



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



Universidad
Nacional
de Córdoba

Mecanismo Molecular de la Activación de la Síntesis de Fosfolípidos por la Proto-oncoproteína c-Fos

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. en Química Andrés M. Cardozo Gizzi

Directora de Tesis
Dra. Beatriz L. Caputto

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba
(CIQUIBIC) – CONICET
Depto. De Química Biológica – Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Junio de 2015

Comisión de Tesis

Dr. Alfredo Cáceres

Dra. Graciela Panzetta

Dr. Marcos Villarreal

Evaluador Externo

Dr. Diego De Mendoza

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a las Instituciones involucradas: el CONICET, que me brindó el apoyo económico; la Facultad de Ciencias Químicas, donde me formé como estudiante de grado y postgrado; la Universidad Nacional de Córdoba, bajo cuyo paraguas protector nos encontramos y a la Agencia (ANPCyT) por la financiación recibida. En segundo lugar, al CIQUIBIC (entendido como un todo), por dejarme ser parte de esta gran familia. Porque en todo momento supe que se podía contar con lo que hiciera falta, que siempre iba a haber una mano amiga dispuesta a ayudar. Una mención especial merecen los responsables de la sala de Microscopía; Cecilia, Carlos y Marcelo, que siempre me apoyaron en lo que requerí. En tercer lugar, a mi comisión de Tesis, por seguirme estos años y brindarme sus consejos.

A mi directora de Tesis, que confió (y aún lo hace) plenamente en mí, por apoyar cada proyecto, cada idea, jugándose cada vez que lo necesité. Por sus consejos y afecto. Porque para ella no hay imposibles. A mis compañeros de laboratorio, porque nuestra relación trasciende lo laboral, porque me llevo muchos recuerdos, muchos lindos momentos compartidos. Porque me soportan todos los días, y hacen que mis días malos sean más soportables también. En especial a Gabriel, que fue quien me formó cuando empecé, porque es un docente de alma que me tuvo paciencia y sabe mucho pero mucho.

A mi familia, que me hizo la persona que hoy soy. A mi papá y mis hermanos, por estar siempre. A mi mamá que ya no puede verme. Sé que hubiera estado orgullosa. A mi familia política por todo su cariño. A mis amigos, por su incondicionalidad, por tantas risas y algunas lágrimas... y por todas las que vendrán.

Al último pero no la última, a Luli, por su permanente apoyo, amor y por nuestros proyectos compartidos. Porque es mi asesora principal. Por todo lo que significa para mí.

A todos Uds., eternamente gracias.

“Termina siempre así, con la muerte. Pero antes, hubo vida. Escondido debajo del bla, bla, bla, bla. Y todo sedimentado bajo los murmullos y el ruido. El silencio y el sentimiento, la emoción y el miedo. Los demacrados, caprichosos destellos de belleza. [...] Más allá, está el más allá. Yo no me ocupo del más allá. Por tanto, que esta novela dé comienzo. En el fondo, es sólo un truco. Sí, es sólo un truco.”

Jep Gambardella – La grande bellezza

A la memoria de mi madre.

Contenido

ABREVIATURAS UTILIZADAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
Membranas biológicas	2
Vías de síntesis de fosfolípidos	3
Lipinas	5
CDS – Vía del CDP-DAG	7
PIS	8
Biosíntesis de PIPs	9
PI4Ks tipo II	11
PI4Ks tipo III	12
c-Fos es un factor de transcripción tipo AP-1 con una función no genómica adicional	13
c-Fos como activador de la síntesis lipídica	14
Regulación de la función de c-Fos como activador de la síntesis de fosfolípidos	16
c-Fos en el crecimiento tumoral	16
c-Fos y un estado activado de la síntesis de lípidos	17
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
RESULTADOS	21
Efecto de c-Fos en la síntesis de PIPs <i>in vivo</i>	22
Las actividades CDS y PIK pero no la de PIS son activadas por c-Fos	22
Las actividades de CDS1 y PI4KII α son claves para la activación del marcado radioactivo de PtdInsP y PtdInsP ₂ promovido por FBS, no así la de PI4KII β	29
CDS1 y PI4KII α pero no PI4KII β participan en una asociación física con c-Fos	32

El domino BD sería el responsable de la activación de la síntesis de PIPs	35
La región N-terminal es la responsable de la asociación con CDS1	37
La región N-terminal es capaz de competir con c-Fos salvaje por su unión a la enzima PI4KII α	39
Activación de la actividad PAP por c-Fos	45
El BD de c-Fos sería el responsable de la actividad incrementada de Lipin 1	48
Fra-1, miembro de la familia Fos, a diferencia de c-Jun es capaz de activar a Lipin 1	49
Lipin 1 interacciona físicamente con c-Fos y Fra-1 pero no con c-Jun	50
c-Fos modifica la actividad de Lipin 1 al incrementar su capacidad catalítica	53
El dominio N-terminal de c-Fos es responsable de la asociación a Lipin 1	56
La región aa: 47-90 dentro del N-terminal de c-Fos estaría involucrado en la asociación Lipin 1/c-Fos	58
DISCUSIÓN	60
La activación de la síntesis de fosfolípidos por c-Fos es un fenómeno no genómico	61
c-Fos es capaz de activar tanto a CDS1 como a Lipin 1	62
¿Para qué son necesarios los lípidos cuya síntesis c-Fos incrementa?	65
Un mecanismo compartido para la activación de la síntesis	67
La naturaleza intrínsecamente desestructurada de c-Fos y su asociación a múltiples enzimas blanco	69
Fra-1 también incrementa la síntesis de lípidos	75
Conclusiones finales	77
MATERIALES Y MÉTODOS	78
BIBLIOGRAFÍA	93

ABREVIATURAS UTILIZADAS

aa: Aminoácidos

AP-1: Proteína Activadora-1

ASO: Oligonucleótido Anti-Sentido específico para c-Fos

BD: Dominio Básico de proteínas tipo AP-1

bZip: Dominio funcional de proteínas tipo AP-1 que comprende a BD y LZ

CDS: CDP-Diacilglicerol Sintasa

CDP-DAG: Citidina Difosfato – Diacilglicerol

CFP: Proteína Fluorescente Cyan

DAG: Diacilglicerol

DGK: Diacilglicerol Quinasa

FBS: Suero Fetal Bovino

FLIM: *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*

FRET: Transferencia de Energía Resonante de Förster

G3P: Glicerol-3-Fosfato

GlcCerS: Glucosilceramida Sintasa

IDPs: Proteínas Intrínsecamente Desestructuradas

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LZ: Dominio cierre de leucinas de proteínas tipo AP-1

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

PA: Ácido Fosfatídico

PAP: Fosfatasas de Ácido Fosfatídico

PBD: Dominio Polibásico de Lipin 1

PI4K: Fosfatidilinositol-4-quinasa

PIPs: Polifosfoinosítidos

PIS: Fosfatidilinositol Sintasa

PtdCho: Fosfatidilcolina

PtdEth: Fosfatidiletanolamina

PtdIns: Fosfatidilinositol

PtdInsP₂: Fosfatidilinositol bifosfato

PtdSer: Fosfatidilserina

RE: Retículo Endoplásmico

TAG: Triacilglicerol

YFP: Proteína Fluorescente Amarilla

RESUMEN

La proto-oncoproteína c-Fos es un factor de transcripción tipo AP-1 cuya función fue descrita hace más de 25 años (Curran & Morgan 1987). En su función canónica, c-Fos forma heterodímeros funcionales con proteínas de las familias Jun, ATF o JDP, que se unen a regiones específicas del ADN y promueven la transcripción de múltiples genes blanco (Hess et al. 2004). Esta actividad AP-1 ha sido involucrada en la transformación de señales de crecimiento de corta duración en cambios de larga duración al regular la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular. Evidencias previas del laboratorio han demostrado que la proteína c-Fos, de manera independiente de su actividad como factor de transcripción tipo AP-1, activa la síntesis de fosfolípidos al asociarse al retículo endoplásmico (Caputto et al. 2014). El objetivo principal de esta Tesis fue estudiar la actividad no genómica de c-Fos por la es capaz de activar la síntesis de lípidos, y en particular el mecanismo molecular por el cual c-Fos ejerce este efecto.

Encontramos que para alcanzar el incremento en el marcado radioactivo de todas las especies de fosfolípidos analizadas, c-Fos afecta positivamente solo etapas metabólicas específicas. Utilizando homogeneizados de células NIH3T3 quiescentes, encontramos que c-Fos recombinante activa *in vitro* la actividad de CDP-diacilglicerol sintasa, Lipin 1 y fosfatidilinositol 4-quinasa tipo II pero no fosfatidilinositol sintasa. La constante cinética V_{max} se incrementó para todas las enzimas analizadas mientras que no se observó ningún efecto en K_m , una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato.

Más aún, hemos probado la activación *in vitro* en un sistema purificado que contiene sólo a c-Fos, Lipin 1 y membranas modelo compuestas de micelas mixtas de Triton X-100/PA. En este sistema altamente simplificado, encontramos que c-Fos incrementa la actividad enzimática de Lipin1 sin modificar la afinidad de esta por las membranas modelo.

En orden de explicar el mecanismo de activación enzimática, realizamos ensayos de interacción proteína-proteína. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y de microscopía FRET establecimos una interacción física entre c-Fos y las enzimas que activa mientras que esta no se produce con aquellas enzimas cuya actividad c-Fos no regula.

El empleo de mutantes de delección permitió determinar que la región involucrada en la activación enzimática es diferente de la región responsable de la unión a enzimas

específicas, y que estas regiones de asociación/activación son comunes a todas las enzimas estudiadas. Mientras que la región de activación es el dominio básico de c-Fos, la región de asociación se encuentra en el N-terminal de la proteína.

Los resultados apoyan nuestra hipótesis de un mecanismo compartido en la activación de la síntesis de fosfolípidos en el que c-Fos se asocia físicamente con las enzimas responsables de la síntesis de fosfolípidos que es capaz de activar modificando su eficiencia catalítica sin alterar la afinidad de la enzima blanco por su sustrato. A su vez, refuerzan el concepto de una proteína que posee dos funciones diferenciales como lo son la de su actividad como factor de transcripción y la capacidad de incrementar actividades enzimáticas claves *per se*, para de esta forma sostener eventos de proliferación o diferenciación celular.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Membranas biológicas

Las membranas de células eucariotas son una compleja mezcla de glicerolípidos, esfingolípidos, proteínas y colesterol (Singer & Nicolson 1972) cuya síntesis requiere la actividad sincronizada de múltiples pasos metabólicos que son coordinados en varios niveles. Los lípidos son las especies moleculares cuantitativamente más importantes de las membranas celulares (Spector & Yorek 1985). Entre la vasta diversidad de lípidos existentes, los más abundantes son los glicerofosfolípidos [fosfatidilcolina (PtdCho), fosfatidiletanolamina (PtdCho), fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidilserina (PtdSer) y cardiolipina] (van Meer et al. 2008). La estructura de todos ellos deriva del glicerol-3-fosfato (G3P), que se esterifica en las posiciones sn-1 y sn-2 con dos ácidos grasos, para dar ácido fosfatídico (PA), y en el grupo fosforilo con alcoholes de bajo peso molecular como colina o etanolamina (Fig. 1). Aunque los glicerofosfolípidos son clasificados de acuerdo a la estructura de su cabeza polar (por ejemplo colina o inositol), cada clase de fosfolípido en realidad consiste en numerosas especies moleculares que contienen la misma cabeza polar pero se diferencian por las cadenas de los ácidos grasos que cada uno contiene (Wenk 2005). En consecuencia, las membranas celulares son formadas por cientos de moléculas de glicerofosfolípidos diferentes. Para alcanzar esta complejidad, las células eucariotas necesitan invertir importantes recursos: aproximadamente 5% de sus genes están involucrados en la síntesis de lípidos (Sud et al. 2007). La mayoría de los glicerofosfolípidos están presentes en todas las membranas celulares, pero la abundancia relativa varía significativamente de una organela a la otra. La síntesis de lípidos estructurales está limitada espacialmente, por lo que el metabolismo lipídico local es el primer determinante de la composición única de las distintas organelas (van Meer et al. 2008).

La biogénesis de membrana es un proceso complejo, fundamental para el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. Estos procesos acoplan señales de crecimiento ambientales con respuestas nucleares para generar cambios funcionales y morfológicos en la célula (Hermansson et al. 2011), que en conjunto necesitan de lípidos para la expansión de membrana. Los lípidos requeridos son provistos por el sistema de

endomembranas; en particular el retículo endoplásmico (RE), el principal sitio de síntesis de la mayoría de los fosfolípidos, y el complejo de Golgi (Fagone & Jackowski 2009).

Fosfolípidos, junto con colesterol y proteínas integrales de membrana son sintetizados en el RE e incorporados a membrana pre-existente. Membranas nacientes surgen desde los sitios de salida del RE y se mueven por transporte vesicular hacia la membrana plasmática pasando a través del complejo de Golgi, donde ocurren una serie de modificaciones post-traduccionales en la carga y las proteínas asociadas a membrana. La composición lipídica también es ajustada en el complejo de Golgi, especializado en la síntesis de esfingomielina, glucosilceramida y glicosfingolípidos complejos (Futerman & Riezman 2005). Adicionalmente, el transporte no vesicular tiene un rol relevante en la distribución y tráfico intracelular lipídico. Los intercambios de monómeros lipídicos, tanto espontáneos (lentos) como mediados por proteínas que transfieren lípidos (mucho más rápidos), son incrementados enormemente por sitios de contacto directo con membranas, definidos como pequeñas intersecciones entre el RE y prácticamente todas las otras organelas celulares (Lev 2010). La biogénesis de membrana es también sostenida con la inactivación de ciertas fosfolipasas frente a determinados estímulos, volviendo más lento el recambio permanente de un abundante rango de fosfolípidos (Manguikian & Barbour 2004, Bao et al. 2006).

Vías de síntesis de fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos constituyen las unidades estructurales mayoritarias de las membranas biológicas. Serán el principal objeto de estudio de esta Tesis, por lo que nos centraremos en la descripción de sus vías de síntesis (Fig. 1). El PA es un precursor central para la biogénesis de membrana (Brindley 1984, Carman & Han 2009). Como puede observarse en la Fig. 1, el PA se encuentra en un punto único de ramificación: puede ser transformado por una fosfatasa a diacilglicerol (DAG), un precursor común a toda la vía de Kennedy, o alternativamente puede ser derivado a la vía de síntesis del fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados por la enzima limitante de la vía, CDP-diacilglicerol sintasa (CDS) (Athenstaedt & Daum 1999).

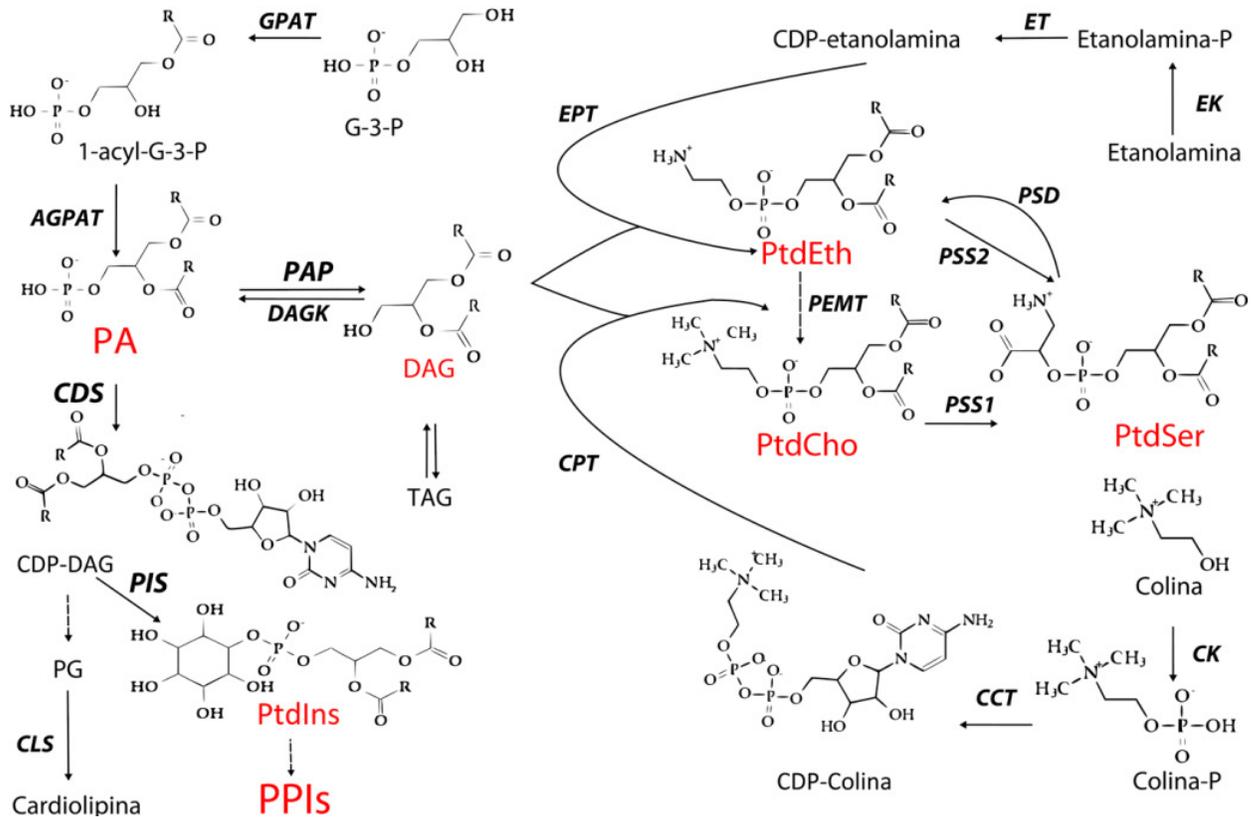


Figura 1. Vías de síntesis de fosfolípidos en células de mamífero. G3P, glicerol-3-fosfato; 1-acyl-3-G-P, 1-acylglicerol-3-fosfato; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol; CDP-DAG, citidina difosfato diacilglicerol; PtdIns, fosfatidilinositol; PIPs, polifosfoinosítidos; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolípidina; PtdEth, fosfatiletanolamina; PtdSer, fosfatidilserina; PtdCho, fosfatidilcolina; P-Etanolamina, fosfoetanolamina; CDP-Etanolamina, citidina difosfato etanolamina; P-Colina, fosfocolina; CDP-Colina, citidina difosfato colina. R representa una cadena acilo de 14-24 carbonos de longitud, con 0-6 dobles enlaces. Metabolitos claves se encuentran en color rojo. Las enzimas que catalizan cada uno de los pasos metabólicos son: GPAT, glicero fosfato aciltransferasa; AGPAT, acilglicerolfosfato aciltransferasa; PAP, fosfatasa de ácido fosfatídico; CDS, CDP-diacilglicerol sintasa; PIS, fosfatidilinositol sintasa; CLS, cardiolípidina sintasa; EPT, CDP-etanolamina: diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa; CPT, CDP-colina: diacilglicerol fosfotransferasa; EK, etanolamina quinasa; ET, CTP: fosfoetanolamina citidiltransferasa; CK, colina quinasa; CCT, CTP: fosfocolina citidiltransferasa; PEMT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; PSD, fosfatidilserina decarboxilasa; PSS, fosfatidilserina sintasa. Adaptado de Cardozo Gizzi & Caputto 2013.

En comparación con sus precursores y sus metabolitos, los niveles de PA son bajos en células en crecimiento a pesar del considerable flujo metabólico a través de PA requerido para sostener la síntesis de fosfolípidos. Además de su rol biosintético, tanto PA como DAG son también importantes en cascadas de transducción de señales (Stace & Ktistakis 2006). El PA se encuentra implicado en regulación de la transcripción, activación del crecimiento celular, biogénesis de membrana, secreción extracelular y transporte vesicular mientras que el DAG se encuentra principalmente involucrado en la activación de proteína quinasa C (PKC), aunque también se ha descrito la activación de otras quinasas también importantes en señalización celular como por ejemplo proteína quinasa D o quinasas de DAG β and γ (Brose et al. 2004, Wang et al. 2006, Carrasco & Merida 2007).

Inicialmente se caracterizaron bioquímicamente dos grupos distintos de fosfatasa de PA (PAP), PAP-1 y PAP-2. Estas últimas se denominaron posteriormente LPP (*lipid phosphate phosphatases* o fosfatasa del fosfato de lípidos) debido a que no son específicas para PA. Su actividad es independiente de Mg^{+2} y sus principales funciones están relacionadas a la transducción de señales a nivel de la membrana plasmática (Pascual & Carman 2013). En cambio, las enzimas con actividad PAP-1 fueron clonadas y denominadas Lipinas.

Lipinas

Las Lipinas son enzimas PAP dependientes de Mg^{+2} , que están involucradas en la síntesis *de novo* de fosfolípidos y lípidos neutros (Harris & Finck 2011). A diferencia de la mayoría de las enzimas de la vía de Kennedy, las Lipinas no son proteínas integrales de membrana sino que se unen a membrana de forma periférica, por lo que necesitan translocar desde el citosol hacia el RE para participar en la síntesis de glicerolípidos (Coleman & Lee 2004, Csaki & Reue 2010).

El dominio polibásico de Lipin 1 (PBD) es un segmento compuesto por nueve residuos básicos consecutivos que está involucrado en la unión selectiva a PA, lo que promueve la translocación de la enzima a membranas. El dominio PBD de Lipin 1 es también su principal señal de localización nuclear. Ha sido propuesto que el rol dual de PBD es regulado a partir de los niveles de PA: un contenido elevado de PA en las membranas citoplásmicas antagoniza

la localización nuclear de Lipin 1 (Ren et al. 2010). Existen evidencias de que las Lipinas dentro del núcleo juegan un rol en la regulación directa de la transcripción de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (Harris & Finck 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que Lipin 1 interacciona directamente con el receptor PPAR α , un factor de transcripción clave para el metabolismo de lípidos en el hígado, y con su co-activador PGC-1 α (Finck et al. 2006). Debido a que Lipin 1 no posee una secuencia de unión a ADN reconocible, la evidencia indica que Lipin 1 incrementaría la actividad de estos complejos de factores de transcripción al reclutar otras proteínas co-activadoras con la habilidad de modificar enzimáticamente la cromatina (Siniosoglou 2013).

En los últimos años las Lipinas han sido intensamente estudiadas dado su rol clave en la síntesis de fosfolípidos (Pascual & Carman 2013). Su actividad se encuentra sujeta a estrictos mecanismos de regulación, dados principalmente por múltiples fosforilaciones. Estas son mediadas por varias quinasas, por ejemplo quinasas dependientes de ciclinas (Grimsey et al. 2008) y mTOR (Huffman et al. 2002, Harris et al. 2007), que inducen su disociación de la membrana. La fosforilación de las Lipinas altera su localización subcelular y las proteínas con las que interactúa, cambiando indirectamente la actividad PAP al impedir que se encuentre con el sustrato y/o directamente al disminuir el reconocimiento o la afinidad por el sustrato (Harris & Finck 2011, Eaton et al. 2013). El reconocimiento por el dominio PBD del PA di-aniónico promueve la asociación a membrana, mientras que la fosforilación mediada por mTOR inhibe dicho reconocimiento (Eaton et al. 2013). La Lipin 1 hiper-fosforilada se asocia a las proteínas citosólicas 14-3-3 lo que facilita su retención en el citosol (Peterfy et al. 2010). Por otro lado, el complejo transmembrana CTDNEP1-NEP1R1 (que es el ortólogo del Nem1p-Spo7p de levaduras) es capaz de defosforilar a Lipin y consecuentemente actúa en la vía de activación de Lipin. Sin embargo, aún no está esclarecido si para ser defosforilada por el complejo CTDNEP1-NEP1R1, la Lipin que se encuentra citosólica debe llegar a la región perinuclear (donde reside el complejo) o si Lipin 1 puede ser también defosforilada en el citosol por fosfatasas desconocidas (Han et al. 2012).

En conclusión, Lipin 1 es capaz de regular la síntesis de lípidos en múltiples niveles. Al regular el destino de PA a través de su actividad PAP, puede controlar directamente la

síntesis de fosfolípidos, mientras que puede hacerlo indirectamente al modular la actividad de factores de transcripción relevantes para el metabolismo de lípidos. Ambas actividades poseen claras separaciones espaciales: mientras que la actividad PAP de las Lipinas se ejerce en las membranas nucleares/reticulares, la actividad como activador co-transcripcional ocurre dentro del núcleo.

CDS – Vía del CDP-DAG

Como se mencionó anteriormente, el PA puede ser sustrato de la familia de Lipinas que lo convierten en DAG o, en cambio, ser sustrato de la enzima CDP-DAG sintasa (CDS) que cataliza la conversión PA a CDP-DAG (Heacock & Agranoff 1997). El CDP-DAG es el precursor de PtdIns y sus derivados fosforilados, además de fosfatidilglicerol o cardiolipina. La biosíntesis y metabolismo de PtdIns es de considerable interés debido a la participación de este lípido y sus derivados fosforilados en la traducción de señales (Di Paolo & De Camilli 2006). Esta enzima tiene un rol clave entonces en la síntesis de fosfolípidos en general y en la de polifosfoinosítidos (PIPs) en particular. La enzima es integral de membrana y es la limitante de la vía (Heacock & Agranoff 1997). Recientemente se cristalizó el homólogo de CDS del organismo procarionta *Thermotoga maritima* (Liu et al. 2014).

Dos isoformas han sido identificadas en mamíferos, CDS1 y CDS2, las cuales han sido descritas localizando en el RE (Saito et al. 1997, Volta et al. 1999, Inglis-Broadgate et al. 2005). El ARNm de CDS2 muestra un patrón de expresión ubicua en ratón, en tanto el ARNm de CDS1 se ha encontrado en cerebro, ojo, músculo liso, riñón y testículo. En ojo, CDS1 está altamente expresada en la capa de fotorreceptores de retinas de adulto, lo que sugiere un rol de CDS1 en la fototransducción de señales a través de la formación de PIP₂ en mamíferos (Inglis-Broadgate et al. 2005). Este rol fue también probado en invertebrados: en la fototransducción en *Drosophila* se requiere de la enzima CDS para la regeneración de PtdInsP₂; los animales mutantes para esta enzima sufren una degeneración retinal mediada por luz (Volta et al. 1999). En otro reporte, la mutación de CDS2 en pez cebra produce defectos específicos en angiogénesis y en la formación de vasos sanguíneos, que fueron atribuidos a la depleción de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ en células endoteliales estimuladas por el factor de crecimiento VEGF. En estos estudios se concluyó que la actividad de la

enzima CDS era necesaria para mantener una reserva de PtdIns(4,5)P₂ para señalización celular (Pan et al. 2012).

Ambas isoformas de CDS son inhibidas tanto por PtdInsP como por PtdInsP₂, en un mecanismo clásico de inhibición por un producto final de la vía (Saito et al. 1997, D'Souza et al. 2014). Más allá de estos reportes, no hay otras pruebas de mecanismos regulatorios endógenos para esta enzima. Existe un estudio que mostró cómo drogas antidepresivas inducen la actividad de CDS, incrementando así la disponibilidad de CDP-DAG y facilitando la síntesis de PtdIns (Aboukhatwa & Undieh 2010), y que postuló entonces la importancia de esta enzima en cascadas de señalización mediadas por este lípido y sus derivados fosforilados en células neurales en humanos.

PIS

La segunda enzima de la vía de síntesis de PIPs se denomina CDP-diacilglicerol:myo-inositol 3-fosfatidil-transferasa o fosfatidilinositol sintasa (PIS). Cataliza la condensación de una molécula de myo-inositol y una de CDP-DAG para formar PtdIns. Un único gen que codifica para esta enzima fue clonado y caracterizado en mamíferos (Tanaka et al. 1996, Lykidis et al. 1997). PIS es una proteína de 213 aminoácidos (aa) que se expresa uniformemente en todos los tejidos humanos analizados. Estos estudios confirmaron además que PIS es responsable tanto de la actividad de síntesis de PtdIns como así también de la de recambio de myo-inositol en una molécula de PtdIns ya formada (Lykidis et al. 1997).

Estudios en pez cebra con una mutante para este gen indican que la falta de síntesis *de novo* de PtdIns genera estrés crónico del RE lo que conduce por ejemplo a esteatosis hepática (Thakur et al. 2011) y a daño e inflamación de la mucosa intestinal (Thakur et al. 2014). A su vez, esta mutante posee defectos estructurales del cristalino ocular y un reducido número de fotorreceptores (Murphy et al. 2011).

Un trabajo reciente mostró que PIS se localiza no solo en el RE, donde co-localiza con CDS1 y CDS2, sino también en un compartimento vesicular altamente móvil en donde estas últimas enzimas quedan excluidas. Estas vesículas emergen desde la red membranosa del RE en forma dependiente de la GTPasa pequeña Sar1 y es donde se concentra la mayor

actividad PIS. Es importante remarcar que estas vesículas que contienen PIS no son simplemente vesículas de transporte que se dirigen al aparato de Golgi, ya que no se observa fusión de las mismas con esta organela. En cambio, se postula que este compartimento hace contactos con una gran cantidad de membranas permitiendo así el intercambio directo de lípidos (Kim et al. 2011). En un estudio posterior de otro grupo se confirmó la existencia de estas estructuras altamente móviles que contienen PIS pero también CEPT (la última enzima en la vía de síntesis de PtdCho) y dependen de otra GTPasa pequeña llamada Rab10 para formar este compartimento que es o bien un extremo que crece o que ha emergido desde el RE (English & Voeltz 2013).

Biosíntesis de PIPs

Los PIPs son molecularmente diversos debido a la fosforilación variable de sus grupos hidroxilo del anillo inositol (Fig. 2). La configuración de las siete especies de PIPs conocidos es controlada rápida y reversiblemente por una batería de quinasas y fosfatasas que interconvierten PIPs y que debido a ello resultan críticas para la localización y función de cada uno de los distintos isómeros (Sasaki et al. 2009). Asimismo, se han identificado un gran número de módulos de proteínas capaces de reconocer a isómeros específicos de PIPs (Czech 2003, Wenk & De Camilli 2004). Esto ha definido un paradigma en la regulación mediada por PIPs en donde los mismos controlan una variedad de fenómenos de señalización y tráfico celular al reclutar proteínas reguladoras hacia complejos de señalización ubicados en membranas celulares (Balla & Balla 2006). De esta forma, los PIPs están involucrados en el transporte vesicular, secreción y endocitosis (Balla et al. 2009), la organización de citoesqueleto (Janmey 1994, Gilmore & Burridge 1996) y la estimulación de las cascadas de proteína quinasas (Noh et al. 1995, Franke et al. 1997, Downward 2004). Las distintas clases de PIPs son además importantes para definir la identidad de las organelas (van Meer et al. 2008).

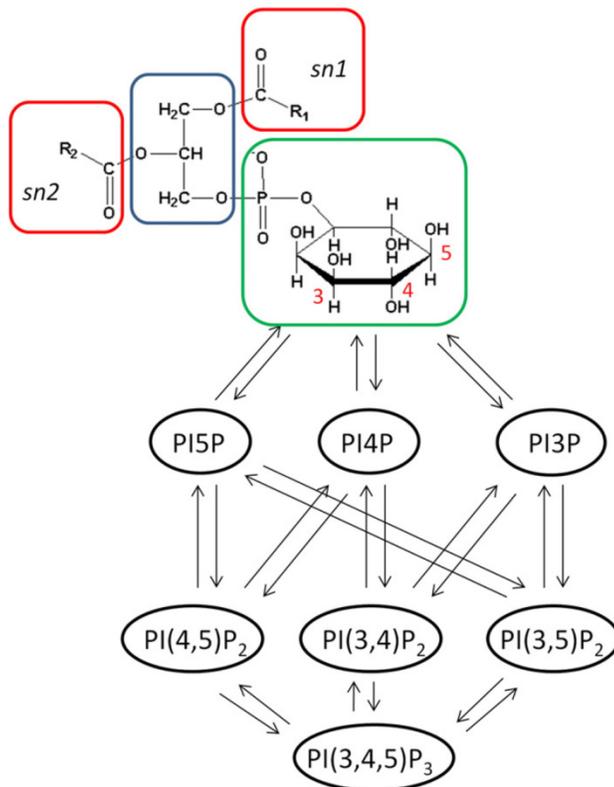


Figura 2. Estructura y formación de PIPs. El fosfatidilinositol está formado por un esqueleto de glicerol (recuadro azul), dos cadenas acilo en las posiciones *sn1* y *sn2* (recuadros en rojo) y una molécula de *myo*-inositol (recuadro verde). Los grupos hidroxilo pueden ser fosforilados en las posiciones 3,4 y 5, lo que permite la formación de hasta siete especies distintas de PIPs. La producción de cada una de estas especies depende de las acciones muy reguladas de las quinasas y fosfatasas de estos lípidos. Las distintas especies pueden ser interconvertidas según se indica con las flechas. Adaptado de D'Souza & Epand 2014.

PI4Ks

Las fosfatidilinositol-4-quinasas (PI4Ks) fosforilan al anillo de inositol en la posición D4 para producir PtdIns4P. A la fecha, en base a la estructura de sus dominios y la sensibilidad a inhibidores, se han identificado cuatro PI4K en mamíferos que se clasifican como tipo II: PI4II α y PI4II β ; y tipo III: PI4III α y PI4III β (Balla & Balla 2006). Las PI4K tipo III tienen un dominio quinasa C-terminal similar a PI3Ks y son sensibles a los mismos inhibidores como por ejemplo wortmanina (Balla 1998). Por otro lado, la región catalítica de las PI4K tipo II se diferencian sustancialmente de las otras, son insensibles a wortmanina pero en cambio son sensibles a adenosina. Cada isoenzima localiza en un compartimiento celular específico en un tejido específico, sugiriendo que cada una de ellas produce PtdIns4P requerido en una función celular diferente.

