

UCH - FC  
MAG - BMCN  
G688  
CA

**EXPLORACION DE LA DEPRESION SINAPTICA  
INDUCIDA  
POR CaMKIIN, INHIBIDOR ENDÓGENO DE CaMKII**



TESIS  
ENTREGADA A LA  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS  
PARA OPTAR AL GRADO DE

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN  
EN BIOLOGÍA MOLECULAR CELULAR Y NEUROCIENCIAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**CAMILO JOSE GOUET HIRIART**

AGOSTO 2010

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDALENA SANHUEZA TOHÁ**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

**CAMILO JOSE GOUET HIRIART**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de Agosto de 2010

**Director de Tesis:**

Dra. Magdalena Sanhueza

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dra. Úrsula Wyneken

Dr. Bernardo Morales





*A mi familia*



## Agradecimientos

El término de esta tesis representa para mí la culminación de un intenso proceso de formación científica en la Facultad de Ciencias. Me siento afortunado de haber pasado por este lugar y le agradezco a todos los profesores, funcionarios, compañeros y amigos que hicieron de este paso una muy bella experiencia.

Agradezco mucho a cada uno de los integrantes del laboratorio en que trabajé, que me acogieron con mucho cariño y de quienes pude aprender muchísimo en este tiempo. En especial le agradezco a la profe Ceci por su apoyo y sus consejos. También gracias a la "sita" por las conversaciones y su grata compañía. Y por su puesto, a mi "compayito", por los momentos de *sopenquidad*, que alegraron mucho la estadía y por haberme ayudado en épocas difíciles.

Mi tutora, "Magda". Ella fue fundamental para el desarrollo de mi tesis. Le agradezco por haberme integrado al laboratorio y por lo que me enseñó. Además, por su atención y apoyo, y por guiar amistosamente a sus alumnos en la senda del sano escepticismo.

Mis amigos también merecen un reconocimiento particular; gracias por estar ahí siempre, por haber escuchado mis descargos cuando lo necesité y también, por compartir mis regocijos en momentos de felicidad. Un saludo especial para Gabriel, Daniel, Diego y Nacho.

Y mi familia. Gracias por todo su cariño. Por la preocupación y el incansable apoyo que me han dado siempre, y sobre todo, por hacer del hogar un lugar alegre para vivir.



## Índice de Materias

1. Lista de Figuras.....	vi
2. Lista de Símbolos, Abreviaturas y Nomenclatura.....	vii
3. Resumen.....	viii
4. Abstract.....	x
5. Introducción.....	1
6. Materiales y Métodos.....	18
6.1. Apéndice: uso de CKIIN y NMDA.....	27
7. Resultados.....	30
7.1. La depresión inducida por CKIIN no comparte mecanismos de expresión con la LTD dependiente de NMDAR.....	30
7.2. La magnitud de la depresión inducida por CKIIN se correlaciona con la cantidad de CaMKII en las DPS.....	41
7.3. El mecanismo de la depresión inducida por CKIIN no incluye etapas intermedias de síntesis ni degradación de proteínas.....	44
8. Discusión.....	47
9. Conclusiones.....	59
10. Bibliografía.....	60



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura y regulación funcional de CaMKII.	6.
<b>Figura 2.</b> CKIIN causa una depresión de la transmisión sináptica que tiene un componente postsináptico persistente.	13.
<b>Figura 3.</b> Efectos de CKIIN sobre plasticidad sináptica.	13.
<b>Figura 4.</b> Calibración del protocolo para inducir LTD.	31.
<b>Figura 5.</b> Experimentos de oclusión en cámara de registros.	34.
<b>Figura 6.</b> Depresión por CKIIN no es afectada por pre-incubación con NMDA.	38.
<b>Figura 7.</b> LTD inducida por NMDA no es afectada por pre-incubación con CKIIN.	39.
<b>Figura 8.</b> Efectos diferenciales de CKIIN durante el desarrollo.	41.
<b>Figura 9.</b> Independencia de la síntesis y degradación de proteínas.	43.
<b>Figura M1.</b> Configuración experimental y registro típico.	20.
<b>Figura M2.</b> Pre-incubación en cámaras de Interfaz.	24.

## Lista de símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura



AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazolepropiónico

Hz : Hertz

min : minuto

ml : mililitro

mM: milimolar

ms : milisegundo

mV : milivolt

NMDA: N-metil-D-aspartato

$\mu$ l : microlitro

$\mu$ M : micromolar

## Resumen

Se piensa que los procesos de aprendizaje y memoria serían sustentados, al menos en parte, por modificaciones funcionales de las sinapsis. En las últimas dos décadas se ha acumulado abundante evidencia sobre la importancia de la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) en estos procesos y en la potenciación sináptica de larga duración (LTP), un modelo celular de memoria extensamente estudiado. Recientemente se ha puesto énfasis en la relevancia que tendría el complejo formado en las densidades postsinápticas (DPS) por CaMKII y el receptor activado por NMDA (NMDAR) (CaMKII-NMDAR) en la inducción de la LTP, además de la ampliamente aceptada importancia de la activación y autofosforilación de la cinasa en este proceso. Adicionalmente, diversas evidencias sugieren que el enriquecimiento de CaMKII en las DPS, que es regulado por la actividad sináptica, permitiría una función de la enzima también en los procesos que mantienen potenciada la transmisión sináptica.

CaMKIIN es una proteína endógena capaz de inhibir específicamente a CaMKII. Se ha visto que colocaliza con CaMKII en neuronas de distintas estructuras cerebrales, incluyendo las células de CA1. En experimentos conductuales se ha mostrado que la expresión de su mRNA aumenta en el hipocampo durante la fase de consolidación del condicionamiento contextual del miedo. Por otro lado, estudios *in vitro* indican que, además de inhibir a la enzima, CaMKIIN impide la formación del complejo CaMKII-NMDAR. Evidencias electrofisiológicas recientes muestran que la aplicación transitoria

de CKIIN, péptido derivado de CaMKIIN, produce una depresión persistente de la transmisión sináptica basal a nivel postsináptico en rebanadas de hipocampo y una facilitación de la posterior inducción de LTP.

En este trabajo exploramos el mecanismo de la depresión inducida por CKIIN, desarrollando un conjunto de experimentos electrofisiológicos basados en la medición de potenciales sinápticos de campo en las sinapsis CA3-CA1. Nuestra hipótesis es que la depresión resultaría de una desestabilización del complejo CaMKII-NMDAR promovida directamente por CKIIN. Nuestros resultados respaldan esta propuesta, mostrando que el mecanismo: (1) es distinto del que opera en una depresión de largo plazo (LTD) dependiente de NMDAR, (2) tendría como blanco de acción a la CaMKII unida a las DPS y (3) no incluiría síntesis ni degradación de proteínas. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que CaMKIIN podría cumplir un rol importante en la regulación de la fracción de CaMKII unida a receptores NMDA en las DPS, modulando de este modo la transmisión sináptica

Estos resultados, junto a evidencias publicadas que muestran: i) una facilitación de la LTP después del tratamiento con péptidos derivados de CaMKIIN y ii) la expresión temprana de su mRNA durante la consolidación de la memoria, sugieren que esta proteína podría tener una función más amplia de regulación de la plasticidad en el hipocampo.

## Abstract

It is thought that activity-dependent synaptic modifications could be a physiological basis of learning and memory processes. In the last two decades a plenty of evidence has been accumulated on the importance of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) in those processes and long term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity. It has recently been emphasized the importance of the complex formed in post-synaptic densities (PSD) by CaMKII and the NMDA receptor (NMDAR) (CaMKII-NMDAR) for LTP induction, besides the widely accepted importance of kinase activation and autophosphorylation in this process. Additionally, several lines of evidence suggest that the enrichment of CaMKII in PSDs, that is regulated by synaptic activity, could allow the enzyme participation also in the processes maintaining enhanced synaptic transmission.

CaMKIIN is an endogenous selective inhibitor of CaMKII and both proteins are located in the same cells in different brain areas, including CA1 pyramidal neurons. It has been shown that the expression of CaMKIIN mRNA is up-regulated after contextual fear conditioning in the hippocampus. *In vitro* studies indicate that in addition to inhibit the enzyme, CaMKIIN prevents the formation of CaMKII-NMDAR complex. Furthermore, recent electrophysiological evidence shows that transient application of CKIIN, a CaMKIIN derived peptide, produces a persistent depression of basal synaptic

transmission in hippocampal slices by a postsynaptic mechanism and facilitates further LTP induction.

In this work we explore the mechanism of synaptic depression induced by CKIIN by using an electrophysiological approach based on synaptic field potentials measurements in CA1 area. We hypothesized that CKIIN generates depression by directly interfering with CaMKII-NMDAR complex. Our results support this idea, as we showed that: (1) the mechanism is different from NMDA-dependent Long Term Depression (LTD), (2) there is a correlation between the magnitude of depression and CaMKII enrichment in DPS, suggesting that CaMKII in the PSD would be the target and (3) the mechanism does not include protein synthesis or degradation. Taken together, these observations suggest that CaMKIIN could play an important role in regulating the fraction of CaMKII bound to NMDA receptors in the DPS, modulating synaptic transmission by this way.

Moreover, given published results showing a facilitation of LTP induction after treatment with peptides derived from CaMKIIN and the expression of its mRNA during memory consolidation, it is possible to propose that this protein could play a more general role as plasticity modulator in the hippocampus.

## Introducción

### Contexto general

En las últimas décadas se ha acumulado importante evidencia experimental que sugiere que las modificaciones en la eficacia sináptica dependientes de actividad neuronal constituirían parte del sustrato fisiológico de los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y cols., 2007; Kemp y Manahan-Vaughan, 2007; Neves y cols., 2008; Kessel y Malinow, 2009). A la propiedad de las conexiones sinápticas que posibilita tales modificaciones en el tiempo se la ha llamado *plasticidad sináptica*.

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre plasticidad sináptica deriva de estudios realizados en el hipocampo. Por un lado, se cuenta con abundante evidencia clínica y experimental que relaciona a esta estructura cerebral con la *formación* de ciertos tipos de memoria (Martin y cols., 2000; Bliss y cols., 2007). Por otra parte, su organización anatómica ha facilitado la implementación de diversas aproximaciones experimentales, siendo particularmente fructíferos los estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas vivas de hipocampo (Bliss y cols., 2007).

La expresión "proceso de plasticidad sináptica", se refiere al proceso que conduce a una modificación de la eficacia sináptica y que es gatillado por ciertos patrones de actividad sináptica. Los *mecanismos celulares y moleculares* involucrados en estos procesos, aluden al conjunto de reacciones metabólicas que resultan en tal modificación. Para facilitar su comprensión y clasificación, se han distinguido tres etapas en el desarrollo de los procesos de plasticidad sináptica: *inducción, expresión y mantención*. La inducción comprende todos los eventos celulares de corta duración que gatillan el cambio en la eficacia sináptica, pero que por sí mismos no la afectan; la expresión incluye todos los mecanismos pre o postsinápticos que en *forma directa* contribuyen a aumentar o disminuir la eficacia sináptica; la mantención tiene que ver con los mecanismos que permiten la persistencia de las modificaciones sinápticas en el tiempo (Bliss y cols., 2007).

Estos mecanismos dependen, entre otros factores, de la estructura cerebral que se estudie, de la edad del animal y del tipo de protocolo de inducción que se utilice. Por este motivo, es importante aclarar que las características de los distintos procesos de plasticidad que discutiremos en esta tesis, son válidas para ratas o ratones juveniles (en torno a P20) y para la zona CA1 del hipocampo. Específicamente, para las sinapsis glutamatérgicas excitatorias entre las vías colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1.

## Receptores de glutamato tipo AMPA

Los receptores de tipo AMPA (AMPArs) transportan la mayor parte de la corriente en estas sinapsis excitatorias. Estos receptores son tetrámeros (de cuatro subunidades) y en las neuronas piramidales de hipocampo se expresan mayoritariamente las subunidades GluR1, -2, -3, constituyéndose preferentemente en forma de heterodímeros iguales, GluR1/2 y GluR2/3 (Kessel y Malinow, 2009).

Se han establecido variados protocolos de estimulación sináptica, que permiten **potenciar** (Bliss y Lomo, 1973; Otmakov y cols., 2004) o **deprimir** (Dudek y Bear, 1992; Lee y cols., 1998; Man y cols., 2000) en forma específica, la eficacia de las sinapsis excitatorias estimuladas. Adicionalmente, se ha mostrado que algunos de estos procesos inducidos por actividad pueden gatillarse en forma farmacológica, generándose una potenciación o depresión sináptica en muchas sinapsis. Respecto de los AMPARs, los procesos de plasticidad sináptica se expresan postsinápticamente mediante dos mecanismos: (1) variación en la *cantidad* de AMPARs presentes en las sinapsis o (2) variación en sus *propiedades funcionales*.

## CaMKII

La enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina cinasa II (CaMKII) es una holoenzima dodecamérica (de 12 subunidades), que en el cerebro tiene predominantemente subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Lisman y cols., 2002). Es una de las proteínas más abundantes del cerebro, constituyendo más del 2% de la proteína total (Merril y cols., 2005). Está particularmente enriquecida en las densidades postsinápticas (DPS), donde interactúa con diversas proteínas, entre ellas la proteína de anclaje PSD-95 y el receptor de glutamato activado por el agonista NMDA (NMDAR).

