

UCH-FC
DOC-BMCN
T 689
C. 1

La proteína de unión a citosinas metiladas
2 dirige la actividad transcripcional del
receptor de ryanodina 3 en plasticidad
dependiente de la experiencia inducida en
ratones por exposición prolongada a
enriquecimiento ambiental

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Rodrigo Flavio Torres Andrade

Junio, 2017

Director de Tesis Dra:

María Cecilia Hidalgo Tapia



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

Rodrigo Flavio Torres Andrade

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de Enero del 2017.

Director de Tesis:

Dr. Cecilia Hidalgo T.

Co-Director de Tesis

Dr. Bredford Kerr F.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Bacigalupo V.

Dr. Verónica Palma A.

Dr. Cecilia Vergara M.

Dr. Alejandra Loyola



... *Cecilia Hidalgo* ...
... *Bredford Kerr* ...
... *Juan Bacigalupo* ...
... *Verónica Palma* ...
... *C. Vergara M.* ...
... *Alejandra Loyola* ...

"We are who we are in good measure because of what we learn and remember"
Eric R. Kandel, Nobel Laureate 2000



«Rodrigo Flavio Torres Andrade nació en San Bernardo el 4 de Febrero de 1986. En el año 2010 se licenció en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica. Durante su formación de pregrado profundizó en la relación entre neuroquímica y conducta. Posteriormente, trabajando como asistente de investigación en el Centro de Estudios Científicos, expandió su interés al campo de la neuroepigenética. En marzo del 2012 ingresó al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Celular Molecular y Neurociencias de la Universidad de Chile. Su tesis de Doctorado relaciona neuroepigenética y conducta, buscando comprender cómo la experiencia determina cambios de expresión génica en neuronas»

Dedicatoria

El camino de la ciencia es difícil. La competitividad es alta, los recursos escasos. Pero ¿cuándo fue hacer ciencia algo sencillo? Pienso en aquellos que fueron torturados y asesinados por promover el conocimiento en un mundo regido por la fe. El panorama ha cambiado, la fe fue reemplazada por la codicia, y donde obispos fueron autoridades, hoy lo es la economía. Así, hacer ciencia hoy se vuelve un acto romántico e irreverente. Agradezco a aquellos que han forjado los cimientos que me mantienen por este camino de irreverencia, mis Padres. Su indiferencia a este mundo material y la capacidad de valorar al hombre por su razonamiento es el regalo máspreciado que poseo. Mi hermana y su entrega han sido mi ejemplo, siempre desearé ser un poco más como tú. Afortunadamente, la irreverencia no es solitaria y he tenido la oportunidad de conocer y aprender de valiosas personas. Entre ellos debo destacar a mis tutores por su constante apoyo durante estos años de doctorado. Finalmente puedo aseverar que la irreverencia y el amor no son incompatibles. Amor, no tengo nada que ofrecer, sin embargo te entrego todo. No tengo certezas, pero te entrego mis misterios. No tengo grandes proyectos, pero te entrego mi simpleza. Todo sea por la oportunidad de ser quien te acompañe e ilumine. Alonso, gracias por tu sonrisa. Gracias por mostrarme que lo mejor del ser humano es intangible. Desde que llegaste, consagré mi vida a ti. Seguiré luchando para que cuando crezcas puedas decir con orgullo que tienes un padre científico.

Resumen

La proteína de unión a citosinas metiladas 2 (MeCP2) es un regulador transcripcional con actividad dual, activando y reprimiendo genes, actuando de puente entre la información epigenética contenida en la metilación de citosinas y la expresión de genes blanco. La actividad neuronal dirige cambios en la metilación de citosinas en una gran cantidad de genes, sin embargo, la relación entre estos cambios y su efecto a nivel celular y/o conductual permanecen sin estudios acabados. En esta tesis se buscó establecer una relación entre los cambios en la metilación y la plasticidad dependiente de la experiencia por medio del estudio del receptor de ryanodina 3 (RyR3) en ratones expuestos a un ambiente enriquecido (EE), un paradigma que a través de la estimulación ambiental determina cambios neuronales tanto a nivel morfológico como funcional. RyR3 es un canal de calcio intracelular que contribuye a la potenciación de largo término hipocampal y a la formación de espinas dendríticas, posicionándolo como un candidato para relacionar estímulos ambientales con efectos neuronales. Los resultados obtenidos muestran que la exposición a un ambiente enriquecido determina un incremento de la metilación del promotor de RyR3, favoreciendo la interacción de MeCP2 e incrementando su actividad transcripcional. Estos cambios fueron observados exclusivamente en hipocampo, contrastando con lo observado en corteza y cerebelo, dando cuenta de la alta especificidad de las modificaciones neuroepigenéticas. Para comprender el impacto de estas modificaciones, se evaluó la vía sinaptogénica Rac-PAK de remodelación de actina. P250GAP actúa como un represor de esta vía. El microRNA132 suprime al mensajero de P250GAP y los canales RyR resultan determinantes en este proceso, favoreciendo la formación de espinas dendríticas. Se determinó que la activación transcripcional de RyR3 observada en ratones expuestos a enriquecimiento ambiental está asociada a un incremento en el nivel de microRNA132, dirigiendo la supresión de P250GAP, lo que produce una activación de la vía sinaptogénica. Esto no fue observado en los ratones carentes de MeCP2. Concordantemente, estos ratones no mostraron el incremento en la densidad de espinas dendríticas asociado a la plasticidad dependiente de la experiencia gatillada por el ambiente enriquecido. Así, se tiene que el ambiente determina cambios neuroepigenéticos que, en conjunto con MeCP2, dirigen la activación transcripcional de RyR3, gatillando la activación de la vía sinaptogénica y el incremento de la densidad de espinas dendríticas. Estos cambios se relacionan con el rendimiento en una prueba de memoria espacial, sugiriendo que los cambios epigenéticos pueden determinar consecuencias conductuales relevantes.

Abstract

The methylated cytosine binding protein 2 (MeCP2) is a transcriptional regulator with dual activity, up or down-regulating target genes, acting as a bridge between epigenetic information provided by cytosine methylation and the expression of a given target gene. Interestingly, neuronal activity directs changes in cytosine methylation on many genes, however the relation of these changes with the cellular/behavioral effects are not properly understood. In this thesis we pursued to establish a relation between methylation changes and experience-dependent plasticity by studying the ryanodine receptor 3 (RyR3) in mice exposed to enriched environment (EE), a paradigm that through increased stimulation directs neuronal changes at both, morphological and functional level. RyR3 is an intracellular calcium channel that contributes to hippocampal long term potentiation and dendritic spine formation, comprising an interesting candidate to relate environmental stimulation to its neuronal effects. Our results show that EE increased RyR3 promoter methylation, facilitating MeCP2 binding and increasing its transcriptional activity. These changes were exclusively observed in hippocampus, evidencing the specificity of epigenetic modifications. To gain an insight into the impact of these modifications we evaluated the synaptogenic Rac-PAK actin remodeling pathway. P250GAP acts as an inhibitor of this pathway and RyR channels contribute to the suppression of P250GAP messenger by facilitating the up-regulation of the microRNA132. We observed that EE-driven RyR3 up-regulation is associated to an increase microRNA132 levels, directing P250GAP suppression and the activation of the synaptogenic pathway. These changes were not observed in mice lacking MeCP2. Concordantly, these mice did not show the increase in dendritic spine density elicited by the experience-dependent plasticity driven by EE. Altogether, our results show that the environment directs epigenetic changes that jointly with MeCP2 direct the transcriptional activation of RyR3, directing the synaptogenic pathway activity and increasing dendritic spine density. Interestingly, these observations are related to the performance in a test of spatial memory, suggesting that epigenetic modifications may have relevant behavioral consequences.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Receptores de Ryanodina	1
1.1.1. Receptores de Ryanodina y Potenciación de Larga Duración	2
1.1.2. Receptores de Ryanodina en Memoria y Aprendizaje	3
1.1.3. Regulación de la Actividad Transcripcional de RyR2 y RyR3	4
1.1.4. Canales RyR y Formación de Espinas Dendríticas	5
1.1.5. Participación de RyR3 en Procesos de Memoria y Aprendizaje	6
1.2. Epigenética y Cromatina	7
1.2.1. Modulación de la Estructura de la Cromatina	8
1.2.2. Metilación del ADN	9
1.2.3. Relevancia Funcional de la Metilación	10
1.3. Proteína de Unión a Citosinas Metiladas 2	12
1.3.1. Regulación de Mecp2 por Actividad Neuronal	13
1.3.2. Mecp2 y Potenciación de Larga Duración	15
1.4. Plasticidad Dependiente de la Experiencia	15
1.4.1. Enriquecimiento Ambiental	16
1.4.2. Enriquecimiento Ambiental y Enfermedades Neurológicas Asociadas al Desarrollo	17
1.5. Propuesta	18
1.5.1. Hipótesis	19
1.5.2. Objetivo General	19
1.5.2.1. Objetivo Específico 1	20
1.5.2.2. Objetivo Específico 2	20

1.5.2.3. Objetivo Específico 3	21
2. Metodología	22
2.1. Descripción General	22
2.2. Soluciones y Tampones	24
2.2.1. Soluciones de Abastecimiento	24
2.2.2. Soluciones de Trabajo	25
2.2.2.1. Soluciones para Genotipificación	25
2.2.2.2. Soluciones para Inmunoprecipitación de Cromatina	25
2.3. Métodos	26
2.3.1. Animales	26
2.3.2. Enriquecimiento Ambiental	27
2.3.3. Genotipificación	27
2.3.4. Tinción de Golgi-Cox	28
2.3.5. Cuantificación de Espinas Dendríticas	28
2.3.6. Extracción de Tejidos	29
2.3.7. PCR en Tiempo Real	30
2.3.8. Modificación de ADN por Bisulfito	32
2.3.9. PCR Metilación Específico	32
2.3.10. Secuenciación del Promotor del Gen que Codifica para Ryr3	33
2.3.11. Inmuno Precipitación de Cromatina	34
2.3.12. Laberinto Acuático de Morris	35
2.3.13. Cuantificación Relativa del Micro ARN 132	36
3. Resultados	38
3.1. Genotipificación	38
3.2. Estudio de la Metilación del Promotor de Ryr3	39
3.2.1. PCR metilación específico (MSP)	39
3.2.2. Secuenciación	41
3.3. Expresión Génica	44
3.3.1. Transcripción Reversa y Estandarización de Partidores	44
3.3.2. Expresión Relativa de Ryr2 y Ryr3	46

3.3.3.	Expresión Relativa de Ryr2 y Ryr3 en Ratones Nulos para Mecp2	47
3.3.4.	Expresión Relativa de Ryr3 en Corteza y Cerebelo	48
3.3.5.	Comparación de la Abundancia de los mARN de Ryr2 y Ryr3	49
3.4.	Inmuno Precipitación de Cromatina	51
3.4.1.	Estandarización de la Sonicación	51
3.4.2.	Estandarización de Partidores	52
3.4.3.	Evaluación de la Interacción de Mecp2 con el Promotor de Ryr3	52
3.5.	Plasticidad dependiente de la experiencia	54
3.5.1.	Regulación de la Vía Rac1-PAK de Remodelación de Actina	54
3.5.2.	Cuantificación de Espinas Dendríticas	57
3.5.3.	Laberinto acuático de Morris	58
4.	Discusión	63
4.1.	Aspectos Generales	63
4.1.1.	Complejidad	63
4.1.2.	Estado Basal, Modificado y Auto-Perpetuación.	64
4.1.3.	Metilación del ADN y Plasticidad Sináptica	66
4.2.	Metilación	69
4.2.1.	PCR Metilación Especifico (MSP)	69
4.2.2.	Secuenciación del Promotor de Ryr3	70
4.3.	Mecp2	74
4.3.1.	Rol de Mecp2 en la Regulación de Ryr3	74
4.3.2.	Implicancia Para el Síndrome de Rett	76
4.4.	Plasticidad Dependiente de la Experiencia	77
4.4.1.	Enriquecimiento Ambiental	77
4.4.2.	Rol del Micro ARN 132 y Supresión de P250GAP	81
4.5.	Memoria Espacial	82
4.5.1.	Activación Transcripcional y Aprendizaje en el Laberinto Acuático de Morris	82
4.6.	Integración de Resultados	85
	Bibliografía	89

Índice de figuras

1.1.1. Contribución de los canales RyR a la formación de espinas dendríticas	6
1.5.1. Hipótesis	20
2.1.1. Esquema global de la metodología de trabajo	23
2.3.1. Cuantificación de espinas dendríticas	29
2.3.2. Secuencia del promotor de Ryr3	36
3.1.1. PCR de genotipificación	38
3.2.1. Gradiente de temperatura para MSP	39
3.2.2. Evaluación de la metilación del promotor de Ryr3	40
3.2.3. MSP cerebelo	41
3.2.4. Perfil de metilación del promotor de Ryr3	42
3.2.5. Secuenciación del promotor de Ryr3	43
3.3.1. Control de la obtención de los cADNs:	44
3.3.2. Estandarización de partidores para mARN de Ryr2 y Ryr3	45
3.3.3. Validación del método $\Delta\Delta Ct$	46
3.3.4. Expresión relativa del mARN de Ryr2 y Ryr3 en hipocampos de animales silvestres	47
3.3.5. Expresión Relativa del mARN de Ryr2 y Ryr3 en hipocampos de animales nulos para Mecp2	48
3.3.6. Expresión relativa del mARN de Ryr3 en cerebelos y cortezas de animales silvestres	49
3.3.7. Comparación de las abundancias de mARN de Ryr2 y Ryr3	50
3.4.1. Estandarización de la sonicación de la cromatina:	51
3.4.2. Estandarización de partidores para CHIP	52
3.4.3. Evaluación de la interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3	53

3.5.1. Micro RNA132 y via Rac1-PAK	55
3.5.2. Evaluación de la expresión relativa de PAK y p250GAP	56
3.5.3. Densidad de Espinas Dendríticas	57
3.5.4. Curso del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris	59
3.5.5. Resultados del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris	60
3.5.6. Cuantificación relativa de los mARN de RyR2 y RyR3 de animales entrenados .	60
3.5.7. Evaluación de la Metilación del promotor de Ryr3 de animales entrenados	61
4.1.1. Esquema para formación y mantención de una nueva marca epigenética	65
4.1.2. Efectos putativos de un cambio global de metilación sobre la función neuronal .	68
4.2.1. Esquemización del resultado de la secuenciación del promotor de ryr3	72
4.2.2. Relación causal entre cambios en la metilación y la actividad transcripcional . .	73
4.6.1. Esquema de resumen de resultados	87

Índice de cuadros

2.2.1. Soluciones de Abastecimiento	24
2.2.2. Tampón TEL	25
2.2.3. Tampón TE	25
2.2.4. Tampón de Fijado	26
2.2.5. Tampón de Lisis Celular	26
2.2.6. Tampón de Lisis Nuclear	26
2.3.1. Mix de PCR para Genotipificación de animales nulos para Mecp2	28
2.3.2. Secuencias Partidores para PCR en Tiempo Real	30
2.3.3. Secuencias Partidores para MSP	33
2.3.4. Partidores utilizados en la secuenciación del promotor de Ryr3	34
2.3.5. Partidores para inmuno precipitación de Cromatina	35

Nomenclatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico	ICV	Intra cerebro ventricular
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	KO	Ratón nulo para Mecp2
BCD	ADN modificado con bisulfito	LTP	Potenciación de Larga Duración
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	MBD	Dominio de unión a ADN Metilado
cADN	ADN complementario	MBP	Proteínas de unión a ADN Metilado
CaMKII	Quinasa calcio/calmodulina dependiente	MeCP2	Proteína de Unión a Citosinas Metiladas 2, Humana
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina	Mecp2	Proteína de Unión a Citosinas Metiladas 2, Ratón
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico	miR132	microRNA132
Ct	Ciclo Umbral	MSP	Reacción en Cadena de la Polimerasa Metilación-Específico
Cyc1	Ciclofilina A	NMDA	N-metil D-aspartato
DNMTs	ADN Metilo Transferasas	P250GAP	Proteína GTPasa-activadora de la familia Rho
EE	Enriquecimiento Ambiental	PAK	Serina/Treonina quinasa activada por p21
HAT	Histonas acetil-transferasas	PKC	Proteína Quinasa C
HDAC	Histonas desacetilasas	qPCR	PCR cuantitativo
		Rac1	GTPasa pequeña de la familia Rho
		RTT	Síndrome de Rett
		RyR	Receptor de Ryanodina
		SC	Condiciones Estándar
		SEM	Error estándar de la media
		WT	Ratón Silvestre

Capítulo 1

Introducción

1.1. Receptores de Ryanodina

Los canales de calcio (Ca^{2+}), conocidos como receptores de ryanodina (RyR), se localizan en la membrana del retículo endoplásmico y sarcoplásmico, siendo responsables de la liberación regulada de calcio desde estos compartimientos intracelulares. La ryanodina presenta una actividad bifásica sobre los canales RyR, manteniendo los canales abiertos a bajas concentraciones (nM) e inhibiendo su apertura a altas concentraciones (μM) (McPherson et al., 1991). Los canales RyR poseen un peso molecular de alrededor de 2 MDa, conformados por cuatro subunidades idénticas de aproximadamente 5000 aminoácidos cada una (Lai et al., 1988). En mamíferos existen tres isotipos de canales RyR (Ryr1-3). Cada isotipo de RyR se encuentra codificado en un cromosoma distinto por los genes *Ryr1*, *Ryr2* y *Ryr3*, conteniendo 104, 102 y 103 exones respectivamente (Mattei et al., 1994). Los diferentes isotipos de RyR conservan un 65% de identidad aminoacídica (Hakamata et al., 1992), presentando 3 regiones de divergencia (D1, D2 y D3).