PI4Ks tipo II

Se discutirán las características de ambas isoformas, α y β , en forma conjunta. Tanto PI4KII α como β se encuentran fuertemente unidas a membranas, debido a la palmitoilación de un segmento conservado de cisteínas que se encuentra dentro del dominio catalítico. A pesar de tener una secuencia de palmitoilación muy similar, una fracción más importante de PI4KII β respecto de PI4KII α no se encuentra palmitoilada y consecuentemente se encuentra en el citoplasma (Jung et al. 2008). PI4KII β es más soluble y menos activa que PI4KII α , pero puede asimismo ser movilizada y activada al haber un estímulo como por ejemplo el del factor de crecimiento PDGF (Wei et al. 2002).

Tanto PI4KII α como PI4KII β se expresan en forma ubicua en tejidos humanos. Northern blot de tejidos humanos han mostrado que el contenido de ARNm de PI4KII β es mayor en hígado mientras que para PI4KII α es mayor en el cerebro (Minogue et al. 2001, Balla et al. 2002). A nivel subcelular, análisis inmunoquímicos y de fraccionamiento subcelular han mostrado que PI4KII α en su forma palmitoilada se ubica en las membranas del RE, trans-Golgi y endosomas (Wang et al. 2003, Waugh et al. 2003).

PI4KII α y PI4KII β son proteínas de un peso molecular cercano a 55 kDa. La comparación de secuencias entre las dos isoformas revela un alto grado de similitud en el dominio catalítico C-terminal con una homología significativamente menor en la región N-terminal, que comprende los primeros 100 residuos aminoacídicos. PI4KII α en el N-terminal posee una región rica en prolina, mientras que PI4KII β no la tiene y en cambio muestra una región ácida. El N-terminal de PI4KII α es necesario para enviarla hacia membranas específicas, incluyendo vesículas positivas para GLUT4 (Xu et al. 2006). Aún no está esclarecido el rol del N-terminal de PI4KII β , si bien se estableció que sufre en esta región una fosforilación, esta no influye en su asociación a membranas o actividad. Más aún, los últimos 160 aa en el C-terminal parecen ser los determinantes en la diferencia de solubilidades, estado de palmitoilación o redistribución dependiente de estímulo (Jung et al. 2008). En cambio, se ha sugerido que la región N-terminal divergente media interacciones proteína-proteína específicas.

Respecto de las funciones biológicas atribuidas a estas enzimas, ha sido descrito que PI4KII α es necesaria para la producción de PtdIns4P en el aparato de Golgi y la red *trans*-Golgi y que esto regula el reclutamiento a membranas de adaptadores de clatrina como por ejemplo los complejos proteicos adaptadores tipo I (Wang et al. 2003, Wang et al. 2007) y tipo III (Craigie et al. 2008). Otro estudio demostró que la mayor parte de la actividad PI4K en el cerebro proviene de PI4KII α , donde además se la encontró asociada a vesículas sinápticas y se la relacionó con la neurotransmisión (Guo et al. 2003). En cambio, PI4KII β podría estar asociada a señalización intracelular, ya que se la encontró asociada *in vivo* al complejo de membrana TCR-CD3 (Srivastava et al. 2006).

PI4Ks tipo III

Existen dos tipos de quinasas tipo III: PI4KIII α (~230 kDa) y PI4KIII β (~92 kDa) (Nakagawa et al. 1996, Nakagawa et al. 1996). Ambas contienen un dominio quinasa C-terminal similar al de las PI3Ks, y ambas son sensibles a wortmanina.

La enzima PI4KIII α es la principal responsable de la generación del PtdIns4P de membrana plasmática (Balla et al. 2005, Balla et al. 2008), a pesar de que su localización inicialmente había sido descrita en la interface RE/Golgi (Nakagawa et al. 1996). A diferencia de la isoforma β , que se expresa en forma ubicua, la isoforma α se encuentra expresada principalmente en cerebro, aunque se detectaron niveles bajos en varios otros órganos (Zolyomi et al. 2000).

La información disponible al presente permite inferir que PI4KIII β regula, mediante la formación de PtdIns4P, el tráfico desde Golgi hacia membrana plasmática (Bruns et al. 2002, Godi et al. 2004). Esta enzima se localiza principalmente en el Golgi (Godi et al. 1999), aunque también se ha descrito que transloca desde el citosol al núcleo, si bien se desconoce la función precisa que allí ejerce (de Graaf et al. 2002).

c-Fos es un factor de transcripción tipo AP-1 con una función no genómica adicional

Células que se encuentran en un proceso activo de proliferación o en eventos de expansión de la membrana demandan la biogénesis de membrana en forma masiva, por lo que es razonable esperar que la homeostasis de las organelas sea diferente de aquellas células que no se están dividiendo o creciendo activamente. Sin embargo, la naturaleza de los eventos que regulan estos procesos todavía es pobremente entendida. Desde un punto de vista simplista los mecanismos que regulan la síntesis lipídica pueden ser divididos en dos: una al nivel de la transcripción y la traducción de las enzimas involucradas (regulación génica) y otra al nivel post-transcripcional (regulación no-genómica). En mamíferos, la familia de factores de transcripción SREBPs, actúa a nivel central controlando la expresión de receptores de lipoproteínas de baja densidad junto con los genes para la síntesis *de novo* de colesterol y ácidos grasos (Nohturfft & Zhang 2009).

En cambio, diversos mecanismos no-genómicos existen y aparecen como respuestas rápidas frente a cambios en la necesidad de síntesis de fosfolípidos (Cardozo Gizzi & Caputto 2013). Dentro de estas respuestas no genómicas a la demanda de síntesis de lípidos, nos concentraremos en aquellas producidas por la proteína de interés central para esta tesis: c-Fos. Esta proteína fue descrita como un miembro de la familia de factores de transcripción inducibles denominado Proteína Activadora 1 (AP-1) hace más de 25 años (Curran & Morgan 1987). El contenido celular de c-Fos se encuentra estrictamente regulado: mientras que en células quiescentes se encuentra al límite de detección, su expresión es rápida y transitoriamente inducido frente a diversos estímulos como por ejemplo factores de crecimiento, estimulación sensorial o liberación de neurotransmisores (Kovary & Bravo 1992, Ginty et al. 1994, Hughes & Dragunow 1995, Caputto & Guido 2000, Maggiolini et al. 2004) . Un trabajo pionero de Hunt y colaboradores mostró como después de la estimulación sensorial se inducía rápidamente la expresión de c-Fos en neuronas espinales de rata (Hunt et al. 1987). A partir de allí, múltiples estudios publicados proveyeron evidencia de que condiciones tanto fisiológicas como patológicas son capaces de inducir la expresión de c-Fos y otros miembros de su familia de factores de transcripción en el sistema nervioso central junto con otros tipos celulares.

AP-1 es un factor de transcripción homo- o heterodimérico compuesto por proteínas que pertenecen a la familias de Fos, Jun, ATF o JDP (Shaulian & Karin 2001). Todos los miembros AP-1 poseen un dominio bZip, que consiste en un dominio básico (BD) adyacente a un motivo de cierre de leucinas. El BD está implicado en la unión secuencia-específica del AP-1 al ADN mientras que los residuos conservados de leucinas permiten la dimerización y consecuentemente la formación de los dímeros AP-1 transcripcionalmente activos (Neuberg et al. 1989). Mientras que la familia Jun existe como homo o heterodímeros, la familia Fos, que no puede homodimerizar, forma heterodímeros estables principalmente con las proteínas Jun. (Hess et al. 2004). Debido a que la dimerización es un pre-requisito para la unión al ADN, c-Fos no se asocia al ADN por sí mismo (Halazonetis et al. 1988).

La actividad AP-1 ha sido involucrada en la transformación de señales de crecimiento de corta duración en cambios de larga duración al regular la expresión de genes blanco involucrados en el crecimiento celular como por ejemplo colagenasa (Angel et al. 1987), metaloproteasa-3 (Kerr et al. 1990), metalotioneina IIA (Lee et al. 1987) o de genes críticos para la re-entrada al ciclo celular como ciclina D1 (Brown et al. 1998). Cuando el correspondiente estímulo cesa, c-Fos se degrada rápidamente, con una vida media que va desde el minuto a la hora, dependiendo del tipo celular (Basbous et al. 2008, Adler et al. 2010).

c-Fos como activador de la síntesis lipídica

c-Fos ejerce un rol relevante en la regulación del crecimiento, diferenciación así como también en procesos de transformación celular (Curran & Franza 1988, Cohen & Curran 1989). Estudios de nuestro laboratorio han establecido que c-Fos tiene dos funciones que lo sitúan como capaz de regular el crecimiento celular no solo con su actividad como factor de transcripción sino también al actuar como un activador de la biosíntesis de lípidos en procesos celulares tanto normales como patológicos que demandan altas tasas de biogénesis de membrana. La activación de la síntesis de lípidos ha sido observada en diferentes tipos celulares: *in vivo* en células ganglionares retinales y fotorreceptoras estimuladas por luz (Guido et al. 1996, Bussolino et al. 1998), en fibroblastos que se encuentran proliferando

(Bussolino et al. 2001), en células PC12 inducidas a diferenciar (Gil et al. 2004, Crespo et al. 2008), en tumores del sistema nervioso central y periférico (Silvestre et al. 2010, Gil et al. 2012) y en tumores mamarios humanos malignos (Motrich et al. 2013).

En la retina, se observó que ante la estimulación lumínica de pollos se produce un incremento tanto en expresión de c-Fos como en la síntesis de lípidos en células ganglionares de la retina (Guido et al. 1996, Bussolino et al. 1998). Al bloquear específicamente la expresión de c-Fos se bloquean las modificaciones inducidas por luz en la síntesis de fosfolípidos. Debido a que la liberación de neurotransmisores ocurre en luz en células ganglionares, se interpretó que el pico en la expresión de c-Fos responde a la necesidad de la célula de incrementar la tasa de síntesis de membrana para restablecer el reciclado de vesículas sinápticas ante la liberación de neurotransmisores (de Arriba Zerpa et al. 1999, Caputto & Guido 2000).

La biogénesis de membrana requiere del suministro coordinado de todos sus componentes integrales. En este sentido, fue notable como en células ganglionares el marcado isotópico realizado tanto *in vivo* (^3H -glicerol o ^{32}P -ortofosfato) como *in vitro* (^{32}P - γ -ATP) mostró consistentemente que la marcación de todos los fosfolípidos analizados se incrementó de manera similar, de un modo dependiente de c-Fos, en luz con respecto a oscuridad. Resultados concordantes fueron encontrados en células PC12 inducidas a diferenciar con factor de crecimiento nervioso (NGF) a un fenotipo similar a neuronas simpáticas. c-Fos activa el marcado metabólico general tanto de fosfolípidos (Gil et al. 2004) como de glicolípidos (Crespo et al. 2008). Al bloquearse la expresión de c-Fos se detiene tanto la activación de síntesis de lípidos como así también la neuritogénesis. Análisis por TLC de los extractos lipídicos luego del marcado isotópico de estas células con ^{14}C -Galactosa o con ^{32}P -ortofosfato mostraron un incremento del 50-60% en todos los glicolípidos marcados con ^{14}C y de PtdCho, que también se marca en este ensayo. Asimismo, todos los fosfolípidos marcados con ^{32}P también mostraron resultados similares. Estos resultados son compatibles con una estimulación global de la maquinaria de síntesis de lípidos en la respuesta a NGF mediada por c-Fos.

Regulación de la función de c-Fos como activador de la síntesis de fosfolípidos

La capacidad de c-Fos para activar la síntesis lipídica en el citoplasma requiere de la asociación de c-Fos al RE (Bussolino et al. 2001), el sitio de síntesis cuantitativamente más importante de la célula. Esta asociación al RE está regulada por el estado de fosforilación de los residuos de tirosina 10 y 30 de c-Fos. Células quiescentes tienen cantidades muy pequeñas de c-Fos que, además, se encuentra fosforilado en dichos residuos y por tanto disociado del RE. Al inducir a las células a proliferar, se promueve la expresión de c-Fos conjuntamente con la desfosforilación de esta proteína, lo que resulta en su asociación a las membranas del RE y en la activación de la síntesis de lípidos (Portal et al. 2007).

c-Src fue identificada como la primer quinasa y TC45-PTP como la primer fosfatasa que actúan sobre los residuos de tirosina de c-Fos (Ferrero et al. 2012). Estudios de fraccionamiento subcelular y de marcado con ^{32}P -ATP evidenciaron que c-Fos fosforilado es incapaz de unirse a membranas y en consecuencia no activa la síntesis de fosfolípidos. La regulación de esta modificación post-traducciona reversible se encuentra en la etapa de desfosforilación. La inducción de las células con mitógenos promueve la concomitante translocación de TC45-PTP desde el núcleo hacia el citoplasma, su activación y la formación del complejo transitorio c-Fos/TC45 que resulta en la desfosforilación de c-Fos (Ferrero et al. 2012). Diferentes estudios han demostrado la activación de c-Src con el estímulo celular, (revisado en Hunter 2009). Sin embargo, en el modelo celular empleado, no se observó un incremento en la fosforilación de c-Fos frente al estímulo, lo que indicaría que la actividad de c-Src basal es suficiente para mantener las pequeñas cantidades de c-Fos presente en células quiescentes en su estado fosforilado. Es importante remarcar que la fosforilación en tirosina tiene un efecto represor de la actividad no genómica de c-Fos mientras que la fosforilación en serinas/treoninas tiene un efecto trans-activador de su actividad como AP-1.

c-Fos en el crecimiento tumoral

Existe abundante información acerca de los eventos genómicos que se encuentran detrás del crecimiento exacerbado característico de células tumorales (Hanahan & Weinberg 2011). En cambio, son escasos los estudios respecto de los cambios pleiotrópicos que

necesariamente acompañan el crecimiento tumoral. En este contexto, altas tasas de proliferación correlacionan estrictamente con una elevada expresión de c-Fos junto con altas tasas de síntesis de fosfolípidos en modelos tumorales. Bloqueando específicamente la síntesis de fosfolípidos dependiente de la expresión de c-Fos se reduce significativamente la proliferación en cultivo de células T98G, que derivan de un glioblastoma multiforme humano. Más aún, al tratar ratones atímicos xeno-transplantados con estas células en el lugar de la lesión con un oligonucleótido ARNm antisentido (ASO) específico para c-Fos, se impide el crecimiento tumoral que de otro modo se desarrolla en el 90% de los animales control (Gil et al. 2012). Resultados concordantes fueron encontrados en ratones NPCis, un modelo animal de la enfermedad humana Neurofibromatosis tipo I, que a los 5-6 meses de edad generan espontáneamente tumores del sistema nervioso central y periférico con una penetrancia del 100%. Los tumores ya formados crecen significativamente más lento que en los controles cuando los ratones NPCis son tratados con ASO para c-Fos. Finalmente, ratones NPCis homocigotas nulos para c-Fos no desarrollan tumores, en contraste con el 71.4% de sus hermanos de camada Fos +/- que si lo hacen (Silvestre et al. 2010).

c-Fos y un estado activado de la síntesis de lípidos

No solo patologías asociadas a tumores muestran c-Fos asociado al RE, en la médula espinal de ratas sensibilizadas para desarrollar encefalomiелitis alérgica en la que se promueve gliosis, se induce la expresión de c-Fos y este se encuentra asociada al RE (Cammer et al. 1989). La actividad no genómica de c-Fos promueve un estado activado de síntesis de fosfolípidos que se ha probado como necesario en modelos de crecimiento, proliferación y/o diferenciación celular para sostener estos procesos. En un reporte reciente, se estudiaron cambios globales en la transcripción inducidos por c-Fos de una manera independiente a su actividad AP-1. Se encontró que estos eran la consecuencia de la síntesis nuclear dependiente de c-Fos de PtdIns(4,5)P₂ (Ferrero et al. 2014), un lípido involucrado en la remodelación de cromatina (Viiri et al. 2012). De esta manera, c-Fos integra ambas funciones, tanto como i) activador de la síntesis lipídica (Caputto et al. 2014) como ii) un modulador transcripcional (Angel & Karin 1991).

CAPITULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los ejemplos planteados hasta aquí apuntan a la existencia de un mecanismo compartido que permite un aumento en el abastecimiento de lípidos y nos permite formular la siguiente hipótesis causa-consecuencia: 1) La expresión de c-Fos es rápidamente inducida por factores externos, que llevan a 2) un incremento tanto en la actividad AP-1 como en la activación de la síntesis de fosfolípidos que en consecuencia sostienen 3) proliferación o diferenciación celular. El tiempo y la localización de estas dos funciones dentro de la célula son distintos. c-Fos nuclear es necesario en etapas iniciales para desencadenar los correspondientes programas génicos, participando entonces en preparar a las células para crecer, mientras que c-Fos citoplásmico es necesario para mantener una tasa elevada de síntesis lipídica tanto en etapas del crecimiento iniciales como tardías (Gil et al. 2004, Ferrero et al. 2012, Gil et al. 2012, Cardozo Gizzi & Caputto 2013).

Distintos reportes del grupo han ido avanzando en el conocimiento de los fenómenos dependientes de c-Fos. El objetivo principal de esta Tesis fue estudiar el mecanismo molecular por el cual c-Fos es capaz de activar la síntesis de lípidos: la manera en que consigue incrementar el marcado radioactivo de todas las especies de fosfolípidos analizadas.

En fibroblastos NIH 3T3 quiescentes estimulados a reingresar al ciclo celular, se produce la rápida inducción transcripcional de c-Fos, en el orden de minutos (Greenberg & Ziff 1984). Se producen dos ondas de expresión de c-Fos que son necesarias para que genere concomitantemente la estimulación en la incorporación de ^{32}P -ortofosfato a fosfolípidos *in vivo* (Bussolino et al. 2001). La primera onda de marcado radioactivo incrementado de lípidos tiene un pico a 7,5 minutos post-estímulo y regresa a niveles del control a los 15 minutos; la segunda onda empieza a los 30 minutos y se mantiene elevada al menos hasta 120 minutos, el tiempo más largo examinado. Los lípidos que incorporan ^{32}P durante la primera onda son PIPs, predominantemente segundos mensajeros ubicuos, mientras que en la segunda onda los productos radioactivos mayoritarios son los principales lípidos constituyentes de membranas. La vida media del ARNm de c-Fos es muy corta en la primer onda, de solo 10 minutos, en tanto es de alrededor de 85 minutos en la segunda onda (Bussolino et al. 2001).

Este antecedente fue el disparador de esta tesis doctoral, ya que nos propusimos estudiar en detalle este fenómeno. El modelo de estudio empleado a lo largo de la tesis será

entonces la mencionada línea celular y particularmente la transición G_0/G_1 inducida por el agregado de suero fetal bovino (FBS) al 20% a células que se encuentran quiescentes luego de permanecer 48 horas deprivadas de factores de crecimiento. Se utilizará este sistema como modelo para estudiar la respuesta celular a un rápido requerimiento de síntesis de lípidos frente a un estímulo externo. Se pretende resolver estos interrogantes mediante un enfoque conjunto de técnicas bioquímicas clásicas junto con microscopía confocal de fluorescencia.

En otros modelos celulares ya se había observado que c-Fos activa el marcado radioactivo de todos los lípidos analizados. Sin embargo, no se conocía si este efecto estaba dado por la activación de todas las vías metabólicas involucradas o si en cambio c-Fos actuaba sobre etapas específicas. Uno de los objetivos específicos fue el de establecer qué etapas metabólicas c-Fos está afectando a partir del estudio de las mismas *in vitro*. La hipótesis es que c-Fos sólo afecta etapas claves, ¿pero cómo lo hace? Nos propusimos estudiar las posibles interacciones directas con las enzimas cuyos pasos metabólicos c-Fos incrementa. Para hacerlo, la idea fue emplear co-inmunoprecipitaciones por su robustez pero también avanzar en el empleo de microscopía de fluorescencia para obtener información espacial y temporal del fenómeno.

Otro de los objetivos planteados fue el de establecer la región de c-Fos involucrada en la función no genómica, conociendo por resultados anteriores que la región básica, involucrada en la unión al ADN, también parecía clave en la función no genómica. El enfoque empleado fue genético, generando mutantes de delección de c-Fos y estudiar la pérdida de función de las mismas en la activación de la síntesis lipídica.

Por último, queda planteado el interrogante de cómo se activan vías metabólicas para dar como producto lípidos distintos. El PA es un intermediario clave en la síntesis de glicerofosfolípidos ya que puede derivado tanto a la vía de PIPs como a la vía de Kennedy que dará lugar finalmente a PtdCho, PtdEth y PtdSer. En el mencionado reporte (Bussolino et al. 2001), se indicó que existen las dos ondas de activación del marcado radioactivo de lípidos que depende de c-Fos en donde los lípidos que incorporan ^{32}P durante la primera onda son diferentes a los de la segunda. Esto despertó un interés por parte mía para continuar estudiando el destino final de PA en este sistema y su dependencia en la expresión de c-Fos.

CAPITULO III

RESULTADOS

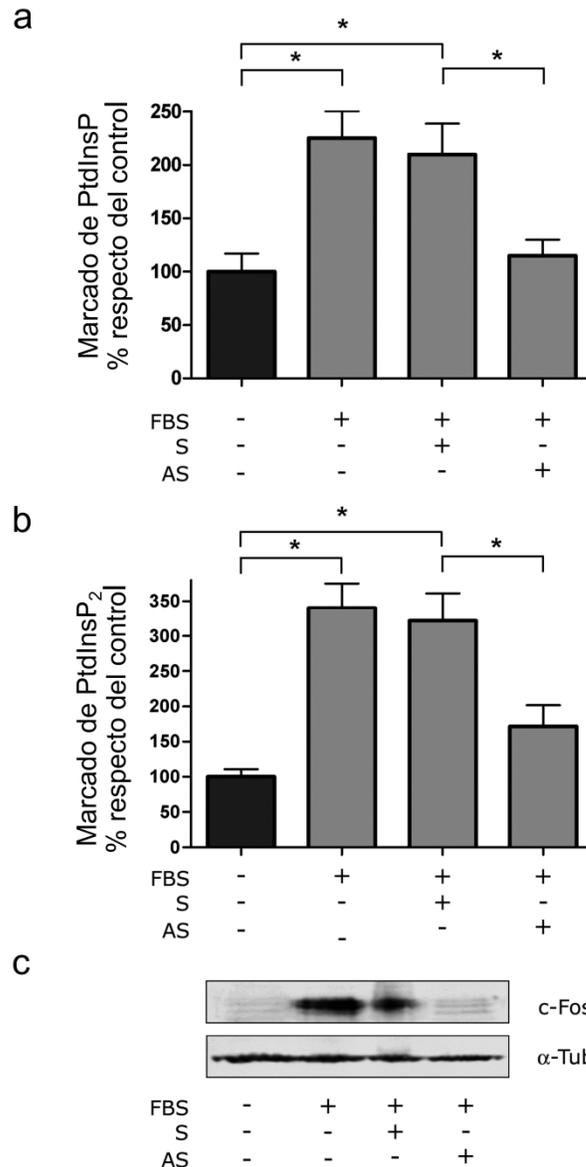
Efecto de c-Fos en la síntesis de PIPs *in vivo*

Cuando ingresé al laboratorio, la Dra. Marianne Renner había comenzado durante el desarrollo de su tesis doctoral a dilucidar algunos aspectos de esta activación dependiente de c-Fos. En la Fig. 3 se puede ver como se produce un acentuado incremento en el marcaje de PtdIns y PtdInsP₂ en las células luego de sólo 7,5 minutos de estímulo. Dicho incremento se ve abolido frente al agregado a las células de un ASO que impide la traducción de la proteína c-Fos. El experimento demuestra la relevancia biológica del fenómeno de la activación dependiente de c-Fos para que la célula ajuste la síntesis de PIPs. Es concordante también con estudios que indican que la expresión de c-Fos es necesaria para que células quiescentes reingresen al ciclo celular (Robbins et al. 1990).

En la mencionada Fig. 3 se observa en la esquina inferior derecha el nombre de Renner, ML reconociendo su trabajo. En próximas figuras, se continuará aclarando si el trabajo fue hecho por otro miembro del laboratorio, en conjunto conmigo o si algunos resultados fueron luego confirmados por mí. En los casos en los que no se coloque ningún nombre, se trata de experimentos realizados íntegramente por mí.

Las actividades CDS y PIK pero no la de PIS son activadas por c-Fos

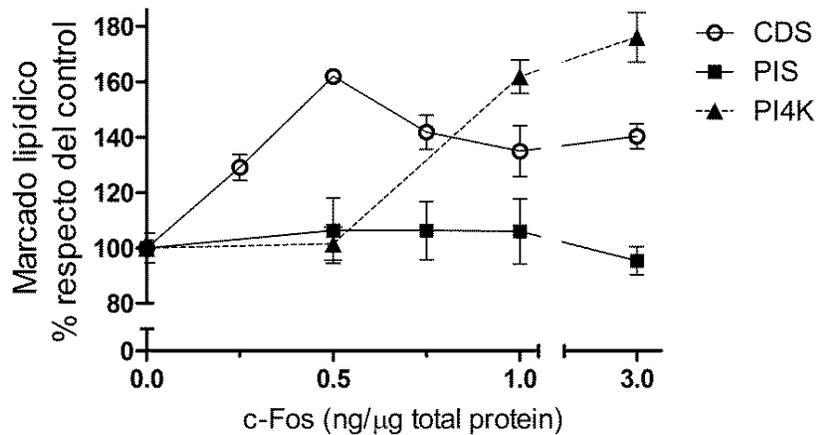
El incremento en el marcaje radioactivo de PIPs implica una más activa tasa de síntesis o de recambio por sobre la de degradación de estos productos lipídicos. Nos propusimos estudiar los distintos pasos metabólicos que conducen a la formación de los mismos. En particular, se midieron las actividades enzimáticas en homogenatos celulares totales de los tres primeros pasos de síntesis de PIPs utilizando precursores específicos de cada etapa metabólica marcados radioactivamente, en presencia o ausencia de c-Fos purificado obtenido en forma recombinante en *E. Coli*. Los homogenatos totales utilizados como fuente de enzimas son de células NIH 3T3 quiescentes, que poseen niveles no detectables c-Fos endógeno.



Renner, ML- Cardozo Gizzi, AM

Figura 3. Efecto del bloqueo de la expresión de c-Fos sobre el marcado radioactivo de PtdInsP y PtdInsP₂. a) y b) Células NIH 3T3 quiescentes fueron pulsadas con ³²P-ortofosfato y luego mantenidas en quiescencia (primera columna) o estimuladas con FBS al 20% durante 7.5 minutos (segunda a cuarta columna). Las células fueron cosechadas y cuantificadas para el marcado radioactivo de PtdInsP (a) o PtdInsP₂ (b) a partir de la correspondiente TLC del extracto lipídico. Oligonucleótido ARNm sentido (S) como control (tercera columna) u oligonucleótido ARNm anti-sentido (AS) contra c-Fos (cuarta columna) fueron adicionados al medio de cultivo previo al estímulo. c) WB de muestras de células utilizadas en a) y b) fue revelado utilizando anticuerpos anti-c-Fos y anti- α -tubulina (control de carga). Nótese la disminución en la expresión de c-Fos al cultivar las células en presencia de AS. *p<0,005 determinado con ANOVA de una vía con Tukey post-test. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

Luego de establecer las condiciones de linealidad de las distintas enzimas, se realizaron ensayos con agregados crecientes de c-Fos purificado para establecer cuál o cuáles actividad/es esta proteína es capaz de modificar. Como puede observarse en la Fig. 4, con el agregado de 0,5 ng c-Fos/ μg proteína total de homogeneizado, CDS tiene un pico en su actividad de alrededor del 60% por encima del control que contiene solo el vehículo. Este aumento se ve disminuido hasta alrededor del 30% por encima del control con mayores cantidades de c-Fos. La actividad PIK requiere de mayores concentraciones de c-Fos (1 ng c-Fos/ μg proteína total) para alcanzar una activación del 60%. Sin embargo, hasta una concentración de 3 ng c-Fos/ μg proteína total (la más alta concentración de c-Fos ensayada) sigue incrementándose el porcentaje de activación. En tanto, no se observó un incremento en la actividad PIS a ninguna de las concentraciones de c-Fos ensayadas.

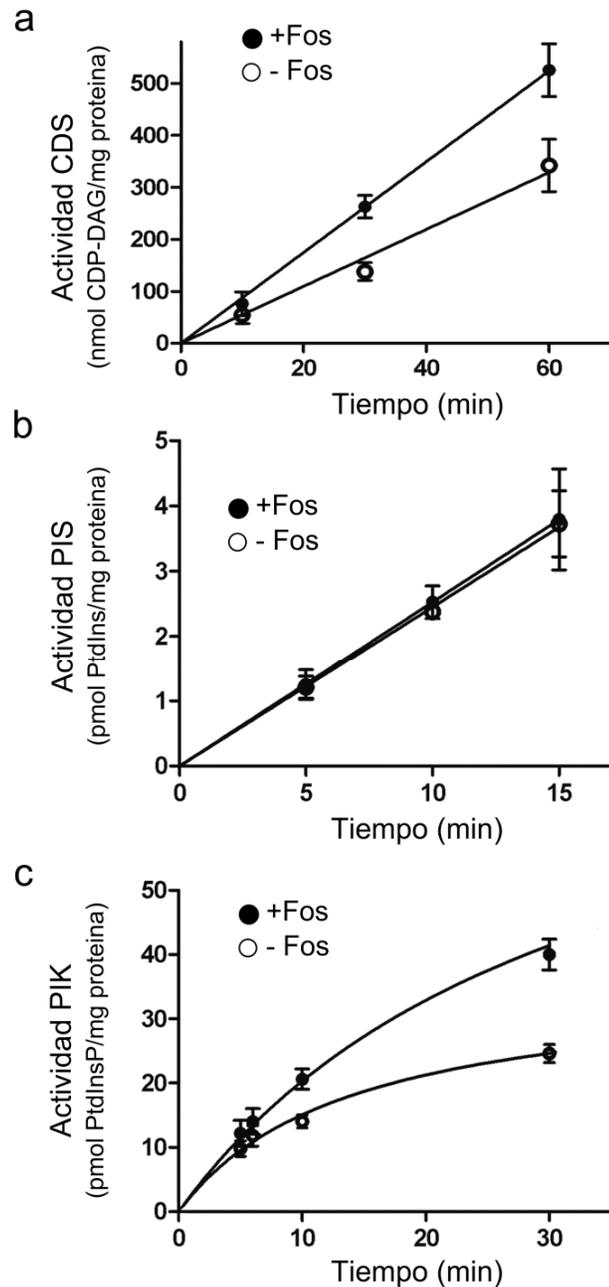


Renner, ML- Cardozo Gizzi, AM

Figura 4. Curvas de activación dependiente de c-Fos para las actividades enzimáticas de CDS, PIS y PIK. Actividad *in vitro* de las enzimas CDS (círculos abiertos), PIS (cuadrados cerrados) y PIK (triángulos cerrados) en homogenatos totales de células NIH 3T3 quiescentes en función de la cantidad de c-Fos recombinante adicionado al medio de ensayo. Las actividades enzimáticas fueron determinadas según se describe en Materiales y Métodos, incubando los tubos durante 20 minutos para el caso de la actividad CDS y 10 minutos para los otros dos. Los Resultados son el promedio \pm DE de un experimento representativo realizado en duplicado de un total de tres experimentos realizados. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

Es realmente interesante que a concentraciones inferiores de c-Fos se active CDS, sugiriendo que los requerimientos para la activación del primer paso metabólico son distintos del tercero.

A continuación, se realizaron curvas de tiempo de las actividades enzimáticas a medir, lo cual consiste en determinar la formación del producto de cada paso metabólico en incubaciones a distintos tiempos; con o sin el agregado de c-Fos recombinante, usando 0,5 ng c-Fos/ μ g proteína total para CDS y 1 ng c-Fos/ μ g proteína total para las otras dos actividades enzimáticas ensayadas. La actividad de CDS fue lineal hasta 60 minutos de incubación (Fig. 5a). La actividad PIS fue lineal hasta 15 minutos, el tiempo más largo ensayado (Fig. 5b). La formación de PtdInsP (actividad PIK) presenta una rápida cinética, por lo que aún determinando la actividad a 25 °C no se obtuvo una clara zona de linealidad (Fig. 5c). En todos los tiempos analizados, se produjeron cantidades incrementadas de CDP-DAG cercanas al 50% con el agregado de c-Fos. Esencialmente el mismo resultado se obtuvo para PIK. En contraste, no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad PIS en los distintos tiempos analizados ni en las distintas concentraciones de c-Fos recombinante ensayadas. Estos experimentos establecieron claramente que c-Fos es capaz de promover una activación general de la vía al incrementar la actividad del primer y tercer paso metabólico involucrado. Asimismo, la no activación de PIS estaría indicando la especificidad de la activación enzimática.



Renner. ML- Cardozo Gizzi. AM

Figura 5. Curvas de tiempo para la actividad enzimática de CDS, PIS y PIK con la adición de c-Fos. Actividad *in vitro* en homogenatos de células NIH 3T3 quiescentes de las enzimas bajo estudio con o sin el agregado de c-Fos recombinante (círculos cerrados o abiertos, respectivamente) en función del tiempo de incubación. Se emplearon 0,5 ng c-Fos/ μ g proteína total para CDS y 1 ng c-Fos/ μ g proteína total para las otras dos actividades enzimáticas ensayadas. Las actividades enzimáticas fueron determinadas según se describe en Materiales y Métodos. Los Resultados son el promedio \pm DE de un experimento representativo realizado en duplicado de un total de tres experimentos realizados. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011.

