



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Localización de las isoformas 2 y 3 del receptor de ryanodina en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata”

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico(a)

Ignacio Antonio Vega Vásquez

Directoras

Dra. Andrea Paula-Lima

Profesora Asociada

Dpto. de Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Dra. Cecilia Hidalgo

Profesora Titular

Dpto. de Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Patrocinante

Dr. Alfonso Paredes

Profesor Asociado

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Abril, 2023

I. Financiamiento

Proyecto BMBF180051 del Ministerio Federal de Educación e Investigación (BMBF),
Alemania

II. Productividad

1. Durante la realización de los cursos que precedieron a esta Memoria de Título, y como importante antecedente para este proyecto, desarrollamos y publicamos el siguiente trabajo:

Lobos, P., Córdova, A., **Vega-Vásquez, I.**, Ramírez, O.A., Adasme, T., Toledo, J., Cerda, M., Härtel, S., Paula-Lima, A. and Hidalgo, C., 2021. RyR-mediated Ca²⁺ release elicited by neuronal activity induces nuclear Ca²⁺ signals, CREB phosphorylation, and Npas4/RyR2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(33), p.e2102265118.

2. Gran parte del trabajo desarrollado en esta Memoria de Título fue publicado en:

Vega-Vásquez, I., Lobos, P., Toledo, J., Adasme, T., Paula-Lima, A. and Hidalgo, C., 2022. Hippocampal dendritic spines express the RyR3 but not the RyR2 ryanodine receptor isoform. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 633, pp.96-103.

III. Agradecimientos y dedicatorias

A mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo incondicional a lo largo de mis años universitarios, y a mi hermana, por aguantarme esos mismos años bajo un mismo techo. A mis compañeros felinos que encontré en el camino y estuvieron a mi lado todo el tiempo.

A mis directoras de tesis, Andrea Paula-Lima y Cecilia Hidalgo, que me recibieron desde mi primer año de universidad y me formaron como científico todos estos años. A todos los integrantes de sus laboratorios que me ayudaron en este camino, en especial a Pedro, Silvia, Jami, Luis... A REDECA y todos sus roomies, en especial a Jorge por sus consejos y oportunidades en el mundo de la microscopía.

A todos mis amigos, aquellos de la carrera, del laboratorio, de REDECA, de la universidad y fuera de ella, gracias por brindarme ánimo y apoyo para llegar hasta donde estoy ahora. En especial, con quienes compartí incontables noches en Discord durante la pandemia (mientras luchábamos juntos en la creación de proyectos, la tesis, o contra la gravedad en Fall Guys), y quienes finalmente me acompañaron en Coyhaique 2023.

IV. Índice de contenido

1. Introducción.....	10
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	16
4. Materiales y métodos.....	17
5. Resultados.....	21
2. Discusión.....	30
3. Conclusiones.....	33
4. Referencias.....	35

V. Índice de figuras

Fig. 1. El hipocampo de rata no contiene la isoforma RyR1	12
Fig. 2. Esquema del retículo endoplásmico neuronal, y propagación de las señales de Ca ²⁺ en neuronas.....	14
Fig. 3. Esquema detallado que muestra la participación de los canales RyR en la propagación de las señales de Ca ²⁺ en neuronas.....	15
Fig. 4. Esquema que fundamenta la técnica de Microscopía de Expansión (ExM).....	19
Fig. 5. La isoforma RyR2 está ausente en espinas dendríticas de hipocampo de rata.....	22
Fig. 6. Lipotransfección de RFP permite visualizar las espinas dendríticas.....	24
Fig. 7. La isoforma RyR3 se enriquece en espinas dendríticas putativas.....	26
Fig. 8. La lipotransfección de RFP confirma que las espinas putativas RyR3-positivas forman parte de las neuronas.	27
Fig. 9. La isoforma RyR3 pero no la isoforma RyR2 está presente en las espinas dendríticas de neuronas hipocámpales de rata en cultivo primario	28

VI. Abreviaturas

Ca²⁺, ión calcio libre; **[Ca²⁺]**, concentración de Ca²⁺; **NMDA-R**, canales receptores de NMDA (siglas en inglés); **VGCCs**, canales de Ca²⁺ dependiente de voltaje (siglas en inglés); **RE**, retículo endoplásmico; **RyR**, Receptor de Ryanodina; **IP₃R**, Receptor de 1,4,5-Inositol trisfosfato; **CICR**, Liberación de Ca²⁺-Inducida por Ca²⁺ (siglas en inglés); **KO**, *knockout* (siglas en inglés); **EA**, Enfermedad de Alzheimer; **sAHP**, corrientes tardías de hiperpolarización lenta (siglas en inglés); **ExM**, Microscopía de Expansión (siglas en inglés); **MAP2**, proteína asociada a microtúbulo 2 (siglas en inglés).

Localización de las isoformas 2 y 3 del receptor de ryanodina en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata

VII. Resumen

El hipocampo es una región del cerebro implicada en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria; ambos procesos requieren señales neuronales de Ca^{2+} generadas por la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Mediante la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , el receptor de ryanodina (RyR), un canal de Ca^{2+} residente en el RE, amplifica y propaga las señales de entrada de Ca^{2+} , lo que conduce a la activación de las vías de señalización citoplasmáticas y nucleares dependientes de Ca^{2+} necesarias para los procesos de plasticidad sináptica y memoria. Trabajos anteriores han demostrado que el hipocampo de roedores expresa principalmente la isoforma RyR2, con niveles de expresión más bajos de la isoforma RyR3 y niveles casi indetectables de la isoforma RyR1; tanto la isoforma RyR2 como la RyR3 tienen papeles centrales en la plasticidad sináptica y en los procesos de memoria dependientes del hipocampo. Aquí describimos que las espinas dendríticas de las neuronas primarias del hipocampo expresan la isoforma RyR3 del canal, que también se expresa en el cuerpo neuronal y en las neuritas. Por el contrario, la isoforma RyR2, que se expresa ampliamente en el cuerpo neuronal y en las neuritas de las neuronas primarias del hipocampo, está ausente de las espinas dendríticas. Proponemos que esta distribución asimétrica es relevante para la función neuronal del hipocampo. Sugerimos que la isoforma RyR3 amplifica las señales de entrada de Ca^{2+} generadas por la actividad neuronal en las espinas dendríticas postsinápticas, desde donde se propagan a la dendrita y activan principalmente la liberación de Ca^{2+} mediada por la isoforma RyR2, lo que conduce a la propagación de señales de Ca^{2+} al soma y al núcleo, donde activan la expresión de genes que median la plasticidad sináptica y la memoria.

Localization of ryanodine receptor isoforms 2 and 3 in dendritic spines of neurons from primary rat hippocampal cultures

VIII. Abstract

The hippocampus is a brain region implicated in synaptic plasticity and memory formation; both processes require neuronal Ca^{2+} signals generated by Ca^{2+} entry via plasma membrane Ca^{2+} channels and Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER). Through Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, the ER-resident ryanodine receptor (RyR) Ca^{2+} channels amplify and propagate Ca^{2+} entry signals, leading to the activation of cytoplasmic and nuclear Ca^{2+} -dependent signaling pathways required for synaptic plasticity and memory processes. Earlier reports have shown that the rodent hippocampus expresses mainly the RyR2 isoform, with lower expression levels of the RyR3 isoform and almost undetectable levels of the RyR1 isoform; both the RyR2 and RyR3 isoforms have central roles in synaptic plasticity and hippocampal-dependent memory processes. Here, we describe that dendritic spines of primary hippocampal neurons express the RyR3 channel isoform, which is also expressed in the neuronal body and neurites. In contrast, the RyR2 isoform, which is widely expressed in the neuronal body and neurites of primary hippocampal neurons, is absent from the dendritic spines. We propose that this asymmetric distribution is of relevance for hippocampal neuronal function. We suggest that the RyR3 isoform amplifies activity-generated Ca^{2+} entry signals at postsynaptic dendritic spines, from where they propagate to the dendrite and activate primarily RyR2-mediated Ca^{2+} release, leading to Ca^{2+} signal propagation into the soma and the nucleus, where they activate the expression of genes that mediate synaptic plasticity and memory.

1. Introducción

Las células invierten una significativa cantidad de su energía en la mantención de una muy baja concentración del ión calcio libre (Ca^{2+}) en el medio intracelular (<100 nM, respecto a la concentración de $\sim 1,2$ mM en el medio extracelular -12.000 veces mayor-), lo cual permite la generación de elevaciones transitorias de la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) intracelular, definidas como señales de Ca^{2+} , las que a su vez logran iniciar o mediar distintos eventos celulares (Hidalgo, C. *et al.* 2005). En el caso de las neuronas del sistema nervioso central, la señalización mediada por Ca^{2+} está involucrada en la secreción de neurotransmisores, la transmisión sináptica, la excitabilidad neuronal, la expresión de genes e incluso en procesos como el aprendizaje y la memoria (Santulli, G. & Marks A. R., 2015). Así, para el funcionamiento normal de las neuronas resulta necesaria la activación coordinada y sin interferencias de diversas vías dependientes de Ca^{2+} , lo que es posible gracias a la compartimentalización temporal y espacial del Ca^{2+} en movimiento (Seymour-Laurent, K. J. & Barish, M. E., 1995). La $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular puede aumentar en las neuronas por distintas fuentes, ya que el Ca^{2+} puede entrar desde el medio extracelular a través de (1) canales de membrana presentes en espinas dendríticas, como los receptores de glutamato, principalmente NMDA-R y AMPA-R, o bien a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs) presentes mayoritariamente en la membrana de las dendritas y el soma neuronal; o (2) se pueden generar por liberación de Ca^{2+} desde organelos que actúan como reservorios intracelulares (mitocondrias y retículo endoplásmico -RE-) (Miyazaki, K., & Ross, W. N, 2013).

El Ca^{2+} se puede liberar desde el RE a través de dos tipos de canales de Ca^{2+} que se encuentran en su membrana: los receptores de ryanodina -RyR- y los receptores de 1,4,5-inositol trifosfato - IP_3R - (Berridge M.J., 1998). La distribución de RyR e IP_3R en neuronas del sistema nervioso central no es igual en todas las regiones en modelos murinos, encontrándose IP_3R en espinas dendríticas y dendritas de neuronas de Purkinje del cerebelo, mientras que los canales RyR se encuentran en las dendritas de dichas neuronas, pero no en sus espinas dendríticas (Seymour-Laurent, K. J. & Barish, M. E., 1995). Caso contrario es lo que ocurriría en el hipocampo, región del cerebro directamente implicada en aprendizaje espacial y memoria declarativa (Hidalgo, C. & Arias-Cavieres, A. 2016), dado que en las neuronas hipocámpales se ha sugerido que son los canales RyR los que se hallan en espinas dendríticas y dendritas, mientras que los IP_3R sólo se encuentran en

dendritas y no en sus espinas (Seymour-Laurent, K. J. & Barish, M. E., 1995). Por otro lado, recientemente se demostró que ambos canales, RyR e IP₃R funcionan independientemente en neuronas hipocampales (Chen-Engerer, H. J. *et al.* 2019), lo que a su vez se condice con que se ha logrado clasificar los transitorios individuales de Ca²⁺ por su cinética, según si son producidos por la acción principal de RyR, IP₃R, o ambos (Miyazaki, K., & Ross, W. N, 2013). De todas formas, las señales de Ca²⁺ producidas por estos canales interactúan entre sí, habiéndose reportado por ejemplo que la isoforma 2 de los canales RyR (RyR2) amplifican y propagan las señales de Ca²⁺ generadas en dendritas por el desenjaulamiento de IP₃ (Ramírez OA, *et al.*, 2021). Así, el funcionamiento en armonía de ambos tipos de canales permite mantener una correcta señalización mediada por Ca²⁺ en el medio intracelular de las neuronas, ya que alteraciones en la liberación de Ca²⁺ desde el RE, mediada por estos canales, se ha reportado como un mecanismo base de diversos tipos de desórdenes neurológicos (Santulli, G. & Marks A. R., 2015).

