

Neurociencias, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO, UBA-CONICET)

Laboratorio de Genética del Aprendizaje

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Unidad Académica 1

PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN

Mecanismos Moleculares de Aprendizaje y Memoria mediados por el transductor de señales y activador de la transcripción, STAT

DOCENTE/S A CARGO: Pagani Mario Rafael

UBICACIÓN: Paraguay 2155, 7mo piso, sector M1

TAREAS A REALIZAR POR PARTE DEL PRACTICANTE:

Cultivos de *Drosophila*, diseño de experimentos, cruzamientos genéticos, análisis del comportamiento y plasticidad sináptica, análisis estadístico e interpretación de resultados.

RESUMEN DEL PROYECTO

El objetivo general de nuestros estudios es comprender las bases moleculares de la discapacidad intelectual en el **síndrome de Noonan (SN)** y desórdenes relacionados a fin de desarrollar estrategias terapéuticas. En este sentido, el presente proyecto propone investigar los mecanismos moleculares del **efecto de espaciamiento (EE)** que se encuentra fuertemente reducido en modelos animales del SN. El EE hace referencia a la mayor memoria que se obtiene luego del entrenamiento espaciado (con intervalos de descanso entre sesiones), en comparación al entrenamiento masivo (la misma cantidad de entrenamiento sin intervalos). En estudios previos, el defecto en la memoria, causado por mutaciones que modelan SN, fue “curable” por medio de tratamiento farmacológico o un entrenamiento apropiado, sugiriendo que los problemas de aprendizaje en SN podrían ser tratados terapéuticamente.

Estudios propios y de terceros indican que el SN es causado por mutaciones en genes que codifican para proteínas de la señalización RAS-ERK1\2. Sin embargo, estudios de interacción génica en *Drosophila* mostraron que los defectos del desarrollo producidos por mutaciones asociadas a SN son modulados por RAS-ERK1/2 y por STAT. Por otro lado, la eliminación de STAT reduce el nivel de memoria en invertebrados y en vertebrados. Sin embargo, los mecanismos implicados no han sido investigados.

Nuestros resultados preliminares en *Drosophila* mostraron que la supresión de STAT reduce la memoria inducida por entrenamiento espaciado, mientras que la sobreexpresión de STAT genera un mayor nivel de memoria con entrenamiento espaciado. Esto sugiere que la función de STAT sería distinta a la de RAS-ERK1/2, ya que la manipulación de ésta última no genera un mayor nivel de memoria luego del entrenamiento espaciado. En conjunto, esta evidencia sugiere la siguiente hipótesis: STAT es necesario para el procesamiento de la información en el efecto de espaciamiento

a través de mecanismos distintos a los reportados para la señalización de RAS-ERK1/2, y posiblemente a través de la interacción entre la señalización de ERK1/2 y STAT. Para poner a prueba esta hipótesis, se proponen tres objetivos específicos que se pondrán a prueba en *Drosophila* y ratones: (1) Determinar si STAT es necesario en el EE, (2) Determinar la dinámica de activación de STAT en respuesta al entrenamiento masivo y espaciado y (3) Determinar si ERK1/2 y STAT interaccionan funcionalmente durante o después de estos entrenamientos.

En los tres objetivos se utilizará un protocolo de dos sesiones de entrenamiento masivo o espaciado de condicionamiento aversivo. En el objetivo 1 se aumentará o reducirá la actividad de STAT con herramientas genéticas o farmacológicas justo antes del entrenamiento. En el objetivo 2 se analizará la dinámica de activación de STAT por medio de reporteros y western blot. En el objetivo 3 se bloqueará la actividad de una vía de señalización (ej. ERK) y se medirá la actividad en la otra vía (ej. STAT) luego del entrenamiento masivo o espaciado. Se espera que STAT module el EE directa o indirectamente a través de un efecto sobre la actividad de ERK1/2 luego del entrenamiento espaciado, pero no masivo. La identificación de nuevos componentes moleculares en el EE proveerá blancos terapéuticos potenciales.

PLAN DE TRABAJO

Objetivo general

El objetivo general de nuestros estudios es comprender las bases moleculares de la discapacidad intelectual en el **síndrome de Noonan (SN)** y desórdenes relacionados a fin de desarrollar estrategias terapéuticas.

La evidencia actual indica que el SN es causado por mutaciones en genes que codifican para proteínas de la señalización RAS-ERK1\2 (**Figura1**). En estudios previos, el defecto en la memoria, causado por mutaciones que modelan SN, fue “curable” por medio de tratamiento farmacológico o un entrenamiento apropiado (Pagani et al., 2009), sugiriendo que los problemas de aprendizaje en SN podrían ser tratados terapéuticamente.

Estudios de interacción génica en *Drosophila* mostraron que los defectos del desarrollo producidos por mutaciones asociadas a SN son modulados por RAS-ERK1/2 y por STAT (Oishi et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos implicados no han sido investigados.

Resultados preliminares mostraron que luego del entrenamiento espaciado, la supresión de *STAT* reduce la memoria, mientras que la sobreexpresión de un alelo silvestre genera un mayor nivel de memoria (**Figura 2**). Esta evidencia sugiere que STAT es requerido para aprendizajes espaciados, sin embargo, funcionaría de una forma distinta a RAS-ERK1/2, ya que la manipulación de ésta última no genera un mayor nivel de memoria luego del entrenamiento espaciado.

Objetivos específicos

Obj. Esp. 1 - Determinar el efecto de reducir o aumentar la actividad de STAT sobre la memoria luego de entrenamiento masivo o espaciado. STAT se manipulará

utilizando herramientas genéticas (**Figura 2**) y farmacológicas. La memoria se evaluará en *Drosophila* y en ratones, utilizando condicionamiento aversivo en ambos modelos, como en publicaciones previas del grupo.

Obj. Esp. 2 – Determinar la dinámica de activación de STAT como consecuencia del entrenamiento masivo o espaciado. La dinámica de activación de STAT se evaluará primero en *Drosophila* utilizando un reportero de actividad genéticamente codificado STAT-GFP. Dichos efectos se confirmarán en experimentos de western blot en *Drosophila* y en ratones, como en estudios y publicaciones previas del grupo.

Obj. Esp. 3 – Determinar si ERK y STAT interaccionan luego del entrenamiento masivo y espaciado. Se analizará la activación de STAT en respuesta al entrenamiento, en animales con supresión de ERK, y viceversa, (determinar la activación de ERK luego de la supresión de STAT). Esto se hará en *Drosophila* y en ratones como en el Obj esp 2.

Introducción, conocimientos existentes y resultados previos

Introducción general

El presente proyecto propone estudiar mecanismos moleculares involucrados en el **efecto de espaciamiento (EE)** en memoria, **una propiedad del aprendizaje que se encuentra alterada en modelos de SN** y desórdenes relacionados. El EE hace referencia a la obtención de una memoria mayor luego de sesiones de entrenamiento espaciadas (con intervalos de tiempo entre las sesiones de entrenamiento) en comparación al mismo número de sesiones masivas (sin intervalos entre sesiones). El EE consistentemente se asocia a la formación de **memoria de largo término (LTM)**. Este estudio nos permitirá mejorar nuestro entendimiento sobre el EE y permitirá contribuir a dos conceptos de importancia: (a) la posibilidad de tratar farmacológicamente la discapacidad intelectual en el SN y (b) la existencia de mecanismos de aprendizaje específicos de la memoria de largo término. A continuación, se desarrollan los aspectos de importancia mencionados.

Síndrome de Noonan (SN) y desórdenes relacionados

El SN (MIM #163950) es un desorden autosómico dominante que afecta a 1 de cada 1000-2500 nacidos vivos, (Nora et al., 1974). La discapacidad intelectual (previamente conocida como retardo mental) es una alteración común en un grupo de desórdenes genéticos, relacionados fenotípicamente, que incluye síndrome de Noonan, LEOPARD, Cardio-Facial-Cutáneo (CFC), NF1, Neurofibromatosis tipo Noonan y síndrome de Costello (CS), en los cuales el marcador bioquímico común es una mayor actividad de ERK1\2. Estos desórdenes, conocidos en conjunto como RASopatías, se caracterizan por presentar defectos de desarrollo, incluyendo dismorfia facial, malformaciones cardíacas y óseas, baja estatura y alta incidencia de leucemia. Consistentemente, los genes afectados en estos desórdenes (PTPN11, SOS, NF1, RAS, RAF y MEK) codifican para proteínas de la vía de señalización de RAS/ERK1/2 asociada a receptores de factor de crecimiento (**Figura 1**) (Krab et al., 2008; Lee et al., 2005; Pierpont et al., 2009; revisado en, Gelb y Tartaglia, 2006; Aoki et al., 2008). La reciente identificación de los genes involucrados en estos desórdenes mostró que no solo comparten características

fenotípicas, sino también una vía metabólica y pueden presentarse como desórdenes alélicos (Ej. mutaciones puntuales en el gen RAS se han identificado en individuos con síndrome de Noonan, CFC y CS (**Figura 1**) (Nyström et al., 2008).