Finalmente, se realizaron curvas de concentración de sustrato de las enzimas que son activadas por c-Fos (Fig. 6) con el objetivo de establecer los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} , de las enzimas en presencia y ausencia de c-Fos. El ajuste de los datos a curvas de Michaelis-Menten permitió determinar los K_m y V_{max} de CDS y PIK, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 1. Estos estudios cinéticos son nuestro primer acercamiento al mecanismo molecular mediante el cual c-Fos consigue el efecto de activación. En los dos casos analizados, se observó el mismo comportamiento: el agregado de c-Fos recombinante produjo incrementos en la velocidad máxima de la reacción de alrededor del 100% por encima del control, sin que se produzcan cambios estadísticamente significativos en los K_m . Esto indica: i) que c-Fos incrementa la capacidad catalítica de las enzimas involucradas en la activación sin que ello implique un cambio en la afinidad de la enzima por su sustrato y ii) son las primeras evidencias de que existe un mecanismo compartido en la activación de las distintas enzimas involucradas. Los pasos metabólicos estudiados catalizan reacciones totalmente distintas: CDS transfiere un nucleótido (CTP) hacia el grupo fosfato del PA mientras que PI4KII α transfiere un fosfato desde ATP hacia el grupo alcohol del anillo de inositol.

Es importante destacar que la mayor concentración de c-Fos exógena adicionada (1 ng/ μ g proteína total) es comparable a una concentración cercana a 10^5 moléculas de c-Fos por célula. Esta concentración es la que se encuentra en fibroblastos cuando la expresión de c-Fos es inducida, según fuera calculada por Kovary & Bravo (1991).

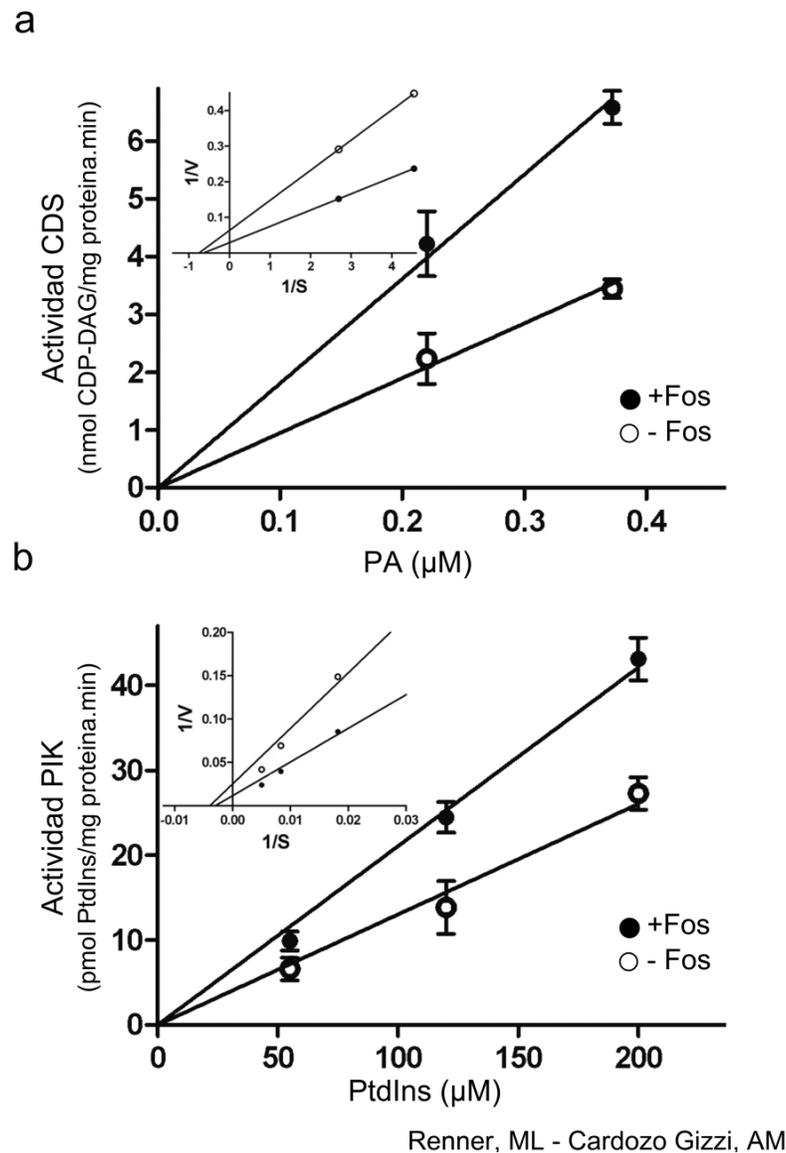


Figura 6. Curvas de concentración de sustrato de las actividades enzimáticas de CDS y PIK. Actividad *in vitro* en homogenatos de células NIH 3T3 quiescentes de las enzimas bajo estudio con o sin el agregado de c-Fos recombinante (círculos cerrados o abiertos, respectivamente) en función de la concentración de sustrato adicionado exógenamente. Las actividades enzimáticas fueron determinadas según se describe en Materiales y Métodos, incubando los tubos durante 20 minutos para el caso de la actividad CDS y 10 minutos para el de PIK. Los resultados son el promedio \pm DE de un experimento representativo realizado en duplicado de un total de tres experimentos realizados. El recuadro interior son gráficos de Lineweaver-Burk para el cálculo de K_m y V_{max} . Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las enzimas de la vía de síntesis de PIPs que son activadas por el agregado de c-Fos recombinante, calculados a partir de los datos de la Fig. 6.

	Constantes cinéticas de la enzima CDS		Constantes cinéticas de la enzima PIK	
	K_m (μ M)	V_{max} (nmol producto/ mg proteína total min)	K_m (μ M)	V_{max} (pmol producto/ mg proteína total min)
Control	1,3 \pm 0,2	15,8 \pm 0,7	254 \pm 30	4,0 \pm 0,5
+c-Fos	1,6 \pm 0,3	34,3 \pm 1,6	331 \pm 57	8,5 \pm 0,6

Las actividades de CDS1 y PI4KII α son claves para la activación del marcado radioactivo de PtdInsP y PtdInsP₂ promovido por FBS, no así la de PI4KII β

En esta instancia, se había establecido que al estimular fibroblastos a reingresar al ciclo celular se produce un rápido incremento en el marcaje radioactivo de PIPs que requiere de la expresión de c-Fos. La hipótesis inicial es que c-Fos media este efecto al activar etapas metabólicas específicas, la primera y la tercera para el caso de la vía de síntesis de PIPs. Para confirmar el rol de enzimas particulares en la síntesis de PtdInsP y PtdInsP₂ *in vivo*, decidimos estudiar el marcado de estos lípidos en células en cultivo previamente tratadas con pequeños ARN de interferencia (siRNA) para deprimir la expresión de las enzimas en estudio.

Respecto de la formación de PtdInsP a partir del PtdIns, se ha observado que en homogenatos totales de células NIH 3T3 se puede abolir prácticamente en su totalidad la actividad PI4K con el inhibidor adenosina, que es específico para PI4K tipo II (de Graaf et al. 2002). Aún más, la vía predominante de fosforilación de PtdIns es iniciada por este tipo de quinasas en muchas células de mamíferos (Fruman et al. 1998) y en particular la enzima PI4KII α se ha descrito como la más activa (Balla et al. 2002). Por tanto, se decidió utilizar las dos isoformas (α y β) de esta familia de enzimas como blanco para disminuir su expresión. En concreto, se trató a las células con siRNA contra CDS1, PI4KII α y PI4KII β .

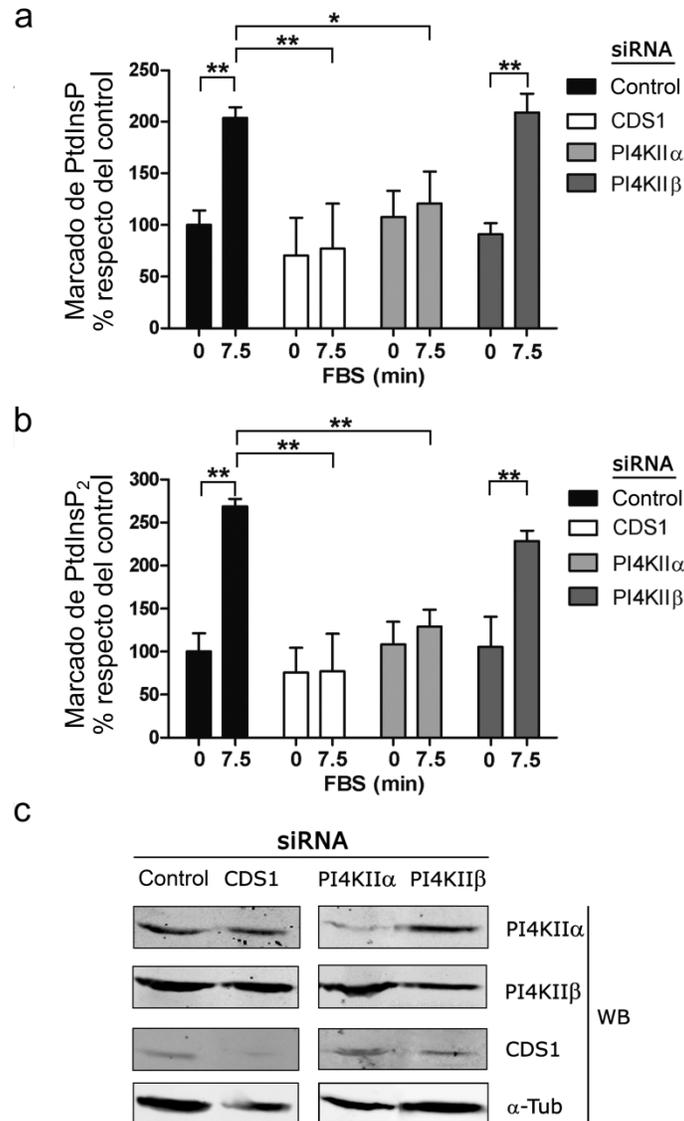


Figura 7. La disminución en la expresión de CDS1 y PI4KII α pero no de PI4KII β suprime el incremento en el marcado radioactivo de PtdInsP y PtdInsP₂ *in vivo*. Células NIH 3T3 fueron transfectadas con siRNA contra las enzimas en estudio para deprimir la expresión de las mismas. Tras establecer la quiescencia, las células fueron pulsadas con ³²P-ortofosfato para luego ser estimuladas con FBS al 20% durante 7.5 minutos. a) y b) muestran el marcado *in vivo* de PtdInsP y PtdInsP₂ (respectivamente) para cada caso analizado. c) WB de homogenatos celulares utilizados en a) y b) fueron revelados para cada una de las enzimas en estudio utilizando anticuerpos específicos (*Abcam*) en las condiciones indicadas (siRNA). En cada caso, puede observarse la disminución de la expresión de la correspondiente enzima en las células tratadas con el siRNA. Se reveló además contra α -tubulina como control de carga en cada caso. El control consistió en células a las que se les adicionó solo el reactivo de transfección. Adicionalmente, se examinaron células trasfectadas con un siRNA que no tiene ningún blanco, y no se observaron diferencias respecto del mencionado control (no mostrado). Los resultados son la media de dos experimentos independientes \pm DE. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ determinado mediante análisis de la varianza de dos vías usando Bonferroni post-test. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

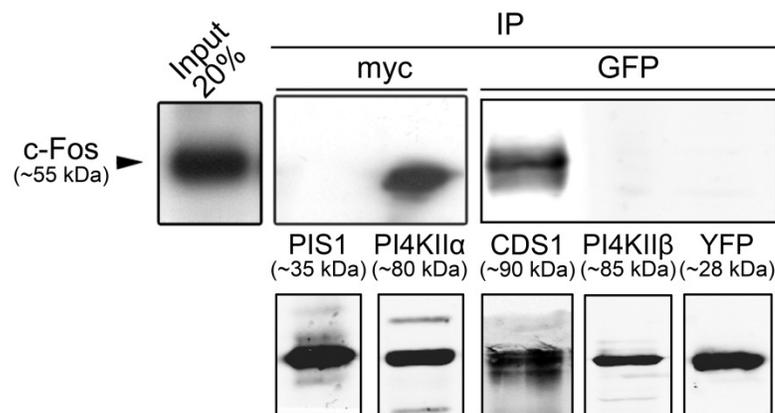
Al estimular las células con FBS, se observa el esperado incremento en el marcado de PtdInsP y PtdInsP₂ (Fig. 7). Este incremento se ve suprimido en células tratadas con siRNA contra CDS1 o PI4KII α . En cambio, disminuir la expresión de PI4KII β no tiene efecto alguno en el fenómeno. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de CDS1 y PIKII α en la activación de la síntesis de PIPs a tiempos cortos en células NIH 3T3 que reingresan al ciclo celular. Es importante remarcar en este punto que según se observa en la Fig. 3, dicha activación es dependiente de la expresión de c-Fos.

Es interesante destacar que en un reporte reciente se vio que mientras CDS1 no muestra una especificidad o preferencia por las cadenas laterales del sustrato (posiciones sn-1 y sn-2 de PA), CDS2, la segunda isoforma de esta enzima, tiene una marcada preferencia por 1-estearoil-2-araquidonil PA como sustrato, así como también una inhibición de su actividad por parte del PtdInsP₂ con estas cadenas de los ácidos grasos en particular (D'Souza et al. 2014). Estudios de otros laboratorios demuestran que el PtdIns formado a partir de la vía de síntesis *de novo* contiene principalmente cadenas del resto acilo saturadas o mono-insaturadas (Holub & Kuksis 1971, Luthra & Sheltawy 1976). En cambio, el ciclo de PtdIns involucra la ruptura de PtdIns(4,5)P₂ en la membrana plasmática y la re-síntesis de PIPs por parte de enzimas, entre ellas DGK ϵ (Lung et al. 2009) o PtdIns4P-5-quinasa (Shulga et al. 2012), que tienen una importante especificidad por el sustrato, lo cual resulta en un enriquecimiento cíclico del PtdIns de cadenas acilo particulares, siendo las principales 1-estearoil-2-araquidonil (18:0 sn-1/20:4 sn-2). Esto último induce a pensar que CDS2 estaría involucrada principalmente en el ciclo del PtdIns mientras que CDS1, que no exhibe ninguna especificidad por la cadena lateral, en la síntesis *de novo* de PtdIns (D'Souza & Epand 2014). La enzima CDS cuya actividad incrementada depende de la expresión de c-Fos y que además al deprimir la expresión de la misma se impide el incremento en la marcación de PtdInsP₂, sería entonces la involucrada en la síntesis *de novo*.

CDS1 y PI4KII α pero no PI4KII β participan en una asociación física con c-Fos

Los experimentos mostrados hasta aquí plantearon el interrogante sobre la forma en que c-Fos logra la activación de enzimas específicas. Un posible mecanismo es mediante una interacción directa con las enzimas que activa. Para estudiar esta alternativa, inicialmente se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en homogenatos totales de fibroblastos NIH 3T3 transfectados para expresar las enzimas bajo estudio con un rótulo que permita dirigir un anticuerpo específico contra el mismo. Concordantemente con lo observado en la activación de enzimas particulares (Figs. 4 y 5), c-Fos coimmunoprecipitó con CDS1 y PI4KII α pero no con PIS1 o PI4KII β (Fig. 8). Estos estudios sugirieron que c-Fos está modulando la actividad de estas enzimas a través de una interacción física, lo cual permitiría la activación específica de las mismas.

La técnica de coimmunoprecipitación es muy robusta ya que si al bajar una proteína con un anticuerpo específico y luego revelar la existencia en el inmuno-complejo de una segunda proteína, se está probando que ambas participan en un complejo. Sin embargo, esta



Alfonso Pecchio, AR- Cardozo Gizzi, AM

Figura 8. CDS1 y PI4KII α pero no PI4KII β coimmunoprecipitan con c-Fos. Células NIH 3T3 fueron transfectadas para expresar PIS1-myc, PI4KII α -myc, CDS1-YFP ó PIKII β -YFP y estimuladas con FBS al 20% durante 1 hora para inducir la expresión de c-Fos endógeno. Lisados de estas células fueron inmunoprecipitados usando anti-GFP (*Roche*) o anti-myc (*Sigma*), ambos producidos en ratón. Se muestra en la parte superior el WB revelado utilizando anti-c-Fos (*Santa Cruz*, producido en conejo) y en la parte inferior los inmunoprecipitados obtenidos para cada enzima revelados usando anti-GFP (*Sigma*) o anti-myc (*Santa Cruz*) ambos producidos en conejo. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

técnica tiene sus limitaciones. En primer lugar, al tratarse de homogenatos totales, no se brinda ninguna información espacial del fenómeno. Más aún, la disrupción del entorno natural en que se encuentran las proteínas de interés puede promover interacciones que no están presentes en una célula intacta. Por último, que ambas proteínas se encuentren en el mismo inmuno-complejo no descarta la posibilidad de terceras proteínas que actúen como proteínas puente.

Para superar estas limitaciones, decidimos estudiar la interacción proteína-proteína usando microscopía FRET por emisión sensibilizada (Elangovan et al. 2003). Dicha técnica se basa en la transferencia de energía desde un donador fluorescente excitado hacia un aceptor (fluorescente o no) por medio de un fenómeno no radiativo. Este fenómeno, denominado FRET o transferencia de energía de Förster, por quien estableciera los principios que lo rigen, depende fuertemente de la distancia. En términos prácticos, donador y aceptor deben encontrarse a no más de 10 nm de distancia para que ocurra el fenómeno de FRET, para el caso de la utilización de proteínas fluorescentes como par aceptor-donador. Esta distancia es típica de una interacción directa entre dos proteínas, por lo que esta técnica permite medir interacciones proteína-proteína (Vogel et al. 2006). El FRET agota la población del estado excitado del donador, disminuyendo su emisión mientras que causa la emisión (sensibilizada) del aceptor. La forma de medir el fenómeno consiste en fusionar las proteínas de interés a proteínas fluorescentes, usando un par o combinación que permita la transferencia de energía. En este caso en particular empleamos a la proteína fluorescente cyan (CFP) como donador y a la proteína fluorescente amarilla (YFP) como aceptor (Piston & Kremers 2007). Para realizar el experimento de FRET, se transfectaron las células con los plásmidos correspondientes al tiempo que se deprivaban a estas de factores de crecimiento. Luego de establecerse la quiescencia, se indujeron las células durante 7,5 minutos con FBS para generar la transición G_0/G_1 y situarnos en el momento de más alta síntesis de PIPs (Bussolino et al. 2001). Este estímulo es necesario para desencadenar los fenómenos celulares que aseguran la interacción de ambas proteínas. Sin embargo, el estímulo también promueve la rápida traducción de c-Fos endógeno, que podría competir con el c-Fos fusionado a CFP por

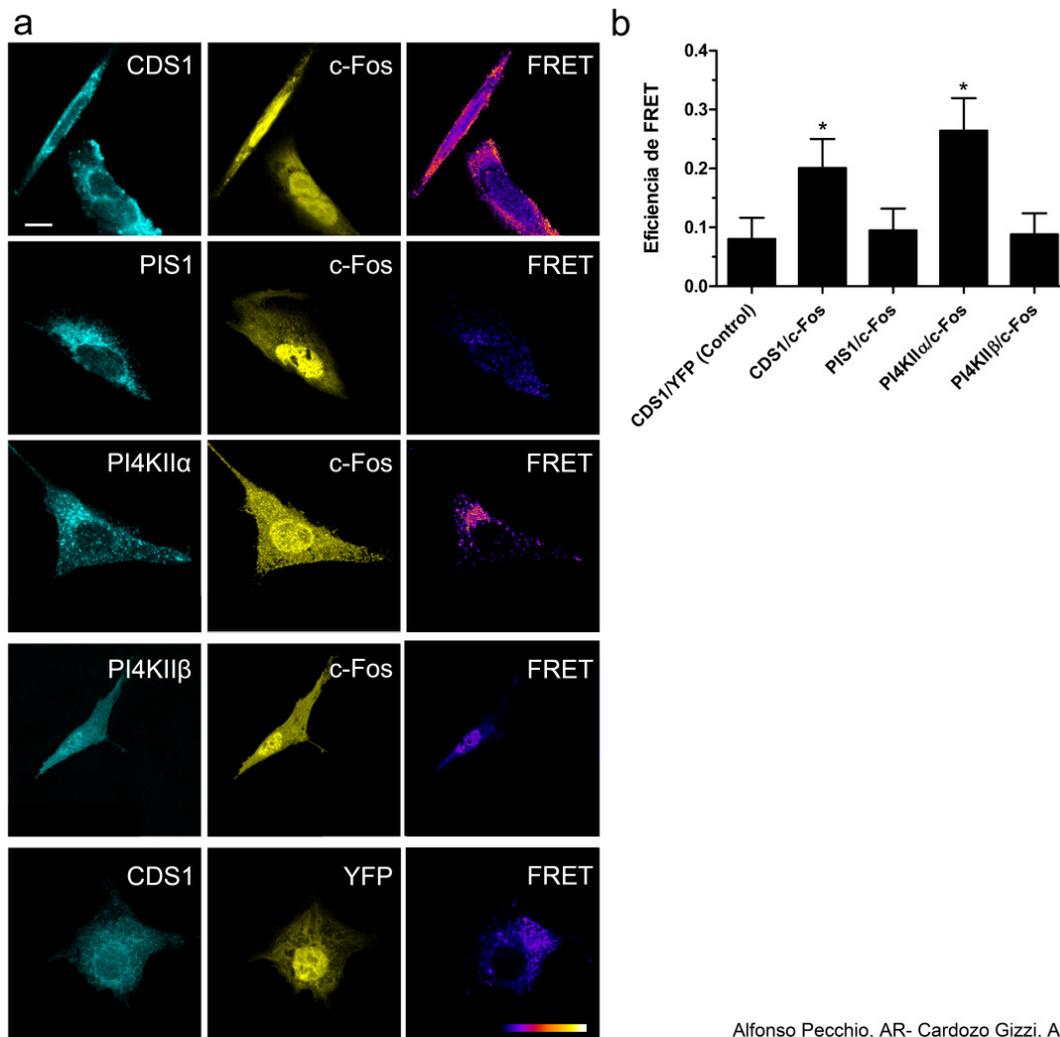


Figura 9. Microscopia FRET revela la interacción entre c-Fos/CDS1 y c-Fos/PI4KIIα. a) Donor de FRET, CFP (izquierda), Aceptor de FRET, YFP (centro) e imagen de Eficiencia de FRET (derecha). Se co-transfectaron las células para que expresen cada una de las enzimas bajo estudio fusionadas a ECFP junto con c-Fos-EYFP y estas fueron examinadas por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los casos. El control negativo es CDS1-ECFP/YFP y se muestra en la fila inferior. La imagen de Eficiencia de FRET fue generada con el programa *ImageJ*, usando una escala pseudocoloreada que representa la eficiencia en una escala que incrementa de azul a blanco, como se muestra en la barra de la esquina inferior derecha. El valor máximo (píxeles blancos) corresponde al control positivo ECFP-EYFP, una quimera de ambas proteínas fluorescentes unidas por un segmento flexible de 18 aa, cuya máxima eficiencia de FRET se utiliza para normalizar la escala (no mostrado). b) Eficiencia promedio de FRET ± DE. Los resultados, obtenidos tras analizar 25 células en cada caso, provienen de un experimento representativo de un total de al menos tres. * $p < 0,001$ determinado por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. La barra blanca en la esquina superior izquierda representa 10 μ m. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011.

la unión de las enzimas y disminuir los valores de FRET. Para contrarrestar esto, se incubó a las células durante el estímulo (y desde 45 minutos antes) con cicloheximida a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que impide la traducción al nivel del ribosoma. De esta forma, se permiten los eventos post-traduccionales necesarios para la activación de algunas enzimas al tiempo que se inhibe la síntesis de c-Fos endógeno.

Las condiciones de FRET indican que las proteínas de interés se encuentran a una distancia menor a 10 nm, actuando entonces como una regla molecular; en tanto que al ser una técnica de microscopía, permite obtener información respecto de la localización subcelular de la interacción. Los resultados correlacionan con lo observado anteriormente en las coimmunoprecipitaciones: tanto CDS1 como PI4KII α pero no PI4KII β participan de una interacción física con c-Fos (Fig. 9). Si bien se observa un acumulamiento de c-Fos dentro del núcleo, la asociación ocurre peri-nuclearmente, aparentemente asociado al RE según puede verse en las imágenes de eficiencia de FRET (Fig. 9). Es importante mencionar que c-Fos experimenta un transporte activo entre el núcleo y el citoplasma, y que esta proteína es capaz de experimentar ciclos de entrada y salida al núcleo (Malnou et al. 2007). El RE es, como se dijo anteriormente, el principal sitio de síntesis de fosfolípidos y el sitio subcelular donde se ha encontrado previamente a c-Fos asociado (Bussolino et al. 2001) por lo que el sitio de asociación enzima/c-Fos se corresponde con la hipótesis de que c-Fos interactúa directamente con enzimas específicas para activar la síntesis metabólica de fosfolípidos en el RE.

El dominio BD sería el responsable de la activación de la síntesis de PIPs

Para determinar cuál o cuáles son los dominios de c-Fos requeridos para esta función no genómica, construimos inicialmente mutantes de delección de la proteína y ensayamos su capacidad para activar la síntesis de PIPs *in vitro*. Puede observarse una representación esquemática de las mutantes empleadas en la Fig. 10c. La mutante NB (aa: 1-160) es capaz de activar la síntesis de PtdInsP y PtdInsP₂ mientras que NA (aa: 1-138) no lo hace (Figs 10 a y b). La diferencia entre ambas mutantes son únicamente los 21 aa del dominio básico (BD) que NB incluye y NA no. Por otro lado, la mutante de delección ΔBD , a la que solo le faltan los 21 aa correspondientes al BD respecto de c-Fos salvaje, es incapaz de activar la síntesis de

PIPs (Fig. 10 a y b). Esta evidencia se suma a la ya obtenida en la línea celular PC12, un modelo de diferenciación neuronal en la que se encontró que el BD de c-Fos era necesario para la activación generalizada de la marcación radioactiva de fosfo- y glico-lípidos en el proceso de elongación de neuritas (Gil et al. 2004, Crespo et al. 2008).

El BD se compone de 21 residuos, doce de los cuales son básicos y por lo tanto poseen carga positiva a pH fisiológico. Como se mencionara en la *Introducción*, este dominio

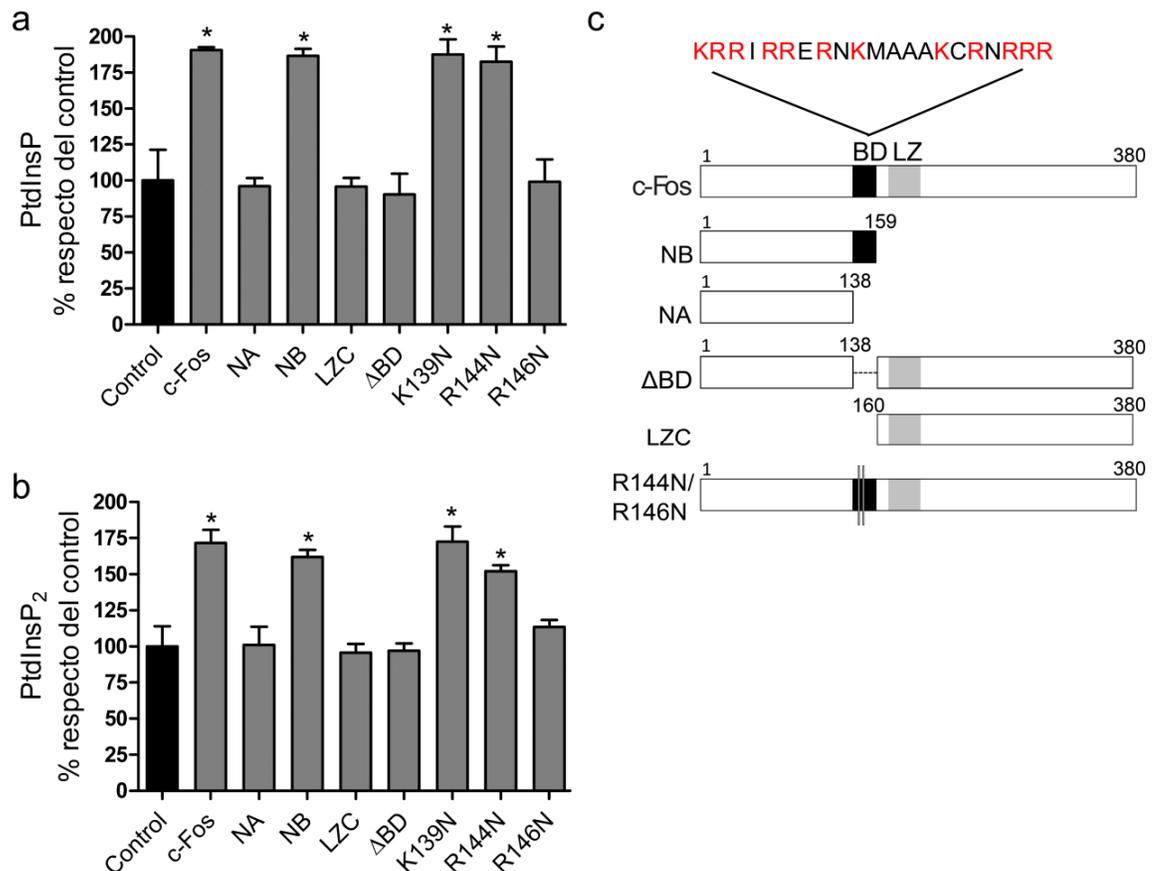


Figura 10. Activación *in vitro* de la síntesis de PtdInsP y PtdInsP₂ por la proteína c-Fos o sus mutantes. a) y b) El marcado radioactivo con ³²P-ATP de PtdInsP y PtdInsP₂ (respectivamente) fue determinado *in vitro* utilizando homogenatos de células quiescentes en presencia de c-Fos o sus mutantes obtenidos en forma recombinante. Los resultados son expresados con respecto a un control en el que sólo se adicionó vehículo. Las proteínas recombinantes se ensayaron a una concentración de 1 ng/μg proteína total en el homogenato. Los resultados son el promedio de un experimento representativo de un total de tres realizado en triplicado ± DE. *p<0,01 determinado por ANOVA de una vía usando el post-test de Dunnett. c) Representación esquemática de las mutantes de deleción o puntuales empleadas en a) y b). Se muestra además la secuencia del BD, con los residuos básicos en rojo. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

está directamente involucrado en la unión al ADN, que por sus fosfatos posee una fuerte carga negativa. Sin embargo, la unión al ADN es altamente específica y los heterodímeros AP-1 solo interaccionan con secuencias definidas. En la Fig. 10c puede verse la secuencia de este dominio donde se han resaltado los residuos básicos en rojo. Decidimos realizar mutantes puntuales sobre estos residuos básicos, en particular sobre lisina-139, arginina-144 y arginina-146, reemplazándolas por asparagina, un aminoácido polar que tiene un grupo carboxamida como su cadena lateral. Los resultados indican que la arginina-146 es indispensable para conseguir la activación de la síntesis lipídica, ya que al mutarla se suprime el efecto. Las otras dos mutantes ensayadas, K139N y R144N, son capaces de incrementar el marcado radioactivo de lípidos a niveles comparables con c-Fos salvaje a pesar de tener una carga positiva menos (Fig. 10 a y b), lo que indicaría que el efecto no es únicamente una cuestión de carga.

La región N-terminal es la responsable de la asociación con CDS1

Habiendo establecido el dominio involucrado en la activación de la síntesis de PIPs, fue de interés establecer cuál era el dominio de asociación con la enzima CDS1, elegida como modelo de estudio. Para ello se fusionaron las mismas mutantes esquematizadas en la Fig. 10c a la proteína fluorescente CFP y se analizó por microscopía FRET la transferencia de energía a CDS1-YFP. Según puede observarse en la Fig. 11, tanto la mutante NA como NB retienen la capacidad de unión a CDS1 a pesar de no contar con la porción C-terminal de la proteína c-Fos salvaje. Ello, sumado a que la mutante LZC (160-380) es incapaz de unirse a la enzima, indicaría que la región C-terminal de c-Fos no está involucrada en el fenómeno. Por otro lado, la mutante Δ BD, a pesar de no poseer capacidad como activadora de la síntesis de PIPs, sigue asociándose a CDS1, lo cual descartaría que el BD esté involucrado en esta asociación. Aún más, el hecho que tanto NA como NB se asocien a la enzima, apuntaría a la región N-terminal (aa: 1-138) como la implicada en la interacción, ya que es la región mínima compartida. En conclusión, la interpretación más sencilla de los resultados obtenidos hasta aquí es que el dominio N-terminal de c-Fos interacciona con CDS1 mientras que el dominio de activación es el BD, lo que indica que, sorpresivamente, la unión y la activación de CDS1 se deben a regiones diferentes de c-Fos.