En la última década se ha demostrado que la liberación de Ca²⁺ mediada por RyRs tiene un rol fundamental en el desarrollo de las espinas dendríticas, afectando procesos como la plasticidad y la longevidad, ya que se ha encontrado que alteraciones de esta señalización mediada por RyR en cualquier estadio del desarrollo resulta en un retardo en la funcionalidad de las espinas, de la dendrita, y de toda la neurona, lo que lleva a un deterioro cerebral e, inclusive, podría conducir a la enfermedad de Alzheimer (EA) (Segal, M., & Korkotian, E., 2014; Paula-Lima A., *et al.*, 2014). Los canales RyR poseen además un rol clave en la regulación de las señales de Ca²⁺ intraneuronales gracias al fenómeno conocido como liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR, por sus siglas en inglés), causado por el agonismo que posee el Ca²⁺ en la apertura de los canales RyR y que provoca la salida masiva de Ca²⁺ desde el RE, amplificando la señal (Meissner, G. 2017). El proceso de CICR es esencial en el hipocampo para la plasticidad sináptica, la plasticidad estructural, y la formación/consolidación de la memoria espacial (Adasme T., *et al.*, 2011; Valdés-Undurraga, I., Lobos, P., *et al.*, 2023; Paula-Lima, A. *et al.* 2014, More *et al.*, 2018a & 2018 b).

Los canales RyR se expresan en todos los órganos, existiendo tres isoformas descritas en mamíferos: RyR1, presente en músculo esquelético; RyR2, canónicamente vinculada al músculo cardíaco, pero abundante en neuronas; y RyR3, originalmente descrita en cerebro, pero que posee una expresión ubicua (Abu-Omar, N. *et al.*, 2018; Santulli, G. & Marks A.

R., 2015). Actualmente se sabe que en el cerebro de mamíferos se expresan las tres isoformas de RyR en diferentes proporciones según la región, aunque RyR2 posee la mayor presencia de las tres de forma general (Abu-Omar, N. *et al.*, 2018). En el hipocampo, la expresión de RyR2 también predomina, mientras que RyR3 se expresa en menor medida, y RyR1 posee niveles indetectables en cultivos primarios de hipocampo de rata (Figuras 1 y 2; Mori, F. *et al.*, 2000; Adasme *et al.* 2011; Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021). Dicha expresión diferencial de las isoformas en el hipocampo es concordante con que la administración en todo el cerebro de oligonucleótidos antisentido contra RyR2 o RyR3 provoca un deterioro del rendimiento de ratones en una tarea de evitación pasiva, pero no así contra RyR1 (Galeotti, N, *et al.*, 2008), lo que sugiere que los procesos de memoria dependientes del hipocampo requieren canales RyR2 y RyR3 funcionales.

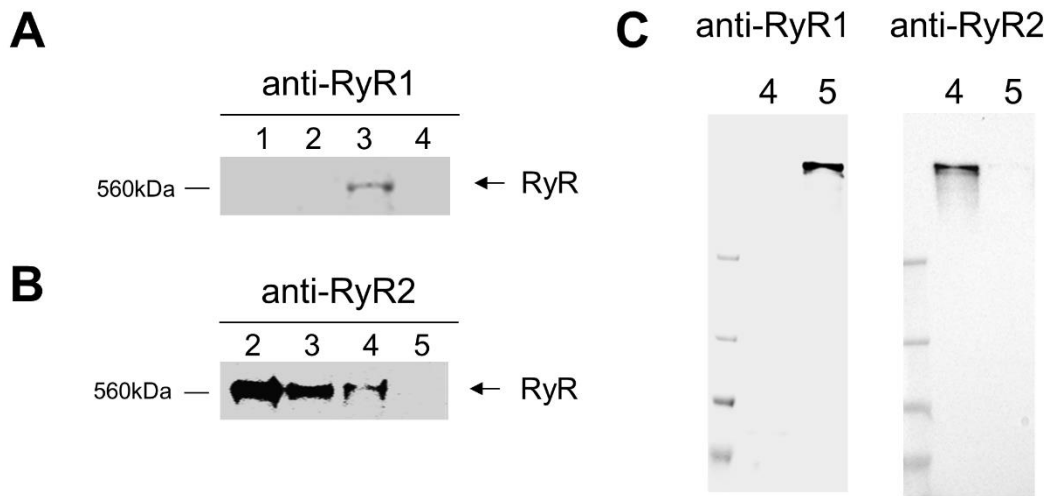


Figura 1. El hipocampo de rata no contiene la isoforma RyR1. Extraído de Lobos, P., Córdova, A., Vega-Vásquez, I. *et al.*, 2021. Simbología: 1, homogeneizado de hipocampo embrionario de rata; 2, microsomas de hipocampo de rata adulta; 3, microsomas de cerebello de rata adulta; 4, homogeneizado de corazón de rata; 5, homogeneizado de músculo esquelético. En (A) se muestra la especificidad de un anticuerpo contra RyR1, con un control positivo en el carril 3 (cerebello), nula señal en hipocampo (carril 1 y 2), y un control negativo en el carril 4 (corazón). En (B) se muestra la especificidad para el anticuerpo anti-RyR2, con presencia de señal en hipocampo y cerebello (carriles 2 y 3), control positivo carril 4 (corazón), y control negativo carril 5 (músculo esquelético). En (C) se muestra otro western blot sólo para carriles 4 (corazón) y 5 (músculo esquelético), que son control positivo y negativo para ambos anticuerpos evaluados, pero en sentido inverso.

En particular, últimamente RyR2 ha tomado un rol protagónico en la EA, considerando su demostrada participación en memoria y su modulación redox relacionada directamente con el estrés oxidativo asociado al envejecimiento (Arias-Cavieres, A. *et al.* 2017; More, J. *et al.* 2018a; Yao, J. *et al.* 2020; Chami, M. & Checler, F. 2020). Por otro lado, como las isoformas RyR1/RyR2 son esenciales para el funcionamiento del músculo esquelético y cardíaco, respectivamente, RyR3 es la única isoforma de RyR cuyo *knockout* (KO) no es letal (Futatsugi, A. *et al.*, 1999). En estudios realizados con ratones KO para esta isoforma se ha encontrado que el canal RyR3 es necesario para la inducción de una plasticidad sináptica hipocampal conocida como depresión a largo plazo (LTD) en neuronas de ratón de la región CA1 (Futatsugi, A. *et al.*, 1999); además, su ausencia también causa problemas en el aprendizaje y memoria espacial en estos modelos (More, J. *et al.*, 2018a & 2018b). También se ha descrito que, al igual que lo que ocurre con RyR2, la expresión de la isoforma RyR3 se encuentra alterada en la EA, tanto en humanos (Kelliher *et al.*, 1999; Bruno, A.M. *et al.*, 2012; Koran, M.E. *et al.*, 2014) como en modelos animales (Paula-Lima A. *et al.*, 2011; Liu, J. *et al.* 2014; More *et al.*, 2018). También se ha reportado la directa implicancia de RyR3 y las señales mediadas por Ca^{2+} en la regulación de la amplitud y potenciación de las corrientes tardías de hiperpolarización lenta (sAHP) de neuronas hipocampales de ratón (Tedoldi, A. *et al.*, 2020), aumentando así la evidencia de que RyR2/RyR3 serían las isoformas específicas fundamentales para la correcta función del hipocampo.

Se sabe que el RE se distribuye en los distintos compartimentos de las neuronas tales como dendritas, axones, soma y espinas dendríticas (Figura 2, Berridge M.J., 1998), y que los canales RyR participan en la propagación del Ca^{2+} desde las espinas dendríticas y dendritas hasta el interior del núcleo neuronal (Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021). Un estudio reciente realizado en ratones que expresan RyR2 marcado con una proteína fluorescente verde (GFP) demostró que GFP-RyR2 se detecta predominantemente en el soma y las dendritas, pero no en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región hipocampal CA1 o en las neuronas granulares del giro dentado (Hiess, F., *et al.*, 2022). Sin embargo, eventos sinápticos aislados provocan la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales CA1 en cortes de hipocampo de rata (Emptage, N., *et al.*, 1999), lo que indica que expresan canales RyR funcionales. Más aún, se ha modelado la propagación del Ca^{2+} desde la espina hasta su dendrita correspondiente, hallándose que en ausencia de los canales RyR esta propagación

no puede ocurrir, y que la difusión pasiva de Ca^{2+} o incluso la presencia de canales IP_3R no resulta suficiente para generar la propagación misma (Breit, M. *et al.*, 2018). De manera complementaria, a través de otros modelos computacionales se concluyó que no sólo necesita de RyR al interior de la espina para lograr una correcta señalización, sino que específicamente RyR debe posicionarse en la base de las espinas dendríticas para lograr maximizar la eficiencia de la propagación (Basnayake, K. *et al.*, 2019). Este hallazgo fue validado en el mismo estudio de forma experimental a través del desenjaulamiento de Ca^{2+} y de glutamato en la espina, combinado con microscopía de superresolución (reducción de emisión estimulada, STED) para inmunotinciones de RyR y espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo (Basnayake, K. *et al.*, 2019). A pesar de lo anterior, aún resta por estudiar el aporte de las isoformas individuales de RyR a la propagación de las señales de Ca^{2+} en estas neuronas.

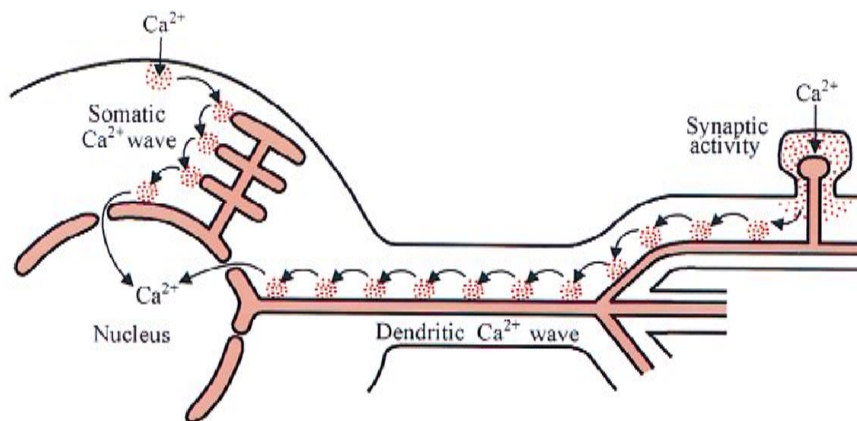


Figura 2. Esquema del retículo endoplásmico neuronal, y propagación de señales de Ca^{2+} en neuronas. Extraído de Berridge M.J., 1998. Ilustra la extensión del RE neuronal, el cual puede llegar a todos los compartimentos de la célula. Propone al RE como organelo clave para la amplificación de señales de Ca^{2+} sinápticas y somáticas a través de CICR hacia el núcleo (avalado por Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021).