### *Estructura y propiedades bioquímicas*

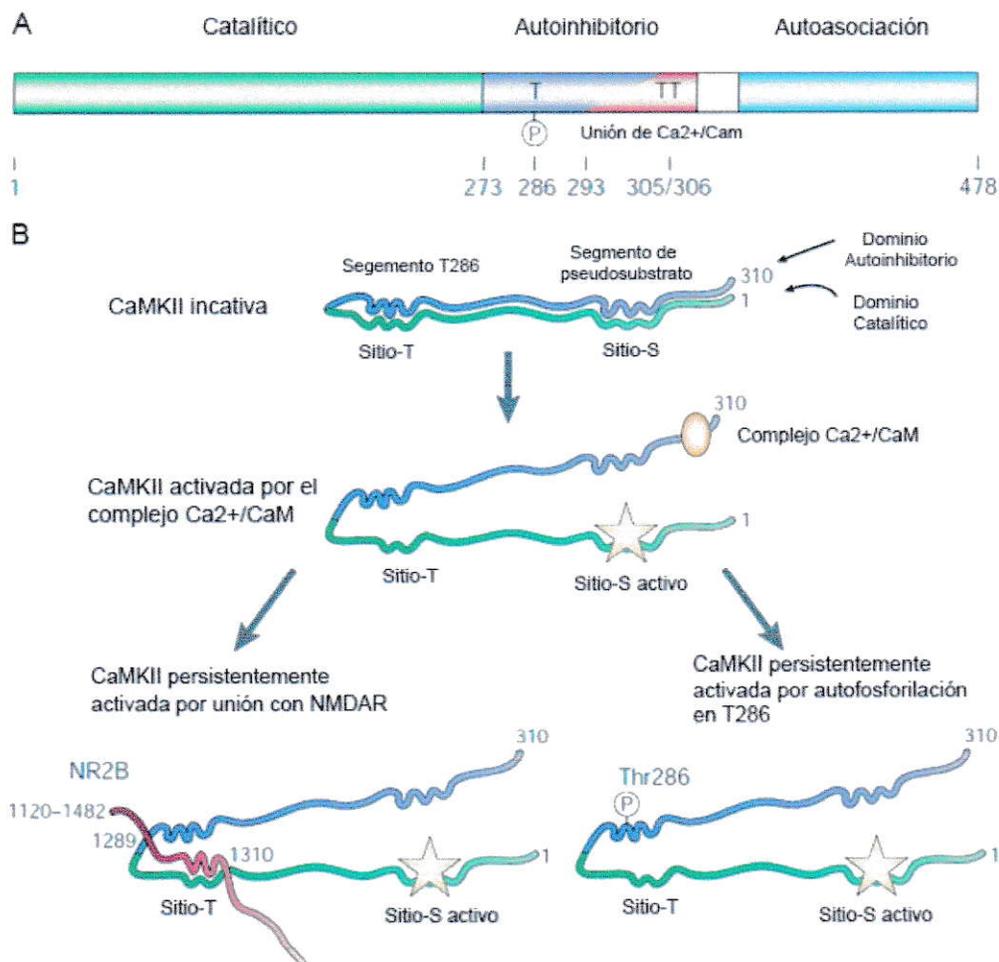
Cada subunidad de CaMKII ( $\alpha$  o  $\beta$ ) contiene 3 dominios: *catalítico*, *autoinhibitorio* y de *autoasociación*. La activación de una subunidad de CaMKII se produce cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular han aumentado por sobre el nivel basal y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina se une al dominio autoinhibitorio (Figura 1). En este estado pueden ocurrir dos eventos que la independizan de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina, volviéndola *autónoma* (Fig 1B): el primero es la autofosforilación, en que una subunidad activa fosforila el dominio autoinhibitorio de una subunidad vecina también activa. El segundo consiste en la unión del dominio catalítico de una subunidad activa a la subunidad NR2B de los NMDARs. Ambos eventos evitan que el dominio autoinhibitorio se acople al dominio catalítico (ver revisión en Lisman y cols., 2002).

Es importante hacer notar que la actividad de la enzima depende también de otros sitios de autofosforilación en el dominio autoinhibitorio, T305 y T306. La autofosforilación en estos residuos impide que el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina se una a la cinasa y la active (Griffith y cols., 2003).

#### *Participación en desarrollo de conexiones y plasticidad sináptica*

Se ha correlacionado el perfil de expresión de CaMKII durante el desarrollo postnatal con la *estabilización y maduración* de la estructura de árboles axonales y dendríticos, y con el establecimiento de circuitos funcionales en distintas zonas del sistema nervioso (Wu y Cline, 1998; Zou y Cline, 1999; Lisman y cols., 2002; Matsuo y cols., 2009).

También se sabe que la activación y autofosforilación de CaMKII es importante para el desarrollo normal de ciertas formas de *aprendizaje* y de la potenciación de larga duración LTP (Silva y cols., 1992; Otmakhov y cols., 1997; Giese y cols., 1998; Hinds y cols., 1998; Frankland y cols., 2001; Irvine y cols., 2005; Yagamata y cols., 2009). Esta forma de plasticidad sináptica corresponde a un aumento sostenido de la eficacia sináptica (Bliss y Lomo, 1973), producido por estimulación sináptica de alta frecuencia (por ejemplo, 100 Hz, 1 s). Se piensa que este tipo de potenciación podría producirse selectivamente en poblaciones de sinapsis durante el aprendizaje, permitiendo la formación de memorias (Whitlock y cols., 2006) y por más de 30 años se ha utilizado como modelo celular de memoria (Bliss y cols., 2007).



**Figura 1. Estructura y regulación funcional de CaMKII.** **A**, Estructura primaria de una subunidad de CaMKII con los diferentes dominios funcionales. T: treonina. **B**, Mecanismo de activación de CaMKII. El dominio inhibitorio está unido al dominio catalítico mientras la enzima está inactiva. El complejo Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM) activa a la enzima al separar ambos dominios y exponer el sitio activo (Sitio-S). Tanto la autofosforilación en T286 del dominio autoinhibitorio, como la unión a la subunidad NR2B del NMDAR generan actividad autónoma de la enzima. El sitio de unión de CaMKII al NMDAR (Sitio-T), sólo es accesible cuando la enzima está activada o autofosforilada. Modificado de Lisman y cols., 2002.

### *CaMKII en la LTP*

Durante la fase de *inducción* de la LTP (apertura de NMDAR y entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la espina dendrítica), se activa CaMKII. Este evento promueve su traslado hacia las DPS y su asociación a esta estructura por medio de la unión a distintas proteínas, entre ellas, NMDAR (Otmakhov y cols., 2004; Bayer y cols., 2006; Zhang y cols., 2008). El **complejo CaMKII-NMDAR** formado, resulta específicamente de la interacción entre el **sitio-T** del dominio catalítico de CaMKII y la subunidad **NR2B** del NMDAR (Fig. 1B; Bayer y cols., 2001). Se ha mostrado que este complejo es clave para la inducción de la LTP y ciertas formas de aprendizaje, ya que al impedir su formación mediante métodos bioquímicos o genéticos, hay una reducción dramática de la LTP y del aprendizaje (Barria y Malinow, 2005; Zhou y cols., 2007).

CaMKII activada participa en la *expresión* de la LTP al fosforilar AMPARs GluR1 en el residuo S831 (Lee y cols., 2000), lo que aumenta su conductancia de canal único (Derkach y cols., 1999) y al promover la inserción de AMPARs en las DPS por medio de un mecanismo no totalmente dilucidado (OH y cols., 2005; Derkach y cols., 2007). Evidencias recientes sugieren que el complejo CaMKII-NMDAR contribuiría también a la *mantención* de la LTP al favorecer la *formación de un ensamble proteico que estabilizaría a los AMPARs en las DPS* (Lisman y cols., 2002; Otmakov y cols., 2004; Sanhueza y cols., 2007). Esto y la gran abundancia de CaMKII en las DPS han sugerido que, aparte de su función enzimática, **CaMKII tendría un rol estructural importante en las DPS** (Lisman y cols., 2002; Otmakov y cols., 2004).

### *CaMKII en DPS en condiciones basales (naive)*

CaMKII es una proteína muy abundante en el cerebro y especialmente en las DPS (Merril y cols., 2005). Su perfil de enriquecimiento promedio en las DPS muestra que en los primeros días del desarrollo postnatal es prácticamente indetectable y entre P10 y P35 aumenta dramáticamente (11-12 veces; Petralia y cols., 2005).

Se sabe que en condiciones basales existe CaMKII unida a NMDARs en las DPS (Bayer y Schulman, 2001) y se ha propuesto que la acumulación de la holoenzima en esta región podría reflejar una historia de actividad sináptica (Bayer y Schulman, 2001; Otmakov y cols., 2004; Asrican y cols., 2007). Entre las evidencias que han dado mayor respaldo a esta idea destaca el hecho de que exista una *correlación positiva* entre la cantidad de CaMKII presente en cada DPS y la magnitud de la corriente evocada en la correspondiente espina (Asrican y cols., 2007). Debe notarse además, que el contenido de CaMKII varía considerablemente entre diferentes DPS, lo cual sugiere una regulación dinámica de éste (Petersen y cols., 2003). A continuación revisaremos ciertos aspectos sobre la regulación de CaMKII enfatizando la importancia fisiológica que tendría este proceso.

### **Regulación de CaMKII**

Estudios genéticos muestran la importancia de la regulación adecuada de CaMKII para los procesos de plasticidad sináptica y para el desarrollo conductual animal (Silva y

cols., 1992; Mayford y cols., 1996; Frankland y cols., 2001; Elgersma, 2004). Por ejemplo, animales con niveles de actividad de  $\alpha$ CaMKII anormalmente altos presentan dificultades en el aprendizaje y alteraciones en la plasticidad sináptica (Mayford y cols., 1996). Por otro lado, animales con bajas cantidades de  $\alpha$ CaMKII tienden a ser muy inquietos y a desarrollar estados epilépticos, además de presentar problemas de aprendizaje y dificultades para inducir LTP (Silva y cols., 1992; Frankland y cols., 2001; Lisman y cols., 2002, Elgersma, 2004).

Respecto de los mecanismos involucrados en la regulación de CaMKII, se ha mostrado que los niveles de fosforilación en T286, T305 y T306 del dominio autoinhibitorio de CaMKII, modulan tanto la actividad enzimática de la cinasa, como su dinámica de asociación/disociación de las DPS (Shen y cols., 2000; Elgersma y cols, 2002; Griffith y cols., 2003). Se piensa que las proteínas fosfatasa de tipo 1, 2A y 2C (PP1, PP2A y PP2C, respectivamente), participarían en este proceso regulatorio al ser capaces de defosforilar a CaMKII en estos residuos (Colbran, 2004).

## CaMKIIN

Hacia fines de los años 90 se descubrió una proteína endógena capaz de inhibir *específicamente* a CaMKII, a la que se llamó CaMKIIN por ser un inhibidor “natural” de esta enzima (Chang y cols., 1998). Se han descrito dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que inhiben a CaMKII de manera *no competitiva* al **unirse al sitio-T** (Vest y cols., 2007; ver Fig. 1B).

Los mRNA de ambas isoformas colocalizan con los mRNAs de las isoformas de CaMKII en las mismas células en distintas estructuras cerebrales (Chang y cols., 2001). Utilizando un anticuerpo que reconoce ambas isoformas, se ha visto que la distribución de CaMKIIN se correlaciona con la de CaMKII en distintas zonas del cerebro de rata y que en cultivo de neuronas hipocampales y *en ausencia de estimulación*, hay colocalización de CaMKIIN y CaMKII en soma y dendritas, pero no en las espinas dendríticas (donde sólo se detecta CaMKII) (Chang y cols., 2001).

### *CaMKIIN y transmisión sináptica*

En el reciente trabajo de Sanhueza y colaboradores (2007), se evaluaron los efectos sobre la transmisión basal de la aplicación extracelular transitoria del péptido Ant-CaMKIINtide (que llamaremos en esta tesis CKIIN) en una preparación de rebanadas de hipocampo. Este péptido corresponde a una fracción de  $\alpha$ CaMKIIN, capaz de internalizarse en las células (por su fusión a la secuencia Ant de Anthennapedia (Minko y cols., 2003)) y que conserva las propiedades inhibitorias específicas sobre CaMKII y

su interacción con el sitio-T (Fink y cols., 2003; Vest y cols., 2007). Los resultados muestran que en presencia de CKIIN se produce una depresión aguda de la transmisión sináptica que se revierte sólo en un 50% al retirar la droga (Fig. 2A). Se pudo determinar que si bien la primera fase aguda es causada por una combinación de efectos a nivel del elemento postsináptico y de modificaciones en la excitabilidad presináptica, sólo las **modificaciones postsinápticas son persistentes**. Asimismo, se mostró que la depresión persistente es saturable.

#### *CaMKIIN y plasticidad sináptica*

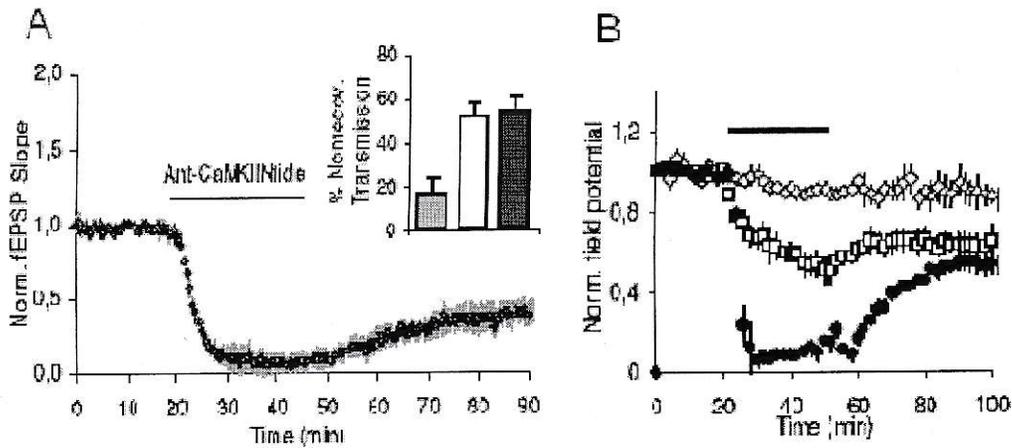
En el mismo trabajo se describen dos efectos interesantes que provoca el tratamiento transitorio con CKIIN sobre la LTP (Fig. 2B): (1) Es posible reinducir LTP en vías que han sido saturadas previamente a la aplicación de la droga. (2) La magnitud de la LTP que se induce en las vías *naive* es varias veces mayor que la inducible en condiciones normales.

