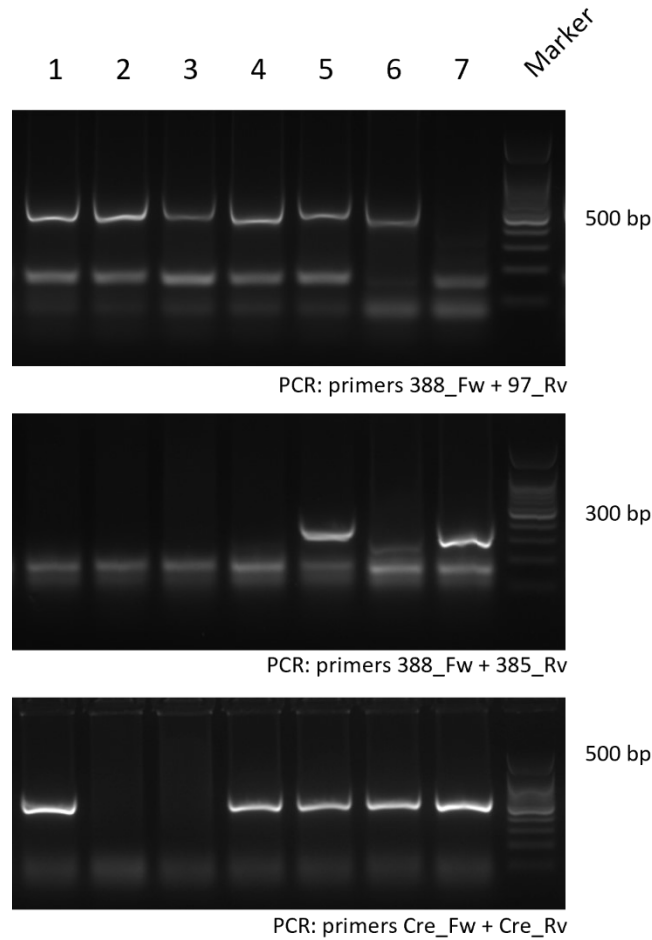


Figura R18. Genotipado representativo de la línea KO condicional de *Nedp1*. Se muestra el genotipado a partir de biopsia de oreja de siete ratones. El par de *primers* 388_Fw + 97_Rv amplifica el alelo *Nedp1^{flx}* (Figura R17), el par 388_Fw + 385_Rv amplifica el alelo *Nedp1 wildtype* (Figura R10) y el par Cre_Fw + Cre_Rv amplifica el gen Nestin-Cre (las secuencias de los *primers* utilizados se encuentra en la Tabla M2). Los genotipos de los ratones son los siguientes: 1) *Nedp1^{flx/flx}; Nestin^{+/Cre}* (*Nedp1* CKO), 2) *Nedp1^{flx/flx}* (*Nedp1* floxed), 3) *Nedp1^{flx/flx}*, 4) *Nedp1^{flx/flx}; Nestin^{+/Cre}*, 5) *Nedp1^{+/flx}; Nestin^{+/Cre}* (*Nedp1* CHet), 6) *Nedp1^{flx/flx}; Nestin^{+/Cre}* y 7) *Nedp1^{+/+}; Nestin^{+/Cre}* (*Nestin-Cre*).

Para validar molecularmente la línea obtenida generamos extractos proteicos de diversos tejidos y realizamos WB utilizando anticuerpos anti-Nedd8. Observamos una acumulación de conjugados de Nedd8 en tejidos de cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) de ratones *Nedp1* CKO respecto de *Nedp1* floxed (Figura R19), mientras que en hígado y bazo no hay diferencias en los niveles de neddilación entre genotipos (Figura R19). Este resultado confirma que la pérdida de función de *Nedp1* ocurrió únicamente en derivados del tubo neural y no en otros tejidos, validando molecularmente el modelo.

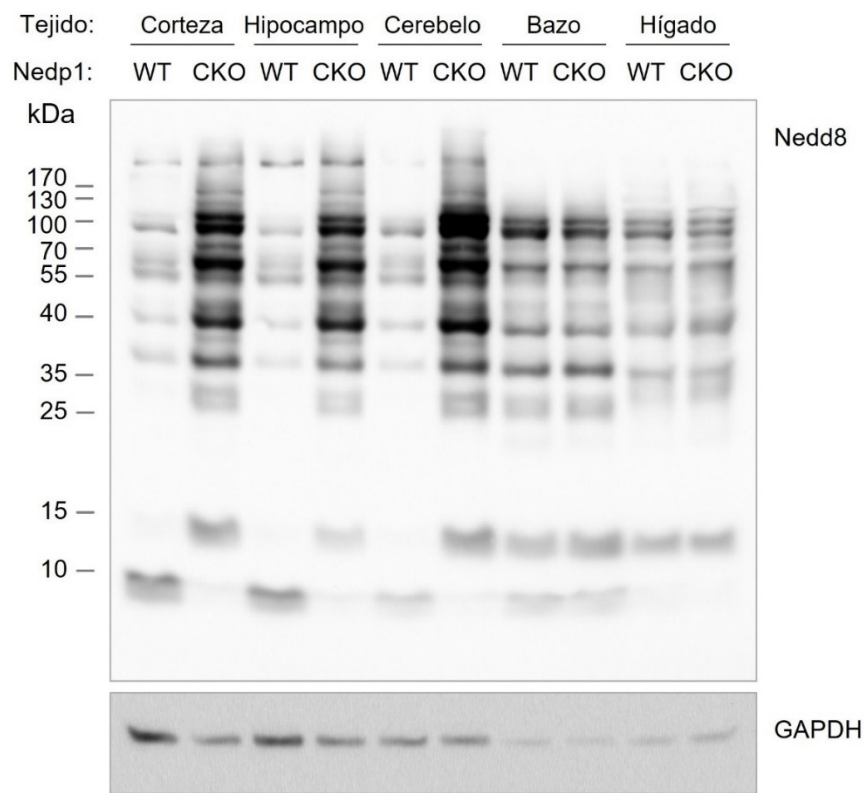


Figura R19. Validación molecular del ratón *Nedp1* CKO. La depleción de Nedp1 en células derivadas del tubo neural se evidencia por el aumento de conjugados de Nedd8 en tejido de cerebro de ratón. Se muestra un Western blot representativo de tejidos derivados de ratones *Nedp1* WT y *Nedp1* CKO revelado contra Nedd8 y contra GAPDH como control de carga.

Los ratones *Nedp1* CKO son viables y fértiles, por ende, podemos decir que el fenotipo de letalidad observado en el ratón *Nedp1* KO no es debido a la pérdida de función de *Nedp1* únicamente en células derivadas del tubo neural. Observamos que tanto en machos como hembras los *Nedp1* CKO pesan menos que los *Nedp1* floxed (Figura R20). La disminución en el peso de ratones portadores de *Nestin-Cre* ha sido reportada previamente [147-149]. Para entender si la diferencia en el peso observada se debe a la pérdida de función de Nedp1 y/o a la expresión de Cre bajo el promotor Nestin, comparamos el peso de ratones *Nestin-Cre*, *Nedp1* floxed, *Nedp1* CHet (*Nedp1*^{+/flx}; *Nestin*^{+/Cre}) y *Nedp1* CKO de 8 semanas de edad (Figura R20). No se observaron diferencias entre los ratones que expresan Cre pero sí entre estos y los ratones *Nedp1* floxed en machos (21.4 ± 0.51 g *Nestin-Cre*, 21.6 ± 0.25 g *Nedp1* CHet, 20.8 ± 0.43 g *Nedp1* CKO, 27.85 ± 0.49 g *Nedp1* floxed) y en hembras (17.4 ± 0.24 g *Nestin-Cre*, 18.11 ± 0.31 g *Nedp1* CHet, 18.07 ± 0.46 g *Nedp1* CKO, 21.24 ± 0.36 g *Nedp1* floxed). Estos

resultados indican que la pérdida de peso en los ratones se debe a la expresión del transgén *Nestin-Cre* y no a la pérdida de función de *Nedp1*.

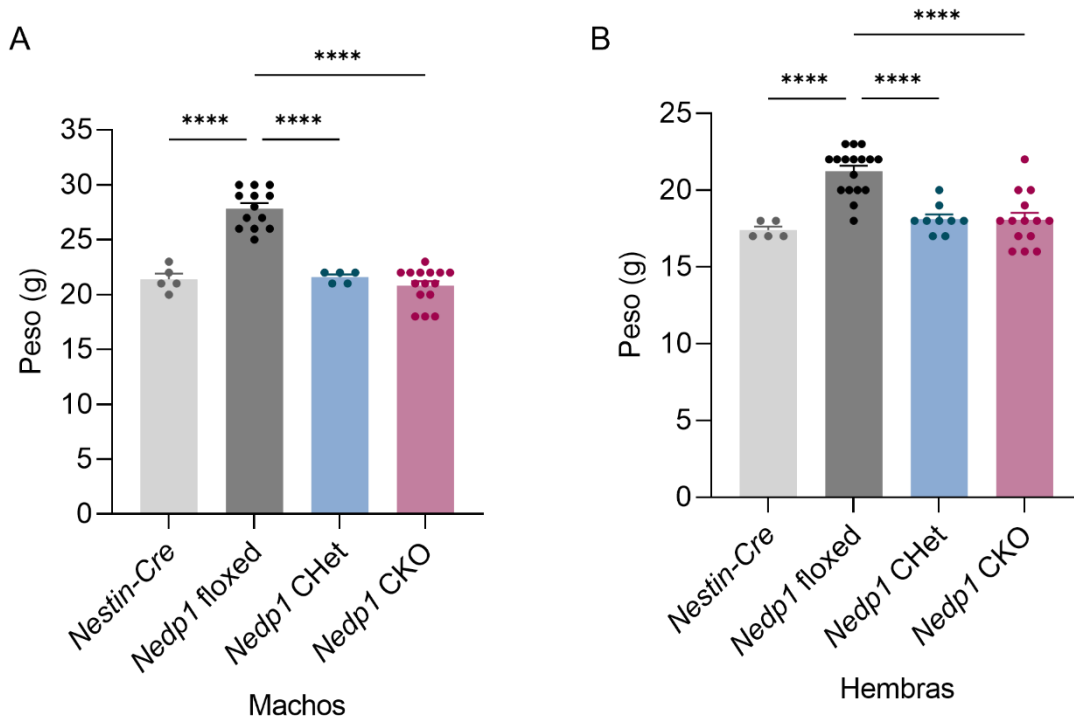


Figura R20. La expresión de *Nestin-Cre* provoca una reducción del peso corporal en ratones. Se registró el peso corporal de ratones de 8 semanas de edad. **A.** Gráfico de peso de machos. **B.** Gráfico de peso de hembras. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 factor seguido de comparación múltiple de Tukey. **** $p < 0.0001$. $n = 5-18$ ratones por genotipo.

Los cerebros que carecen de *Nedp1* funcional son más pequeños con ventrículos laterales agrandados

Para continuar con la caracterización del ratón *Nedp1* CKO, cuantificamos el área de cerebros perfundidos de ratones de 12 semanas. Encontramos una disminución significativa en el área del cerebro de ratones *Nedp1* CKO comparados no solo contra sus controles floxeados sino también contra la línea condicional heterocigota ($125.3 \pm 2.04 \text{ mm}^2$ *Nedp1* floxed, $113.1 \pm 1.8 \text{ mm}^2$ *Nedp1* CHet, $98.54 \pm 1.62 \text{ mm}^2$ *Nedp1* CKO; ANOVA 1 un factor, $p < 0.0001$; Figura R21).