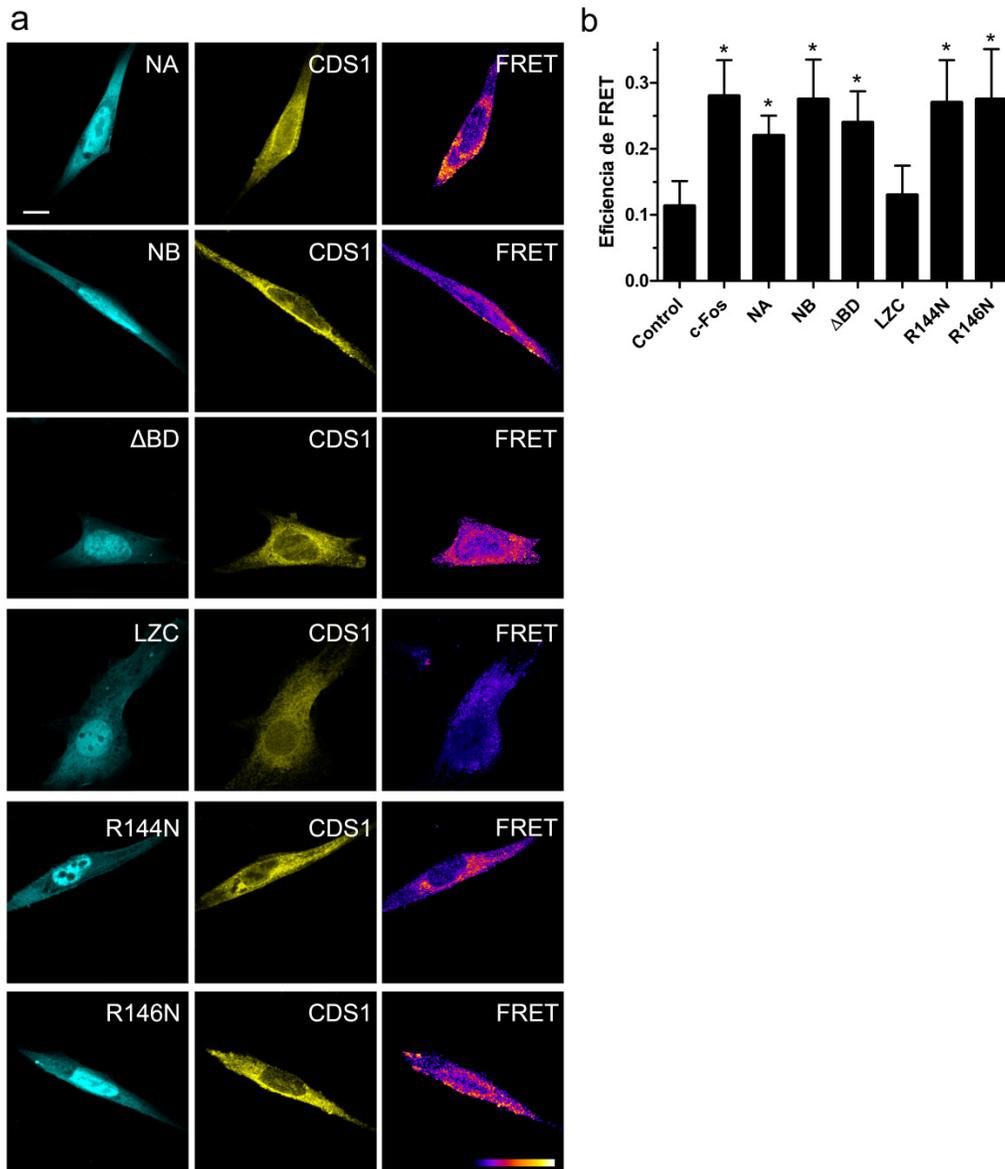


Figura 11. El dominio N-terminal es el responsable de la asociación de c-Fos a la enzima CDS1. a) Donor de FRET, CFP (izquierda), Aceptor de FRET, YFP (centro) e imagen de Eficiencia de FRET (derecha). Se co-transfectaron las células para que expresen cada una de las enzimas bajo estudio fusionadas a ECFP junto con c-Fos-EYFP y estas fueron examinadas por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los casos. El control negativo es CDS1-ECFP/YFP (no mostrado). La imagen de Eficiencia de FRET fue generada con el programa *ImageJ*, usando una escala pseudocoloreada que representa la eficiencia en una escala que incrementa de azul a blanco, como se muestra en la barra de la esquina inferior derecha. El valor máximo (píxeles blancos) corresponde al control positivo ECFP-EYFP, una quimera de ambas proteínas fluorescentes unidas por un segmento flexible de 18 aa, cuya máxima eficiencia de FRET se utiliza para normalizar la escala (no mostrado). b) Eficiencia promedio de FRET \pm DE. Los resultados, obtenidos tras analizar 25 células en cada caso, provienen de un experimento representativo de un total de al menos tres. * $p < 0,001$ determinado por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. La barra blanca en la esquina superior izquierda representa 10 μ m. Adaptado de Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. (2011).

La región N-terminal es capaz de competir con c-Fos salvaje por su unión a la enzima PI4KII α

Dado el hallazgo de que la región N-terminal es la responsable de la asociación a la enzima CDS1 pero no de la activación de la misma (ya que el dominio de activación se localiza en el BD) se decidió utilizarlo para una posible intervención en el metabolismo celular. La idea consiste en establecer si la región N-terminal por si misma puede competir por el sitio de unión de la enzima con c-Fos y de esta forma, al impedir la asociación, evitar el incremento en la actividad enzimática. El objetivo último de esta intervención en el metabolismo es establecer una posible estrategia para detener la proliferación celular que, como se dijo, depende del estado activado de síntesis de fosfolípidos. A partir de la evidencia obtenida hasta aquí, diseñamos un experimento de competencia, utilizando a la enzima PI4KII α para esta prueba de concepto. Estos experimentos se realizaron en conjunto con el Dr. Cesar Prucca, que comenzaba entonces una estancia post-doctoral en el laboratorio con el objetivo de desarrollar esta estrategia anti-tumoral mediante el bloqueo específico de la actividad no genómica de c-Fos.

Para hacer estos experimentos de competencia utilizamos otra forma de determinar la ocurrencia de FRET llamado FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* o Microscopía de tiempo de vida media de fluorescencia). El método de emisión sensibilizada se basa en la intensidad de la imagen para poder cuantificar una eficiencia “aparente” en la transferencia de energía y por lo tanto depende de la concentración de los fluoróforos, que debe ser tomada en cuenta para normalizar la señal. En cambio, la técnica de FLIM mide el tiempo de vida media de fluorescencia (τ), el cual no depende de la concentración de fluoróforos, el microscopio empleado o las condiciones de adquisición. Este método se encuentra entre los más robustos y confiables para medir FRET, ya que se basa en un parámetro físico cuantificable directamente (Sun et al. 2013). Toda población de fluoróforos que es excitada por un pulso de luz reside en el estado electrónico excitado un tiempo determinado antes de decaer al estado basal. Para decaer, emite energía en forma radiativa o bien puede disipar esa energía en forma no radiativa. En presencia de un aceptor de FRET, la población de fluoróforos excitados posee una nueva vía para transmitir o disipar la

energía. En consecuencia, el tiempo de vida media en el estado excitado es menor respecto de una población de fluoróforos que no tienen disponible un aceptor. En otras palabras, el tiempo de vida media del fluoróforo emisor disminuye ante la ocurrencia de FRET. El cambio en el tiempo de vida media con o sin el aceptor (o el $\Delta \tau$) indica la eficiencia de FRET en forma cuantitativa, siendo este un parámetro muy robusto para establecer una interacción proteína-proteína. Una de las principales desventajas de este método es que la adquisición de datos confiables depende de coleccionar múltiples imágenes sucesivas para así tener los fotones necesarios para hacer un análisis, y por lo tanto es más lento que la técnica de emisión sensibilizada. La otra desventaja es que requiere instrumentación especializada y costosa. Para más detalles, ver la sección *Materiales y Métodos*.

El experimento se desarrolla de la siguiente manera: se toman las imágenes de FLIM para un campo en particular y a continuación se obtienen las imágenes para los canales de CFP, YFP y $\lambda 660$ (el fluoróforo con el que se marcó a NA-myc). Las imágenes de FLIM se toman excitando únicamente al donador de FRET, CFP, utilizando un láser modulado y un detector para el mismo, ya que se estudia el $\Delta \tau$ en la fluorescencia del donador. Las imágenes confocales de los tres canales en cambio permiten tener la información espacial para las tres proteínas, para luego hacer análisis de ubicación subcelular y co-localización.

Analizamos entonces la ocurrencia de FRET como una disminución en el tiempo de vida media de fluorescencia del donador utilizando un enfoque novedoso, el análisis de fasores (Digman et al. 2008). En este enfoque, la información de FLIM se representa de forma que el decaimiento de fluorescencia de cada píxel de la imagen genera un punto en un gráfico de fasores (o *phasor plot*) (Fig. 12). El gráfico de fasores es un gráfico en el que se representan las coordenadas s y g de cada fasor, un vector que representa el tiempo de vida media. Existe un fasor por cada píxel en la imagen que representa entonces el tiempo de vida media de ese píxel (ver *Materiales y Métodos* para la descripción de un fasor). Se utiliza un cursor en el gráfico de fasores, de forma que al seleccionar los fasores que están dentro de este cursor, se “pintan” los píxeles en la imagen que se corresponden con estos fasores (Fig. 13, en este caso se “pintan” de violeta los píxeles que se encuentran en el cursor negro redondo del gráfico de fasores). El fasor que finalmente se asocia con una célula es el fasor promedio (o el que

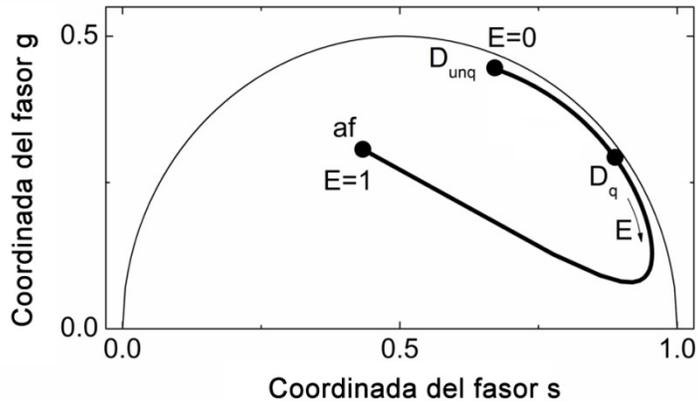
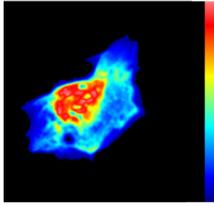


Figura 12. Diagrama representativo del enfoque del faser y cálculos de eficiencia de FRET. Se empieza por establecer el faser promedio del donador sólo (D_{unq}) y el faser promedio de la autofluorescencia de la célula (af). Se genera una trayectoria que indica un corrimiento hacia tiempos de vida medios menores y que se corresponden con la eficiencia de FRET. Adaptada de Giral et al. (2012).

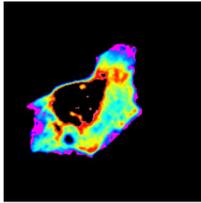
engloba mas cantidad de pixeles de la imagen). La cuantificación de FRET en el gráfico de fasores se logra al analizar el corrimiento entre las especies del donador y el donador en presencia del aceptor. Siguiendo el método descrito en Digman et al. (2008), se determinaron los fasores de la autofluorescencia de la célula (af) a partir de células sin transfectar y del donador sólo (D_{unq}) para calcular una trayectoria de eficiencia de FRET variable (0-100%) (Fig. 12). El enfoque del faser no tiene ajustes o modelos.

Se comenzó por confirmar la interacción c-Fos/PI4KII α (Fig. 13) que se había observado por emisión sensibilizada (Fig. 9). Cómo puede verse en una célula representativa (Fig. 13a) el cursor ubicado en 13-25% de eficiencia de FRET selecciona la gran mayoría de los pixeles. Luego, se estableció que el dominio N-terminal de c-Fos es también el responsable de la asociación a la enzima PI4KII α , ya que según puede verse en la Fig. 13d, la eficiencia de FRET para NA-CFP/PI4KII α -YFP es estadísticamente igual a la de c-Fos / PI4KII α . Finalmente se estudió la interacción c-Fos / PI4KII α en presencia de NA-myc, es decir el N-terminal de c-Fos con un rótulo de myc que permite localizarlo al hacer una inmunocitoquímica contra este epítoto. Como puede verse en la Fig. 13c, ahora el cursor que indica una eficiencia de FRET menor al 8% es el que engloba la mayor parte de los fasores. Según se observa en la cuantificación de la eficiencia de FRET, la expresión por parte de la célula de esta mutante de c-Fos es capaz de interferir o competir con la interacción entre c-Fos / PI4KII α .

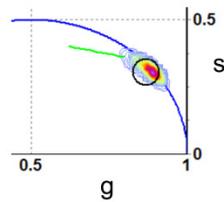
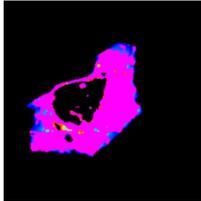
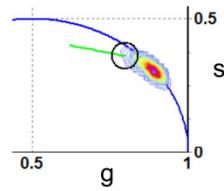
a
c-Fos-CFP/PI4KII α -YFP
Intensidad de fluorescencia (u.a.)



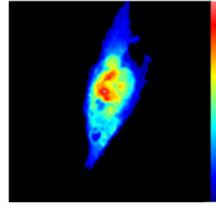
FLIM



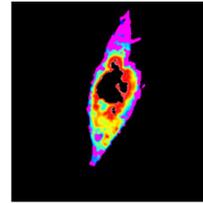
Phasor Plot



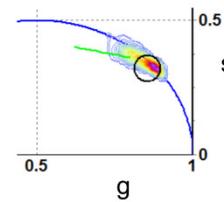
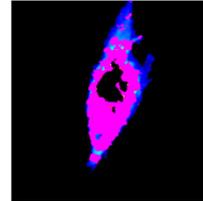
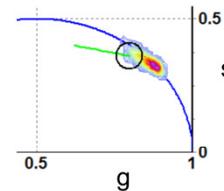
b
NA-CFP/PI4KII α -YFP
Intensidad de fluorescencia (u.a.)



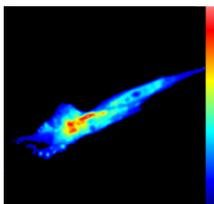
FLIM



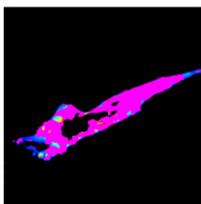
Phasor Plot



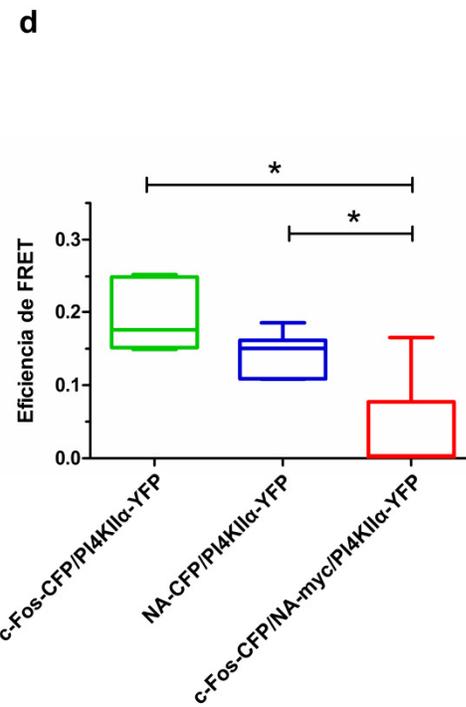
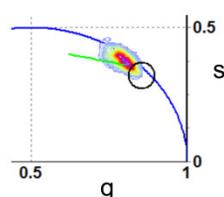
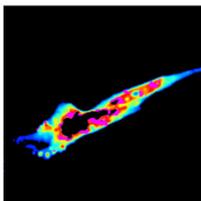
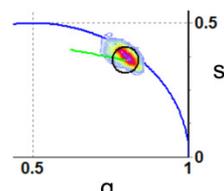
c
c-Fos-CFP/NAmyc/PI4KII α -YFP
Intensidad de fluorescencia (u.a.)



FLIM



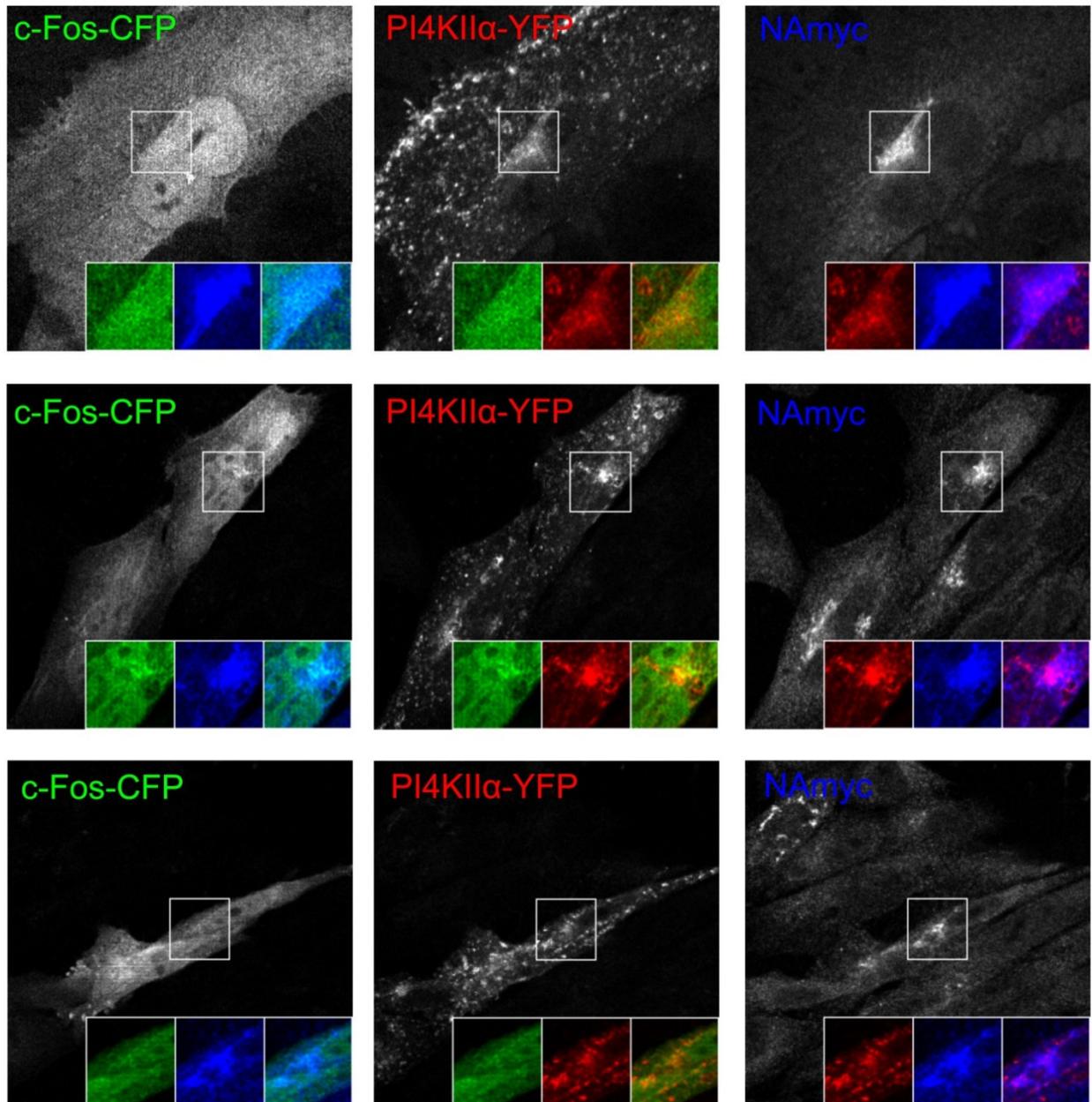
Phasor Plot



Cardozo Gizzi, AM - Prucca, CG

Figura 13. NA-myc compete con la unión de c-Fos salvaje con PI4KII α . (a, b y c) Un experimento de FLIM-estrategia del faser en células NIH 3T3 muestra la imagen de intensidad de fluorescencia, el gráfico del faser y la localización en la imagen de FLIM (máscara violeta) de los pixeles que se encuentran dentro del área de selección (circulo negro en el gráfico de fasores). Se observan dos subconjuntos de fasores, y los correspondientes pixeles se seleccionan en la máscara de la imagen de FLIM como pixeles violetas: pixeles en el rango <8% y 13-25% de eficiencia de FRET. En a y b) el cursor de selección 13-25% de eficiencia de FRET selecciona al menos el 80% de los pixeles totales, en tanto en c) el cursor de eficiencia de FRET <8% selecciona al menos el 80% de los pixeles totales. Es importante destacar que se dispuso un umbral de intensidad que descarta los pixeles dentro del núcleo, para así excluirlos del análisis. d) Cuantificación de la eficiencia de FRET tomando un total de 15 células para cada caso. * $p < 0,01$ usando ANOVA y post-test de Dunnett. Nótese como NAMyc es capaz de disminuir la eficiencia de FRET y por lo tanto la interacción c-

El análisis posterior de la fluorescencia en los tres canales aportó nueva información (Fig. 14). La enzima PI4KII α se observa teniendo una amplia distribución extranuclear y se encuentra asociada a membranas de distintas organelas/vesículas en forma particulada concordantemente con la bibliografía que la señala asociada a RE, Golgi y endosomas (Waugh et al. 2003, Minogue et al. 2006). Por otro lado, c-Fos-CFP se observa tanto dentro como fuera del núcleo, a diferencia de NA-myc que aparece concentrado en forma perinuclear, excluido del núcleo y asociado aparentemente a membranas. Es posible que la fusión de c-Fos a CFP genere una acumulación de esta quimera en el núcleo, que ya no se observa con el pequeño rótulo de myc para el caso de la mutante NA. Precisamente en la estructura donde localiza NAMyc es donde se da una triple co-localización de las proteínas en estudio. Es de esperar que allí sea donde se produzca la competencia por la unión de PI4KII α . Sin embargo, en las imágenes de FLIM, la ocurrencia de FRET se da en toda la región extranuclear, que es la que marca el cursor (Fig. 13) y no en esta región en particular. Dos posibles explicaciones a este resultado surgen rápidamente: 1) la resolución espacial del FLIM no es suficiente para observar una región precisa o 2) la interacción c-Fos/PI4KII α se produce en múltiples localizaciones citoplásmicas más allá de la acumulación en alguna región particular.



Cardozo Gizzi, AM - Prucca, CG

Figura 14. Localización subcelular de c-Fos, PI4KII α y la mutante de c-Fos NA expresadas en forma exógena. Imágenes confocales de células NIH 3T3 quiescentes estimuladas por 7,5 minutos con 20% FBS. Las células habían sido transfectadas para expresar c-Fos-CFP, PI4KII α -YFP y la mutante de c-Fos, NA-myc. Las células fueron a posteriori marcadas con un anticuerpo anti-myc y un anticuerpo secundario. Se observan tres campos representativos mostrando células triple-positivo (filas). En cada caso, se observa un recuadro que aparece aumentado y pseudo-coloreado en el recuadro inferior. En la primera columna en el recuadro puede verse la co-localización parcial de c-Fos-CFP (verde) con NAmyc (azul) para dar cian. En la segunda columna en el recuadro puede verse la co-localización parcial de c-Fos-CFP (verde) con PI4KII α (rojo) para dar amarillo. En la tercera columna en el recuadro puede verse la co-localización parcial de PI4KII α (rojo) con NAmyc (azul) para dar magenta.

Es interesante destacar que a partir de estas observaciones, el Dr. César Prucca continuó con experimentos de proliferación de células tumorales en cultivo sobreexpresando la mutante NA y observó que se limita la proliferación, dando los primeros indicios de que esta estrategia podría funcionar para controlar la proliferación exacerbada de las células tumorales. En particular, se utilizaron tres sistemas: 1) células transfectadas para expresar NAmyc, 2) líneas celulares estables que expresan NA al ser inducidas con mifepristona y 3) protección (adición de proteínas en lípidos catiónicos a las células) de la mutante NA. En todos los casos, la presencia de NA disminuyó la tasa de proliferación de las células tumorales respecto de los controles (Resultados no mostrados). Las consecuencias de esto se analizarán en la sección *Discusión*.

Activación de la actividad PAP por c-Fos

El PA es un intermediario clave en la síntesis de glicerofosfolípidos ya que puede ser convertido por la enzima CDS en CDP-DAG para continuar hacia la vía de PIPs y cardiolipina o alternativamente ser convertido por una enzima PAP a DAG, intermediario común a toda la vía de Kennedy que dará lugar finalmente a PtdCho, PtdEth y PtdSer. Hasta aquí hemos establecido que c-Fos logra una activación general de la vía de síntesis de PIPs mediante una interacción física directa y la consecuente activación de CDS1 y PI4KII α . Resultados previos de la Dra. Marianne Renner indican que c-Fos también es capaz de incrementar la actividad PAP en homogenatos totales de células NIH 3T3 quiescentes, derivando PA entonces hacia la vía de Kennedy al formar DAG, intermediario común de todos los productos lipídicos de esta vía (Fig. 15a). Esto último podría explicar los cambios en las especies marcadas radioactivamente en la segunda onda de la transición G₀/G₁. La actividad PAP que se incrementa por c-Fos en dichos homogenatos corresponde a PAP I, ya que no se detectó la formación de producto bajo condiciones de reacción adecuadas para medir PAP II (Tesis Doctoral Marianne Renner, 2003).

La activación de PAP I dependiente de la expresión de c-Fos también había sido descrita en células ganglionares de la retina de pollo. Al suprimir la expresión de c-Fos mediante un ARN antisentido contra esta proteína inyectado en la retina de los animales, se

cancela la activación de PAP I estimulada por luz (de Arriba Zerpa et al. 1999). Si bien los resultados mostraron claramente que la activación PAP I es dependiente de c-Fos, dado la complejidad del sistema experimental *in vivo* utilizado, resultaba muy difícil avanzar en los estudios del mecanismo molecular involucrado en esta activación.

Dada una reciente publicación en donde se reporta la purificación de la enzima Lipin 1 (Han & Carman 2010), con actividad PAP I, se decidió poner a punto un sistema de ensayo *in vitro* con componentes purificados donde analizar el rol de c-Fos sobre la actividad de esta enzima. En el sistema empleado la membrana modelo está formada por micelas del detergente no iónico Tritón X-100. Este detergente forma micelas de tamaños relativamente homogéneas de un radio cercano a 6 nm para micelas hidratadas (Lichtenberg et al. 1983, Thomas et al. 1999). A dichas micelas se les adiciona PA de forma de obtener un máximo de 10 mol% de PA, de esta manera no se alteran las características propias de las micelas de Tritón X-100 (Lin & Carman 1990). Las micelas mixtas de Tritón X-100/PA resultantes permite analizar la actividad PAP en un ambiente que simula la superficie de membranas celulares (Carman et al. 1995).

El gen *Lpn1* da lugar a tres transcritos distintos (Lipin 1 α , Lipin 1 β y Lipin 1 γ) por procesamiento alternativo del ARN. Cada una de las isoformas posee una localización subcelular particular así como una actividad PAP diferenciada. Lipin 1 α aparece predominantemente nuclear mientras que Lipin 1 β (que posee 33 residuos extra) reside mayormente en el citoplasma/ER (Peterfy et al. 2005). En cambio, Lipin 1 γ se encuentra asociada a gotas lipídicas a través de un dominio hidrofóbico específico de esta isoforma (Wang et al. 2011). Se escogió para el estudio a la enzima Lipin 1 β dada su localización subcelular. De aquí en adelante, Lipin 1 β será simplemente Lipin 1.

Se purificó hasta homogeneidad la enzima Lipin 1 expresada recombinante en *E. Coli*, y se obtuvo una banda del peso molecular aparente esperado de 110 kDa en SDS-PAGE. Se ensayó su actividad en micelas mixtas de Tritón X-100/PA con el agregado de concentraciones crecientes de c-Fos purificado (Fig. 15b). En este sistema purificado, el agregado de c-Fos recombinante incrementa la actividad PAP de Lipin 1 hasta cerca del 40% por encima del control. Este ensayo presenta claras ventajas respecto del realizado

ensayando la actividad PAP en homogenatos totales, en donde existen una vasta cantidad de proteínas celulares conjuntamente con la compleja composición de membranas biológicas. Aunque no son directamente comparables debido, entre otros motivos, a que las condiciones del ensayo son diferentes (Pasquare et al. 2004) se pueden establecer algunas conclusiones parciales. Por ejemplo en el ensayo de micelas mixtas los únicos componentes presentes son c-Fos, Lipin 1 y las membranas modelo compuestas por micelas mixtas de Tritón-100/PA, lo cual descarta que otras proteínas puedan estar involucradas en la activación de la enzima por c-Fos.

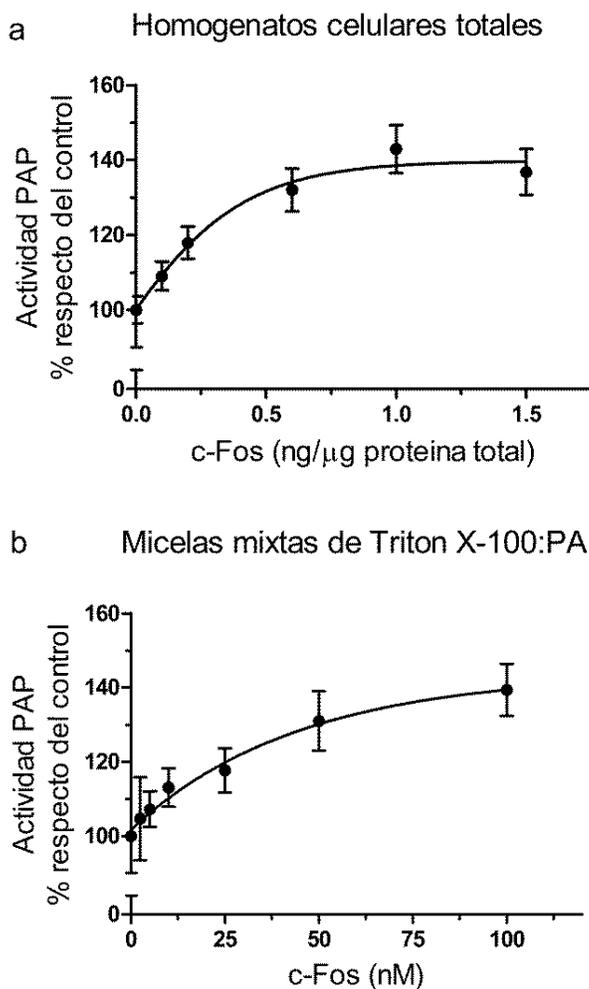


Figura 15. Efecto de la adición de c-Fos sobre la actividad PAP. a) Actividad PAP *in vitro* en homogenatos celulares totales de células NIH 3T3 quiescentes en función del agregado de c-Fos recombinante. b) Actividad PAP de Lipin 1 purificada sobre micelas mixtas de Tritón X-100/PA conteniendo 9.1 mol% y 1 mM de PA en función del agregado de c-Fos recombinante. La actividad enzimática está expresada con respecto al control (referenciado como el 100%) que contiene vehículo en lugar de c-Fos. Los resultados son el promedio \pm DE de un experimento representativo hecho en triplicado de al menos tres realizados.

Es decir que se confirma que el fenómeno de activación se debe exclusivamente a c-Fos actuando sobre algún aspecto de la enzima. Intentaremos acercarnos a dicho aspecto en próximos experimentos a partir de este sistema simplificado.

Teniendo en cuenta que c-Fos no puede homodimerizar y de que no existe en el sistema otra proteína tipo AP-1, esta es una nueva evidencia de que c-Fos ejerce su acción en forma monomérica y en forma no genómica. En la *Discusión* profundizaré el análisis de esta última afirmación.

El BD de c-Fos sería el responsable de la actividad incrementada de Lipin 1

Para definir cuáles son los residuos aminoacídicos implicados en la activación de la enzima, se determinó la actividad enzimática de Lipin 1 en el sistema purificado en presencia de las mutantes empleadas en la Fig. 10c. Al igual que para el caso de la vía de PIPs (Fig. 10), aquellas mutantes que contienen el BD son capaces de incrementar la formación de producto mientras que aquellas que no lo poseen no (Fig. 16). El caso más claro es la mutante Δ BD, a la que sólo le faltan los 21 residuos del mencionado dominio y que en consecuencia no incrementa la actividad de Lipin 1. Así como el BD probó ser relevante para la activación de la síntesis de PIPs (Fig. 10), se observa lo mismo en este caso. Sin embargo, se trata ahora de una enzima diferente, medida en un sistema purificado sobre membranas modelo; lo cual refuerza la importancia del BD de c-Fos en el mecanismo de activación. Otro

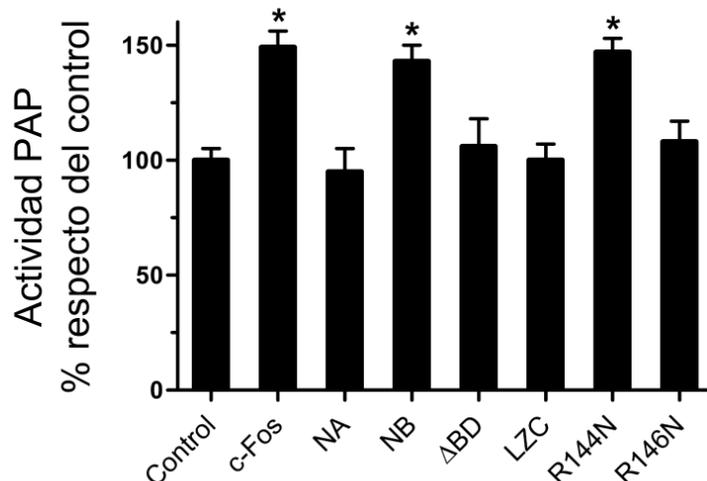


Figura 16. Efecto de las mutantes de delección o puntuales de c-Fos sobre la actividad PAP de Lipin 1.