#### *Regulación de CaMKIIN*

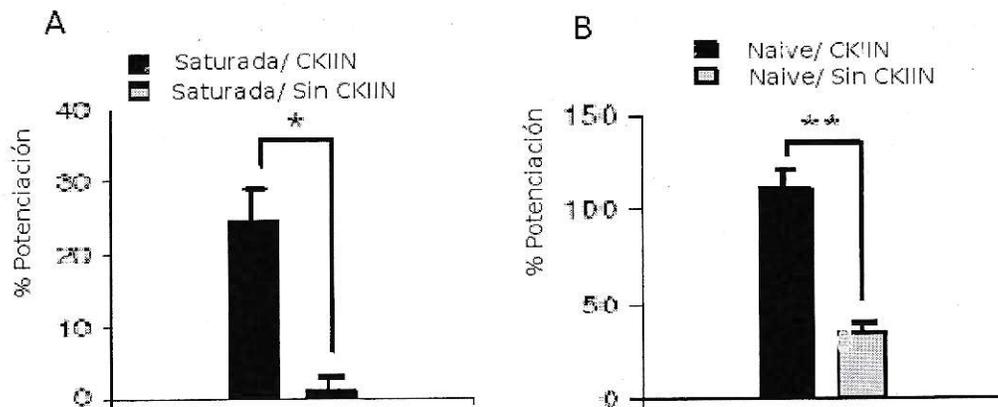
Interesantemente, se ha reportado que el mRNA de  $\alpha$ CaMKIIN *aumenta* luego de inducir un condicionamiento del miedo que involucra claves contextuales (Lepicard y cols., 2006). La temporalidad y magnitud de este aumento son similares a las de los “genes de expresión temprana” (IEGs), aquellos cuya expresión es aumentada por actividad neuronal intensa. Notablemente, este aumento se restringe *exclusivamente* al

hipocampo y la amígdala, estructuras que se sabe son clave para la *formación* de esta forma de memoria, entre otras (McClelland y cols., 1995; Martin y cols., 2000).

No se sabe qué implicancias tiene el aumento del mensajero en estas estructuras, pero podría tratarse de un mecanismo de regulación negativa de CaMKII (Lepicard y cols., 2006). En este sentido, resulta intrigante que CaMKIIN inhiba específicamente a CaMKII uniéndose al sitio-T, el mismo sitio de interacción de la enzima con la subunidad NR2B de los NMDARs (Vest y cols., 2007; Bayer y cols., 2001). Esto abre la posibilidad de que CaMKIIN interfiera con la unión estable de la enzima a las DPS.



**Figura 2. CKIIN causa una depresión de la transmisión sináptica que tiene un componente postsináptico persistente.** **A**, Efecto de 5  $\mu$ M CKIIN sobre la transmisión basal. Notar que la recuperación es parcial. En el Inserto se muestra que el porcentaje de la transmisión que no se recupera (depresión persistente) es saturable (gris y blanco: 3 y 5  $\mu$ M por 30 min, respectivamente; negro: 10  $\mu$ M por 2 h). **B**, La estimulación presináptica fue alternada con aplicación local de pulsos del agonista glutamatérgico AMPA (CKIIN es aplicado en el baño (barra)). (●): EPSP (Potencial postsináptico excitatorio), (□): respuesta a AMPA, (□): control AMPA. **C**, Luego de lavar el inhibidor, las componentes persistentes de los efectos sobre EPSP y AMPA son similares. Norm.: Normalizado. Modificado con autorización de Sanhueza y cols., 2007.



**Figura 3. Efectos de CKIIN sobre plasticidad sináptica.** **A**, Gráfico resumen de la magnitud de la LTP reinducida con una serie de tétanos en vías previamente saturadas, tras la aplicación de CKIIN 5 $\mu$ M por 30 min o vehículo (n=9). **B**, Lo mismo que en A, pero la serie de tétanos se aplica sobre la vía *naive* (n=9). Modificado de Sanhueza y cols., 2007.

## La propuesta de trabajo

Motivados por los antecedentes anteriores que sugieren que CaMKIIN podría participar en plasticidad sináptica al regular a CaMKII, estudiamos el **mecanismo** asociado con la **depresión** de la **transmisión sináptica basal** inducida por CKIIN (Fig 2A). Nuestra hipótesis de trabajo fue que CKIIN induce esta depresión por interferencia directa con el complejo CaMKII-NMDAR.

Lo primero que averiguamos fue si este proceso comparte *mecanismos de expresión* con la depresión de largo plazo dependiente de NMDAR (LTD). En esta forma de plasticidad se produce entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los NMDAR y activación de proteínas fosfatasa, promoviéndose finalmente la desfosforilación de AMPARs y su endocitosis (Lee y cols., 2000; Kemp y Bashir, 2001; Kessel y Malinow, 2009). Si bien no existe una conexión evidente de CaMKII con la LTD, nos pareció sugerente que los protocolos que inducen normalmente esta forma de depresión (típicamente 900 pulsos a 1 Hz (LFS) o la aplicación transitoria del agonista NMDA) pueden producir fenómenos similares a los observados cuando se aplica transitoriamente CKIIN (ver Figura 2). Por un lado, tanto la transmisión basal como la potenciada son deprimidas luego de aplicar estos protocolos (Dudek y Bear, 1993; Lee y cols., 1998). Por otra parte, es posible reinducir LTP en vías previamente saturadas y despoteñadas por LFS. Adicionalmente, se observan LTPs proporcionalmente mayores en las vías que han sido deprimidas con anterioridad (Dudek y Bear, 1993; Lee y cols., 1998). Por estas razones, era posible que

CKIIN estuviese realmente generando LTD, quizás por medio de un efecto inespecífico, como por ejemplo un aumento de la actividad sináptica en las rebanadas tratadas.

En segundo lugar, investigamos si la magnitud de la depresión persistente causada por CKIIN se correlaciona con la cantidad de CaMKII presente en las DPS. Para ello comparamos la magnitud de la depresión en dos períodos del desarrollo postnatal, teniendo presente que el enriquecimiento promedio de CaMKII en las DPS aumenta dramáticamente durante el primer mes postnatal (Petralia y cols., 2005)

Para investigar sobre posibles etapas intermedias en el mecanismo, evaluamos la dependencia de síntesis de proteínas y su degradación por la vía del proteasoma. Estos procesos han sido relacionados con diversas formas de plasticidad sináptica y con etapas particulares en el desarrollo de ellas (Huber y cols., 2000; Huber y cols., 2001; Karpova y cols., 2006).

## **Hipótesis del Trabajo**

La proteína CaMKIIN, inhibidor endógeno de la enzima CaMKII, produce una depresión de la transmisión sináptica al interferir directamente con el complejo CaMKII-NMDAR.

## **Objetivos**

Objetivo general:

Determinar si la depresión persistente de la transmisión sináptica basal producida por CKIIN corresponde a un proceso tipo LTD y evaluar si la CaMKII unida a las DPS constituye un blanco de acción directo en esta forma de plasticidad inducida por métodos farmacológicos.

Objetivos específicos:

1. A partir de los protocolos que se han descrito para la inducción de LTD dependiente de NMDAR seleccionar uno que nos permita inducir LTD de manera eficiente y reproducible.
2. Determinar si la depresión persistente de la transmisión sináptica basal generada por CKIIN comparte mecanismos de expresión con una LTD dependiente de NMDAR.
3. Determinar si la depresión persistente gatillada por CKIIN se correlaciona con la

cantidad de CaMKII presente en las DPS.

4. Evaluar si la depresión sináptica inducida por CKIIN requiere de la activación de vías metabólicas que involucren síntesis o degradación de proteínas.

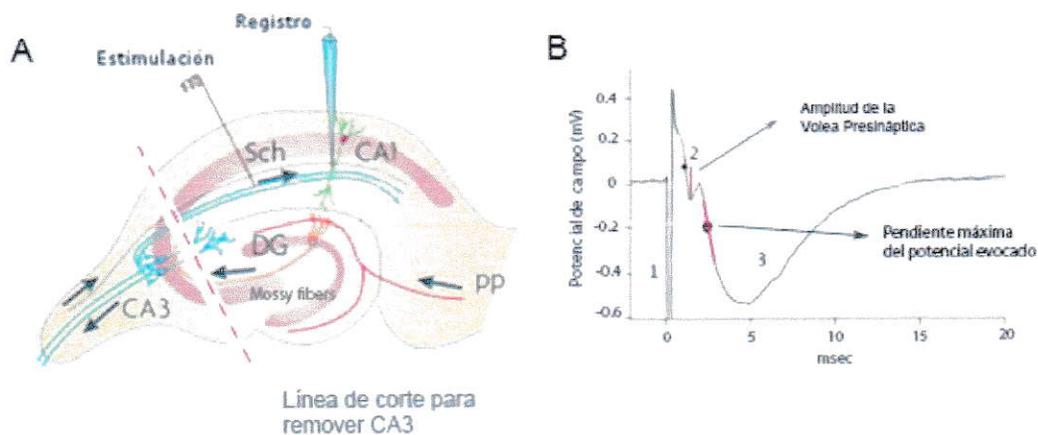
## Materiales y Métodos

El trato brindado a los animales utilizados durante este trabajo, provenientes del Vivero Central de la Pontificia Universidad Católica de Chile, se hizo siguiendo los protocolos establecidos por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

**Preparación de rebanadas.** Siguiendo los procedimientos de disección estándar (Moyer y Brown, 2002), se obtuvieron rebanadas transversales de hipocampo ( $400\mu\text{m}$ ) de ratas Sprague Dawley, neonatas (P7-P10) y juveniles (P18-P25). En la preparación de rebanadas de ratas juveniles se utilizó líquido cefalorraquídeo artificial de disección (LCRADis) frío ( $\sim 2^{\circ}\text{C}$ ), cuya composición en mM fue: NaCl 125, KCl 2.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.25,  $\text{NaHCO}_3$  25, Glucosa 10,  $\text{MgCl}_2$  10,  $\text{CaCl}_2$  1. La composición de LCRADis que se utilizó para las ratas neonatas fue, en mM: Sacarosa 212.7, KCl 2.6,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.23,  $\text{NaHCO}_3$  25, Glucosa 10,  $\text{MgCl}_2$  10,  $\text{CaCl}_2$  1. A todas las rebanadas preparadas se les removió la zona CA3, para evitar que los tratamientos farmacológicos activasen esta zona y se gatillase actividad sináptica inespecífica en la zona CA1 (Figura M1.A). Luego las rebanadas fueron mantenidas en una cámara de inmersión con LCRA cuya composición en mM fue: NaCl 125, KCl 2.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.25,  $\text{NaHCO}_3$  25, Glucosa 10,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  2. Esto se realizó a temperatura ambiente, durante 2 horas, antes de efectuar los experimentos. Las rebanadas fueron mantenidas bajo oxigenación constante con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ .

**Experimentos Electrofisiológicos.** Luego de preparar las rebanadas y mantenerlas en reposo durante 2 horas, se transferían cuidadosamente a la cámara de registros, conectada a un sistema de perfusión donde circulaban 10 ml de LCRA a una tasa de 2 ml/min, por la acción de una bomba peristáltica (Masterflex). La solución se burbujeaba constantemente con la mezcla 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> en una jeringa que contenía aproximadamente 7 ml de la solución circulante. Los experimentos se realizaban a 30°C. Para los registros de potenciales de campo se utilizaron electrodos de vidrio (0.3-0.6 MΩ) llenos con LCRA y para la estimulación presináptica, electrodos bipolares concéntricos de Pt/Ir (FHC, St Bowdoin, ME).

El electrodo de registro se situó en el stratum radiatum de la zona CA1 (Figura M1). El electrodo de estimulación también lo ubicamos en el stratum radiatum a una distancia de aproximadamente 300µm, ya sea hacia el subículo o hacia CA3, alternando entre experimentos. En los experimentos en que se indujo LTD por LFS (aplicación de 900 pulsos a 1 Hz), se utilizaron dos electrodos de estimulación, uno para la vía test y otro para la vía control, que fueron situados a cada lado y a la misma distancia del electrodo de registro. La amplitud del estímulo se fijó en el valor que generó entre un 60 a 70% de la respuesta máxima (definida por la aparición de la espiga poblacional, *pop-spike*). La frecuencia de estimulación en todos los experimentos fue 0.033 Hz, salvo en algunos de calibración, donde se utilizó una frecuencia de 0.05 Hz.



**Figura M1. Configuración experimental y registro típico.** A, Esquema de una rebanada transversal de hipocampo. Se muestran las 3 vías principales que componen el circuito trisináptico, entre la zona del giro dentado (DG) y las zonas CA3 y CA1. El primer grupo de sinapsis de este circuito se da entre las neuronas que componen la vía perforante (PP) y las células granulares de DG. Estas neuronas proyectan sus axones hacia CA3 (mossy fibers) donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales de esta zona, constituyendo el segundo grupo de sinapsis del circuito. El tercero se da entre los axones de las neuronas de CA3, que componen la vía colateral de Schaffer (Sch) y las neuronas piramidales de CA1. A todas las rebanadas les removíamos la zona CA3 con un corte equivalente al de la figura. El electrodo de registro lo situábamos en el stratum radiatum de la zona CA1, donde se encuentran las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Para estimular Sch, ubicábamos el electrodo de estimulación en el stratum radiatum, hacia la zona CA3 o hacia el lado opuesto, a 300  $\mu\text{m}$  de distancia. B, Registro típico del potencial de campo en función del tiempo, obtenido en condiciones basales bajo la configuración experimental mostrada en A. Los números indican los componentes de la señal: (1) artefacto de estimulación, provocado por la carga y descarga del electrodo de estimulación. (2) volea presináptica, producida por la descarga de potenciales de acción de los axones presinápticos. Para cuantificar esta componente medíamos la amplitud entre el mínimo local y el punto de inflexión anterior a él (marcado con un punto), en esta región del registro. (3) El potencial evocado, correspondiente a una deflexión negativa del potencial generada por un conjunto de sinapsis. El valor negativo se debe a que en esa zona particular hay una disminución *neto* de la densidad de cargas positivas producida por las sinapsis excitatorias. Esta componente la cuantificábamos tomando el valor máximo (absoluto) de la pendiente en la fase inicial del evocado, tal como se indica en la figura. (A) Esquema modificado de Neves y cols., 2008, (B) Registro obtenido en nuestro laboratorio.

En todos los experimentos se registró durante 20 min previo a la aplicación de cualquier tratamiento (estimulación eléctrica o aplicación de drogas), para tener una medida de la actividad basal. Los potenciales de campo fueron registrados utilizando un amplificador diferencial (A-M Systems), en el rango 1Hz - 5KHz y para la estimulación utilizábamos un estimulador Isostim A320 WPI. Estos aparatos estaban conectados a un convertidor de señales análogo-digital, acoplado a un computador personal, que tenía incorporado el programa IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Este sistema nos permitió generar los protocolos de estimulación, observar y analizar parcialmente los registros mientras cursaba el experimento y finalmente almacenar los datos para su posterior análisis.