RyR1 fue originalmente descrito en músculo esquelético (Takeshima et al., 1989) mientras que RyR2 fue clonado desde músculo cardíaco (Otsu et al., 1990), sin embargo su expresión no se limita a estos tejidos. RyR1 y RyR2 son cruciales para el acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético y cardíaco respectivamente, sirviendo de ejemplos para la función fisiológica de los canales RyR. En músculo esquelético, el potencial de acción alcanza las invaginaciones transversas de la membrana plasmática, resultando en la liberación de calcio desde el retículo

sarcoplásmico por una interacción mecánica de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L con RyR1 (Block et al., 1988; Rios and Brum, 1987). En músculo cardíaco, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L determinan la entrada de calcio extra-celular. Sensores de calcio presentes en RyR2 facilitan su apertura y por ende la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico participando en una amplificación de señal conocida como liberación de calcio inducida por calcio (CICR) (Endo, 2009; Fabiato, 1983). En ambos casos, el aumento intracelular de calcio determinado por la apertura de los canales RyR da inicio a la contracción muscular. RyR3 fue caracterizada en cerebro (Hakamata et al., 1992), destacando su expresión en hipocampo, cuerpo estriado y tálamo. Sin embargo, las tres isoformas se expresan en el sistema nervioso central, con patrones que cambian durante el desarrollo, siendo RyR2 y su mensajero el isotipo más abundante (Mori et al., 2000). La expresión de canales RyR en sistema nervioso central resulta de nuestro particular interés, debido a su participación en procesos necesarios para la correcta funcionalidad neuronal, con implicancias que abarcan procesos cognitivos complejos como el aprendizaje y la memoria. A continuación abordaremos la participación de los canales RyR en la potenciación a larga duración.

1.1.1. Receptores de Ryanodina y Potenciación de Larga Duración

El incremento abrupto y sostenido de la eficiencia de la transmisión sináptica en respuesta a estimulación de alta frecuencia se conoce como potenciación de larga duración (LTP). La LTP puede durar desde horas, hasta meses (Abraham, 2003). Adicionalmente, el aprendizaje induce LTP en ratas (Whitlock et al., 2006), sugiriendo que la LTP tiene un importante rol en el aprendizaje y memoria (Bliss and Collingridge, 1993). La LTP puede ser dividida en una fase de inducción o S-LTP con alrededor de 20 minutos de duración, una fase temprana (E-LTP) con una duración de 3 horas y una fase tardía (L-LTP) que permite a la potenciación mantenerse por espacios temporales mayores, alcanzando días e incluso semanas (Huang et al., 1996). La inducción de la LTP tiene como mecanismo primario la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo N-metil D-aspartato (NMDA), lo cual requiere la liberación previa de su bloqueador por magnesio (Nicoll and Roche, 2013).

La estimulación de fibras pre-sinápticas determina la liberación de glutamato hacia la hendidura sináptica. El glutamato activa los receptores ionotrópicos tipo ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), determinando el ingreso de sodio al terminal post-sináptico,

generando su despolarización. La despolarización libera el bloqueo por magnesio de los receptores NMDA permitiendo su apertura y consecuente ingreso de calcio al terminal. El rápido aumento de calcio intracelular determina la activación de enzimas, resultando de particular importancia la quinasa calcio/calmodulina dependiente tipo II (CaMKII) y la proteína quinasa C (PKC). Estas quinasas son determinantes en la inducción de la LTP y la autofosforilación de CaMKII es crucial para la mantención de la E-LTP (Lisman et al., 2012; Sacktor et al., 1993). La L-LTP comprende la extensión de la E-LTP en el tiempo, requiriendo la transcripción activa de genes, y es dependiente de la síntesis de proteínas (Frey et al., 1988; Huang et al., 1996).

Existen diversos paradigmas de estimulación para inducir LTP, sin embargo, todos coinciden en el aumento en la concentración de calcio intracelular como evento determinante en la inducción. La capacidad de los canales RyR de producir CICR ha llevado a explorar su participación en la LTP, sugiriéndose que los canales RyR pueden amplificar la señal de calcio generada por el receptor NMDA (Raymond and Redman, 2006). Así, una estimulación sub-umbral que da origen a S-LTP en rebanadas de hipocampo, puede dar paso a una E-LTP por medio de la activación de los canales RyR a través de la incubación de las rebanadas con una concentración activadora de ryanodina (Grigoryan et al., 2012), sugiriendo que los canales RyR pueden alterar los requerimientos para la inducción de LTP (Wang et al., 1996). En esta misma línea, cuando se bloquean los canales RyR se pudo establecer que una fracción importante de la señal de calcio inducida por estimulación de alta frecuencia es producto de la CICR (Alford et al., 1993). En particular, la CICR inducida por actividad sináptica en espinas dendríticas del área CA1 del hipocampo es en gran parte dependiente de los canales RyR (Emptage et al., 1999).

1.1.2. Receptores de Ryanodina en Memoria y Aprendizaje

Las evidencias antes expuestas sugieren que los canales RyR son componentes activos en la inducción de la LTP, permitiendo abordar su papel en memoria y aprendizaje. La inyección intra-cerebro-ventricular (ICV) de dantroleno, que inhibe el acoplamiento entre los canales de calcio tipo L y los canales RyR (Paul-Pletzer et al., 2005), disminuye la retención de memoria en una prueba de evitación pasiva (Ohnuki and Nomura, 1996). En esta prueba los animales reciben un choque eléctrico al ingresar a una cámara oscura, aprendiendo a permanecer en una cámara iluminada adyacente por un tiempo fijado por el experimentador (Criterio de Latencia). La prueba de evitación pasiva es un paradigma de aprendizaje emocional asociativo en donde

el animal toma una decisión, evitando o ingresando a un compartimiento oscuro, en el cual ha experimentado un estímulo aversivo. La respuesta observada en la prueba de evitación pasiva puede darse como producto de un condicionamiento formado por claves multisensoriales representando un ambiente complejo. Esto ha conducido a evaluar el rol del hipocampo en la prueba de evitación pasiva, encontrándose que la inactivación reversible del hipocampo disminuye el tiempo de latencia, sugiriendo un rol para esta estructura en el aprendizaje asociado a esta prueba. Los animales inyectados con el vehículo en el que se disuelve el dantroleno permanecen por el tiempo de criterio en la cámara iluminada durante una prueba de retención de memoria, mientras que la inyección ICV de dantroleno determina que el criterio de latencia no se alcance. Así mismo, la inyección ICV de dantroleno, aumenta el número de errores en un laberinto radial de ocho brazos (Ohnuki and Nomura, 1996), en esta prueba los brazos del laberinto cuentan con una recompensa (alimento), registrándose como correcto ingresar a un brazo no visitado previamente e incorrecto ingresar a un brazo visitado, donde la recompensa fue previamente consumida. Galeotti et al. (2008) hicieron uso de oligonucleótidos antisentido para disminuir los niveles de RyR1, RyR2 y RyR3, encontrando que la disminución de RyR2 y RyR3, pero no de RyR1, determina una menor retención de memoria en una prueba de evitación pasiva.

1.1.3. Regulación de la Actividad Transcripcional de RyR2 y RyR3

Los isotipos 2 y 3 del receptor de ryanodina son expresados en el sistema nervioso central y como se ha expuesto, ambos juegan un papel en memoria y aprendizaje. Sin embargo, la regulación de su expresión parece estar dirigida de manera independiente, encontrándose que el tratamiento crónico con nicotina induce la expresión de *Ryr2* en la corteza (Ziviani et al., 2011). Así mismo, el tratamiento con cocaína determina un incremento de la expresión de *Ryr1* y *Ryr2* en la corteza frontal, este aumento pudo ser prevenido por el tratamiento con un antagonista selectivo de los receptores de dopamina D1 (Kurokawa et al., 2011). En humanos, un estudio post-mortem de pacientes con impedimento cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas mostró un incremento en la expresión de *Ryr2*, en el primer grupo, mientras que en los pacientes con Alzheimer se encontró un aumento en la expresión de *Ryr3* (Bruno et al., 2012). Por otra parte, animales que sobre-expresan la subunidad NR2B del receptor NMDA, la cual es blanco de fosforilación por parte de CaMKII, presentan mayores niveles de expresión de *Ryr3* en el hipocampo, lo que resulta de particular importancia ya que estos animales muestran

mejores rendimientos en pruebas de memoria y aprendizaje (Li et al., 2011). Estos resultados que, a pesar de su participación conjunta en procesos de memoria y aprendizaje, es posible una regulación transcripcional diferencial para Ryr2 y Ryr3 en regiones del cerebro donde ambas isoformas son expresadas. No obstante, los mecanismos de regulación transcripcional de estos canales no han sido estudiados en detalle.

1.1.4. Canales RyR y Formación de Espinas Dendríticas

Los procesos cognitivos complejos como la memoria y aprendizaje se encuentran asociados a fenómenos de plasticidad neuronal, un ejemplo es la ya mencionada potenciación de largo plazo. Otro fenómeno de plasticidad neuronal de interés para procesos cognitivos complejos es la plasticidad estructural, refiriéndose ésto a la remodelación de espinas dendríticas de forma dependiente de la actividad neuronal. Así, se tiene que tratamientos con KCl son capaces de incrementar la formación de espinas dendríticas, mientras que el silenciamiento neuronal con TTX conduce a una disminución del número de las mismas (McAllister, 2000). De esta forma es interesante abarcar la relación entre los canales RyR y la remodelación de espinas dendríticas. Es importante señalar que la remodelación de espinas dendríticas mediada por la neurotrofina derivada del cerebro BDNF requiere de estos canales de calcio, sugiriendo un rol para estos canales en la remodelación de espinas dendríticas dependiente de actividad (Wayman et al., 2008; Lesiak et al., 2014; Adasme et al., 2011). Así mismo, experimentos *in vitro* han mostrado que el incremento de espinas dendríticas determinado por el neurotóxico PCB 95 (pentaclorobifenil) requiere de los canales RyR (Lesiak et al., 2014). Es interesante que el mecanismo de acción conlleve la sobreexpresión del micro ARN 132 (miR132), un microRNA implicado en diversas conductas y enfermedades neurológicas. El miR132 ha mostrado tener como blanco a diferentes mensajeros, entre ellos cabe destacar a la proteína de unión a citosinas metiladas 2, Mecp2 (Klein et al., 2007), proteína de interés para esta tesis, y la proteína activadora de la actividad GTPasa, P250GAP (Wayman et al., 2008). P250GAP es un regulador negativo de la formación de espinas dendríticas por medio de su rol activador de la actividad GTPasa de Rac1. Rac1 es una Rho GTPasa pequeña y en su forma activa, GTP-Rac1, contribuye a la remodelación de actina vía Rac1-PAK. La activación de su actividad GTPasa por P250GAP favorece la forma inactiva de Rac1, GDP-Rac1, poniendo límite a la remodelación de actina por la vía Rac1-PAK. Así, se ha descrito que los canales RyR median los aumentos de calcio que son necesarios para incrementar

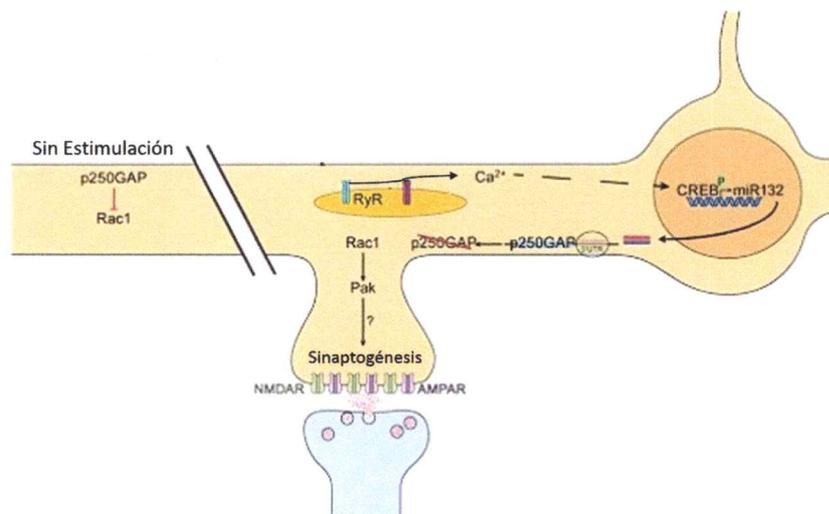


Figura 1.1.1: **Esquema de la contribución de los canales RyR a la formación de espinas dendríticas:** Se representa la vía sinaptogénica Rac1-PAK. En ausencia de estimulación P250GAP inhibe la actividad de la vía. En actividad neuronal los canales RyR resultan determinantes para la activación de la vía sinaptogénica, ya que sus diferentes isotipos median la contribución de calcio que permite la sobreexpresión del micro RNA132. El miR132 suprime al mensajero de P250GAP dando lugar a la activación de la vía Rac1-PAK, favoreciendo la formación de espinas dendríticas. Esquema modificado de Lesiak et al. (2014)

los niveles de miRNA132, conduciendo a la degradación del mensajero de *p250GAP*. La supresión de este regulador negativo de la sinaptogénesis determina un incremento en la formación de espinas dendríticas (Figura 1.1.1). Es más, ensayos con ARN interferentes muestran que la disminución de los canales RyR imposibilita la formación de espinas dendríticas inducida por PCB95, llevando a los autores a sugerir que los canales RyR pueden mediar la formación de espinas dendríticas en forma actividad dependiente (Lesiak et al., 2014), dando sustento a la hipótesis de esta tesis.

1.1.5. Participación de RyR3 en Procesos de Memoria y Aprendizaje

Para distinguir la funcionalidad isotipo-específica de RyR3 es necesario recurrir a resultados obtenidos en animales mutantes nulos que carecen de este isotipo del receptor de ryanodina. Estos animales mostraron discapacidades en pruebas de condicionamiento de miedo contextual y en pruebas de evitación pasiva (Kouzu et al., 2000). Así mismo se determinó que los animales carentes de RyR3 presentan dificultad al aprender un nuevo objetivo en el laberinto acuático de Morris (Balschun et al., 1999), lo que evidencia un importante rol para RyR3 en el rendimiento de

diversas pruebas conductuales. De forma concordante, Balschun et al. (1999) mostraron que una estimulación débil del área CA1 del hipocampo produce LTP en animales silvestres, mientras que la misma estimulación en animales carentes de RyR3 no logra inducir una potenciación sostenida en el tiempo, dando un sustento a las deficiencias conductuales observadas. Además, RyR3 ha sido implicado en otra forma de inducción de LTP, demostrándose que este isotipo es necesario para la inducción de LTP por el anión superóxido (Huddleston et al., 2008). Todos estos antecedentes sugieren que esta isoforma, enriquecida en hipocampo, cumple un rol en los procesos de inducción y mantención de la LTP, además de participar en el rendimiento de ejercicios conductuales de memoria y aprendizaje, haciendo de RyR3 un blanco interesante de estudio a nivel de sistema nervioso central.

A continuación se presentará un mecanismo que puede favorecer la regulación del isotipo 3 del receptor de ryanodina en función de la actividad sináptica, permitiendo además abordar una posible regulación diferencial de Ryr2 y Ryr3.

1.2. Epigenética y Cromatina

El concepto epigenética deriva del original "epigenotipo" planteado en 1942 por el Dr. Conrad Waddington y que hace mención a los procesos complejos que tienen lugar entre el genotipo y el fenotipo. Con esta base, la epigenética se comprende hoy de manera mucho más amplia, llegando a definirse como un tipo de memoria genética que determina cambios estables en la expresión génica, sin involucrar cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Jiang et al., 2008). Bajo este concepto resulta clave considerar que el proceso de transcripción no ocurre sobre una hebra de ADN desnuda.

La cromatina es el templado funcional sobre el cual se regula la expresión génica. La cromatina consiste de ADN enrollado sobre nucleosomas y en adición a brindar un primer nivel de protección al ADN, los nucleosomas regulan el acceso de factores de transcripción a los promotores. Los nucleosomas están compuestos por 146 pares de bases de ADN enrollados 1.7 veces sobre un octamero de histonas conteniendo dos copias de cada una de las cuatro histonas basales: H2A, H2B, H3 y H4 (Luger et al., 1997). Los nucleosomas se encuentran ubicados a intervalos regulares de aproximadamente 200 pares de bases de ADN. Estas regiones son estabilizadas por la interacción de la histona H1 con el ADN (Misteli et al., 2000). La cadena resultante de este

arreglo periódico de nucleosomas puede formar estructuras de orden superior, conformando una fibra solenoidal de 30 nm. La histona H1 es componente activo de esta fibra, determinando su importancia a nivel de nucleosoma y supra-nucleosoma (Thoma et al., 1979).

1.2.1. Modulación de la Estructura de la Cromatina

Resulta importante considerar que la estructura de la cromatina puede ser modulada por diferentes mecanismos. Los complejos remodeladores de la cromatina son funcional y composicionalmente complejos, sin embargo, comparten la presencia de una subunidad motora ATP-dependiente y son capaces de alterar la posición y/o estabilidad de los nucleosomas (Bao and Shen, 2007; Lusser and Kadonaga, 2003). Los complejos SWI/SNF poseen la capacidad de unirse a nucleosomas hiperacetilados e interrumpir momentáneamente las interacciones ADN-nucleosoma, aumentando su movilidad (Aoyagi et al., 2002). La familia ISWI presenta diferentes complejos con diversas actividades, destacándose la capacidad de asociarse a la heterocromatina y facilitar su replicación (Barak et al., 2003). La familia Mi2/NurRD está involucrada en la represión transcripcional (Bowen et al., 2004). Los complejos que contienen INO80 o SWR1 como ATPasa han sido relacionados con el reemplazo de la histona H2A por la variante H2A.Z (Mizuguchi et al., 2004).

Las histonas H2A, H2B y H3 presentan diferentes isotipos codificados por diferentes genes, sin embargo, estas variantes difieren en pocos residuos. La funcionalidad de las variantes puede clasificarse según su patrón de expresión dando origen a tres grupos generales. Un grupo replicación dependiente, en donde las variantes de las histonas son incorporadas siguiendo la replicación del ADN. Un grupo replicación y ciclo celular independiente y un grupo donde la incorporación de las variantes es tejido específica (Doenecke et al., 1997). Las variantes de las histonas proporcionan heterogeneidad química y funcional a la cromatina. Por ejemplo la histona H3.3 aumenta la dinámica de la cromatina y está asociada a la transcripción activa (Daury et al., 2006); así mismo la histona H2A.Z se ubica preferentemente en la región promotora (Guillemette and Gaudreau, 2006).

El extremo amino terminal de las histonas queda expuesto en la superficie del nucleosoma, tornándolo en blanco de diversas modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones incluyen la mono, doble o triple-metilación de lisinas y la mono o doble-metilación de argininas, acetilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas (Turner, 2005). Las modificaciones son

introducidas y removidas de manera específica, así la acetilación de histonas es llevada a cabo por un grupo de enzimas histonas acetil-transferasas (HAT) y revertido por las histona desacetilasas (HDAC) (Di Gennaro et al., 2004). Las histona metilo-transferasas actúan sobre lisinas o argininas, mientras que esta modificación es revertida de manera específica, dependiendo del sustrato y del nivel de metilación. Por ejemplo, la de-metilasa específica de lisinas (LSD1), es capaz de de-metilar la histona H3 mono y doble-metilada en la lisina 4 (H3K4) (Shi et al., 2004). Las modificaciones post-traduccionales del extremo amino terminal de las histonas alteran la carga electrostática de la superficie del nucleosoma, determinando cambios en la estructura local de la cromatina. Residuos sumamente conservados presentes en las cuatro histonas basales sirven de blanco para la acetilación de lisinas, constituyendo la modificación de histonas mejor caracterizada en su asociación con cromatina activa y activación génica (Hansen et al., 2010).