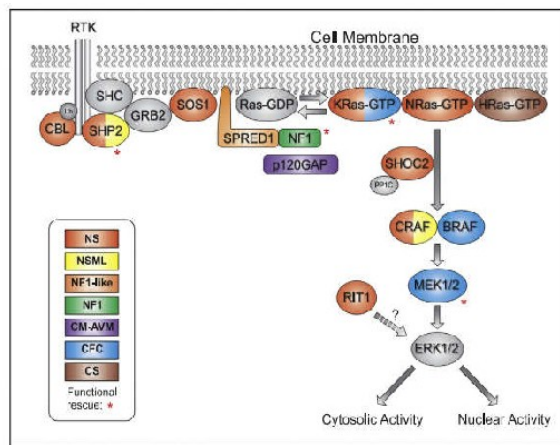


Figura 1. Representación esquemática de la señalización de RAS-ERK1/2. Las RASopatías son un grupo de trastornos del neurodesarrollo causados por mutaciones en genes que codifican proteínas (ilustradas en código de colores). Este grupo incluye los siguientes: Síndrome de Noonan (SN), síndrome de Noonan con múltiples lentigos (NSML), síndrome similar a NF1 (similar a NF1), neurofibromatosis tipo 1 (NF1), malformación capilar síndrome de malformación arteriovenosa (MC-MAV), síndrome cardio-facio-cutáneo (CFC) y síndrome de Costello (SC). El asterisco rojo indica componentes moleculares donde se logró el rescate funcional.

El efecto de espaciamiento (EE)

El EE hace referencia a la inducción de una mayor memoria por medio del entrenamiento espaciado en comparación a la memoria obtenida luego del entrenamiento masivo. El EE se ha estudiado ampliamente debido a su relevancia para la psicología, la educación, la terapia cognitiva, la jurisprudencia y la publicidad (Bjork et al., 1970; Appleton-Knapp et al., 2005; Price et al., 2006; Cepeda et al., 2006). Sin embargo, se ha estudiado principalmente en humanos y en consecuencia los mecanismos involucrados son esencialmente desconocidos (Cepeda et al., 2006). El EE es solo observable para LTM, al corto plazo no se expresa tal efecto. Consistentemente, en modelos experimentales se ha identificado que el EE está mediado por la formación de LTM dependiente de síntesis de proteínas (Quinn y Dudai, 1976). Este robusto fenómeno conservado en invertebrados y vertebrados se ha detectado en distintos tipos de memoria incluyendo, habituación, sensibilización, condicionamiento, navegación, habilidades motoras y lenguaje, lo que sugiere que es una propiedad fundamental del comportamiento animal (Ebbinghaus, 1885; Carew et al., 1972; Tully et al., 1994; Gerber et al., 1998; Hermitte et al., 1999; Beck et al., 2000; Sutton et al., 2002; Cepeda et al., 2006; Philips et al., 2007). Sin embargo, como se describe en las secciones 4.3. b-c los mecanismos moleculares identificados en el EE son muy escasos.

El entrenamiento espaciado induce un patrón de activación diferencial de ERK1/2

Si bien la correspondencia neuroanatómica entre humanos y modelos animales puede ser distante, los mecanismos moleculares involucrados en aprendizaje y memoria se encuentran conservados (para una revisión, ver Kandel, 2001; Bolduc y Tully, 2009). Una característica de la memoria de largo término, conservada en distintos organismos y paradigmas comportamentales, es el requerimiento de síntesis de nuevas proteínas, la cual, en general se induce por medio de múltiples sesiones de entrenamiento espaciadas en el tiempo. Los mecanismos asociados al aprendizaje se han estudiado principalmente luego de una sesión única de entrenamiento (ej. Guo et al., 2000), lo que en general, induce memoria de corto término. Sin embargo, los mecanismos involucrados en el aprendizaje de experiencias repetidas, que inducen la formación de LTM, son poco conocidos. Observaciones recientes muestran que durante el entrenamiento repetido (masivo vs. espaciado) se establece un patrón diferencial de activación de ERK (Pagani et al., 2009).

En el entrenamiento espaciado se observa un pulso de activación de ERK1/2, luego de cada sesión de entrenamiento, mientras que el protocolo masivo solo produce activación de ERK1/2 luego de la última sesión de entrenamiento. Esto se debe a que cada sesión de entrenamiento remueve la activación de ERK1/2 producida por la sesión previa de entrenamiento. De esta forma la proximidad temporal de las sesiones en el protocolo masivo previene la activación de ERK1/2 luego de cada sesión, mientras que el protocolo espaciado la permite (Pagani et al., 2009).

De esta forma, en las investigaciones que se proponen, se estudiarán mecanismos asociados a múltiples sesiones de entrenamiento y se evaluará la memoria a las 24 h, momento en el cual se detecta LTM.

4.3.b Principales contribuciones de otros e interrogantes

Mecanismos moleculares en el efecto de espaciamiento (EE)

El conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en el EE es escaso. Cabe destacar que el entrenamiento espaciado se asocia consistentemente con la formación de LTM y muchos mecanismos moleculares están implicados en LTM. Sin embargo, esos mecanismos no regulan el EE, sino que participan en alguna etapa de esta memoria. Un componente central en la regulación del EE parece ser ERK1/2. Philips y colaboradores (2007) identificaron en *Aplysia* que el número de sesiones de entrenamiento espaciado necesario para promover el EE se podía reducir a dos sesiones. Sin embargo, las sesiones debían estar separadas por 40 min, en lugar del intervalo clásico de 15 min. Este intervalo de 40 min coincidía con el tiempo necesario para que la activación de ERK1/2 sea máxima. Si bien este dato era interesante, no era claro cuál era su relación con el EE. Posteriormente, nuestros estudios en *Drosophila* contribuyeron a este interrogante (Ver, sección 4.3.a y c).

Posteriormente el mismo grupo mostró que ERK1/2 era necesario para el EE y su

activación estaba dada por medio de dos tipos de receptores tirosina quinasa (TrkB and TGFr β -II) (Kopec et al., 2015). Durante el entrenamiento espaciado en *Aplysia*, estos receptores median la activación de ERK, actuando de forma independiente en el soma y los terminales sinápticos (Kopec et al., 2015). Si bien estos hallazgos ampliaron la complejidad en los mecanismos del EE, no es claro cómo se regula la actividad de ERK1/2, o porqué son necesarios múltiples pulsos de actividad de ERK1/2, ni que otros componentes moleculares participan de forma independiente de la señalización de ERK1/2 en este fenómeno.

Interacción génica de SHP2-N308D con RAS-ERK1/2 y STAT

El SN es causado por mutaciones en genes que codifican para proteínas de la vía de señalización RAS/ERK1/2, siendo el alelo Shp2-N308D la mutación más frecuente que explica el 50 % de los casos. Nuestros estudios en *Drosophila* han mostrado que distintos alelos clínicamente relevantes, incluyendo Shp2-N308D, afectan una propiedad del aprendizaje conocida como el EE (Pagani et al., 2009). La evidencia actual indica que la patogénesis en el SN depende de una activación exaltada de RAS/ERK1/2 (para revisión, ver Rauen, 2013; San Martin and Pagani, 2014). Sin embargo, estudios de interacción génica mostraron que los defectos del desarrollo producidas por el alelo Shp2-N308D en el ala de *Drosophila* son reguladas por RAS-ERK1/2 y por STAT aunque de forma distinta (Oishi et al., 2006). Los defectos causados por Shp2-N308D, fueron exaltados por mutaciones ganancia de función de RAS o ERK, pero reducidos por mutaciones pérdida de función de estos. En contraste, los defectos causados por Shp2-N308D, fueron reducidos por mutaciones ganancia de función de STAT y exaltados por mutaciones pérdida de función (Oishi et al., 2006). Esto indica que la señalización de RAS-ERK1/2 y STAT ejercen efectos opuestos sobre los defectos del desarrollo causados por Shp2N308D. Sin embargo, dichos mecanismos no se han investigado.

STAT en plasticidad y memoria

La vía de señalización JAK/STAT está muy conservada evolutivamente en los eucariotas y está involucrada en el crecimiento celular, supervivencia, desarrollo y diferenciación. En el sistema nervioso central (SNC) se la ha vinculado principalmente al control de la expresión génica durante el desarrollo. Cuando un receptor de membrana es activado por hormonas, factores de crecimiento o citoquinas, se induce la fosforilación y activación de JAK, que a su vez fosforila a STAT. Los dímeros de STAT fosforilados translocan al núcleo y permiten la expresión de genes.

La actividad de STAT no sólo se limita a desarrollo del SNC sino que además hay cada vez más evidencias acerca de su participación en vías de señalización con efectos en funciones cognitivas tanto en invertebrados como en vertebrados, siendo STAT3 la isoforma implicada en plasticidad sináptica en hipocampo y posiblemente en memoria (Nicolas et al., 2013). En *Drosophila* se ha comprobado que la participación de la vía JAK/STAT es fundamental para la formación de LTM en aprendizajes aversivos (Copf et al., 2011) y la desregulación de la vía también estaría relacionada con la patogénesis en modelos de enfermedad de Alzheimer (Chiba et al., 2009).