Estudios previos demostraron que la línea *Nestin-Cre* presenta alteraciones fenotípicas como la disminución en el tamaño y peso corporal, hipopituitarismo y anomalías comportamentales, aunque

existen controversias sobre los mecanismos moleculares subyacentes [147-149]. Por esta razón incluimos el ratón Nestin-Cre como grupo experimental adicional en ciertos ensayos. Para corroborar que el efecto de la disminución en el tamaño del cerebro se debe a la pérdida de función de *Nedp1* y no a la expresión de *Nestin-Cre* analizamos cortes coronales de cerebros de ratones de 12 semanas (Figura R22). Tomamos 5 secciones de referencia según la distancia a Bregma (mm): 2.34, 0.98, -0.22, -2.06 y -3.08 y cuantificamos el área total (Figura R22). Los cortes de cerebro de *Nestin-Cre* no presentan diferencias significativas en el área total con respecto a *Nedp1* floxed en ninguna de las secciones analizadas, mientras que el área de los cortes de *Nedp1* CKO es significativamente menor a *Nedp1* floxed en 4 de las 5 secciones estudiadas, y menor a la de *Nestin-Cre* en todas las secciones analizadas (Figura R22 B y C). Por lo tanto, podemos concluir que la pérdida de función de *Nedp1* en células derivadas del tubo neural, y no la presencia del transgén *Nestin-Cre*, provoca una disminución en el tamaño del cerebro.

Una reducción en el tamaño cerebral puede ser secundaria a trastornos en el neurodesarrollo o a fenómenos neurodegenerativos que reducen la masa encefálica. Típicamente, estos fenómenos suelen acompañarse de incrementos en el tamaño de los ventrículos cerebrales [150-152]. Por lo tanto, determinar su tamaño es una manera indirecta pero independiente de investigar la influencia de la delección de *Nedp1* en el desarrollo neural. Por ello, cuantificamos el área relativa de los ventrículos laterales en secciones coronales a 0.98 mm de Bregma, observamos que en ratones *Nedp1* CKO los ventrículos son significativamente mayores que en *Nedp1* floxed (Figura R23 A, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones de Tukey: *Nedp1* floxed vs *Nedp1* CKO, $p < 0.0001$). No encontramos diferencias en este parámetro entre los genotipos *Nedp1* floxed, *Nedp1* CHet y *Nestin-Cre* (Figura R23 A), por lo cual el aumento del tamaño de ventrículos laterales en ratones *Nedp1* CKO es atribuible a la pérdida de función de *Nedp1*. No se observaron diferencias en el espesor de la corteza relativo al área total de la sección coronal entre genotipos (Figura R23 C), sin embargo, hay una disminución significativa en el área relativa del estriado dorsal de *Nedp1* CKO respecto de *Nedp1* floxed (Figura R23 B, 23.76 ± 0.67 % *Nedp1* floxed, 19.44 ± 1 % *Nedp1* CKO, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones de Tukey: *Nedp1* floxed vs *Nedp1* CKO, $p = 0.0047$). Esta disminución en el área relativa del estriado podría contribuir al mayor tamaño de ventrículos en el cerebro de ratones carentes de *Nedp1* funcional.

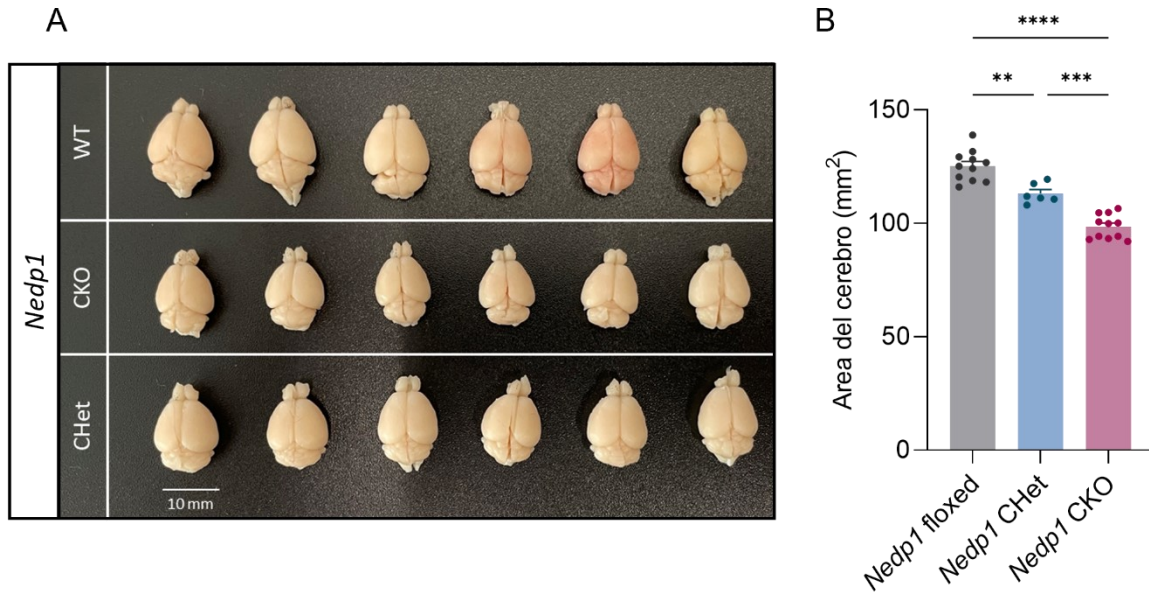


Figura R21. Los cerebros de ratones *Nedp1* CKO son más pequeños (parte 1). Cerebros de ratones de 12 semanas de edad fueron perfundidos y fijados para posterior procesamiento y análisis. **A.** Foto de cerebros enteros desde punto de vista dorsal de ratones *Nedp1* floxed (WT), *Nedp1* CKO (CKO) y *Nedp1* CHet (CHet). **B.** Gráfico de la cuantificación del área de los cerebros. La barra de escala representa 10 mm. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 factor seguido de comparación múltiple de Tukey. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 5$ cerebros por genotipo.

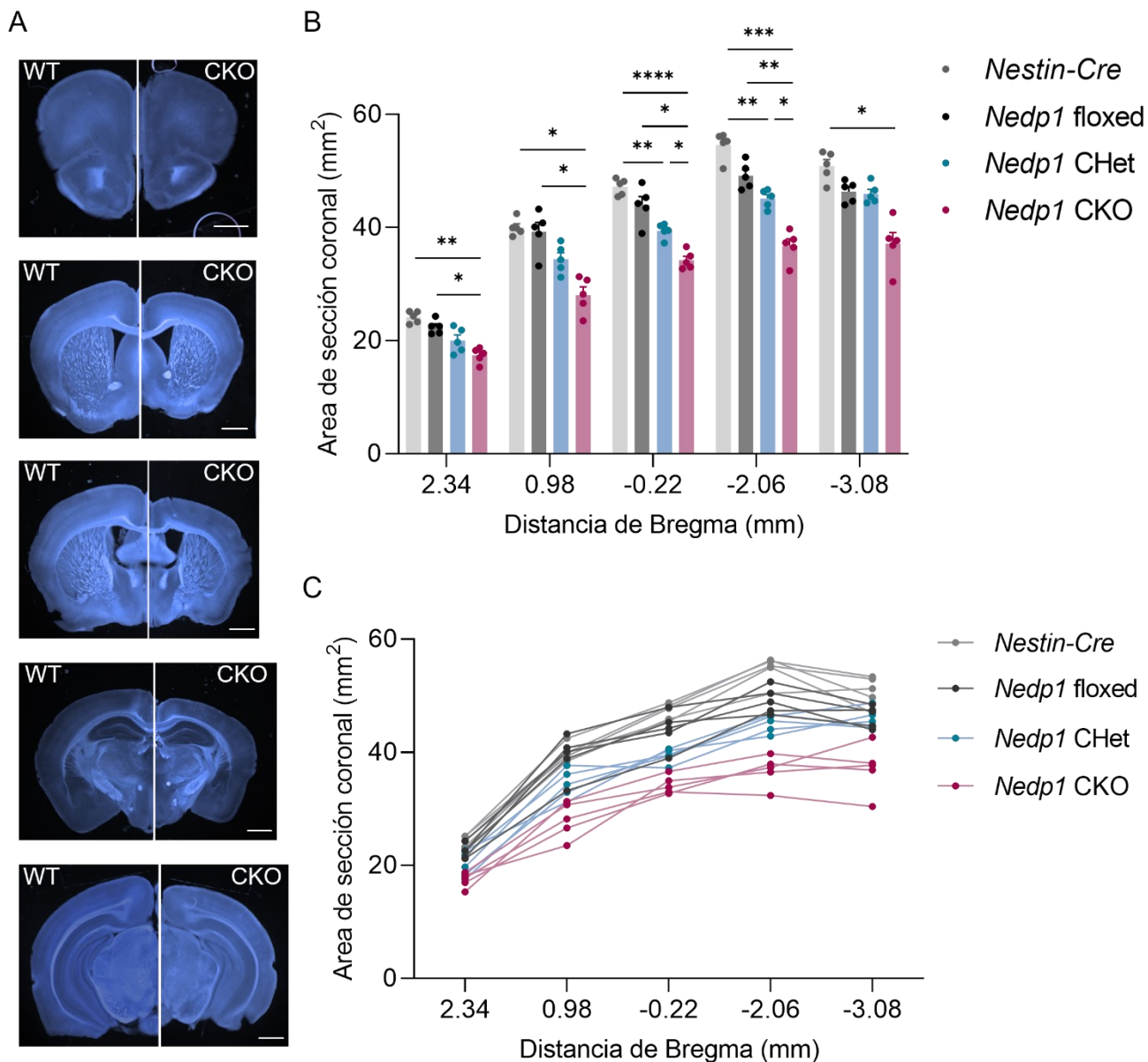


Figura R22. Los cerebros de ratones *Nedp1* CKO son más pequeños (parte 2). Cerebros de ratones de 12 semanas de edad fueron fijados y cortados coronalmente en secciones de 130 μ m. **A.** Fotos representativas de secciones coronales de ratones *Nedp1* floxed (WT) y *Nedp1* CKO (CKO) a distancias de Bregma 2.34, 0.98, -0.22, -2.06, -3.08 mm de arriba hacia abajo. **B.** Gráfico de barras del área de secciones coronales en función de la distancia de Bregma por ratón. **C.** Gráfico XY del área de secciones coronales en función de la distancia de Bregma por ratón. La barra de escala representa 1 mm. Los datos en (B) se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 5$ cerebros por genotipo.