Si las isoformas RyR2/3 actúan de una forma redundante o especializada en esta propagación del Ca^{2+} , es algo que aún no se ha establecido con claridad, principalmente debido a la dificultad que conlleva desarrollar herramientas isoforma-específicas debido a su gran tamaño (4 subunidades de ~ 5000 aminoácidos cada una) y la identidad entre isoformas (cerca del 70% de la secuencia, Meissner, G. 2017). A pesar de ello, hemos reportado preliminarmente y de forma pionera la presencia de RyR3 y la exclusión de RyR2

en espinas dendríticas de neuronas en cultivo primario de hipocampo (Figura 3, Adasme *et al.* 2011); sin embargo, dicha observación no ha sido profundizada mediante análisis cuantitativo. El presente proyecto busca estudiar si existe una distribución diferencial de estas isoformas de RyR en las espinas dendríticas (sólo RyR2 y RyR3 que están presentes en hipocampo), lo que podría sentar las bases de un modelo sobre cómo ambas isoformas se complementan para mantener una correcta homeostasis de las señales de Ca^{2+} en las neuronas, y sobre su rol en el hipocampo y en la regulación de la plasticidad sináptica.

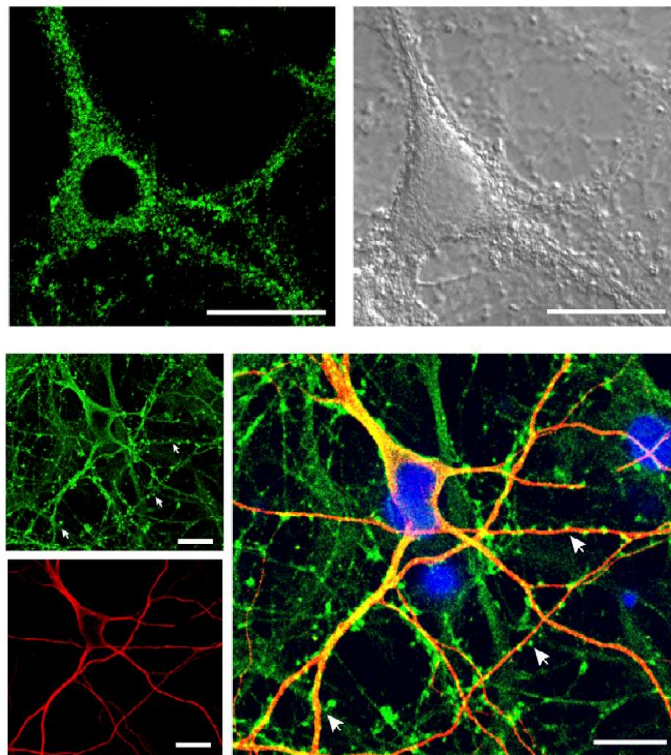


Figura 3. Esquema detallado que muestra la participación de los canales RyR en la propagación de las señales de Ca^{2+} en neuronas Extraído de Adasme, T. et al., 2011. En verde se presenta el marcaje de RyR2 de una neurona hipocampal de cultivo primario, y a la derecha una fotografía de la misma neurona en campo claro. Abajo, se muestra un panel de los marcajes: RyR3 (verde), MAP2 (rojo) y DAPI (azul); puntas de flecha indican espinas putativas en el marcaje de RyR3. Las células gliales, negativas para MAP2, presentan abundante señal para RyR3. Barras de escala 20 μm .

2. Hipótesis

RyR3 es la única isoforma de los receptores de ryanodina presente en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

3. Objetivos

Objetivo General: Evaluar la localización de las isoformas de RyR en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

Objetivos Específicos (OE):

OE 1: Determinar la localización de RyR2 respecto al marcador de espinas dendríticas Homer1 en neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata sometidos a microscopía de expansión. **Razonamiento:** El anticuerpo primario anti-RyR2 proviene de ratón, mientras que el anticuerpo primario anti-Homer1 es de conejo, por lo que se puede realizar una colocalización de ambos marcajes para corroborar que RyR2 no se encuentra en espinas dendríticas de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata, considerando que ya fue demostrado en tejido de ratón (rebanadas de cerebro, Hiess, F., *et al.* 2022).

OE 2: Establecer metodología para la visualización de espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata sometidos a microscopía de expansión. **Razonamiento:** Para evaluar la localización de RyR3 en espinas en el OE3 (siendo que el anticuerpo primario es de la misma especie de los marcadores de espinas dendríticas disponibles), se necesita establecer primero la visualización de espinas dendríticas en los cultivos expandidos, para lo cual se evaluará la marca de la proteína Espinofilina en neuronas lipotransfectadas con un plasmidio que codifica la expresión de una proteína fluorescente (y la resistencia de la proteína fluorescente al procedimiento de expansión).

OE 3: Analizar la localización de RyR3 en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata sometidos a microscopía de expansión. **Razonamiento:** Habiendo determinado que la microscopía de expansión en neuronas lipotransfectadas con una proteína fluorescente permite visualizar espinas dendríticas, se estudiará la localización del marcaje de RyR3 en dichas neuronas de los cultivos, evaluando la presencia de esta isoforma de RyR en las espinas dendríticas.

4. Materiales y métodos

Reactivos y plasmidios: El plasmidio ShScr-RFP (TR30015) se adquirió de Origene (Rockville, MD, USA). El medio neurobasal, DMEM y el suplemento B27 se compraron a Gibco (Carlsbad, CA, USA), mientras que DAPI y GlutamaxTM de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La lipofectamina 3000[®] y la proteinasa K (25530031) fueron adquiridas de ThermoFisher/ Invitrogen (Waltham, MA, USA), y el ácido metacrílico N-hidroxisuccinimida (MA-NHS; 730300) e 4-Hidroxi-TEMPO (176141) en Merck (Darmstadt, Alemania). El suero fetal bovino fue de Biological Industries (Cambridge, Reino Unido), y la poli-D-lisina de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). El suero de burro fue adquirido de HyClone, Cytiva (Logan, UT, USA).

Anticuerpos: Anticuerpos primarios específicos contra MAP2 (ratón, MAB3418) y RyR3 (conejo, AB9082) fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos contra RyR2 (ratón, MA3-916/C3-33) y PSD95 (ratón, MA1-045/6G6-1C9) fueron de Thermo Fisher/Molecular Probes (Waltham, MA, USA). El anticuerpo contra Homer1 (conejo, 160 003) fue adquirido de Synaptic Systems (Goettingen, Alemania); el anticuerpo contra Espinofilina (conejo, ab18561) fue de Abcam (Goettingen, Alemania); los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 contra ratón y Alexa Fluor 633 contra conejo fueron comprados de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Cultivo primario hipocampal de rata: los cultivos primarios hipocampales se prepararon a partir de embriones de 18 días de gestación de ratas Sprague-Dawley según descrito anteriormente (Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021). En breve, se aislaron los hipocampos de los embriones para obtener células hipocampales que se sembraron en placas Petri tratadas previamente con poli-L-lisina (0,1 mg/mL), en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino por 1 hora para permitir la adhesión de neuronas y minimizar la proporción de células gliales. Los cultivos se mantuvieron en el medio comercial libre de suero (Neurobasal) y suplementado con B27, conteniendo también Glutamax TM, penicilina (20 U/mL), y estreptomycin (20 µg/mL) a 37 °C y 5% CO₂ hasta ser usados entre los 14 y 21 días *in vitro* (DIV). Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con la guía “Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings” de la Sociedad Americana de Psicología y con la aprobación bioética por parte del Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo FMUCH #1142).

Lipotransfección: La lipotransfección de ShScr-RFP que codifica a una RFP sin destinación específica (para marcar morfología) se realizó con Lipofectamina 3000®. En breve, los cultivos se incubaron en medio neurobasal sin B27 con una mezcla de ADN:Lipofectamina en una razón 1:3, considerando la transfección de 1 µg de ADN total para neuronas crecidas en coverslips de 25 mm. Luego, el medio fue reemplazado tras 1 h por medio neurobasal suplementado con B27 esperándose 72 h para usar los cultivos en los respectivos experimentos.

Inmunofluorescencia: los cultivos primarios, tras 14-21 días *in vitro*, se fijaron a 37°C con 2% de paraformaldehído (PFA) y 2% sacarosa en buffer fosfato salino (PBS) por 5 min, y luego con 4% PFA 4% sacarosa por 10 min; posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Se procedió luego al marcaje de Homer1, PSD95, MAP2, RyR2, o RyR3, según protocolos de inmunomarcaje indirecto descritos anteriormente (Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021). En breve, los pasos de bloqueo y permeabilización se realizaron en simultáneo por una incubación por dos horas a temperatura ambiente con una solución compuesta por 3% suero de burro y 0,25% Tritón X-100 en PBS (S-B/P); luego se procedió a incubar el anticuerpo primario durante la noche en S-B/P a 4°C, lavar con S-B/P, e incubar a temperatura ambiente por 2 horas con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con Alexa Flúor, 1:200 en S-B/P. Las células se lavaron con PBS, para posteriormente teñirse con DAPI 1:1000 por 10 min para marcar los núcleos, y luego lavar nuevamente con PBS.

Microscopía de Expansión (ExM): Esta técnica (Figura 4, Chen, F. *et al.*, 2015) corresponde a un tratamiento que se realiza a una muestra de inmunofluorescencia convencional para trasladar la señal de los anticuerpos secundarios a un gel que tiene la propiedad de poder expandirse isométricamente hasta 4 veces por cada dimensión espacial. El protocolo utilizado se basa en el publicado por Chen, F. y colaboradores: en breve, las inmunofluorescencias se incubaron con la molécula puente MA-NHS 1 mM por 1 h, y la gelificación se realizó a 37°C por 2 h (acrilamida 2,5% + N,N'-Metilénbisacrilamida 0,15% + acrilato de sodio 8,6% + NaCl 11,7% en PBS 1X). La digestión de los cultivos se realizó con proteinasa K 16 U/mL a 37°C durante la noche; para expandir los geles, se realizaron al menos tres lavados con agua ultrapura por 30 minutos. Los geles expandidos se inmovilizaron en cubreobjetos previamente tratados con 0,1% Poli-D-Lisina por 20 min, para proceder a la adquisición de fotos.