Una de las características que tiene la estación de trabajo que utilizamos, es que permite hacer registros simultáneos en dos rebanadas. Este sistema, además de permitir una mayor eficiencia en la realización de experimentos que requieren múltiples repeticiones, nos permitió evaluar los efectos que *un mismo tratamiento* experimental podía tener sobre una rebanada test y una control. Esto fue particularmente útil en los experimentos de pre-incubación (Figs. 6 y 7) y en los experimentos con animales de diferentes edades (Fig. 8).

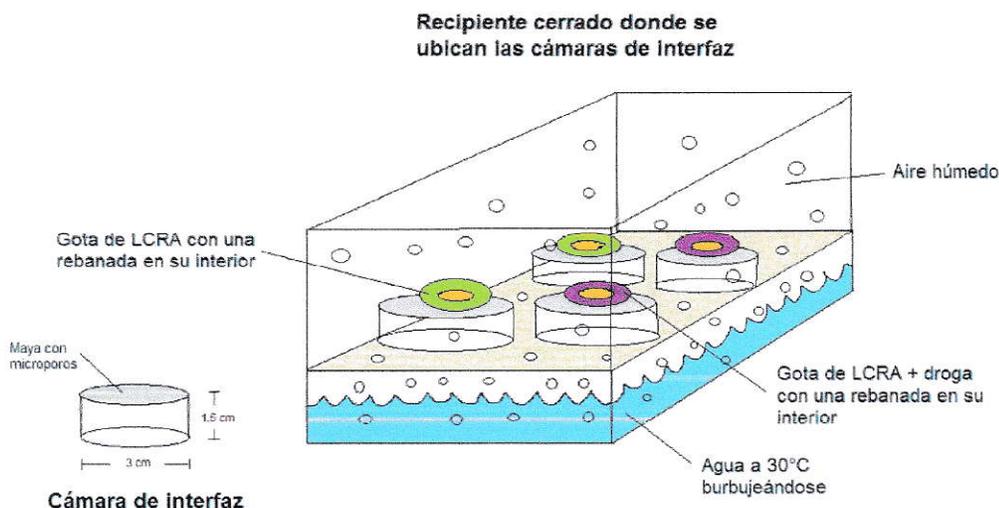
### **Experimentos de oclusión con pre-incubación de rebanadas**

Para la pre-incubación de las rebanadas, se utilizaron insertos para cultivo como cámaras de interfaz (NUNC Brand Products). Estos pequeños pocillos cilíndricos de plástico, huecos y cubiertos en una de sus caras por una membrana de policarbonato con microporos (8  $\mu\text{m}$  de diámetro), permiten la difusión de gases (ver Figura M2). En un recipiente cerrado, a 30°C, saturado con la mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> húmeda, se colocaron un grupo de cámaras de interfaz y sobre la superficie porosa de cada una de éstas se almacenó una rebanada en una gota (aprox. 200 $\mu\text{l}$ ) de LCRA (Fig. M2). Para incubar las rebanadas con NMDA o con CKIIN, se preparó en un recipiente externo, una solución de LCRA oxigenado, que contenía alguna de las drogas en su concentración final (CKIIN, 5 $\mu\text{M}$ ; NMDA, 20 $\mu\text{M}$ ) y otro sólo con LCRA para las rebanadas controles. Luego, se utilizó una pipeta pasteur de vidrio, con la cual se reemplazó la gota inicial de LCRA por una gota de LCRA con la droga (rebanadas tests) o por una gota de LCRA regular (rebanadas controles). Cumplido el tiempo de incubación (ver esto más adelante) se volvió a reemplazar la gota, pero esta vez por LCRA regular, tanto en las rebanadas test, como en las controles. Terminado este procedimiento, se transfirieron una rebanada test y una rebanada control a la cámara de registros, para evaluar la magnitud de la depresión provocada por la droga complementaria a la utilizada en la pre-incubación.

Para provocar la depresión inducida por CKIIN en las cámaras de interfaz, se incubaron las rebanadas con CKIIN (5 $\mu\text{M}$ ) por 30 min. Para estimar el grado de depresión que generaba este tratamiento, se comparó, en la cámara de registros, la magnitud de los

potenciales evocados en una rebanada test y otra control, para un mismo valor de volea presináptica. La amplitud del estímulo en las rebanadas controles se fijó en el valor que generó entre un 60 a 70% de la respuesta máxima. En el caso de las rebanadas test la amplitud de estimulación se fijó de tal modo que la magnitud de la volea presináptica fuese igual a la del registro control. Con estos valores de transmisión sináptica y volea presináptica se inició la segunda parte de estos experimentos de oclusión, en que se aplicó NMDA ( $20\mu\text{M}$ ) por 5 min (Figura 6).

Para inducir la LTD en las cámaras de interfaz se incubaron rebanadas con NMDA ( $20\mu\text{M}$ ) por 10 min, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Para estimar la magnitud de la LTD, se compararon las curvas entrada-salida entre las rebanadas test y rebanadas controles, obtenidas en la cámara de registros. Estas curvas se generaron graficando la volea presináptica versus la magnitud del potencial evocado (ver más adelante la cuantificación de estas variables), para valores crecientes de intensidad de estimulación y para cada par de rebanadas (test y control). Luego se ajustó a una recta la parte inicial de las curvas obtenidas y se compararon las pendientes resultantes del ajuste. La parte inicial se consideró desde el origen hasta los niveles en que la magnitud del evocado no aumentara con la volea presináptica (saturación).



**Figura M2. Pre-incubación en cámaras de Interfaz.** Diagrama representativo de los materiales utilizados para pre-incubar rebanadas con NMDA o con CKIIN. A la izquierda una cámara de interfaz. Se indican sus dimensiones aproximadas y en gris se representa la superficie microporosa que permite la difusión de gases. El agua que se ubica en la parte inferior del recipiente de la derecha, se burbujea con la mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Las cámaras se posan sobre una rejilla plástica (en color beige) que permite el paso de aire húmedo. Las gotas en verde representan LCRA y las gotas en color morado representan LCAR con NMDA o CKIIN. Ver texto para la descripción del procedimiento de pre-incubación.

### **Péptido inhibidor y otros reactivos:**

*Procedencia:* CKIIN (RQIKIWFQNRRMKWKK-RPPKLGQIGRSKRVVIE DDRIDDVLK) lo obtuvimos del Biopolymer Synthesis Center (California Institute of Technology); NMDA (Sigma Aldrich), anisomicina (Tocris Bioscience); Mg-132 (Tocris Bioscience), TTX (Sigma Aldrich). Todas las sales utilizadas (Merck).

*Preparación:* A partir de los envases originales, se generaron alícuotas de volúmenes y concentraciones particulares para cada droga. Anisomicina y MG-132 fueron disueltas

en DMSO, a una concentración que no excedió el 0.2%. CKIIN y NMDA se disolvieron en agua bidestilada. Las alícuotas fueron mantenidas en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , salvo anisomicina que fue mantenida en un refrigerador a  $2^{\circ}\text{C}$ .

*Aplicación:* Durante la aplicación de las drogas a las rebanas en la cámara de registros, se agregó a la jeringa todo el volumen de solución contenido en las alícuotas (5-25  $\mu\text{l}$ ), utilizando una micropipeta adecuada para cada caso. Para lavar en el tiempo que correspondiese, se abrió el circuito de recirculación y se hizo pasar 30 ml de LCRA, que se habían sido mantenidos en un reservorio aparte, con las mismas condiciones de burbujeo que en el baño. Posteriormente, se reinició la circulación de la solución.

**Análisis de datos y estadística.** El procesamiento de datos y los análisis estadísticos, se hicieron utilizando el programa IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Para cuantificar los potenciales sinápticos de campo se midió el valor máximo de la pendiente de las respuestas evocadas durante la fase inicial (Fig. M1B). La volea presináptica se cuantificó midiendo la amplitud entre el punto mínimo y el punto de inflexión anterior a él (donde la segunda derivada del potencial es cero), en esta zona del registro. La medición de la amplitud de la volea en relación a la línea base (nivel de potencial previo a la estimulación), resultó poco satisfactoria en nuestro caso, puesto que el artefacto de estimulación (específicamente la fase de descarga del electrodo) se sobreponía con la señal biológica produciéndose una distorsión del registro fisiológico temprano. De este modo, se introducía un error en la estimación del efecto provocado por un tratamiento sobre esta componente presináptica. Para evaluar si el criterio utilizado era adecuado, se realizó una serie de experimentos ( $n=6$ ) donde se pudo separar las componentes

biológicas y artefactuales: al aplicar TTX luego de obtener una serie de registros en condiciones normales, se eliminó del registro toda actividad biológica y de ese modo fue posible obtener el trazo correspondiente al artefacto. Para obtener el trazo correspondiente a la actividad biológica, se restó el artefacto al registro completo. Con esta serie se determinó que el criterio del punto de inflexión tiene un error de un 10% aproximadamente.

En los experimentos de calibración (Fig. 4) y en los experimentos de oclusión largos (Fig. 5) no se pudo estimar el valor de la volea con ningún método razonable, debido a la gran amplitud que presentaban los artefactos de estimulación en los registros.

La eficacia sináptica se estimó calculando el cociente entre la pendiente del potencial evocado y la magnitud de la volea presináptica, para cada uno de los registros obtenidos.

La normalización de los datos se hizo dividiendo cada uno de los valores de eficacia sináptica (o la pendiente del potencial evocado) obtenidos durante el experimento, por el valor promedio de actividad basal. Para estimar el nivel de depresión causado por cada tratamiento se consideró el valor promedio de las variables normalizadas, obtenido en un intervalo de 10 min entorno al tiempo post-tratamiento que se indica en cada una de las series de experimentos. La renormalización en los experimentos de oclusión en la cámara de registros (Fig. 5) se hizo considerando los valores de transmisión 10 min previos a la aplicación del segundo tratamiento (CKIIN o NMDA). Todos los procedimientos que se describieron fueron automatizados gracias a la implementación de un programa computacional diseñado por Germán Fernández.

Para los análisis estadísticos utilizamos el Test de Student normal y pareado, dependiendo del caso. El criterio que utilizamos para la significancia estadística fue  $p < 0.05$ . Los valores de las medidas indicadas en el texto corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

#### **Apéndice: uso de CKIIN y NMDA.**

##### *CKIIN*

Se ha reportado que el péptido Ant presenta un altísimo nivel de adsorción en superficies plásticas y de vidrio, debida tanto a interacciones electrostáticas como hidrofóbicas (Persson y cols., 2003). Estas observaciones nos obligaron a mantener un riguroso cuidado de las condiciones de limpieza en que desarrollamos los experimentos. En este sentido, creemos que la gran variabilidad observada al aplicar CKIIN después del NMDA en los primeros experimentos de oclusión (experimentos en que los tratamientos secuenciales se realizaban en la cámara de registros, Fig. 5A) podría deberse a un manejo inadecuado de estos factores. Estas posibles fuentes de variabilidad fueron minimizadas al implementar el sistema de registro simultáneo de rebanadas provenientes del mismo animal, que habían sido pre-incubadas con NMDA o LCRA, y que en la cámara de registro eran sometidas a la misma solución circulante y aplicación de CKIIN (Fig. 6).

## *NMDA*

Se ha observado que el NMDA pierde su efectividad para producir LTD después de que las rebanadas son mantenidas por períodos largos (entre 1 y 2 horas) en las cámaras de registros (H.K. Lee, comunicación personal). Estas son las condiciones de nuestros experimentos de oclusión largos (Fig. 5B), y por ello es razonable proponer que los fallos en el efecto del NMDA (4 de 7 experimentos) se deberían a una dificultad de este tipo y no a una oclusión.

Se ha reportado que con el tiempo las rebanadas experimentan cambios en los niveles de fosforilación de ciertas proteínas vinculadas con procesos de plasticidad (entre otras, AMPARs) (Ho y cols., 2004). Es posible que en la cámara de registros esté ocurriendo un fenómeno de esta clase, cuya manifestación no es evidente y que impide que el proceso gatillado por NMDA curse con normalidad en experimentos de larga duración. Este problema lo solucionamos pre-incubando rebanadas con CKIIN o LCRA en cámaras de interfaz, aplicando posteriormente en éstas, el tratamiento con NMDA en la cámara de registros (Fig. 7).

## Resultados

### **1. La depresión inducida por CKIIN no comparte mecanismos de expresión con la LTD dependiente de NMDAR.**

En la primera parte del trabajo desarrollamos dos series de experimentos de oclusión para determinar si la depresión sináptica inducida por CKIIN comparte mecanismos de expresión con una LTD dependiente de NMDAR. Recordemos que los mecanismos de expresión son los que contribuyen a modificar de manera directa la eficacia sináptica.

Para describir el racional de los experimentos de oclusión, llamaremos “tratamiento” tanto a las estimulación sináptica de baja frecuencia (LFS) como a la aplicación de agentes farmacológicos que produzcan depresión sináptica (CKIIN o NMDA, ver más adelante). En general, los experimentos de oclusión consisten en la aplicación secuencial de dos tratamientos y la interpretación de los resultados se basa en que los mecanismos de inducción de plasticidad sináptica son saturables. Por ejemplo, el nivel de depresión inducida por la aplicación de varios protocolos de LFS tiene un límite, más allá del cual, la estimulación no tendrá efecto. De este modo, si dos procesos de depresión sináptica comparten total o parcialmente sus mecanismos de expresión, se espera observar que el efecto del segundo tratamiento sea suprimido o disminuido por la aplicación del primero.