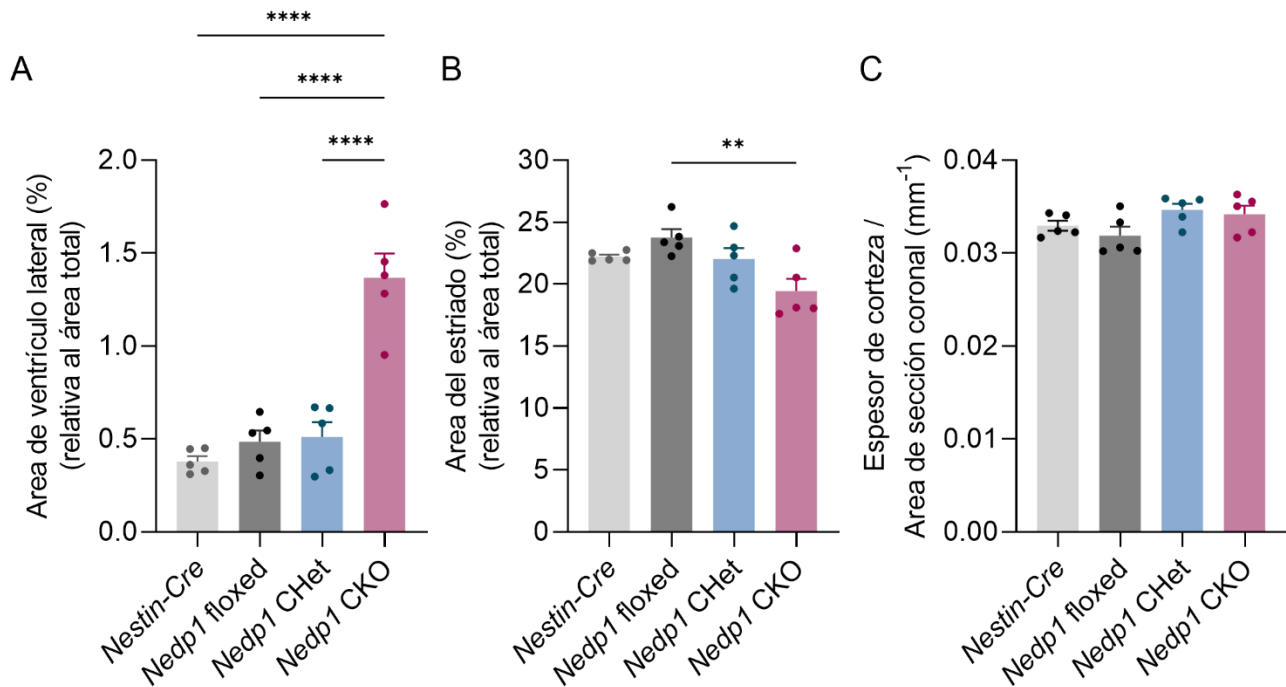


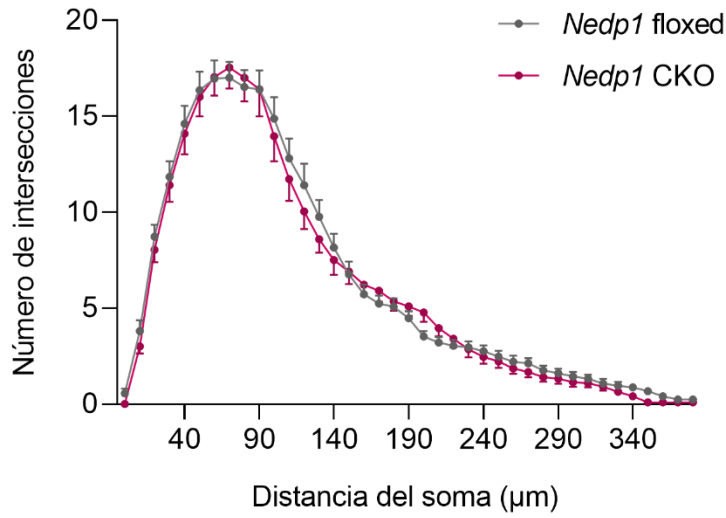
Figura R23. La pérdida de función de Nedp1 deriva en un aumento en el tamaño de los ventrículos laterales del cerebro. Se utilizaron secciones coronales de cerebros (0.98 mm de distancia de Bregma) para cuantificar el área de ventrículos laterales, el área del estriado dorsal y el espesor de la corteza. Se relativizaron las áreas de las estructuras estudiadas al área total de la sección de cada ratón. **A.** Gráfico del área relativa de ventrículo lateral por genotipo. **B.** Gráfico del área relativa del estriado por genotipo. **C.** Gráfico del espesor de corteza relativa por genotipo. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 factor seguido de comparación múltiple de Tukey. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. $n = 5$ cerebros por genotipo.

La pérdida de función de Nedp1 no afecta la morfología neuronal

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que el bloqueo de la neddilación de sustratos distintos de Culinas altera la arborización dendrítica [33]. Además, como reportamos en esta tesis, Nedp1 afecta la arborización dendrítica de neuronas en cultivo (Figura R16). Dado estos antecedentes y que *Nedp1* afecta la morfología del cerebro, nos preguntamos si Nedp1 también altera la morfología neuronal *in vivo*. Para ello, combinamos la línea *Nedp1* KO condicional con la línea *Thy1^{EGFP}*. Los ratones portadores del gen *Thy1^{EGFP}* [132] expresan la proteína fluorescente EGFP en neuronas dispersas en el hipocampo permitiendo analizar parámetros morfológicos de neuronas *in vivo*.

Analizamos neuronas de la región CA1 del hipocampo a partir de cerebros fijados de ratones de 12 semanas de edad. En contraste con las observaciones realizadas en neuronas en cultivo, no se observaron diferencias significativas en la arborización de dendritas apicales entre *Nedp1* floxed (*Nedp1^{flx/flx}, Thy1^{EGFP}*) y *Nedp1* CKO (*Nedp1^{flx/flx}; Nestin-Cre, Thy1^{EGFP}*) *in vivo* (Figura R24). Tampoco se observaron diferencias en la longitud dendrítica total (Figura R25 B) ni en el volumen del soma (Figura R25 C). Sin embargo, hay una diferencia en la máxima longitud en el eje de la dendrita principal (Figura R25 A, $460.3 \pm 16.33 \mu\text{m}$ *Nedp1* floxed, $408.8 \pm 10.64 \mu\text{m}$ *Nedp1* CKO, test de t de dos colas: $p = 0.0115$). Esta disminución se condice con el menor tamaño absoluto del cerebro de ratones *Nedp1* CKO y, por ende, menor espesor absoluto de la corteza debido a la pérdida de función de *Nedp1*.

A



B

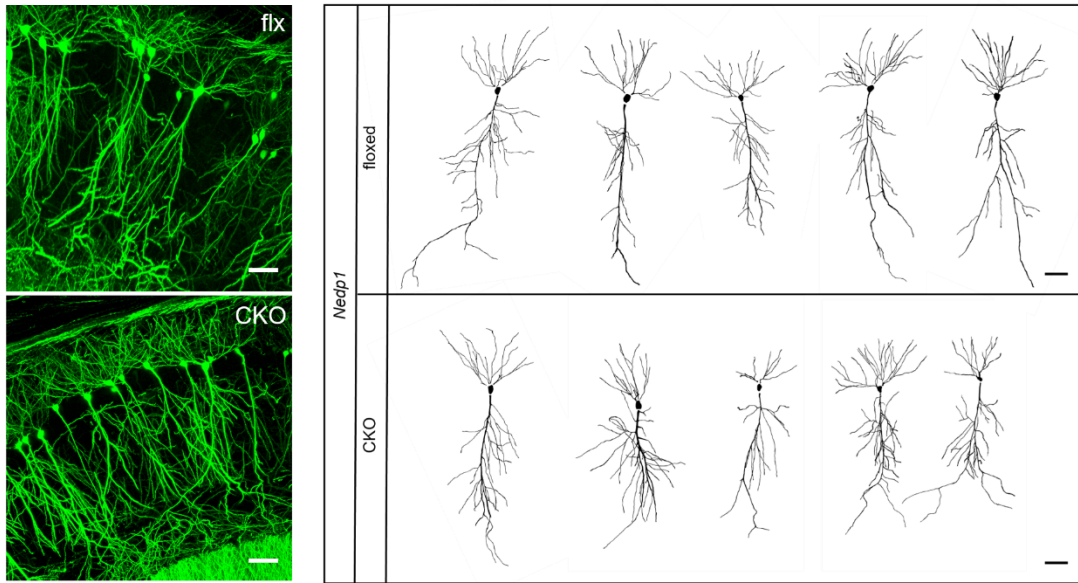


Figura R24. La delección de *Nedp1* no afecta la complejidad de la arborización dendrítica de neuronas de la región CA1 del hipocampo. Cerebros de ratones de 12 semanas de edad que expresaban EGFP bajo el promotor Thy1 fueron perfundidos y posteriormente seccionados coronalmente en rodajas de 130 μm . **A.** Gráfico de la complejidad de la arborización dendrítica (análisis de Sholl). **B.** Fotos y trazados representativos de neuronas analizadas (flx: *Nedp1* floxed, CKO: *Nedp1* CKO). Las barras de escala representan 50 μm . Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores. $n = 22\text{-}26$ neuronas provenientes de 5 cerebros por genotipo.

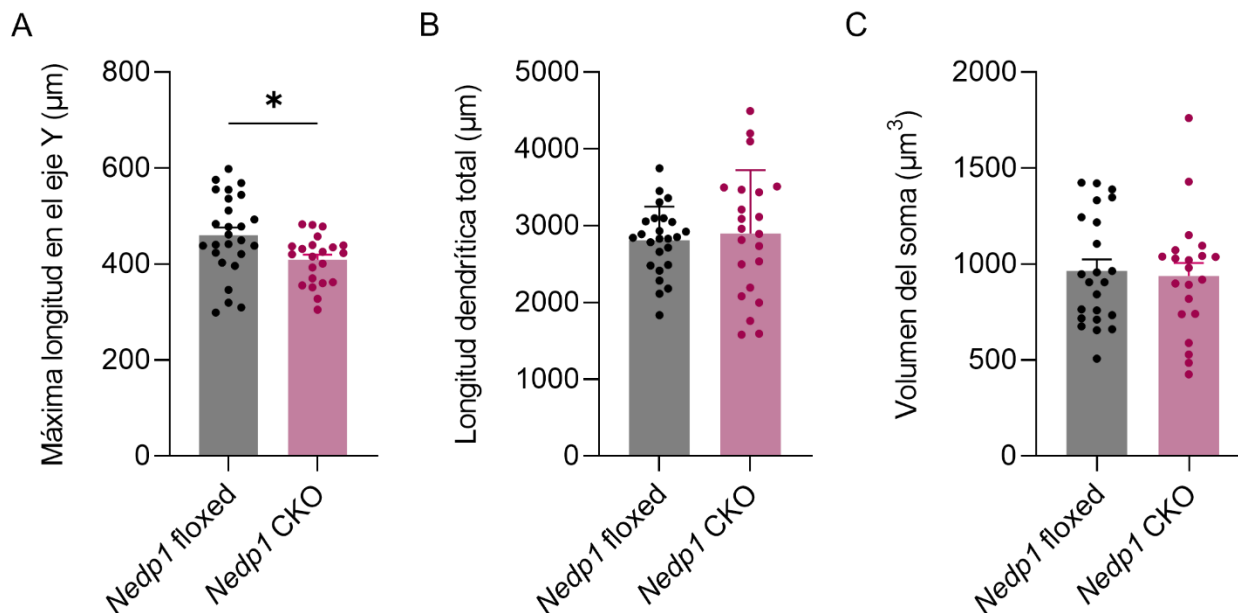


Figura R25. Parámetros morfológicos de neuronas de CA1 del hipocampo. Cerebros de ratones de 12 semanas de edad que expresaban EGFP bajo el promotor Thy1 fueron perfundidos y posteriormente seccionados en rodajas de 130 µm. A partir de estos cortes se cuantificaron tres parámetros neuronales. **A.** Gráfico de longitud máxima en el eje Y (el eje de la dendrita principal). **B.** Gráfico de la longitud dendrítica total. **C.** Gráfico del volumen del soma. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue test de t de dos colas. * $p < 0.05$. $n = 22-26$ neuronas provenientes de 5 cerebros por genotipo.