La expresión de STAT3 en neuronas está asociada a la homeostasis de glucosa (Gao *et al.*, 2004)□ y además se ha comprobado que la inhibición de su actividad en la microglia puede reducir los síntomas de la depresión generalizada (Kwon *et al.*, 2017). Recientemente se ha mostrado la participación de STAT5 en procesos de aprendizaje y memoria: los ratones knock-out para STAT5 en todo el cerebro presentaron déficits en tareas de reconocimiento de objetos, laberinto de Barnes y condicionamiento por miedo al contexto (CFC) (Furigo *et al.*, 2018).

Por otro lado, el aumento en la actividad de STAT1 mediante la aplicación de RNAi dirigido contra la proteína inhibidora de STAT activado -PIAS1- ha mejorado la formación de memorias en el laberinto acuático de Morris (MWM) en ratones (Tai *et al.*, 2011). PIAS1, el inhibidor de STAT1 y STAT3, es un gen inmediato-temprano que requiere la actividad de NMDAR, ERK1/2 y CREB para modular la plasticidad sináptica (Liu *et al.*, 2013)□.

Además, en experimentos en ratones la aplicación localizada en la corteza órbito-frontal de JSI-124, un inhibidor de STAT3 (Blaskovich *et al.*, 2003), bloqueó la flexibilidad cognitiva, impidiendo el aprendizaje reverso en una tarea de cambio de atención (attentional set-shifting test) (Donegan *et al.*, 2014).

En conjunto, estos resultados muestran que la señalización de JAK/STAT está involucrada en plasticidad y memoria, siendo STAT3 la isoforma más probablemente asociada a memoria dependiente de hipocampo. Sin embargo, no es claro cómo participa en memoria, ni cual es la relación con la señalización de RAS-ERK1/2 extensamente estudiada o si regula el EE. En este proyecto se proponen tres objetivos específicos que tienen la potencialidad de responder a estos interrogantes. Mientras que en *Drosophila* existe un solo gen de STAT, en mamíferos existen al menos 5 genes. En nuestros estudios con roedores nos enfocaremos en STAT3, ya que parece ser el más relevante para tareas que requieren la participación del hipocampo.

4.3. c Principales contribuciones al tema publicadas por el grupo (max. 2 carillas)

Si bien existen aportes propios y de terceros al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el EE, aún resta comprender cómo se establecen los pocos mecanismos descritos para la dinámica de actividad de ERK o la participación de otros componentes moleculares y celulares. En este sentido, recientemente observamos que la señalización de SHP2 en animales adultos regula la supervivencia, los niveles de triglicéridos y el metabolismo energético a través la señalización de insulina, con efectos distintos en distintos tejidos (Ruzzi *et al.*, 2020).

A continuación, se describen brevemente los aportes del grupo sobre el rol de mutaciones asociadas al SN en el EE en memoria y plasticidad sináptica.

Mutaciones asociadas al SN afectan el EE en memoria

Como se presentó brevemente más arriba, nuestras investigaciones han mostrado que el efecto de espaciamiento depende de los niveles de actividad de la fosfatasa de tirosinas SHP2 o RAS, las cuales regulan la dinámica de activación de ERK durante el

entrenamiento repetido. Está bien documentado que SHP2, RAS y ERK participan durante el desarrollo en la vía de señalización TKR-RAS-ERK1/2 en vertebrados e invertebrados y dicha vía es necesaria en memoria de largo término (Pagani et al., 2009; Philip et al., 2013; Cattaneo et al., 2020; revisado en San Martin y Pagani, 2014; Medina y Viola, 2018). Cabe destacar que muchas manipulaciones farmacológicas o genéticas pueden reducir los niveles de LTM luego del entrenamiento espaciado. Sin embargo, no tenemos evidencia que indique que otros componentes moleculares, distintos de SHP2, RAS y ERK, también puedan regular el efecto de espaciamiento.

Nuestros estudios previos, han mostrado que las mutaciones asociadas al SN, en genes que codifican para SHP2 o RAS, afectan la dinámica de activación de ERK, dando como resultado la ausencia de EE y memoria (Pagani et al., 2009; Cattaneo et al., 2020).

La sobreexpresión de RAS o SHP2, durante un entrenamiento masivo aceleran la activación de ERK1/2 y produce LTM

En el caso particular de la deficiencia del EE, éste se ha podido revertir por medio de una estrategia de entrenamiento (prolongación del intervalo entre las sesiones de entrenamiento) o una estrategia farmacológica (una inhibición moderada de la actividad fosfatasa de SHP2). Ambas estrategias posibilitaron la formación de LTM a niveles normales (Pagani et al., 2009). Resultados similares se observaron al manipular genéticamente la actividad de RAS (Cattaneo et al., 2020).

Una característica de importancia para este estudio es que tanto la sobreexpresión de un alelo tipo silvestre de Shp2 o Ras, permitió la formación de LTM luego de un entrenamiento masivo (un protocolo insuficiente para generar esta memoria). Dicho efecto no se observa en el caso de la manipulación de STAT (Ver, **4.3. d -Resultados preliminares**).

La estimulación espaciada, pero no masiva, promueve precisión en la plasticidad sináptica estructural

Un entrenamiento débil produce memoria de corto plazo basada en modificaciones postraduccionales, mientras que un entrenamiento más fuerte produce memoria de largo plazo basada en cambios estructurales a nivel sináptico.

Utilizando un sistema modelo de plasticidad sináptica estructural en *Drosophila*, estudiamos cómo distintos patrones de estímulos promovían cambios estructurales específicos (formación de nuevos botones sinápticos). En estos estudios identificamos que el EE es detectable a nivel sináptico, el cual determina especificidad y precisión en los cambios sinápticos estructurales (San Martin et al., 2017).

Mientras que un solo pulso de estimulación (masivo) indujo plasticidad sináptica estructural, la misma cantidad de estimulación dividida en tres estímulos espaciados lo impidió por completo. Este efecto inhibitorio fue determinado por la longitud de los intervalos entre estímulos.

El efecto inhibitorio del espaciamiento se perdió al suprimir la actividad de RAS o ERK, mientras que la sobreexpresión de Ras-WT la potenció. Además, dividir el mismo tiempo

total de estimulación en cinco o más estímulos produjeron una mayor precisión en el número de eventos de plasticidad (San Martin et al., 2017).

Mutaciones asociadas al SN eliminan el EE en plasticidad sináptica estructural

En nuestros estudios de plasticidad sináptica se observó que las mutaciones de Ras, asociadas a discapacidad intelectual (RasV152G), eliminaron el efecto del espaciamiento y llevó a las neuronas a decodificar distintos patrones de estimulación como estimulación masiva (San Martin et al., 2017). Esta evidencia sugiere que las alteraciones en memoria, causadas por mutaciones clínicamente relevantes, pueden resultar del efecto sobre la plasticidad sináptica.

Resultados preliminares

RAS es necesario para aprendizaje espaciado, pero exalta la memoria luego del entrenamiento masivo en *Drosophila*

Como se presentó en la sección “4.3. *c Principales contribuciones publicadas por el grupo*”, la supresión de RAS o SHP2 reduce la memoria de largo término generada por el entrenamiento espaciado, sin afectar la memoria inmediata o aquella obtenida luego del entrenamiento masivo. Por otro lado, la sobre expresión de RAS o SHP2 promovió la formación de LTM luego del entrenamiento masivo, (un protocolo insuficiente para generar LTM), sin generar ningún efecto luego del entrenamiento espaciado (Pagani et al., 2009; Cattaneo et al., 2020). En contraste, la manipulación de STAT generó un efecto claramente diferente.

STAT es necesario y suficiente para aprendizaje espaciado, y no afecta la memoria luego del entrenamiento masivo

Para definir el rol de STAT en aprendizaje y memoria se redujo el nivel de actividad de STAT (por medio de RNAi) o se aumentó (por medio de la sobre expresión de un alelo silvestre). Las manipulaciones genéticas se hicieron en los cuerpos pedunculados (estructuras necesarias para aprendizaje y memoria) justo antes del entrenamiento utilizando el sistema TARGET (tub-GAL80ts; 247-GAL4/UAS-STAT-RNAi), (tub-GAL80ts;247-GAL4/UAS-STAT-WT) y líneas parentales (McGuire et al., 2003). En este sistema, el factor de transcripción GAL4 media la expresión de los transgenes bajo control regulatorio de la secuencia UAS. A 18 °C el represor termosensible de GAL4, GAL80ts, impide la actividad transcripcional de GAL4. Sin embargo, a 29 °C GAL80ts se desestabiliza permitiendo la transcripción dependiente de GAL4. En los experimentos presentados más abajo, los animales fueron cultivados 18 °C y antes del entrenamiento se aplicó 29 °C durante 4 días.