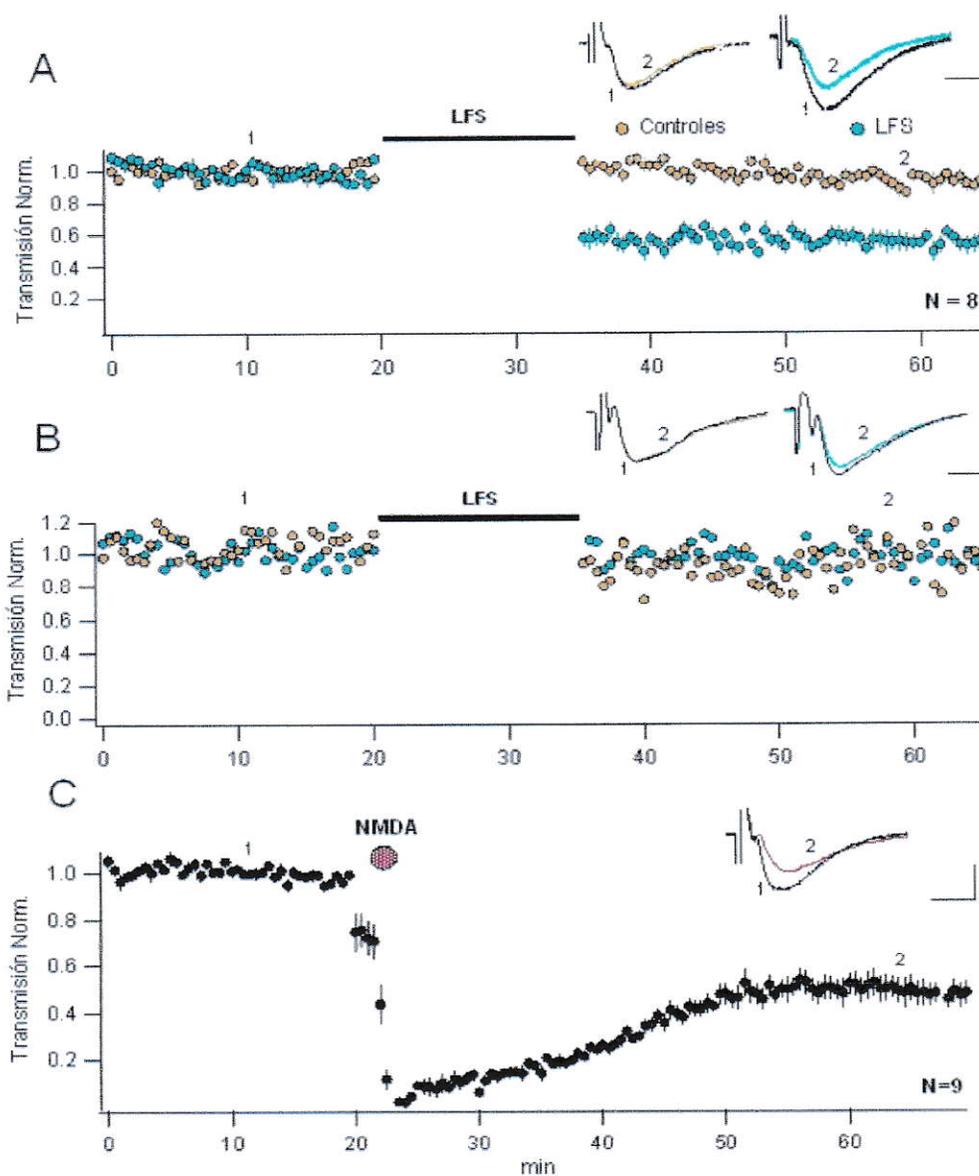
Para que estos experimentos sean concluyentes se deben cumplir dos requisitos claves: que los efectos provocados por cada uno de los tratamientos sean reproducibles, y que al menos uno de ellos provoque un efecto cercano al nivel saturante.

### *1.1. Primera aproximación: experimentos de oclusión en cámara de registros.*

#### *1.1.1. Calibración de los protocolos.*

En nuestro caso ya contábamos con el antecedente de que la aplicación extracelular de CKIIN 5 $\mu$ M por 30 min provoca una depresión saturante de la transmisión sináptica cercana un 50% (Sanhueza y cols., 2007).

Para la inducción de la LTD dependiente de NMDAR probamos como primera alternativa la utilización de un protocolo de estimulación presináptica de baja frecuencia: LFS: 900 pulsos a 1 Hz. (Dudek y Bear, 1992; Lee y cols., 2000; Kemp y Bashir, 2001). El criterio para evaluar si un tratamiento producía o no LTD fue que produjese una depresión mayor o igual a un 25% respecto de la vía control, midiendo a los 25 min post-LFS. En la Fig. 4A se muestra un resumen de todos los experimentos en que se indujo LTD por LFS. La transmisión sináptica se redujo en un 40%  $\pm$  4% del valor registrado en la vía control (n=8). En la Fig. 4B se muestra un experimento representativo en que no se indujo LTD por LFS (8 de 16 experimentos). Debido al bajo grado de reproducibilidad observado optamos por descartar este protocolo para inducir LTD.



**Figura 4. Calibración del protocolo para inducir LTD.** A. Gráfico promedio de todos los experimentos en que se indujo LTD a través de LFS (1Hz por 15 min). B. Experimento representativo en que falla la inducción de LTD luego de LFS (8 de 16 experimentos). C. Gráfico resumen de todos los experimentos en que se indujo LTD aplicando NMDA ( $20\mu\text{M}$ , 5 min). En todos los gráficos el inserto corresponde al promedio de 8 registros consecutivos obtenidos en los tiempos indicados por los números, en un experimento representativo de cada caso. Calibración: 0.4mV, 5ms. Norm.: Normalizada.

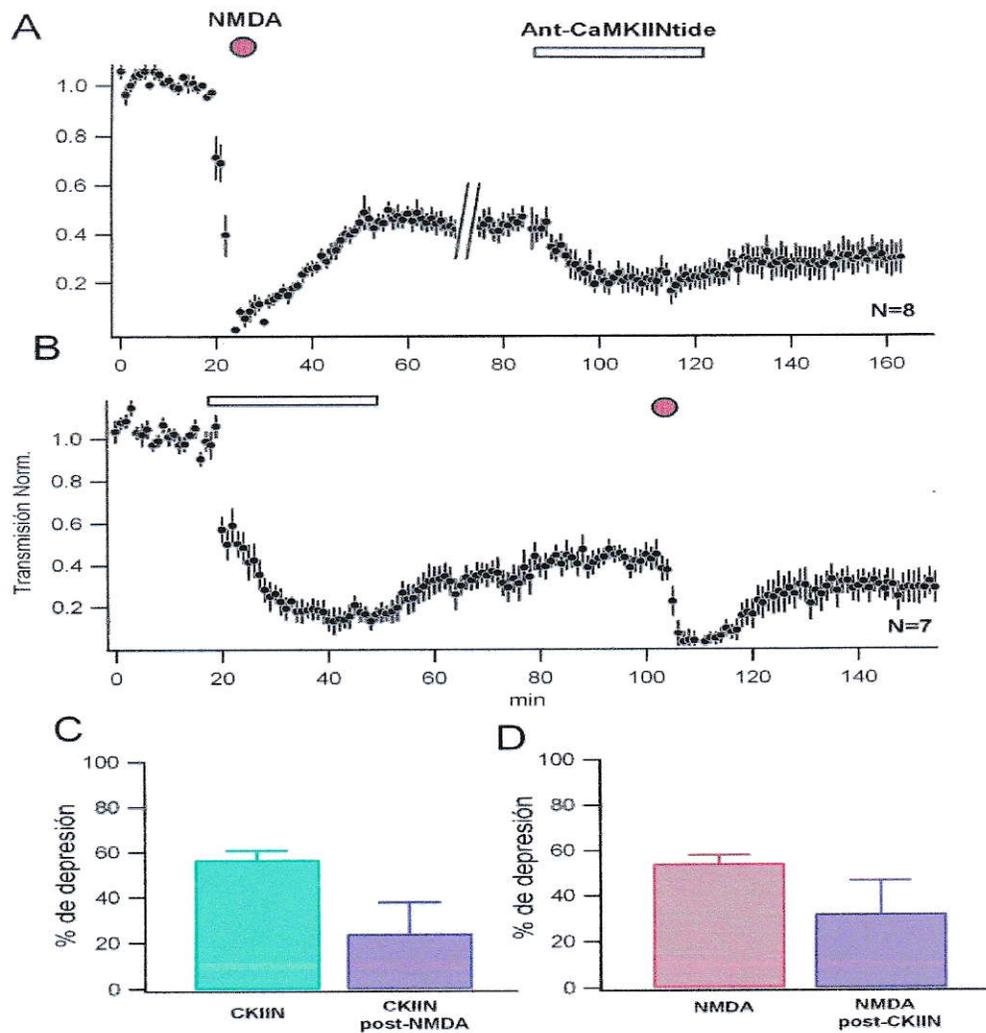
En segundo lugar probamos un método farmacológico. Utilizamos los trabajos de Lee y cols. (1998) y Kameyama y cols. (1998), como referencias de un método que en la actualidad es ampliamente usado para inducir LTD dependiente de NMDAR por medios bioquímicos. Así, pudimos determinar que en nuestras condiciones experimentales, la aplicación de NMDA (20 $\mu$ M por 5 min) provocaba una depresión significativa de la transmisión sináptica basal, medida a los 40 min post-NMDA (Fig. 4C, 51%  $\pm$  5% n = 9, p < 0,001). En este caso, nuevamente consideramos efectivos los tratamientos en que el nivel de depresión fuese mayor o igual al 25%, comparando esta vez con el nivel basal. Utilizando este criterio, encontramos que el efecto observado era reproducible (sólo 1 de 10 inducciones falló) y por lo tanto decidimos implementar este protocolo para el desarrollo de los experimentos de oclusión.

#### *1.1.2. Aplicación secuencial de CKIIN y NMDA.*

Con el fin de evaluar si había o no oclusión entre ambos efectos, comparamos la magnitud de la depresión provocada por cada tratamiento cuando era aplicado en primer lugar (desde la condición basal), con la depresión generada cuando era aplicado después del otro tratamiento. En este último caso, al momento de analizar los resultados, se renormalizaba respecto del nivel de transmisión que había 10 min antes de la segunda aplicación.

En la Figura 5 se muestra un resumen de los experimentos realizados aplicando secuencialmente NMDA y CKIIN, y viceversa. Si bien se aprecia que CKIIN provoca en promedio un menor efecto cuando se aplica posterior al NMDA que desde la condición basal (Fig. 5B), las diferencias no son estadísticamente significativas. En la Figura 5C se muestra el porcentaje de depresión causado por CKIIN en ambas condiciones medido a los 45 min post-CKIIN (CKIIN =  $57\% \pm 4\%$ ,  $n=7$ , CKIIN post-NMDA =  $30\% \pm 14\%$ ,  $n=8$ ,  $p>0.05$ ). De manera similar, la LTD que resulta de la aplicación de  $20\mu\text{M}$  de NMDA por 5 min, medida a los 40 min post-NMDA, no es significativamente distinta en ambas condiciones (Fig. 5D; NMDA =  $55\% \pm 4\%$  ( $n=8$ ) y NMDA post-CKIIN =  $33\% \pm 15\%$  ( $n=7$ ),  $p>0.05$ ).

Al mirar con detención los resultados mostrados, llama la atención el grado de variabilidad que se observa cuando los tratamientos son aplicados en segundo lugar (ver barras de error en Fig. 5C, 5D). De hecho, al cuantificar los efectos provocados por los tratamientos aplicados en segundo lugar, resulta evidente la existencia de dos grupos, según la magnitud del efecto: uno en que los efectos son normales y otro en que los efectos son muy débiles (no se muestra). Estas observaciones podrían sugerir que en algunos casos hubo oclusión. Alternativamente, es posible plantear que la causa de la dualidad observada está en que las drogas pierden su eficiencia en ciertas condiciones (ver Apéndice en Materiales y Métodos para una discusión sobre este punto). Por ahora, tengamos presente que existe este comportamiento dual en las respuestas, si bien al considerar todos los experimentos, el análisis estadístico indica que en promedio, no hay



**Figura 5. Experimentos de oclusión en cámara de registros. A y B.** Gráficos promedio de todos los experimentos en que se aplicó NMDA ( $20\mu\text{M}$ ) por 5 min y luego CKIIN ( $5\mu\text{M}$ ) por 30 min (A), y viceversa (B). En 4 de los 8 experimentos que se resumen en A, se aplicó CKIIN con 10 min de anticipación (el tiempo de recuperación post-NMDA fue 50 min y no 1 hr como en los otros 4). Como la renormalización para cada experimento se hace precisamente con los 10 min pre-CKIIN (ver Materiales y Métodos), decidimos replicar estos 10 min de registro en los 4 experimentos mencionados, para hacer coincidir *visualmente* los tiempos de aplicación de CKIIN. Las barras diagonales indican el tiempo desde el cual se hace esta operación. **C.** Se compara la depresión de la transmisión sináptica luego del tratamiento con CKIIN ( $n=7$ ) con la depresión producida por el mismo tratamiento, pero cuando éste fue precedido por la aplicación de NMDA ( $n=8$ ,  $p>0.05$ ). **D.** Se comparan los efectos del tratamiento con NMDA en la condición basal ( $n=8$ ) y después de tratar con CKIIN (se renormaliza respecto del nivel post-CKIIN;  $n=7$ ,  $p>0.05$ ). Norm.: Normalizada.

oclusión. En la sección siguiente veremos de qué modo se pudo confirmar esta observación.

### *1.2. Segunda aproximación: Pre-incubación en cámaras de interfaz.*

A fin de confirmar que la LTD y la depresión causada por CKIIN no comparten mecanismos de expresión, implementamos una variante de los experimentos de oclusión descritos en la sección anterior. En términos generales, el procedimiento consistió en pre-incubar rebanadas en cámaras de interfaz con una de las dos drogas (NMDA o CKIIN) y su respectivo control (cambio de LCRA), evaluando posteriormente los efectos del tratamiento complementario, que era aplicado en la cámara de registros doble (ver detalles en Materiales y Métodos). Esto permitió que pares de rebanadas, pre-incubadas y controles, fueran sometidas exactamente a la misma solución circulante. Esto evitó posibles variaciones en las condiciones experimentales, particularmente en la concentración efectiva del péptido en el baño. De este modo, pudimos realizar un análisis estadístico de pares minimizando a la vez el impacto de posibles variaciones *entre* individuos.

Por otra parte, introdujimos ciertas modificaciones en el sistema de registros que nos permitieron medir la *eficacia sináptica*, definida como la relación (potencial evocado)/(volea presináptica) (ver más abajo). La razón para cuantificar esta variable es que constituye una medida más precisa de la función sináptica, ya que considera las variaciones que podrían provocar los tratamientos farmacológicos en la excitabilidad de los axones presinápticos que son reclutados con la estimulación eléctrica. Para

cuantificar la eficacia sináptica medimos la pendiente del potencial sináptico evocado y la magnitud de la componente presináptica de la señal (volemia presináptica) y calculamos la razón entre éstas (detalles en Materiales y Métodos). En adelante mostraremos los resultados en términos de esta variable.