La densidad y el volumen de espinas dendríticas no se ven alterados por Nedp1

La neddilación de sustratos distintos de las Culininas afecta la formación y estabilidad de espinas dendríticas [79]. Con el fin de profundizar la caracterización morfológica de neuronas de la región CA1 del hipocampo en ausencia de la enzima Nedp1, evaluamos la densidad y el volumen de espinas dendríticas. No observamos diferencias entre la densidad de espinas dendríticas, 19.7 ± 0.58 y 18.58 ± 0.57 espinas cada 10 µm en *Nedp1* floxed y *Nedp1* CKO respectivamente (Figura R26 A, test de t de dos colas: $p = 0.1706$). Tampoco registramos diferencias entre los genotipos en el volumen de las espinas dendríticas (Figuras R26 B, C y D, 0.08645 ± 0.001244 µm³ *Nedp1* floxed, 0.08645 ± 0.001293 µm³ *Nedp1* CKO, test de t de dos colas: $p = 0.9989$).

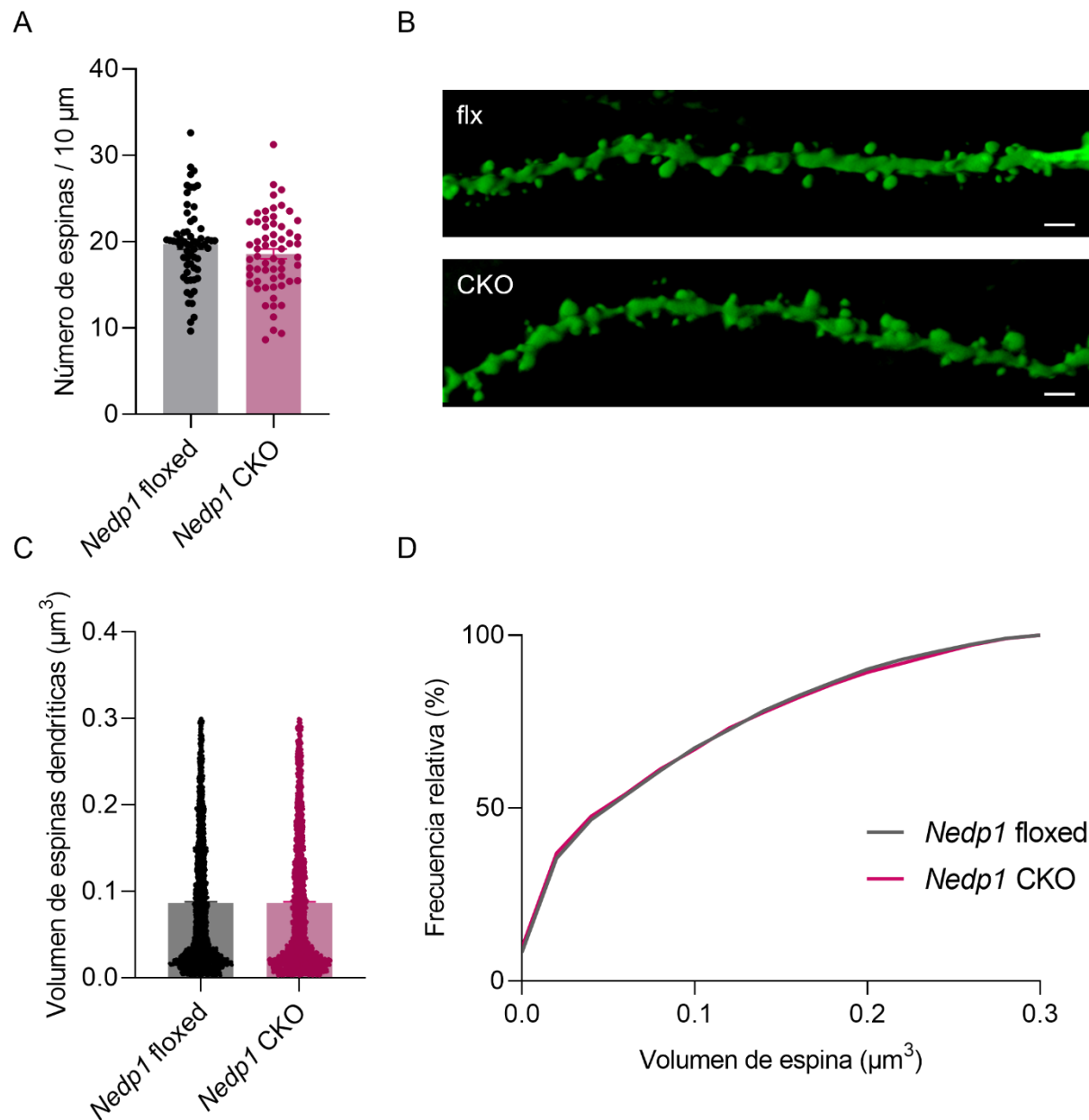


Figura R26. La pérdida de función de Nedp1 no altera la densidad ni el volumen de espinas dendríticas. Se analizaron neuronas hipocámpales de la región CA1 ratones Nedp1 CKO. **A.** Gráfico de densidad de espinas dendríticas (número de espinas cada 10 μm). $n = 61\text{-}62$ secciones de dendritas provenientes de 22-26 neuronas por genotipo. **B.** Imágenes representativas de secciones de dendritas utilizadas para el análisis de densidad, volumen y frecuencia relativa de espinas dendríticas (flx: Nedp1 floxed, CKO: Nedp1 CKO). Las barras de escala representan 2 μm . **C.** Gráfico de volumen de espinas dendríticas por genotipo. **D.** Frecuencia relativa acumulada de espinas por volumen de espina. $n = 3809\text{-}3907$ espinas provenientes de 22-26 neuronas por genotipo. Los datos en (A) y (C) se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue test de t de dos colas.

Conclusiones

En este capítulo se estudiaron los fenotipos asociados a la pérdida de función de Nedp1 en el cerebro de ratones C57BL/6 haciendo uso de la línea *Nedp1* KO condicional generada (Figura R17). Se validó esta línea de ratón mediante WB con anticuerpos anti-Nedd8, demostrando el incremento de conjugados de Nedd8 como consecuencia de la ausencia de Nedp1 funcional en tejido de cerebro, fenómeno que no fue verificado en bazo e hígado, como era de esperar (Figura R19). Se comprobó que Nedp1 no afecta el peso corporal de los ratones (Figura R20).

Demostramos que la falta de expresión de *Nedp1* en células derivadas del tubo neural, principalmente neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, no es la causa de la letalidad observada en el ratón *Nedp1* KO total, pero provoca alteraciones en el desarrollo cerebral: los cerebros resultan más pequeños, con ventrículos laterales aumentados y el área relativa del estriado disminuida (Figuras R22 y R23).

En este trabajo comprobamos que los ratones *Nedp1* CKO no exhiben alteraciones de parámetros morfológicos neuronales como la arborización dendrítica apical, el volumen del soma ni la longitud dendrítica total en neuronas hipocámpales de la región CA1 (Figuras R24 y R25). Tampoco observamos un efecto en la densidad ni en el volumen de espinas dendríticas (Figura R26).

Dado que la depleción de *Nedp1* sucede en estadios tempranos del desarrollo pueden ocurrir mecanismos compensatorios, enmascarando potenciales roles fisiológicos de la enzima Nedp1. Esto también podría explicar la diferencia en los resultados de arborización dendrítica entre neuronas en cultivo y neuronas en el cerebro de ratón *Nedp1* CKO (*in vivo*).

Capítulo V. Nedp1 y la sobrevida a inductores apoptóticos en células en cultivo

Como se mencionó en la sección 3.1 de la introducción, en la literatura hay resultados controversiales respecto al rol de Nedp1 en la sobrevida celular frente a diversos estresores. En particular, se describieron respuestas diametralmente opuestas de Nedp1 frente al estrés oxidativo en células HEK293 en dos trabajos [105, 111] y se reportaron distintas respuestas al daño DNA doble cadena dependiendo del estresor utilizado [56, 105, 111]. Comprender mejor el rol a nivel celular de Nedp1 no es trivial y, si bien la estructura central de la presente tesis está sustentada en estudios *in vivo*, para ello es necesario realizar ensayos en células en cultivo.

La mayoría de los estudios realizados hasta ahora utilizan líneas celulares muy transformadas como modelos celulares y diferentes tipos de desafíos pro apoptóticos. Estas diferencias en el tipo celular, el grado de transformación celular o el tipo de insulto celular, podrían, por sí mismas, ser suficientes para explicar las diferencias encontradas. Uno de los principales problemas es que el campo de estudio carece de un control fisiológico, es decir, conocer el rol de Nedp1 sobre la sobrevida frente a distintos tipos de estrés en células normales.

Para contribuir a resolver esta controversia realizamos cultivos primarios de fibroblastos embrionarios (MEF) a partir de embriones E16.5 *Nedp1* WT o *Nedp1* KO. Las MEF fueron sometidas a distintas concentraciones de tres drogas ampliamente utilizadas como insultos celulares en ensayos de sensibilidad: MG132, Doxorrubicina y Etopósido. MG132 es un inhibidor del proteasoma que induce la apoptosis mediante estrés proteostático [153]. La Doxorrubicina es uno de los agentes antitumorales más empleados históricamente en oncología. Es sabido que es un agente intercalante del ADN que inhibe la progresión del complejo Topoisomerasa II bloqueando la replicación, que promueve el desensamblado de histonas induciendo daño al ADN y la desregulación del epigenoma y de la transcripción general de la célula. Sus efectos también incluyen el aumento de radicales libres y la desregulación de procesos de senescencia, autofagia y ferroptosis [154]. Debido a este mecanismo pleiotrópico de acción, decidimos utilizar en paralelo Etopósido, otro inhibidor de la Topoisomerasa II

de distinta familia (Doxorubicina es una antraciclina mientras que el Etopósido es un glucósido derivado de la Podofilotoxina) [155].

La pérdida de función de Nedp1 tiene efectos diferenciales en la sobrevida celular ante diferentes estresores

Las MEFs fueron incubadas durante 24 hs con MG132 o Doxorubicina o durante 48 hs con Etopósido. Estos tiempos de incubación fueron basados en trabajos previos [156-160] y nuestros propios estudios preliminares de calibración de tiempos y dosis (no mostrado). Al finalizar el tratamiento se incubaron las células con Alamar Blue durante 3 horas para determinar la proporción de células viables. Se normalizó cada tratamiento (distintas concentraciones) al tratamiento sin estímulo (concentración 0 μ M).

Al comparar las curvas dosis-respuesta de MG132 de ambos genotipos, observamos que las células carentes de Nedp1 funcional, sobreviven menos que las *wildtype* (Figura R27 A, ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Bonferroni: Efecto significativo del genotipo, $p = 0.008$). En cambio, Nedp1 parece no afectar la sobrevida de las MEF frente a la Doxorubicina, la sobrevida llega a una meseta del 50 % a partir de 1 μ M de Doxorubicina para ambos genotipos (Figura R27 B, ANOVA de 2 factores: no hay efecto significativo del genotipo, $p = 0.6046$). Por último, se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores para evaluar el efecto del genotipo y la dosis de Etopósido sobre la sobrevida de MEF y se observó un efecto significativo del genotipo sobre la sobrevida ($p = 0.008$), la pérdida de expresión de *Nedp1* otorga mayor resistencia a las células expuestas a Etopósido (Figura R27 C).