La supresión de la función STAT, utilizando RNA de interferencia, STAT-RNAi, mostró una reducción de la memoria a las 24 horas después del entrenamiento espaciado, pero no después del entrenamiento masivo o a la memoria inmediata (**Figura 2**). Esta observación es consistente con estudios previos (Copf et al., 2011). En contraste, la sobreexpresión de un alelo de tipo salvaje de STAT aumentó la memoria a las 24 horas después del entrenamiento espaciado respecto al genotipo control, mientras que no tuvo efecto sobre la memoria inducida por el entrenamiento masivo.

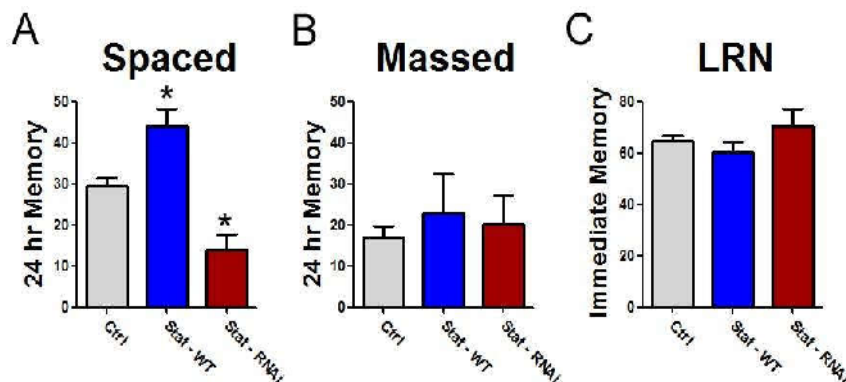


Figura 2. Efecto agudo de la manipulación de STAT sobre la memoria inmediata y a las 24 horas.

Memoria en condicionamiento olfatorio aversivo en genotipos que sobre expresan en cuerpos pedunculados un alelo tipo silvestre de STAT, (*tubGAL80ts;GAL4-247/UAS-Stat-WT* (**Stat-WT**), o RNAi, *tub-GAL80ts;GAL4247/UAS-Stat-RNAi*, (**Stat-RNAi**) y el genotipo control parental (*tubGAL80ts;GAL4-247/+*) (**Ctrl**) luego de inducir la expresión por 4 días a temperatura restrictiva (29°C). **(A)** Memoria a las 24 hr luego de entrenamiento espaciado. **(B)**, Memoria a las 24 hr luego de entrenamiento masivo. **(C)** Memoria inmediata luego de una única sesión de entrenamiento. * indica $p < 0.05$ comparado con el genotipo control. ANOVA seguido de una prueba de Dunnett. N= 6

Actividades, cronogramas y metodología

- **Planteo de la hipótesis.** Nuestros estudios en *Drosophila* mostraron que alelos clínicamente relevantes en el SN afectan una propiedad del aprendizaje conocida como el **efecto de espaciamiento (EE)** (Pagani et al., 2009; San Martin et al., 2017; Cattaneo et al., 2020). El EE se ha estudiado en distintas áreas del conocimiento, sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados son esencialmente desconocidos. El entendimiento actual es que la patogénesis en el SN depende de una activación exaltada de RASERK1\2 (para revisión, ver Rauen, 2013; San Martin and Pagani, 2014). Sin embargo, estudios de interacción génica mostraron que los defectos del desarrollo producidos por el alelo más frecuente en modelos de SN son regulados por RAS-ERK, pero también por STAT (Oishi et al., 2006). La coactivación e interacción de la señalización de ERK y STAT se ha detectado en procesos inflamatorios, diferenciación celular o en mecanismos asociados a cáncer (Winston et al., 1996; Tkach et al., 2013; Beach et al., 2017). La eliminación de STAT reduce el nivel de memoria en invertebrados y en vertebrados (Copf et al., 2011; Nicolas et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos

implicados no han sido investigados.

Nuestros resultados preliminares mostraron que la supresión de *STAT* reduce la memoria producida por el entrenamiento espaciado, pero no afecta la memoria producida por entrenamiento masivo. Más interesante, la sobreexpresión de un alelo silvestre de *STAT* genera un mayor nivel de memoria luego del entrenamiento espaciado, pero no con otros entrenamientos (**Figura 2**). Esta evidencia sugiere que *STAT* es requerido para el EE, sin embargo, funcionaría de una forma distinta a RAS-ERK1/2, ya que ésta última no genera un mayor nivel de memoria luego del entrenamiento espaciado. **HIPÓTESIS: *STAT* es necesario para el procesamiento de la información en el efecto de espaciamiento a través de mecanismos distintos a los reportados para la señalización de RAS-ERK1/2, y posiblemente a través de la interacción entre la señalización de ERK1/2 y *STAT*.**

Actividades propuestas y metodología. Esta sección se divide en dos partes: **A-Diseño experimental** (acorde a los objetivos específicos) y **B-Métodos**.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Obj. Esp. 1 - Determinar el efecto de reducir o aumentar la actividad de *STAT* sobre la memoria luego de entrenamiento masivo o espaciado.

Experimento 1.1 Condicionamiento aversivo en *Drosophila*.

Para el entrenamiento y testeo de la memoria se utilizará un condicionamiento aversivo, por medio de la asociación temporal de un odorante a un shock eléctrico, un procedimiento bien establecido (Tully y Quinn, 1985; Tully et al., 1994). Se utilizará un protocolo de 2 sesiones masivas o espaciadas por 30 min [ver, Métodos para detalles técnicos]. La memoria se evaluará 24 hs después del entrenamiento. El EE se estimará a través de la diferencia en la memoria inducida a las 24 hrs por entrenamiento espaciado y masivo. **Genotipos.** Para reducir la actividad de *STAT* se utilizará un RNAi-*STAT* y para aumentar la actividad la sobreexpresión de un alelo tipo silvestre *STAT*-WT, utilizando el sistema TARGET (tub-GAL80ts; 247GAL4/UAS-*STAT*-RNAi) y (tub-GAL80ts; 247-GAL4/UAS-*STAT*-WT), como en resultados preliminares (**Figura 2**). **Genotipos y condiciones control.** Como genotipos control se usarán las líneas parentales (GAL80ts; 247-GAL4), (UAS-*STAT*-RNAi) y (UAS-*STAT*-WT) que llevan, pero no expresan los transgenes de *STAT*. Como condición control se utilizarán las líneas triple transgénicas y parentales que fueron mantenidas siempre a 18 C, donde no se espera expresión de los transgenes de *STAT*, como en experimentos previos (Cattaneo et al., 2020). Además, el protocolo masivo se utilizará como una condición que nos permita distinguir efecto que puedan estar asociados a la presentación de estímulos (odorante o shock eléctrico) o incluso con algún proceso no relacionado con el aprendizaje espaciado.

Experimento 1.2 Condicionamiento aversivo en ratones.

Se entrenará un grupo de ratones adultos con un protocolo de condicionamiento por miedo al contexto (CMC) con dos shocks eléctricos de baja intensidad (0.6 mA, duración 1 s) espaciados por 1 hora a fin de generar una memoria aversiva de larga duración (Kogan y col., 1997) □ (entrenamiento espaciado) o espaciados por 1 min (entrenamiento masivo). A estos dos grupos se los tratará para modular la actividad de *STAT* de forma bilateral de la siguiente manera. 72 hs antes del entrenamiento se administrará RNAi contra *PIAS1* intra-hipocampal (área dorsal) para aumentar la actividad de *STAT3* durante la formación de la traza mnésica (Tai y col., 2011) □. Por otro lado, se analizarán los efectos de la inhibición de *STAT3* mediante la aplicación localizada en el hipocampo dorsal del inhibidor selectivo de *STAT3*, JSI-124 (Donegan y col., 2014) □ una hora antes del inicio del entrenamiento. La memoria en ambos casos se

evaluará a las 24 hs después del entrenamiento (ver métodos para detalles técnicos).

Condición control. En ambos grupos de entrenamiento se utilizará un grupo control no entrenado naive, un control de shock (que recibe la misma cantidad de shocks que los entrenados, pero no se le permite asociar el shock al contexto, ya que son colocados e inmediatamente reciben los shocks y son removidos del contexto) y el grupo que recibe el vehículo correspondiente.

Obj. Esp. 2 – Determinar la dinámica de activación de STAT como consecuencia del entrenamiento masivo y espaciado.

Experimento 2.1 Efecto del entrenamiento sobre la dinámica de activación de STAT en *Drosophila*.