### *1.2.1. Calibración de los protocolos de pre-incubación*

La pre-incubación con CKIIN ( $5\mu\text{M}$ ) se hizo durante 30 min en las cámaras de interfaz, tal como se describe en Sanhueza y cols. (2007). Este tratamiento provocó una depresión significativa de la eficacia sináptica de un  $62\% \pm 8\%$  ( $n=3$ ,  $p < 0,001$ ) (ver Materiales y Métodos para la estimación de este valor).

Para definir la duración apropiada del tratamiento con NMDA en las cámaras de interfaz, pre-incubamos rebanadas con NMDA ( $20\mu\text{M}$ ) durante diferentes períodos de tiempo. Para medir el grado de depresión causado por estos tratamientos, comparamos las curvas de entrada-salida de rebanadas tratadas y rebanadas control (ver Materiales y Métodos). En la Figura 6A podemos ver en forma superpuesta los registros de campo obtenidos para intensidades de estimulación creciente en una rebanada pre-incubada con NMDA y una control (izquierda). A partir de estos registros se construyen las curvas de entrada-salida (derecha), y se estima el grado de depresión producido en la rebanada pre-tratada con NMDA en la cámara de interfaz (ver Materiales y Métodos). Con este método determinamos que la pre-incubación con NMDA ( $20\mu\text{M}$ ) por 10 min generaba una depresión significativa de la eficacia sináptica de un  $69\% \pm 7\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,001$ ).

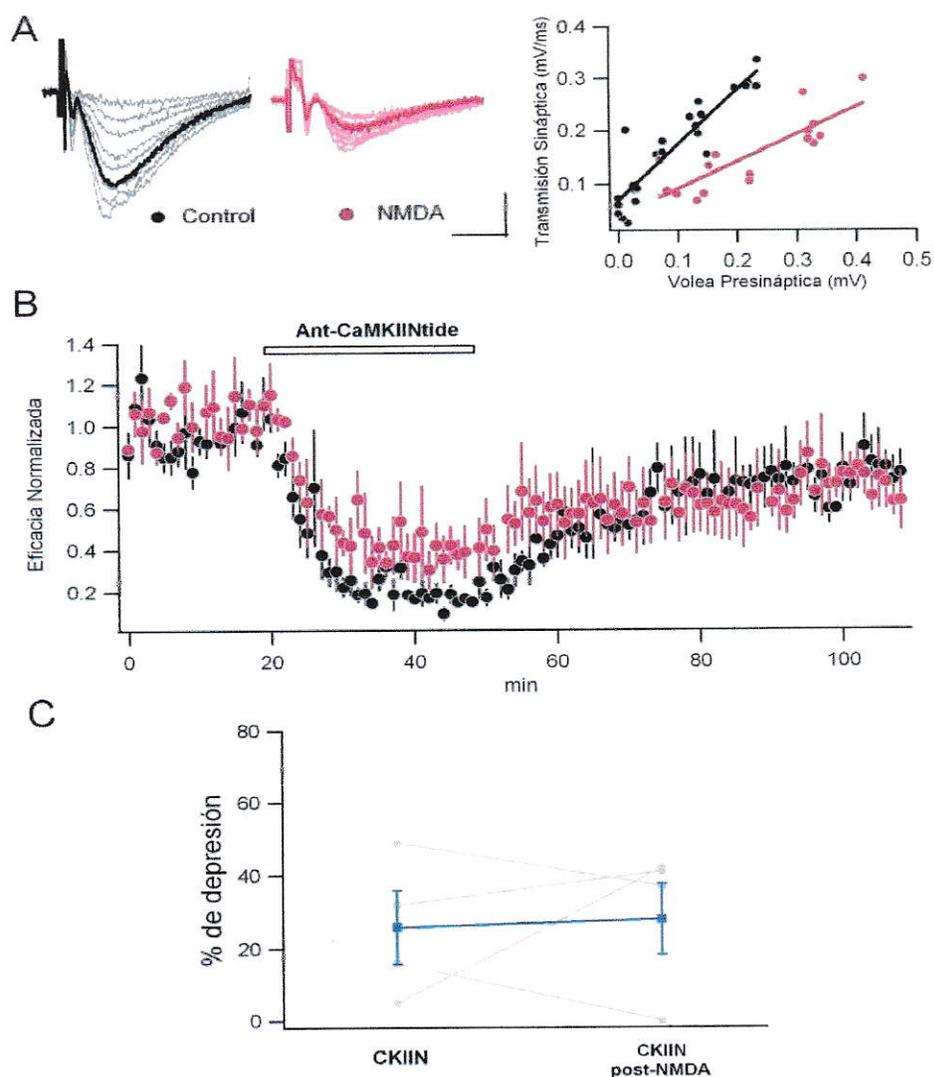
### *1.2.2. Pre-incubación con NMDA y aplicación de CKIIN en la cámara de registro*

Los resultados de los experimentos muestran que la aplicación de CKIIN en la cámara de registros produce una depresión persistente similar en el grupo pre-tratado con NMDA y el control, en que las rebanadas sólo fueron sometidas a cambios de LCRA. El resumen de los resultados de estos experimentos se muestra en la Fig. 6B. En la Fig. 6C se grafica el porcentaje de depresión que indujo el péptido (después de 60 min de lavado) en pares de rebanadas tratadas (test) y control provenientes del mismo animal. Depresión en rebanadas test =  $28\% \pm 10\%$ , depresión en rebanadas control =  $26\% \pm 10\%$  (n=4) (Test de Student pareado,  $p>0.8$ ). Este resultado indica claramente que no hay oclusión entre los efectos.

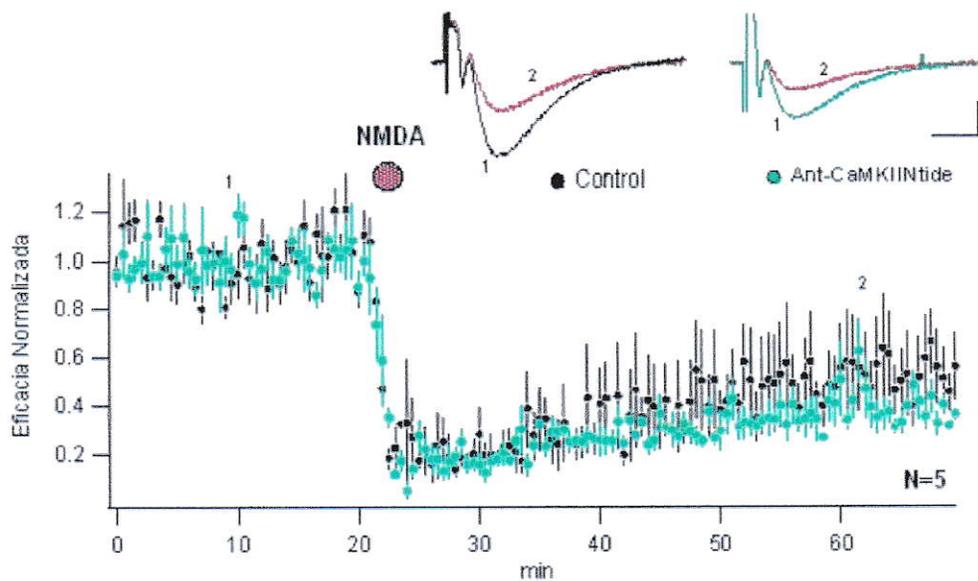
### *1.2.3. Pre-incubación con CKIIN.*

En esta serie sólo 3 de los 5 experimentos incluyeron pares tratado/control, de modo que no realizamos el análisis estadístico de pares, sino un t-test normal. Los otros dos experimentos correspondieron a dos rebanadas pre-tratadas y dos controles, provenientes de diferentes animales.

Tal como se observa en el gráfico resumen de la Figura 7, la aplicación de NMDA en la cámara de registro, induce una LTD que no es significativamente distinta en el grupo pre-tratado con CKIIN y el grupo control, medido a los 45 min post-NMDA. Rebanadas test =  $60\% \pm 5\%$  (n=5), rebanadas control =  $45\% \pm 16\%$  (n=5) ( $p>0.4$ ). Estos resultados



**Figura 6. Depresión por CKIIN no es afectada por pre-incubación con NMDA.**  
**A.** Construcción de curvas de entrada-salida para confirmar que el pre-tratamiento con NMDA produjo LTD. Izquierda: Superposición de registros obtenidos al incrementar la magnitud de la corriente de estimulación en una rebanada control y en una pre-tratada con NMDA ( $20\ \mu\text{M}$ ) por 10 min. Los registros representativos de la condición basal (previa a la aplicación de CKIIN) se muestran en color más intenso. Calibración:  $0.4\text{mV}$ ,  $4\text{ms}$ . Derecha: Curvas de entrada-salida de los pares (volea, evocado) obtenidos para una serie de registros en cada condición. La medida de la depresión se obtiene al comparar las pendientes de las curvas en la región lineal. **B.** Gráfico resumen de la aplicación de CKIIN ( $5\ \mu\text{M}$ ) por 30 min en rebanadas pre-incubadas con NMDA (rojo) y controles (sólo cambios del LCRA; negro);  $n=5$ . **C.** Comparación de la depresión inducida por CKIIN en pares de rebanadas test y control. Los trazos grises unen los puntos del par obtenido en cada experimento y el trazo azul une los valores promedio más error estándar,  $n=5$ ,  $p>0.8$ .



**Figura 7. LTD inducida por NMDA no es afectada por pre-incubación con CKIIN.** Gráfico resumen del efecto inducido por NMDA en rebanadas pre-incubadas con CKIIN (5 $\mu$ M) por 30 min (verde) y rebanadas control (negro). **Inserto:** promedio de 8 registros consecutivos obtenidos en los tiempos indicados por los números, en un experimento representativo de cada condición. Calibración 0.2mV, 4ms.

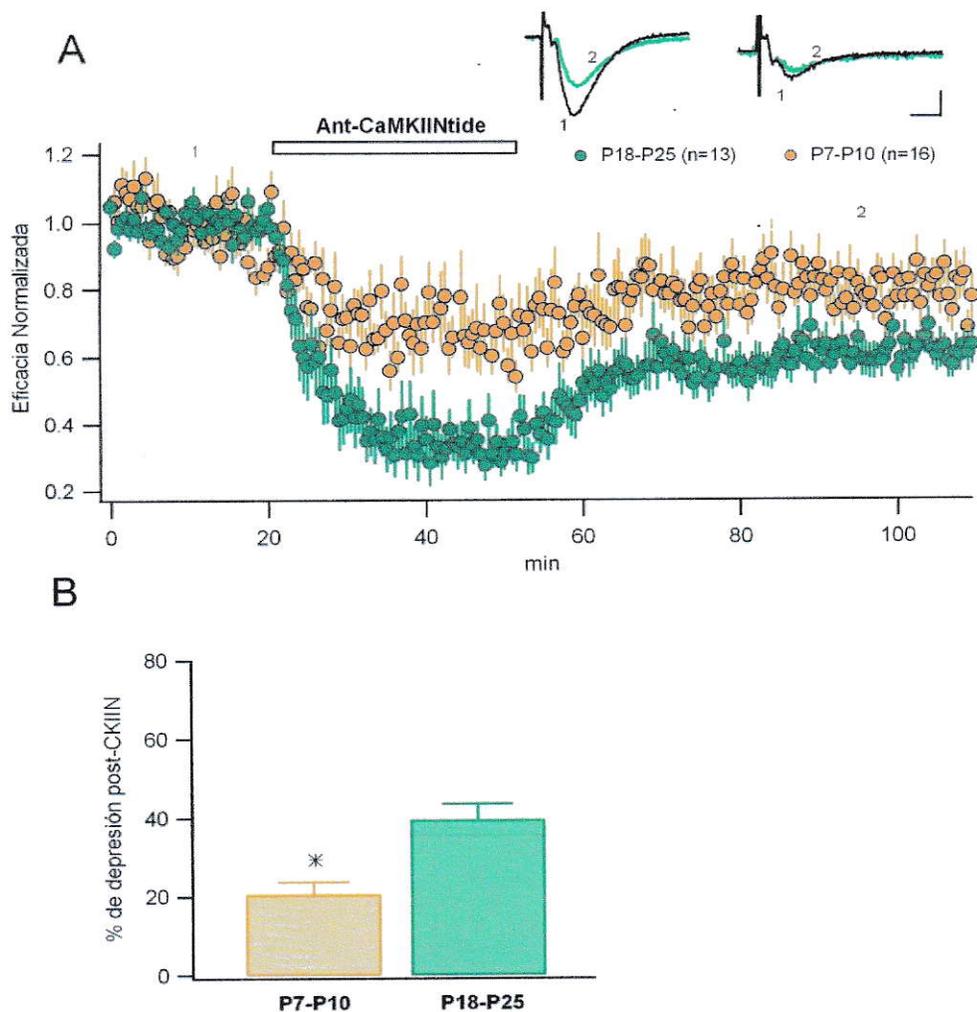
muestran que no hay oclusión de los efectos sobre la eficacia sináptica observados por la aplicación transitoria de estos agentes, tampoco cuando se ha invertido el orden temporal de los tratamientos. Esto confirma que la depresión inducida por CKIIN y la LTD dependiente de NMDAR no compartirían mecanismos de expresión.

## **2. La magnitud de la depresión inducida por CKIIN se correlaciona con la cantidad de CaMKII en las DPS.**

Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis de que el blanco de acción de CKIIN es la CaMKII unida a las DPS, comparamos la magnitud de la depresión inducida por CKIIN en ratas neonatas (P7-P10) y juveniles (P18-P25). Esta aproximación se fundamentó en que la cantidad de CaMKII en las DPS aumenta rápidamente durante el primer mes de desarrollo postnatal (Petralia y cols., 2005). Nuestro razonamiento fue que si CKIIN está provocando su efecto por interferencia directa con el complejo CaMKII-NMDAR, entonces la magnitud del efecto persistente debería ser menor en ratas neonatas que en juveniles.