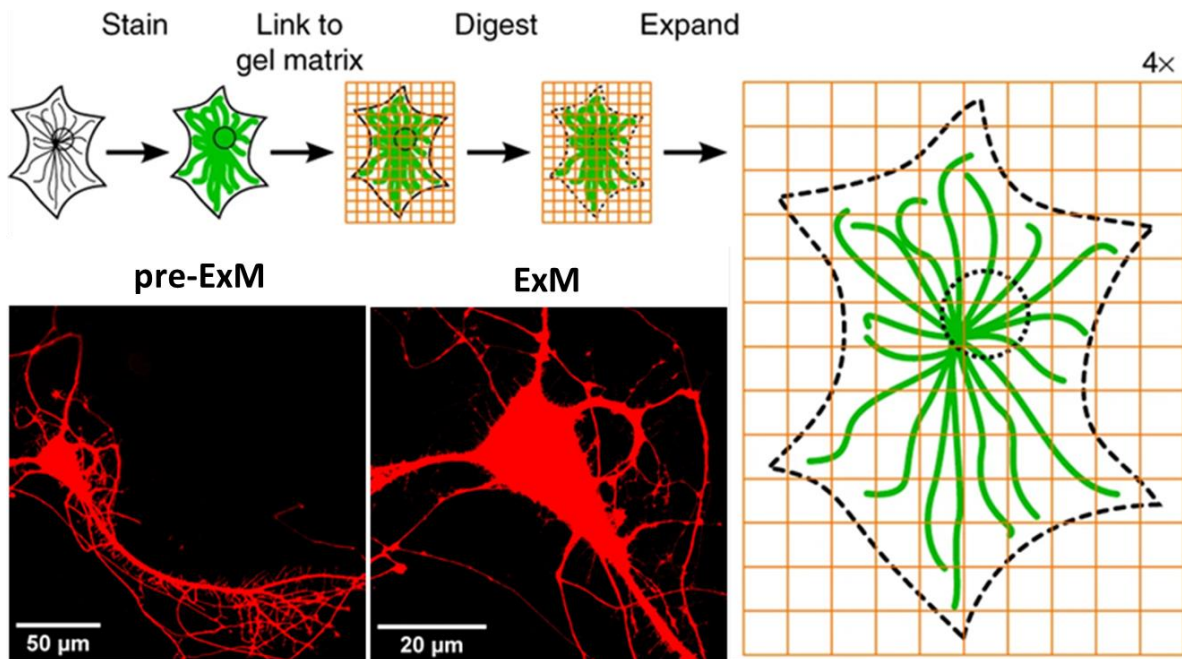


Figura 4. Esquema que fundamenta la técnica de Microscopía de Expansión (ExM). Modificado de Asano S.M. et al., 2018, con trabajo obtenido de la estandarización de la técnica en el laboratorio. Se muestran los pasos cruciales de la técnica: 1) marcaje, 2) creación de uniones marcaje-gel, 3) digestión controlada de la muestra, 4) expansión del gel que conserva el marcaje. Imágenes pre-ExM y Expanded muestran a la misma neurona de un cultivo primario de hipocampo de rata antes y después de realizar el protocolo de ExM, la cual expresa la proteína fluorescente roja (RFP) sin destinación específica.

Adquisición de imágenes: Se utilizó un microscopio Spinning Disk (PerkinElmer, Waltham, MA/Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo 25x 0,8 N.A. de aire y 40X 1,2 N.A. de agua y excitación a 488, 568 y 647 nm con láser de diodo (Omicron) para obtener imágenes de neuronas fijadas y expandidas para la inmunotinción de RyR2/Homer1 y MAP2/Espinofilina. Para las imágenes de PSD-95/RyR3 se utilizó un microscopio confocal (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite 63X 1,4 N.A. y excitación con láseres de 488 y 633 nm. Para las imágenes de PSD-95/RyR3 se utilizó un microscopio confocal (FV1000, Olympus, Tokio, Japón) con un objetivo de inmersión en agua 60X 1,2 N.A. y excitación con láseres de 405, 488 y 559 nm.

Procesamiento de imágenes: Las imágenes adquiridas en 3D se deconvolucionaron con el programa Huygens (Scientific Volume Imaging, Países Bajos, <http://svi.nl>), y procesadas con el analizador de colocalización del mismo programa, del cual se obtuvieron los coeficientes de intersección y Mander's para cada imagen. En cada combinación, Homer1 y RyR3 fueron presentados como el canal rojo para Huygens, mientras que MAP2, RyR2, y PSD95 fueron canal verde; la colocalización del canal verde con el canal rojo fue la calculada para todas las condiciones (para PSD95/RyR3 la colocalización inversa se añadió adicionalmente).

Análisis estadístico: Los resultados se presentan como el promedio \pm SE del total de neuronas analizadas para cada condición. En cada experimento, se explicita la cantidad de cultivos independientes utilizados como "n", pudiendo cada experimento tener 1 o más neuronas analizadas por cultivo, con los gráficos de barras mostrando como puntos en las barras cada neurona analizada. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Origin, versión 2018 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.). Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para todos los gráficos, excepto para los experimentos con PSD95, en los que se utilizó la prueba de Chen-Shapiro (ya que se analizaron más de 10 imágenes). Para evaluar la significación estadística en los datos distribuidos normalmente (todos los gráficos excepto los experimentos PSD95), se utilizó el test de ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey en el caso de los gráficos RyR3-t y RyR3-h; para analizar el resto de las muestras se empleó la prueba t de Student. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para evaluar la significación estadística en los experimentos con PSD95.

5. Resultados

A. RyR2 no colocaliza con la proteína residente de espinas dendríticas Homer1.

Un estudio reciente en rebanadas de cerebro de ratones transgénicos que expresan RyR2 fusionado a GFP reportó que esta isoforma de RyR se encontraba presente en el soma y las dendritas pero no en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales CA1 del hipocampo (Hiess, F., *et al*, 2022). Para determinar si las espinas dendríticas de las neuronas de cultivo primario hipocampal de rata carecen de la isoforma endógena de RyR2, se estudió si RyR2 colocalizaba con Homer1, una proteína expresada en las espinas dendríticas (Sala, C., *et al.*, 2001). En este trabajo se realizó inmunomarcaje de los cultivos contra RyR2, Homer1 y MAP2 (proteína de citoesqueleto de neuronas que no llega a espinas dendríticas), y se sometieron a microscopía de expansión.

En la figura 5 se muestran las imágenes adquiridas para los distintos inmunomarcajes, y de regiones del cultivo donde se aprecian principalmente dendritas. Como se ilustra en la figura 5A, el marcaje de RyR2 (rojo) y Homer1 (verde) no colocalizan aparentemente (falta de señal amarilla correspondiente a unión rojo-verde). Como control, también evaluamos el marcaje de MAP2 (rojo) y Homer1 (verde); las imágenes fusionadas evidencian la esperada ausencia de colocalización entre ellos (figura 5C). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los canales verde y rojo para cada condición se realizó trazando una línea amarilla para cruzar una espina dendrítica y su dendrita, como se muestra en las figuras 5B y 5D (paneles derechos), donde se observó la exclusión de la señal de Homer1 de las señales de RyR2 y MAP2. La cuantificación de la colocalización casi nula de MAP2 o RyR2 con Homer1 se ilustra en la figura 5E, que no muestra una diferencia significativa, confirmando la ausencia de RyR2 en las espinas dendríticas de las neuronas primarias del hipocampo al distribuirse en forma similar a MAP2.

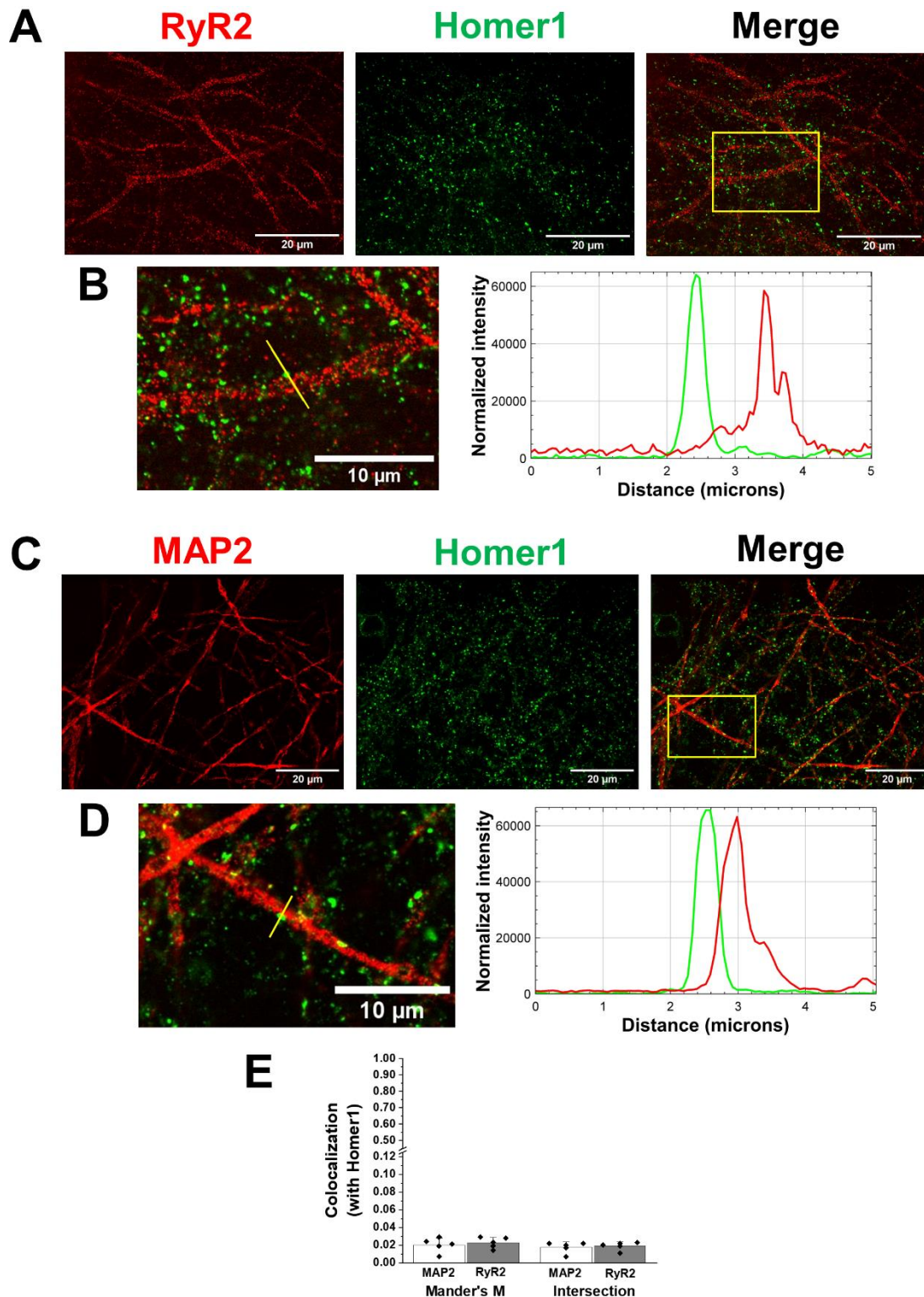


Figura 5. RyR2 está ausente en espinas dendríticas de hipocampo de rata. Se analizó el marcaje de Homer1 (verde) y RyR2 (rojo) o MAP2 (rojo) en cultivos primarios de hipocampo, y se utilizó microscopía de expansión para mejorar la resolución de la imagen adquirida. Se muestran imágenes

confocales para RyR2/Homer1 (A) y MAP2/Homer1 (C). Las imágenes ampliadas se ilustran en B y D; los trazados de los perfiles de líneas amarillas que se muestran en estas figuras ilustran la exclusión de los picos de Homer1 de las señales de RyR2 o MAP2 (B y D, paneles derechos). La cuantificación de la colocalización entre RyR2 o MAP2 con Homer1 se muestra con los coeficientes de Mander y de intersección (E). Los gráficos de barras se expresan como Media \pm EE, con tres (n=3) cultivos independientes para RyR2/Homer1 y n=2 para MAP2/Homer1.