Actividad PAP de Lipin 1 purificada ensayada sobre micelas mixtas de Tritón X-100/PA como en la Fig. 15b con o sin el agregado de 100 nM de la mutante indicada. Los resultados son el promedio \pm DE de un experimento representativo hecho en triplicado de un total de tres realizados. * $p < 0,01$ determinado con ANOVA de una vía con post-test de Dunnett.

punto a considerar es que al tratarse de un sistema purificado, puede descartarse que el BD esté interactuando con otra proteína o actuando como puente hacia una tercera proteína para generar el efecto de activación, lo que indicaría de que se trata de un efecto del BD por sí mismo. Es importante remarcar además que el agregado de la mutante R146N no incrementa la actividad respecto del control (Fig. 16), por lo que la significancia de este residuo no es exclusiva en la activación de la vía de síntesis de PIPs.

Fra-1, miembro de la familia Fos, a diferencia de c-Jun es capaz de activar a Lipin 1

Dado el rol del BD de c-Fos en la activación enzimática de Lipin 1, decidimos estudiar si otras dos proteínas que forman complejos de tipo AP-1 y que comparten un dominio BD, c-Jun y Fra-1, también promueven la activación. Las proteínas AP-1 poseen un dominio BD, responsable de la asociación al ADN, junto a un dominio llamado “cierre de leucinas”, responsable de la heterodimerización, que en conjunto se denomina “bZip”. La Fig. 17 muestra un esquema de las tres onco-proteínas con sus dominios bZip correspondientes, junto con un alineamiento de las secuencias de sus BD. Fra-1 es un miembro de la familia Fos que posee un BD altamente conservado con respecto a c-Fos aunque la homología total de las dos proteínas es inferior al 44%. Por el contrario, c-Jun tiene una secuencia muy divergente, y esa divergencia de secuencia incluye al dominio bZip en su totalidad. Cuando se adicionó Fra-1 obtenido en forma recombinante en lugar de c-Fos al sistema micelar, se incrementó la actividad PAP de Lipin 1 en una medida similar al aumento provocado por el agregado de c-Fos (Fig. 17c). La similitud de ambos BD refuerza la idea de la participación de este dominio no solo en su unión secuencia-específica al ADN sino también en la activación enzimática. En tanto c-Jun, que tiene un BD con baja homología respecto de las otras dos proteínas (e incluso una densidad de carga inferior), no promueve un incremento en la actividad de Lipin 1 cuando es adicionada al sistema purificado en lugar de c-Fos (Fig. 17c).

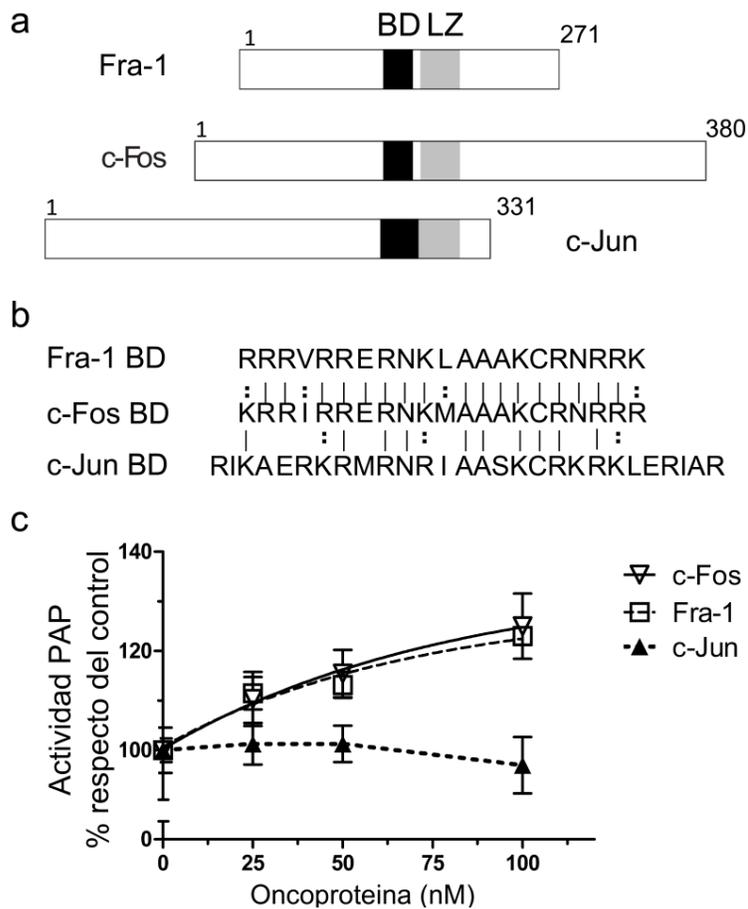


Figura 17. Efecto de c-Fos, Fra-1 y c-Jun en la actividad PAP de Lipin 1. a) Representación esquemática de Fra-1, c-Fos y c-Jun. Se indica en negro el BD y en gris el cierre de leucinas de las tres proteínas que se encuentran alineadas. El bZip se conforma por el BD y el cierre de leucinas. El cierre de leucinas permite la dimerización para formar dímeros AP-1 activos y el BD funciona asociándose a secuencias blanco de ADN pero también activando a enzimas blanco. b) BDs de las tres proto-oncoproteínas. La línea indica "identidad" y los dos puntos indican una sustitución conservativa. Note la alta homología entre los BDs de Fra-1 y c-Fos pero no así con el BD de c-Jun. c) Actividad PAP de Lipin 1 purificada sobre micelas mixtas de Tritón X-100/PA como se indica en la leyenda de la Fig. 15b con el agregado de c-Fos o Fra-1 o c-Jun purificados.

Lipin 1 interactúa físicamente con c-Fos y Fra-1 pero no con c-Jun

Hasta aquí, hemos establecido que c-Fos incrementa la actividad Lipin 1 a través de su dominio BD, en homogenatos totales pero también en un sistema purificado diseñado específicamente para ensayar la actividad de esta enzima. Esto planteó el interrogante respecto a si Lipin 1 y c-Fos participan en una asociación física como forma de alcanzar el estado activado de la enzima. Para responderlo, se analizó por microscopía FRET por emisión sensibilizada la posible interacción utilizando ahora el par de FRET mTurquoise2/ SYFP2. En la bibliografía se encuentran descriptas las mutaciones puntuales de CFP y YFP que resultan en proteínas fluorescentes que resultan más brillantes y resistentes al fotoblanqueo (Kremers et al. 2006, Goedhart et al. 2012), denominadas mTurquoise2 y SYFP2, y que son entonces mejores herramientas para microscopía de fluorescencia.

Se fusionaron c-Fos, c-Jun o Fra-1 a la proteína fluorescente mTurquoise2 y se estudió una posible interacción con Lipin 1-SYFP2 en células NIH 3T3 quiescentes luego de ser estimuladas durante 1 hora con 20% FBS en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Se eligió este tiempo de estímulo porque así como a 7,5 minutos post-estímulo se produce el pico en la síntesis de PIPs, a 1 hora post-estímulo el análisis indica que los lípidos marcados son mayoritariamente los principales constituyentes de membrana (Bussolino et al. 2001). Por lo tanto, al estimular las células por 1 hora, nos situamos en las condiciones *a priori* más favorables para observar el fenómeno de interacción. Como un control positivo, se utilizó c-Fos/ PI4KII α , una interacción que ya se había establecido (Figuras 9 y 13), si bien en ese caso la células habían sido estimuladas durante 7,5 minutos. Se encontró que tanto c-Fos como Fra-1 interaccionan físicamente con Lipin 1 mientras que c-Jun no lo hace (Fig. 18); lo cual correlaciona con nuestra hipótesis de que las onco-proteínas que activan a la enzima son capaces de interaccionar con ella.

La interacción aparece localizada fuera del núcleo, si bien tanto c-Fos como Lipin 1 localizan también dentro del mismo. Las enzimas analizadas en la vía de síntesis de PIPs son extra-nucleares, en cambio según bibliografía, Lipin 1 se ubica tanto en RE como en núcleo, donde cumple funciones diferentes. Su actividad PAP 1 se encuentra asociada al RE mientras que su función como co-activador transcripcional se produce en el núcleo (Siniosoglou 2013). c-Fos ejerce su actividad genómica en el núcleo, mediante su actividad como factor de transcripción de tipo AP-1, pero también de manera independiente a esta al incrementar la síntesis de PtdInsP₂ y promoviendo de esta forma cambios transcripcionales globales (Ferrero et al. 2014). Sin embargo, c-Fos ejerce su efecto no genómico principalmente en el citoplasma, asociado al RE (Caputto et al. 2014). Según se observa en la Fig. 18, la interacción c-Fos/Lipin 1 se produce peri-nuclearmente, probablemente asociado al RE. Por lo tanto, si bien las dos proteínas localizan en ambos compartimientos, la asociación y consecuentemente la activación parecen ocurrir únicamente a nivel del RE.

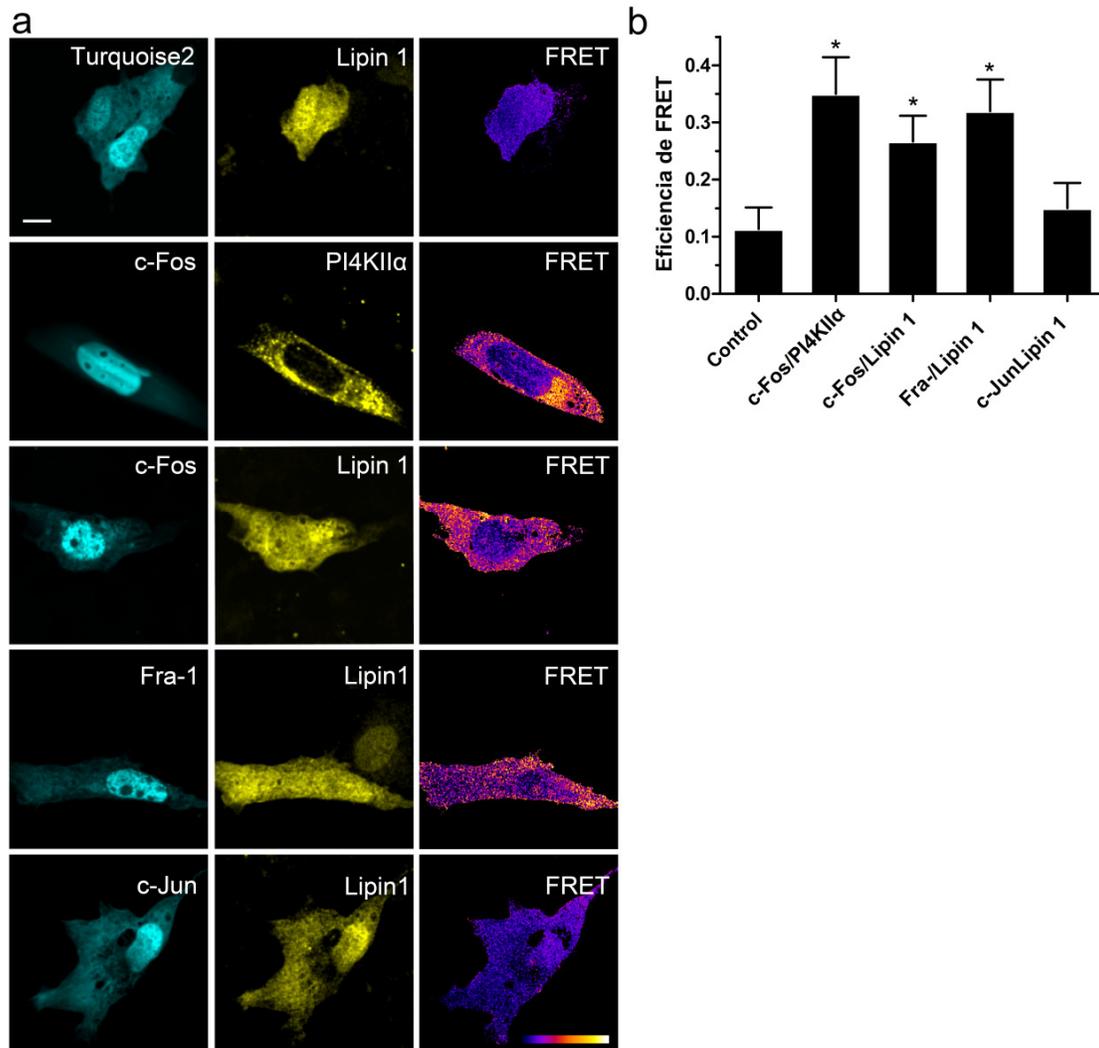


Figura 18. Microscopia FRET revela la interacción entre c-Fos/Lipin 1 y Fra-1/Lipin 1, pero no entre c-Jun/Lipin 1. Donor de FRET, mTurquoise2 (izquierda), Aceptor de FRET, SYFP2 (centro) e imagen de Eficiencia de FRET (derecha). Se co-transfectaron las células para que expresen c-Fos, Fra-1 o c-Jun fusionadas a mTurquoise2 junto con Lipin 1-SYFP2 y estas fueron examinadas por microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los casos. Como control negativo se utilizó mTurquoise2/Lipin 1 (fila superior) y como control positivo c-Fos-mTurquoise2/PI4KIIα (segunda fila). La imagen de Eficiencia de FRET fue generada con el programa *ImageJ*, usando una escala pseudocoloreada que representa la eficiencia en una escala que incrementa de azul a blanco, como se muestra en la barra de la esquina inferior derecha. El valor máximo (píxeles blancos) corresponde al control positivo SYFP2-mTurquoise2, una quimera de ambas proteínas fluorescentes unidas por un segmento flexible, cuya máxima eficiencia de FRET se utiliza para normalizar la escala (no mostrado). b) Eficiencia promedio de FRET \pm DE. Los resultados, obtenidos tras analizar 25 células en cada caso, provienen de un experimento representativo de un total de al menos tres. * $p < 0,001$ determinado por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. La barra blanca en la esquina superior izquierda de a) representa 10 μ m.

c-Fos modifica la actividad de Lipin 1 al incrementar su capacidad catalítica

Considerando que Lipin 1 interacciona con c-Fos y es activada por esta proteína, decidimos examinar la cinética de su activación en el sistema simplificado como estrategia para obtener información acerca del mecanismo molecular de esta activación. La capacidad catalítica incrementada de Lipin 1 en presencia de c-Fos puede deberse a un incremento en la capacidad para unirse a membranas, un incremento en la eficiencia catalítica de la enzima (eficiencia del sitio activo) o una combinación de ambos factores. Para resolver este interrogante, se realizaron ensayos enzimáticos utilizando micelas mixtas de Tritón X-100/PA (Fig. 19).

Como se mencionó anteriormente, Lipin 1 es una enzima soluble que primero debe asociarse a membranas para, una vez unida, buscar sobre la superficie a su sustrato PA para así catalizar la reacción como fosfatasa. Este proceso depende entonces de interacciones en solución con las membranas y de interacciones de superficie con los lípidos presentes sobre la membrana. Un modelo cinético que describe esta situación ha sido formulado y se denomina “modelo de dilución de superficie” (Carman et al. 1995). Usando este modelo, se realizaron dos tipos de experimentos: i) manteniendo la concentración de superficie de PA constante a 9.1 mol% mientras se incrementa su concentración molar y ii) manteniendo la concentración molar de PA fija a 1 mM mientras se modifica su concentración de superficie (o mol%).

Los experimentos de tipo i) permiten determinar la primera etapa en donde la enzima que se encuentra soluble se une a las membranas modelo en una transición desde la solución hacia la superficie para formar el complejo enzima-micela mixta. Esta asociación depende de la concentración de solución (o molar) del lípido (Lin & Carman 1990). Debido a que la concentración de superficie de PA está fija, al incrementar la concentración molar de PA es necesario incrementar la concentración molar de Tritón X-100 en la misma proporción. En consecuencia, se está incrementando el número total de micelas, que además tienen la misma composición. Los experimentos de tipo ii) en cambio permiten el estudio de cómo la enzima unida a la membrana modelo encuentra PA en la superficie de esta membrana para poder llevar a cabo la reacción enzimática.

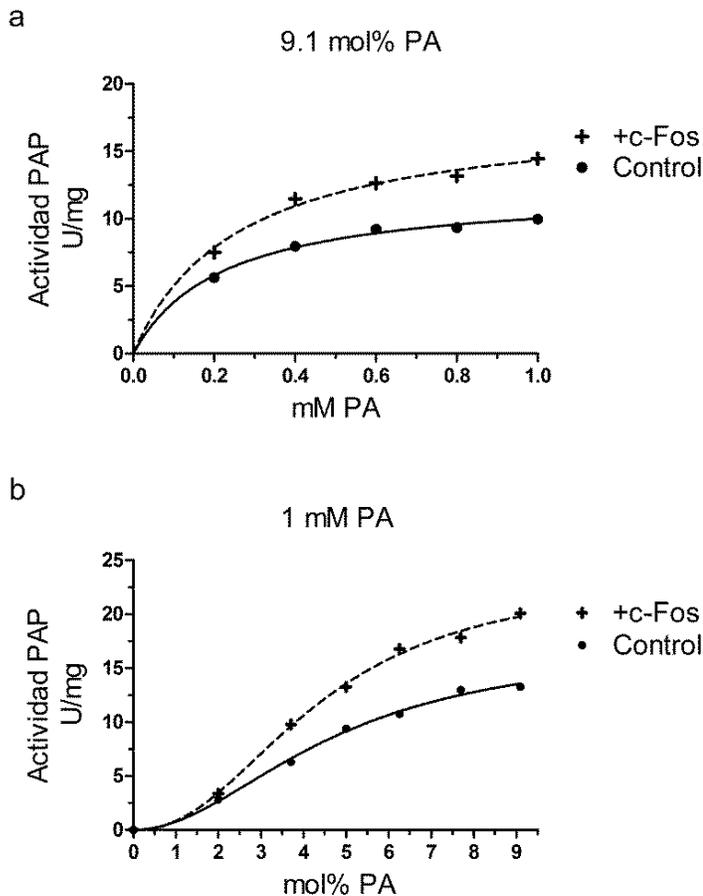


Figura 19. Dependencia del agregado de c-Fos en la actividad PAP de Lipin 1 con en la concentración molar y de superficie de PA. La actividad PAP de Lipin 1 se midió en función de la concentración molar de PA (a) y de la concentración de superficie de PA (b) con o sin el agregado de c-Fos. Para los experimentos en a), la relación molar de PA a Tritón X-100 fue mantenida en 9.1 mol%. Para los experimentos en b), la concentración molar de PA se mantuvo en 1 mM, y la concentración de Tritón X-100 fue variada para obtener las concentraciones de superficie indicadas. En ambos tipos de experimentos la concentración de c-Fos se mantuvo constante en $9,09 \times 10^{-6}$ mol%, lo que significa que el cociente entre c-Fos a lípido total se mantiene constante. Esta concentración es la misma que en la Fig. b en 100 nM de c-Fos, donde se obtuvo la mayor activación.

Esta etapa depende de la concentración de superficie de PA. En este caso, como la concentración molar de PA está fija, se incrementa la concentración molar de Tritón X-100 para así diluir la concentración de superficie de PA. En la práctica, se está incrementando fuertemente el número de micelas, que tienen en su superficie progresivamente menos PA (Carman et al. 1995, Han & Carman 2010). Expresado en otra manera, podríamos decir que la enzima está “viendo” menor cantidad de PA sobre la superficie de la micela. En ambos tipos de experimentos, la concentración de superficie de c-Fos se mantuvo constante a $9,09 \times 10^{-6}$ mol%, de forma que el cociente entre el contenido molar de c-Fos y la concentración molar total de lípidos se mantenga constante. En otras palabras, el cociente entre el número de moléculas de c-Fos y el número total de micelas mixtas presentes en el ensayo se conserva. Cuando se examinó cada punto experimental, encontramos que el porcentaje de

activación con respecto al control es constante en alrededor del 40% en todas las condiciones ensayadas (Fig. 19).

Bajo las condiciones de tipo i), se observó una cinética de tipo Michaelis-Menten; en tanto en los experimentos de tipo ii) se observó un comportamiento cinético cooperativo de tipo alostérico (ecuación de Hill). Utilizando regresiones no lineales utilizando estos modelos, fue posible determinar los parámetros cinéticos a partir de los datos de la Fig. 19, y se encuentran mostrados en la Tabla 2. Se encontró en los experimentos de tipo i) que, a pesar de que la constante k_{cat} se incrementa cerca del 50% (Fig. 19a), c-Fos no promovió una unión más eficiente de Lipin 1 a las membranas modelo, dado que las diferencias en K_s no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). El parámetro K_s es una medida de la afinidad de la enzima por las membranas, es decir una medida de las interacciones de la enzima en solución con las micelas. Análisis de los datos a partir de la ecuación de Hill de los experimentos de tipo ii) se encontró que el parámetro K_m no es modificado significativamente frente a la adición de c-Fos (Fig. 19b). El parámetro K_m puede ser considerado como la afinidad de enzima por su sustrato. La probada cooperatividad de Lipin 1 (Han & Carman 2010), reflejada en el número de Hill, no se ve alterada tampoco. En cambio, la k_{cat} de la reacción se ve positivamente modificada por c-Fos, e incrementa alrededor de 40%. Los experimentos realizados revelaron que la eficiencia catalítica de Lipin 1 es modificada por c-Fos sin que ello implique alterar la asociación de Lipin a las micelas, reflejada en K_s , o su interacción específica con PA, reflejada en K_m .

Los resultados son concordantes con otros obtenidos previamente para otras enzimas

Tabla 2. Parámetros cinéticos de Lipin 1 empleando micelas mixtas de Triton X-100/PA con o sin el agregado de c-Fos recombinante, calculados con el programa *GraphPad Prism 5* a partir de los datos de la Fig. 19a y b. Se usaron las ecuaciones de Michaelis-Menten o de Hill, respectivamente, para ajustar los datos.

	Constantes cinéticas con respecto a la concentración molar de PA		Constantes cinéticas con respecto a la concentración de superficie de PA		
	K_s (mM)	$k_{cat}(s^{-1})$	K_m (mol%)	$k_{cat}(s^{-1})$	No. Hill
Control	0,22±0,03	20,3±0,7	4,7±0,6	28,7±3,0	2,0±0,3
+c-Fos	0,26±0,04	29,9±1,6	4,4±0,5	39,4±2,5	2,2±0,2

activadas por c-Fos y que muestran que se produce un incremento en la capacidad catalítica sin modificar la afinidad por el sustrato. Pero además aquí la utilización del sistema purificado permite su análisis en un sistema muy simple en donde es posible establecer conclusiones en forma directa.

En los últimos años, múltiples reportes han descripto nuevas proteínas que interaccionan con Lipin 1, alterando su distribución subcelular a través de modificaciones post-traduccionales y/o al asociarse directamente con la misma, regulando así sus funciones celulares (Huffman et al. 2002, Harris et al. 2007, Grimsey et al. 2008, Liu & Gerace 2009). c-Fos interacciona con Lipin 1 (Fig. 18), pero la co-transfección con c-Fos no cambia la localización subcelular de Lipin 1 respecto a la transfección sólo de la enzima (Resultados no mostrados), lo cual indicaría que c-Fos no cambia la localización de la enzima sino que logra activarla donde esta localiza. Asimismo, c-Fos tampoco modifica su afinidad por la membrana modelo estudiada, ya que no cambia los parámetros K_s o K_m de la enzima. Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta una proteína que interacciona con Lipin 1 que modifica su actividad directamente, y no su localización subcelular o afinidad por membranas, aunque el mecanismo preciso de esta activación no está esclarecido completamente.

El dominio N-terminal de c-Fos es responsable de la asociación a Lipin 1

Los experimentos en la Fig. 16 nos indican que el BD de c-Fos es el responsable de la activación promovida sobre Lipin 1. En cambio, el dominio responsable de la asociación a Lipin 1 es desconocido en este punto. Para explorar este interrogante, se utilizaron las diferentes mutantes de delección que se esquematizaron previamente en la Fig. 10, fusionadas a mTurquoise2 para estudiar una posible interacción con Lipin 1 mediante microscopía FRET. Las mutantes NA (aa: 1-138, sin el BD) y Δ BD (solo le faltan los aa: 139-160) mantienen la asociación a Lipin 1, descartando de este modo que el BD sea el responsable de esta. La mutante LZC, que comprende el C-terminal de c-Fos, no se une a la enzima, sugiriendo que esta porción no participa en el fenómeno. La región mínima compartida por las mutantes capaces de unirse a Lipin 1 es nuevamente el N-terminal de c-Fos.

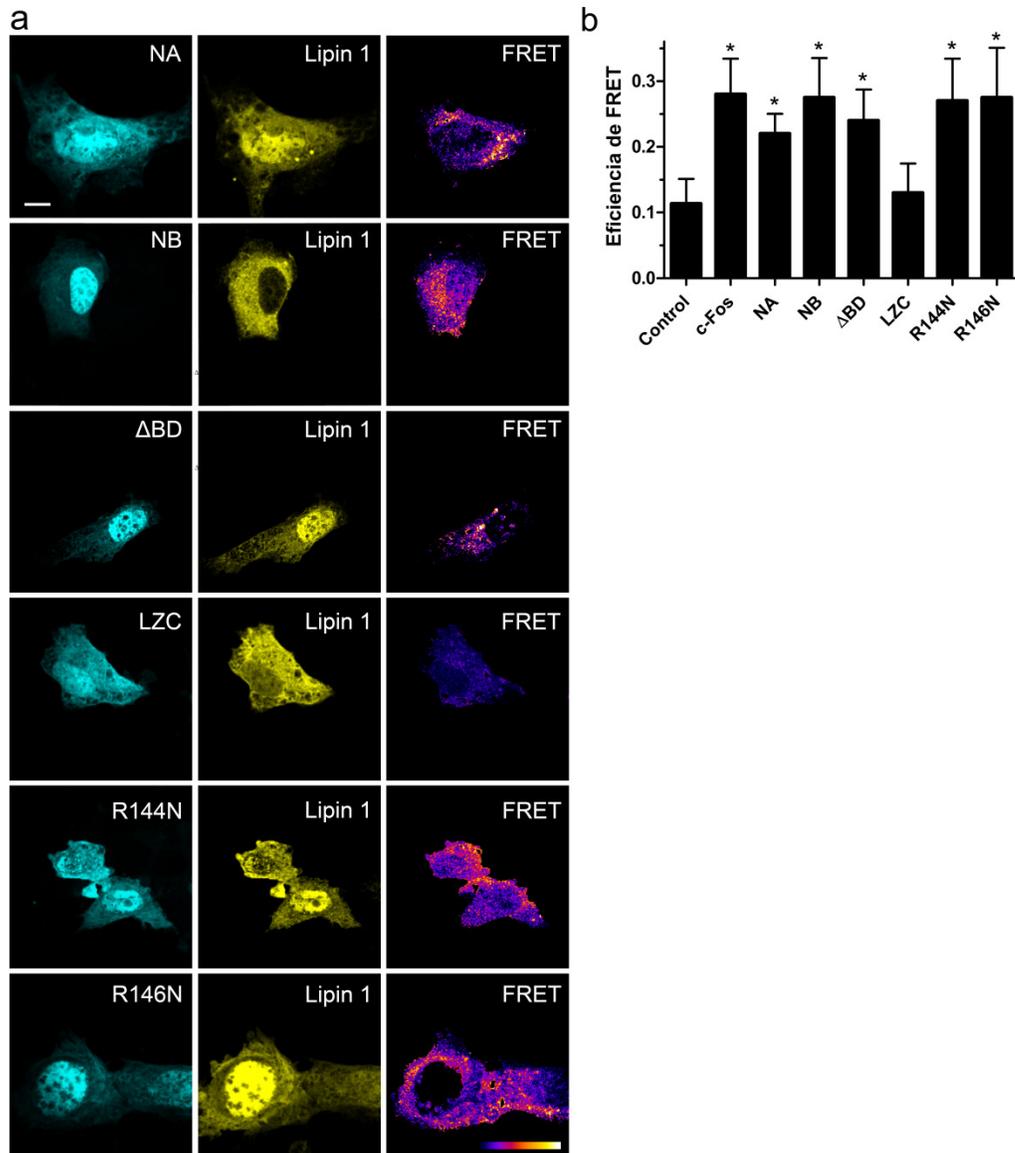


Figura 20. El dominio N-terminal es el responsable de la asociación de c-Fos a la enzima Lipin 1. Donor de FRET, mTurquoise2 (izquierda), Aceptor de FRET, SYFP2 (centro) e imagen de Eficiencia de FRET (derecha). Se co-transfectaron las células para que expresen a c-Fos o alguna de sus mutantes fusionadas a mTurquoise2 junto con Lipin 1-SYFP2 y estas fueron examinadas por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los casos. Se utilizó como control negativo mTurquoise2/Lipin 1 (no mostrado). La imagen de Eficiencia de FRET fue generada con el programa *ImageJ*, usando una escala pseudocoloreada que representa la eficiencia en una escala que incrementa de azul a blanco, como se muestra en la barra de la esquina inferior derecha. El valor máximo (píxeles blancos) corresponde al control positivo SYFP2-mTurquoise2, una quimera de ambas proteínas fluorescentes unidas por un segmento flexible, cuya máxima eficiencia de FRET se utiliza para normalizar la escala (no mostrado). b) Eficiencia promedio de FRET \pm DE. Resultados obtenidos tras analizar 25 células en cada caso son de un experimento representativo de un total de al menos tres. * $p < 0,001$ determinado por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. La barra blanca en la esquina superior izquierda de a) representa 10 μ m.

La región aa: 47-90 dentro del N-terminal de c-Fos estaría involucrado en la asociación Lipin 1/c-Fos

Dado que la región N-terminal de c-Fos se asocia pero no activa a Lipin 1 (Figuras 20 y 16, respectivamente), decidimos estudiar la porción mínima de esta región que conserva la capacidad para unirse a esta enzima. El Dr. César Prucca gentilmente cedió las mutantes conteniendo diferentes porciones de los primeros 138 residuos de c-Fos fusionadas a la proteína fluorescente mTurquoise2 y que utilizamos para establecer la región mínima necesaria para la asociación. Estas mutantes se encuentran representadas en la Fig. 21c. Las tres mutantes pequeñas, de 46 residuos de longitud (NA 1-46, NA 47-92, NA 93-138), no mostraron asociación a Lipin 1 (Fig. 21b). Sorpresivamente, tanto los primeros 92 residuos como la región aa: 47-138 alcanzaron eficiencias de FRET comparables con la de c-Fos salvaje. Una posible explicación a este resultado es que la región aa: 47-92 (la región mínima compartida por las dos mutantes capaces de interactuar con Lipin 1) esté involucrada en el fenómeno de asociación pero que esta región no sea suficiente por sí misma para asegurar la unión a la enzima. Otra explicación posible es que la región aa: 47-92 sea suficiente para la asociación, pero el impedimento estérico debido al gran volumen de la proteína fluorescente que se encuentra a continuación del péptido de solo 46 residuos de longitud impida la asociación a la enzima. El perfil hidrofóbico de c-Fos muestra dos segmentos que poseen los valores más altos de hidrofobicidad de toda la proteína entre los residuos 50-68 y 76-86 (Ver *Discusión*, Fig. 23). La hidrofobicidad parece tener un rol de importante para la asociación. Dado que tanto los primeros como los últimos 46 residuos (aa: 1-46 y aa: 93-138, respectivamente) son también requeridos para la asociación, podría ser que estos residuos actúan simplemente como espaciadores o conectores flexibles que permiten aliviar la tensión estérica entre las secciones hidrofóbicas asociadas a la enzima y la proteína fluorescente citoplásmica. Alternativamente, estas regiones de c-Fos (aa: 1-46 y aa: 93-138) podrían poseer características particulares, lo que será discutido en la próxima sección conjuntamente con el hecho de que todas las enzimas activadas interactúan específicamente con la región N-terminal.