Tal como se reporta en la literatura (Hsia y cols., 1998, Dudek y Bear, 1993), constatamos que la magnitud de la transmisión sináptica en ratas neonatas es muy pequeña (ver inserto en Fig. 8A). Al comparar todos los experimentos realizados, vemos que la aplicación de CKIIN en rebanadas de ratas neonatas, provoca una depresión sináptica significativamente menor que la observada con ratas juveniles, medida 45 min post-CKIIN (Fig. 8A, Resumen de todos los experimentos; 8B, ratas neonatas =  $21\% \pm 3\%$ ,  $n=16$ , ratas juveniles =  $40\% \pm 4\%$ ,  $n=13$ ,  $p<0.001$ ).

Estos resultados indican que la magnitud de la depresión generada por CKIIN se correlaciona con la cantidad de CaMKII presente en DPS, sugiriendo al complejo CaMKII-NMDAR, como uno de los blancos de acción de CKIIN.

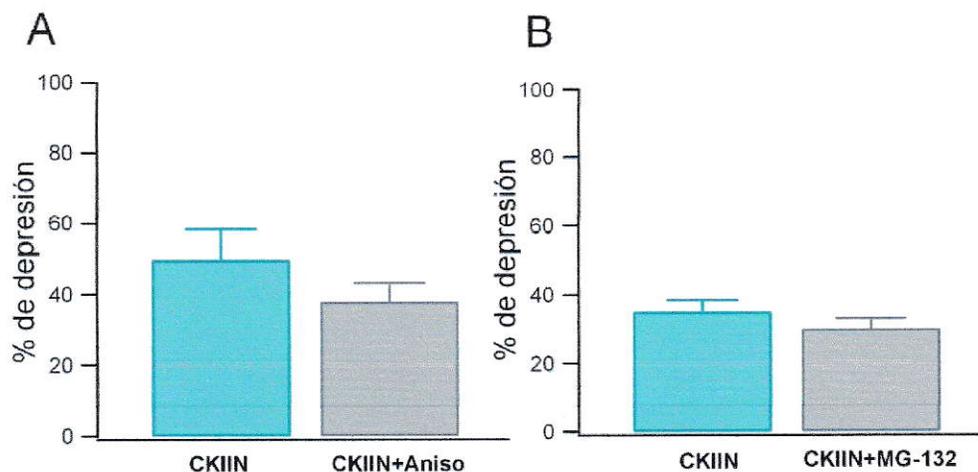


**Figura 8. Efectos diferenciales de CKIIN durante el desarrollo.** **A.** Gráfico resumen de todos los experimentos con ratas neonatas (P7-P10; amarillo; n=16) y juveniles (P18-P25; verde; n=13), en que se aplica CKIIN (5 $\mu$ M) por 30 min. **Inserto:** promedio de 8 registros consecutivos obtenidos en los tiempos indicados por los números, en un experimento representativo de cada condición. Calibración 0.2mV, 4ms. **B.** Porcentaje de depresión promedio luego de aplicar CKIIN a rebanadas de animales neonatos y juveniles (\* p<0.001).

### **3. El mecanismo de la depresión inducida por CKIIN no incluye etapas intermedias de síntesis ni degradación de proteínas.**

Los resultados obtenidos hasta este punto sugerían un proceso de plasticidad sináptica inducida bioquímicamente, diferente de la LTD y cuyo blanco sería la CaMKII ligada a las DPS.

Con el propósito de evaluar si el mecanismo de inducción contempla la activación de vías metabólicas que incluyan síntesis y degradación de proteínas. En una primera serie de experimentos aplicamos CKIIN en presencia del antibiótico anisomicina. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre el grupo test y el control, en la magnitud de la depresión inducida por CKIIN, midiendo a los 40 min post-CKIIN (Fig. 9A; Rebanadas con anisomicina =  $38\% \pm 6\%$  (n=11) y rebanadas control =  $50\% \pm 8\%$  (n=5),  $p > 0.2$ ). En experimentos diferentes, vimos que la aplicación de anisomicina (20  $\mu\text{M}$ ) por 40 min no afectó la eficacia sináptica basal por sí misma (datos no mostrados).



**Figura 9. Independencia de la síntesis y degradación de proteínas. A.** Porcentaje de depresión promedio, luego de aplicar CKIIN (5 $\mu$ M) por 30 min en rebanadas con anisomicina (20 $\mu$ M) (n=11) y controles (n=5),  $p>0.2$ . **B.** Porcentaje de depresión promedio, luego de aplicar CKIIN (5 $\mu$ M) por 30 min en rebanadas con MG-132 (10-20 $\mu$ M) (n=4) y controles (n=4),  $p>0.2$ .

En una segunda serie de experimentos, evaluamos si la inducción del proceso dependía de la degradación de proteínas mediada por el proteasoma. Esta vez aplicamos CKIIN de la manera habitual, pero en presencia de MG-132 (10-20 $\mu$ M), compuesto que inhibe de manera reversible al proteasoma (Karpova y cols., 2006). Los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre el grupo test y el control, en la magnitud de la depresión provocada por CKIIN, al medir a los 40 min post-CKIIN (Fig. 10B, rebanadas con MG-132 = 30%  $\pm$  3%, n=4, rebanadas control = 35%  $\pm$  4%, n=4,  $p>0.2$ ).

Estos resultados sugieren que la depresión causada por CKIIN no dependería de la activación de vías metabólicas compuestas, que involucren la síntesis de proteínas ni la degradación de ellas por la vía del proteasoma. Esto sería consistente con un proceso de *acción directa* sobre el complejo CaMKII-NMDAR.

## Discusión

En los últimos 20 años se ha acumulado abundante evidencia sobre la participación de la enzima CaMKII en plasticidad sináptica y memoria, haciéndose particular hincapié en la importancia que tiene en la LTP y ciertas formas de aprendizaje dependientes del hipocampo (Lisman y cols., 2002). También se ha establecido que la regulación funcional, tanto temporal como espacial de CaMKII es clave para el desarrollo normal de estos procesos (Silva y cols., 1992; Mayford y cols., 1996; Fankland y cols., 2001; Griffith y cols., 2003, Elgersma, 2004).

En esta tesis investigamos un proceso de depresión sináptica inducido por la aplicación transitoria de CKIIN, péptido derivado de la proteína endógena CaMKIIN, inhibidor natural de CaMKII. La hipótesis de trabajo fue que la depresión provocada por CKIIN resulta de una desestabilización del complejo CaMKII-NMDAR y nuestros resultados son consistentes con ella. En particular encontramos que la depresión inducida por CKIIN: (1) no comparte mecanismos de expresión con una LTD dependiente de NMDAR, (2) el blanco de acción sería la CaMKII unida a las DPS y (3) que es independiente de la síntesis y degradación de proteínas.

## **CKIIN induce una depresión sináptica distinta de una LTD dependiente de NMDAR.**

La LTD dependiente de NMDAR es la forma de depresión sináptica más estudiada (Kemp y Bashir, 2001; Bliss y cols., 2007). Se ha propuesto que codifica aspectos particulares de las memorias declarativas, como claves de orientación y detalles espaciales de un ambiente y que operaría conjuntamente con la LTP en la formación de los trazos de memoria (Kemp y Manahan-Vaughan, 2007).

A pesar de que existen escasas referencias que vinculan indirectamente a CaMKII con la LTD (Mayford y cols., 1995; Mayford y cols., 1996; Davies y cols., 2008), nos pareció interesante evaluar si la depresión gatillada por CKIIN comparte mecanismos de expresión con la LTD, por dos motivos principales. En primer lugar, observamos que CKIIN provoca los mismos efectos funcionales sobre las sinapsis que los protocolos que inducen LTD: (1) deprimir las vías *naive* y potenciadas y (2) permitir la re-inducción de LTP en vías previamente potenciadas (a nivel saturante) y obtener LTPs de mayor magnitud en vías *naive* (Figs. 2 y 3) (Dudek y Bear, 1993; Lee y cols., 1998; Sanhueza y cols., 2007). El segundo motivo es que CKIIN inhibe a una enzima que es multifuncional, y en este sentido resulta plausible que producto de su aplicación a la rebanada completa se gatillen procesos plásticos dependientes de actividad sináptica similares a una LTD.

Como vimos en el desarrollo del trabajo, mediante dos series independientes de experimentos de oclusión, demostramos que la depresión sináptica inducida por CKIIN no comparte mecanismos de expresión con una LTD dependiente de NMDAR (Figs. 6 y 7). Veamos cuáles son estos mecanismos según la visión canónica, para discutir qué información específica obtenemos sobre la depresión inducida por CKIIN:

- (1) Desfosforilación de S845 en la subunidad GluR1 de los AMPARs (Lee y cols., 1998; Kameyama y cols., 1998). El sitio S845 corresponde al sustrato de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y se ha visto que su desfosforilación disminuye la probabilidad de apertura de los AMPARs (Banke y cols., 2000).
- (2) Endocitosis de AMPARs (Holman y cols., 2007; Smith y cols., 2007; Derkach y cols., 2007).

La no oclusión observada en nuestros experimentos es consistente con la especificidad de CKIIN como inhibidor de CaMKII (Vest y cols., 2007), en tanto no debería afectar los sustratos de PKA (S845). Respecto de la remoción de AMPARs podemos afirmar que, de contribuir este proceso a la depresión gatillada por CKIIN, éste involucraría un subconjunto de receptores distinto del que participa en la LTD o bien se gatillaría a través de una vía metabólica diferente. Revisemos algunos elementos sobre tráfico de receptores AMPA, para profundizar en este último punto.

Se ha propuesto la existencia de dos grupos de receptores AMPA en cuanto a sus propiedades de tráfico a través de la membrana plasmática. El primero de ellos consta de AMPARs con subunidades GluR2/3, que en condiciones basales ciclarían constantemente desde y hacia la membrana sináptica (Kessel y Malinow, 2009). El segundo estaría compuesto por AMPARs cuyo tráfico es regulado por actividad sináptica. La composición de los receptores involucrados en este proceso dependerá de la forma de plasticidad involucrada, es decir, si es una LTP o una LTD, pero en ambos operaría un mecanismo de dos etapas de características similares.

En la potenciación se produciría primeramente un aumento en la tasa de exocitosis de AMPARs que contienen **subunidades GluR1**, en la zona *extrasináptica* (Derkach y cols., 2007). Los receptores excitados serían estabilizados en esta zona por fosforilación de S845 en GluR1 (Oh y cols., 2005). En una segunda etapa se produciría la inserción de estos receptores en la membrana sináptica, mediante un proceso promovido por la fosforilación de S831 en GluR1, llevada a cabo por CaMKII (Derkach y cols., 2007). Es posible que la formación del complejo CaMKII-NMDAR, por su parte, *estabilice en las DPS* al nuevo conjunto de receptores insertados (Lisman y Zhabotinsky, 2001).

En el caso de la LTD, se produciría una primera internalización de AMPARs con subunidades GluR1 desde la *zona extrasináptica*, promovida por la desfosforilación de S845 en GluR1 (Derkach y cols., 2007). Este evento provocaría la difusión de AMPARs con **subunidades GluR2** (heterodímeros de GluR1/2 o GluR2/3) desde la membrana

sináptica hacia la membrana extrasináptica y su posterior endocitosis en esta zona (Derkach y cols., 2007; Kessel y Malinow, 2009).

Como se aprecia, los mecanismos asociados con ambos procesos de plasticidad no serían uno el inverso del otro. De hecho, se sabe que la *despotenciación*, proceso mediante el cual es posible revertir la LTP, se da a través de un mecanismo distinto de la LTD y efectivamente constituye el inverso de la potenciación: hay disminución en los niveles de fosforilación de S831 en la subunidad GluR1 de los AMPARs (Lee y cols., 2000) y remoción de AMPARs con subunidades GluR1 de las sinapsis (Luthi y cols., 2004). En este sentido, es posible que el proceso gatillado por CKIIN se asemeje, en cuanto a las vías de señalización y receptores AMPARs involucrados, a una despotenciación, en tanto podría resultar de una interferencia directa con el complejo CaMKII-NMDAR (ver más adelante). Esto sería consistente, entonces, con el hecho de que no observemos oclusión en nuestros experimentos.

### **CKIIN actuaría sobre la CaMKII unida a las DPS**

Es sabido que las sinapsis y sus propiedades plásticas cambian durante el desarrollo postnatal (Dudek y Bear, 1993; Yasuda y cols., 2003; Petralia y cols., 2005). Para nosotros fue relevante contar con información sobre el perfil de enriquecimiento promedio de CaMKII en las DPS durante el primer mes de desarrollo postnatal: en P2 es prácticamente indetectable, y a partir de P10 comienza a aumentar rápidamente (Petralia y cols., 2005).

Si nuestra hipótesis es cierta, vale decir, que CKIIN actúa directamente sobre el complejo CaMKII-NMDAR, entonces debíamos observar una *aumento* en la magnitud de la depresión persistente inducida por CKIIN conforme los animales fuesen mayores. En efecto, eso encontramos al comparar la magnitud de los efectos persistentes en rebanadas de animales neonatos (P7-P10) y juveniles (P18-P25) (Fig. 8). Esto indica que la magnitud de la depresión sináptica inducida por CKIIN se correlaciona con la cantidad de CaMKII presente en las DPS.

Un resultado reciente, concordante con los resultados anteriores, muestra una *disminución* de GFP- $\alpha$ CaMKII ligada en las espinas dendríticas, concomitante a una depresión de la transmisión sináptica basal, al tratar rebanadas de hipocampo con una droga similar a CKIIN (versión truncada de CaMKIINtide, fusionada a otra secuencia de incorporación; N. Otmakhov, manuscrito en preparación). Interesantemente, en experimentos de coimmunoprecipitación se ha visto, además, que idéntico tratamiento produce disociación del complejo CaMKII-NMDAR en rebanadas de hipocampo (G. Fernández, J. Hell, manuscrito en preparación).

Los resultados obtenidos en los experimentos con animales de diferentes edades, así como las observaciones hechas por nuestros colaboradores, son consistentes con nuestra hipótesis, en que al menos un paso importante de la depresión inducida por CKIIN sería la desestabilización del complejo CaMKII-NMDAR y la consecuente remoción de AMPARs de la zona sináptica. Notemos que esto no sólo indicaría que una parte de la transmisión sináptica es mantenida por CaMKII en su asociación con NMDAR, sino que

existe una proteína endógena, CaMKIIN, que sería capaz de promover la ruptura de ese complejo.