B. Lipotransfección con RFP permite visualizar espinas dendríticas

Para lograr la visualización de las espinas dendríticas en los cultivos primarios de hipocampo de rata utilizados, a la vez que se realizó un inmunomarcaje de MAP2/RyR3 con los anticuerpos disponibles, se lipotransfectó los cultivos con un plasmidio que codifica para la proteína fluorescente roja (RFP) sin destinación particular. La lipotransfección posee una baja eficiencia, en un campo determinado de adquisición se puede lograr que sólo una neurona exprese el plasmidio (Figura 6A). Al no poseer la RFP una destinación específica, esta se distribuye a lo largo de toda la extensión de la neurona, logrando marcar estructuras negativas para el inmunomarcaje de MAP2 (proteína asociada a microtúbulos, específica para neuronas, y que no llega a espinas dendríticas) pero que son parte de la neurona.

Al realizar el inmunomarcaje de la proteína espinofilina, proteína enriquecida en las espinas dendríticas (Allen, P. *et al.*, 1997), se puede corroborar que las protuberancias MAP2-/RFP+ corresponden a espinas dendríticas (Figura 6B). En la Figura 6C se puede apreciar el perfil de intensidad a lo largo de la línea amarilla que atraviesa una única espina dendrítica (a la izquierda canal RFP como referencia de morfología), RFP y espinofilina (spino) poseen un pico común correspondiente a la espina, que no posee señal importante de MAP2, mientras que la dendrita posee los tres canales.

La estrategia de lipotransfección de proteínas fluorescente para visualización de espinas es común en la literatura (ver Srivastava, D. P., *et al.*, 2011 como protocolo estándar para análisis de morfología de espinas); sin embargo, este paso fue necesario para validar esta metodología en el modelo utilizado. En el caso particular del presente trabajo, fue necesario determinar además si la lipotransfección de esta RFP era compatible con el posterior inmunomarcaje y expansión del cultivo. Tal como se reportó en protocolos iniciales de ExM, en donde las proteínas tipo barril sobreviven al paso de la digestión con una retención de fluorescencia de más del 50% de intensidad (Asano A., *et al.* 2018), la RFP lipotransfectada logró sobrevivir a todo el protocolo de expansión (Figura 4).

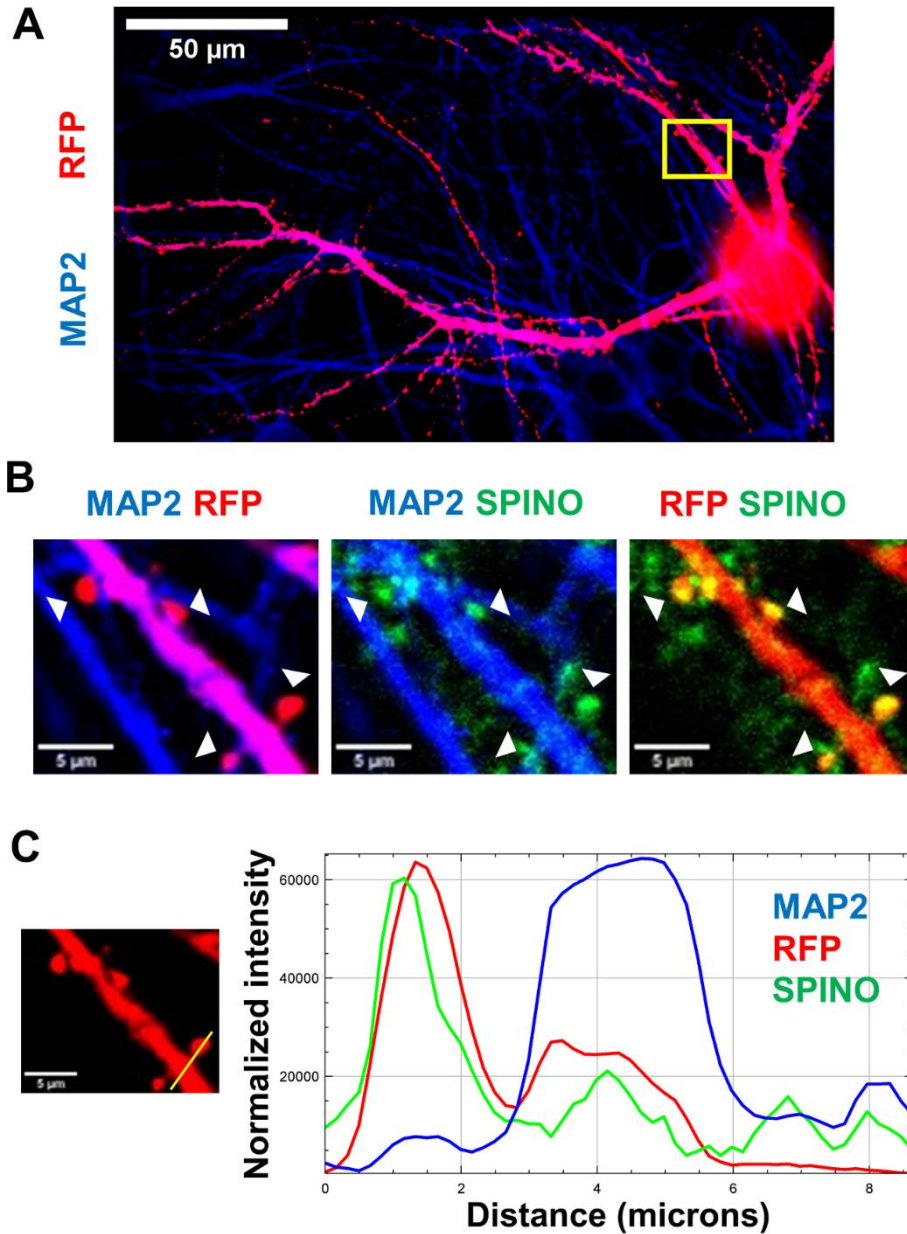


Figura 6. Lipotransfección de RFP permite visualizar espinas dendríticas. Se analizó el inmunomarcaje de MAP2 (azul) y la proteína enriquecida en espinas dendríticas espinofilina (verde) en una neurona lipotransfectada para la expresión de RFP (rojo). Se muestra un campo general de una neurona lipotransfectada en (A), con un zoom en (B) del recuadro amarillo para visualizar espinas dendríticas. Se resaltan con puntas de flecha blancas las marcas positivas para RFP pero negativas para MAP2, que resultan ser positivas para espinofilina, concluyéndose que son espinas dendríticas. Se muestra un perfil de la intensidad a lo largo de una espina dendrítica y su dendrita (C) de la línea amarilla mostrada a la izquierda en la fotografía del canal RFP de la misma amplificación en (B).

C. RyR3 está presente y enriquecido en las espinas dendríticas

Imágenes confocales convencionales fueron suficientes para apreciar espinas dendríticas putativas en neuronas primarias del hipocampo de muestras regulares no expandidas (figura 7A). El inmunomarcaje de MAP2 (rojo) y RyR3 (verde) se caracteriza por una fuerte señal positiva de RyR3 y negativa de MAP2 en el borde de las dendritas. La microscopía de expansión nos permitió resolver estas espinas dendríticas putativas RyR3-positivas con más detalle (figura 7B, flechas amarillas). Las imágenes expandidas resultantes muestran que estas espinas dendríticas putativas siempre mostraban señales RyR3 más fuertes en comparación con las señales RyR3 mostradas por las dendritas. Para cuantificar estas observaciones, evaluamos la colocalización de las señales de MAP2 en imágenes de sólo dendritas con la señal de RyR3 total (RyR3-t), y con la señal de RyR3 de mayor intensidad (RyR3-h), que se obtuvo aplicando un umbral de intensidad que sólo preservaba las señales fuertes mostradas por las espinas dendríticas putativas. Se encontró que la colocalización de las señales MAP2/RyR3-t alcanzaba alrededor del 85% de intersección, significativamente mayor que la colocalización de MAP2 o RyR2 con Homer1 (colocalización nula de referencia). Por el contrario, las señales MAP2 mostraron niveles significativamente más bajos de colocalización con la señal de espinas putativas, RyR3-h, que además no fueron significativamente distintas a las mostrados por las señales MAP2/Homer1 (figuras 7C y 7D).

Para confirmar que las fuertes señales positivas para RyR3 observadas en la figura 6 corresponden a espinas dendríticas, se realizó el inmunomarcaje de RyR3 en cultivos previamente lipotransfectados con una proteína roja fluorescente (RFP). Este enfoque permitió visualizar la morfología completa de una sola neurona y sus dendritas para evaluar la localización de RyR3 simultáneamente en estos compartimentos. Además, en cultivos no expandidos, confirmamos que MAP2 no se encontraba presente en toda la extensión neuronal, ya que no colocalizó con todos los compartimentos RFP-positivos. En particular, la marca de MAP2 estaba excluida de las espinas dendríticas y los filopodios (figura 8A, puntas de flecha blancas). RyR3 también mostraba fuertes señales en lo que se puede reconocer como espinas dendríticas (figura 8B) al ser RFP-positivas (figura 8C). En cultivos expandidos lipotransfectados con RFP se lograron resolver en mayor detalle las espinas dendríticas, mostrándose en la figura 8D una dendrita secundaria con clara visualización de pequeñas protuberancias de la dendrita, que eran RyR3-positivas (figura 8D).