Se tiene entonces un contexto altamente organizado y dinámico en el cual se lleva a cabo la expresión génica. Este contexto está lejos de permanecer constante en el tiempo, ya que es sometido a constantes modificaciones estructurales, cada una de las cuales se encuentra estrechamente regulada. Todos estos factores mencionados, juegan importantes roles en la determinación de los niveles de expresión génica, permitiendo o imposibilitando el acceso de la maquinaria transcripcional a los promotores de manera dinámica en respuesta a los requerimientos celulares. Sin embargo, la modificación covalente del ADN en la cromatina también es capaz de influenciar la transcripción. Es en esta modificación donde centraremos nuestra atención a continuación.

1.2.2. Metilación del ADN

La modificación del ADN, a través de la adición de un grupo metilo en la posición 5 de las Citosinas ubicadas en un dinucleótido CpG palindrómico (^{5me}CpG), es considerada una marca epigenética. En el genoma de los mamíferos, la distribución de dinucleótidos CpG se observa a una tasa menor de la esperada en base a la frecuencia de ocurrencia de los nucleótidos C y G. Sin embargo, los dinucleótidos CpG se encuentran enriquecidos en la región -400/+400 del sitio de inicio de la transcripción (Aerts et al., 2004). Este enriquecimiento se debe a la presencia de islas CpG, regiones de más de 200 pares de bases con un alto contenido de nucleótidos citosinas y guaninas (Gardiner-Garden and Frommer, 1987).

En las regiones con baja frecuencia de dinucleótidos CpG, se observa que las citosinas se encuentran metiladas, mientras que las islas CpG ubicadas en la región próxima al sitio de inicio

de la transcripción se encuentran libres de metilación, conformando regiones hipometiladas del genoma (Rollins et al., 2006). Así, el genoma consta de regiones cortas, de menos de 4000 pares de bases, libres de metilación que se encuentran inmersas en largos dominios metilados. Esto puede constituir un mecanismo con el potencial de disminuir el tamaño efectivo del genoma, exponiendo aquellos promotores con islas CpG con bajo porcentaje de metilación (Ooi and Bestor, 2008).

La metilación de las citosinas se lleva a cabo por la acción de las proteínas ADN metiltransferasas (DNMTs), en particular DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Estas proteínas comparten el mecanismo catalítico utilizando S-adenosil-L-metionina (SAM) como donante del grupo metilo (Bestor, 2000; Goll and Bestor, 2005). DNMT1 actúa preferentemente sobre substratos hemimetilados y se localiza en el frente de replicación (Leonhardt et al., 1992) manteniendo el patrón de metilación en la hebra de ADN naciente. Las proteínas DNMT3a y DNMT3b actúan sobre ADN no metilado y hemimetilado con similar eficiencia y son consideradas responsables de la metilación de novo del ADN; sin embargo, se ha descrito la interacción entre DNMT1 y DNMT3a durante la metilación de novo, sugiriendo un rol para DNMT1 en el proceso (Fatemi et al., 2002).

La metilación de las citosinas provoca cambios en el surco mayor del ADN, alterando la interacción entre proteínas y el ADN. A pesar de este cambio, existen proteínas con dominios capaces de reconocer las regiones metiladas del ADN de manera específica, conocidas como proteínas de unión a ^{5me}CpG (MBP). El dominio de unión a ^{5me}CpG (MBD) fue caracterizado inicialmente en la proteína Mecp2 (Nan et al., 1993) y es compartido por las proteínas MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4. Estas MBP, exceptuando a MBD3, pueden unirse a ^{5me}CpG y reclutar diferentes proteínas capaces de remodelar la cromatina, tales como el complejo de histonas deacetilasas (HDACs), histonas metilo-transferasas y complejos remodeladores dependientes de ATP (Jones et al., 1998; N et al., 2005; Zhang et al., 1999). Esto ha llevado a considerar la metilación del ADN como una marca epigenética asociada a la represión génica.

1.2.3. Relevancia Funcional de la Metilación

El rol de la metilación del ADN ha destacado en procesos como la inactivación del cromosoma X, la diferenciación celular y la supresión de los transposones (Altun et al., 2010; Goll and Bestor, 2005; Jones and Takai, 2001; Tycko, 2010). La metilación de las citosinas determina un cambio

en las interacciones entre el ADN y las proteínas, inhibiendo la interacción secuencia-específica de factores de transcripción con la región promotora de genes blanco. Así mismo, la metilación puede reclutar proteínas MBD, las cuales pueden alterar el estado de la cromatina a través de sus interacciones con proteínas remodeladoras asociadas al silenciamiento génico (Jones and Takai, 2001). Sin embargo, suponer que la metilación del ADN es sinónimo de silenciar la expresión génica es una sobre-simplificación del sistema. Para comprender esto se destacan los estudios de expresión génica realizados en animales nulos para *Mecp2*. Estos estudios muestran genes cuya expresión incrementa y que por ende permiten sostener el modelo simplista en el que la metilación actúa como un silenciador de la expresión génica. Sin embargo, también se encontró un gran número de genes cuya expresión se ve reducida, esto último es consistente con un modelo en el cual *Mecp2* actúa como activador de la transcripción (Urduingio et al., 2008). Esto es corroborado por modelos murinos en los cuales se sobre-expresa *Mecp2*, obteniéndose un aumento en la expresión de genes blanco. Este efecto es mediado por la interacción entre *Mecp2* y CREB1 (Chahrour et al., 2008). Así, se tiene que el rol de la metilación de citosinas en la regulación de la transcripción de un gen determinado no puede ser determinado *a priori*. A pesar de la gran cantidad de información disponible, resulta imposible asociar la metilación de una citosina a una función sin llevar a cabo un estudio detallado.

Recientemente se describió que la respuesta transcripcional del gen *pS2* en respuesta a estrógeno conlleva cambios cíclicos en los niveles de metilación en su región promotora. Para esto, se silenció la actividad del promotor manteniendo el cultivo libre de estrógeno por tres días. Transcurrido este tiempo, se agregó estrógeno y se tomaron muestras cada diez minutos por un período de tres horas, observándose incrementos en los niveles de metilación del promotor a los 20 y 120 minutos. Así, cuando *pS2* está transcripcionalmente activo, el ADN es metilado tras la ocupación cíclica del promotor por el receptor de estrógeno alfa y por la ARN polimerasa II. Resultados y cinéticas similares se obtuvieron para diferentes promotores y bajo diferentes metodologías para sincronizar la actividad transcripcional (Kangaspeska et al., 2008). Estos resultados permiten comprender la metilación del ADN no solo como una marca epigenética capaz de reprimir o activar la transcripción génica, sino como parte inherente de la transcripción cíclica del gen *pS2* (Métivier et al., 2008).

El papel dinámico y fundamental de la metilación del ADN queda expuesto a cabalidad por enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalida-

des faciales (ICF) y el síndrome de Rett (RTT). El síndrome ICF (OMIM 242860) se caracteriza por la reducción en el nivel de inmunoglobulinas, alteraciones faciales leves y por mostrar la heterocromatina yuxtacentromérica alargada en los cromosomas metafásicos. Este síndrome es causado por mutaciones en el gen que codifica la proteína DNMT3b (Xu et al., 1999). De manera concordante, regiones que se encuentran fuertemente metiladas en diferentes tejidos se muestran hipometiladas en pacientes con síndrome ICF. El síndrome de Rett (OMIM 312750) (RTT) es causado por mutaciones en el gen que codifica la proteína Mecp2 (Amir et al., 1999) y se define como un desorden postnatal progresivo del desarrollo neuronal. Los pacientes con síndrome de Rett, que afecta principalmente a niñas, se desarrollan normalmente hasta los 6-18 meses de edad, luego de esto comienza un estancamiento del desarrollo, destacándose la disminución del crecimiento de la cabeza que da origen a una microcefalia. A medida que el síndrome progresa, comienza una etapa de regresión, en la cual el deterioro determina características autistas, anomalías motoras y retardo mental (Chahrour and Zoghbi, 2007). Diferentes modelos murinos de RTT muestran alteraciones en la funcionalidad sináptica, observándose que animales sintomáticos son incapaces de mostrar potenciación de largo término (LTP) en el área CA1 del hipocampo. Es interesante notar que estas alteraciones no fueron observadas en animales jóvenes no sintomáticos, dando un sustento a nivel neurofisiológico a la regresión característica de este síndrome (Asaka et al., 2006; Moretti et al., 2006).

1.3. Proteína de Unión a Citosinas Metiladas 2

La proteína de unión a citosinas metiladas 2 (Mecp2) pertenece a la familia de proteínas MBP y está codificada por el gen *Mecp2*, el cual posee cuatro exones que dan origen a dos isoformas de la proteína. Sin embargo, recientemente se demostró que la re-expresión isoforma-específica de Mecp2 revierte el fenotipo asociado al síndrome de Rett, que se define más adelante (Kerr et al., 2012). La proteína Mecp2 está compuesta por tres dominios: el dominio MBD, un dominio de represión transcripcional (TRD) y un dominio C-terminal. El dominio MBD es necesario y suficiente para la interacción con ^{5me}CpG en diversos contextos de secuencias de ADN (Free et al., 2001). El dominio TRD recluta complejos represores y proteínas HDAC, por lo que su actividad represora recae en la capacidad de remodelar la cromatina (Nan et al., 1998). El dominio C terminal facilita la interacción de Mecp2 con los nucleosomas y con el ADN desnudo (Chandler et al., 1999).



Esta diversidad de funciones hacen de *Mecp2* una proteína que integra información epigenética como la metilación del ADN para acoplarla a la expresión de genes blanco. Adicionalmente, se ha descrito que *Mecp2* reprime la transcripción génica de manera independiente de las HDAC (Yu et al., 2000). En esta misma línea se demostró que *Mecp2* previene la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción, interactuando con la maquinaria basal de la transcripción (Kaludov and Wolffe, 2000). Recientemente se ha descrito que en adición a su funcionalidad como represor transcripcional, *Mecp2* es capaz de activar la actividad transcripcional de genes como somatostatina y *Pomc*, demostrándose que *Mecp2* interactúa con co-activadores, destacándose la interacción con la 1 (CREB1). Esta interacción muestra un efecto sinérgico sobre la actividad transcripcional de los genes blanco. Se tiene entonces un panorama en que la metilación del ADN puede imposibilitar el acceso de factores de transcripción a los promotores. Esto puede ocurrir por la sola presencia de islas CpG metiladas o por la interacción de éstas con *Mecp2*, posicionando la metilación del ADN como un factor relevante en el estudio de la regulación de la expresión génica (Chahrour et al., 2008).

1.3.1. Regulación de *Mecp2* por Actividad Neuronal

Estudios llevados a cabo en ratón han mostrado que la proteína *Mecp2* se expresa en el sistema nervioso central, alcanzando sus niveles más altos de expresión en neuronas post-mitóticas (Balmer et al., 2003). Esto, sumado a la recuperación del fenotipo asociado al síndrome de Rett por la re-expresión de *Mecp2* en neuronas post-mitóticas en modelos murinos (Luikenhuis et al., 2004), sugieren un rol para *Mecp2* como un regulador selectivo de la expresión génica en neuronas.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) tiene un importante rol en el desarrollo y mantención del sistema nervioso central, promoviendo tanto el desarrollo y crecimiento de nuevas neuronas como su interacción por medio de conexiones sinápticas, modulando la actividad y plasticidad sináptica. La estructura del gen *Bdnf* de rata está bajo el control de cuatro promotores que dan origen a al menos ocho mensajeros diferentes (Timmusk et al., 1993). El aumento en la concentración de calcio intracelular activa al promotor III de *Bdnf* (Tao et al., 1998); esta activación involucra la fosforilación calcio-dependiente de *Mecp2* (Chen et al., 2003). *Mecp2* se encuentra unida al promotor del exón III en condiciones basales, sin embargo, ante la despolarización de la membrana, se gatilla la fosforilación de *Mecp2* en la serina 421 (S421);

esto libera a *Mecp2* del promotor, permitiendo su transcripción (Chen et al., 2003; Zhou et al., 2006). Diversos paradigmas han mostrado inducir la fosforilación en S421, entre los cuales se destaca la estimulación eléctrica de alta frecuencia y los entrenamientos conductuales, resultando de particular importancia que la mutación puntual que imposibilita la fosforilación en la S421, determina una mayor unión de *Mecp2* con sus promotores blanco (Li et al., 2011). Los trabajos presentados anteriormente son corroborados con la observación de modelos murinos del síndrome de Rett, los cuales muestran niveles normales de BDNF durante la etapa pre-sintomática del síndrome, dan paso a una disminución de los niveles con el comienzo de la sintomatología (Sun and Wu, 2006). Así, la sobreexpresión de BDNF en estos animales revierte parte de su fenotipo (Chang et al., 2006), sugiriendo que parte de las alteraciones que componen el RTT pueden deberse a una regulación transcripcional anómala debido a la ausencia de uno de sus reguladores transcripcionales basales, *Mecp2*.

Otra modificación post-traducciona importante para comprender la regulación actividad-dependiente de *Mecp2* es su fosforilación en la serina 80 (S80). Esta fosforilación es regulada de manera inversa a la fosforilación en S421. Así, la despolarización inducida por el tratamiento con KCl determina una disminución de los niveles de fosforilación en S80 (Tao et al., 2009). La mutación S80A determina menores niveles de interacción de *Mecp2* con promotores de genes blanco, teniéndose entonces que en estado de reposo la S80 se encuentra fosforilada, favoreciendo la interacción de *Mecp2* con promotores de genes blanco. Los animales que poseen la mutación S80A exhiben una reducción de la actividad locomotora a la mitad de la presentada por los animales silvestres. En contraste la mutación S421A determina un incremento en la actividad locomotora, sugiriendo que estas fosforilaciones tienen efectos diferentes y, probablemente opuestos sobre la funcionalidad de *Mecp2* (Chao and Zoghbi, 2009).

La capacidad de regular la funcionalidad de *Mecp2* de manera actividad-dependiente, hace de *Mecp2* un regulador transcripcional interesante. Además se debe señalar que los modelos murinos de Síndrome de Rett presentan diversas alteraciones, entre ellas debemos destacar los problemas en la homeostasis de calcio (Kron and Müller, 2010; Mironov et al., 2009) y las alteraciones en aprendizaje, memoria y LTP inducida en el área CA1 del hipocampo (Moretti et al., 2006).

1.3.2. Mecp2 y Potenciación de Larga Duración

En cuanto a la relación entre Mecp2 y la plasticidad sináptica, se destaca la caracterización de los animales mutantes nulos para Mecp2 realizada por Asaka y colaboradores (Asaka et al., 2006). Estos animales mostraron una disminución significativa en la facilitación por pulsos pareados, sugiriendo una mayor liberación de neurotransmisor en los animales nulos. La expresión de las subunidades del receptor NMDA también mostró diferencias, encontrándose disminuidos los niveles de la subunidad NR2A, mientras que los niveles de la subunidad NR2B se encontraron aumentados. La expresión de otras proteínas propias de la arquitectura pre y post sináptica evaluadas por Asaka et al. (2006) fueron indistinguibles entre el animal silvestre y los animales nulos para Mecp2. Consistente con estas observaciones, se encontró que las propiedades basales de la neurotransmisión no se ven afectadas en los animales nulos para Mecp2, observándose una curva estímulo-respuesta y una potenciación post-tetánica indistinguible de las respuestas obtenidas para los animales silvestres. A pesar de esto, existe un deterioro en la LTP inducida tanto por estimulación en rafagas theta como por estimulación de alta frecuencia en la sinapsis CA1-CA3 en animales sintomáticos, observándose que la potenciación cae a niveles basales tras alrededor de una hora de registro, datos que concuerdan con lo obtenido para la LTP inducida en rebanadas de corteza somatosensorial (Asaka et al., 2006; Lonetti et al., 2010; Weng et al., 2011).

1.4. Plasticidad Dependiente de la Experiencia

La dependencia de la estimulación externa es necesaria para el desarrollo y mantención de los circuitos neuronales en su aspecto más fino y funcional. Así, por ejemplo, el desarrollo de la sinapsis retinogénica murina conlleva al menos tres etapas. Las dos primeras son intrínsecas y no requieren la estimulación visual. En estas etapas se incluyen el desarrollo de las proyecciones axonales y formación de las sinapsis. La segunda etapa requiere actividad espontánea de las neuronas que participan de este circuito, permitiendo la eliminación de sinapsis inmaduras. La tercera etapa no es un fenómeno neuronal intrínseco y solo puede darse por medio de la exposición a la experiencia visual (Noutel et al., 2011). Esta etapa representa el fenómeno de plasticidad dependiente de la experiencia, en donde los programas intrínsecos son complementados por medio de la experiencia sensorial, permitiendo el refinamiento de los circuitos. Es interesante que Mecp2

participe activamente de la plasticidad dependiente de la experiencia, llegando a sugerirse que las principales características del síndrome de Rett surgen como consecuencia de la imposibilidad de llevar a cabo las modificaciones inducidas por medio de la plasticidad dependiente de la experiencia. Así, en el ejemplo planteado, la sinapsis retinogénica presenta alteraciones en los animales nulos para *Mecp2*. Sin embargo, las alteraciones encontradas no ocurren durante el desarrollo intrínseco y se limitan exclusivamente a la tercera etapa del desarrollo, la etapa que requiere de la experiencia (Noutel et al., 2011). El fenómeno de plasticidad dependiente de la experiencia continúa presentándose aún en la etapa adulta y es parte importante del aprendizaje y formación de nuevas memorias. Así debemos considerar que el RTT es reversible en ratones adultos, así la re-expresión de *Mecp2* en ratones permite una robusta recuperación del fenotipo asociado a este síndrome (Guy et al., 2007; Kerr et al., 2012), sugiriendo que este síndrome no encuentra su fundamento en problemas neurodegenerativos y que los genes necesarios para dar origen a los fenómenos asociados con la plasticidad sináptica se encuentran intactos pero silentes en este modelo murino. Así, la recuperación fenotípica sugiere que la regulación de estos genes silentes puede ser recuperada activamente en neuronas. A continuación se presentará un paradigma ampliamente utilizado para inducir plasticidad dependiente de la experiencia.