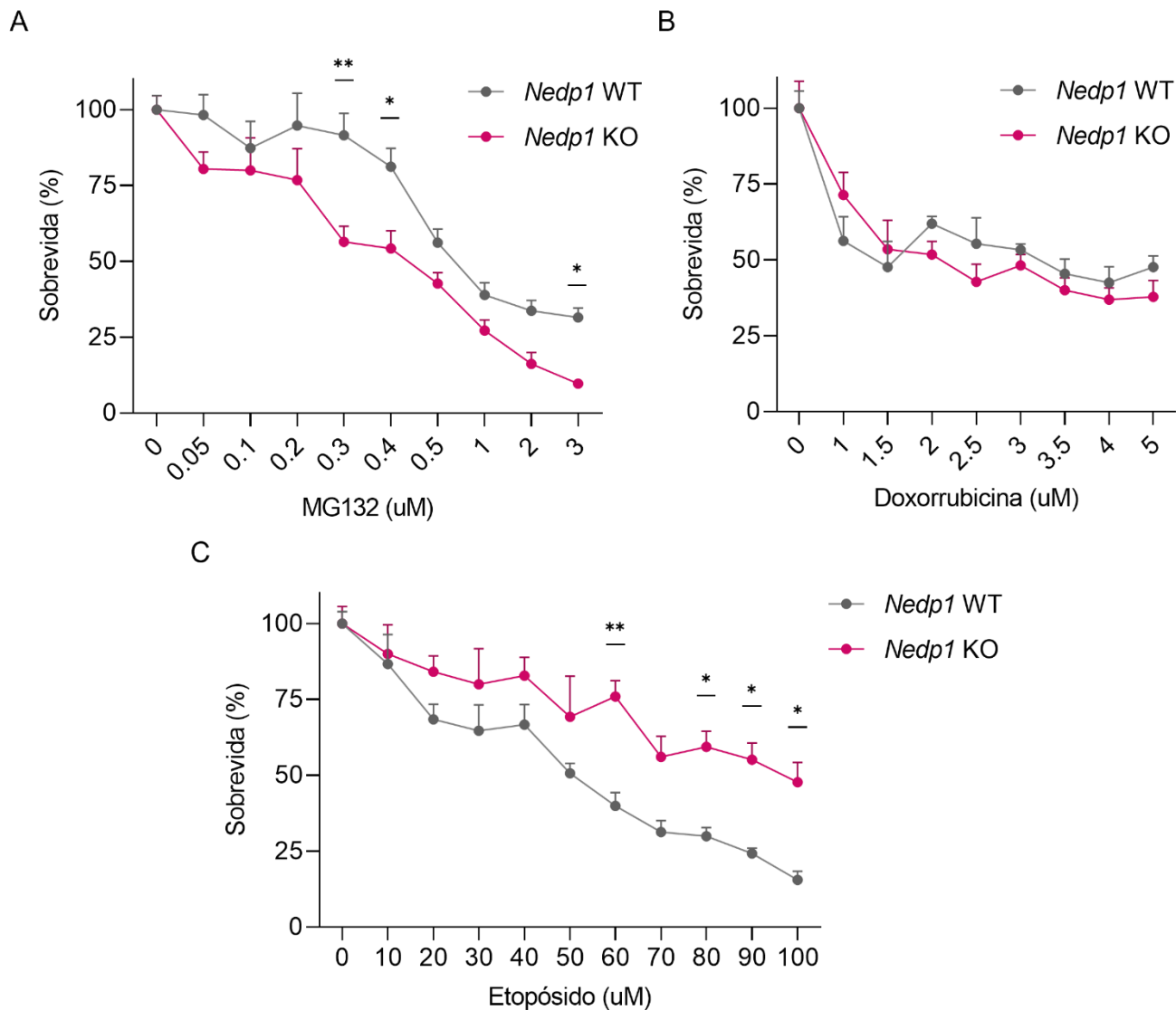


Figura R27. La pérdida de Nedp1 afecta la sobrevivencia de MEF frente al estrés celular. Células de cultivo primario de fibroblastos embrionarios E16.5 de ratones *Nedp1* WT o *Nedp1* KO fueron tratadas con concentraciones crecientes de drogas inductoras de apoptosis durante 24 o 48 horas. Luego del tratamiento, las células fueron incubadas con Alamar Blue para determinar la proporción de células vivas. Se muestran gráficos de sobrevivencia en función del genotipo y de la concentración de estímulo con (A) MG132, (B) Doxorubicina y (C) Etopósido. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 factores seguido de comparación múltiple de Bonferroni. Tanto en (A), (B) y (C), la interacción Dosis x Genotipo no fue significativa. En (A) se observó un efecto significativo del genotipo sobre la sobrevivencia ($p = 0.008$). En (B) el genotipo no tiene un efecto significativo ($p = 0.6046$). En (C) se observó un efecto significativo del genotipo sobre la sobrevivencia ($p = 0.0033$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 3$ por grupo experimental. Se muestra un gráfico representativo de 3 experimentos con células provenientes de dos cultivos primarios independientes.

En vista de estos resultados, podemos decir que *Nedp1* otorga resistencia a las MEF frente a MG132, ya que las células *Nedp1* KO sobreviven menos que las WT a distintas dosis de MG132 (Figura R27 A). *Nedp1* parece no estar involucrada en la vía de acción de Doxorrubicina (Figura R27 B). Mientras que *Nedp1* provee mayor sensibilidad a los fibroblastos embrionarios frente a Etopósido (Figura R27 C). Es interesante notar que *Nedp1* no cumple un único rol general frente a estresores celulares, sino que su función es más compleja y depende del tipo de estímulo y del daño involucrado. Dado que los experimentos fueron realizados siempre en el mismo tipo celular, el origen de las células queda descartado como una fuente de variabilidad adicional. Estos resultados apuntan en la dirección que las controversias generadas en la literatura probablemente estén relacionadas con los diferentes roles que *Nedp1* ejerce en el control de la sobrevivencia celular frente a distintos estresores.

Discusión

El presente trabajo de investigación se centró en estudiar dos de los principales argumentos en contra de la existencia de la neddilación como una auténtica modificación post-traducciona. La vía de la neddilación atípica ha puesto en duda la existencia de los blancos de Nedd8 identificados. Podemos concluir que el fenómeno de neddilación atípica no se encuentra altamente conservado en mamíferos, que su existencia no es una constante ubicua en todas las células y que sus niveles dependen del tipo celular y combinación de estímulos. Además, logramos determinar contextos de alta relevancia biológica de la enzima que remueve Nedd8 de blancos distintos a las Culinas. En particular, demostramos que Nedp1 aumenta la sobrevivencia de organismos invertebrados en condiciones de estrés, y que, notablemente, es esencial para la supervivencia en un modelo mamífero.

Sobre la extensión del fenómeno de neddilación atípica:

Los estudios que describieron originalmente la neddilación atípica no determinaron el grado de conjugación de Nedd8 inducido, sino que se limitaron a reportar la presencia o ausencia de estos conjugados [73, 85]. Incluso, se ha propuesto que la neddilación atípica es un proceso biológico que protege al proteasoma frente al estrés proteostático mediante la formación de agregados proteicos [88, 90]. Sin embargo, esta hipótesis se apoya en correlaciones de datos y aún no ha sido demostrada causalmente. En este trabajo de investigación nos propusimos explorar qué tan frecuente es el fenómeno de neddilación atípica y si existen variaciones en su intensidad.

Lobato-Gil y colaboradores identificaron el neddiloma atípico inducido por MG132 en células humanas HCT116 y determinaron que se encuentra enriquecido en cadenas de poli-Nedd8, cadenas mixtas de Nedd8-Ubiquitina y Nedd8-SUMO [32]. Sin embargo, en nuestros ensayos observamos que la utilización del inductor más fuerte de la vía de neddilación atípica, MG132 30 μ M, no siempre deriva en la acumulación de sustratos neddilados en todos los contextos celulares analizados. La neddilación atípica inducida por MG132 ocurre en las células humanas, pero no en las murinas, sugiriendo que es un fenómeno especie específico (Figuras R2 y R3). Además, notamos que las distintas células humanas

no exhiben las mismas proporciones de neddilación atípica inducida por MG132, sugiriendo también que los distintos contextos celulares podrían modular el nivel de la intensidad de este fenómeno.

Como se mencionó previamente, la mayoría de los ensayos de neddilación atípica reportados en la bibliografía han sido realizados en líneas celulares. Una excepción es el trabajo de Li *et al.* donde reportaron que en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata los inhibidores del proteasoma (MG132, Bortezomib y MG262) inducen un aumento de conjugados de Nedd8. Sin embargo, la mayor proporción de la neddilación en este tipo celular es prevenida por MLN4924, el inhibidor de NAE [89]. Esto sugiere que la neddilación canónica es la que prevalece bajo estrés proteostático en este tipo celular. Li *et al.*, al igual que en esta tesis, reportaron que la inhibición del proteasoma en MEFs no deriva en una acumulación detectable por WB de conjugados de Nedd8 [89].

El mecanismo molecular causal propuesto para el fenómeno de la neddilación atípica es el aumento en la relación de Nedd8:Ubiquitina libre [85]. Los resultados obtenidos en esta tesis son compatibles con esta hipótesis puesto que en células HEK293, fibroblastos humanos y MEFs bajo condiciones donde esta relación se encuentra aún más desbalanceada, como el tratamiento combinado de MG132 + NAEi, observamos un incremento en los niveles de neddilación atípica respecto del tratamiento únicamente con MG132 (Figuras R2 B y R3 A y B). Un efecto similar fue reportado previamente en células HeLa [73]. Este mayor desbalance en el tratamiento combinado podría deberse a que, por un lado, el *pool* de Ubiquitina libre disminuye debido a que las moléculas de Ubiquitina quedan secuestradas en sus sustratos por la inhibición del proteasoma y, por otro lado, el *pool* de Nedd8 libre incrementa debido a que Nedd8 no está siendo incorporado a sus sustratos a través de la vía canónica de neddilación por NAE. Una manera posible de validar esta hipótesis sería comparando los niveles de Nedd8 y Ubiquitina libre entre las distintas condiciones experimentales. Lamentablemente en nuestros WB la señal de Nedd8 no es lo suficientemente fuerte como para detectar la banda de Nedd8 libre aun sembrando la máxima cantidad de muestra posible y tampoco hemos logrado resolver la banda correspondiente a Ubiquitina libre en todos los ensayos.

Utilizando estrés térmico (HS), otro inductor reportado de neddilación atípica [73, 85], observamos una tendencia al aumento de conjugados de Nedd8 únicamente en células MCF7 y HEK293 (Figura R2 A

y B). Posiblemente aumentando en número de ensayos esta tendencia resulte significativa, aunque de menor magnitud que la inducida por MG132. Además, en los otros tipos celulares analizados el tratamiento HS no logró inducir la vía de neddilación atípica. Estos resultados van línea con el mecanismo molecular de inducción de neddilación atípica recién mencionado. El estrés térmico induce la formación de agregados proteicos enriquecidos en Ubiquitina [161]. No obstante, el HS podría no estar generando un desbalance de Nedd8:Ubiquitina libre lo suficientemente desequilibrado como para inducir la vía de neddilación atípica en todos los contextos celulares, remarcando que la inducción de esta vía es dependiente del tipo celular y el inductor utilizado.

Kurtz *et al.* reportaron que la sobreexpresión de Nedd8 en células HEK293 induce la neddilación atípica [85]. Estos resultados fueron parcialmente reproducidos únicamente por Li *et al.* aunque sin realizar los controles necesarios para confirmar que la neddilación observada es atípica (inhibición de NAE o UBA1) [89]. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser reproducidos por nuestro laboratorio (datos no mostrados) ni por Lobato-Gil *et al.* utilizando las mismas células [32]. Ha sido descripto que existen grandes problemas de reproducibilidad debido a la heterogeneidad entre las líneas celulares de distintos laboratorios [162, 163], esto podría explicar en parte las diferencias reportadas entre estos estudios de investigación. La contradicción de estos reportes sugiere, nuevamente, que la neddilación atípica es un fenómeno contexto dependiente susceptible incluso a variaciones dentro de un mismo tipo de línea celular.