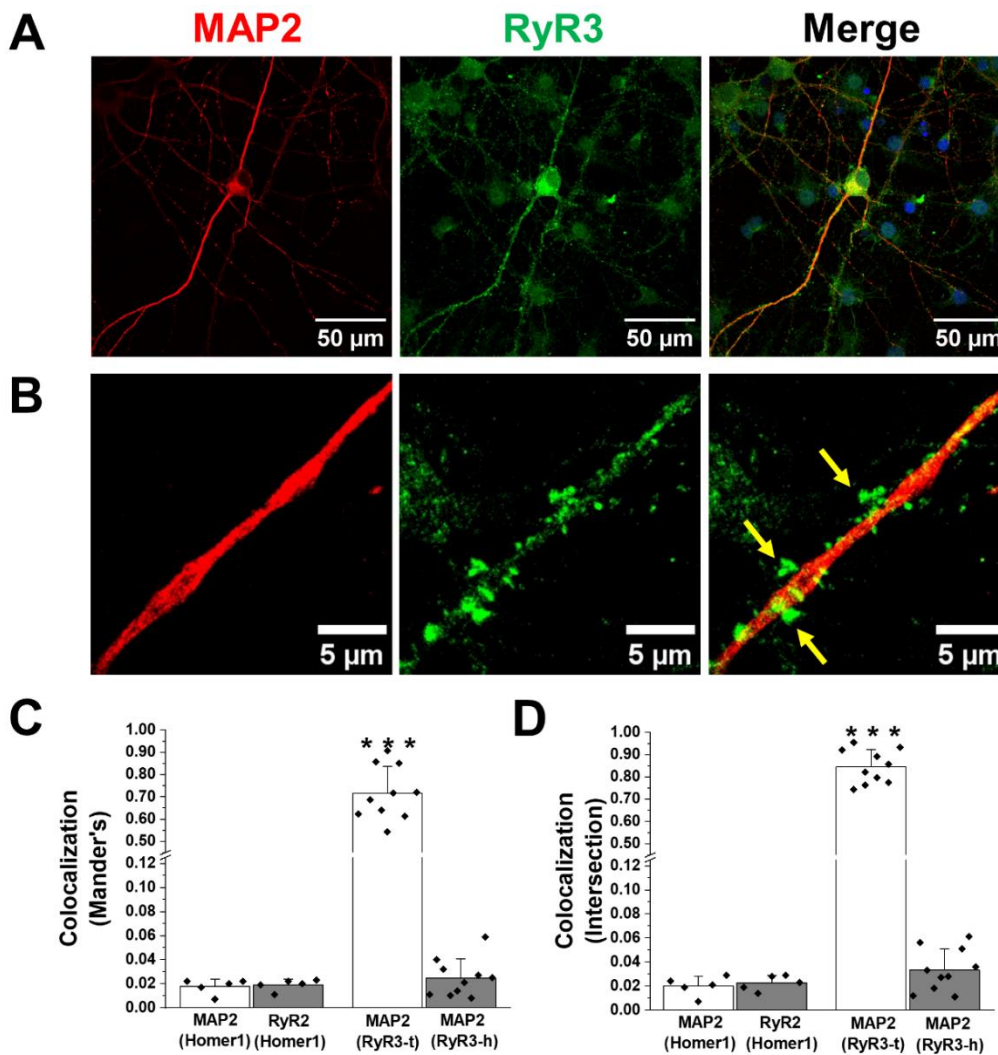


Figura 7. La isoforma RyR3 se enriquece en espinas dendríticas putativas. Se analizó el marcaje de RyR3 (verde) y MAP2 (rojo) en cultivos primarios de hipocampo, y se utilizó microscopía de expansión para mejorar la resolución de la imagen adquirida. Proyecciones en Z de las imágenes confocales de cultivos no expandidos se muestran en A, con espinas putativas positivas a RyR3 visibles a lo largo de las dendritas. Para resolver mejor estas estructuras, los cultivos expandidos se muestran en B, donde las espinas dendríticas putativas RyR3 positivas se indican con flechas amarillas. La cuantificación de la colocalización entre las señales MAP2 y RyR3 total (RyR3-t) se representa gráficamente como coeficientes de Mander (C) y de intersección (D), con valores MAP2/RyR2 (Homer1) como referencia de colocalización nula. En la cuantificación se incluye la señal RyR3 más intensa (RyR3-h), que corresponde a las señales más altas de RyR3, determinadas por un umbral manual que nos permitió segmentar las espinas dendríticas putativas por intensidad. Los gráficos de barras se expresan como media \pm EE, con cuatro ($n=4$) cultivos independientes para MAP2/RyR3. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, en relación con MAP2 (Homer1).

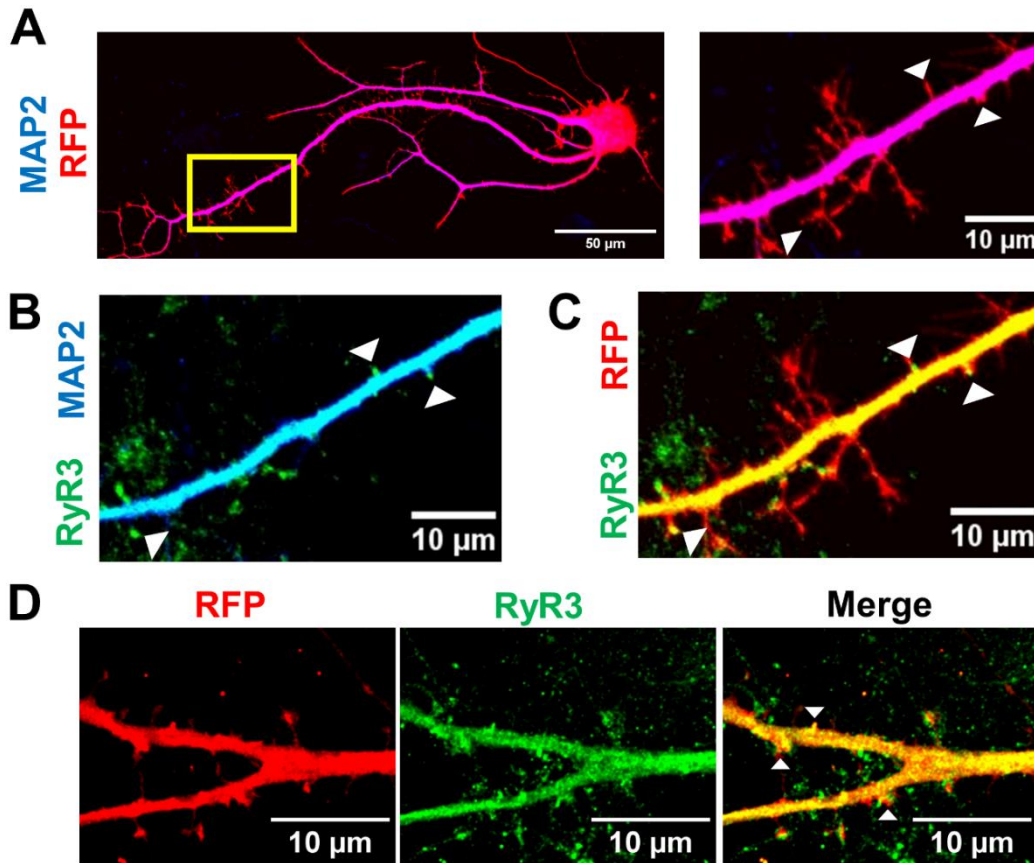


Figura 8. La lipotransfección de RFP confirma que las espinas putativas RyR3-positivas forman parte de las neuronas. Cultivos de hipocampo fueron lipotransfectados con RFP (rojo) e inmunomarcados para RyR3 (verde) y MAP2 (azul). (A-C) Las imágenes muestran una neurona no expandida, con una ampliación del campo a la derecha para A (rectángulo amarillo desde la izquierda), y el mismo campo amplificado en B y C, con puntas de flecha blancas señalando las espinas dendríticas que son RyR3-positivas y MAP2-negativas. (D) Una dendrita secundaria de un cultivo lipotransfectado con RFP y expandido, donde pueden identificarse visualmente espinas dendríticas RyR3 positivas (puntas de flecha blancas).

Para corroborar los hallazgos anteriores, evaluamos la colocalización de PSD95 con RyR3 en cultivos no expandidos. Encontramos que la señal de RyR3 (verde) se colocalizaba altamente con la señal de PSD95 (rojo) en los cultivos inmunomarcados (figura 9A). La cuantificación de la colocalización positiva fue consistente tanto para RyR3 con respecto a PSD95 como viceversa (figura 9B). Por último, evaluamos la colocalización de RyR3 y RyR2, considerando que RyR3-h correspondía de forma fiable a espinas dendríticas RyR3-positivas. Como se ilustra en la Figura 9C, en las neuronas expandidas las señales

RyR2 (rojo) no se colocaron con las fuertes señales RyR3 alrededor de la dendrita (verde), que marcan las espinas dendríticas. Las señales RyR2 mostraron el mismo patrón que las señales MAP2 cuando se evaluó su colocación con RyR3-t/h (figuras 9D y 9E).

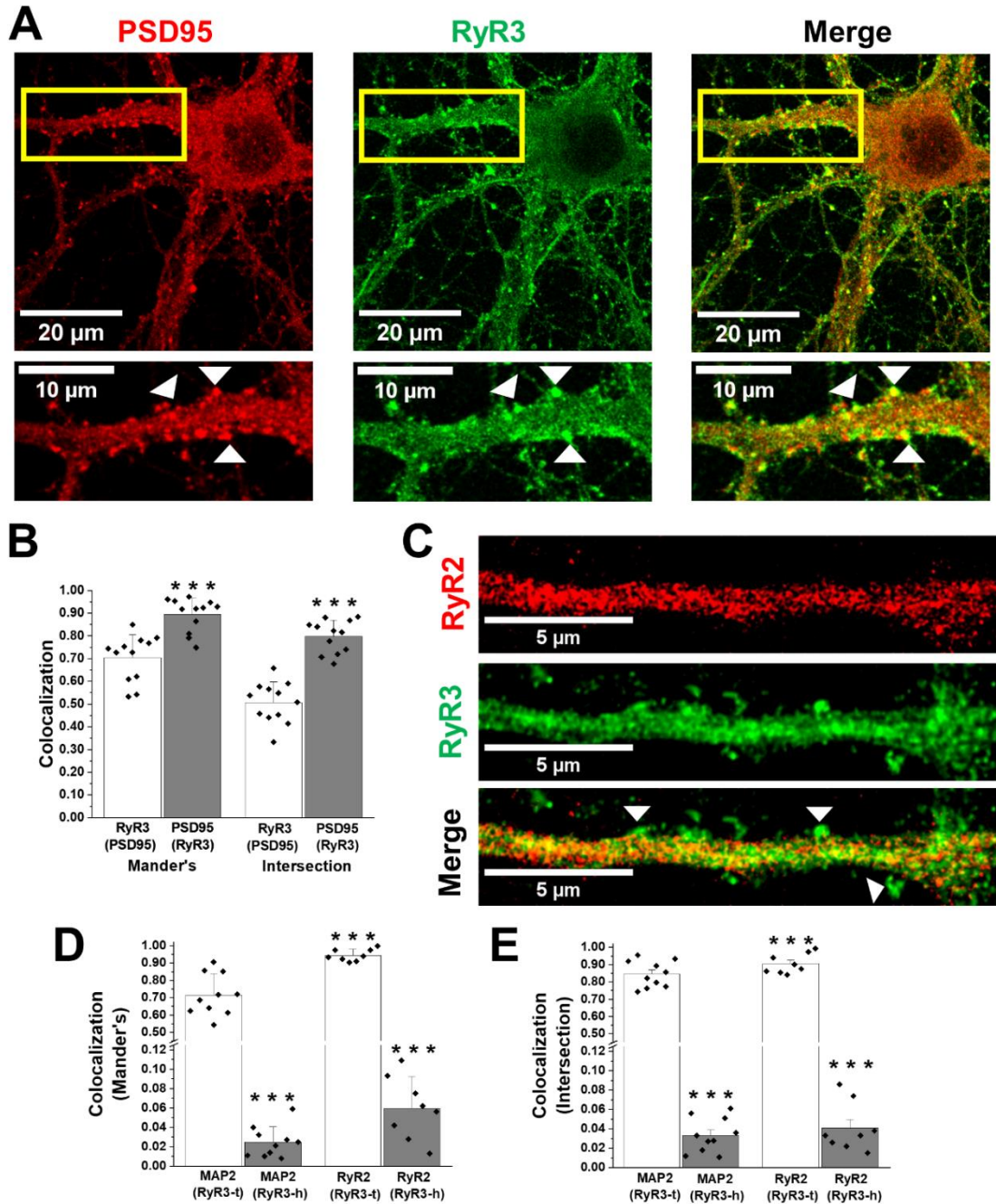


Figura 9. La isoforma RyR3 pero no la RyR2 está presente en las espinas dendríticas de cultivos primarios de hipocampo de rata. Inmunofluorescencia contra PSD95 y RyR3 en cultivos primarios de hipocampo. (A) Proyección z-stack de imágenes confocales para ambos canales y

composición, donde pueden visualizarse espinas RyR3 positivas (rectángulo amarillo y puntas de flecha blancas). (B) Cuantificación de la colocalización PSD95/RyR3 se representa como coeficientes de Mander y de intersección. (C) Se analizó el marcaje de RyR3 (verde) y PSD95 (rojo) en los cultivos usando microscopía de expansión para mejorar la resolución en la adquisición, mostrando una proyección z-stack de imágenes confocales de espinas RyR3 positivas y RyR2 negativas a lo largo de las dendritas (puntas de flecha blancas). La cuantificación de la colocalización RyR2/RyR3 se representa gráficamente como coeficientes de Mander (D) y de intersección (E), con valores MAP2 (RyR3-t/h) como referencia de una colocalización positiva/negativa. Los gráficos de barras se expresan como promedio \pm SE, con tres (n=3) cultivos independientes para ambos experimentos. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, en relación con las barras blancas en cada coeficiente para B, y para la barra MAP2 (RyR3-t) en D y E.