1.4.1. Enriquecimiento Ambiental

El enriquecimiento ambiental (EE) es una modificación de las condiciones estándar para la mantención de animales de laboratorio definida inicialmente como «una combinación compleja de estimulación social e inanimada». El EE típicamente considera jaulas más grandes de lo normal, un grupo mayor de animales, objetos de diferentes formas, tamaños y texturas y la oportunidad de realizar ejercicio voluntario (van Praag et al., 2000). El objetivo del enriquecimiento ambiental es proveer al animal con mayores niveles de estimulación sensorial y cognitiva, además de posibilitar la existencia de conductas sociales más complejas, promoviendo en consecuencia la conducta exploratoria espontánea (Baroncelli et al., 2010).

El EE causa diversos efectos a nivel conductual y fisiológico, tanto para animales silvestres como en modelos de diversas enfermedades. Así el EE determina un incremento en los niveles de neurotrofinas como BDNF y el factor de crecimiento de nervios (NGF) (Ickes et al., 2000). Estructuralmente, el EE aumenta tanto la arborización dendrítica como el número de espinas dendríticas (Rasin et al., 2011; Turner et al., 2003), llegando recientemente a demostrarse *in*

in vivo que el EE incrementa la densidad y la tasa de recambio de espinas dendríticas (Jung and Herms, 2014). A nivel celular, se observa un incremento en la expresión de proteínas propias de la arquitectura sináptica, como PSD-95 y Sinaptofisina (Nithianantharajah et al., 2004) y un cambio en la expresión de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, favoreciendo la dinámica de ensamblaje y tráfico de receptores (Naka et al., 2005; Tang et al., 2001), determinando una potenciación de la LTP inducida en la sinapsis CA3-CA1 (Artola et al., 2006; Duffy et al., 2001). Estos cambios fisiológicos están acompañados por un mejor desempeño en pruebas conductuales como el laberinto acuático de Morris (Kempermann et al., 1997) y la extinción del miedo inducido por condicionamiento al contexto (Tang et al., 2001). Se tiene entonces que el EE, como modelo de estimulación cognitiva, sensorial y motora, ha demostrado inducir plasticidad sináptica dependiente de la experiencia, tanto a nivel estructural como funcional (Nithianantharajah and Hannan, 2006).

1.4.2. Enriquecimiento Ambiental y Enfermedades Neurológicas Asociadas al Desarrollo

Dada la actividad multifactorial del EE sobre la plasticidad sináptica, se considera la posibilidad de que el EE pueda tener un efecto benéfico sobre diversas enfermedades neurológicas que comparten la disminución de la plasticidad sináptica como rasgo característico, siendo esto producto de la alteración de los procesos de plasticidad que tienen lugar de manera natural durante el desarrollo. El síndrome de Rett pertenece a este grupo de enfermedades y a través de uno de sus principales modelos se ha podido dar cuenta del efecto del enriquecimiento sobre parámetros conductuales, morfológicos y moleculares. Así, para animales nulos para *Mecp2*, el EE determina una normalización de los niveles de BDNF, alcanzando los niveles de los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar. Además se observó una recuperación de la LTP inducida por TBS en rebanadas de corteza somatosensorial (Lonetti et al., 2010). Esto es acompañado por una recuperación de la coordinación motora y de la conducta ansiosa evaluada a través del laberinto en cruz elevada (Kerr et al., 2010a), permitiendo que los cambios que subyacen estas mejoras cobren relevancia como blanco terapéutico para el Síndrome de Rett.

El síndrome de Rett es una de diversas enfermedades neurológicas para las cuales el EE ha mostrado revertir parte de su fenotipo. Entre ellas cabe destacar las enfermedades de Huntigtons, Alzheimer, Parkinson y al Síndrome de X frágil (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Dando

cuenta de que el enriquecimiento ambiental, como modelo de plasticidad dependiente de la experiencia, es capaz de gatillar efectos estructurales y moleculares tanto en animales silvestres como en diversos modelos de enfermedades.

1.5. Propuesta

A lo largo de la introducción se han presentado datos que sugieren un rol activo de los canales RyR tanto en la inducción como en la mantención de la LTP, concepto que se ve reforzado por las diferentes alteraciones conductuales evidenciadas al modificar la funcionalidad de los receptores de ryanodina por medio de agentes farmacológicos. En el laboratorio de la Dra. Cecilia Hidalgo se ha establecido que tanto *Ryr2* como *Ryr3* aumentan su expresión en respuesta a la inyección de BDNF intra-hipocampo; así mismo, el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris aumenta la expresión de ambos isotipos en hipocampo de rata (Adasme et al., 2011), abriendo la interrogante acerca del mecanismo de regulación transcripcional de los canales RyR. En particular, RyR3 ha mostrado participar de la inducción y mantención de la LTP (Balschun et al., 1999), además de resultar determinante para el rendimiento en pruebas de aprendizaje y memoria, haciendo que la regulación transcripcional de *Ryr3* sea un área interesante de estudio.

La metilación del ADN como marca neuroepigenética presenta el potencial de regular la expresión génica. En esta línea, el trabajo de Guo et al. (2011) muestra que la estimulación electro-convulsiva aplicada a ratones genera cambios perdurables en la metilación del ADN, encontrándose a *Ryr3* entre los genes que presentan cambios en los niveles de metilación de su promotor (Guo et al., 2011). Consecuentemente, se observó un cambio en los niveles transcripcionales de *Ryr3*, sugiriendo que la metilación del promotor de *Ryr3* es un elemento que puede efectivamente regular su transcripción.

Dentro de las proteínas MBD que interactúan con el ADN metilado, *Mecp2* ha mostrado ser regulada de manera actividad-dependiente por medio de su fosforilación en S421 y S80, alterando su capacidad de interactuar con promotores de genes blanco como BDNF. Consistente con la idea de que *Mecp2* puede actuar como regulador transcripcional de *Ryr3*, se tiene que un análisis de la expresión génica de animales nulos para *Mecp2* arrojó a *Ryr3* entre los genes con expresión reducida en cerebelo (Ben-Shachar et al., 2009a), sugiriendo que *Mecp2* participa activamente sobre la actividad transcripcional de *Ryr3*. *Mecp2* permite así relacionar la actividad neuronal

con la actividad transcripcional de un gen, haciendo de *Mecp2* un interesante candidato para dirigir la regulación actividad-dependiente de *Ryr3*.

El EE, como paradigma experimental, ha mostrado inducir plasticidad dependiente de la experiencia, tanto a nivel estructural como fisiológico. Por esto, el EE constituye un paradigma útil para evaluar cambios inducidos por actividad neuronal, mostrando la capacidad de potenciar la LTP y de alterar la expresión de diversas proteínas relacionadas a la plasticidad sináptica. Así, el EE permite abordar la capacidad de *Mecp2* de actuar como regulador transcripcional actividad-dependiente de *Ryr3*. Además, la recuperación fenotípica inducida por el EE en animales nulos para *Mecp2* permite plantear al EE como una plataforma para identificar cambios críticos con potencial terapéutico para el síndrome de Rett, resultando sumamente interesante comprender la participación de los canales RyR en este proceso.

En esta tesis se buscará determinar la regulación transcripcional de *Ryr3* por medio de la interacción de la proteína *Mecp2* con su promotor, con énfasis en las modificaciones de esta interacción determinados por el paradigma de EE utilizado como inductor de plasticidad dependiente de la experiencia. Conjuntamente, mostrar que *Mecp2* actúa como regulador de la expresión del canal *Ryr3* permite suponer un rol para estos canales en el fenotipo sináptico de los animales nulos para *Mecp2*, por lo que se plantea evaluar la funcionalidad de los canales RyR en este modelo del síndrome de Rett. Resulta llamativo evaluar si los canales RyR participan del fenotipo sináptico descrito para los animales nulos así como de la mejoría fenotípica observada al exponer a los animales nulos al EE.

Con los antecedentes descritos, se plantea la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo.

1.5.1. Hipótesis

La proteína de unión a citosinas metiladas 2 (*Mecp2*) actúa como activador transcripcional del receptor de ryanodina 3 (*Ryr3*) en plasticidad dependiente de la experiencia inducida en ratones por exposición prolongada a un ambiente enriquecido (Figura 1.5.1).

1.5.2. Objetivo General

Determinar el mecanismo de regulación transcripcional de *Ryr3* en plasticidad dependiente de la experiencia en función de la interacción de *Mecp2* con su promotor evaluada en hipocampos

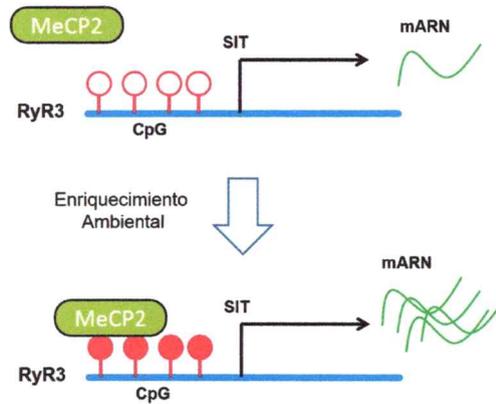


Figura 1.5.1: **Hipótesis:** Se representa la hipótesis del trabajo: Mecp2 actúa como activador transcripcional de Ryr3. Se destaca el efecto del ambiente enriquecido sobre la metilación del promotor de Ryr3, pasando de un estado de metilación bajo (círculos vacíos) a un nivel alto (círculos rellenos). El incremento de la metilación favorece la interacción de Mecp2 con el promotor, incrementando la actividad transcripcional (SIT: Sitio de Inicio de Transcripción).

de ratones.

1.5.2.1. Objetivo Específico 1

Evaluar el estado de la metilación del promotor proximal de Ryr3 en condición basal y determinar el efecto del EE sobre este estado

Haciendo uso de la reacción en cadena de la polimerasa específica para la metilación (MSP) y de la secuenciación de ADN modificado por bisulfito, se caracterizará la metilación del promotor proximal de Ryr3, lo que permitirá otorgar un sustrato para su regulación en función de Mecp2. Dada la evidencia presentada en el trabajo de Guo y colaboradores (Guo et al., 2011), se espera encontrar que el promotor proximal de Ryr3 presente citosinas que muestren cambios en su estado de metilación debido a la plasticidad dependiente de la experiencia inducida por el EE.

1.5.2.2. Objetivo Específico 2

Determinar la interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3 en condición basal y el efecto del EE sobre esta interacción.

Se evaluará la funcionalidad de la metilación en función de la interacción de Mecp2 con la región caracterizada en el objetivo 1. Así mismo, se buscará establecer una relación entre esta

interacción y los niveles de transcripción de Ryr3. Se espera, según planteado en la hipótesis, que exista una relación directa entre la interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3 y su nivel de actividad transcripcional evidenciado en el nivel de ARN mensajero detectado. Así mismo, se espera una concordancia entre lo propuesto en la hipótesis y los niveles de ARN mensajero de Ryr3 observados en animales nulos para Mecp2 mantenidos tanto en condiciones estándar (SC) como en EE, corroborando el rol de Mecp2 como activador transcripcional de Ryr3.

1.5.2.3. Objetivo Especifico 3

Evaluar el papel de la regulación transcripcional de Ryr3 en el incremento en la densidad de espinas dendríticas inducida por EE.

Observaciones realizadas *in vitro* han permitido sugerir que los canales RyR contribuyen a la remodelación de espinas dendríticas dependiente de actividad. El EE será utilizado como paradigma para evaluar la contribución de la regulación transcripcional de Ryr3 a la remodelación de espinas dendríticas inducida por la plasticidad dependiente de experiencia. Se espera que los animales nulos para Mecp2 presenten disminuida la densidad de espinas dendríticas producto de la regulación transcripcional alterada de Ryr3. Funcionalmente se espera que esto se manifieste en alteraciones conductuales en una prueba de memoria y aprendizaje en comparación a los animales silvestres mantenidos en EE.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Descripción General

Al obtenerse una camada de animales estos son genotipificados, reconociendo si son animales silvestres (WT) o nulos para *Mecp2* (KO). Los animales son situados en un EE, con comida y agua brindadas ad-libitum, desde el destete hasta cumplidas las 8 semanas, edad a la cual se iniciarán los experimentos. Esto permite contar con 4 grupos experimentales: Animales silvestres mantenidos en condiciones estándar (WT-SC), animales silvestres mantenidos en EE (WT-EE), animales nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar (KO-SC) y animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE (KO-EE) (Figura 2.1.1). El EE consiste de dos jaulas fusionadas por medio de un túnel. Estas jaulas son compartidas por 8-10 animales, contrastando con los 4-6 animales mantenidos en las jaulas estándar. Cada ambiente enriquecido presenta objetos de diferentes formas, colores y texturas con el objetivo de aumentar la estimulación sensorial. Además los animales tienen acceso a una rueda de ejercicio voluntario. Todos los objetos son cambiados diariamente, por lo que el acceso a los diferentes juguetes, incluyendo la rueda de ejercicio, es intermitente. La jaula de enriquecimiento cuenta además con dos tipos de suelo, de diferentes texturas y olores, los cuales son intercambiados semanalmente para maximizar la novedad y estimulación del enriquecimiento.

Para caracterizar la metilación del promotor de *Ryr3* se utilizarán animales silvestres mantenidos en condiciones estándar y animales silvestres mantenidos en EE. Se extraerá ADN desde el hipocampo de estos animales, el cual será sometido a conversión por bisulfito. Una vez realizado

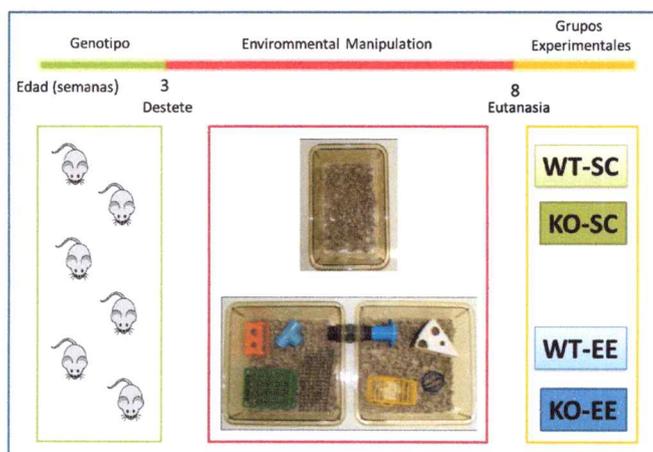


Figura 2.1.1: **Esquema global de la metodología de trabajo:** Los animales, luego de ser genotificados, son destinados a una de las condiciones ambientales en las cuales se mantienen desde las 3 semanas hasta las 8 semanas de vida. Producto de este esquema se obtienen cuatro grupos experimentales Animales silvestres en condiciones estándar (WT-SC) y en enriquecimiento (WT-EE) y animales nulos para *Mecp2* en condiciones estándar (KO-SC) y en enriquecimiento (KO-EE).

esto, el ADN modificado se utilizará como sustrato para PCR metilación específica, obteniéndose una aproximación cualitativa del estado de metilación. A continuación se secuenciará la región de interés, y se comparará las secuencias de los animales en condiciones estándar y de EE. Este protocolo permitirá detectar cambios en el patrón de metilación entre las dos condiciones. Los resultados del PCR metilación específico permitirán dar un soporte a la región en estudio para proceder a su secuenciación. En el caso de encontrarse un resultado negativo para el PCR metilación específico, se procederá a replantear la región de interés.

Para el objetivo 2, se comparará la inmuno precipitación de cromatina realizada por medio de anticuerpos contra *Mecp2* total en muestras obtenidas desde hipocampos de animales silvestres mantenidos en condiciones estándar o en EE, para caracterizar la interacción de *Mecp2* con las regiones de interés definidas en el objetivo 1. Junto con esto se compararán, por medio de PCR en tiempo real, los niveles de ARN mensajero de *Ryr2* y *Ryr3* para los animales silvestres en condiciones estándar y en EE, con el propósito de establecer si hay una correlación entre la interacción de *Mecp2* y el nivel transcripcional de *Ryr2* y *Ryr3*. En este punto se incluirán los animales nulos para *Mecp2*, permitiendo comparar la expresión de *Ryr2* y *Ryr3* con la de los animales silvestres.

La idea de que es posible mantener una regulación transcripcional de Ryr3 por la proteína Mecp2, permite preguntarse si esta regulación contribuye a la remodelación de espinas dendríticas dependiente de la actividad, de manera similar a como se ha observado en modelo *in vitro*. Así, se evaluará la densidad de espinas dendríticas en hipocampos de animales silvestres y nulos para Mecp2, mantenidos tanto en condiciones estándar como en enriquecimiento. De encontrarse diferencias significativas en la densidad de espinas dendríticas se procederá a caracterizar el mecanismo por el cual RyR3 puede contribuir a la remodelación de espinas dendríticas.

2.2. Soluciones y Tampones

Para preparar las diferentes soluciones se cuenta con una serie de soluciones de abastecimiento, las cuales sirven de base para la elaboración de las soluciones de trabajo. Así, una solución de trabajo se obtiene al combinar diferentes volúmenes de las soluciones de abastecimiento y completar hasta el volumen indicado en cada solución.

2.2.1. Soluciones de Abastecimiento

Las siguientes soluciones se utilizaron como base para la preparación de las soluciones de trabajo. Su elaboración debe ser cuidadosa, prestando atención a la condición de los implementos y al pH final de la solución.

Nombre	Concentración	pH
Tris-HCl	0.5 M	8.0
EDTA	0.5 M	8.0
EGTA	200 mM	8.0
NaCl	2.5 M	
Hepes	0.5 M	7.5
KCl	2.5 M	
NaOH	3 M	
SDS	20 %	
Nonidet P40	100 %	

Cuadro 2.2.1: Soluciones de Abastecimiento

2.2.2. Soluciones de Trabajo

Las soluciones de trabajo son preparadas considerando diferentes volúmenes de las soluciones de abastecimiento, en los siguientes cuadros se presentan las composiciones de cada solución, señalando los volúmenes de las soluciones de abastecimiento necesarios y el volumen final de la solución. Se presenta también la concentración final de cada componente de la solución.

2.2.2.1. Soluciones para Genotipificación

Para la genotipificación se requieren dos tampones Tris-EDTA y TE. El primero se utiliza para la lisis del tejido y la obtención de ADN (TEL). El ADN obtenido se resuspende en buffer TE.