Sobre la relevancia fisiológica de Nedp1:

La noción predominante en el campo de las UBLs es que Nedp1 carece de relevancia fisiológica. Esta afirmación surge a partir de un conjunto de modelos *in vivo* (*S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans* y *D. melanogaster*) en los cuales la delección o el silenciamiento de Nedp1 no deriva en alteraciones fenotípicas evidentes [56, 104, 106, 107]. No obstante, la mayoría de estos trabajos se limitó a reportar la viabilidad de los organismos sin profundizar en una caracterización de aspectos fisiológicos fundamentales como el desarrollo o la sobrevivencia.

En este trabajo de investigación demostramos que la delección de Nedp1 disminuye la sobrevivencia y la fertilidad de la mosca de la fruta (Tabla R3, Figuras R8 A y R7), siendo esta la primera vez que se

describe un efecto fisiológico de Nedp1 en un modelo de invertebrados en condiciones basales. Este efecto en la sobrevivencia no fue observado en el gusano (Tabla R1, Figura R5 A) lo cual podría indicar una discrepancia en la relevancia biológica de esta enzima entre estos dos modelos animales.

La disminución en la fertilidad de la mosca de la fruta puede deberse a diversos factores tales como alteraciones en el cortejo, en la cantidad de espermatozoides de los machos, en la fecundidad de las hembras (oviposición), en la cantidad de larvas y en la cantidad de moscas eclosionadas [164-166]. En esta tesis demostramos que este último parámetro se encuentra afectado (Figura R7) aunque podrían realizarse más ensayos para determinar el o los parámetros afectados por la falta de Nedp1.

Recientemente, el grupo del Dr. Xirodimas demostró que las células gonadales del gusano *ulp-3* KO son más resistentes a la apoptosis inducida por radiación [56]. Este antecedente sugiere que Nedp1 podría cumplir roles relacionados con la respuesta al estrés. De hecho, la exposición a diferentes condiciones de estrés reveló que los individuos carentes del ortólogo de Nedp1 en el gusano y la mosca de la fruta son más sensibles y presentan una disminución en la sobrevivencia bajo contextos adversos (Tablas R2 y R4, Figuras R5 B y R8 B-D). Estos resultados indican que Nedp1 podría estar involucrada en las vías de respuesta específicas para cada estrés, aunque se requieren más estudios para comprender el rol específico de Nedp1 en estos contextos.

La validación molecular de *ulp-3* KO (ortólogo de Nedp1 en *C. elegans*) no se pudo realizar de la manera convencional: mediante la comprobación de acumulación de sustratos neddilados vía WB ya que los anticuerpos anti-Nedd8 no reconocen a ned-8 endógeno (su ortólogo en *C. elegans*).

Continuando con el estudio de la relevancia biológica de Nedp1, en este trabajo generamos y validamos por primera vez un modelo mamífero KO de Nedp1 (Figuras R10, R11, R12 y R15). Observamos que la viabilidad de los ratones Nedp1 KO depende del *background* genético de la cepa: los ratones KO son subletales en un *background* excoriado 129P2 x CD1 (Tabla R5) y letales en *background* C57BL/6 (Tabla R6).

Como se mencionó en el Capítulo III, en los ratones Nedp1 KO se detectaron niveles residuales de ARNm de Nedp1 (Figura R11). A pesar de que el aceptor de *splicing* de la trampa génica presente en el

intrón dos de Nedp1 es fuerte, es factible que en algunos eventos de *splicing* sea utilizado el aceptor de *splicing* alternativo del exón tres generándose ARNm de Nedp1 funcional. La subletalidad de los ratones Nedp1 KO en background 129P2 x CD1 podría estar ligada a que ciertas combinaciones del repertorio de variantes alélicas presentes en esta cepa exocriada logren compensar parcialmente los defectos causados por la falta de Nedp1. También podría ocurrir que estas combinaciones alélicas favorezcan la variante de *splicing* que da lugar a Nedp1 funcional logrando una expresión mínima de Nedp1 que, a pesar de no prevenir la acumulación de conjugados de Nedd8, compensa la letalidad observada en C57BL/6. Un ensayo posible para discernir entre estas posibilidades sería realizar RT-qPCRs de Nedp1 en embriones provenientes de cruzamientos heterocigotas (Nedp1^{+/-} X Nedp1^{+/-}) de ambos *backgrounds* genéticos analizar si hay diferencias en los niveles de ARNm entre embriones Nedp1 KO 129P2 x CD1 y C57BL/6.

La interpretación de la esencialidad como atributo binario es una simplificación de una característica más compleja y altamente dependiente del contexto [167, 168]. La diferencia en la viabilidad entre la mosca y el ratón Nedp1 KO podría ser atribuible a anomalías asociadas a perturbaciones de funciones fisiológicas básicas tales como la respiración, la succión y la homeostasis propias del ratón [169].

Puesto que el sistema nervioso controla las funciones fisiológicas recién mencionadas [170, 171] y que ha sido demostrado que la neddilación de sustratos que no son Culinas afecta el desarrollo neuronal y la formación y estabilidad de espinas dendríticas [33, 79], en esta tesis nos volcamos a explorar el rol de Nedp1 en el sistema nervioso. Reportamos que la pérdida de función de Nedp1 en el cerebro no explica el fenotipo de letalidad observado en el ratón Nedp1 KO total. Esto sugiere que la letalidad es producto de la alteración de algún otro sistema o de varios sistemas en simultaneo. Se podría realizar un análisis histopatológico de los embriones y explorar si hay algún órgano o tejido que se vea particularmente afectado por la pérdida de función de Nedp1.

Ensayos en cultivo revelaron que la delección de Nedp1 afecta la arborización dendrítica de neuronas hipocampales (Figura R16). No obstante, este efecto no fue reproducible en el modelo *in vivo* (Figura R24). En el ratón Nedp1 CKO, podrían estar ocurriendo mecanismos compensatorios a lo largo

del desarrollo que prevengan los defectos en la arborización dendrítica de las neuronas hipocampales. Además, en el cerebro las neuronas se encuentran en un contexto donde ocurre la interacción con otros tipos celulares que podrían prevenir las alteraciones producidas por la falta de Nedp1.

En esta tesis demostramos que la pérdida de función de Nedp1 en células derivadas del tubo neural (fundamentalmente neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) deriva en alteraciones morfológicas en el cerebro murino: cerebros más pequeños, ventrículos laterales más grandes y una disminución en el área relativa del estriado (Figuras R21, R22 y R23).

Un menor tamaño cerebral puede estar asociado a una disminución generalizada del tamaño de los somas de neuronas y a una disminución en la arborización dendrítica [172, 173]. Sin embargo, estos parámetros no se encuentran alterados *in vivo* en los ratones Nedp1 CKO y por ende no explican la disminución en el tamaño cerebral observado (Figuras R24, R25 D). Alteraciones en la proliferación y/o diferenciación de progenitores neuronales podrían derivar en una modificación del tamaño del cerebro. Un estudio del número de células y de la densidad celular podría contribuir a elucidar la causa de la reducción del tamaño absoluto de los cerebros CKO de Nedp1.

El mayor tamaño relativo de los ventrículos laterales del ratón Nedp1 CKO correlaciona con una leve reducción en el área relativa del estriado dorsal (Figura R23 A y C). La composición neuronal del estriado es heterogénea siendo las neuronas espinosas medianas la población predominante constituyendo entre el 90 y 95 % [174]. Ha sido reportado que la disfunción de células tanto neuronales como no neuronales del cuerpo estriado contribuyen al desarrollo de enfermedades como Parkinson, Huntington, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción y autismo [175-177]. Podría hipotetizarse que la disminución del estriado debido a la carencia de Nedp1 podría llevar a alguno de los trastornos recién mencionados. Se requieren ensayos comportamentales para explorar esta hipótesis.

La incorporación del ratón Nestin-Cre entre los grupos experimentales fue fundamental para corroborar que los efectos observados en el ratón Nedp1 CKO se deben a la pérdida de función de Nedp1 y no a problemas técnicos asociados con la línea Nestin-Cre. El sistema de expresión génica Cre/loxP ha sido ampliamente utilizado para estudiar la función de genes específicos en el campo de la

neurobiología [178, 179]. Sin embargo, en los últimos años se han reportado problemas técnicos relacionados con las líneas de expresión de Cre y la línea Nestin-Cre no es la excepción [180]. La línea de ratón transgénica Nestin-Cre [130] ha sido asociada con ciertos fenotipos fisiológicos y comportamentales como hipopituitarismo leve, peso corporal reducido y ansiedad reducida [148, 181].

La delección de Nedp1 deriva en una acumulación de conjugados de Nedd8, disminuyendo los niveles de Nedd8 libres (Figuras I7, R12, R15, R19). Teóricamente, la delección de Nedp1 podría afectar indirectamente la proliferación celular como consecuencia de una disminución de la biodisponibilidad de Nedd8 libre. Bajo esta hipótesis la disminución de Nedd8 libre afectaría la neddilación de Culininas (Figura R15) y por ende la regulación del ciclo celular. Sin embargo, tanto las líneas celulares KO/KD de Nedp1 previamente reportadas como los MEFs Nedp1 KO utilizadas en esta tesis son capaces de proliferar normalmente [56, 105, 111]. Más aún, si la proliferación celular se viera impedida a causa de la pérdida de función de Nedp1, ninguno de los modelos *in vivo* de Nedp1 KO serían viables y el ratón Nedp1 KO no superaría la etapa de blastocisto.

A pesar de que el ratón C57BL/6 Nedp1 KO muere al nacer, los fibroblastos derivados de embriones son viables en cultivo y no presentan alteraciones evidentes. Esto podría indicar que la pérdida de función de Nedp1 cobra mayor relevancia a nivel organismo que a nivel celular. De hecho, las líneas celulares humanas U2OS y HEK293 KO/KD de Nedp1 son viables en cultivo [56, 105, 111]. Es posible que la viabilidad de las líneas celulares humanas KO/KD para NEDP1 haya arrojado dudas sobre la importancia de esta enzima en modelos de mamíferos.

En esta tesis nos propusimos explorar la función de Nedp1 frente al estrés a nivel celular en células normales para lo cual utilizamos fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) como modelo. Realizamos estudios preliminares en busca de funciones biológicas de Nedp1 asociadas a la supervivencia de MEFs frente a tres inductores de apoptosis ampliamente utilizados: MG132, Doxorrubicina y Etopósido (Figura R27). Hemos observado respuestas diferenciales dependiendo del tratamiento utilizado. Las células carentes de Nedp1 mostraron mayor resistencia a la muerte celular frente a Etopósido, mayor sensibilidad ante MG132 y ninguna diferencia frente a Doxorrubicina.

Nedp1 ha sido asociada a la progresión de la vía de apoptosis inducida por radiación y etopósido en células U2OS [56]. A su vez, existen reportes contradictorios en cuanto a la influencia de Nedp1 en la resistencia al estrés oxidativo. Según Guan *et al.* las células HEK293 Nedp1 KO son más sensibles a dicho estrés, mientras que Keuss *et al.* postulan lo contrario [105, 111]. Esta discrepancia podría ser atribuible a diferencias técnicas en los protocolos utilizados para inducir estrés oxidativo tales como la concentración de peróxido de hidrógeno y los tiempos de incubación. La delección de Nedp1 tanto en células HEK293 como en U2OS ha sido vinculada con una menor resistencia a la Camptotecina, un fármaco que estabiliza los enlaces de la Topoisomerasa I al ADN provocando roturas de cadena doble. Este amplio repertorio de respuestas ante estrés celular sugiere que Nedp1 no tiene un rol único y global frente al estrés, sino que se encuentra involucrado en vías específicas.