En este objetivo se utilizará el protocolo de 2 sesiones masivas o espaciadas por 30 min como en el objetivo

1. La dinámica de activación de STAT se evaluará a distintos tiempos (1, 15 y 30 min) luego de cada sesión de entrenamiento y luego del fin del entrenamiento masivo o espaciado, utilizando un reportero de actividad genéticamente codificado para STAT-GFP (Bach et al., 2007). Para evaluar su localización y curso temporal aproximado se usará microscopía confocal de cerebro completo. Para cuantificar los niveles de actividad de STAT se tomarán muestras de cerebro a distintos tiempos y se revelará por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-GFP y un secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488. **Genotipos.** El reportero de actividad, STAT-GFP, está constituido por un transgén que lleva la secuencia codificante para GFP bajo 10 copias del promotor SOC, que es sensible a transcripción si STAT se encuentra activado (10XSTAT92E-DGFP) (Bach et al., 2007). **Genotipos y condiciones control.** Como genotipos control se usarán una línea que lleva UAS-GFP, que no está bajo control regulatorio de STAT y además no debería expresarse. Como condición control se utilizarán el protocolo masivo de entrenamiento, el cual tiene el mismo número de sesiones de entrenamiento, pero no muestra efecto de espaciamiento, como en experimentos previos (Cattaneo et al., 2020).

Experimento 2.2 Efecto del entrenamiento sobre la dinámica de activación de STAT en roedores.

Una vez concluida la caracterización conductual y farmacológica, procederemos a estudiar la dinámica de activación de STAT3 en los mecanismos moleculares de formación de memorias. Para ello realizaremos ensayos de western blot con anticuerpos anti-STAT3 fosforilado en homogenatos de hipocampo de animales que hayan sido entrenados en cada uno de los protocolos de CMC (masivo y espaciado). Cada grupo experimental será subdividido en dos: al día siguiente una mitad de los animales será testeada en el CMC y los restantes serán sacrificados para obtener los homogenatos. Las muestras de hipocampo dorsal se tomarán a distintos tiempos (1, 15 y 30 min) luego de cada sesión de entrenamiento, (Note que, en el protocolo masivo, luego de la primera sesión solo existirá una muestra tomada al minuto post entrenamiento). **Condición control.** Los experimentos incluirán un grupo de animales naive, otros que reciban shock pero no permanecen en el contexto (grupo control shock). Además, un grupo de animales que será entrenado con el protocolo masivo o espaciados y luego testeado en el CMC, que permitirán evaluar el nivel de memoria en el lote utilizado.

Obj. Esp. 3 – Determinar si ERK y STAT interaccionan luego del entrenamiento masivo y espaciado.

Experimento 3.1 Interacción de STAT y ERK en *Drosophila*.

Se analizará la activación de STAT como en el obj 2 después del entrenamiento masivo o espaciado en animales que expresan un RNAi-ERK en los cuerpos pedunculados. Esto permitirá determinar si la señalización de ERK1/2 interacción con la activación de STAT en este neuropilo. De forma similar, se analizará la activación de ERK1/2 en animales que expresan un RNAi-STAT. La dinámica de activación de ERK1/2 se evaluará luego de cada sesión de entrenamiento y a distintos tiempos luego del fin del entrenamiento masivo o espaciado, utilizando un reportero de actividad genéticamente codificado SPARK-ERK (Zhang et al., 2018). Este reportero produce una fuerte señal de GFP que sigue la dinámica de activación detectable por western blot con anticuerpos anti-pERK.

Genotipos: animales transgénicos que expresan el reportero de activación de STAT junto con el RNAi-ERK bajo control de GAL80ts; 247-GAL4 y animales transgénicos que expresan el reportero SPARK-ERK junto con RNAi-STAT bajo control de GAL80ts; 247-GAL4 y líneas parentales control, como en el obj 1.

Experimento 3.2 Interacción de STAT y ERK en roedores.

De forma similar se analizará en muestras de hipocampo dorsal de ratón, el nivel de actividad de una vía (STAT o ERK1/2) cuando se inhibe la actividad de la otra vía de señalización por medio de infusiones preentrenamiento de inhibidores de ERK y STAT3, MK-801 o JSI-124, respectivamente. El nivel de actividad de STAT o ERK1/2 se determinará por western blot como en el obj. Esp. 2.

Condición control. Los experimentos incluirán grupos control como en el obj 2.

B-MÉTODOS

Condicionamiento aversivo en *Drosophila*. Las moscas serán entrenadas y testeadas en un condicionamiento olfatorio estándar (Tully y Quinn, 1985), utilizando un protocolo de 2 sesiones que facilita el análisis de la señalización molecular durante el entrenamiento (Cattaneo et al., 2020). Brevemente, grupos de ~100 animales 3 a 4 días después de eclosión serán entrenadas y testeadas en oscuridad. Los grupos son expuestos consecutivamente al odorante #1 (estímulo condicionado, EC+) (1min) temporalmente asociado con el shock eléctrico (estímulo incondicionado, EI) y luego al odorante #2 (EC-) (1min) sin shock eléctrico. Este procedimiento constituye una sesión de entrenamiento. A fin de lograr un diseño balanceado, paralelamente un segundo grupo de ~100 animales es entrenado con el odorante #1 (como EC-) y el #2 (como EC+). Ambos grupos son utilizados para estimar un único índice de respuesta condicionada (o PI=performance Index) que se computa como $n=1$. Una corriente de aire (750ml/min) es burbujeada en aceite mineral puro, o conteniendo Octanol-3 (OCT) [1.5×10^{-3}], o methylcyclohexanol (MCH) [1.0×10^{-3}] (Fluka) como EC. Para testear la memoria, la respuesta de escape al odorante es testada durante 2 min en un dispositivo en forma de "T", donde los odorantes (EC+ y EC-) son liberados simultáneamente en los distintos brazos de la "T". Al finalizar el periodo de testeo los animales quedan atrapados en el brazo EC+ o EC-, son contados y el número de animales en los brazos se utiliza para calcular el índice de respuesta: La memoria se analizará a las 24 h después de 2 sesiones de entrenamiento, con 30 min de intervalo entre sesiones (entrenamiento espaciado) o sin intervalos entre sesiones (entrenamiento masivo).

Condicionamiento aversivo en roedores. Para los experimentos se utilizarán ratones C57BL/6 machos de entre 8 y 10 semanas de edad, adquiridos del bioterio de la Academia Nacional de Medicina. Serán alojados en el bioterio de ratones del IFIBIO hasta la realización de los entrenamientos. En la etapa inicial del proyecto se hará un experimento de calibración del shock. Una vez concluida, se realizarán los experimentos de entrenamientos de CMC masivo y espaciado con infusiones intrahipocampales de las drogas mencionadas previamente. Para ello, se realizará una cirugía con anestesia total (Isoflurano) a fin de implantar y fijar cánulas guía que permitirán la infusión de localizada de los fármacos utilizando una microjeringa Hamilton. Se dejará recuperar los animales durante una semana y posteriormente serán entrenados y testeados. El entrenamiento de CMC espaciado consiste en la aplicación de dos shocks eléctricos de 0.6 mA, duración 1 s separados por 1 hora, mientras que para el entrenamiento del CMC masivo, se aplican los shocks de la misma intensidad y duración, pero con una separación de 1 minuto entre ellos. Al día siguiente se testea la memoria de cada uno de los animales, reinsertandolos individualmente en la caja de entrenamiento y midiendo el porcentaje de tiempo que permanecen inmóviles (% de freezing). Un porcentaje de freezing mayor a 30 segundos se considera evidencia de la formación de la memoria.

Análisis de la activación de STAT y ERK con reporteros genéticamente codificados. Para analizar los niveles de activación de STAT o ERK de los objetivos 2 y 3, se utilizarán reporteros previamente generados y caracterizados, STAT-GFP y SPARK-ERK, respectivamente (Bach et al 2007; Zhang et al., 2018). Dado que se trata de reporteros basados en GFP y que el entrenamiento incluye a 100 moscas por vez, se analizará la expresión de GFP en cerebros fijados *a posteriori* del entrenamiento. Se realizará un protocolo de inmunohistoquímica estándar contra GFP (anestesia por frío x 2 minutos, fijación de cabezas en PFA 4% en frío por 30 min, se diseccionan los cerebros y luego lavados 5 x PBS-TX 0.1% 15 minutos; bloqueo en NGT 7% 2 horas, incubación en anticuerpo primario anti-GFP (mAb G6539, Sigma) toda la noche a 4°C, lavados 5 x PBS-TX 0.1% 15 minutos cada uno, incubación en anticuerpo secundario asociado a Alexa488, lavados 5 x PBS-TX 0.1% 15 minutos cada uno, se montan los cerebros con medio de

montaje y se sella con esmalte para la posterior adquisición de imágenes con microscopía confocal, como en publicaciones previas (Fernandez-Chiappe et al 2020; Frenkel et al., 2017).

Western Blot. Los niveles de activación de ERK1\2 y STAT serán estimados por medio de western blot y normalizando los niveles de fosfoproteína a proteína total, como en Pagani et al., (2009). Brevemente, para cada condición experimental, incluyendo genotipos y tiempos post entrenamiento, 30 cabezas serán homogenizadas en búfer de carga. Las proteínas serán separadas en un gel 10% Tricina-glicina, y transferidas a nitrocelulosa (Invitrogen). Las membranas serán incubadas con anticuerpo primario anti-ERK1\2 (1/1000) o anti-pSTAT (1/1000). Su detección se hará por medio de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP (1/2000) seguido de detección con ECL-plus (Amersham). Luego las membranas serán incubadas con anticuerpos anti-ERK1\2 o anti-STAT y reveladas usando un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1/2000) seguido de detección con ECL.