Solución	Volumen de Abastecimiento	Concentración Final (V = 50 mL)
Tris HCL	10 mL	100 mM
EDTA	500 uL	5 mM
NaCl	4 mL	200 mM
SDS	500 uL	0.2 %

Cuadro 2.2.2: Tampón TEL

Solución	Volumen de Abastecimiento	Concentración Final (V = 50 mL)
Tris HCl	1 mL	10 mM
EDTA	100 uL	1 mM

Cuadro 2.2.3: Tampón TE

2.2.2.2. Soluciones para Inmunoprecipitación de Cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina utiliza tres tampones básicos. El primero se requiere para llevar a cabo la fijación de la muestra, permitiendo fijar las interacciones entre ADN y proteínas. Posterior a esto, se requiere llevar a cabo la lisis celular y lisis nuclear, este último tampón es de suma importancia, ya que en éste tampón tendrá lugar la sonicación de la cromatina.

Solución	Volumen de Abastecimiento	Concentración Final (V = 50 mL)
Hepes	5 mL	50 mM
EDTA	100 uL	1 mM
EGTA	125 uL	0.5 mM
NaCl	2 mL	100 mM

Cuadro 2.2.4: Tampón de Fijado

Solución	Volumen de Abastecimiento	Concentración Final (V = 50 mL)
Tris HCl	1 mL	10 mM
NaCl	200 uL	10 mM
Nonidet P40	100 uL	0.2 %

Cuadro 2.2.5: Tampón de Lisis Celular

Solución	Volumen de Abastecimiento	Concentración Final (V = 50 mL)
Tris HCl	5 mL	50 mM
EDTA	1 mL	10 mM
SDS	2.5 mL	1 %

Cuadro 2.2.6: Tampón de Lisis Nuclear

2.3. Métodos

2.3.1. Animales

Los animales nulos para *Mecp2* corresponden al modelo desarrollado en el laboratorio de Adrian Bird (Guy 2001). Los fundadores de la colonia fueron obtenidos desde The Jackson Laboratory stock #003890. Hembras heterocigotas para *Mecp2* en un fondo genético C57BL/6:129/SvJ fueron cruzadas con machos silvestres en un fondo 129/SvJ. En esta tesis, para fines experimentales, solo se utilizaron los machos nulos para *Mecp2* y sus hermanos silvestres. Los animales se mantuvieron en racks ventilados en condiciones SPF (Specific Pathogen Free) a una temperatura ambiente de 20 °C en ciclo de 12/12 horas Día/Noche. La comida y el agua se brindaron ad libitum. Los experimentos fueron diseñados de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de los animales de experimentación y aprobados por el comité bioético para el cuidado y uso de los animales del Centro de Estudios Científico. Previo al trabajo con animales se exigió la aprobación

del curso teórico/práctico de manipulación y uso de animales de experimentación dictado por el director del bioterio del Centro de Estudios Científicos. El bioterio del centro de estudios científicos cuenta con certificación internacional otorgada por la AAALAC (<http://www.aaalac.org/>).

2.3.2. Enriquecimiento Ambiental

Los animales fueron mantenidos en un ambiente enriquecido por 5 semanas desde el destete (p21). En cada enriquecimiento ambiental fueron mantenidos un mayor número de animales por jaula (8-10 ratones), favoreciendo el establecimiento de interacciones sociales complejas. En adición los animales cuentan con mayor espacio por animal (159 cm² por ratón) que sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (113 cm² por ratón). Las jaulas enriquecidas cuentan con diversos juguetes que, para incrementar la novedad, son intercambiados diariamente. Los juguetes incluyen una rueda de ejercicio voluntario, la cual está disponible intermitentemente para los animales. Otros juguetes permiten la formación de pequeños laberintos y nidos. El EE considera las mismas condiciones de luz, temperatura y alimento que la de los animales mantenidos en condiciones estándar.

2.3.3. Genotipificación

Se obtuvieron las puntas de las colas de los animales durante su tercera semana de vida; las colas fueron digeridas en tampón TEL incluyendo proteínasa K a 55° durante toda la noche. El ADN fue precipitado y lavado por la adición sucesiva de etanol 100 % y 70 % para ser resuspendido en 50 µL de tampón TE. Una vez obtenido el ADN, este fue utilizado como substrato en un PCR utilizando los partidores de genotipificación: partidor sentido común para WT y KO secuencia CCA CCC TCC AGT TTG GTT TA, partidor antisentido específico para WT secuencia GAC CCC TTG GGA CTG AAG TT y partidor antisentido específico para KO secuencia CCA TGC GAT AAG CTT GAT GA (Cuadro 2.3.1). El producto del PCR es analizado en un gel de agarosa al 1,5 % observándose las bandas correspondientes a animales silvestres, heterocigotos y nulos para Mecp2. Considerando el genotipo, los animales son asignados azarosamente a las diferentes condiciones experimentales.

Reactivo	Solución de abastecimiento	Volumen	Concentracion Final
Tampón	5x Green Buffer Promega	4 uL	1x
dNTPs	5 mM Promega	0.8 uL	0.2 mM
Partidor Sentido	10 uM	1 uL	0.5 uM
Partidor Antisentido WT	10 uM	1 uL	0.5 uM
Partidor Antisentido KO	10 uM	1 uL	0.5 uM
MgCl ₂	25 mM	0.4 uL	0.5 mM
Taq	-	0,4 uL	-
Agua ultrapura	-	11.4 uL	-
ADN	-	1 uL	-
Volumen de Reacción	-	20 uL	-

Cuadro 2.3.1: Mix de PCR para Genotipificación de animales nulos para Mecp2

2.3.4. Tinción de Golgi-Cox

La tinción de Golgi-Cox se realizó en rebanadas de hipocampo utilizando el Kit FD Rapid GolgiStain (FDNeuroTechnologies) siguiendo las instrucciones proporcionadas. Los cerebros fueron removidos rápida y cuidadosamente para evitar un daño externo producto de la manipulación y fueron sumergidos en suero fisiológico mantenido a 4 °C para remover la sangre de la superficie. El cerebro se seccionó mediante cortes coronales conservando la región conteniendo el hipocampo y se sumergieron en la solución de impregnado en la que se mantuvieron en oscuridad por 2 semanas. Cortes de 200 µm fueron realizados en criostato y montados en porta-objetos en dónde se finalizó el protocolo de tinción. Los cortes fueron finalmente deshidratados y cubiertos utilizando Permount como medio. Los cortes fueron conservados en oscuridad hasta la toma de fotografías.

2.3.5. Cuantificación de Espinas Dendríticas

La cuantificación de espinas dendríticas se realizó según previamente descrito (Orlowski and Bjarkam, 2012). Dendritas secundarias o terciarias del Stratum radiatum de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo fueron fotografiadas. Las dendritas consideradas para la cuantificación debían cumplir con los siguientes requisitos. 1) Presentar una buena tinción, sin cortes a lo largo de la dendrita 2) Ubicarse a al menos 40 µm del soma 3) El fragmento a cuantificar debe encontrarse en un mismo plano focal y presentar un largo de alrededor de 30 µm



Figura 2.3.1: **Cuantificación de espinas Dendríticas:** La dendrita es reducida hasta conformarse un esqueleto de un pixel de ancho. El software ImageJ permite cuantificar las irregularidades del esqueleto, las cuales se corresponden con el número y ubicación aproximada de la espinas dendríticas. En la imagen se observa el esqueleto obtenido por el procesamiento de la imagen original sobrepuesto al fragmento de 20 μm de dendrita que le corresponde, apreciándose la colocación de espinas con las perturbaciones del esqueleto de la dendrita. La imagen ha sido ampliada para su visualización.

(20-50 μm) 4) El fragmento a cuantificar debe ser relativamente recto para minimizar errores. Alrededor de 30 dendritas por animal fueron consideradas para su cuantificación.

Las imágenes fueron inicialmente adquiridas mediante una cámara MSHOT (Digital Microscope Camera MD-90) montada sobre un microscopio Olympus CX31. El tamaño de las imágenes fue de 3488 x 2616 pixeles y se utilizó un objetivo 100 X, dando una buena resolución para observar espinas dendríticas individuales. Regiones de interés conteniendo los fragmentos de dendritas fueron recortadas de cada imagen y los procedimientos siguientes fueron realizados en una imagen binaria de 8 bits. Se obtuvo el esqueleto de la imagen binaria por medio del software ImageJ y se analizó utilizando la función Skeleton Analysis, obteniéndose el número de extremos del esqueleto. Los extremos del esqueleto representan el número de irregularidades en la superficie de la dendrita y corresponden al número y ubicación aproximada de las espinas dendríticas (Figura 2.3.1).

2.3.6. Extracción de Tejidos

Animales de 8 semanas de edad mantenidos en las diferentes condiciones experimentales fueron sacrificados por dislocación cervical. El hipocampo completo (HPC), la corteza (CTX) y el cerebelo (Cb) fueron disectados mediante un corte sagital medial. El tejido fue inmediatamente utilizado o conservado a -80°C hasta su uso.

2.3.7. PCR en Tiempo Real

El ARN total fue extraído utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN fue precipitado desde la fase acuosa por la adición de 1 volumen de alcohol isopropílico. El ARN fue tratado con una unidad de DNasa I (Life Technologies) y cuantificado en nanodrop por absorción a 260 nm y procesado inmediatamente guardándose los remanentes a -80 °C. 2 µg de ARN total fueron retrotranscritos por 60 minutos a 37 °C utilizando partidores al azar y el kit ImProm II (Promega) para sintetizar ADN complementario de hebra única (cADN). La amplificación y cuantificación del cADN se realizó por medio de un mix de PCR preparado utilizando Kapa SYBR Quantimix (Kapa). El PCR en tiempo real se realizó por triplicado utilizando el termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett, Australia) en un volumen final de 10 µL, cada uno conteniendo 1 µL de cADN en una dilución previamente determinada. Los resultados fueron analizados mediante el software Rotor Gene 6000 Series Software 1.7 (Corbett, Australia) y los valores fueron normalizados por la metodología de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando Ciclofilina A (Cyc1) como normalizador. Cyc1 ha demostrado ser expresado en altos niveles y presentar menor variabilidad que otros genes utilizados como normalizadores (Torres-Andrade et al., 2014). La expresión relativa se presenta como el promedio \pm SEM. La significancia se obtuvo por comparación utilizando la prueba de T de Student. La secuencia de los partidores utilizados se muestra en el cuadro 2.3.2.

Nombre	Alineación	Secuencia	Tm	Uso	Amplicón
Ryr3_F	Exón 18	TGGTGTCTGGTGATGATCTGT	58	mARN	180
Ryr3_R	Exón 19	TGCACAGGTTGTCCATTGAT	57	mARN	
Ryr2_F	Exón 72	AGCTTGAAAGACACCGAGGA	58	mARN	104
Ryr2_R	Exón 74	TAGAGAGCCATCTGCCACCT	60	mARN	
Cyc1_F	Exón 4	GGCAATGCTGGACCAAACACAA	62	mARN	221
Cyc1_R	Exón 5	GTA AAAATGCCCGCAAGTCAAAAG	59	mARN	
p250GAP_F	Exón 1	CAGGGATTCAAGAGTTTCTCAAG	57	mARN	213
p250GAP_R	Exón 2	TTAACCTTCGTGCTCGCTGT	59	mARN	
Pak1_F	Exón 1	CCTGAAGGAACCCGGCG	60	mARN	237
Pak_R	Exón 2	GGTGT TTTCTCATCGGAGGGG	60	mARN	

Cuadro 2.3.2: Secuencias Partidores para PCR en Tiempo Real

La metodología utilizada para la cuantificación de los datos obtenidos por PCR en tiempo real corresponden al método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Esta metodología ha sido ampliamente utilizada, contando con más de 100 citaciones en la base de datos Pubmed y ha sido previamente utilizada en el laboratorio del Dr. Kerr para la evaluación de expresión génica considerando diferentes condiciones (Torres-Andrade et al., 2014). El detalle del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ puede ser revisado en el trabajo de Livak and Schmittgen (2001), sin embargo se procederá a dar una breve descripción del mismo para permitir una mejor interpretación de resultados al lector. El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fue utilizado debido a que permite determinar una cuantificación relativa de un ARN mensajero, es decir, permite determinar si en una condición de interés un ARN mensajero se encuentra en mayor o menor abundancia en comparación a una condición control. En la mayoría de los análisis de esta tesis, la condición ambiental estándar es considerada como referencia o control y el enriquecimiento ambiental representa la condición de interés en la cual se busca determinar la abundancia relativa de los diferentes mensajeros. Este método considera la normalización de la abundancia de un mensajero de interés por la abundancia de un mensajero de referencia (C_t interés - C_t normalizador = ΔC_t), evitando que las diferencias observadas para el mensajero de interés se deban a diferencias en la cantidad de cADN utilizado. En adición, el método considera una segunda normalización por la condición de referencia o en nuestro caso, la condición estándar de mantención de los ratones (ΔC_t - C_t promedio obtenido en la condición referencia = $\Delta\Delta C_t$). Ambas normalizaciones permiten obtener los componentes principales del método $\Delta\Delta C_t$. De esta forma, los resultados y análisis presentados en esta tesis considerarán siempre datos normalizados. El trabajo con datos de C_t crudos fue evitado siguiendo la recomendación presentada en el trabajo de Livak and Schmittgen (2001): «Cualquier análisis estadístico considerando los valores de C_t crudos debe ser evitado». Debido a las normalizaciones sucesivas, tanto por un mensajero de referencia, como por una manipulación ambiental control, el método exige que la abundancia del mensajero de referencia no sea alterada por las manipulaciones ambientales. La forma de llevar a cabo esta evaluación está descrita (Livak and Schmittgen, 2001). En esta tesis, se realizó la evaluación de una serie de normalizadores de los cuales sólo dos mostraron una abundancia constante entre las diferentes manipulaciones ambientales, estos mensajeros son beta 2 microglobulina (B2M) (datos no presentados) y Cyc1 (sección resultados, figura 3.3.3). En adición, Cyc1 fue previamente validado para la publicación del trabajo de Torres-Andrade et al. (2014). A pesar de esto, los principales resultados de esta

tesis fueron analizados utilizando tanto B2M como Cyc1 como normalizadores, permitiendo corroborar que las diferencias observadas en los diferentes experimentos no se deben a alteraciones de carga de cADN ni corresponden a un artefacto producido por el mensajero de referencia. No obstante, es importante señalar que en este escrito se presentan sólo resultados obtenidos utilizando Cyc1 como normalizador. El segundo punto crucial y restrictivo para este método es que las eficiencias de los partidores utilizados para el mensajero de interés y de referencia sean similares. La forma de llevar a cabo esta evaluación está descrita (Livak and Schmittgen, 2001), y los análisis pertinentes fueron realizados para los diversos partidores utilizados. Se presenta un ejemplo representativo del análisis realizado para los mensajeros de Cyc1 y de Ryr3 (Figura 3.3.3). En resumen: se realizaron las evaluaciones requeridas para el uso del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ cumpliéndose los requisitos presentados en el trabajo, permitiendo el uso de esta metodología. Así, los resultados de esta tesis se presentan siempre en forma de expresión relativa, normalizados tanto por un mensajero de referencia como por la manipulación ambiental control.

2.3.8. Modificación de ADN por Bisulfito

El tejido fresco o mantenido a -80°C fue digerido utilizando la proteínasa K por 4 horas a 55°C . El homogenizado fue tratado con una unidad de RNAsa a 37°C por una hora para eliminar la contaminación por ARN. El ADN se obtuvo desde la fase acuosa obtenida por la adición de 1 volumen de Fenol/Cloroformo/alcohol Isoamílico (25:24:1) (Invitrogen). El ADN fue resuspendido en $100\ \mu\text{L}$ de tampón TE y cuantificado utilizando nanodrop por absorción a $260\ \text{nm}$. La modificación de ADN por bisulfito se realizó utilizando el kit CpGenome Turbo Bisulfito Modification (Millipore) según las instrucciones del proveedor. $150\ \text{ng}$ de ADN fueron denaturados por la adición de NaOH 3N e incubados a 37°C por 10 minutos. La modificación se realizó por 40 minutos a 70°C procediéndose inmediatamente a la desulfonación. El ADN modificado se purificó por centrifugación en columnas, eluyéndose en $25\ \mu\text{L}$ de tampón previamente calentado a 65°C .

2.3.9. PCR Metilación Específico

El PCR metilación específico (MSP) consta de una etapa inicial de denaturación a 95°C con el fin de disminuir la probabilidad de ocurrencia de estructuras secundarias que faciliten el alineamiento indeseado de partidores. Posterior a esta etapa se realizó un número de ciclos

Nombre	Alineación	Secuencia	Tm	Uso	Amplicón
ryr3_M1_F	1426	GTCGTGTTAGTTGGTGTTTATAGTC	56	MSP	155
ryr3_M1_R	1581	TCTCTAACAACTCTTTACATACGCA	57	MSP	
ryr3_M2_F	1426	GTCGTGTTAGTTGGTGTTTATAGTC	56	MSP	154
ryr3_M2_R	1580	CTCTAACAACTCTTTACATACGCA	55	MSP	
ryr3_M3_F	1425	TGTCGTGTTAGTTGGTGTTTATAGTC	58	MSP	156
ryr3_M3_R	1581	TCTCTAACAACTCTTTACATACGCA	57	MSP	
ryr3_BCD1_F	371	TTTGTGTTGTGTAAGTTTGTGGAGA	60	BCD	259
ryr3_BCD1_R	629	CCATTTACTAAAAACAACCCTACC	58	BCD	
ryr3_BCD2_F	372	TTGTTTGTGTAAGTTTGTGGAGATA	59	BCD	259
ryr3_BCD2_R	629	CCATTTACTAAAAACAACCCTACC	58	BCD	

Cuadro 2.3.3: Secuencias Partidores para MSP

determinado experimentalmente. Cada ciclo considera denaturación-alineamiento-elongación a 95 °C - Tm - 72 °C, respectivamente. La temperatura de alineamiento (Tm) se determinó experimentalmente utilizando un gradiente de temperatura. El diseño de los partidores se realizó utilizando el programa Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Este programa permite tanto el diseño de partidores para MSP como partidores para amplificar ADN modificado por bisulfito (BCD). Se diseñaron 3 juegos de partidores; el alineamiento del juego de partidores en el contexto de la región de interés se muestra en la figura 2.3.2. El partidor sentido considera 7 citosinas, de las cuales 2 se encuentran en el contexto CpG. El partidor antisentido considera 5 citosinas, de las cuales 1 se encuentra en un dinucleotido CpG. Las secuencias se pueden encontrar en el cuadro 2.3.3

2.3.10. Secuenciación del Promotor del Gen que Codifica para Ryr3

Se delimitó una región de interés (ROI) definida según los resultados obtenidos por medio de MSP. El ROI fue definido considerando la secuencia de referencia del gen codificando para Ryr3 (NM_177652), ubicándose en esta secuencia el sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente se abarcaron 1000 pb rio arriba y 800 pb rio abajo, dando un ROI de 1800 pb totales. En esta región se identificaron 9 dinucleótidos CpG, entre las que se encuentran las citosinas evaluadas por MSP. La región genómica de secuenciación puede ubicarse en el Genome Browser de la UCSC

Nombre	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido
Ryr3_1	TTTAGATGTTTGTGTGTAAAGTTGTGG	CAACCCCTACCCAAAAACATACCTAAATAAT
Ryr3_2	TAGGAAATTTGATTTTATTGTGTAGTGTTT	AACCTCTTCCCCGAAAAATATAAAC
Ryr3_3	TAATTAAGATTGAAAGAGTAGATTTGTTTAGAT	AACGACCTAAAAATAAACTTAATTATGAAAATAA

Cuadro 2.3.4: Partidores utilizados en la secuenciación del promotor de Ryr3

bajo las coordenadas: chr2:113029482-113031331 (<http://genome.ucsc.edu/>). La secuenciación se realizó utilizando los partidores presentados en el cuadro 2.3.4 a partir de ADN obtenido desde hipocampo, cerebelo y corteza de animales mantenidos en condiciones estándar y en EE. Se secuenciaron muestras de las diferentes subregiones de 4 animales por condición ambiental. También se secuenciaron hipocampos de 3 animales de 3 semanas de edad (p21). Estos últimos se definirán como animales jóvenes en el trabajo, mientras que aquellos animales que son mantenidos dentro de las manipulaciones ambientales descritas para este trabajo se consideran animales adultos. La secuenciación fue realizada por una empresa externa (Zymo Research, California, Estados Unidos), quienes realizaron la modificación por bisulfito y la amplificación de los fragmentos de interés conteniendo los dinucleótidos CpG ubicados en el promotor de Ryr3. Los resultados se presentan como porcentaje de metilación, este porcentaje representa la cantidad de veces que una determinada citosina se encontró metilada del total de lecturas dadas para esa citosina particular en el tejido analizado.