6. Discusión

Funciones cruciales del hipocampo, incluyendo la plasticidad sináptica y los procesos de aprendizaje y memoria, requieren vías de señalización mediadas por Ca^{2+} (Brini, M.m *et al.*, 2014). Las primeras revisiones de la bibliografía relativa a la homeostasis y señalización del Ca^{2+} neuronal propusieron que las señales de Ca^{2+} inducidas en las espinas dendríticas o en el soma por la actividad neuronal se propagan al núcleo a través de la CICR (Berridge, M.J., 1998; Gleichmann, M. & Mattson, M.P., 2011). En una de estas revisiones, se sugirió que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática provocaría la apertura de los canales RyR cercanos, expresados en el RE dentro de la espina (Gleichmann, M. & Mattson, M.P., 2011). El aumento resultante en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática activaría a su vez la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3R , permitiendo que el Ca^{2+} se propague activamente hacia el núcleo, donde promovería cambios en la expresión génica (Gleichmann, M. & Mattson, M.P., 2011); sin embargo, este modelo no distinguía entre las isoformas de RyR existentes.

En este trabajo mostramos que mientras las dendritas de las neuronas primarias del hipocampo expresan las isoforma RyR2 y RyR3, las espinas dendríticas sólo expresan la isoforma RyR3 del canal (Vega-Vasquez, I., *et al.*, 2022). Basándonos en estos resultados, sugerimos que cada isoforma tiene un papel específico en la función neuronal. Proponemos que la isoforma RyR3 amplifica las señales de entrada de Ca^{2+} generadas en las espinas dendríticas tras la estimulación de receptores NMDA postsinápticos (Emptage, N., *et al.*, 1999). A través de CICR, las señales de Ca^{2+} mediadas por RyR3 se propagarían desde las espinas dendríticas a las dendritas, donde estimularían la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR2 - que es fundamental para la propagación de señales de Ca^{2+} al núcleo (Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021) - y posiblemente también la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR3 e $\text{IP}_3\text{R1}$. Con una estimulación sináptica suficientemente fuerte, las señales de Ca^{2+} resultantes alcanzarían el soma neuronal y el núcleo, donde promoverían los cambios de expresión génica necesarios para la plasticidad sináptica sostenida y los procesos de memoria espacial (Bading, H., 2013; Lobos, P., Córdova, A. *et al.* 2021).

Aunque las isoformas RyR2 y RyR3 se han relacionado de forma independiente con procesos específicos relacionados con la plasticidad sináptica normal del hipocampo, o con

enfermedades, ambas isoformas (y no RyR1) son necesarias para modular los procesos de memoria (Galeotti, N. et al. 2008). Este trabajo presenta una posible explicación al hecho de que se requieran ambas isoformas, sin embargo, es necesario llevar a cabo más investigación a futuro sobre el funcionamiento y cinéticas específicas que diferencian a estas dos isoformas entre sí. El que posean una localización diferenciada implica una especialización funcional que aún no ha sido descrita. Más aún, se ha reportado que las junctofilinas (proteínas de anclaje de RE-membrana plasmática) reclutan de una manera isoforma-específica tanto a los canales RyR como a los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Ca_v), con alteraciones funcionales en la actividad de $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ como consecuencia de esta interacción (Perni, S. & Beam, K. 2021). Este hallazgo apoya aún más una especialización de los canales RyR, los cuales se localizarían de manera isoforma-dependiente para cumplir una necesidad fisiológica distinta y específica en las neuronas, pero que actualmente desconocemos.

Por otro lado, los canales IP_3R también comprenden tres isoformas en mamíferos ($\text{IP}_3\text{R}1-3$), siendo la $\text{IP}_3\text{R}1$ la principal isoforma del sistema nervioso central, que se encuentra enriquecida tanto en las células de Purkinje (cerebelo) como en las neuronas CA1 del hipocampo (Paula-Lima, A. et al. 2014). Contrasta con esto estudios que han reportado que la expresión de $\text{IP}_3\text{R}2/3$ es menos eficiente en el sistema nervioso central, siendo más importante en otros tejidos (Furuichi, T. et al. 1993). Considerando que en el hipocampo los canales IP_3R son excluidos de las espinas dendríticas (Seymour-Laurent, K. J. & Barish, M. E., 1995), la presencia de RyR3 y la ausencia de RyR2 en este compartimento le otorga a la isoforma RyR3 un protagonismo especial en los procesos que involucran la movilización y amplificación de Ca^{2+} desde las espinas dendríticas. Curiosamente, se ha descrito la presencia de una variante de empalme de RyR3 tanto en ratones como en humanos, que da lugar a una isoforma RyR3 truncada (Miyatake, R., et al., 1996; Leeb, T. & Brenig, B., 1998). Esta isoforma RyR3 truncada (RyR3-II), que se expresa en el sistema nervioso central y en varios tejidos periféricos, carece de algunos de los dominios transmembrana necesarios para una función óptima del canal de Ca^{2+} (Miyatake, R., et al., 1996; Leeb, T. & Brenig, B., 1998). En cambio, el cerebro expresa específicamente la variante RyR3 que conserva la integridad de sus dominios transmembrana (RyR3-I) (Miyatake, R., et al., 1996; Leeb, T. & Brenig, B., 1998). Futuros trabajos deberían explorar si las espinas dendríticas expresan la variante RyR3-I (no

truncada), que a diferencia de la variante truncada amplificaría eficazmente las señales de entrada de Ca^{2+} en este compartimento. Al mismo tiempo, RyR3-II (truncado) podría funcionar como un canal con un umbral alto (menos sensible al Ca^{2+}), complementando la función de RyR2 en las dendritas y el soma.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes y resultados expuestos en el presente trabajo de tesis, y considerando que los depósitos de Ca^{2+} intracelulares sensibles a IP_3 y ryanodina son funcionalmente independientes en las neuronas del hipocampo (Chen-Engerer, H.J., et al., 2019) (pero véase Ramírez, O.A., et al., 2021), proponemos que los canales RyR2, RyR3 e $\text{IP}_3\text{R1}$ tienen una distribución bien definida y funciones especializadas entre los compartimentos de las neuronas del hipocampo. Sugerimos que esta distribución diferencial conlleva una contribución específica de cada canal intracelular a las vías de señalización de Ca^{2+} que median la plasticidad sináptica, construyendo una compleja y afinada red de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . En particular, RyR3 desempeñaría un rol clave en estas vías de señalización, debido a su relevancia en detectar la entrada de Ca^{2+} y su posterior movilización dentro de las espinas dendríticas. Es fundamental, además, estudiar en profundidad las contribuciones individuales de cada canal, ya que es muy posible que cualquier perturbación a esta fina organización contribuya a la fisiopatología de enfermedades como la EA, que involucra alteraciones en la señalización mediada por Ca^{2+} en el hipocampo.

Así, los canales RyR2 y RyR3, junto con los canales $\text{IP}_3\text{R1}$, tendrían un papel central en la propagación de las señales de Ca^{2+} desde la sinapsis hasta el núcleo, reafirmando la importancia de comprender la interacción entre estos canales y su impacto en la función neuronal. Todo esto se resume en el esquema mostrado en la figura 10 a continuación.

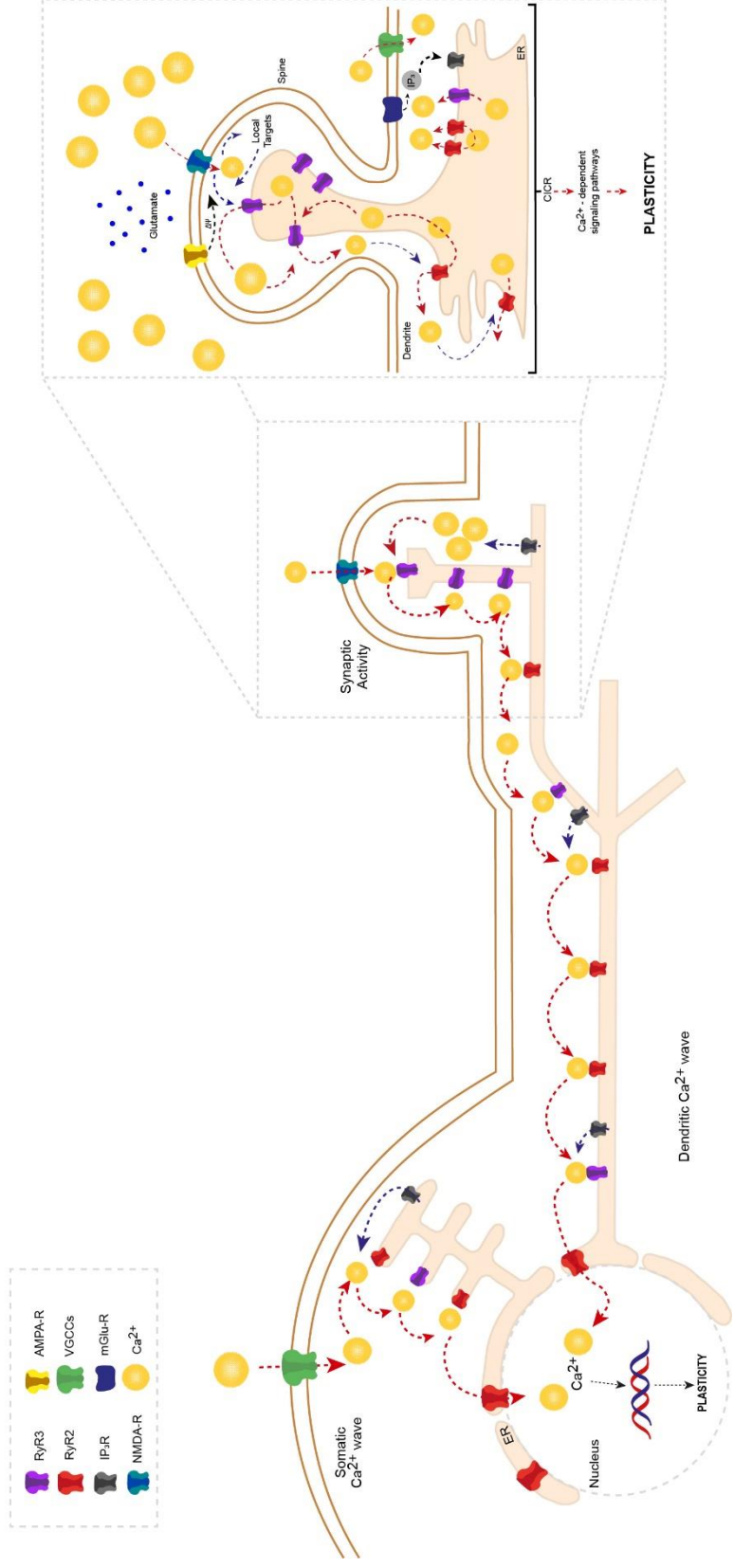


Figura 10. Esquema resumen. La figura fusiona las propuestas de: (1) Berridge, M.J., 1998 sobre la participación del RE en la amplificación hasta el núcleo de las elevaciones transitorias de Ca²⁺ (generadas en la sinapsis o en el soma), y (2) Paula-Lima, A., et al., 2014, en que se destacan a los receptores de ryanodina como protagonistas de esta amplificación vía CICR. Se incorporan los hallazgos del presente trabajo en que sería la isoforma RyR3 la que estaría presente en las espinas dendríticas, participando luego RyR2, RyR3 e IP₃R en la amplificación hasta el núcleo de las señales de Ca²⁺ generadas por la entrada de Ca²⁺ desde el extracelular vía NMDA-R o VGCCs. Esquema creado por Camila García-Navarrete.