### **El mecanismo de la depresión inducida por CKIIN no contemplaría síntesis ni degradación de proteínas**

A la fecha se han descrito diversos procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo (Dudek y Bear, 1993; Lee y cols., 1998, Man y cols., 2000; Huber y cols., 2001; Otmakov y cols., 2004). Estudiando los mecanismos involucrados en ellos, se ha visto que algunos dependen de la síntesis de proteínas (Huber y cols., 2000) o de su degradación por la vía del proteasoma (Karpova y cols., 2006). Motivados por estas observaciones, decidimos evaluar si CKIIN gatilla un mecanismo que involucre a estos procesos.

Nuestros resultados muestran que la depresión generada por CKIIN se induce normalmente en presencia de inhibidores de síntesis proteica (Fig. 9A) y de la degradación de proteínas mediada por el proteasoma (Fig. 9B). Esto sugiere que el mecanismo de inducción del proceso no incluiría la activación de rutas metabólicas que involucren a estos dos procesos.

Interesantemente, esta observación descarta la posibilidad de que, por medio de una activación inespecífica de la actividad sináptica, CKIIN esté generando una LTD dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR-LTD), puesto que se ha mostrado que esta forma de depresión requiere de la síntesis de proteínas (Huber, 2001).

Más aún, experimentos recientes en el laboratorio muestran que la depresión sináptica inducida por CKIIN no requiere de la transmisión glutamatérgica ionotrópica (la aplicación transitoria del péptido junto a bloqueadores de receptores de NMDA y AMPA, produce el mismo efecto persistente; B. Aburto, datos no publicados). Esta evidencia, junto a la recién mencionada, permite descartar procesos plásticos dependientes de actividad gatillados por la aplicación de CKIIN en la rebanada.

En conjunto, estas observaciones sugieren que CKIIN provocaría su efecto sin la mediación de rutas metabólicas compuestas, lo cual sería consistente con una *acción directa* sobre el complejo CaMKII-NMDAR.

### **Consideraciones futuras**

Hemos visto que CKIIN induce una depresión persistente de la transmisión sináptica, que probablemente deriva de una interferencia directa con el complejo CaMKII-NMDAR. Para esclarecer el mecanismo falta precisar si hay variación en los niveles de fosforilación de AMPARs y también si hay remoción de AMPARs de las sinapsis y de qué tipo de AMPARs se trataría (GluR1/2, GluR2/3). Para ello se podrían realizar experimentos bioquímicos utilizando anticuerpos que reconozcan subunidades específicas de los AMPARs y anticuerpos que permitan medir los niveles de fosforilación en distintos residuos, como por ejemplo S845 y S831, en la subunidad GluR1.

### **Posibles implicancias del papel de CaMKIIN en la regulación de CaMKII**

Animales mutantes que presentan niveles anormales de CaMKII (Silva y cols., 1992; Frankland y cols., 2001) o que expresan formas de CaMKII con alternaciones de sus propiedades funcionales (Mayford y cols., 1996; Irvine y cols., 2005), evidencian la importancia de mantener una regulación apropiada de esta enzima para el desarrollo normal de diferentes procesos cognitivos (Elgersma, 2004).

En este trabajo hemos visto que un inhibidor endógeno de CaMKII es capaz de provocar una depresión sináptica, relacionada probablemente con la desestabilización del complejo CaMKII-NMDAR. La pregunta natural que surge es si acaso un proceso de esta clase podría estar ocurriendo endógenamente en las neuronas o si es posible que CaMKIIN esté haciendo algo completamente distinto. La evidencia de que disponemos sobre la fisiología de CaMKIIN es muy limitada (Chang y cols., 2001; Lopicard y cols., 2006; Saha y cols., 2006) y por ello sólo podemos aventurar algunas especulaciones que motiven la realización de experimentos futuros. Revisemos entonces, en esta última sección, algunos puntos sobre regulación funcional de CaMKII en DPS haciendo énfasis en el vínculo que podrían tener con CaMKIIN.

Es sabido que ciertas configuraciones de actividad sináptica, en particular las que inducen LTP, promueven el traslado de CaMKII hacia las DPS y su asociación a esta estructura (Shen y cols., 2000; Otmakov y cols., 2004; Bayer y cols., 2006). El grado de

reversibilidad que tenga esta asociación depende, entre otros factores, de los niveles de fosforilación en la propia CaMKII (Shen y cols., 2000; Bayer y cols., 2006). Específicamente, se ha visto que la fosforilación en T286 (aquella que la hace autónoma, ver Introducción) *estabiliza* la interacción entre CaMKII y la subunidad NR2B de NMDAR (Bayer y col., 2006), mientras que las fosforilaciones en T305 y T306 de la subunidad autoinhibitoria, *inhiben* la interacción CaMKII/NR2B al impedir que el complejo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina se una a la cinasa y la active (Bayer y cols., 2001).

Las proteínas fosfatasa PP1, PP2A y PP2C son capaces de desfosforilar a CaMKII en estos sitios (Colbran, 2004). La actividad que cada una de estas proteínas tiene sobre CaMKII depende de la región subcelular en que se encuentre la cinasa (Strack y cols., 1997a). Se ha propuesto que en las DPS, la actividad fosfatasa de PP1 tendría un rol regulatorio importante sobre CaMKII (Colbran, 2004), pues se ha visto que, además de estar altamente enriquecida en esta estructura, da cuenta prácticamente de la totalidad de las desfosforilaciones de la CaMKII unida a la DPS (Strack y cols., 1997a). En el contexto de la regulación del complejo CaMKII-NMDAR, diríamos entonces que la actividad de PP1 sobre CaMKII regularía *indirectamente* esta asociación, por desfosforilación de los residuos que modulan la dinámica de asociación/disociación. En este sentido, la particularidad que tendría CaMKIIN como regulador de la CaMKII en las DPS, residiría no tanto es su capacidad de inhibir la actividad de la cinasa, sino en la que tendría para interferir *directamente* el complejo CaMKII-NMDAR.

En un contexto más general, es interesante notar que en el trabajo de Whitlock y colaboradores (2006) se observa que un condicionamiento aversivo produce LTP en zonas discretas de CA1, concomitante a un aumento en la fosforilación de S831. Después de 30 min la cantidad de GluR1 en las sinapsis y los niveles de fosforilación en S831 comienzan a disminuir desde un valor máximo. Se observa también que la transmisión sináptica se mantiene potenciada en las vías que inicialmente se potenciaron, mientras que en otras vías comienza a ocurrir una depresión de la transmisión. En relación con estas observaciones y con lo que hemos aprendido sobre CaMKIIN, resulta intrigante que los niveles del mRNA de  $\alpha$ CaMKIIN aumenten significativamente a partir de 30 min de inducirse un condicionamiento contextual del miedo (Lepicard y cols., 2006).

Aún no sabemos si los fenómenos observados en ambos experimentos tienen alguna relación y ciertamente sería interesante averiguarlo. En este sentido, se podría estudiar cómo cambia la expresión y distribución de la proteína CaMKIIN en distintas circunstancias experimentales, por ejemplo en la LTP o en aquellas asociadas con alguna forma de condicionamiento dependiente del hipocampo. Experimentos de bloqueo de función con tecnología de RNA interferente, también podrían ser instructivos.

En este mismo contexto, podría ser interesante evaluar si CaMKIIN tiene un rol de tipo homeostático al regular a CaMKII, es decir, que contribuya a mantener las sinapsis en rangos operacionales, evitando su eventual saturación (Shobe, 2002; Lepicard y cols.,

2006). Esto cobraría particular relevancia en una estructura tan dinámica (en cuanto a procesos de plasticidad) como el hipocampo (Kessel y Malinow, 2009).

## Conclusión

Las evidencias obtenidas con el desarrollo de esta tesis, permiten concluir que:

- (1) La depresión sináptica inducida por el péptido CKIIN es distinta de la LTD dependiente de NMDAR.
- (2) CKIIN afecta a la CaMKII unida a las DPS para inducir la depresión.
- (3) El proceso de depresión inducido por CKIIN no contempla activación de vías metabólicas que involucren síntesis ni degradación de proteínas.

Esto sería consistente con una acción directa de CKIIN sobre el complejo CaMKII-NMDAR, que desencadenaría una modificación de tipo estructural en las DPS con una consecuente remoción de AMPARs de las sinapsis.

## Bibliografía

- Asrican, B., Lisman, J. y Otmakhov, N. 2007. Synaptic strength of individual spines correlates with bound  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci.* 27:14007-14011.
- Benke, T.A., Luthi, A., Isaac, J.T. y Collingridge, G.L. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* 393:793-797.
- Banke, T.G., Bowie, D., Lee, H., Huganir, R.L., Schousboe, A. y Traynelis, S.F. 2000. Control of GLuR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 20:89-102.
- Barria, A. y Malinow, R. 2005. NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII. *Neuron.* 48:289-301.
- Bayer, K.U. y Schulman, H. 2001. Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for caMKII. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 289: 917-923.
- Bayer, K.U., De Koninck, P., Leonard, S.A., Hell, J.W. y Schulman, H. 2001. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature.* 411:801-805.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O'Leary, H., Schulman, H. y De Koninck, P. 2006. Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci.* 26:1164-1174.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., Morris, R. 2007. Synaptic plasticity in the hippocampus. En P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss y J. O'Keefe (eds), *The Hippocampus Book.* pp 343-474. Oxford University Press, Oxford.
- Moyer, J.R. y Brown T.H. 2002. Patch-Clamp techniques applied to brain slices. En W. Walz, A.A. Boulton y G.B. Baker (eds), *Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques.* pp 142-148. Humana Press, Totowa, N.J.
- Bliss, T.V.P. y Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond).* 232:331-356.

Chang, B.H., Mukherji, S. y Soderling, T.R. 1998. Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor in brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 10.890–5.

Chang, B.H., Mukherji, S. y Soderling, T.R. 2001. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: localization of isoforms in rat brain. *Neuroscience.* 102:767-777.

Colbran, R.J. 2004. Protein phosphatases and Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 24:8.404-9.

Davies, K.D., Goebel-Goody, S.M., Coultrap, S.J. y Browning, M.D. 2008. Long term synaptic depression that is associated with GluR1 dephosphorylation but not  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 283:33138–33146.

Derkach, V., Barria, A. y Soderling, T.R. 1999.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96:3269-3274.

Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S. y Soderling, T.R. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:101-113.

Dudek, S.M. y Bear, M.F. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89:4363-4367.

Dudek, S.M. y Bear, M.F. 1993. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J. Neurosci.* 13:291-291.

Elgersma, Y., Fedorov, N.B., Ikonen, S., Choi, E.S., Elgersma, M., Carvalho, O.M., Giese, K.P., Silva, A.J. 2002. Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning. *Neuron.* 36:493-505.

Elgersma Y., Sweatt, J.D. y Giese K.P. 2004. Mouse genetic approaches to investigating Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. *J. Neurosci.* 24:8410-8415.

Fink, C.C., Bayer, K.U., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Schulman, H. y Meyer, T. 2003. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron.* 39:283-297.

Frankland, P.W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A. y Silva, A.J. 2001.  $\alpha$ -CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature.* 411:309-313.

- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F. y Huganir, R.L. 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*. 405:955-959.
- Lepicard, E.M., Mizuno, K., Antunes-Martins, A., von Herten, L.S.J. y Giese, K.P. 2006. An endogenous inhibitor of Calcium/calmodulin-dependent kinase II is up-regulated during consolidation of fear memory. *Eur. J. Neurosci*. 23:3063–3070.
- Lisman, J. E. y Zhabotinsky, A.M. 2001. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron* 31:191–201.
- Lisman, J., Schulman, H. y Cline, H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci*. 3:175-190.
- Man, H.Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M. y Wang, Y.T. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*. 25:649–662.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. y Morris, R.G.M. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci*. 23:649-711.
- Matsuo, N., Yamasaki, N., Ohira, K., Takao, K., Toyama, K., Eguchi, M., Yamaguchi, S. y Miyakawa, T. 2009. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Front. in Behav. Neurosci*. 3:1-10.
- Mayford, M., Wang, J., Kandel, E.R. y O'Dell, T.J. 1995. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell*. 81:891-904.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y., Wang, L., Hawkins, R.D. y Kandel, E.R. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*. 274:1678-1683.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., Hell, J.W. 2005. Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends Pharmacol. Sci*. 26:645-53.
- Minko, T., Dharap S. S. y Fabbriatore A.T. 2003. Enhancing the efficacy of chemotherapeutic drugs by the suppression of antiapoptotic cellular defense. *Cancer Detection and Prevention* 27:193-202.

Smith, K.E., Gibson, E.S. y Dell'Acqua1, M.L. 2007. cAMP-Dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-Kinase anchoring protein scaffold protein. *J. Neurosci.* 26:2391-2402.

Strack, S., Barban, M.A., Wadzinski, B.E. y Colbran, R.J. 1997a. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J. Neurochem.* 68(5):2119-28.

Vest, R.S., Davies, K.D., O'Leary, H., Port, J.D. y Bayer, K.U. 2007. Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor. *Mol. Biol. Cell.* 18:5024-33.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G. y Bear, M.F. 2006. Learning induces Long-Term Potentiation in the hippocampus. *Science.* 313:1093-1097

Wu, G.Y. y Cline, H.T. 1998. Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science.* 279:22-226.

Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T. y Okabe, S. 2009. Kinase-Dead knock-In Mouse Reveals an Essential Role of Kinase Activity of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spine enlargement, Long Term Potentiation, and learning. *J. Neurosci.* 29:7607-7618.

Yasuda, H., Barth, A.L., Stellwagen, D. y Malenka, R.C. 2003. A developmental switch in the signalling cascades for LTP induction. *Nat. Neurosci.* 6:15-16.

Zhang, Y.P., Holbro, N. y Oertner, T.G. 2008. Optical induction of plasticity at single synapses reveals input-specific accumulation of  $\alpha$ CaMKII. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105:12039-12044.

Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G.D., Hell, J.W., Kennedy, M.B. y Silva, A.J. 2007. Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J. Neurosci.* 27:13843-13853.

Zhou, D.J. y Cline, H.T. 1999. Postsynaptic Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II is required to limit elaboration of presynaptic and postsynaptic neuronal arbors. *J. Neurosci.* 19:8909-8918.