2.3.11. Inmuno Precipitación de Cromatina

El hipocampo completo fue sometido a una interrupción mecánica breve y fijado inmediatamente por 8 minutos a temperatura ambiente en solución de fijado conteniendo formaldehído al 1% (Amresco). La fijación se detuvo con la adición de glicina 2.5 M. Se realizaron lavados con PBS estéril conteniendo inhibidores de proteasas para luego proceder a homogenizar el tejido mediante un homogenizador Potter en solución de lisis celular. El producto de la homogenización fue centrifugado y el precipitado resuspendido en 500 μ L de tampón de lisis nuclear. La sonicación se realizó en ciclos de 30 segundos por un tiempo determinado experimentalmente de 20 minutos, obteniéndose fragmentos de cromatina en el rango de 200 pb (Figura 3.4.1b). Los complejos ADN-Proteína se precipitaron utilizando el Kit EpiQuik Chromatin immunoprecipitation (# P-2003, Epigentek) utilizando 3 μ g de anticuerpo contra Mecp2 (ab2828, Abcam) o

igual cantidad de IgG como control. Para revertir el entrecruzamiento se incubó a 65 °C por toda la noche y posteriormente se realizó una digestión utilizando proteinasa K. El ADN se obtuvo una vez realizada una extracción con Fenol/Cloroformo/alcohol Isoamílico (25:24:1) (Invitrogen) y una precipitación con etanol y acetato de amonio a -80 °C por una hora. Para evaluar el nivel de interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3, se realizaron PCR utilizando el inmuno precipitado como sustrato con los partidores estandarizados experimentalmente, cuyas secuencias se presentan en el cuadro 2.3.5. En la figura 2.3.2 se aprecia la ubicación de los partidores en el contexto de la secuencia del promotor. Los resultados se presentan como PCR de punto final en gel de agarosa, PCR en tiempo real normalizado utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ (revisar la sección PCR en tiempo real para mayor detalle) considerando el locus H19 como región de referencia y el promotor de Ryr3 como región de interés y como porcentaje del input según descrito previamente (Lin et al., 2012).

2.3.12. Laberinto Acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris es una prueba clásica de aprendizaje espacial dependiente de hipocampo. Para esta prueba se llevó a cabo el entrenamiento descrito en Adasme y colaboradores (2011). La piscina es un recipiente plástico de 1,20 m de diámetro y 60 cm de alto y fue llenada con agua coloreada blanca hasta alcanzar los 40 cms de profundidad. El agua fue coloreada con el fin de ocultar la plataforma, la cual fue situada en el cuadrante norte. Cla-

Nombre	Alineación	Secuencia	Tm	Uso	Amplicón
ryr3_C1_F	1406	TGCATAGAGCAAACGCAGGT	60	ChIP	197
ryr3_C1_R	1602	AGAGCATGCCTAAGTGGTCG	59	ChIP	
ryr3_C2_F	1403	TGCTGCATAGAGCAAACGCA	60	ChIP	196
ryr3_C2_R	1598	CATGCCTAAGTGGTCGGTCT	59	ChIP	
ryr3_C3_F	1407	GCATAGAGCAAACGCAGGTG	59	ChIP	117
ryr_C3_R	1523	AGTAGAGGACCCTCAGCCAG	60	ChIP	
H19_C1_F	247	GGGGTTCACCTGTTTTGCAC	59	ChIP	142
H19_C1_R	388	GGCTTTTGTGCTTTCTGGCA	59	ChIP	
H19_C2_F	165	TGGGTGTGTCAGCCCAAATCA	59	ChIP	102
H19_C2_R	266	GTGCAAAACAGGTGAACCCC	59	ChIP	

Cuadro 2.3.5: Partidores para inmuno precipitación de Cromatina

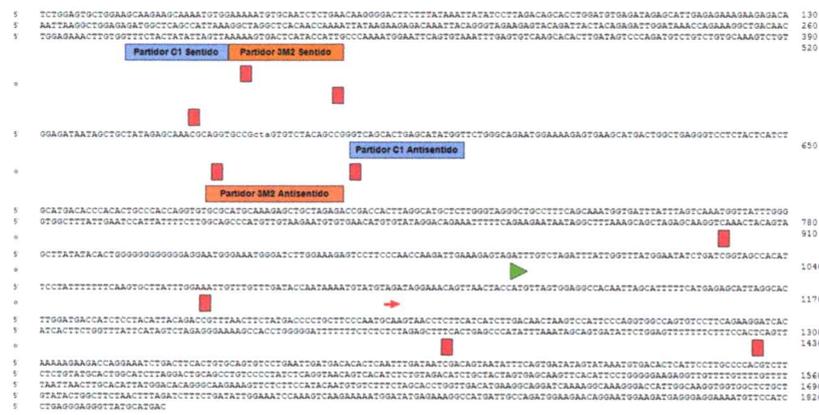


Figura 2.3.2: **Secuencia del promotor de Ryr3**: Se presenta la secuencia del promotor de Ryr3 con sus principales hitos y los partidores utilizados dentro de este contexto. Flecha Verde: Inicio de transcripción. Flecha Roja: Inicio primer intrón. Bloques Naranjos: Partidores MSP. Bloques Morados: Partidores CHIP. Bloques Rojos: dinucleótidos CpG

ves espaciales, fueron colocadas rodeando la piscina, manteniéndose fijas en su ubicación por el transcurso de la prueba. Se realizaron 4 repeticiones diarias de la prueba por 4 días consecutivos. Cada repetición constó de 60 segundos, comenzando desde diferentes cuadrantes de la piscina para evitar el aprendizaje en función de claves propiocéntricas. En la primera repetición del primer día, aquellos animales que no encontraron la plataforma oculta durante el minuto de búsqueda fueron guiados hasta ella y dejados ahí por 30 segundos para permitir la familiarización con las claves ambientales. El intervalo entre las repeticiones fue de 5 minutos, tiempo durante el cual los animales fueron mantenidos en grupo en una jaula. Se cronometró el tiempo que le tomó a cada animal encontrar la plataforma (latencia de escape). En adición se registró en video todas las sesiones con el fin de poder analizar la conducta de los animales en el transcurso de la prueba. Una vez finalizadas las repeticiones del día, los animales fueron secados y retornados a su jaula. Los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en enriquecimiento fueron evaluados utilizando una plataforma visible. Esta prueba tuvo lugar dos días después de finalizado el entrenamiento. Los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar no fueron considerados en esta prueba debido al impedimento físico que presentan.

2.3.13. Cuantificación Relativa del Micro ARN 132

Para determinar los niveles relativos de micro RNA132 (miR132) se utilizó el método de stem-loop RT-PCR (Chen et al., 2005) según previamente descrito (Myklebust et al., 2011).

Brevemente, hipocampos de animales fueron procesados para la extracción de RNAs pequeños utilizando el kit MirVana (Life Technologies). 2 µg de RNAs previamente tratados con DNasa fueron sometidos a transcripción reversa utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (P/N 4366596) según las instrucciones provistas por la compañía. El PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit, TaqMan Universal PCR Master Mix II, No UNG (P/N 4440040) y ensayos TaqMan específicos (461735_mat, para el miR132 y 001234 para sno234) de acuerdo a las instrucciones provistas. Una vez obtenidas las curvas de amplificación, la expresión relativa se obtuvo por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tal como se describe para la expresión relativa, utilizando los valores de sno234 como control endógeno.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Genotipificación

Previo al trabajo experimental se debe establecer el genotipo de los animales. Para esto se extrajo ADN genómico de un fragmento de la cola obtenido cuando la camada cumple su tercera semana de vida. El ADN es utilizado como sustrato para un PCR convencional utilizando tres partidores dirigidos a diferentes regiones del gen *Mecp2*. Los partidores corresponden a un partididor sentido y dos partidores antisentidos los cuales son específicos para los animales WT

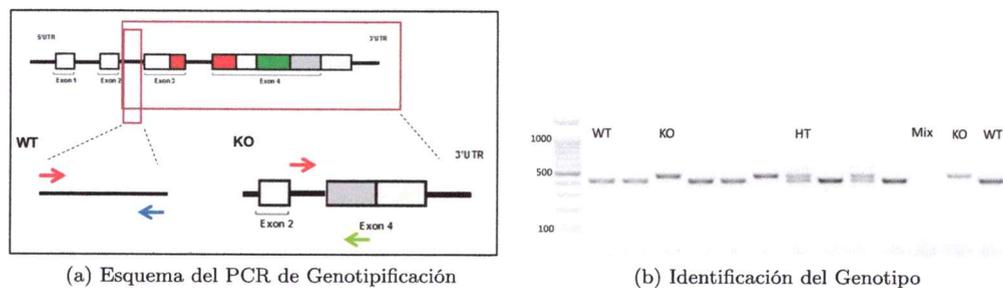


Figura 3.1.1: **PCR de genotipificación:** (a) Se muestran los 4 exones del gen *Mecp2* y el alineamiento de los partidores de genotipificación. El partididor sentido es común para animales silvestres (WT) y knock-out (KO) (flecha roja) y los partidores antisentido específicos para cada genotipo (flecha azul y verde) (b) Gel de agarosa al 1,5% con los productos de PCR obtenidos para la genotipificación de una camada de animales. Se destacan un animal Silvestre (WT), Knock-Out (KO) y Heterocigoto (HT). Los 3 carriles del extremo derecho representan los controles utilizados. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

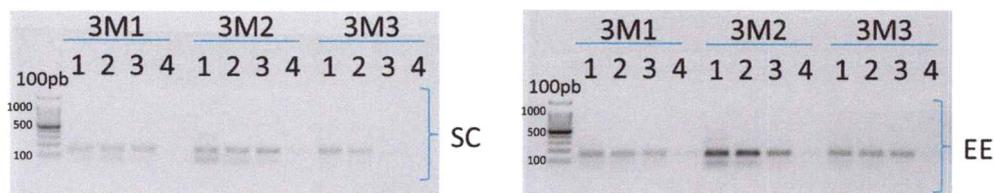


Figura 3.2.1: **Gradiente de temperatura para MSP:** Gel de agarosa al 1,5% con los productos obtenidos al realizar un PCR en gradiente con los 3 conjuntos de partidores específicos para el promotor proximal de *Ryr3* (3M1-3M3). Izquierda, se utilizó como sustrato ADN modificado obtenido de un animal silvestre mantenido en condiciones estándar (SC). Derecha, se utilizó como sustrato ADN modificado obtenido de un animal mantenido en EE (EE). 1, 2, 3 y 4 representan a las T_m de 55 °C, 58,7 °C, 62,2 °C y 65 °C, respectivamente. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

y KO. El partidador sentido es común para los animales WT y KO ya que alinea en el segundo intrón, región que se conserva en el animal KO. El partidador antisentido específico para WT alinea en el tercer exón, el cual es deletado en el animal KO, obteniéndose un amplicón de 420 pares de bases para los animales WT. El partidador antisentido específico para KO alinea en la región 3' no transcrita y solo producto de la delección es posible la amplificación obteniéndose un producto de 470 pares de bases. La diferencia de tamaño de los amplicones obtenidos permite identificar animales silvestres, nulos y heterocigotos para *Mecp2* (Figura 3.1.1). La genotipificación se realiza antes de las 3 semanas de vida, de manera que al momento del destete los animales puedan ser destinados a una de las manipulaciones ambientales utilizadas en este trabajo, buscando mantener tantos animales WT como KO en cada condición.

3.2. Estudio de la Metilación del Promotor de *RyR3*

3.2.1. PCR metilación específico (MSP)

El primer requerimiento para considerar que la regulación transcripcional de *Ryr3* pueda ser dirigida por medio de cambios neuroepigenéticos es lograr determinar que nuestras manipulaciones ambientales dan origen a un cambio en el nivel de metilación del promotor de *Ryr3*. Para analizar la metilación del promotor de *Ryr3* se utilizaron dos técnicas complementarias aplicadas a los animales silvestres mantenidos en ambas condiciones ambientales. Inicialmente se estandarizó el PCR metilación-específico (MSP) para el promotor de

3. El MSP es una técnica cualitativa y compleja, sin embargo, su correcto funcionamiento

permite reconocer un cambio en la metilación de la región de interés. Para esto se procedió a modificar el ADN genómico por tratamiento con bisulfito, obteniéndose ADN modificado (BCD). En la primera aproximación se realizaron 5 conversiones paralelas de una muestra de ADN proveniente de hipocampo de un ratón WT-SC y de una muestra de ADN de hipocampo de un ratón WT-EE. De esta manera se pudo evaluar tanto la robustez de la conversión, como el efecto del enriquecimiento sobre la metilación del promotor de *Ryr3*.

La metilación se evaluó, una vez realizada la modificación por bisulfito, por medio de un PCR metilación-específico (MSP), para el cual se diseñaron partidores específicos para el promotor de *Ryr3* en su forma metilada (Cuadro 2.3.3). Los partidores fueron probados mediante un PCR en gradiente con temperaturas de melting desde 55 °C a 65 °C (Figura 3.2.1).

Para evaluar la metilación del promotor de *Ryr3* en su forma metilada se seleccionó el set de partidores *ryr3_M2*, observándose una mayor obtención de producto cuando el ADN genómico provino del animal mantenido en EE, sugiriendo un aumento en la metilación del promotor de *Ryr3* producto del EE. Esto se confirmó utilizando las diferentes modificaciones por bisulfito realizadas en paralelo, dando validez al tratamiento por bisulfito (Figura 3.2.2a). Como control de la especificidad del aumento observado en el producto de MSP se utilizaron partidores específicos para el promotor de *Pomc* en su forma metilada, obteniéndose una banda tenue pero de igual intensidad para ambas condiciones. Esto era esperado, ya que POMC no está

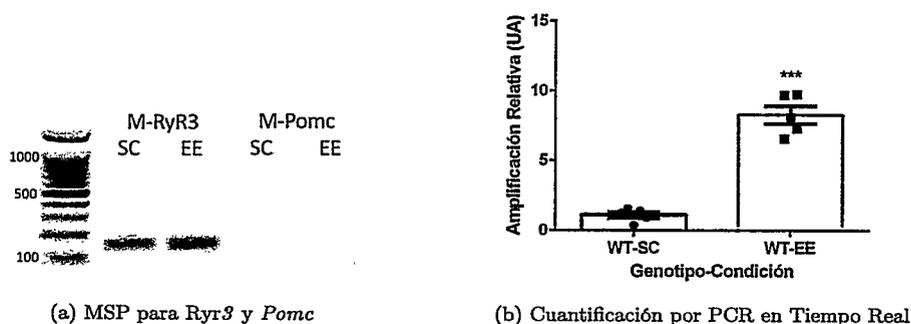


Figura 3.2.2: Evaluación de la metilación del promotor de *Ryr3*: (a) Gel de agarosa al 1,5% con el producto de PCR obtenido para los partidores 3M2 de *Ryr3* a 55°C. Como control se utilizó el análisis de la metilación del promotor de *Pomc*. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb). (b) Cuantificación por PCR en tiempo real de la amplificación obtenida para los partidores 3M2 para 5 animales por condición. La significancia se obtuvo por t de student, *** $p < 0,0001$.

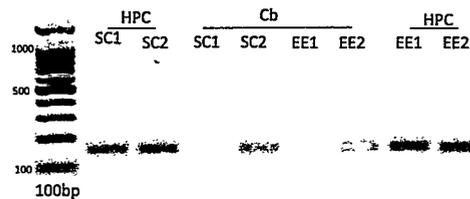


Figura 3.2.3: **MSP Cerebelo:** Evaluación de la metilación del promotor de *Ryr3* en Cerebelo utilizando MSP. Se observa un gel de agarosa al 1.6 % con el producto del MSP obtenido cuando el sustrato corresponde a ADN obtenido desde cerebelo de animales mantenidos en condiciones estándar (SC) y enriquecimiento ambiental (EE). Como controles se presenta el mismo procedimiento utilizando ADN de Hipocampo de los mismos animales. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

sujeto a regulación transcripcional en hipocampo. A continuación se procedió a cuantificar el cambio en la amplificación observado mediante el uso de PCR en tiempo real, esta vez utilizando 5 animales por condición (Figura 3.2.2b), obteniéndose una amplificación relativa 6 veces mayor cuando el sustrato del PCR en tiempo real fue ADN de hipocampo modificado proveniente de los animales mantenidos en EE. Estos resultados sugieren que el EE induce un aumento en la metilación del promotor proximal de *Ryr3*.