Para realizar los westerns blot en homogenatos total de hipocampo dorsal de ratones, los animales serán entrenados en ambos protocolos de CMC y a los distintos tiempos después del entrenamiento, se sacrificará la mitad. Se disecarán los hipocampos y serán procesados de forma individual, para ser almacenados a -20° hasta que se realicen los westerns blots. La otra mitad será evaluada al día siguiente en el CMC como control del aprendizaje. Los westerns blot se harán esencialmente como se describe arriba, pero utilizando anticuerpos específicos contra pSTAT3 y STAT3 total.

Análisis Estadístico. Comparaciones múltiples de medias obtenidas de experimentos de comportamiento, señales fluorescentes o western blot se harán por medio de ANOVA de uno o dos factores acorde al diseño experimental, seguido de pares de comparaciones planeadas. El error alfa, establecido en 0.05, será corregido con el método de Bonferroni. Los grupos se considerarán diferentes cuando $p < 0.05$.

• **Resultados y metas**

El proyecto está organizado a fin de que cada objetivo específico y experimentos en cada modelo animal puedan llevarse a cabo independientemente de los otros objetivos. Sin embargo, será de gran valor conocer si la manipulación de STAT en roedores posee algún efecto sobre la memoria (Obj. Esp. 1) antes de analizar la dinámica de activación de STAT (Obj. Esp. 2) o su interacción con ERK1/2 (Obj. Esp. 3).

4.5 Resultados esperados (max. 200 palabras)

En principio se espera que la supresión de STAT reduzca la LTM en roedores, mientras que la exaltación de esta promueva un mayor nivel de memoria, de forma similar a lo observado en *Drosophila* (Ver, **4.3. d Resultados preliminares**). Dicha exaltación de la memoria en vertebrados podría tener un valor terapéutico potencial, a través de la exaltación de STAT o la inhibición específica de PIAS (*Proteínas inhibidoras de STAT activado*).

En relación con la dinámica de actividad de STAT durante y luego del entrenamiento, se espera activación con entrenamiento espaciado, pero no masivo. Además, se pueden esperar 3 propiedades en base a la evidencia previa. Primero, STAT no estaría regulada negativamente con cada sesión de entrenamiento, como es el caso de ERK1/2, ya que STAT no exalta la memoria luego del entrenamiento masivos (Ver, **4.3. a-c introducción**). Segundo, en base a los estudios de interacción génica en el desarrollo del ala de *Drosophila*, es posible que STAT regule negativamente los niveles de actividad de ERK1/2. Sin embargo, en base a los efectos del inhibidor de STAT, PIAS1, es posible

esperar que ERK promueva la inhibición de STAT, mientras que STAT promueva o no un efecto similar sobre ERK1/2.

4.6 Difusión de los resultados (max. 200 palabras)

Los resultados generados anualmente se presentarán en reuniones científicas nacionales y/o internacionales si nuestras posibilidades financieras lo permiten. Alcanzado un grado de avance razonable en nuestros estudios se espera poder publicar nuestros resultados en revistas científicas de buen impacto.

4.7 Protección de los resultados (max. 200 palabras)

En esta instancia no se espera generar resultados que deban protegerse por medio de registro de propiedad intelectual.

4.8 Actividades de transferencia (max. 500 palabras)

En esta etapa del proyecto no se planea realizar transferencia tecnológica. Sin embargo, si las manipulaciones de STAT en vertebrados promueven una mayor memoria, sería razonable discutir con el área de vinculación tecnológica de CONICET y evaluar la factibilidad de implementar algún instrumento de transferencia donde se investigue específicamente el valor de la exaltación de STAT como tratamiento anti -amnésico.

5-CONFORMACION DEL GRUPO DE INVESTIGACION

5.1 Justificación de la conformación del grupo (max. 200 palabras)

El Dr Pagani investigó mecanismos moleculares, neuronales, sinápticos y metabólicos en modelos de Rasopatías (Pagani et al., 2009; San Martin et al., 2017; Cattaneo et al., 2020; Ruzzi et al., 2020). El actual proyecto constituye la expansión lógica de dichas investigaciones, donde la contribución de la Dra Frenkel y la Dra Martinez será esencial. **La Dra Frenkel** ha investigado mecanismos de aprendizaje y memoria y tiene experiencia en la adquisición de imágenes por microscopía confocal (Frenkel et al., 2017). También utilizó un sensor de voltaje genéticamente codificado conocido como arclight (Frenkel et al., en preparación; informe CIC 2019), por lo que tiene experiencia en el análisis de señales fluorescentes dinámicas en el cerebro de *Drosophila*. Su contribución, será determinar la dinámica de activación de STAT y ERK por medio de los reporteros genéticamente codificados (Obj esp. 2 y 3). **La Dra Martinez** posee una extensa experiencia en aprendizaje y memoria en roedores en paradigmas de condicionamiento aversivo y memoria contextual (Ballarini y col., 2009; Moncada y col., 2011; Martínez y col., 2012, 2014; Villar y col., 2016). Su contribución consiste en estudiar el rol de STAT y ERK en la memoria en vertebrados (Obj esp. 1-3).

5.2 Interacción con otros grupos (max. 200 palabras) Para este proyecto contaremos con la colaboración de la **Dra De la Fuente** que posee amplia experiencia en el uso de

roedores en ensayos de aprendizaje y memoria. Nuestro grupo posee interacción casi permanente con la **Dra Rela** de facultad de medicina, UBA y el **Dr Lew** de facultad de ingeniería, UBA, en distintos proyectos y contribuyen con experimentos electrofisiológicos, entre otros, discusión y tareas de reparación y/o modificación a nuestros equipamientos electrónicos para el entrenamiento de los animales. Estas colaboraciones se corroboran en la coautoría de varios artículos (San Martin et al., 2017; Ruzzi et al., 2020; Cattaneo et al., 2020). Nuestros experimentos se llevarán a cabo en facultad de medicina (IFIBIO-UBA-CONICET) y en la facultad de Cs Exctas (IFIBYNE-UBA-CONICET). En ambas unidades ejecutoras los integrantes del grupo interaccionan regularmente en el trabajo diario y en discusiones de presentación de resultados en seminarios o eventos internos con otros investigadores de áreas relacionadas.

5.3 Antecedentes de cooperación entre los participantes del grupo (max. 400 palabras) Los integrantes del grupo no poseen antecedentes de colaboración en proyectos de investigación. Sin embargo, los integrantes del grupo tienen interacción profesional y discusión sobre temas del área de aprendizaje y memoria desde hace 15 años aproximadamente. Durante todos estos años hemos mantenido una buena relación profesional, de respeto, buen entendimiento y discusión constructiva, lo que nos lleva a pensar que podemos interactuar productivamente en el marco de esta colaboración.

VIABILIDAD Y FACTIBILIDAD TÉCNICA

La factibilidad del proyecto se encuentra en buena medida garantizada gracias a que los experimentos que se proponen son técnicamente similares a otros previamente desarrollados. Como indican nuestras publicaciones, disponemos de experiencia con los experimentos de comportamiento en *Drosophila* y roedores, western blot y microscopía confocal. Contamos con el equipamiento necesario para experimentos de comportamiento (cajas de comportamiento, incubadoras, lupas y microscopio de fluorescencia y cuarto de comportamiento), experimentos de Western blot (fuente de poder y cubas) y microscopio confocal (FLUOWVIEW 1000) en ambas instituciones involucradas. Además, contamos con una variedad de genotipos de *Drosophila* para manipular STAT y ERK y tres variantes del reportero de STAT. Contamos con materiales para experimentos de western blot y anticuerpos primarios y secundarios para detección de ERK. Lo que nos permitiría comenzar a trabajar en el proyecto de forma casi inmediata. Sin embargo, la ejecución de este proyecto será posible solo si obtenemos financiación específica.

Actualmente nuestros laboratorios funcionan por medio de distintos subsidios. Los subsidios de proyectos asociados al titular son tres proyectos en colaboración, donde otros investigadores son los responsables: -2018-2020 UBACYT: 20020170100192BA (IR: Lew Sergio). -2018-2021 ANPCyT: PICT-2017-3208 (IR: Lew Sergio). -2020-2023 ANPCyT: PICT-2018-1518 (IR: Rela Lorena) y se espera obtener financiación adicional para los años subsiguientes. Los subsidios de proyectos en asociados a la Dra Martinez son el ANPCyT PICT-2017-2465 en el cual

es IR, UBACyT 2020 del que es colaboradora y otros subsidios ANPCyT que fueron otorgados al Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales del cual participa como colaboradora. Los subsidios de proyectos asociados a la Dra Frenkel son, COVID 19 – 679; PIP 112 20301 00378 CO, en ninguno de los cuales es IR. Y otro en el que participa como colaboradora PICT-2018-00995.