El agregado de proteínas aberrantes ha sido asociado a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [182-184]. A su vez, Nedd8 se ha reportado presente en lesiones neurodegenerativas como los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson y los cuerpos de Mallory en fibras de Rosenthal en los astrocitomas [185]. Si bien la potencial función de agregados proteicos en enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central no ha sido subsecuentemente explorada en estudios causales, su disolución se considera un enfoque terapéutico. Un trabajo reciente sugiere que la inhibición de Nedp1 promueve la disolución de gránulos de estrés en modelos de esclerosis múltiple celulares [186]. Aun se requieren más estudios para conocer a qué vías se encuentra asociada Nedp1 y cuál es su rol en cada una de ellas.

En esta tesis demostramos que la neddilación atípica es un fenómeno restringido a ciertos tipos celulares, que Nedp1 cumple un rol en la resistencia al estrés en dos modelos de invertebrados y es esencial en un modelo murino. En conclusión, estos resultados sustentan que la neddilación es una auténtica modificación post-traducciona. Los modelos murinos generados en esta tesis (*Nedp1* KO y *Nedp1* CKO) pueden ser utilizados como herramientas para la identificación del neddiloma en células normales en diversos tejidos, en particular en el sistema nervioso, y continuar con la descripción de las funciones asociadas a la neddilación de sustratos no Culinas.

Bibliografía

1. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. Science, 2007. **315**(5809): p. 201-5.
2. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. EMBO J, 2000. **19**(1): p. 94-102.
3. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
4. Chau, V., et al., *A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein*. Science, 1989. **243**(4898): p. 1576-83.
5. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 159-80.
6. Schwartz, D.C. and M. Hochstrasser, *A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 321-8.
7. Dye, B.T. and B.A. Schulman, *Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 131-50.
8. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
9. Haas, A.L. and T.J. Siepmann, *Pathways of ubiquitin conjugation*. FASEB J, 1997. **11**(14): p. 1257-68.
10. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
11. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
12. Schulman, B.A. and J.W. Harper, *Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 319-31.
13. Stewart, M.D., et al., *E2 enzymes: more than just middle men*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 423-40.
14. Valimberti, I., et al., *E2 superfamily of ubiquitin-conjugating enzymes: constitutively active or activated through phosphorylation in the catalytic cleft*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14849.
15. Eletr, Z.M., et al., *E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(10): p. 933-4.
16. Weber, J., S. Polo, and E. Maspero, *HECT E3 Ligases: A Tale With Multiple Facets*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 370.
17. Kamadurai, H.B., et al., *Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a Ubch5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex*. Mol Cell, 2009. **36**(6): p. 1095-102.
18. Verdecia, M.A., et al., *Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 249-59.
19. Huang, L., et al., *Structure of an E6AP-Ubch7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1321-6.
20. Lydeard, J.R., B.A. Schulman, and J.W. Harper, *Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1050-61.
21. Yu, H., et al., *Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1219-22.

22. Zachariae, W., et al., *Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1216-9.
23. Seol, J.H., et al., *Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1614-26.
24. Kamura, T., et al., *Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase*. Science, 1999. **284**(5414): p. 657-61.
25. Braten, O., et al., *Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(32): p. E4639-47.
26. Chen, B.B. and R.K. Mallampalli, *Masking of a nuclear signal motif by monoubiquitination leads to mislocalization and degradation of the regulatory enzyme cytidylyltransferase*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(11): p. 3062-75.
27. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 399-422.
28. Peng, J., et al., *A proteomics approach to understanding protein ubiquitination*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 921-6.
29. Park, S.H., et al., *The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 153-65.
30. Wang, J. and M.A. Maldonado, *The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(4): p. 255-61.
31. Xia, Z.P., et al., *Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 114-9.
32. Lobato-Gil, S., et al., *Proteome-wide identification of NEDD8 modification sites reveals distinct proteomes for canonical and atypical NEDDylation*. Cell Rep, 2021. **34**(3): p. 108635.
33. Vogl, A.M., et al., *Global site-specific neddylation profiling reveals that NEDDylated cofilin regulates actin dynamics*. Nat Struct Mol Biol, 2020. **27**(2): p. 210-220.
34. Hendriks, I.A., et al., *Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(10): p. 927-36.
35. Lamoliatte, F., et al., *Targeted identification of SUMOylation sites in human proteins using affinity enrichment and paralog-specific reporter ions*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(9): p. 2536-50.
36. Leidecker, O., et al., *The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions*. Cell Cycle, 2012. **11**(6): p. 1142-50.
37. Galisson, F., et al., *A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(2): p. M110 004796.
38. Kliza, K. and K. Husnjak, *Resolving the Complexity of Ubiquitin Networks*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 21.
39. Deshaies, R.J., *SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 435-67.
40. Connelly, C. and P. Hieter, *Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression*. Cell, 1996. **86**(2): p. 275-85.
41. Bai, C., et al., *SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box*. Cell, 1996. **86**(2): p. 263-74.
42. Huang, D.T., et al., *Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity*. Nature, 2007. **445**(7126): p. 394-8.

43. Morimoto, M., et al., *Nedd8-modification of Cul1 is promoted by Roc1 as a Nedd8-E3 ligase and regulates its stability*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(2): p. 392-8.
44. Kamura, T., et al., *The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2928-33.
45. Saifee, N.H. and N. Zheng, *A ubiquitin-like protein unleashes ubiquitin ligases*. Cell, 2008. **135**(2): p. 209-11.
46. Jin, J., et al., *Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins*. Genes Dev, 2004. **18**(21): p. 2573-80.
47. Sarikas, A., T. Hartmann, and Z.Q. Pan, *The cullin protein family*. Genome Biol, 2011. **12**(4): p. 220.
48. Skaar, J.R., J.K. Pagan, and M. Pagano, *Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 369-81.
49. Xirodimas, D.P., *Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 802-6.
50. Kamitani, T., et al., *Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28557-62.
51. Yeh, E.T., L. Gong, and T. Kamitani, *Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles*. Gene, 2000. **248**(1-2): p. 1-14.
52. Huang, D.T. and B.A. Schulman, *Expression, purification, and characterization of the E1 for human NEDD8, the heterodimeric APPBP1-UBA3 complex*. Methods Enzymol, 2005. **398**: p. 9-20.
53. Pan, Z.Q., et al., *Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction*. Oncogene, 2004. **23**(11): p. 1985-97.
54. Gong, L. and E.T. Yeh, *Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12036-42.
55. Huang, D.T., et al., *E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification*. Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 483-95.
56. Bailly, A.P., et al., *The Balance between Mono- and NEDD8-Chains Controlled by NEDP1 upon DNA Damage Is a Regulatory Module of the HSP70 ATPase Activity*. Cell Rep, 2019. **29**(1): p. 212-224 e8.
57. Patel, A.G., et al., *Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes*. J Biol Chem, 2012. **287**(6): p. 4198-210.
58. Boh, B.K., et al., *Inhibition of cullin RING ligases by cycle inhibiting factor: evidence for interference with Nedd8-induced conformational control*. J Mol Biol, 2011. **413**(2): p. 430-7.
59. Merlet, J., et al., *Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1924-38.
60. Herrmann, J., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1276-91.
61. Cardozo, T. and M. Pagano, *The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 739-51.
62. Podust, V.N., et al., *A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4579-84.

63. Morimoto, M., et al., *Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1)*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(3): p. 1093-6.
64. Rabut, G. and M. Peter, *Function and regulation of protein neddylation*. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep, 2008. **9**(10): p. 969-76.
65. Leck, Y.C., et al., *Biochemical and cellular effects of inhibiting Nedd8 conjugation*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(3): p. 588-93.
66. Gao, M.X., et al., *The SCF FSN-1 ubiquitin ligase controls germline apoptosis through CEP-1/p53 in C. elegans*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 1054-62.
67. Kim, H.J., et al., *Drosophila homolog of APP-BP1 (dAPP-BP1) interacts antagonistically with APPL during Drosophila development*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 103-15.
68. Dharmasiri, S., et al., *The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis*. EMBO J, 2003. **22**(8): p. 1762-70.
69. Ou, C.Y., et al., *Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in Drosophila eye development*. Genes Dev, 2002. **16**(18): p. 2403-14.
70. Jones, D. and E.P. Candido, *The NED-8 conjugating system in Caenorhabditis elegans is required for embryogenesis and terminal differentiation of the hypodermis*. Dev Biol, 2000. **226**(1): p. 152-65.
71. Soucy, T.A., et al., *An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 732-6.
72. Milhollen, M., et al., *MLN4924, a Potent and Novel Small Molecule Inhibitor of Nedd8 Activating Enzyme, Induces DNA Re-Replication and Apoptosis in Cultured Human Tumor Cells*. Blood, 2008. **112**(11): p. 3621-3621.
73. Xirodimas, D.P., et al., *Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway*. EMBO Rep, 2008. **9**(3): p. 280-6.
74. Gao, F., et al., *Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1171-7.
75. Watson, I.R., et al., *Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34096-103.
76. Xirodimas, D.P., et al., *Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity*. Cell, 2004. **118**(1): p. 83-97.
77. Stickle, N.H., et al., *pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3251-61.
78. Kumar, S., Y. Tomooka, and M. Noda, *Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(3): p. 1155-61.
79. Vogl, A.M., et al., *Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition*. Nat Neurosci, 2015. **18**(2): p. 239-51.
80. Andersen, N., N. Krauth, and S. Nabavi, *Hebbian plasticity in vivo: relevance and induction*. Curr Opin Neurobiol, 2017. **45**: p. 188-192.
81. Kessels, H.W. and R. Malinow, *Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior*. Neuron, 2009. **61**(3): p. 340-50.
82. Brockmann, M.M., et al., *Neddylation regulates excitatory synaptic transmission and plasticity*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17935.

83. Jones, J., et al., *A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins*. J Proteome Res, 2008. **7**(3): p. 1274-87.
84. Norman, J.A. and R. Shiekhhattar, *Analysis of Nedd8-associated polypeptides: a model for deciphering the pathway for ubiquitin-like modifications*. Biochemistry, 2006. **45**(9): p. 3014-9.
85. Hjerpe, R., et al., *Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 927-36.
86. Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 253-66.
87. Meszka, I., J. Polanowska, and D.P. Xirodimas, *Mixed in chains: NEDD8 polymers in the Protein Quality Control system*. Semin Cell Dev Biol, 2022. **132**: p. 27-37.
88. Maghames, C.M., et al., *NEDDylation promotes nuclear protein aggregation and protects the Ubiquitin Proteasome System upon proteotoxic stress*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4376.
89. Li, J., et al., *NEDD8 Ultimate Buster 1 Long (NUB1L) Protein Suppresses Atypical Neddylation and Promotes the Proteasomal Degradation of Misfolded Proteins*. J Biol Chem, 2015. **290**(39): p. 23850-62.
90. Kim, S., et al., *Stress-induced NEDDylation promotes cytosolic protein aggregation through HDAC6 in a p62-dependent manner*. iScience, 2021. **24**(3): p. 102146.
91. Lyapina, S., et al., *Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1382-5.
92. Schwechheimer, C., et al., *Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1379-82.
93. Hotton, S.K. and J. Callis, *Regulation of cullin RING ligases*. Annu Rev Plant Biol, 2008. **59**: p. 467-89.
94. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 9-20.
95. Mukhopadhyay, D. and M. Dasso, *Modification in reverse: the SUMO proteases*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(6): p. 286-95.
96. Gan-Erdene, T., et al., *Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28892-900.
97. Mendoza, H.M., et al., *NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25637-43.
98. Shin, Y.C., et al., *The molecular determinants of NEDD8 specific recognition by human SENP8*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27742.
99. Shen, L.N., et al., *Structural basis of NEDD8 ubiquitin discrimination by the deNEDDylating enzyme NEDP1*. EMBO J, 2005. **24**(7): p. 1341-51.
100. Reverter, D., et al., *Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1*. J Mol Biol, 2005. **345**(1): p. 141-51.
101. Hemelaar, J., et al., *Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 84-95.
102. Wu, K., et al., *DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28882-91.
103. Yamoah, K., K. Wu, and Z.Q. Pan, *In vitro cleavage of Nedd8 from cullin 1 by COP9 signalosome and deneddylase 1*. Methods Enzymol, 2005. **398**: p. 509-22.