Para verificar si este cambio de metilación es propio del hipocampo o es compartido por otras estructuras del cerebro, se procedió a evaluar la metilación del promotor de *Ryr3* por medio de MSP utilizando como sustrato ADN proveniente del cerebelo de los mismos animales utilizados para evaluar el cambio en la metilación del hipocampo. En el caso del cerebelo no se pudo observar un cambio consistente entre las dos condiciones (Figura 3.2.3), sugiriendo que el cambio en la metilación del promotor de *Ryr3* es específico para hipocampo.

3.2.2. Secuenciación

Los resultados obtenidos por medio del MSP dan cuenta de un cambio en la metilación del promotor de *Ryr3*. Sin embargo resulta interesante poder cuantificar la magnitud de los cambios, para esto se procedió a realizar la secuenciación de próxima generación de ADN modificado por bisulfito (Next Generation Bisulphite Sequencing). La secuenciación se realizó sobre ADN obtenido desde hipocampos completos de animales adultos de 8 semanas de edad mantenidos en EE y condiciones estándar. En adición se consideraron animales de 3 semanas de edad, considerados jóvenes. Cabe destacar que a las 3 semanas, los animales no han ingresado a las

manipulaciones ambientales, por ende estas muestras nos muestran el estado de metilación del promotor antes de la manipulación ambiental. Los animales adultos corresponden a los animales utilizados en el PCR en tiempo real en que se cuantificó la amplificación relativa del MSP (Figura 3.2.2b), solo que por motivos de espacio para muestras, de los 5 animales sólo se incluyeron 4 para el análisis. La secuenciación realizada consideró tres amplicones que cubren los dinucleótidos CpG de interés, ubicados en el promotor proximal y primer exón de *Ryr3*. La estimación de la metilación se obtuvo de un promedio de 97460 lecturas y una cobertura promedio de los CpGs de 7861x con una tasa de conversión por bisulfito de un 99%. La secuenciación arrojó un alto

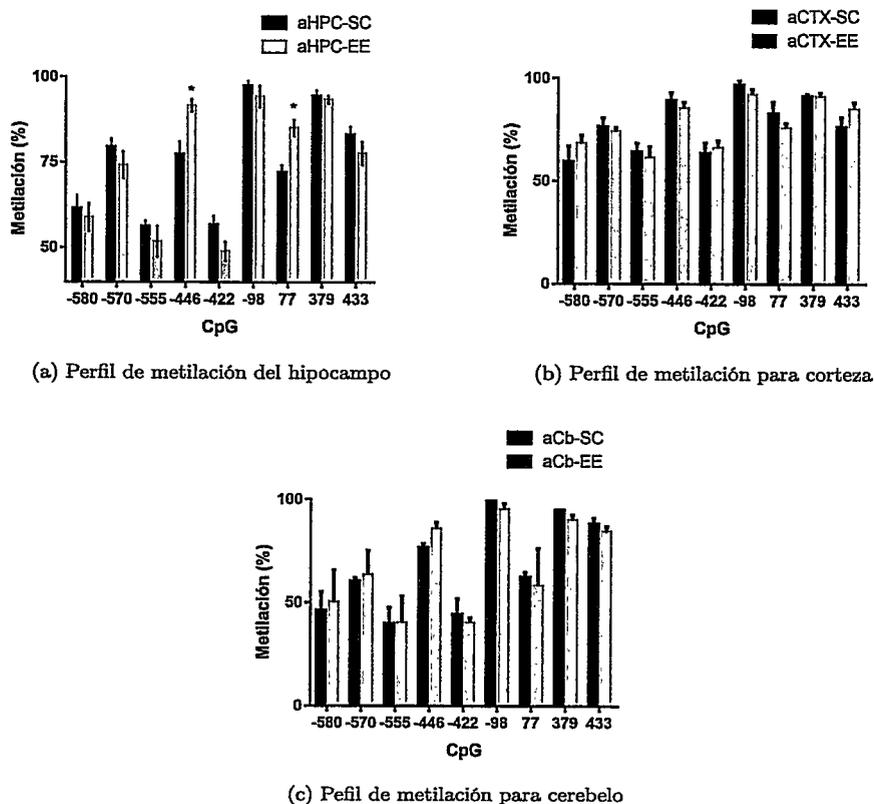
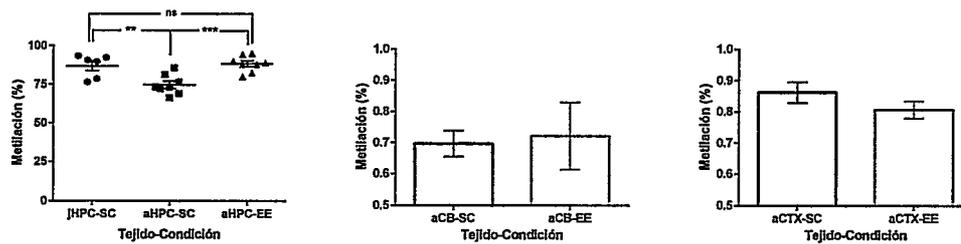


Figura 3.2.4: Perfil de metilación del promotor de *Ryr3*. Se muestra el perfil de metilación obtenido para los diferentes CpGs en (a) hipocampo (HPC), (b) Corteza (CTX) y (c) Cerebelo (Cb). Se comparan muestras provenientes de animales mantenidos en SC y en EE. Los dinucleótidos CpG se encuentran numerados en relación al sitio de inicio de la transcripción. Se consideraron 4 animales para la secuenciación de hipocampo y 3 para corteza y cerebelo. La significancia se evaluó para cada residuo de manera independiente, utilizando la prueba de t de Student. * $p < 0,05$



(a) Metilación de citosinas -446 y 77 en animales Jóvenes y Adultos (b) Metilación de citosinas -446 y 77 en Cerebelo (c) Porcentaje de Metilación de citosinas -446 y 77 en Corteza

Figura 3.2.5: Secuenciación del promotor de Ryr3: Se muestran los resultados de la secuenciación para el promotor de Ryr3 de animales jóvenes y adultos mantenidos en SC y adultos mantenidos en EE. (a) Se muestra el porcentaje de metilación de las citosinas -313 y 77 para hipocampos de animales jóvenes (jHPC-SC) y adultos mantenidos en SC (aHPC-SC) y adultos mantenidos en EE (aHPC-EE). (b) Se muestra el porcentaje de metilación de las citosinas -313 y 77 para cerebelos de animales adultos en SC (aCB-SC) y mantenidos en EE (aCB-EE). (c) Se muestra el porcentaje de metilación de las citosinas -313 y 77 para las cortezas de animales adultos en SC (aCTX-SC) y adultos mantenidos en EE (aCTX-EE). Se muestran los resultados obtenidos para 3 animales por condición, los animales jóvenes tenían 3 semanas al momento de obtenerse las muestras y los animales adultos son aquellos que pasaron por el protocolo de enriquecimiento descrito para este trabajo. La significancia se obtuvo por la prueba de t de Student mientras que la comparación entre más de dos grupos se obtuvo por ANOVA con comparación múltiple de Tukey.

porcentaje de metilación de las citosinas ubicadas en el contexto CpG en el hipocampo de animales adultos ($74 \% \pm 15$). Este porcentaje de metilación de las citosinas se observa también para cerebelo ($68 \% \pm 22$) y corteza ($77 \% \pm 13$) (Figura 3.2.4)

A pesar del alto nivel de metilación encontrado en las diferentes regiones, se observa un aumento significativo en el porcentaje de metilación de las citosinas -446 y 77 cuando el ADN sustrato de la secuenciación proviene de hipocampos de animales mantenidos en EE en comparación al porcentaje de metilación obtenido para muestras de animales mantenidos en condiciones estándar (Figura 3.2.4). Al observar en detalle el porcentaje de metilación de estas citosinas, se observa que en hipocampo de animales jóvenes (P21) el porcentaje de metilación de las citosinas -446 y 77 alcanza un $86 \% \pm 7$. Este porcentaje de metilación cae en los hipocampos de animales adultos a un $75 \% \pm 6$, recuperándose al nivel de los animales jóvenes cuando los animales se mantienen en EE ($87 \% \pm 5$) (Figura 3.2.5a). Estos resultados sugieren que el EE permite recuperar o mantener el nivel de metilación mostrado por los animales jóvenes. Resulta interesante que este cambio en la metilación se observe solo cuando el ADN proviene de hipocampo, ya que en corteza y cerebelo, el enriquecimiento no tiene efecto sobre el porcentaje de metilación de las

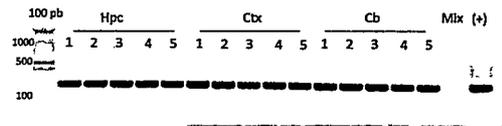


Figura 3.3.1: **Control de la obtención de los cADNs:** Gel de agarosa al 1,5% con el producto de PCR utilizando partidores para *Cyc1* utilizando como sustrato cADN proveniente de diferentes animales (1-5). Hpc, hipocampo. Ctx, Corteza. Cb, Cerebelo. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb). El carril mix corresponde a un control que posee todos los componentes de la retrotranscripción pero carece de transcriptasa reversa, este control es generalmente conocido como -RT.

citosinas -446 y 77 (Figura 3.2.5b y 3.2.5c).

En conjunto, los resultados obtenidos por medio de MSP y la secuenciación del promotor de *Ryr3* dan cuenta de un cambio en la metilación de CpGs discretos y ubicados en el promotor proximal de *Ryr3*. Este aumento es específico para hipocampo, ya que ni cerebelo ni corteza mostraron el cambio en la metilación de las citosinas a pesar que las muestras estudiadas provienen del mismo grupo de animales. Con esto en mente, se procedió a evaluar las consecuencias a nivel de ARN mensajero (mARN) para determinar si este cambio en la metilación puede estar asociado a la regulación transcripcional de *Ryr3*.

3.3. Expresión Génica

3.3.1. Transcripción Reversa y Estandarización de Partidores

Una vez establecido que existe un cambio en la metilación del promotor de *Ryr3* como producto de las manipulaciones ambientales realizadas, se procedió a determinar si existe un cambio en los niveles de ARN mensajero para animales silvestres y nulos para *Mecp2* mantenidos en las diferentes condiciones. Así, para evaluar los niveles de mensajeros de *Ryr3* y *Ryr2* en animales silvestres y nulos para *Mecp2*, se disectaron hipocampo, corteza y cerebelo para posteriormente obtener el ARN de los tejidos. Este ARN fue sometido a transcripción reversa, obteniéndose ADN clonado (cADN). El cADN obtenido se utilizó como sustrato para un PCR convencional utilizando partidores para ciclofilina como control del proceso, corroborándose la integridad del cADN y descartándose la contaminación por remanentes de ADN (Figura 3.3.1).

Para evaluar la expresión génica de *Ryr3* y *Ryr2* se diseñaron partidores específicos para sus

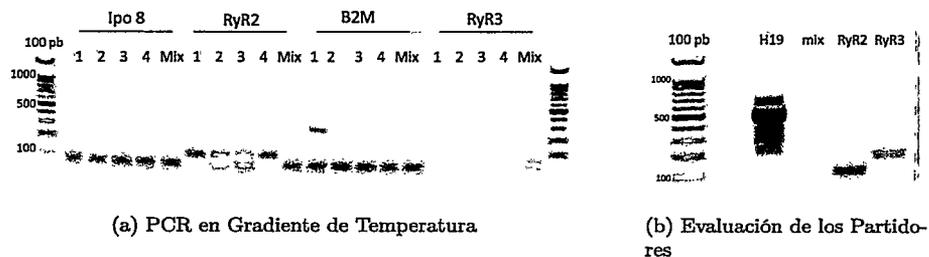
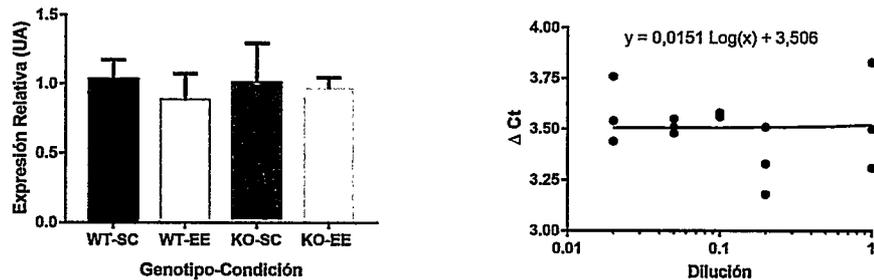


Figura 3.3.2: Estandarización de partidores para PCR en tiempo real: Se muestra la estandarización de los partidores utilizados para la evaluación de los niveles de mRNA de RyR2 y RyR3 (a) Gel de agarosa al 1,5% con los productos obtenidos para un PCR en gradiente utilizando los partidores de RyR2 y RyR3. 1, 2, 3 y 4 representan a las T_m de 55, 58,7, 62,2 y 65 °C, respectivamente. (b) Gel de agarosa al 1,5% con el producto de un PCR convencional con T_m de 55 °C utilizando los partidores para RyR2 y RyR3 y un pool de cADN como sustrato. H19 se utilizó como control positivo de la reacción utilizando ADN genómico como sustrato. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

mARN (Cuadro 2.3.2). Los partidores fueron probados, utilizando como sustrato un pool de cDNA de hipocampo en un PCR en gradiente con temperaturas de melting (T_m) desde 55° a 65°C (Figura 3.3.2a). Se seleccionó la temperatura de 55°C como temperatura de alineamiento (T_m) para trabajar. La T_m seleccionada se puso a prueba una vez más mediante un PCR convencional. La especificidad de los partidores se advierte en que no se observa producto inespecífico en el gel, además el tamaño del amplicón corresponde al esperado, los tamaños teóricos esperados se pueden revisar en la tabla 2.3.2 (Figura 3.3.2b).

Los resultados de PCR en tiempo real que se presentan a continuación se obtuvieron utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ para la cuantificación relativa de la abundancia de ARN mensajeros. Este método de cuantificación relativa exige que se cumplan ciertos parámetros técnicos descritos en la sección métodos de esta tesis. Con esto en mente, se realizaron las evaluaciones pertinentes que validan el uso de esta metodología para las diferentes condiciones de trabajo utilizadas en esta tesis. Estas evaluaciones están propuestas y descritas en el trabajo de Livak and Schmittgen (2001). En la figura 3.3.3 se presenta la evaluación de la abundancia del mensajero normalizador en las diferentes condiciones y genotipos de interés para esta tesis. Se puede observar que la expresión de *Cyc1* se mantiene constante en las diferentes condiciones y genotipos, entregando la certeza de que las diferencias observadas en las abundancias de los ARN mensajeros no se deben a variaciones en la abundancia del mensajero normalizador. Así mismo, se presenta un análisis representativo de las eficiencias de los partidores de RyR3 y *Cyc1*. El método de Livak



(a) Evaluación de la abundancia relativa de Cyc1

(b) Eficiencias de amplificación para Ryr3 y Cyc1

Figura 3.3.3: **Validación del método $\Delta\Delta\text{Ct}$** : Se presentan las evaluaciones necesarias para validar la utilización del método $\Delta\Delta\text{Ct}$ para la cuantificación relativa de la abundancia de ARN mensajeros. (a) Se muestra la expresión relativa del mensajero normalizador Cyc1 evaluado en las diferentes condiciones y genotipos utilizados en esta tesis. (b) Se examinaron las eficiencias de los partidores utilizados para el mensajero de interés Ryr3 y el normalizador Cyc1 obteniéndose el valor de ΔCt ($\text{Ct Ryr3} - \text{Ct Cyc1}$) para cada punto de las diluciones seriadas 1/1, 1/5, 1/10, 1/20 y 1/50.

and Schmittgen (2001) requiere que las eficiencias de los partidores sean similares, para lo cual plantea evaluar cómo varía el ΔCt con diferentes diluciones del cADN. Se puede observar que la regresión lineal es prácticamente horizontal, indicando que las eficiencias de ambos partidores son similares e independientes de las diluciones con que se trabajó el cADN (Figura 3.3.3). Este tipo de evaluación se realizó de acuerdo a lo planteado en el trabajo de Livak and Schmittgen (2001) para todos los partidores utilizados, ya que es un requisito restrictivo para el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). De esta forma se valida el uso de esta metodología para la evaluación de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real.

3.3.2. Expresión Relativa de Ryr2 y Ryr3

El PCR en tiempo real se realizó con las condiciones determinadas previamente para cada set de partidores, como normalizador se utilizó Ciclofilina. Como control adicional, cada vez se realizó una curva de melting, en donde se pudo corroborar la obtención de un producto único como resultado de la amplificación del PCR en tiempo real (datos no mostrados). Los resultados del PCR en tiempo real fueron evaluados según el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Cada muestra obtenida desde la transcripción reversa fue evaluada en triplicado en el PCR en tiempo real, obteniéndose un Ct (Ciclo Umbral) promedio para cada animal evaluado. Este

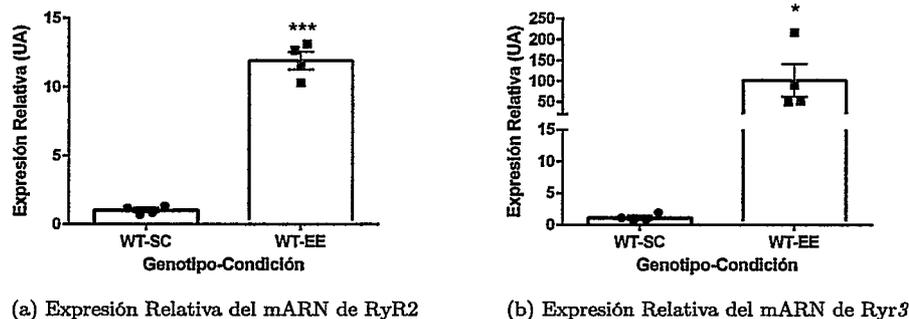


Figura 3.3.4: **Expresión relativa del mRNA de Ryr2 y Ryr3 en hipocampos de animales silvestres:** La expresión del mRNA de Ryr2 y Ryr3 en animales silvestres mantenidos en EE (WT-EE) fue evaluada por qPCR y normalizada en función de los animales silvestres mantenidos en SC (WT-SC). (a) Se evaluó el mRNA de Ryr2 en hipocampos de animales silvestres. (b) La expresión del mRNA de Ryr3 en hipocampos de animales silvestres. La significancia se obtuvo por la prueba de T de Student, *** $p < 0,0001$. En gráfico se representan los resultados de 4 animales por condición, errores corresponden a \pm SEM.

valor promedio es el que se utiliza para establecer la expresión relativa entre las condiciones. Los resultados se presentan como expresión relativa en función de los animales WT-SC o KO-SC según corresponda. Los errores gráficos corresponden al error estándar de la media.