Nuestro laboratorio cuenta con personal técnico de CONICET que nos asiste para reparar o modificar equipamiento para el análisis de la memoria en *Drosophila* y roedores (CPA:

Esteban Valverde), y personal que prepara el material de cultivo de moscas y realiza el mantenimiento de ~300 genotipos (CPA: Daniela Herrmann), así como bioteristas para el mantenimiento de ratones (CPAs: Jesica Unger y Verónica Risso). La Facultad de Ciencias Exactas, UBA y la Facultad de Medicina, UBA, dan un número de servicios, incluyendo la recolección de residuos patogénicos, limpieza, autoclavado, servicio de informática, acceso a internet, y juntamente con el ministerio de ciencia, da acceso a revistas científicas.

7 -ASPECTOS ÉTICOS

No aplica. El presente proyecto no involucra el uso de sujetos humanos en los experimentos.

SEGURIDAD LABORAL AMBIENTAL Y BIOSEGURIDAD RELACIONADOS CON EL PROYECTO

El presente proyecto no involucra experimentos en los que se utilice materiales o reactivos de alto riesgo o infecciosos que impliquen un riesgo para los investigadores o el ambiente o riesgo que requieran medidas de alta seguridad o bioseguridad.

Para el manejo de los animales de laboratorio, nuestra institución posee protocolos y reglamentación específica que debe ser aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación (CICUAL).

AUTORIZACIONES CORRESPONDIENTES

Para el trabajo con *Drosophila* en condiciones de laboratorio no se requieren permisos.

Para los experimentos con ratones se ha presentado el proyecto al CICUAL de la Facultad de Medicina para su autorización. El certificado se adjunta en la presentación del proyecto.

10 -RECURSOS FINANCIEROS (max. 2 carillas)

Los recursos solicitados se resumen en la siguiente tabla y se detallan más abajo.

Recursos financieros		GUSTARDAR		SAMIR	
	RECURSO	2021	2022	2023	TOTAL
GASTOS DE CAPITAL (8)	EQUIPAMIENTO (1)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
	INSTRUMENTOS (2)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
	BIBLIOTECA (3)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
	TOTAL	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
GASTOS CORRIENTES (9) UNIFORMES (10)	BIENES DE CONSUMO	\$ 340.000,00	\$ 420.000,00	\$ 340.000,00	\$ 1.100.000,00
	VIAJES Y VIÁTICOS (4)	\$ 20.000,00	\$ 20.000,00	\$ 20.000,00	\$ 60.000,00
	DIFUSIÓN Y/O PROTECCIÓN DE RESULTADOS (5)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 160.000,00	\$ 160.000,00
	SERVICIOS DE LIMPIEZA (6)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
	OTROS GASTOS (7)	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
	TOTAL	\$ 360.000,00	\$ 440.000,00	\$ 520.000,00	\$ 1.320.000,00

Año 1: Se solicitan \$ 360.000 para la adquisición de animales e insumos básicos defuncionamiento del laboratorio. Los fondos serán usados para la adquisición de animales (\$ 14000/año), insumos para su mantenimiento (25.000/año), anestésico (5000/año), insumos y descartable (\$ 5000/año), jeringas Hamilton (\$ 10.000/año), carga de CO2 (\$ 12.000/año), sales para preparación debufferes y fijador (\$ 40.000/año), inhibidores farmacológicos, anti-sense y un anticuerpo primario antiSTAT y un anti-STAT total (\$ 220.000 en año 1 y 2). Se utilizarán para viajes y gastos de inscripción al evento anual de la sociedad de investigaciones en neurociencia \$ 20.000/año.

Año 2: Se solicitan \$ 440.000 para la adquisición de animales e insumos básicos de funcionamiento del laboratorio. Los fondos serán usados para la adquisición de animales (\$ 14000/año), insumos para su mantenimiento (25.000/año), anestésico (5000/año), insumos y descartable (\$5000/año), jeringas Hamilton (\$ 10.000/año), carga de CO2 (\$ 12.000/año), sales para preparación debufferes y fijador (\$ 40.000/año), inhibidores farmacológicos, anti-sense y un anticuerpo primario antiSTAT, un anti-STAT total, anticuerpo anti-GFP y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 (\$ 300.000/ año). Se utilizarán para viajes y gastos de inscripción al evento anual de lasociedad de investigaciones en neurociencia \$ 20.000/año.

Año 3. Se solicitan \$ 520.000 para la adquisición de animales e insumos básicos defuncionamiento del laboratorio: Los fondos serán usados para la adquisición de animales (\$ 14000/año), insumos para su mantenimiento (15.000/año), anestésico (5000/año), insumos y descartable (\$5000/año), inhibidores farmacológicos, anti-sense y un anticuerpo primario anti-pSTAT y un anti-STAT total (\$ 220.000 en año 1 y 2). Se utilizarán para viajes y gastos de inscripción al evento anual de lasociedad de investigaciones en neurociencia \$ 20.000/año.El tercer año no será necesario la adquisición de algunos de los reactivos de mayor costo, incluyendoinhibidores farmacológicos y anticuerpos, y se utilizarán \$160.000 para publicación de resultados.

DEDICACION AL PROYECTO

Todos los miembros del grupo tendrán una dedicación al proyecto del 50 % o superior, dependiendo de la posibilidad de obtener otras fuentes de financiación las cuales requerirán una dedicación similar. **-El Dr Pagani** con la participación de estudiantes

llevará a cabo todos los experimentos de comportamiento con *Drosophila*, para el posterior análisis de la memoria (en su laboratorio) y análisis de la actividad de STAT y ERK (que se llevará a cabo en el laboratorio de la Dra Frenkel) (Obj 1 -3).

Además, llevará a cabo los experimentos de Western blot para detectar la actividad de STAT y ERK en muestras de hipocampo obtenidas por la Dra Martinez (Obj 2 -3)

-La Dra Martinez con la participación de estudiantes de licenciatura o de doctorado llevará a cabo todos los experimentos de comportamiento en ratones (Obj 1 -3). **-La Dra Frenkel** con la participación de estudiantes llevará a cabo todos los experimentos de análisis de actividad de STAT y ERK en *Drosophila*, a través de microscopía confocal (Obj 2 -3).

REFERENCIAS

- Aoki, Yoko et al. 2008. "The RAS/MAPK Syndromes: Novel Roles of the RAS Pathway in Human Genetic Disorders." *Human Mutation* 29(8).
- Appleton-Knapp, Sara L., Robert A. Bjork, and Thomas D. Wickens. 2005. "Examining the Spacing Effect in Advertising: Encoding Variability, Retrieval Processes, and Their Interaction." *Journal of Consumer Research* 32(2).
- Bach, Erika A. et al. 2007. "GFP Reporters Detect the Activation of the Drosophila JAK/STAT Pathway in Vivo." *Gene Expression Patterns* 7(3).
- Ballarini, Fabricio et al. 2009. "Behavioral Tagging Is a General Mechanism of Long-Term Memory Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(34).
- Beach, Krista M., Jianbo Wang, and Deborah C. Otteson. 2017. "Regulation of Stem Cell Properties of Müller Glia by JAK/STAT and MAPK Signaling in the Mammalian Retina." *Stem Cells International* 2017.
- Beck, C. D.O., Bradley Schroeder, and Ronald L. Davis. 2000. "Learning Performance of Normal and Mutant Drosophila after Repeated Conditioning Trials with Discrete Stimuli." *Journal of Neuroscience* 20(8).
- Bjork, Robert A., and Ted W. Allen. 1970. "The Spacing Effect: Consolidation or Differential Encoding?" *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* 9(5).
- Blaskovich, M. A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., & Sefti, S. M. (2003). Discovery of JSI124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer research*, 63(6), 1270-1279.
- Bolduc, Francois, and Tim Tully. 2009. "Molecular Basis of Learning and Memory." *Neurodevelopmental disabilities: Clinical and scientific foundations*.
- Carew, Thomas J., Harold M. Pinsky, and Eric R. Kandel. 1972. "Long-Term Habituation of a Defensive Withdrawal Reflex in Aplysia." *Science* 175(4020).
- Cattaneo, Verónica et al. 2020. "Repeating or Spacing Learning Sessions Are Strategies for Memory Improvement with Shared Molecular and Neuronal Components." *Neurobiology of Learning and Memory* 172.
- Cepeda, Nicholas J. et al. 2006. "Distributed Practice in Verbal Recall Tasks: A Review and Quantitative Synthesis." *Psychological Bulletin* 132(3).
- Chiba, T., Yamada, M., Sasabe, J., Terashita, K., Shimoda, M., Matsuoka, M., & Aiso, S. (2009). Amyloid- β causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Molecular psychiatry*, 14(2), 206-222.
- Copf, Tijana et al. 2011. "Cytokine Signaling through the JAK/STAT Pathway Is Required for Long-Term Memory in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America 108(19).