104. Chan, Y., et al., *DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 19): p. 3218-23.
105. Keuss, M.J., et al., *Unanchored tri-NEDD8 inhibits PARP-1 to protect from oxidative stress-induced cell death*. EMBO J, 2019. **38**(6).
106. Mergner, J., et al., *DENEDDYLASE1 deconjugates NEDD8 from non-cullin protein substrates in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2015. **27**(3): p. 741-53.
107. Zhou, L. and F.Z. Watts, *Nep1, a Schizosaccharomyces pombe deneddylating enzyme*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 2): p. 307-14.
108. Enchev, R.I., B.A. Schulman, and M. Peter, *Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(1): p. 30-44.
109. Madeira, F., et al., *Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(W1): p. W276-W279.
110. Chen, D.V., et al., *Deneddylation by SENP8 restricts hepatitis B virus propagation*. Microbiol Immunol, 2021. **65**(3): p. 125-135.
111. Guan, J., S. Yu, and X. Zheng, *NEDDylation antagonizes ubiquitination of proliferating cell nuclear antigen and regulates the recruitment of polymerase eta in response to oxidative DNA damage*. Protein Cell, 2018. **9**(4): p. 365-379.
112. Brown, J.S. and S.P. Jackson, *Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response*. Open Biol, 2015. **5**(4): p. 150018.
113. Vertegaal, A.C., *Uncovering ubiquitin and ubiquitin-like signaling networks*. Chem Rev, 2011. **111**(12): p. 7923-40.
114. Arntzen, M.O., et al., *IsobariQ: software for isobaric quantitative proteomics using IPTL, iTRAQ, and TMT*. J Proteome Res, 2011. **10**(2): p. 913-20.
115. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
116. Kirkpatrick, D.S., C. Denison, and S.P. Gygi, *Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 750-7.
117. Vijayasimha, K. and B.P. Dolan, *The Many Potential Fates of Non-Canonical Protein Substrates Subject to NEDDylation*. Cells, 2021. **10**(10).
118. Ramazi, S. and J. Zahiri, *Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods*. Database (Oxford), 2021. **2021**.
119. Woodsmith, J., A. Kamburov, and U. Stelzl, *Dual coordination of post translational modifications in human protein networks*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(3): p. e1002933.
120. Smoly, I., et al., *An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts*. PLoS Comput Biol, 2017. **13**(1): p. e1005221.
121. Meneely, P.M., C.L. Dahlberg, and J.K. Rose, *Working with Worms: Caenorhabditis elegans as a Model Organism*. 2019. **19**(1): p. e35.
122. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
123. Wolkow, C.A., et al., *Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system*. Science, 2000. **290**(5489): p. 147-50.

124. Albert, P.S. and D.L. Riddle, *Mutants of Caenorhabditis elegans that form dauer-like larvae*. Dev Biol, 1988. **126**(2): p. 270-93.
125. Piper, M.D.W. and L. Partridge, *Drosophila as a model for ageing*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(9 Pt A): p. 2707-2717.
126. Roote, J. and A. Prokop, *How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics*. G3 (Bethesda), 2013. **3**(2): p. 353-8.
127. Rubin, G.M., *Drosophila melanogaster as an experimental organism*. Science, 1988. **240**(4858): p. 1453-9.
128. Bellen, H.J., et al., *The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes*. Genetics, 2004. **167**(2): p. 761-81.
129. Raymond, C.S. and P. Soriano, *High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells*. PLoS One, 2007. **2**(1): p. e162.
130. Tronche, F., et al., *Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 99-103.
131. Michalczyk, K. and M. Ziman, *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation*. Histol Histopathol, 2005. **20**(2): p. 665-71.
132. Feng, G., et al., *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 41-51.
133. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
134. Dickstein, D.L., et al., *Automatic Dendritic Spine Quantification from Confocal Data with Neurolucida 360*. Curr Protoc Neurosci, 2016. **77**: p. 1 27 1-1 27 21.
135. Han, S.K., et al., *OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research*. Oncotarget, 2016. **7**(35): p. 56147-56152.
136. Zhang, S., et al., *Caenorhabditis elegans as a Useful Model for Studying Aging Mutations*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 554994.
137. Tissenbaum, H.A., *Using C. elegans for aging research*. Invertebr Reprod Dev, 2015. **59**(sup1): p. 59-63.
138. He, Y. and H. Jasper, *Studying aging in Drosophila*. Methods, 2014. **68**(1): p. 129-33.
139. Yamaguchi, M. and H. Yoshida, *Drosophila as a Model Organism*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1076**: p. 1-10.
140. Urso, S.J. and T. Lamitina, *The C. elegans Hypertonic Stress Response: Big Insights from Shrinking Worms*. Cell Physiol Biochem, 2021. **55**(S1): p. 89-105.
141. Choe, K.P., *Physiological and molecular mechanisms of salt and water homeostasis in the nematode Caenorhabditis elegans*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013. **305**(3): p. R175-86.
142. Choe, K.P. and K. Strange, *Molecular and genetic characterization of osmosensing and signal transduction in the nematode Caenorhabditis elegans*. FEBS J, 2007. **274**(22): p. 5782-9.
143. Lamitina, S.T., et al., *Adaptation of the nematode Caenorhabditis elegans to extreme osmotic stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(4): p. C785-91.
144. Belyi, A.A., et al., *The Resistance of Drosophila melanogaster to Oxidative, Genotoxic, Proteotoxic, Osmotic Stress, Infection, and Starvation Depends on Age According to the Stress Factor*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(12).

145. Schnutgen, F., et al., *Enhanced gene trapping in mouse embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(20): p. e133.
146. Smale, S.T., *Beta-galactosidase assay*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(5): p. pdb prot5423.
147. Declercq, J., et al., *Metabolic and Behavioural Phenotypes in Nestin-Cre Mice Are Caused by Hypothalamic Expression of Human Growth Hormone*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135502.
148. Giusti, S.A., et al., *Behavioral phenotyping of Nestin-Cre mice: implications for genetic mouse models of psychiatric disorders*. J Psychiatr Res, 2014. **55**: p. 87-95.
149. Harno, E., E.C. Cottrell, and A. White, *Metabolic pitfalls of CNS Cre-based technology*. Cell Metab, 2013. **18**(1): p. 21-8.
150. Gimenez, U., et al., *3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10308.
151. Finn, R., C.C. Evans, and L. Lee, *Strain-dependent brain defects in mouse models of primary ciliary dyskinesia with mutations in Pcdp1 and Spzf2*. Neuroscience, 2014. **277**: p. 552-67.
152. Ishihara, K., et al., *Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome*. Cereb Cortex, 2010. **20**(5): p. 1131-43.
153. Guo, N. and Z. Peng, *MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells*. Asia Pac J Clin Oncol, 2013. **9**(1): p. 6-11.
154. Kciuk, M., et al., *Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity*. Cells, 2023. **12**(4).
155. Pommier, Y., et al., *DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs*. Chem Biol, 2010. **17**(5): p. 421-33.
156. Escobar, D., et al., *Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin*. Cell Death Dis, 2015. **6**(7): p. e1816.
157. Rodriguez-Enfedaque, A., et al., *zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(8): p. 1343-52.
158. Zanutto-Filho, A., et al., *Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling*. Invest New Drugs, 2012. **30**(6): p. 2252-62.
159. Bae, H. and J.L. Guan, *Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(9): p. 1232-41.
160. Panaretakis, T., et al., *Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(8): p. 3821-31.
161. Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, *Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1552-5.
162. Liu, Y., et al., *Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(3): p. 314-322.
163. Tang, L., *Investigating heterogeneity in HeLa cells*. Nat Methods, 2019. **16**(4): p. 281.
164. Avila, F.W., et al., *Insect seminal fluid proteins: identification and function*. Annu Rev Entomol, 2011. **56**: p. 21-40.

165. David, J., Y. Cohet, and P. Foluillet, *The variability between individuals as a measure of senescence: a study of the number of eggs laid and the percentage of hatched eggs in the case of Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol, 1975. **10**(1): p. 17-25.
166. Manning, A., *The control of sexual receptivity in female Drosophila*. Anim Behav, 1967. **15**(2): p. 239-50.
167. Bello, S.M., M.L. Berry, and C.L. Smith, *Know Your Model: How essential is that essential gene?* Lab Anim (NY), 2020. **49**(1): p. 9-10.
168. Rancati, G., et al., *Emerging and evolving concepts in gene essentiality*. Nat Rev Genet, 2018. **19**(1): p. 34-49.
169. Turgeon, B. and S. Meloche, *Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 1-26.
170. Moseley, A.E., et al., *The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5317-24.
171. DeChiara, T.M., et al., *Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth*. Cell, 1995. **83**(2): p. 313-22.
172. Barkovich, A.J., et al., *A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012*. Brain, 2012. **135**(Pt 5): p. 1348-69.
173. Armstrong, D., et al., *Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(2): p. 195-201.
174. Gokce, O., et al., *Cellular Taxonomy of the Mouse Striatum as Revealed by Single-Cell RNA-Seq*. Cell Rep, 2016. **16**(4): p. 1126-1137.
175. Robison, A.J. and E.J. Nestler, *Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(11): p. 623-37.
176. Maia, T.V. and M.J. Frank, *From reinforcement learning models to psychiatric and neurological disorders*. Nat Neurosci, 2011. **14**(2): p. 154-62.
177. Kreitzer, A.C. and R.C. Malenka, *Striatal plasticity and basal ganglia circuit function*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 543-54.
178. Deussing, J.M., *Targeted mutagenesis tools for modelling psychiatric disorders*. Cell Tissue Res, 2013. **354**(1): p. 9-25.
179. Taniguchi, H., et al., *A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex*. Neuron, 2011. **71**(6): p. 995-1013.
180. Schmidt-Supprian, M. and K. Rajewsky, *Vagaries of conditional gene targeting*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 665-8.
181. Galichet, C., R. Lovell-Badge, and K. Rizzoti, *Nestin-Cre mice are affected by hypopituitarism, which is not due to significant activity of the transgene in the pituitary gland*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11443.
182. Kim, G., et al., *ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies*. Neuron, 2020. **108**(5): p. 822-842.
183. Morimoto, R.I., *Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging*. Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1427-38.
184. Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck, *Toxic proteins in neurodegenerative disease*. Science, 2002. **296**(5575): p. 1991-5.
185. Mori, F., et al., *Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005. **31**(1): p. 53-61.

186. Kassouf, T., et al., *Targeting the NEDP1 enzyme to ameliorate ALS phenotypes through stress granule disassembly*. Sci Adv, 2023. **9**(13): p. eabq7585.