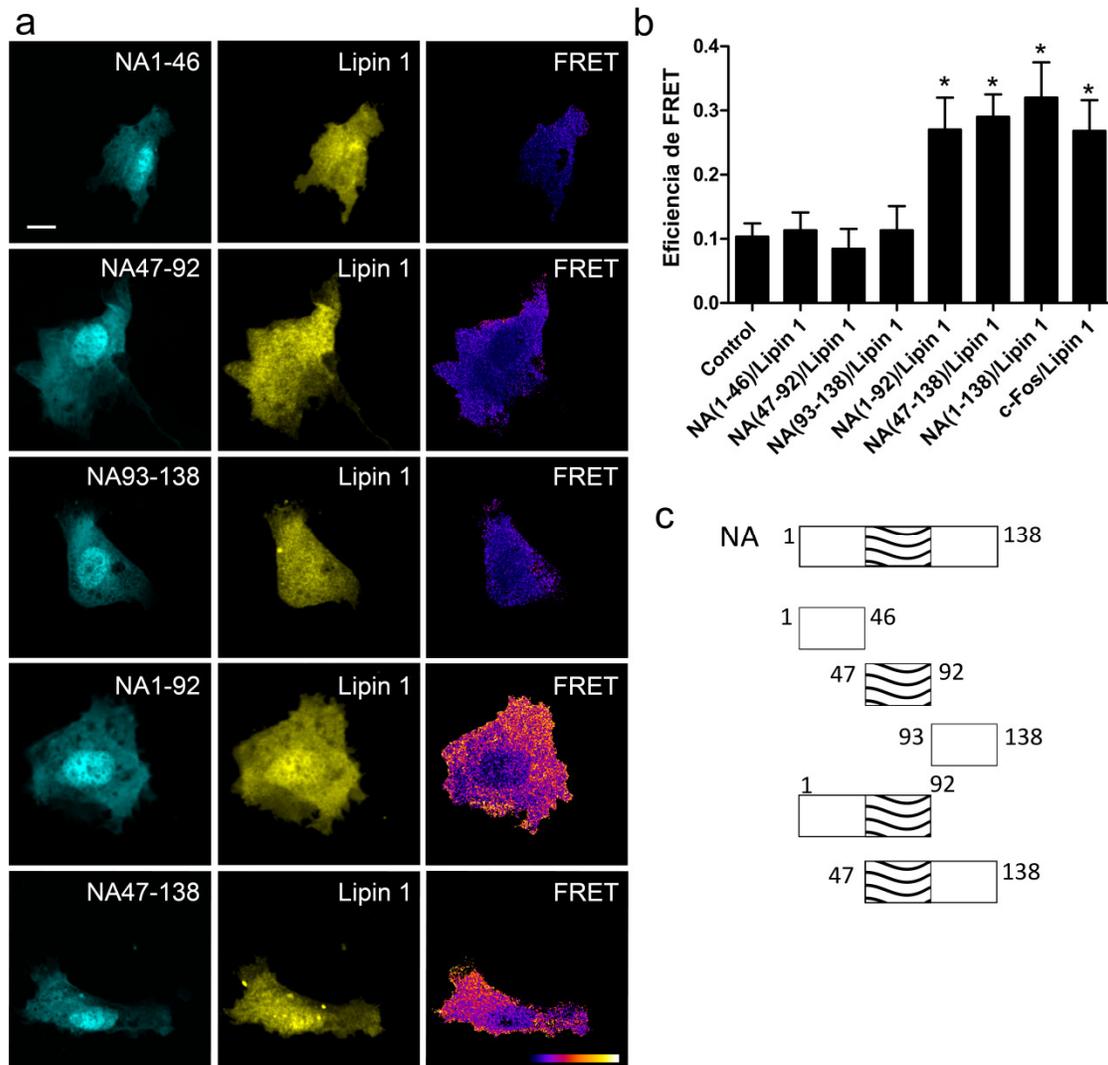


Figura 21. Microscopía FRET revela la importancia de la región de c-Fos aa: 47-93 para la asociación con Lipin 1. a) Donor de FRET, mTurquoise2 (izquierda), Aceptor de FRET, SYFP2 (centro) e imagen de Eficiencia de FRET (derecha). Se co-transfectaron las células para que expresen a las mutantes pequeñas de la región N-terminal de c-Fos fusionadas a mTurquoise2 junto con Lipin 1-SYFP2 y estas fueron examinadas por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los casos. Se utilizó como control negativo mTurquoise2/Lipin 1 (no mostrado). La imagen de Eficiencia de FRET fue generada con el programa *ImageJ*, usando una escala pseudocoloreada que representa la eficiencia en una escala que incrementa de azul a blanco, como se muestra en la barra de la esquina inferior derecha. El valor máximo (píxeles blancos) corresponde al control positivo SYFP2-mTurquoise2, una quimera de ambas proteínas fluorescentes unidas por un segmento flexible, cuya máxima eficiencia de FRET se utiliza para normalizar la escala (no mostrado). La barra blanca en la esquina superior izquierda de a) representa 10 μm b) Eficiencia promedio de FRET \pm DE. Resultados obtenidos tras analizar 25 células en cada caso son de un experimento representativo de un total de al menos tres. * $p < 0,001$ determinado por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. c) Representación esquemática de la región N-terminal, que incluye una sección altamente hidrofóbica (aa: 47-92, representado con un patrón ondulado), y de las distintas mutantes pequeñas del N-terminal empleadas en a).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

La activación de la síntesis de fosfolípidos por c-Fos es un fenómeno no genómico

La activación de la síntesis de fosfolípidos podría ser en principio una consecuencia de la actividad de c-Fos como factor de transcripción tipo AP-1, al incrementar por ejemplo la expresión de enzimas de síntesis de los mismos. Los primeros experimentos de marcación de fosfolípidos totales en células de la retina de pollo indicaron la dependencia de la expresión de c-Fos para el incremento en el marcado radioactivo en respuesta a la luz (Guido et al. 1996, Bussolino et al. 1998). Es importante discutir en este punto las evidencias experimentales encontradas fundamentalmente en esta Tesis y en otros trabajos del grupo que muestran como c-Fos realiza esta función no canónica en un nivel no genómico.

La primera evidencia directa de esto fueron los experimentos realizados *in vitro* en los cuales se midió la incorporación de ^{32}P desde ^{32}P -ATP a fosfolípidos totales (Gil et al. 2004) o en particular a PtdInsP y PtdInsP₂ (esta Tesis, Fig. 10) utilizando como fuente de enzima homogenatos totales u homogenatos libres de la fracción nuclear de células quiescentes que contienen niveles despreciables de c-Fos endógeno. En estos experimentos, se adicionó en forma exógena ^{32}P - γ -ATP junto con c-Fos purificado, para que luego las enzimas presentes en el homogenato celular incorporaran fosfato radioactivo a fosfolípidos, que se extrajeron y cuantificaron. El agregado de c-Fos recombinante incrementa el marcado radioactivo de fosfolípidos *in vitro* alrededor del 100% por encima del control. Lo que es clave en los experimentos de marcación radioactiva *in vitro* es que, en células quiescentes, los niveles endógenos de los otros miembros AP-1 tampoco son detectables. c-Fos es incapaz de estimular la transcripción en ausencia de c-Jun (Chiu et al. 1988), lo que descarta una activación de la síntesis lipídica a partir de mecanismos regulatorios genómicos en este sistema. Por otro lado, c-Jun purificado ensayado en los experimentos antes mencionados no tuvo un efecto en la tasa de síntesis de fosfolípidos (Gil et al. 2004) o en particular en la activación de Lipin 1 en un sistema purificado (Fig. 17), apuntando hacia la especificidad del fenómeno de activación.

La segunda línea de evidencia de que el efecto que estudiamos se produce de manera no genómica se obtuvo a partir de la utilización de mutantes de delección de c-Fos en los

mencionados ensayos de marcación de fosfolípidos *in vitro*, donde el ejemplo más claro surge de la mutante NB (aa: 1-160). Esta mutante es capaz de activar la síntesis de fosfolípidos y en particular de PIPs (Fig. 10), así como de activar a Lipin 1 (Fig. 16) a niveles comparables con la proteína c-Fos completa. Sin embargo, la mutante NB no contiene dominio de cierre de leucinas, indispensable para la heterodimerización y consecuente formación de un dímero AP-1. Dado entonces que NB no puede actuar como factor de transcripción, pero aun así activa la síntesis de fosfolípidos, ello confirma la función no genómica de c-Fos. Más aún, la mutante NB ha sido capaz de sostener *in vivo* la diferenciación o la proliferación celular en células privadas de factores de crecimiento (Gil et al. 2004, Gil et al. 2012). La utilización de mutantes ha establecido también que la función anti-apoptótica de c-Jun, antagonizando a MEKK en células PC12, está dada de forma no genómica ya que no depende de su dimerización o unión al ADN (Leppa et al. 2001), lo cual indica que las funciones no genómicas de los miembros AP-1 no son exclusivas de c-Fos.

La confirmación última de que la activación de la síntesis lipídica se trata de un efecto independiente de la transcripción ha sido descrita en esta Tesis doctoral, en el ensayo de la actividad PAP de Lipin 1 en micelas mixtas. En este sistema altamente simplificado, sin más componentes que las membranas modelo, Lipin 1 y la propia onco-proteína, c-Fos es capaz por sí mismo de generar un efecto sobre la actividad catalítica de la enzima (Fig. 15b). En definitiva, las distintas líneas de evidencia convergen en establecer que este fenómeno de activación es claramente no genómico.

c-Fos es capaz de activar tanto a CDS1 como a Lipin 1

Al comenzar esta Tesis, se había determinado previamente que c-Fos es capaz de incrementar el marcado radioactivo de todas las especies de fosfolípidos analizadas (Bussolino et al. 2001, Gil et al. 2004), si bien los pasos metabólicos particulares permanecían sin examinar. Para profundizar entonces sobre las etapas metabólicas que pudieran ser afectadas por c-Fos utilizamos como modelo de estudio la inducción de células quiescentes a re-ingresar al ciclo de celular mediante el agregado de FBS al 20% al medio de cultivo, lo cual dispara una serie de eventos celulares que estudiamos en la ventana de la primera hora post-

estímulo. En particular, estudiamos el marcado radioactivo de las dos ondas consecutivas de síntesis de lípidos en esta ventana temporal. Estas ondas poseen características distintas ya que mientras que en la primera se marcan fundamentalmente PIPs en la segunda, en cambio, se marcan mayoritariamente los principales constituyentes de membrana, como por ejemplo PtdEth (Bussolino et al. 2001). En este sentido, en la primera parte de esta Tesis se estableció que para incrementar el marcado de PIPs c-Fos actúa sobre la enzima CDS1 (la primera de la vía) y sobre PI4KII α (que cataliza el tercer paso metabólico). El fenómeno se probó de relevancia biológica, ya que al deprimir la expresión de c-Fos, se inhibe el incremento en el marcado (Fig. 3). Más aún, se estableció que las mencionadas enzimas están necesariamente implicadas en el proceso, ya que al deprimir la expresión de CDS1 o de PI4KII α se anulaba el efecto de activación de la síntesis al estimular a las células (Fig. 7).

Claramente, CDS1 tiene un rol destacado en la síntesis de fosfolípidos y en la regulación de este metabolismo. La enzima CDS de *Drosophila* (que posee un único gen para la enzima) ha sido descrita como clave para coordinar el crecimiento celular y el acúmulo de grasas ya que al aumentar la disponibilidad de PtdIns, incrementa la actividad de la vía de la insulina, lo que induce el crecimiento celular (Liu et al. 2014). La vía de la insulina es una vía de señalización conservada desde mamíferos hasta *Drosophila* que depende del suministro de PtdIns y regula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo lipídico (Teleman 2010). Las moscas que son mutantes nulos para CDS poseen un menor tamaño de células y órganos conjuntamente con un acumulamiento de lípidos neutros (Liu et al. 2014). Esto viene de la mano de otros reportes, donde en el mencionado organismo se involucra a CDS en vías de señalización celular vinculadas a PIPs (Wu et al. 1995) o incluso en células de mamífero donde afecta las respuestas de cascadas de señalización inducidas por citoquinas pro-inflamatorias específicas (Weeks et al. 1997). Por otro lado, numerosos estudios genéticos y bioquímicos llevados a cabo en levaduras y células de mamíferos señalan a Lipin 1 como un regulador crucial para el metabolismo lipídico y la fisiología celular (Csaki & Reue 2010, Harris & Finck 2011, Pascual & Carman 2013, Siniosoglou 2013). Por ejemplo, un estudio implicó a Lipin 1 en la síntesis de fosfolípidos que acompaña la expansión de membranas del RE en la diferenciación de linfocitos B (Fagone et al. 2007).

Está claro que la regulación de la actividad de Lipin y CDS determina la distribución del esqueleto de glicerol entre las dos ramas de las vías metabólicas (Fig.22). Por lo tanto, podrían determinar el destino de los intermediarios lipídicos, por un lado hacia la formación de PIPs (hacia vías de señalización mediadas por estos lípidos), o en cambio a la formación de TAG (como forma de almacenamiento de energía) y fosfolípidos de membrana como PtdCho o PtdEth necesarios para la expansión de membranas celulares. Hemos mostrado en los *Resultados* que c-Fos es capaz de activar tanto la conversión de PA a CDP-

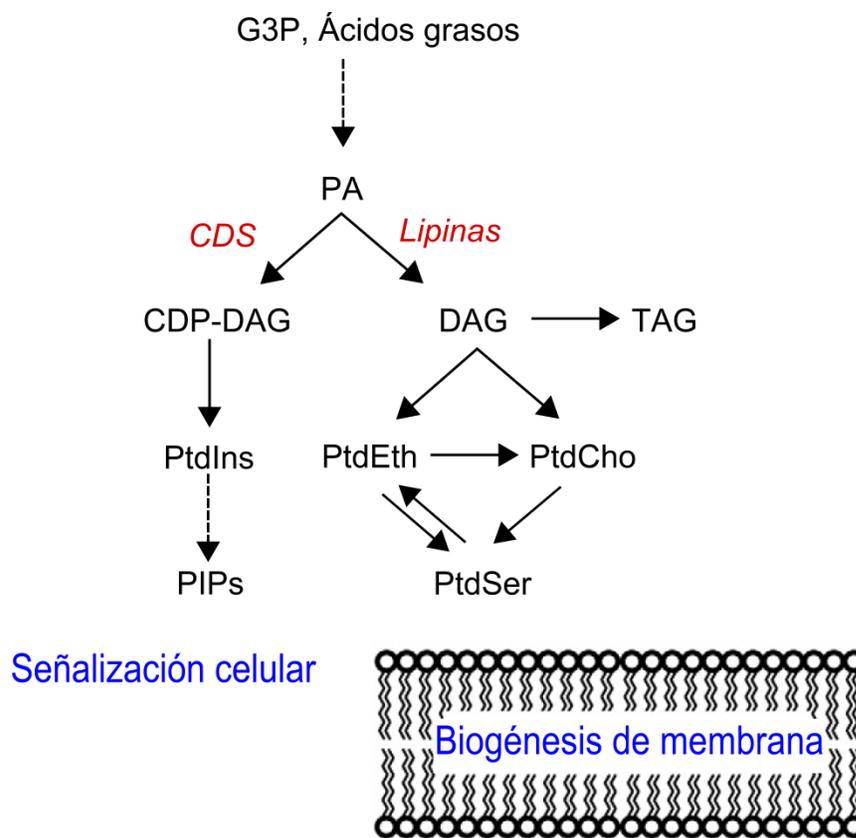


Figura 22. Esquema simplificado de las vías de síntesis de novo de glicerofosfolípidos. El glicerol-3-P (G3P) es convertido a través de una serie de acilaciones con ácidos grasos en PA (no mostrado). PA es un intermediario clave que es usado, al ser convertido en DAG por las Lipinas, para la síntesis de los principales fosfolípidos PtdCho, PtdEth y PtdSer (vía de Kennedy) y en consecuencia la biogénesis de membrana. EL DAG producido también es utilizado en la síntesis de triacilglicerol, lípido neutro de reserva por excelencia. En la otra rama, PA es convertido en CDP-DAG por CDS, que dará finalmente PIPs, involucrados en señalización celular. Adaptado de Siniosoglou 2013.

DAG (activando CDS1, hacia la vía de PIPs, Figs. 4,5 y 6) como a DAG (activando Lipin 1, hacia la vía de Kennedy, Figs. 15 y 16). Los cambios en la activación de estas dos enzimas pueden en principio explicar las diferencias en las especies marcadas en las dos ondas. No existe una manera fácil de determinar cómo c-Fos podría incrementar una etapa metabólica en favor de la otra para generar un flujo metabólico hacia una vía en particular. No está claro como c-Fos podría generar este efecto, pero sí que la interrelación entre CDS, Lipin 1 y c-Fos está involucrada en el fenómeno, según se desprende de las vías de síntesis de fosfolípidos presentados en la Fig. 22.

¿Se activa primero una enzima y luego otra? Un punto que quedó pendiente fue el de establecer la dinámica de la activación mediante FRET en células estimuladas, siguiéndolas en el tiempo. ¿Es una cuestión temporal, de localización o una combinación de ambas? Mientras que CDS es una proteína integral de membrana, Lipin 1 debe translocar hacia las membranas para catalizar la reacción enzimática. Ello ya impone una limitación temporal. Por otro lado, en los ensayos *in vitro*, CDS requiere menores concentraciones de c-Fos respecto de Lipin 1 para activarse (Figs. 4 y 15a, respectivamente). Si bien ambos ensayos no son directamente comparables, por las condiciones diferentes del ensayo, podrían estar indicando una tendencia. Si la afinidad de CDS por c-Fos fuera mayor que la de Lipin, se podría activar a menores concentraciones de c-Fos, y por lo tanto a tiempos cortos post-estímulo cuando la concentración de c-Fos es menor. A la hora post-estímulo, la mayor concentración de c-Fos permitiría la activación de Lipin. Esta es sólo una de las posibles explicaciones, teniendo en cuenta la cuestión temporal y de afinidad, sin embargo, hay muchas otras consideraciones a tener en cuenta y que seguramente serán interesantes explorar.

¿Para qué son necesarios los lípidos cuya síntesis c-Fos incrementa?

Es demasiado simplista a esta altura pensar que el aumento en la síntesis lipídica sólo puede ser para generar nueva membrana que directamente se utilice para la expansión de membranas necesaria para el crecimiento celular. Si bien el ensayo *in vitro* de marcación de fosfolípidos a partir de ^{32}P - γ -ATP no distingue entre síntesis *de novo* o recambio parcial,

también se hicieron experimentos *in vivo* utilizando como precursor ^3H -glicerol y analizando los fosfolípidos marcados, y este ensayo da cuenta exclusivamente de la síntesis *de novo*, en donde se mostró la dependencia de la expresión de c-Fos para su activación (de Arriba Zepa et al. 1999). Entonces c-Fos activa la síntesis *de novo* de los principales fosfolípidos, pero esto no implica la producción neta de membranas. Por ejemplo, las altas tasas de síntesis de PtdCho en células en G_1 del ciclo celular se ven acompañadas de altas tasas de degradación del mencionado lípido mediado por la fosfolipasa independiente de calcio A_2 (iPLA $_2$) (Manguikian & Barbour 2004) y la esterasa diana de neuropatía (Zaccheo et al. 2004, Glynn 2005), generando un balance durante esta etapa. La acumulación neta de PtdCho se da al llegar a la fase S, donde una reducción en el recambio lo permite (Jackowski 1994). Sin embargo, esta fase de alto recambio es necesaria para la proliferación celular. De hecho, la inhibición de iPLA $_2$ en células de cáncer de ovario produce un arresto de la proliferación en la fase S, que puede ser rescatado con el agregado exógeno de ácido lisofosfatídico (LPA), producto de la degradación de PtdCho por esta enzima (Song et al. 2007). LPA ha probado tener funciones de crecimiento y supervivencia en este tipo particular de células (Fang et al. 2002).

En el caso de c-Fos, hemos probado cómo aumenta la síntesis de fosfolípidos mediando etapas claves. Pero, ¿podría c-Fos también incrementar la actividad de fosfolipasas? Evidencias encontradas en monocapas como modelo de membranas indican que c-Fos modula la actividad de tres clases de fosfolipasas (Borioli et al. 2002), al menos en este sistema simplificado. Interesantemente, varios lípidos bioactivos que se producen durante el metabolismo de glicerofosfolípidos como PA, DAG, PtdIns(4,5)P $_2$ y ácido araquidónico, pueden regular vías de señalización celular (Oude Weernink et al. 2007). El metabolismo lipídico es muy complejo y aún no se entiende acabadamente como funciona pero claramente la regulación del mismo tiene consecuencias sobre la crecimiento celular, proliferación, supervivencia y apoptosis al actuar sobre vías de señalización (Huang & Freter 2015) y que van más allá de la simple acumulación de membrana. A pesar de no comprender todavía el fin último de los fosfolípidos cuya síntesis c-Fos induce, las consecuencias celulares de c-Fos han sido puestas de manifiesto en numerosos estudios, ya que al deprimir

la expresión de c-Fos se reduce el marcado radiactivo de fosfolípidos y ello conlleva a la detención de la diferenciación (Gil et al. 2004) y de la proliferación (Gil et al. 2012). Hemos estudiado la forma en que c-Fos consigue la activación de la síntesis, pero queda abierta la pregunta de los mecanismos que estos lípidos desencadenan para sostener finalmente la proliferación.

Un mecanismo compartido para la activación de la síntesis

Un aspecto que emerge del cuerpo de resultados de esta Tesis es el mecanismo con el que c-Fos activa en forma general la síntesis de glicerofosfo- y glico- lípidos. En todos los casos estudiados, la activación de enzimas particulares tiene puntos en común: un aumento en la V_{max} sin modificar el K_m . Este fue el caso para CDS1, PI4KII α , Lipin 1, pero también para glucosilceramida sintasa (GlcCerS), la primera enzima en la vía de síntesis de glicolípidos (Crespo et al. 2008). Mientras que algunas enzimas son activadas, otras no lo son, y en todos los casos estudiados, la activación involucra una asociación física directa entre c-Fos y la enzima activada. Los resultados obtenidos sostienen la existencia de un mecanismo común para la activación de la síntesis de lípidos mediada por la proto-oncoproteína c-Fos.

El mecanismo común comienza por la localización subcelular de los participantes del fenómeno en estudio, así como c-Fos se encuentra asociado a las membranas del RE (Bussolino et al. 2001), también lo están las enzimas que es capaz de activar. Es para destacar que el RE es la principal organela donde transcurre la biosíntesis de lípidos (Bell et al. 1981, van Meer et al. 2008) y aparece como un sitio de activación en común para todas las enzimas con las que c-Fos interactúa. Está claro que CDS1 localiza en el RE (Inglis-Broadgate et al. 2005), así como Lipin 1 (Peterfy et al. 2005, Grimsey et al. 2008). En cambio la enzima PI4KII α se encuentra en múltiples compartimientos, se localiza en el trans-Golgi (Wang et al. 2003), membranas del sistema endosomal (Salazar et al. 2005) así como intermediarios de tráfico especializados como por ejemplo vesículas sinápticas (Guo et al. 2003). Sin embargo, un reporte muestra sólida evidencia bioquímica de que existe una fracción minoritaria pero muy activa enzimáticamente que localiza en el RE (Waugh et al. 2003), donde podría ser activada por c-Fos (Clayton et al. 2013). En esta última revisión, se cita de este modo al

reporte producto de los resultados de la primera parte de la presente Tesis doctoral que fueran publicados en la revista *Mol. Biol. Cell* (Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011).

Por otro lado, aunque la enzima GlcCerS normalmente se clasifica como una enzima residente en Golgi, también se la ha detectado en membranas de pre-Golgi/RE (Futerman & Pagano 1991, Kohyama-Koganeya et al. 2004). Más aún, GlcCerS es única entre las enzimas glicolípido glicosiltransferasa en el sentido de que el sitio catalítico se orienta hacia la cara citoplásmica en vez de la cara luminal del RE (Kohyama-Koganeya et al. 2004). En conclusión, la activación de la síntesis de lípidos por c-Fos se logra al incrementar la actividad de enzimas particulares que translocan o son componentes integrales del retículo endoplásmico. La única excepción encontrada hasta aquí es PI4P5K (PtdIns4P-5-quinasa), que se ubica principalmente en el núcleo (Boronenkov et al. 1998, Mellman et al. 2008). Se mostró que c-Fos activa a esta enzima en matrices nucleares, promoviendo la formación de PtdIns(4,5)P₂ y consecuentemente cambios transcripcionales globales independientes de la actividad AP-1 de c-Fos (Ferrero et al. 2014).

Una pregunta que queda abierta en la presente Tesis es si existen determinantes en las enzimas que permitan su interacción con c-Fos, ya que no hemos apuntado a establecer las regiones involucradas en las enzimas activadas. Todavía es incierta la región de Lipin 1 β involucrada en la asociación con c-Fos. Existen descriptos en Lipin 1 una organización en forma de dominios conservados que comprende al amino terminal (N-LIP) con una función desconocida y un dominio C-terminal (C-LIP) que contiene el dominio catalítico, una secuencia tipo HAD. Sumados a estos dominios, se encuentra además el dominio PBD involucrado en la unión de PA y algunas otras regiones más de alta homología con los otros miembros de la familia, junto con extensivas regiones no conservadas. Es por lo tanto de interés estudiar a futuro si la región de interacción es un dominio conservado en Lipin 2 y 3. ¿Se trata de una activación PAP I general o está restringida a Lipin 1? En la vía de síntesis de PIPs encontramos que la isoforma α pero no la β de PI4KII se asocia y es activada por c-Fos (Figs. 8 y 9). La comparación de secuencias entre estas isoformas muestra, como se mencionó en la *Introducción*, una región catalítica C-terminal muy conservada mientras que en la región N-terminal (los primeros 100 residuos) existe una muy baja homología e incluso

se ha postulado que esta región interviene en asociaciones proteína-proteína específicas. Podría entonces tratarse de una región que la isoforma α posee pero no la β o, por otro lado, podría tratarse simplemente de que estas dos proteínas no localizan en los mismos compartimientos subcelulares. Para el caso de Lipin 1 y Lipin 2, se estableció que ambas no sólo tienen un patrón de localización diferencial sino también un patrón de expresión temporal diferente (Grimsey et al. 2008). Estos ejemplos ponen de manifiesto que la existencia de más de una enzima que cataliza los mismos pasos metabólicos no significa que sus funciones sean redundantes.

La naturaleza intrínsecamente desestructurada de c-Fos y su asociación a múltiples enzimas

blanco

¿Cómo es que c-Fos es capaz de activar enzimas que no comparten similitudes estructurales obvias entre ellas? La respuesta puede encontrarse en la naturaleza intrínsecamente desordenada de c-Fos (Campbell et al. 2000, Gaggiotti et al. 2009). Pertenece a la familia de proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs), proteínas que contienen extensas regiones que no poseen una estructura 3D definida en su estado nativo (Dyson & Wright 2005). Este tipo de proteínas tienen una plasticidad conformacional que les permite el reconocimiento y unión a múltiples proteínas blanco con una combinación única de interacciones de alta especificidad y baja afinidad (Dyson & Wright 2005, Wright & Dyson 2009, Liu & Huang 2014). La existencia de IDPs está cambiando el paradigma de secuencia-estructura-función. Las IDPs no poseen una única estructura y se adaptan a diferentes roles, si bien se ha encontrado que las proteínas relacionadas a señalización celular y en particular a cáncer se encuentran enriquecidas en regiones desordenadas (Iakoucheva et al. 2002).

El orden o desorden de una proteína está definido al nivel de la secuencia de sus aminoácidos, lo que ha permitido el desarrollo de predictores de desorden basados en la secuencia. Podría decirse en base a la bibliografía que estos predictores poseen una exactitud general cercana al 80% al comparar los resultados de probabilidad de desorden con la información experimental (He et al. 2009).

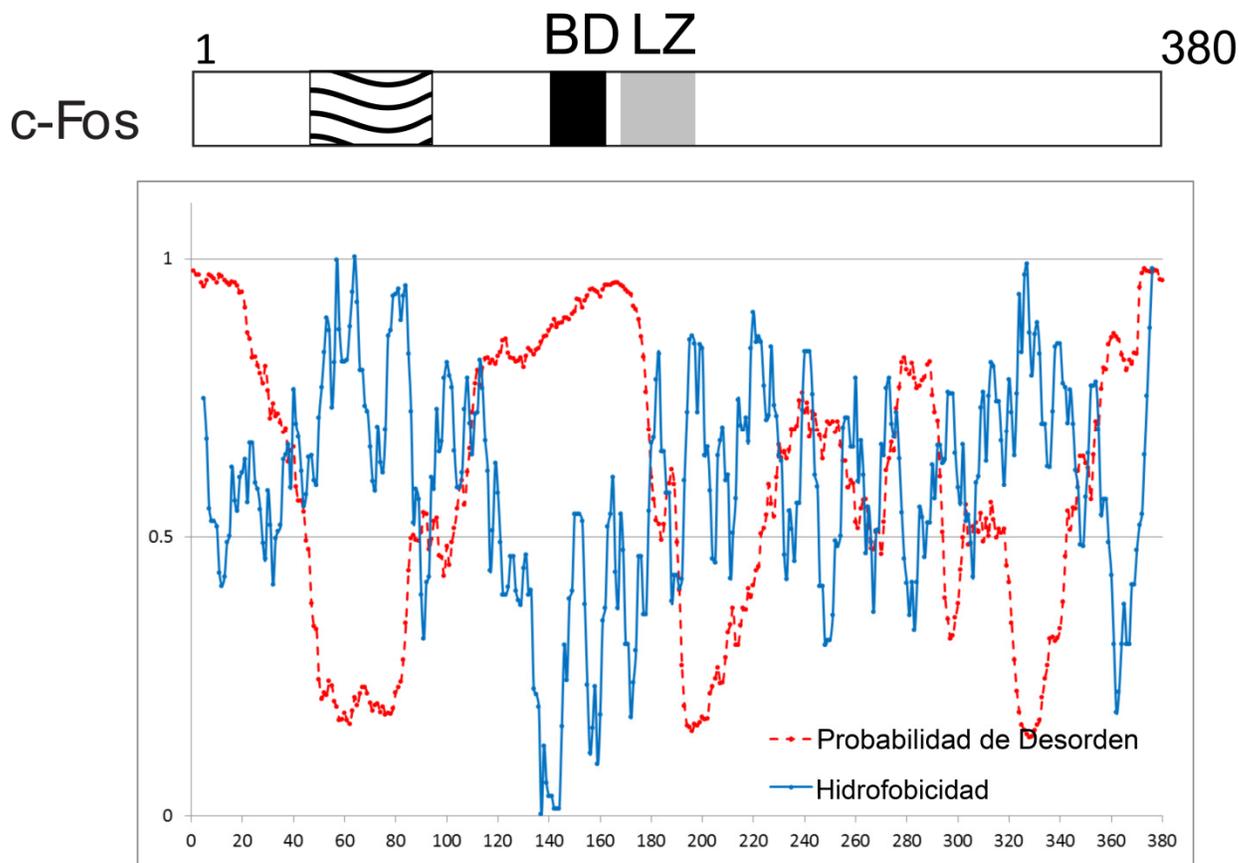


Figura 23. Perfil de hidrofobicidad y de probabilidad de desorden de c-Fos. Representación esquemática de c-Fos. BD (aa: 139-159, en negro) es el segmento compuesto por 21 residuos responsable de la unión secuencia-específica al ADN y de la activación de enzimas blanco. LZ (aa: 165-193, en gris) es el dominio que permite la dimerización y consecuentemente la formación de AP-1 activos. El N-terminal (primeros 138 residuos) es el responsable de la interacción proteína-proteína con enzimas de síntesis de fosfolípidos. El dominio aa: 47-92, tiene un rol importante en esta función y está representado con patrón ondulado. En la parte inferior se observa el resultado de predictores de probabilidad de desorden y de hidrofobicidad basados en análisis de la secuencia. En rojo se observa la representación de la probabilidad del desorden en función del número de residuo obtenido con PONDR-FIT (Xue et al. 2010). El valor de corte es 0,5 lo que significa que residuos por encima de ese valor son desordenados. En azul se observa la representación de hidrofobicidad en función del número de residuo obtenida a partir de la escala Kyte & Doolittle. Nótese que en la región aa: 47-92 existen dos segmentos altamente hidrofóbicos que solapan con una región ordenada, según se discute en el texto.

En la sección *Resultados*, hemos mostrado como el N-terminal de c-Fos es responsable de la asociación específica pero no la activación de CDS1, PI4KII α y Lipin 1. Para encontrar nuevas perspectivas, hemos ingresado la secuencia de c-Fos en diferentes predictores de desorden. Para todos los predictores utilizados, se encontró consistentemente un perfil similar al mostrado en la Fig. 23 para la región N-terminal. Si bien toda la proteína c-Fos es una IDP, y esto incluye su N-terminal, hemos observado que la probabilidad de desorden cae significativamente en la región alrededor de aa: 45-80 (Fig. 23), punto que discutiremos a continuación.

Algunos de los predictores que utilizamos son clasificadores que han sido entrenados con secuencias ordenadas y desordenadas de bases de datos como PONDR-VLXT (Romero et al. 2001); otros, como IUPred, se basan en propiedades físico-químicas tales como la capacidad de polipéptidos de formar contactos estabilizadores (Dosztanyi et al. 2005). Los valores de probabilidad se calculan residuo por residuo, tomando una ventana o rango de aminoácidos vecinos. La Fig. 23 muestra una representación de probabilidad de desorden utilizando PONDR-FIT (Xue et al. 2010) junto con un perfil hidrofóbico utilizando la escala de Kyte y Doolite (1982). PONDR-FIT utiliza una red neuronal artificial para predecir cuales residuos son desordenados. La idea detrás de la utilización de redes neurales es dar diferente peso y combinar de manera no lineal distintos tipos de atributos como la composición general de aminoácidos, la complejidad de la secuencia o características de los mismos aminoácidos como carga o hidropatía (He et al. 2009).

Mientras que la repulsión de cargas favorece el desplegado, el incremento en la hidrofobicidad favorece el plegado, según los presupuestos del primer modelo predictor (Uversky et al. 2000). En otras palabras, regiones hidrofóbicas tienden a ser ordenadas mientras que regiones con cargas netas difícilmente podrán compactarse y establecer una estructura única, sino que por lo contrario tenderán a tener múltiples configuraciones. Gráficos de carga neta total en función de hidropatía permiten distinguir proteínas desordenadas de aquellas que no lo son. También se desarrolló un algoritmo para predecir residuo por residuo la probabilidad de desorden a partir de esta idea (Prilusky et al. 2005).

Este simple modelo funciona notoriamente bien aun teniendo en cuenta los desarrollos actuales (Uversky 2013).

La alta hidrofobicidad de la región de c-Fos aa: 47-92 ya ha sido señalada en la sección *Resultados*, donde se la vinculó a la asociación con Lipin 1 (Fig. 21). Puede verse en la Fig. 23 como la mencionada región forma un segmento hidrofóbico que según el predictor tiene mayor tendencia al orden. Las regiones con mayor propensión al orden han sido apuntadas como dominios funcionales dentro de IDPs, y se piensa que participan en el reconocimiento molecular de los múltiples blancos de unión (Hsu et al. 2013). Según los resultados obtenidos, la región intermedia del N-terminal (aa: 47-92) está involucrada de una manera compleja con la asociación a Lipin 1 (Fig. 21) pero también a PI4KII α , según indican resultados preliminares del Dr. César Prucca. Nuevos experimentos utilizando mutantes de esta región podrían esclarecer su rol y a la vez brindar información acerca de si es un fenómeno secuencia-especifica o si, como suponemos, se trata de un efecto debido a las propiedades globales del segmento en cuestión.