- Donegan, Jennifer J., Milena Girotti, Marc S. Weinberg, and David A. Morilak. 2014. "A Novel Role for Brain Interleukin-6: Facilitation of Cognitive Flexibility in Rat Orbitofrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 34(3).
- Frenkel, L. et al. 2002. "Angiotensin II and the Transcription Factor Rel/NF-KB Link Environmental Water Shortage with Memory Improvement." *Neuroscience* 115(4).
- . 2012. "Food Odor, Visual Danger Stimulus, and Retrieval of an Aversive Memory Trigger Heat Shock Protein HSP70 Expression in the Olfactory Lobe of the Crab Chasmagnathus Granulatus." *Neuroscience* 201.
- Frenkel, Lia et al. 2008. "Both Heat Shock and Water Deprivation Trigger Hsp70 Expression in the Olfactory Lobe of the Crab Chasmagnathus Granulatus." *Neuroscience Letters* 443(3).
- Frenkel, Lia, Beatriz Dimant, et al. 2010. "Neuroanatomical Distribution of Angiotensin-II-like Neuropeptide within the Central Nervous System of the Crab Chasmagnathus; Physiological Changes Triggered by Water Deprivation." *Cell and Tissue Research* 341(1).
- Frenkel, Lia et al. 2017. "Organization of Circadian Behavior Relies on Glycinergic Transmission." *Cell Reports* 19(1).
- Frenkel, Lia, Héctor Maldonado, and Alejandro Delorenzi. 2005a. "Memory Strengthening by a Real-Life Episode during Reconsolidation: An Outcome of Water Deprivation via Brain Angiotensin II." *European Journal of Neuroscience* 22(7).
- . 2005b. "Retrieval Improvement Is Induced by Water Shortage through Angiotensin II." *Neurobiology of Learning and Memory* 83(2).
- Frenkel, Lia, Luis Daniel Suárez, Héctor Maldonado, and Alejandro Delorenzi. 2010. "Angiotensin Modulates Long-Term Memory Expression but Not Long-Term Memory Storage in the Crab Chasmagnathus." *Neurobiology of Learning and Memory* 94(4).
- Furigo, Isadora C. et al. 2018. "Brain STAT5 Signaling Modulates Learning and Memory Formation." *Brain Structure and Function* 223(5).
- Gelb, Bruce D., and Marco Tartaglia. 2006. "Noonan Syndrome and Related Disorders: Dysregulated RAS-Mitogen Activated Protein Kinase Signal Transduction." *Human Molecular Genetics* 15(SUPPL. 2).
- Gerber, Bertram, Daniel Wüstenberg, Anne Schütz, and Randolph Menzel. 1998. "Temporal Determinants of Olfactory Long-Term Retention in Honeybee Classical Conditioning: Nonmonotonous Effects of the Training Trial Interval." *Neurobiology of Learning and Memory* 69(1).
- Gorostiza, E. Axel et al. 2014. "Circadian Pacemaker Neurons Change Synaptic Contacts across the Day." *Current Biology* 24(18).
- Guo, Hul Fu et al. 2000. "A Neurofibromatosis-1-Regulated Pathway Is Required for Learning in Drosophila." *Nature* 403(6772).
- Hermite, Gabriela, María Eugenia Pedreira, Daniel Tomsic, and Héctor Maldonado. 1999. "Context Shift and Protein Synthesis Inhibition Disrupt Long-Term Habituation after Spaced, but Not Massed, Training in the Crab Chasmagnathus." *Neurobiology of Learning and Memory* 71(1).
- Kandel, E. R. 2001. "The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue between Genes and Synapses." *Science* 294(5544).
- Kogan, Jeffrey H. et al. 1997. "Spaced Training Induces Normal Long-Term Memory in CREB Mutant Mice." *Current Biology* 7(1).
- Kopec, Ashley M., Gary T. Philips, and Thomas J. Carew. "Distinct growth factor families are recruited in unique spatiotemporal domains during long-term memory formation in Aplysia californica." *Neuron* 86.5 (2015): 1228-1239.
- Krab, Lianne C., Susanna M.I. Goorden, and Ype Elgersma. 2008. "Oncogenes on My Mind: ERK and MTOR Signaling in Cognitive Diseases." *Trends in Genetics* 24(10).
- Lee, S. M.G., and J. C. Cooper. 2005. "Noonan Syndrome with Giant Cell Lesions." *International Journal of Paediatric Dentistry* 15(2).
- Liu, S. Y., Y. L. Ma, and E. H.Y. Lee. 2013. "NMDA Receptor Signaling Mediates the Expression of Protein Inhibitor of Activated STAT1 (PIAS1) in Rat Hippocampus." *Neuropharmacology*

- Martin, Alvaro San, Lorena Rela, Bruce Gelb, and Mario Rafael Pagani. 2017. "The Spacing Effect for Structural Synaptic Plasticity Provides Specificity and Precision in Plastic Changes." *Journal of Neuroscience* 37(19).
- Martínez, María Cecilia et al. 2012. "Memory Traces Compete under Regimes of Limited Arc Protein Synthesis: Implications for Memory Interference." *Neurobiology of Learning and Memory* 98(2).
- Martínez, María Cecilia, María Eugenia Villar, Fabricio Ballarini, and Haydée Viola. 2014. "Retroactive Interference of Object-in-Context Long-Term Memory: Role of Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex." *Hippocampus* 24(12).
- McGuire, Sean E., Gregg Roman, and Ronald L. Davis. 2004. "Gene Expression Systems in *Drosophila*: A Synthesis of Time and Space." *Trends in Genetics* 20(8).
- Medina, Jorge H., and Haydee Viola. 2018. "ERK1/2: A Key Cellular Component for the Formation, Retrieval, Reconsolidation and Persistence of Memory." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.
- Moncada, Diego et al. 2011. "Identification of Transmitter Systems and Learning Tag Molecules Involved in Behavioral Tagging during Memory Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(31).
- Nora, James J. et al. 1974. "The Ullrich-Noonan Syndrome (Turner Phenotype)." *American Journal of Diseases of Children* 127(1).
- Nyström, A. M. et al. 2008. "Noonan and Cardio-Facio-Cutaneous Syndromes: Two Clinically and Genetically Overlapping Disorders." *Journal of Medical Genetics* 45(8).
- Oishi, Kimihiko et al. 2006. "Transgenic *Drosophila* Models of Noonan Syndrome Causing PTPN11 Gain-of-Function Mutations." *Human Molecular Genetics* 15(4).
- Pagani, Mario R., Kimihiko Oishi, Bruce D. Gelb, and Yi Zhong. 2009. "The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction." *Cell* 139(1).
- Philips, Gary T., Ekaterina I. Tzvetkova, and Thomas J. Carew. 2007. "Transient Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Confined to a Narrow Temporal Window Required for the Induction of Two-Trial Long-Term Memory in *Aplysia*." *Journal of Neuroscience* 27(50).
- Philips, Gary T., Xiaojing Ye, Ashley M. Kopec, and Thomas J. Carew. 2013. "Mapk Establishes a Molecular Context That Defines Effective Training Patterns for Long-Term Memory Formation." *Journal of Neuroscience* 33(17).
- Pierpont, E. I. et al. 2009. "Genotype Differences in Cognitive Functioning in Noonan Syndrome." *Genes, Brain and Behavior* 8(3).
- Rauen, Katherine A. 2013. "The RASopathies." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 14.
- Ruzzi, Leonardo R. et al. 2020. "The Phosphatase CSW Controls Life Span by Insulin Signaling and Metabolism Throughout Adult Life in *Drosophila*." *Frontiers in Genetics* 11.
- San Martín, Alvaro, and Mario Rafael Pagani. 2014. "Understanding Intellectual Disability through RASopathies." *Journal of Physiology Paris* 108(4–6).
- Sutton, Michael A., Jasmine Ide, Sarah E. Masters, and Thomas J. Carew. 2002. "Interaction between Amount and Pattern of Training in the Induction of Intermediate-and Long-Term Memory for Sensitization in *Aplysia*." *Learning and Memory* 9(1).
- Tai, Derek J.C. et al. 2011. "Novel Role and Mechanism of Protein Inhibitor of Activated STAT1 in Spatial Learning." *EMBO Journal* 30(1).
- Tkach, Mercedes et al. 2013. "P42/P44 MAPK-Mediated Stat3Ser727 Phosphorylation Is Required for Progesterone-Induced Full Activation of Stat3 and Breast Cancer Growth." *Endocrine-Related Cancer* 20(2).
- Tully, T., T. Preat, S. C. Boynton, and M. Del Vecchio. 1994. "Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*." *Cell* 79(1).
- Tully, Tim, and William G. Quinn. 1985. "Classical Conditioning and Retention in Normal and Mutant *Drosophila Melanogaster*." *Journal of Comparative Physiology A* 157(2).
- Villar, María Eugenia et al. 2017. "Memory Consolidation and Expression of Object Recognition Are Susceptible to Retroactive

Interference." *Neurobiology of Learning and Memory* 138. Zhang, Qiang et al. 2018. "Visualizing Dynamics of Cell Signaling In Vivo with a Phase Separation-Based Kinase Reporter." *Molecular Cell* 69(2).

CARGA HORARIA: 12 hs semanales