7. Conclusiones

Respecto al trabajo planeado para esta memoria de título, se cumplieron los objetivos propuestos al: (1) determinar que RyR2 se localiza en las dendritas de las neuronas hipocampales de cultivos primarios de rata y no en las espinas dendríticas de estas (OE1); (2) visualizar espinas dendríticas de los mismos cultivos mediante la lipotransfección con RFP, y mostrando que es una señal que no se pierde con el protocolo de microscopía de expansión (OE2); (3) analizar la localización de RyR3, encontrando que se enriquece en espinas dendríticas (RyR3-h, con nula colocalización con MAP2 y presente en espinas dendríticas visualizadas con lipotransfección de RFP), y que también se halla en dendritas y soma de las neuronas hipocampales estudiadas (OE3).

En conjunto, los resultados mostrados permiten dar por cumplido el objetivo general de evaluar la localización de las dos isoformas de RyR presentes en cultivos primarios hipocampales (RyR2/RyR3), así como comprobar la hipótesis planteada de que RyR3 es la única isoforma del canal RyR presente en espinas dendríticas de neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

8. Referencias

- Abu-Omar, N., Das, J., Szeto, V., & Feng, Z. P. (2018). Neuronal ryanodine receptors in development and aging. *Molecular neurobiology*, 55(2), 1183-1192.
- Adasme, T., Haeger, P., Paula-Lima, A. C., Espinoza, I., Casas-Alarcón, M. M., Carrasco, M. A., & Hidalgo, C. (2011). Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3029-3034.
- Allen, P. B., Ouimet, C. C., & Greengard, P. (1997). Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9956-9961.
- Arias-Cavieres, A., Adasme, T., Sánchez, G., Muñoz, P., Hidalgo, C. (2017). Aging impairs hippocampal-dependent recognition memory and LTP and prevents the associated RyR up-regulation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 111.
- Asano, S. M., Gao, R., Wassie, A. T., Tillberg, P. W., Chen, F., & Boyden, E. S. (2018). Expansion microscopy: protocols for imaging proteins and RNA in cells and tissues. *Current protocols in cell biology*, 80(1), e56.
- Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. (2013). *Nat Rev Neurosci*, 14(9):593-608
- Basnayake, K., Mazaud, D., Bemelmans, A., Rouach, N., Korkotian, E., & Holcman, D. (2019). Fast calcium transients in dendritic spines driven by extreme statistics. *PLoS biology*, 17(6), e2006202.
- Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C., ... & Kreshuk, A. (2019). Ilastik: interactive machine learning for (bio) image analysis. *Nature Methods*, 16(12), 1226-1232.
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26.
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(3), 213-232.
- Breit, M., Kessler, M., Stepniewski, M., Vlachos, A., & Queisser, G. (2018). Spine-to-Dendrite calcium modeling discloses relevance for precise positioning of ryanodine receptor-containing spine endoplasmic reticulum. *Scientific reports*, 8(1), 1-17.
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. (2014). *Cell Mol Life Sci*, 71(15):2787-814.
- Bruno, A. M., Huang, J. Y., Bennett, D. A., Marr, R. A., Hastings, M. L., & Stutzmann, G. E. (2012). Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33(5), 1001-e1.
- Chami, M., & Checler, F. (2020). Targeting Post-Translational Remodeling of Ryanodine Receptor: A New Track for Alzheimer's Disease Therapy?. *Current Alzheimer Research*, 17(4), 313-323.

- Chen, F., Tillberg, P. W., & Boyden, E. S. (2015). Expansion microscopy. *Science*, 347(6221), 543-548.
- Chen-Engerer, H. J., Hartmann, J., Karl, R. M., Yang, J., Feske, S., & Konnerth, A. (2019). Two types of functionally distinct Ca²⁺ stores in hippocampal neurons. *Nature communications*, 10(1), 1-8.
- Emptage N, Bliss TV, Fine A. Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines (1999). *Neuron*, 22(1):115-24.
- Ferreiro, E., Oliveira, C. R., & Pereira, C. (2004). Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid- β peptide. *Journal of neuroscience research*, 76(6), 872-880.
- Futatsugi, A., Kato, K., Ogura, H., Li, S. T., Nagata, E., Kuwajima, G., ... & Mikoshiba, K. (1999). Facilitation of NMDA-R-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron*, 24(3), 701-713.
- Galeotti N, Vivoli E, Bartolini A, Ghelardini C. (2008). A gene-specific cerebral types 1, 2, and 3 RyR protein knockdown induces an antidepressant-like effect in mice. *J Neurochem*, 106(6):2385-94.
- Gleichmann M, Mattson MP. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. (2011). *Antioxid Redox Signal*, 14(7):1261-73.
- Hidalgo, C., & Arias-Cavieres, A. (2016). Calcium, reactive oxygen species, and synaptic plasticity. *Physiology*, 31(3), 201-215.
- Hidalgo, C., Donoso, P., & Carrasco, M. A. (2005). The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors?. *IUBMB life*, 57(4-5), 315-322.
- Hiess F, Yao J, Song Z, Sun B, Zhang Z, Huang J, Chen L, Institoris A, Estillore JP, Wang R, Ter Keurs HEDJ, Stys PK, Gordon GR, Zamponi GW, Ganguly A, Chen SRW. (2022). Subcellular localization of hippocampal ryanodine receptor 2 and its role in neuronal excitability and memory. *Commun Biol*, 5(1):183.
- Koran, M. E. I., Hohman, T. J., & Thornton-Wells, T. A. (2014). Genetic interactions found between calcium channel genes modulate amyloid load measured by positron emission tomography. *Human genetics*, 133(1), 85-93.
- Liu, J., Supnet, C., Sun, S., Zhang, H., Good, L., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2014). The role of ryanodine receptor type 3 in a mouse model of Alzheimer disease. *Channels*, 8(3), 230-242.
- Lobos, P., Córdova, A., Vega-Vásquez, I., Ramírez, O. A., Adasme, T., Toledo, J., ... & Hidalgo, C. (2021). RyR-mediated Ca²⁺ release elicited by neuronal activity induces nuclear Ca²⁺ signals, CREB phosphorylation, and Npas4/RyR2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(33).
- Matyash, M., Matyash, V., Nolte, C., Sorrentino, V., & Kettenmann, H. (2002). Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *The FASEB Journal*, 16(1), 1-25.

- Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *Journal of General Physiology*, 149(12), 1065-1089.
- Miyazaki, K., & Ross, W. N. (2013). Ca²⁺ sparks and puffs are generated and interact in rat hippocampal CA1 pyramidal neuron dendrites. *Journal of Neuroscience*, 33(45), 17777-17788.
- More, J. Y., Bruna, B. A., Lobos, P. E., Galaz, J. L., Figueroa, P. L., Namias, S., ... & Adasme, T. (2018a). Calcium release mediated by redox-sensitive RyR2 channels has a central role in hippocampal structural plasticity and spatial memory. *Antioxidants & redox signaling*, 29(12), 1125-1146.
- Mori, F., Fukaya, M., Abe, H., Wakabayashi, K., & Watanabe, M. (2000). Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neuroscience letters*, 285(1), 57-60.
- More, J., Casas, M. M., Sánchez, G., Hidalgo, C., & Haeger, P. (2018b). Contextual fear memory formation and destabilization induce hippocampal RyR2 calcium channel upregulation. *Neural plasticity*, 2018.
- Paula-Lima, A. C., Adasme, T., SanMartin, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M. A., ... & Hidalgo, C. (2011). Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxidants & redox signaling*, 14(7), 1209-1223.
- Paula-Lima, A. C., Adasme, T., & Hidalgo, C. (2014). Contribution of Ca²⁺ release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation. *Antioxidants & redox signaling*, 21(6), 892-914.
- Perni, S., & Beam, K. (2021). Neuronal junctophilins recruit specific CaV and RyR isoforms to ER-PM junctions and functionally alter CaV2. 1 and CaV2. 2. *Elife*, 10, e64249.
- Ramírez OA, Córdova A, Cerda M, Lobos P, Härtel S, Couve A, Hidalgo C. (2021). Ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release and atlastin-2 GTPase activity contribute to IP3-induced dendritic Ca²⁺ signals in primary hippocampal neurons. *Cell Calcium*, Jun;96:102399.
- Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., & Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, 31(1), 115-130.
- Santulli, G., & R Marks, A. (2015). Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain, metabolism, and aging. *Current molecular pharmacology*, 8(2), 206-222.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Segal, M., & Korkotian, E. (2014). Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 64.
- Seymour-Laurent, K. J., & Barish, M. E. (1995). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate and ryanodine

receptor distributions and patterns of acetylcholine- and caffeine-induced calcium release in cultured mouse hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 2592-2608.

Sun, Y., & Gao, X. (2017). Eliminating the Animal Species Constraints in Antibody Selection for Multicolor Immunoassays. *Bioconjugate chemistry*, 28(5), 1499-1504.

Tedoldi, A., Ludwig, P., Fulgenzi, G., Takeshima, H., Pedarzani, P., & Stocker, M. (2020). Calcium-induced calcium release and type 3 ryanodine receptors modulate the slow afterhyperpolarising current, sIAHP, and its potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Plos one*, 15(6), e0230465.

Valdés-Undurraga I, Lobos P, Sánchez-Robledo V, Arias-Cavieres A, SanMartín CD, Barrientos G, More JY, Muñoz P, Paula-Lima AC, Hidalgo C and Adasme T (2023) Long-term potentiation and spatial memory training stimulate the hippocampal expression of RyR2 calcium release channels. *Front. Cell. Neurosci.* 17:1132121.

Yao, J., Sun, B., Institoris, A., Zhan, X., Guo, W., Song, Z., ... & Chen, S. W. (2020). Limiting RyR2 Open Time Prevents Alzheimer's Disease-Related Neuronal Hyperactivity and Memory Loss but Not β -Amyloid Accumulation. *Cell reports*, 32(12), 108169.