Fue establecido que el dominio BD de c-Fos experimenta una transición desorden a orden al unirse al ADN como un complejo AP-1, formando una alfa hélice que interacciona directamente con el ADN (Patel et al. 1990, Glover & Harrison 1995). La idea detrás de esto es que proteínas que son desestructuradas en su estado nativo pueden adoptar una estructura definida bajo ciertas condiciones, que incluyen la presencia de un ligando, un cambio en el pH o la presencia de cationes o sales específicos (Wright & Dyson 2009). Aunque todavía resta por establecerse si existe una transición “desorden a orden” acoplada a la asociación del N-terminal de c-Fos a las enzimas blanco. Es posible pensar que el plegado de c-Fos al unirse a su enzima blanco podría ser relevante para la formación del complejo c-Fos/enzima. Sin embargo, el plegado en respuesta una unión no es universal y existen ejemplos de IDPs que preservan un alto nivel de desorden aún unidas a su blanco, un fenómeno denominado “fuzziness” o “estructuras difusas” (Hazy & Tompa 2009).

En cualquier caso, está definido que la interacción con distintas proteínas puede involucrar una misma región, como sería el caso del N-terminal para la unión de c-Fos a múltiples enzimas blanco para ser activadas. En cambio, la región BD tiene una función

directa tanto en la actividad AP-1 como en la activación en si misma de enzimas puntuales, por lo que c-Fos utiliza la misma región para realizar acciones muy distintas. Proponemos a c-Fos como una proteína IDP capaz de múltiples funciones (o *moonlighting* por su denominación en inglés). La manifestación última de la naturaleza IDP de c-Fos es su promiscuidad para unirse a múltiples blancos, como c-Jun o Lipin 1 para citar solo dos ejemplos, y así poder ejercer como un proteína *moonlighting* (Tompa et al. 2005, Jeffery 2009).

Existen diversos mecanismos para que una proteína multi-tarea pase de una función a otra, tales como una regulación en su localización subcelular o capacidad para unirse a ligandos. En este sentido, vale la pena mencionar que una fosforilación en los residuos de tirosina 10 y 30 vuelve a c-Fos incapaz de asociarse al RE y consecuentemente de activar la síntesis de lípidos (Ferrero et al. 2012). La región aa: 47-92 se encuentra flanqueada por dos regiones flexibles desestructuradas (Fig. 23). En base a los Resultados obtenidos, parece razonable pensar que la fosforilación en las tirosinas 10 y 30 afecta de alguna manera la región aa: 47-92 que posiblemente es la responsable de interactuar con las enzimas blanco. Se ha señalado que regiones desordenadas dentro de una proteína facilitan la fosforilación (Liu & Huang 2014) dado que la fosforilación se da predominantemente en estas regiones (Iakoucheva et al. 2004). Más aún, los niveles de fosforilación son mucho más dinámicos durante el ciclo celular para IDPs (Tyanova et al. 2013), regulando de esta forma el accionar de proteínas claves para la progresión del ciclo. La fosforilación en tirosinas es sólo una de las formas de regular las actividades de c-Fos, otro ejemplo resulta de la acción de las quinasas de serinas/treoninas ERK y RSK que fosforilan a c-Fos luego de estímulos mitogénicos en su dominio de trans-activación C-terminal promoviendo un incremento en su estabilidad y capacidad como factor de transcripción (Murphy et al. 2002, Murphy & Blenis 2006). Es importante resaltar que las distintas fosforilaciones generan efectos opuestos, mientras que la fosforilación en tirosinas reprime su actividad como activador de la síntesis lipídicas, la fosforilación en ser/treo incrementa su actividad AP-1.

Otra característica determinada por la naturaleza IDP de c-Fos es su comportamiento interfacial. c-Fos es una proteína anfitrópica que a partir de su naturaleza flexible ejerce una

actividad de superficie. Estudios biofísicos han mostrado que c-Fos tiene una gran afinidad por membranas y una marcada capacidad para detectar y responder a cambios en la composición y estado de fase de lípidos en una monocapa (Borioli et al. 2001, Gaggiotti et al. 2009). Todo ello apoya la idea de que c-Fos tiene las características moleculares (alta actividad de superficie, capacidad para detectar y responder a lípidos y desorden intrínseco que permite cierta promiscuidad en sus asociaciones) (Borioli 2011) para llevar a cabo un rol regulatorio en la síntesis de glicerolípidos. En un contexto celular, c-Fos puede ser imaginado detectando la composición lipídica, asociándose específicamente a membranas del RE y encontrando su camino hacia enzimas blanco para finalmente activarlas *in situ* (Cardozo Gizzi & Caputto 2013).

La región N-terminal de c-Fos media la asociación con CDS1, PI4KII α y Lipin 1. En la Fig. 14 se observa una localización de NA-myc (mutante que comprende todo el N-terminal, aa: 1-138) exclusivamente peri-nuclear, en tanto en la Fig. 13 se probó como NA-myc es capaz de competir por la unión de PI4KII α con c-Fos. Es posible que la sobre-expresión de NA bloquee la interacción c-Fos/enzima para todos los casos en donde se observó que la región N-terminal es la involucrada en la unión. Nuestra hipótesis es que c-Fos activa a las enzimas exclusivamente en esta localización subcelular, en el RE, por lo que la presencia de la mutante NA allí sería capaz de competir y generar el efecto de detener la activación general de la síntesis de fosfolípidos. En relación a lo anterior, la sobre-expresión de la mutante NA puede detener la proliferación de células T98G en cultivo, resultados obtenidos por el Dr. Cesar Prucca en su proyecto post-doctoral que se continuó a partir de los *Resultados* de la primera parte de esta Tesis. Esto último es una prueba más de que la activación de lípidos dependiente de c-Fos es requerida por la célula para sostener la proliferación, pero además indica que el N-terminal de c-Fos es clave para ello y aparece como un posible blanco terapéutico. Anteriormente ya se utilizaron estrategias para disminuir los efectos de c-Fos al impedir su expresión mediante el uso de ARN antisentido (Mercola et al. 1987, Edwards et al. 1988, Ledwith et al. 1990). Sin embargo, la mutante NA aparece como atractiva por bloquear únicamente el rol no genómico de c-Fos, compitiendo con la proteína endógena por la unión de sus enzimas blanco.

Fra-1 también incrementa la síntesis de lípidos

Ya se ha establecido que Fra-1 está involucrado en la proliferación de células de cáncer de mama al incrementar el marcado radioactivo de fosfolípidos (Motrich et al. 2013), si bien el mecanismo por el cual lo hace es desconocido. En esta Tesis hemos encontrado que, al menos para la actividad PAP-1, Fra-1 es capaz de incrementar la actividad enzimática en la misma medida que c-Fos. Ya se discutió la homología del BD de ambas proteínas y de la relevancia de este dominio a partir de experimentos con mutantes de delección. Por otro lado, también se encontró una unión directa entre Fra-1 y Lipin 1, por lo que es razonable pensar en que el mecanismo de activación de Fra-1 posee características comunes con el de c-Fos. Esto nos lleva a especular acerca de las regiones de Fra-1 que podrían mediar la interacción con la mencionada enzima.

En términos generales, existen dos regiones altamente conservadas entre c-Fos y Fra-1: el dominio bZip (que comprende el BD) y los últimos 70 residuos en C-terminal de ambas proteínas. Sin embargo, existe una tercera región de similitud entre la secuencia primaria de ambas proteínas, los aa: 54-84 de c-Fos y los aa: 31-61 de Fra-1 (Fig. 24). Esta región comprende para el caso de c-Fos en forma casi completa el dominio que se ha identificado como necesario para la asociación a Lipin 1 (Fig. 21), la región comprendida por aa: 47-90 de la que se ha venido discutiendo su función. Por lo tanto, la tercera región de homología entre c-Fos y Fra-1 se trataría de la que está involucrada, al menos en el caso de c-Fos, en la interacción con las enzimas blanco. Predictores de desorden e hidropatía también indican que esta región de Fra-1 comparte las características de la región equivalente de c-Fos. Es un segmento altamente hidrofóbico, ligeramente más corto que el de c-Fos, en donde PONDR-FIT predice una región ordenada flanqueada por regiones desordenadas. Es interesante remarcar que si bien no existe una conservación a nivel de secuencia, la región ordenada aa: 31-61 de Fra-1 tiene a cada lado regiones desestructuradas como se da en c-Fos. Estudios a futuro podrían confirmar si este es efectivamente el dominio de interacción, y si existe un mecanismo de activación compartido por las dos proto-oncoproteínas.

Conclusiones finales

La regulación de la síntesis lipídica para las diferentes etapas del crecimiento y la proliferación celular es un proceso clave que debe ser finamente regulado debido a que involucra la actividad sincronizada de múltiples pasos metabólicos que se orquestan en varios niveles. Sin duda, un mecanismo clave para alcanzar la regulación global de la biogénesis de membrana es a través de factores de transcripción que actúan en forma coordinada para regular la expresión de enzimas responsables de la síntesis lipídica como las que ocurren durante la división celular (Nohturfft & Zhang 2009). Sin embargo, dado que la biosíntesis de lípidos involucra numerosas etapas metabólicas, la regulación de la síntesis requeriría de complejos y variados mecanismos regulatorios. A pesar de ello, a la luz de los resultados de muchos laboratorios, se observa que al regular únicamente etapas limitantes se altera toda la vía.

En este sentido, la evidencia obtenida en esta Tesis doctoral indica que al incrementar la capacidad catalítica de enzimas clave, c-Fos incrementa la disponibilidad de los principales lípidos. Esto apunta a un posible mecanismo molecular de activación compartido por las distintas enzimas a las que c-Fos se asocia físicamente. Hemos avanzado en el conocimiento del cómo es que c-Fos actúa a nivel no genómico, pero se abre el interrogante del “para qué”. No está claro en este punto el fin de la activación de la síntesis de lípidos, pero si sus consecuencias últimas: el sostenimiento del crecimiento o la proliferación celular. Quizás estudios en esta dirección nos indiquen en un futuro como limitar la proliferación irrestricta de células tumorales, al interferir con la activación lipídica que es promovida por c-Fos.

CAPITULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los reactivos radioactivos son de *PerkinElmer*. Los lípidos son de *Avanti Polar Lipids*. La Lipofectamina 2000, los medios y reactivos de cultivo son de *Invitrogen*. Los reactivos de biología molecular, kits, enzimas de restricción, etc. son de *Promega*. Los demás reactivos son de máxima pureza adquiridos en *Sigma*, *Merck* o equivalente. Se harán aclaraciones cuando sea pertinente.

Cultivos celulares

Todos los experimentos fueron realizados con la línea celular derivada de fibroblastos de ratón NIH 3T3 adquiridas al *American Type Culture Collection*, USA. Esta línea fue crecida en cápsulas de Petri descartables de diferentes tamaños según cada experimento (multicelda de 24, cápsulas de 35, 60 o 100 mm de diámetro). Las células fueron crecidas hasta alcanzar más del 90% de confluencia en cada caso. Para la adquisición de imágenes en experimentos de microscopía fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio redondos previamente tratados con ácido y enjuagados exhaustivamente. Los cultivos se sembraron a baja densidad y se dejaron proliferando a 37°C durante 48 horas en presencia de 5% de CO₂ en DMEM suplementado con 10% v/v suero de ternero bovino (*Gibco*). Una vez alcanzada la confluencia, las células se arrestaban al reemplazar el medio de cultivo con DMEM. Se dejaron las células con este medio durante 48 horas más. En los experimentos de estimulación se adicionó FBS para llevar al 20 % final durante los tiempos especificados en cada experimento.

Marcado metabólico de PtdInsP y PtdInsP₂

Células quiescentes fueron pulsadas con 25 µCi/mL de ³²P-ortofosfato 15 minutos antes de cosecharlas. Para el experimento del bloqueo específico de la expresión de c-Fos al producirse el estímulo, ARNm anti-sentido (Morpholino oligonucleótidos, Gene Tools) contra c-Fos (5'-TGC-GTT-GAA-GCC-CGA-GAA-3') (Bussolino et al. 1998) o un oligonucleótido de

secuencia aleatoria que no tiene blanco en células de ratón fueron adicionados al medio a una concentración de 1 µg/mL medio cultivo, 30 minutos antes del pulsado radioactivo.

En cambio, para deprimir la expresión de las enzimas blanco se utilizaron dúplex de ARN pequeño de interferencia (*Dharmacon*). En todos los casos, 240 pmol de ARN total fueron transfectados a cada pocillo en una placa multicelda de 6 con Lipofectamina de acuerdo al protocolo del fabricante. Después de 24 horas, las células fueron transfectadas una segunda vez de la misma forma y fueron cultivadas por 48 horas más en medio libre de suero antes de realizar el marcado metabólico. Para corregir por posibles diferencias en el número de células en los distintos pocillos en los ensayos con ARN pequeño de interferencia, se corrió en paralelo un pocillo que no se marcó radioactivamente y que se utilizó para WB. El mencionado WB se reveló contra las distintas enzimas para así poner de manifiesto si había funcionado el tratamiento con ARN pequeño de interferencia. Por densitometría se estableció además la intensidad de la banda de α -tubulina, utilizada como control de carga para normalizar las cuentas radioactivas obtenidas con la proteína total sembrada.

Luego del pulsado, se estimuló a las células durante 7,5 minutos con FBS al 20%. Luego del estímulo, se enjuagó cuidadosamente con dos lavados de PBS frío antes de cosechar las células en agua. Los ensayos se hicieron en duplicado en un total de tres experimentos independientes como mínimo.

Marcado de PtdInsP y PtdInsP₂ *in vitro*

La capacidad de marcado radioactivo de ³²P-PtdInsP y ³²P-PtdInsP₂ de células quiescentes fue determinado *in vitro* según Gil et al. (2004) en tubos de Khan de vidrio. El buffer de reacción contenía HEPES 64 mM (pH 7,4), NaCl 140 mM, KCl 4,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, glucosa 5,6 mM, 3 µCi de ³²P-ATP (actividad específica 3000 Ci/mmol). Se determinó la marcación en presencia de c-Fos o sus mutantes de delección obtenidos en forma recombinante y purificados, utilizando 1 ng c-Fos recombinante/µg proteína total resuspendido en 3 µL de buffer de elusión, que contiene imidazol 500 mM /urea 8 M. A los incubados control se les adicionó en cambio 3 µL de buffer de elusión. Las reacciones, que tenían un volumen final de 80 µL, fueron iniciadas con la adición de 100 µg de homogenato

celular total al medio de ensayo, incubadas por 1 hora a 37 °C y terminadas por la adición de 20 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1. Los ensayos se hicieron por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

Purificación de PtdInsP y PtdInsP₂ y cromatografía en capa delgada

Para la obtención de los mencionados fosfolípidos tanto desde el marcado metabólico o el marcado *in vitro*, se utilizó el método de Folch (Folch et al. 1957). Tras la adición de 20 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1, la fase orgánica fue particionada por el agregado de agua (0,2 volúmenes). Luego de vorterear por 3 segundos, se centrifugó durante 2 minutos a 1.500 rpm para separar las fases y se lavó la fase inferior (orgánica) 5 veces con 1 mL de fase superior teórica (metanol/agua/cloroformo 48:47:3, v/v/v) para eliminar el precursor radioactivo soluble. Finalmente, se extrajo cuidadosamente la fase inferior mediante pipeta Pasteur y se transfirió a un nuevo tubo de vidrio. Se secó esta fase bajo flujo de nitrógeno para luego resuspender en 50 µL de cloroformo/metanol 2:1.

Los extractos lipídicos fueron separados en placas cromatográficas delgadas de Sílica Gel 60 utilizando la metodología descrita en Catz & Sterin-Speziale (1996). Las placas de sílica fueron tratadas con una solución de oxalato de potasio al 1% en metanol/agua 2:3 y calentadas posteriormente a 110 °C durante al menos 30 minutos previo a ser utilizadas para remover humedad residual. Las placas fueron desarrolladas en dos corridas consecutivas en un sistema monodimensional utilizando cloroformo/metanol/ácido acético/agua 25:15:8:2 para la primera corrida, luego de la cual las placas fueron secadas a temperatura ambiente y desarrolladas en el mismo sistema de solventes pero en las proporciones 25:15:16:2.

Fosfolípidos de referencia fueron sembrados en carriles junto a las muestras y visualizadas con vapores de yodo en una cuba dispuesta para este fin, para de esta forma identificar los productos obtenidos. La radioactividad de los lípidos individuales fue cuantificada por exposición de la placa de sílica a una pantalla de fósforo y posteriormente procesada para su visualización por PhosPhorImager (*Molecular Dynamics*) utilizando el scanner específico FLA-3000 (*Fijifilm*).

Clonado de mutantes de c-Fos

Mutantes de delección de c-Fos: Las diferentes mutantes se construyeron mediante el diseño de oligonucleótidos específicos que abarcaron a los diferentes dominios de c-Fos salvaje, y con estos oligonucleótidos se realizaron reacciones de PCR y clonado direccional a partir de la secuencia de un vector que codifica para c-Fos de rata con un rótulo de 6 x histidinas con codones optimizados para procariontes (Abate et al. 1991). Los productos de PCR obtenidos se verificaron en geles de agarosa, se purificaron con columnas de purificación y se ligaron al vector de expresión procarionte pET15b (*Novagen*) utilizando los sitios de restricción NdeI y BamHI.

Mutagénesis sitio dirigida: La generación de mutantes puntuales de c-Fos se realizó mediante procedimientos diferentes. Estas secuencias se construyeron por una estrategia denominada “Superposición Extendida” u “OE-PCR” (Higuchi et al. 1988). Brevemente, consiste en la utilización de 4 oligonucleótidos, 2 conteniendo la mutación puntual deseada y que además son 100% complementarios entre sí (“mutagénicos”), y los otros 2 restantes que se unen a los extremos de la secuencia de c-Fos salvaje (“No mutagénicos”). Los oligonucleótidos mutagénicos son usados en una primera reacción de PCR con su correspondiente oligonucleótido no mutagénico, para obtener 2 productos de PCR conteniendo cada uno de ellos la mutación deseada. Estos productos de PCR se corren en un gel de agarosa y se purifican adecuadamente y debido a que estos complementan perfectamente sus extremos, se mezclan y se realiza una tercera reacción de PCR, con los oligonucleótidos no mutagénicos como cebadores de la reacción. Finalmente se obtiene amplificada a la secuencia completa de c-Fos pero ahora con la mutación introducida. Las etapas finales son las mismas que para los clonados anteriores.

Expresión y purificación de c-Fos, Fra-1, c-Jun y sus mutantes

Se siguió el protocolo descrito en Borioli et al. (2001). Una colonia de BL21 (DE3) conteniendo el plásmido fue inoculada a 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), y se incubó durante la noche a 37 °C. Dos mL del cultivo saturado se inocularon

a 100 mL de LB que se creció con agitación constante de 250 rpm a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,5. Entonces se le agregó al cultivo 1 μ M de concentración final de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se lo incubó por 4 horas más a 37 °C. El cultivo inducido para la expresión de c-Fos fue cosechado por centrifugación a 5,000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimento se re-suspendió en 2 mL de buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl y 5 mM imidazol (buffer de unión). Las bacterias resuspendidas fueron incubadas con lisozima durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego lisadas adicionalmente con 5 pulsos de sonicación a la máxima potencia durante 1 minuto en hielo, para evitar que aumente la temperatura del lisado. El lisado fue centrifugado a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. El sedimento contiene a la proteína en forma mayoritaria, que permanece insoluble en cuerpos de inclusión. Se resuspendió en buffer de unión pero que ahora además contiene urea 6 M. Se lo incubó durante una hora a 4 °C por agitación constante favoreciendo la solubilización de los cuerpos de inclusión. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue pasado por un filtro de 0,4 μ m y luego a través de una columna de afinidad de Níquel-Sefarosa de 600 μ L (suspensión acuosa). Se procedió al lavado primero con 3 mL de buffer de unión y luego con 2 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 20 mM imidazol y urea 6 M. La proteína fue eluída en fracciones de 0,4 mL en un total de 2 mL con buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol y urea 6 M. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford 1976). Las preparaciones, que tenían una concentración cercana a 1 mg/mL, se guardaron a 4 °C por hasta un mes.

Anticuerpos empleados

Se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-myc (ratón, M4439), anti-tubulina (ratón, DM1A), anti-GFP (conejo, G1544), son de Sigma. Anti-c-Fos (ratón, sc-52) y anti-myc (conejo, sc-789) de Santa Cruz. Anti-CDS1 (conejo, Ab-84019), anti-PI4KII α (conejo, Ab-71824) y β (conejo, Ab-71823) son de Abcam. Anti-GFP de Roche (ratón, #1-814-460).

Inmunoprecipitaciones

Las inmunoprecipitaciones se realizaron según se describió previamente (Bonifacino & Dell'Angelica 2001). Brevemente, cultivos celulares de NIH 3T3 (aproximadamente 250 µg) arrestados y transfectados con la proteína de interés, se estimularon (Ver Cultivos celulares) y lavaron dos veces con PBS 10mM frío. Luego se agregó 500 µl de buffer de lisis (50 mM TrisHCl pH: 7,5, 1% v/v Tritón X-100, 300 mM NaCl, cóctel inhibidor de proteasas *Complete* (Roche) y 0,05% P/v azida sódica) y fueron dejados en hielo durante 20 minutos. Después de este tiempo se recolectaron los lisados y se pusieron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, se agitaron con vortex al máximo durante 3 segundos y se dejaron en hielo durante 15 minutos más. Los lisados fueron pre-absorbidos con el agregado de 10 µl de proteína G-Sepharosa (*GE Healthcare*) durante una hora en un rotor de 360° a 4°C, y después de este tiempo fueron nuevamente centrifugados a 13.200 rpm a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente transvasado a un nuevo tubo. Se separó el 20% del volumen obtenido para posterior análisis por WB (homogenato total) y el resto del lisado fue sometido a la co-inmunoprecipitación. Se agregó 25 µl de proteína G-Sepharosa previamente conjugada con aproximadamente 1 µg de anticuerpo policlonal correspondiente a cada caso (ver *Resultados*). Las inmunoprecipitaciones se dejaron en un rotor 360° a 4°C durante 4 horas. Luego de este tiempo los inmunocomplejos fueron centrifugados 30 segundos a 4.200 rpm y lavados con buffer de lavado (50 mM TrisHCl pH: 7,5, 0,1% v/v Tritón X-100, 300 mM NaCl, cóctel inhibidor de proteasas *Complete* y 0,05% P/v azida sódica). Este procedimiento se realizó 4 veces y después se hizo un lavado final con PBS para remover el detergente remanente que puede interferir en la siguiente etapa de WB. Las muestras se calentaron a 100 C° durante 5 minutos y se sembraron para el posterior SDS-PAGE.

SDS-PAGE y Western Blot

Cápsulas de Petri conteniendo las células se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS 10 mM frío y se cosecharon con un volumen mínimo de agua milliQ (o Buffer de lisis, según lo especifique algún procedimiento) conteniendo además cóctel inhibidor de proteasas *Complete*. Después de cuantificar proteínas por Bradford, y dependiendo del anticuerpo y/o

proteína a detectar, una cantidad de proteínas que variaba entre 10 µg a 150 µg fue calentada durante 5 minutos a 100 °C en presencia de Buffer de siembra de proteínas (*sample buffer*) conteniendo 20 % del agente reductor 2-β mercaptoetanol, para ser posteriormente sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Todos los geles SDS-PAGE se realizaron en concentración 12% final de acrilamida. Después de la electroforesis y habiéndose separado las proteínas de diferente peso molecular, las mismas fueron transferidas (70 minutos, 300 mA) a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm de poro e incubadas durante al menos una hora con buffer de bloqueo (5% leche descremada en PBS). Luego de este tiempo las membranas estaban listas para ser incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes según cada caso. Como anticuerpos secundarios se usaron IRDye 800 y 680 anti-ratón o anti-conejo (*LI-COR*), según corresponda. Para revelar las bandas se utilizó un scanner fluorescente en infrarrojo *Odyssey* (*LI-COR*). El peso molecular de cada banda fue calculada por extrapolación a un estándar de pesos moleculares sembrado en cada gel (*BioRad*).

Expresión y purificación de Lipin 1

Se siguió el protocolo descrito en Han & Carman (2010). Una colonia de Rosetta2 (DE3) conteniendo el plásmido de la Lipin 1β humana fue inoculado a 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y cloroanfencol (50 µg/mL), y se incubó durante la noche a 37 °C. Dos mililitros del cultivo saturado se inocularon a 500 mL de medio fresco que se creció con agitación constante de 250 rpm a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,5. Entonces se le agregó al cultivo 1 µM de concentración final de IPTG y se lo incubó por 3 horas más a 37 °C. El cultivo inducido para la expresión de Lipin 1 fue cosechado por centrifugación a 5,000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimento se re-suspendió en 20 mL de buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl y 5 mM imidazol. Las bacterias resuspendidas fueron lisadas a través de dos pasajes en un Emulsiflex a 15,000 p.s.i. y el lisado centrifugado a 12,000 x g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue pasado a través de una columna de afinidad de Níquel-Sefarosa de 1 mL (suspensión acuosa). Se procedió al lavado con 25 mL con buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM

NaCl, 45 mM imidazol, 7 mM 2-mercaptoetanol y 10% v/v glicerol. La enzima, que posee un rótulo de 6 histidinas en línea, fue eluída en fracciones de 0,5 mL en un total de 3 mL con buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 7 mM 2-mercaptoetanol y 10% glicerol. Después de establecer cuáles eran las alícuotas más concentradas, se las mezcló y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford 1976). Las preparaciones de enzimas, que tenían una concentración cercana a 1 mg/mL, se guardaron en pequeñas alícuotas a -70 °C.

Preparación del reactivo de verde de malaquita-molibdato

Un reactivo coloreado para detectar fosfato inorgánico libre fue preparado según Mahuren et al. (2001) con algunas modificaciones, y se compone de 3 volúmenes de verde de malaquita 0,1 mM y un volumen de molibdato de amonio 34 mM en HCl 5 M. Luego de mezclar los componentes, se deja en agitación por lo menos durante 30 minutos, se filtra y se guarda protegido de la luz. El reactivo así preparado se usó dentro de una semana de preparado.

Preparación de las micelas mixtas de Tritón X-100/PA

PA en cloroformo/metanol (2:1) fue transferido a un tubo de ensayo de vidrio, secado bajo un flujo de N₂ y finalmente mantenido *in vacuo* durante 1 hora. Tritón X-100 fue adicionado al PA justo después del buffer de ensayo para preparar las micelas mixtas. El vortereo aplicado extensivamente asegura la formación de micelas. El contenido mol% de PA en las micelas mixta fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\text{mol\%}_{\text{PA}} = 100 \times [\text{PA (molar)}] / ([\text{PA (molar)}] + [\text{Triton X-100(molar)}])$$

En forma similar, el mol% de c-Fos recombinante fue calculado como:

$$\text{mol\%}_{\text{c-Fos}} = 100 \times [\text{c-Fos (molar)}] / ([\text{PA (molar)}] + [\text{Triton X-100(molar)}])$$

La concentración total de PA en las micelas mixtas se mantuvo por debajo del 15% para asegurar que la estructura de la misma sea similar a la de micelas de Tritón X-100 puras Lichtenberg et al. (1983).

Actividades enzimáticas

En todos los casos se utilizó como fuente de enzima homogenatos totales de NIH 3T3. Los incubados tuvieron 100 µg proteína total en un volumen final de 80 µL.

CDS

La reacción se llevó a cabo según Lykidis et al. (1997). El buffer de reacción contenía Bis Tris-HCl (pH 6,5) 100 mM H³-CTP (actividad específica 14,5 Ci/mmol), PA 2 mM (suspensión acuosa sonicada en buffer), MgCl₂ 10 mM. La reacción se comenzó con el agregado de MgCl₂. La reacción fue incubada a 37 °C durante los tiempos indicados.

PIS

La reacción se llevó a cabo según Lykidis et al. (1997). El buffer de reacción contenía Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, MgCl₂ 50 mM, MnCl₂ 2 mM, CDP-DAG 1 µM sonicado en buffer y 3.3 mM myo-[H³]inositol (actividad específica 30 Ci/mmol). La reacción se desarrolló durante tiempos variables a 37 °C.

PI4K

La reacción se llevó a cabo según Wong et al. (1997) con algunas modificaciones. El buffer de reacción contenía Hepes (pH 7,5) 20 mM, MgCl₂ 20 mM, ATP 20 µM, PtdIns 70 µM y PtdSer 35 µM sonicados en buffer y γ-³²P-ATP 10 µCi (actividad específica 3000 Ci/mmol) incubando la reacción a 25 °C durante tiempos variables.

PAP

La actividad PAP se midió según Pasquare et al. (2001) con algunas modificaciones. El buffer de reacción contenía Tris-maleato (pH 6,5) 50 mM, L-α-dipalmitoil-C¹⁴-PA 0,75 µCi

(actividad específica 100-200 mCi/mmol) y dioleoil-PA 0,3 mM como dispersión en agua y MgCl_2 1 mM. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante tiempos variables.

Actividad de Lipin 1 en micelas mixtas de Tritón X-100/PA

La actividad PAP de Lipin 1 purificada fue medida según Han & Carman (2000) mediante la determinación de la liberación de fosfato inorgánico proveniente del PA por la acción enzimática en micelas mixtas preparadas como se indicó anteriormente. El buffer de reacción contiene 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM L- α -PA purificado de huevo de gallina, 10 mM Tritón X-10 y 50 ng enzima en un volumen total de 0,1 mL. La mezcla de reacción fue incubada durante 20 minutos a 37 °C, momento en que se terminó la reacción enzimática con el agregado de 0,5 mL HCl 0,1 M en metanol, 1 mL de cloroformo y 1 mL de agua milliQ. Tras 3 segundos de agitación en vortex, se procedió a separar las fases por centrifugación durante 2 minutos a 2,000 x g de los tubos de ensayo de vidrio. Se tomaron 300 μL de la fase acuosa superior y se mezcló con 600 μL del reactivo de verde de malaquita-molibdato, el reactivo pasa de amarillo a verde. Tras esperar 15 minutos, se midió la absorbancia a 650 nm. Como blanco se utilizó 300 μL de agua milliQ, que no muestra diferencias con la fase superior de un tubo en el que el incubado a 37 °C fue omitido.

Transfecciones transitorias de ADN plasmídico

Los plásmidos utilizados se encuentran descritos en la Tesis doctoral de Dr. Alfonso Pecchio (2008). Para el caso de Lipin 1, se partió del plásmido cedido gentilmente por el Dr. Carman y que fue utilizado en la publicación de Wang, H (2011). A partir de dicho plásmido, se subclonó en el vector pSYFP2-N1 empleando los sitios Nhe y XhoI, dado que el vector de origen (pEGFP-N1) y el de destino poseen los mismos sitios de clonado y marco de lectura. La introducción de los diferentes plásmidos a las células para los experimentos de FRET utilizadas se realizó mediante la utilización de lípidos catiónicos comerciales, Lipofectamina 2000. Las condiciones no difirieron significativamente del protocolo del fabricante, pero se

hicieron cambios considerables respecto a las cantidades de ADN utilizadas. Los diferentes plásmidos usados necesitaron optimizarse individualmente para obtener niveles de expresión aceptables. Para el caso de c-Fos y sus mutantes, se emplearon 0,8 µg de ADN por pocillo en un *multiwell* de 24. En cambio, para las enzimas se utilizó la cantidad descrita en la Tabla 3. Para las co-transfecciones, se adicionaron ambas cantidades de ADN en la mezcla con Lipofectamina 2000.

Tabla 3. Cantidades de ADN plasmídico empleadas en la transfecciones transitorias para FRET

Enzima	µg ADN/pocillo
CDS1	2
PIS1	1,4
PI4KII α	1
PI4KII β	1
Lipin 1	1,6

Adquisición de imágenes confocales para FRET

Las imágenes para los análisis de FRET fueron tomadas usando microscopios confocales Olympus FV1000, Olympus FV300 o Zeiss Pascal equipados en todos los casos con un láser de Argón multilínea (458, 488 y 514 nm). La fluorescencia de CFP (donor) fue detectada utilizando excitación a 458 nm, y una ventana de detección de 465-495 nm. La fluorescencia de YFP (aceptor) fue detectada utilizando excitación a 514 nm y una ventana de detección de 530-560 nm. Las imágenes fueron adquiridas utilizando objetivos 60X apertura numérica = 1,42 con un zoom digital de 3X, 512x512, ajustando el *pinhole* de forma de tomar fetas ópticas de 0.8-1 µm. Las condiciones de adquisición se ajustaron para minimizar el fotoblanqueo y tiempo de escaneo pero maximizando la relación señal/ruido en las distintas condiciones. Una vez ajustadas las mismas, se procedió a tomar el conjunto de imágenes de todo el experimento con las mismas condiciones en el mismo día.

FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) por Emisión Sensibilizada

Para el análisis de imágenes célula por célula realizada post-adquisición se utilizó el programa de distribución libre ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Se utilizó el algoritmo previamente descrito en Elangovan et al. (2003) para remover el sangrado espectral del donador (SE_D) y la excitación directa del aceptor (ED_A) que contaminan la señal de FRET. Con ese propósito se usaron siete imágenes: dos imágenes de referencia marcadas sólo para el donador y otras dos imágenes de referencia marcadas sólo para el aceptor (Dex/Dem y Dex/Aem); y tres imágenes con doble marca proveniente de células co-transfectadas (Aex/Aem, Dex/Dem, Dex/Aem). La imagen Dex/Dem muestra la fluorescencia apagada o *quenched* del donador (qD) y corresponde al canal del donador (D), mientras que la imagen Aex/Aem indica la fluorescencia del aceptor y corresponde al canal del aceptor (A). La imagen Dex/Aem corresponde a la imagen de FRET no corregida ($uFRET$), que es procesada según el algoritmo de Elangovan para generar la imagen de precisión de FRET (PFRET), mostrando los niveles de transferencia de energía corregidos:

$$PFRET = uFRET - qD \times SE_D - A \times ED_A \tag{1}$$

La eficiencia aparente de FRET:

$$E = 1 - qD/uD \tag{2}$$

se expresa como la fracción de fluorescencia del donador en la ausencia de FRET o *unquenched* donador (uD). Este último parámetro se calcula como:

$$uD = qD + PFRET \tag{3}$$

como una aproximación de la Eq. B.19 en Elangovan et al. (2003). ImageJ fue usado para calcular este parámetro. Luego de sustraer el ruido de fondo o *background*, se aplicó una máscara independiente a las imágenes qD , $uFRET$ y A para excluir del análisis pixeles

saturados o pixeles por debajo de un umbral determinado. Los valores de eficiencia de FRET promedio fueron calculados desde regiones de interés de acuerdo a:

$$E = 1 - \frac{qD}{qD+PFRET} \quad (4)$$

en un análisis pixel por pixel. De esta forma, se puede lograr la separación de pixeles que contienen señal significativa de aquellos que sólo representan mayoritariamente ruido de fondo para el cálculo de FRET. La imágenes de E resultantes fueron pseudocoloreadas con ImageJ en donde la intensidad del pixel se representa mediante una escala de color: blanco es el valor máximo normalizado de pSYFP2-mTurquoise2 mientras que azul corresponde al valor mínimo, 0.

FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) en el dominio de la frecuencia

Un microscopio confocal Olympus FV-1000 equipado con un módulo de FastFlim FlimBox (ISS) fue utilizado para los estudios de FLIM. FLIMBox es un hardware de frecuencia digital capaz de análisis multi-armónico (Colyer et al. 2008). Un láser de diodo a 445 nm modulado con un frecuencia de 20 MHz fue usado para la excitación de CFP (donor), con una excitación cruzada muy baja de YFP (aceptor). La emisión de fluorescencia de CFP fue colectado en una ventana espectral de 470-495 nm. Una solución de fluoresceína en Cumarina 6 disuelta en etanol (pico de excitación y emisión: 460 y 505, respectivamente) que tiene un tiempo de vida media de fluorescencia de 2,5 ns fue usada como estándar para calibrar la respuesta instrumental. Se siguió el protocolo establecido en Sun et al. (2012).

Las imágenes fueron obtenidas en 256x256 con 20 μ s/pixel y promediando 25-50 imágenes tomadas consecutivamente. La información de FLIMBox conteniendo la información de intensidad y de tiempo de vida fueron adquiridas y procesadas utilizando el programa Sim-FCS, desarrollado en el *Laboratory for Fluorescence Dynamics*. Se utilizó la estrategia del fasor, una representación de vectores (Clayton et al. 2004, Digman et al. 2008), para cuantificar el tiempo de vida del donador (Verveer et al. 2000, Caiolfa et al. 2007). El fasor

representa el decaimiento de fluorescencia en un espacio transformado de Fourier. La fase y la modulación son medidas en cada pixel de una imagen y son usados para determinar las coordenadas del fasor en ese pixel, para así establecer el tiempo de vida de fluorescencia del donador. El fasor es entonces un vector, cuyas coordenadas polares son s y g , relacionadas directamente con la fase y modulación, los parámetros físicos que se miden directamente. Es importante destacar que la estrategia del fasor no requiere de un modelo de ajuste, sino que expresa el decaimiento de fluorescencia en términos de las coordenadas polares. En los experimentos utilizamos la componente del segundo armónico, que corresponde a 40 MHz.

El fasor asociado con una célula obtenida a través de este sistema se determinó como un promedio de la imagen celular. El fasor de autofluorescencia fue determinado tomando las imágenes de FLIM de células no transfectadas. Se determinó el fasor del donador en ausencia y presencia del aceptor. Para cada experimento, se colectaron múltiples imágenes del donador en ausencia del aceptor para tomar un valor fasor promedio, que fue asignada a la posición del donador en ausencia del aceptor. El FLIM puede de esta forma medir el acortamiento en el tiempo de vida media que resulta de FRET (Wouters & Bastiaens 1999). La cuantificación de FRET en el gráfico del fasor se alcanza al medir el corrimiento del fasor entre las dos especies: el donador en ausencia y en presencia del aceptor. Según se describe en Digman et al. (2008) a partir de los fasores de autofluorescencia y del donador en ausencia del aceptor se calcula la trayectoria de eficiencia variable de FRET (0-100%). Esto permite determinar la eficiencia de FRET del fasor promedio de cada célula de donador en presencia del aceptor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abate, C., D. Luk, and T. Curran, *Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(7): p. 3624-32.
2. Aboukhatwa, M.A. and A.S. Undieh, *Antidepressant stimulation of CDP-diacylglycerol synthesis does not require monoamine reuptake inhibition*. BMC Neurosci, 2010. **11**: p. 10.
3. Adler, J., N. Reuven, C. Kahana, and Y. Shaul, *c-Fos proteasomal degradation is activated by a default mechanism, and its regulation by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 determines c-Fos serum response kinetics*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(15): p. 3767-78.
4. Alfonso Pecchio, A.R., A.M. Cardozo Gizzi, M.L. Renner, M. Molina-Calavita, and B.L. Caputto, *c-Fos activates and physically interacts with specific enzymes of the pathway of synthesis of polyphosphoinositides*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(24): p. 4716-25.
5. Angel, P., et al., *12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(6): p. 2256-66.
6. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
7. Athenstaedt, K. and G. Daum, *Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism*. Eur J Biochem, 1999. **266**(1): p. 1-16.
8. Balla, A. and T. Balla, *Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(7): p. 351-61.
9. Balla, A., et al., *Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(2): p. 711-21.
10. Balla, A., G. Tuymetova, M. Barshishat, M. Geiszt, and T. Balla, *Characterization of type II phosphatidylinositol 4-kinase isoforms reveals association of the enzymes with endosomal vesicular compartments*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 20041-50.
11. Balla, A., G. Tuymetova, A. Tsiomenko, P. Varnai, and T. Balla, *A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(3): p. 1282-95.
12. Balla, T., *Phosphatidylinositol 4-kinases*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1436**(1-2): p. 69-85.
13. Balla, T., Z. Szentpetery, and Y.J. Kim, *Phosphoinositide signaling: new tools and insights*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 231-44.
14. Bao, S., et al., *Effects of stable suppression of Group VIA phospholipase A2 expression on phospholipid content and composition, insulin secretion, and proliferation of INS-1 insulinoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 187-98.
15. Basbous, J., I. Jariel-Encontre, T. Gomard, G. Bossis, and M. Piechaczyk, *Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: is there a unique answer?* Biochimie, 2008. **90**(2): p. 296-305.

16. Belguise, K., N. Kersual, F. Galtier, and D. Chalbos, *FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(8): p. 1434-44.
17. Bell, R.M., L.M. Ballas, and R.A. Coleman, *Lipid topogenesis*. *J Lipid Res*, 1981. **22**(3): p. 391-403.
18. Bonifacino, J.S. and E.C. Dell'Angelica, *Immunoprecipitation*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. **Chapter 7**: p. Unit 7 2.
19. Borioli, G.A., *Immediate early proto-oncoproteins and membranes: not just an innocent liaison*. *Curr Protein Pept Sci*, 2011. **12**(8): p. 685-90.
20. Borioli, G.A., B.L. Caputto, and B. Maggio, *c-Fos is surface active and interacts differentially with phospholipid monolayers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(1): p. 9-13.
21. Borioli, G.A., M.L. Fanani, B.L. Caputto, and B. Maggio, *c-Fos is a surface pressure-dependent diverter of phospholipase activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **295**(4): p. 964-9.
22. Boronenkov, I.V., J.C. Loijens, M. Umeda, and R.A. Anderson, *Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(12): p. 3547-60.
23. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
24. Brindley, D.N., *Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis*. *Prog Lipid Res*, 1984. **23**(3): p. 115-33.
25. Brose, N., A. Betz, and H. Wegmeyer, *Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals*. *Curr Opin Neurobiol*, 2004. **14**(3): p. 328-40.
26. Brown, J.R., et al., *Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(9): p. 5609-19.
27. Bruns, J.R., M.A. Ellis, A. Jeromin, and O.A. Weisz, *Multiple roles for phosphatidylinositol 4-kinase in biosynthetic transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 2012-8.
28. Bussolino, D.F., et al., *Light affects c-fos expression and phospholipid synthesis in both retinal ganglion cells and photoreceptor cells in an opposite way for each cell type*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998. **58**(1-2): p. 10-5.
29. Bussolino, D.F., et al., *c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism*. *FASEB J*, 2001. **15**(3): p. 556-8.
30. Caiolfa, V.R., et al., *Monomer dimer dynamics and distribution of GPI-anchored uPAR are determined by cell surface protein assemblies*. *J Cell Biol*, 2007. **179**(5): p. 1067-82.
31. Cammer, W., F.A. Tansey, and C.F. Brosnan, *Gliososis in the spinal cords of rats with experimental allergic encephalomyelitis: immunostaining of carbonic anhydrase and vimentin in reactive astrocytes*. *Glia*, 1989. **2**(4): p. 223-30.

32. Campbell, K.M., A.R. Terrell, P.J. Laybourn, and K.J. Lumb, *Intrinsic structural disorder of the C-terminal activation domain from the bZIP transcription factor Fos*. *Biochemistry*, 2000. **39**(10): p. 2708-13.
33. Caputto, B.L., A.M. Cardozo Gizzi, and G.A. Gil, *c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1841**(9): p. 1241-6.
34. Caputto, B.L. and M.E. Guido, *Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus*. *Neurochem Res*, 2000. **25**(1): p. 153-62.
35. Cardozo Gizzi, A.M. and B.L. Caputto, *Mechanistic insights into the nongenomic regulation of phospholipid synthesizing enzymes*. *IUBMB Life*, 2013. **65**(7): p. 584-92.
36. Carman, G.M., R.A. Deems, and E.A. Dennis, *Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(32): p. 18711-4.
37. Carman, G.M. and G.S. Han, *Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(5): p. 2593-7.
38. Carrasco, S. and I. Merida, *Diacylglycerol, when simplicity becomes complex*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(1): p. 27-36.
39. Catz, S.D. and N.B. Sterin-Speziale, *Bradykinin stimulates phosphoinositide turnover and phospholipase C but not phospholipase D and NADPH oxidase in human neutrophils*. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(4): p. 591-7.
40. Clayton, A.H., Q.S. Hanley, and P.J. Verveer, *Graphical representation and multicomponent analysis of single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data*. *J Microsc*, 2004. **213**(Pt 1): p. 1-5.
41. Clayton, E.L., S. Minogue, and M.G. Waugh, *Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases as modulators of membrane trafficking and lipid signaling networks*. *Prog Lipid Res*, 2013. **52**(3): p. 294-304.
42. Cohen, D.R. and T. Curran, *The structure and function of the fos proto-oncogene*. *Crit Rev Oncog*, 1989. **1**(1): p. 65-88.
43. Coleman, R.A. and D.P. Lee, *Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation*. *Prog Lipid Res*, 2004. **43**(2): p. 134-76.
44. Colyer, R.A., C. Lee, and E. Gratton, *A novel fluorescence lifetime imaging system that optimizes photon efficiency*. *Microsc Res Tech*, 2008. **71**(3): p. 201-13.
45. Craige, B., G. Salazar, and V. Faundez, *Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha contains an AP-3-sorting motif and a kinase domain that are both required for endosome traffic*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(4): p. 1415-26.
46. Crespo, P.M., et al., *c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 31163-71.
47. Csaki, L.S. and K. Reue, *Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins*. *Annu Rev Nutr*, 2010. **30**: p. 257-72.
48. Curran, T. and B.R. Franza, Jr., *Fos and Jun: the AP-1 connection*. *Cell*, 1988. **55**(3): p. 395-7.
49. Curran, T. and J.I. Morgan, *Memories of fos*. *Bioessays*, 1987. **7**(6): p. 255-8.

50. Czech, M.P., *Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 791-815.
51. Chiu, R., et al., *The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes*. *Cell*, 1988. **54**(4): p. 541-52.
52. D'Souza, K. and R.M. Epand, *Enrichment of phosphatidylinositols with specific acyl chains*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(6): p. 1501-8.
53. D'Souza, K., Y.J. Kim, T. Balla, and R.M. Epand, *Distinct properties of the two isoforms of CDP-diacylglycerol synthase*. *Biochemistry*, 2014. **53**(47): p. 7358-67.
54. de Arriba Zerpa, G.A., et al., *Light exposure activates retina ganglion cell lysophosphatidic acid acyl transferase and phosphatidic acid phosphatase by a c-fos-dependent mechanism*. *J Neurochem*, 1999. **73**(3): p. 1228-35.
55. de Graaf, P., et al., *Nuclear localization of phosphatidylinositol 4-kinase beta*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 8): p. 1769-75.
56. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. *Nature*, 2006. **443**(7112): p. 651-7.
57. Digman, M.A., V.R. Caiolfa, M. Zamai, and E. Gratton, *The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis*. *Biophys J*, 2008. **94**(2): p. L14-6.
58. Dosztanyi, Z., V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon, *IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(16): p. 3433-4.
59. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**(2): p. 177-82.
60. Dyson, H.J. and P.E. Wright, *Intrinsically unstructured proteins and their functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(3): p. 197-208.
61. Eaton, J.M., G.R. Mullins, D.N. Brindley, and T.E. Harris, *Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(14): p. 9933-45.
62. Edwards, S.A., A.Y. Rundell, and E.D. Adamson, *Expression of c-fos antisense RNA inhibits the differentiation of F9 cells to parietal endoderm*. *Dev Biol*, 1988. **129**(1): p. 91-102.
63. Elangovan, M., et al., *Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy*. *Methods*, 2003. **29**(1): p. 58-73.
64. English, A.R. and G.K. Voeltz, *Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(2): p. 169-78.
65. Fagone, P. and S. Jackowski, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S311-6.
66. Fagone, P., et al., *Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(10): p. 7591-605.
67. Fang, X., et al., *Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1582**(1-3): p. 257-64.
68. Ferrero, G.O., M.L. Renner, G.A. Gil, L. Rodriguez-Berdini, and B.L. Caputto, *c-Fos-activated synthesis of nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P(2)] promotes global transcriptional changes*. *Biochem J*, 2014. **461**(3): p. 521-30.

69. Ferrero, G.O., F.N. Velazquez, and B.L. Caputto, *The kinase c-Src and the phosphatase TC45 coordinately regulate c-Fos tyrosine phosphorylation and c-Fos phospholipid synthesis activation capacity*. *Oncogene*, 2012. **31**(28): p. 3381-91.
70. Finck, B.N., et al., *Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway*. *Cell Metab*, 2006. **4**(3): p. 199-210.
71. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J Biol Chem*, 1957. **226**(1): p. 497-509.
72. Franke, T.F., D.R. Kaplan, L.C. Cantley, and A. Toker, *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*. *Science*, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
73. Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley, *Phosphoinositide kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 481-507.
74. Futerman, A.H. and R.E. Pagano, *Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver*. *Biochem J*, 1991. **280 (Pt 2)**: p. 295-302.
75. Futerman, A.H. and H. Riezman, *The ins and outs of sphingolipid synthesis*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(6): p. 312-8.
76. Gaggiotti, M.C., M. Del Boca, G. Castro, B.L. Caputto, and G.A. Borioli, *The immediate-early oncoproteins Fra-1, c-Fos, and c-Jun have distinguishable surface behavior and interactions with phospholipids*. *Biopolymers*, 2009. **91**(9): p. 710-8.
77. Gil, G.A., et al., *c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1881-94.
78. Gil, G.A., D.C. Silvestre, N. Tomasini, D.F. Bussolino, and B.L. Caputto, *Controlling cytoplasmic c-Fos controls tumor growth in the peripheral and central nervous system*. *Neurochem Res*, 2012. **37**(6): p. 1364-71.
79. Gilmore, A.P. and K. Burridge, *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate*. *Nature*, 1996. **381**(6582): p. 531-5.
80. Ginty, D.D., A. Bonni, and M.E. Greenberg, *Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB*. *Cell*, 1994. **77**(5): p. 713-25.
81. Giral, H., et al., *NHE3 regulatory factor 1 (NHERF1) modulates intestinal sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2b) expression in apical microvilli*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(42): p. 35047-56.
82. Glover, J.N. and S.C. Harrison, *Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA*. *Nature*, 1995. **373**(6511): p. 257-61.
83. Glynn, P., *Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1736**(2): p. 87-93.
84. Godi, A., et al., *FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(5): p. 393-404.
85. Godi, A., et al., *ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(5): p. 280-7.
86. Goedhart, J., et al., *Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 751.

87. Greenberg, M.E. and E.B. Ziff, *Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene*. Nature, 1984. **311**(5985): p. 433-8.
88. Grimsey, N., et al., *Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29166-74.
89. Guido, M.E., G.A. de Arriba Zerpa, D.F. Bussolino, and B.L. Caputto, *Immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides*. J Neurosci Res, 1996. **43**(1): p. 93-8.
90. Guo, J., et al., *Phosphatidylinositol 4-kinase type IIalpha is responsible for the phosphatidylinositol 4-kinase activity associated with synaptic vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3995-4000.
91. Halazonetis, T.D., K. Georgopoulos, M.E. Greenberg, and P. Leder, *c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities*. Cell, 1988. **55**(5): p. 917-24.
92. Han, G.S. and G.M. Carman, *Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14628-38.
93. Han, S., et al., *Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1 (formerly TMEM188) is the metazoan Spo7p ortholog and functions in the lipin activation pathway*. J Biol Chem, 2012. **287**(5): p. 3123-37.
94. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
95. Harris, T.E. and B.N. Finck, *Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2011. **22**(6): p. 226-33.
96. Harris, T.E. and B.N. Finck, *Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(6): p. 226-33.
97. Harris, T.E., et al., *Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 277-86.
98. Hazy, E. and P. Tompa, *Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins*. Chemphyschem, 2009. **10**(9-10): p. 1415-9.
99. He, B., et al., *Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview*. Cell Res, 2009. **19**(8): p. 929-49.
100. Heacock, A.M. and B.W. Agranoff, *CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1348**(1-2): p. 166-72.
101. Hermansson, M., K. Hokynar, and P. Somerharju, *Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells*. Prog Lipid Res, 2011. **50**(3): p. 240-57.
102. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
103. Higuchi, R., B. Krummel, and R.K. Saiki, *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7351-67.
104. Holub, B.J. and A. Kuksis, *Differential distribution of orthophosphate- 32 P and glycerol- 14 C among molecular species of phosphatidylinositols of rat liver in vivo*. J Lipid Res, 1971. **12**(6): p. 699-705.

105. Hsu, W.L., et al., *Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding*. Protein Sci, 2013. **22**(3): p. 258-73.
106. Huang, C. and C. Freter, *Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(1): p. 924-49.
107. Huffman, T.A., I. Mothe-Satney, and J.C. Lawrence, Jr., *Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 1047-52.
108. Hughes, P. and M. Dragunow, *Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system*. Pharmacol Rev, 1995. **47**(1): p. 133-78.
109. Hunt, S.P., A. Pini, and G. Evan, *Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation*. Nature, 1987. **328**(6131): p. 632-4.
110. Hunter, T., *Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 140-6.
111. Iakoucheva, L.M., C.J. Brown, J.D. Lawson, Z. Obradovic, and A.K. Dunker, *Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins*. J Mol Biol, 2002. **323**(3): p. 573-84.
112. Iakoucheva, L.M., et al., *The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 1037-49.
113. Inglis-Broadgate, S.L., et al., *Isolation and characterization of murine Cds (CDP-diacylglycerol synthase) 1 and 2*. Gene, 2005. **356**: p. 19-31.
114. Jackowski, S., *Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3858-67.
115. Janmey, P.A., *Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly*. Annu Rev Physiol, 1994. **56**: p. 169-91.
116. Jeffery, C.J., *Moonlighting proteins--an update*. Mol Biosyst, 2009. **5**(4): p. 345-50.
117. Jung, G., et al., *Molecular determinants of activation and membrane targeting of phosphoinositol 4-kinase IIbeta*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 501-9.
118. Kerr, L.D., D.B. Miller, and L.M. Matrisian, *TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence*. Cell, 1990. **61**(2): p. 267-78.
119. Kim, Y.J., M.L. Guzman-Hernandez, and T. Balla, *A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes*. Dev Cell, 2011. **21**(5): p. 813-24.
120. Kohyama-Koganeya, A., et al., *Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35995-6002.
121. Kovary, K. and R. Bravo, *Existence of different Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5015-23.
122. Kovary, K. and R. Bravo, *The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4466-72.

123. Kremers, G.J., J. Goedhart, E.B. van Munster, and T.W. Gadella, Jr., *Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius*. *Biochemistry*, 2006. **45**(21): p. 6570-80.
124. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. *J Mol Biol*, 1982. **157**(1): p. 105-32.
125. Ledwith, B.J., S. Manam, A.R. Kraynak, W.W. Nichols, and M.O. Bradley, *Antisense-fos RNA causes partial reversion of the transformed phenotypes induced by the c-Ha-ras oncogene*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(4): p. 1545-55.
126. Lee, W., P. Mitchell, and R. Tjian, *Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements*. *Cell*, 1987. **49**(6): p. 741-52.
127. Leppa, S., M. Eriksson, R. Saffrich, W. Ansorge, and D. Bohmann, *Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4369-78.
128. Lev, S., *Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(10): p. 739-50.
129. Lichtenberg, D., R.J. Robson, and E.A. Dennis, *Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **737**(2): p. 285-304.
130. Lin, Y.P. and G.M. Carman, *Kinetic analysis of yeast phosphatidate phosphatase toward Triton X-100/phosphatidate mixed micelles*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(1): p. 166-70.
131. Liu, G.H. and L. Gerace, *Sumoylation regulates nuclear localization of lipin-1alpha in neuronal cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e7031.
132. Liu, X., Y. Yin, J. Wu, and Z. Liu, *Structure and mechanism of an intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4244.
133. Liu, Y., W. Wang, G. Shui, and X. Huang, *CDP-diacylglycerol synthetase coordinates cell growth and fat storage through phosphatidylinositol metabolism and the insulin pathway*. *PLoS Genet*, 2014. **10**(3): p. e1004172.
134. Liu, Z. and Y. Huang, *Advantages of proteins being disordered*. *Protein Sci*, 2014. **23**(5): p. 539-50.
135. Logullo, A.F., et al., *Role of Fos-related antigen 1 in the progression and prognosis of ductal breast carcinoma*. *Histopathology*, 2011. **58**(4): p. 617-25.
136. Lung, M., et al., *Diacylglycerol kinase epsilon is selective for both acyl chains of phosphatidic acid or diacylglycerol*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(45): p. 31062-73.
137. Luthra, M.G. and A. Sheltawy, *The metabolic turnover of molecular species of phosphatidylinositol and its precursor phosphatidic acid in guinea-pig cerebral hemispheres*. *J Neurochem*, 1976. **27**(6): p. 1501-11.
138. Lykidis, A., P.D. Jackson, C.O. Rock, and S. Jackowski, *The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33402-9.

139. Maggiolini, M., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27008-16.
140. Mahuren, J.D., S.P. Coburn, A. Slominski, and J. Wortsman, *Microassay of phosphate provides a general method for measuring the activity of phosphatases using physiological, nonchromogenic substrates such as lysophosphatidic acid*. Anal Biochem, 2001. **298**(2): p. 241-5.
141. Malnou, C.E., et al., *Heterodimerization with Jun family members regulates c-Fos nucleocytoplasmic traffic*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 31046-59.
142. Manguikian, A.D. and S.E. Barbour, *Cell cycle dependence of group VIA calcium-independent phospholipase A2 activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 52881-92.
143. Mellman, D.L., et al., *A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 1013-7.
144. Mercola, D., A. Rundell, J. Westwick, and S.A. Edwards, *Antisense RNA to the c-fos gene: restoration of density-dependent growth arrest in a transformed cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **147**(1): p. 288-94.
145. Minogue, S., et al., *Cloning of a human type II phosphatidylinositol 4-kinase reveals a novel lipid kinase family*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16635-40.
146. Minogue, S., et al., *Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 3): p. 571-81.
147. Motrich, R.D., G.M. Castro, and B.L. Caputto, *Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53211.
148. Murphy, L.O. and J. Blenis, *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(5): p. 268-75.
149. Murphy, L.O., S. Smith, R.H. Chen, D.C. Fingar, and J. Blenis, *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 556-64.
150. Murphy, T.R., et al., *Phosphatidylinositol synthase is required for lens structural integrity and photoreceptor cell survival in the zebrafish eye*. Exp Eye Res, 2011. **93**(4): p. 460-74.
151. Nakagawa, T., K. Goto, and H. Kondo, *Cloning and characterization of a 92 kDa soluble phosphatidylinositol 4-kinase*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 2): p. 643-9.
152. Nakagawa, T., K. Goto, and H. Kondo, *Cloning, expression, and localization of 230-kDa phosphatidylinositol 4-kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(20): p. 12088-94.
153. Neubergh, M., M. Schuermann, J.B. Hunter, and R. Muller, *Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex*. Nature, 1989. **338**(6216): p. 589-90.
154. Noh, D.Y., S.H. Shin, and S.G. Rhee, *Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1242**(2): p. 99-113.
155. Nohturfft, A. and S.C. Zhang, *Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 539-66.

156. Oude Weernink, P.A., L. Han, K.H. Jakobs, and M. Schmidt, *Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 888-900.
157. Pan, W., et al., *CDP-diacylglycerol synthetase-controlled phosphoinositide availability limits VEGFA signaling and vascular morphogenesis*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 489-98.
158. Pascual, F. and G.M. Carman, *Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(3): p. 514-22.
159. Pasquare, S.J., M.G. Ilincheta de Boschero, and N.M. Giusto, *Aging promotes a different phosphatidic acid utilization in cytosolic and microsomal fractions from brain and liver*. *Exp Gerontol*, 2001. **36**(8): p. 1387-401.
160. Pasquare, S.J., G.A. Salvador, and N.M. Giusto, *Phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase activities in rat cerebellum during aging*. *Lipids*, 2004. **39**(6): p. 553-60.
161. Patel, L., C. Abate, and T. Curran, *Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun*. *Nature*, 1990. **347**(6293): p. 572-5.
162. Peterfy, M., T.E. Harris, N. Fujita, and K. Reue, *Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(6): p. 3857-64.
163. Peterfy, M., J. Phan, and K. Reue, *Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(38): p. 32883-9.
164. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(9): p. 407-14.
165. Portal, M.M., G.O. Ferrero, and B.L. Caputto, *N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation*. *Oncogene*, 2007. **26**(24): p. 3551-8.
166. Prilusky, J., et al., *FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(16): p. 3435-8.
167. Ren, H., et al., *A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(18): p. 3171-81.
168. Robbins, P.D., J.M. Horowitz, and R.C. Mulligan, *Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product*. *Nature*, 1990. **346**(6285): p. 668-71.
169. Romero, P., et al., *Sequence complexity of disordered protein*. *Proteins*, 2001. **42**(1): p. 38-48.
170. Saito, S., K. Goto, A. Tonosaki, and H. Kondo, *Gene cloning and characterization of CDP-diacylglycerol synthase from rat brain*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(14): p. 9503-9.
171. Salazar, G., et al., *Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha is a component of adaptor protein-3-derived vesicles*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(8): p. 3692-704.
172. Sasaki, T., et al., *Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases*. *Prog Lipid Res*, 2009. **48**(6): p. 307-43.
173. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2390-400.

174. Shulga, Y.V., R.A. Anderson, M.K. Topham, and R.M. Epand, *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isoforms exhibit acyl chain selectivity for both substrate and lipid activator*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 35953-63.
175. Silvestre, D.C., G.A. Gil, N. Tomasini, D.F. Bussolino, and B.L. Caputto, *Growth of peripheral and central nervous system tumors is supported by cytoplasmic c-Fos in humans and mice*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9544.
176. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
177. Siniosoglou, S., *Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 575-81.
178. Song, Y., et al., *An association of a simultaneous nuclear and cytoplasmic localization of Fra-1 with breast malignancy*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 298.
179. Song, Y., et al., *Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 suppresses proliferation and tumorigenicity of ovarian carcinoma cells*. Biochem J, 2007. **406**(3): p. 427-36.
180. Spector, A.A. and M.A. Yorek, *Membrane lipid composition and cellular function*. J Lipid Res, 1985. **26**(9): p. 1015-35.
181. Srivastava, R., R.K. Sinha, and G. Subrahmanyam, *Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta associates with TCR-CD3 zeta chain in Jurkat cells*. Mol Immunol, 2006. **43**(5): p. 454-63.
182. Stace, C.L. and N.T. Ktistakis, *Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(8): p. 913-26.
183. Sud, M., et al., *LMSD: LIPID MAPS structure database*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D527-32.
184. Sun, Y., N.M. Hays, A. Periasamy, M.W. Davidson, and R.N. Day, *Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy*. Methods Enzymol, 2012. **504**: p. 371-91.
185. Sun, Y., C. Rombola, V. Jyothikumar, and A. Periasamy, *Forster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells*. Cytometry A, 2013. **83**(9): p. 780-93.
186. Tanaka, S., J. Nikawa, H. Imai, S. Yamashita, and K. Hosaka, *Molecular cloning of rat phosphatidylinositol synthase cDNA by functional complementation of the yeast Saccharomyces cerevisiae pis mutation*. FEBS Lett, 1996. **393**(1): p. 89-92.
187. Teleman, A.A., *Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in Drosophila*. Biochem J, 2010. **425**(1): p. 13-26.
188. Thakur, P.C., J.M. Davison, C. Stuckenholtz, L. Lu, and N. Bahary, *Dysregulated phosphatidylinositol signaling promotes endoplasmic-reticulum-stress-mediated intestinal mucosal injury and inflammation in zebrafish*. Dis Model Mech, 2014. **7**(1): p. 93-106.
189. Thakur, P.C., et al., *Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in cd1pt-deficient zebrafish*. Hepatology, 2011. **54**(2): p. 452-62.

190. Thomas, M.J., et al., *Lipid exchange between mixed micelles of phospholipid and triton X-100*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1417**(1): p. 144-56.
191. Tompa, P., C. Szasz, and L. Buday, *Structural disorder throws new light on moonlighting*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(9): p. 484-9.
192. Tyanova, S., J. Cox, J. Olsen, M. Mann, and D. Frishman, *Phosphorylation variation during the cell cycle scales with structural propensities of proteins*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(1): p. e1002842.
193. Uversky, V.N., *A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics*. Protein Sci, 2013. **22**(6): p. 693-724.
194. Uversky, V.N., J.R. Gillespie, and A.L. Fink, *Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?* Proteins, 2000. **41**(3): p. 415-27.
195. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
196. Verveer, P.J., F.S. Wouters, A.R. Reynolds, and P.I. Bastiaens, *Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane*. Science, 2000. **290**(5496): p. 1567-70.
197. Viiri, K., M. Maki, and O. Lohi, *Phosphoinositides as regulators of protein-chromatin interactions*. Sci Signal, 2012. **5**(222): p. pe19.
198. Vogel, S.S., C. Thaler, and S.V. Koushik, *Fanciful FRET*. Sci STKE, 2006. **2006**(331): p. re2.
199. Volta, M., et al., *Identification and characterization of CDS2, a mammalian homolog of the Drosophila CDP-diacylglycerol synthase gene*. Genomics, 1999. **55**(1): p. 68-77.
200. Wang, H., et al., *Lipin-1gamma isoform is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain*. FEBS Lett, 2011. **585**(12): p. 1979-84.
201. Wang, J., et al., *PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(7): p. 2646-55.
202. Wang, X., S.P. Devaiah, W. Zhang, and R. Welti, *Signaling functions of phosphatidic acid*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(3): p. 250-78.
203. Wang, Y.J., et al., *Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi*. Cell, 2003. **114**(3): p. 299-310.
204. Waugh, M.G., et al., *Localization of a highly active pool of type II phosphatidylinositol 4-kinase in a p97/valosin-containing-protein-rich fraction of the endoplasmic reticulum*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 1): p. 57-63.
205. Weeks, R., et al., *Isolation and expression of an isoform of human CDP-diacylglycerol synthase cDNA*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(3): p. 281-9.
206. Wei, Y.J., et al., *Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46586-93.
207. Wenk, M.R., *The emerging field of lipidomics*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(7): p. 594-610.

208. Wenk, M.R. and P. De Camilli, *Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8262-9.
209. Wong, K., R. Meyers dd, and L.C. Cantley, *Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13236-41.
210. Wouters, F.S. and P.I. Bastiaens, *Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells*. Curr Biol, 1999. **9**(19): p. 1127-30.
211. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Linking folding and binding*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(1): p. 31-8.
212. Wu, L., B. Niemeyer, N. Colley, M. Socolich, and C.S. Zuker, *Regulation of PLC-mediated signalling in vivo by CDP-diacylglycerol synthase*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 216-22.
213. Xu, Z., G. Huang, and K.V. Kandror, *Phosphatidylinositol 4-kinase type IIalpha is targeted specifically to cellugyrin-positive glucose transporter 4 vesicles*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2890-7.
214. Xue, B., R.L. Dunbrack, R.W. Williams, A.K. Dunker, and V.N. Uversky, *PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(4): p. 996-1010.
215. Zaccheo, O., D. Dinsdale, P.A. Meacock, and P. Glynn, *Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24024-33.
216. Zolyomi, A., X. Zhao, G.J. Downing, and T. Balla, *Localization of two distinct type III phosphatidylinositol 4-kinase enzyme mRNAs in the rat*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(5): p. C914-20.