Para determinar si las manipulaciones ambientales determinan una modificación en los niveles de mRNA de Ryr2 y

3 se evaluó el nivel de mRNA en hipocampos de animales mantenidos en condiciones estándar y EE. Se observó un aumento de la expresión de los mRNA de Ryr2 y Ryr3 en hipocampo de los animales silvestres mantenidos en EE en relación a los animales mantenidos en condiciones estándar (Figura 3.3.4). Es interesante que ambas isoformas involucradas en procesos de memoria y aprendizaje presenten una respuesta transcripcional frente a este estímulo reconocido por inducir plasticidad dependiente de la experiencia.

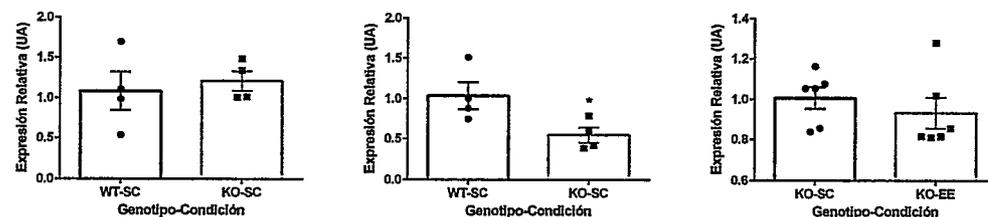
3.3.3. Expresión Relativa de Ryr2 y Ryr3 en Ratones Nulos para Mecp2

Dado que previamente logramos determinar que la metilación del promotor de Ryr3 aumenta producto de la mantención de los animales en el ambiente enriquecido, es posible que su regulación transcripcional sea dirigida por una proteína de unión a ADN metilado, como Mecp2.

Para comenzar a evaluar esta posibilidad, se comparó la expresión del mRNA de Ryr2 y Ryr3 en hipocampos de animales nulos para *Mecp2* con los niveles de expresión mostrados por sus hermanos silvestres. Los niveles de mRNA de Ryr2 observados en ratones nulos para *Mecp2* no mostraron diferencias en relación a los niveles de sus hermanos silvestres (Figura 3.3.5). Sin embargo, se destaca la disminución significativa del mRNA de Ryr3 observada en los ratones nulos para *Mecp2* en relación a sus hermanos silvestres (Figura 3.3.5). Estos resultados sugieren que Ryr3, pero no Ryr2, es un blanco transcripcional directo de *Mecp2*. Así mismo, resulta interesante que el EE no presente efecto sobre la expresión del mRNA de Ryr3 en los hipocampos de animales nulos para *Mecp2* (Figura 3.3.5c), sugiriendo un rol de activador transcripcional para *Mecp2* tanto en la condición basal como para la plasticidad dependiente de la experiencia inducida por el paradigma de EE.

3.3.4. Expresión Relativa de Ryr3 en Corteza y Cerebelo

Para evaluar si la sobre-expresión del mRNA de Ryr3 es específica para hipocampo, se cuantificó la expresión relativa de Ryr3 para los cerebelos y cortezas de los animales silvestres mantenidos en EE en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar. Llama la



(a) Expresión Relativa del mRNA de Ryr2 (b) Expresión Relativa del mRNA de Ryr3 (c) Expresión Relativa del mRNA de Ryr3

Figura 3.3.5: Expresión Relativa del mRNA de Ryr2 y Ryr3 en hipocampos de animales nulos para *Mecp2*: La expresión de los mRNA de Ryr2 y Ryr3 en animales nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar (KO-SC) fue evaluada por qPCR y normalizado en función de los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar (WT-SC). (a) Se evaluó el mRNA de Ryr2 en hipocampos de animales nulos para *Mecp2* (b) La expresión del mRNA de Ryr3 en hipocampos de animales nulos para *Mecp2*. (c) La expresión del mRNA de Ryr3 en hipocampos de animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE (KO-EE) en relación a sus hermanos nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar (KO-SC). La significancia se obtuvo por la prueba de T de Student, * $p = 0,0282$. En gráfico se representan los resultados de 4 y 6 animales por condición; los valores corresponden al promedio \pm SEM.

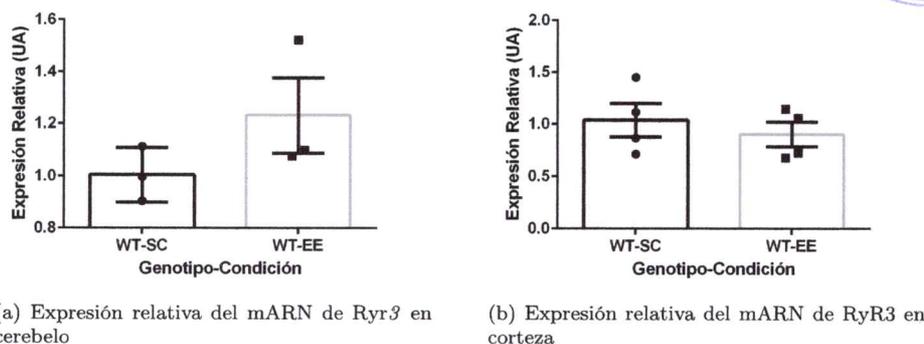
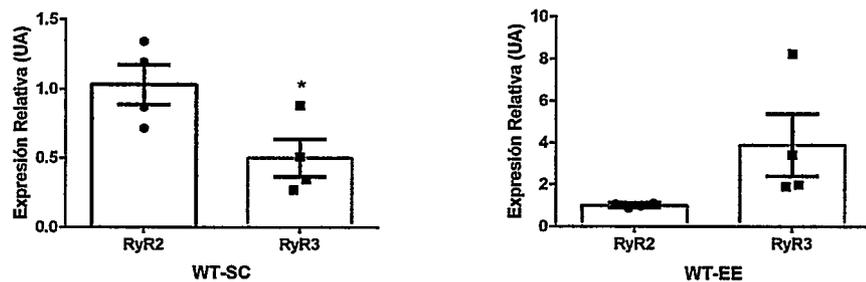


Figura 3.3.6: **Expresión relativa del mRNA de Ryr3 en cerebelos y cortezas de animales silvestres** (a) Expresión relativa del mRNA de Ryr3 en Cerebelos de animales silvestres (b) Expresión Relativa del mRNA de Ryr3 en cortezas de animales silvestres. La expresión del mRNA de Ryr3 en muestras de los diferentes tejidos de animales silvestres mantenidos en EE (WT-EE) fue evaluada por qPCR y normalizada en función de los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar (WT-SC). En el gráfico se representan los resultados de 3 y 4 animales por condición respectivamente, los valores corresponden al promedio \pm SEM.

atención que las cortezas y cerebelos de los animales expuestos a enriquecimiento no mostraron diferencias significativas en la expresión de Ryr3 en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (Figura 3.3.6). Cabe destacar que estas muestras fueron obtenidas del mismo grupo de animales cuyos hipocampos mostraron un incremento robusto en Ryr3 (Figura 3.3.4b). Estos datos sugieren que la regulación transcripcional inducida por el EE observada en hipocampo es específica para esta estructura.

3.3.5. Comparación de la Abundancia de los mRNA de Ryr2 y Ryr3

Al realizar la estandarización inicial de los partidos se observó una marcada diferencia en la expresión de los mRNA de Ryr2 y Ryr3 (Figura 3.3.2b). Por esto se buscó validar esta observación por medio de qPCR. Para estos análisis se consideró como referencia el mensajero de Ryr2, obteniéndose que en hipocampo el mensajero de Ryr3 es significativamente menos expresado que el de Ryr2 (Figura 3.3.7a), lo que coincide con lo reportado en la literatura (Mori et al., 2000). Sin embargo, posterior a la manipulación ambiental y la regulación transcripcional inducida por el EE, no se observan diferencias significativas entre los niveles de mensajeros de Ryr2 y Ryr3, sugiriendo que la manipulación ambiental conduce a una equiparación de los niveles de mensajero de ambas isoformas (Figura 3.3.7b).



(a) El mRNA de *Ryr3* está disminuido en comparación a *Ryr2*

(b) El EE equipara los niveles de mRNA de *Ryr2* y *Ryr3*

Figura 3.3.7: Comparación de las abundancias de mRNA de *Ryr2* y *Ryr3* en hipocampo: (a) El mRNA de *Ryr3* se encuentra significativamente menos abundante en comparación al mRNA de *Ryr2* en animales silvestres mantenidos en condiciones estándar (t-test $p = 0,0372$). (b) En ratones mantenidos en EE no se observan diferencias en las abundancias del mRNA de *Ryr3* en comparación al mRNA de *Ryr2*. Se presentan resultados de 4 animales por condición \pm SEM.

En conjunto, los datos obtenidos al evaluar la expresión génica de *Ryr2* y *Ryr3* en ratones silvestres y nulos para *Mecp2* mantenidos en las diferentes condiciones ambientales permiten concluir que el EE dirige una robusta sobre-expresión de *Ryr2* y *Ryr3* en hipocampo de animales silvestres. En ausencia de *Mecp2*, el nivel de mRNA de *Ryr2* no se ve afectado, mientras que el nivel de mRNA de *Ryr3* se encuentra significativamente disminuido, sugiriendo que *Ryr3*, pero no *Ryr2* es un blanco transcripcional de *Mecp2*. Consecuentemente, en ausencia de *Mecp2*, *Ryr3* no muestra el incremento transcripcional inducido por el EE observado en animales silvestres. Tanto los niveles reducidos de mRNA de *Ryr3* observado en animales nulos para *Mecp2* en relación a los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar, como la ausencia de sobre-expresión inducida por EE observada en los animales nulos para *Mecp2* sugieren que *Mecp2* actúa como activador transcripcional de *Ryr3*. Se debe destacar que la regulación transcripcional mostró ser específica para hipocampo, ya que de manera similar al cambio en la metilación, ni cerebelo ni corteza mostraron cambio en los niveles de mRNA de *Ryr3*. Con esto en mente se procedió a evaluar la interacción directa de *Mecp2* con el promotor de *Ryr3* por medio de inmunoprecipitación de cromatina.

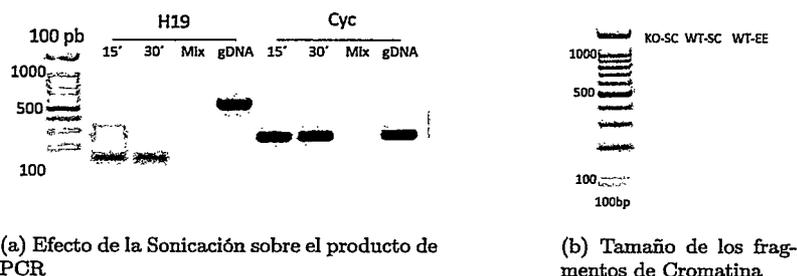


Figura 3.4.1: Estandarización de la sonicación de cromatina: (a) Se utilizaron dos juegos de partidores con productos de 500 y 200 pb aproximados, nótese que la eficiencia del amplicon de menor tamaño no se ve afectada por un menor tiempo de sonicación. (b) Se observa un gel de agarosa al 2% con la cromatina sonicada por 15 y 30 minutos. Nótese el enriquecimiento de los fragmentos alrededor de los 200 pb para las diferentes muestras. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

3.4. Inmuno Precipitación de Cromatina

3.4.1. Estandarización de la Sonicación

Para establecer una relación directa entre la regulación transcripcional de 3, la modificación de la metilación inducida por el EE y *Mecp2*, se debe poner a prueba la interacción de *Mecp2* con el promotor de *Ryr3*. Para esto se procedió a realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Inicialmente se diseñaron una serie de partidores dirigidos al promotor proximal de *Ryr3* y al locus H19 (Cuadro 2.3.5), estos partidores fueron probados utilizando ADN genómico y cromatina. Cabe señalar que el locus H19 corresponde a un locus silenciado por imprinting mediante la metilación del alelo paterno, este silenciamiento es dependiente de *Mecp2* (Drewell et al., 2002). Inicialmente fue necesario realizar una estandarización para obtener los fragmentos de cromatina del tamaño adecuado para la inmuno precipitación, lo que se realizó utilizando como sustrato hipocampo completo y fijando la potencia del sonicador a un 75% del máximo. El tiempo de sonicación mostró tener efecto sobre el tamaño de los fragmentos de cromatina y por ende un PCR cuyo producto alcanza los 500 pb no pudo ser amplificado al realizar la sonicación por 30 minutos. Cuando la sonicación fue de 15 minutos, se observa el producto de PCR de 500 pb (Figura 3.4.1a). Debido a que los amplicones de los partidores diseñados para evaluar la interacción de *Mecp2* con las diferentes regiones genómicas son de alrededor de 100 pb, se decidió realizar la sonicación por 15 minutos, evitando el

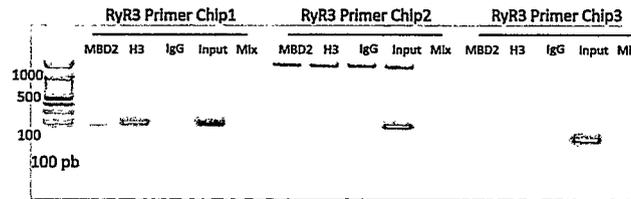


Figura 3.4.2: **Estandarización de partidores para ChIP:** Los partidores fueron probados inicialmente con ADN genómico, observándose una amplificación limpia. En la figura se presenta un gel de agarosa al 1,6 % con el producto de la amplificación realizada con los diferentes sets de partidores (Primer Chip 1-3) utilizando como sustrato el inmuno precipitado obtenido con anticuerpos contra MBD2 e histona H3. Se aprecian bandas inespecíficas para los sets de partidores 2 y 3. El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

sobre-calentamiento de la muestra. Los fragmentos obtenidos por la sonicación se encuentran enriquecidos en el rango de los 200 pb (Figura 3.4.1b).

3.4.2. Estandarización de Partidores

Los partidores utilizados fueron probados inicialmente en ADN genómico (datos no mostrados), posteriormente se realizó una prueba utilizando como sustrato la cromatina previamente sonicada (Figura 3.4.1b) y finalmente se realizó una prueba de inmunoprecipitación (Figura 3.4.2). Es interesante destacar que a pesar de una amplificación limpia cuando el sustrato es ADN genómico, esto no siempre fue así para la cromatina fragmentada. Por lo que la prueba de inmunoprecipitación fue determinante para definir los partidores a utilizar en los experimentos posteriores. Debido a la presencia de bandas inespecíficas en los juegos de partidores 2 y 3, el set de partidores utilizado para evaluar la interacción de Mecp2 con el promotor de *Ryr3* fue el par número 1 (Figura 3.4.2).

3.4.3. Evaluación de la Interacción de Mecp2 con el Promotor de *Ryr3*

Una vez determinado el tiempo de sonicación necesario para obtener los fragmentos de cromatina del tamaño requerido y tras evaluar los juegos de partidores dirigidos al promotor de *Ryr3* se procedió a evaluar la interacción de Mecp2. Para esto se obtuvo cromatina de hipocampos de animales mantenidos en condiciones estándar y en ambiente enriquecido y se utilizó como sustrato para el proceso de inmuno precipitación de cromatina (ChIP) utilizando un anticuerpo dirigido contra MeCP2. En total se evaluaron 10 animales representando 4 replicados biológicos

por condición y distribuidos en dos experimentos. El primer experimento se realizó para validar el anticuerpo, utilizándose 2 ratones mantenidos en SC, 2 ratones mantenidos en EE y 2 ratones mutantes nulos para *Mecp2*. Los resultados de este experimento no se presentan en esta tesis, sin embargo permitieron validar el uso del anticuerpo, ya que no se detectó inmunoprecipitado cuando la cromatina provino de los ratones mutantes nulos. El segundo experimento considero 3

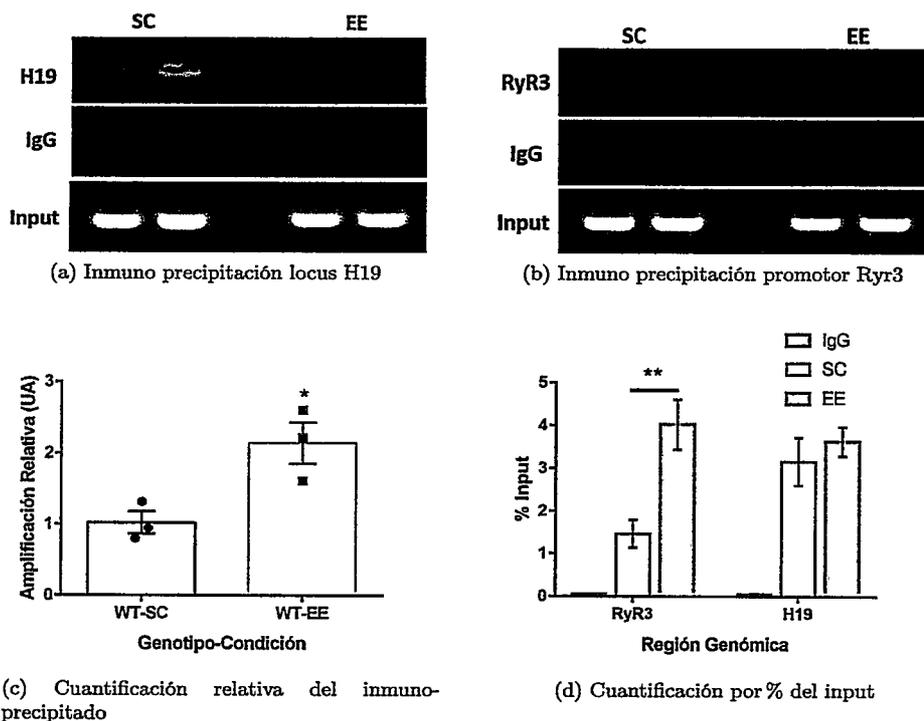


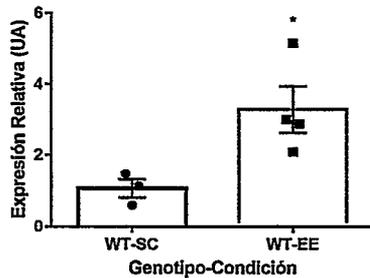
Figura 3.4.3: Evaluación de la interacción de *Mecp2* con el promotor de *Ryr3*: Se realizó la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra *Mecp2*, el inmunoprecipitado se evaluó con los partidores dirigidos al promotor de *Ryr3* y al locus H19. Se observa el producto final de los PCR realizados para evaluar la interacción de *Mecp2* con (a) el locus H19 y (b) el promotor de *Ryr3*. El input representa la carga de cromatina utilizada en cada condición e IgG representa el control de especificidad. Se presenta el resultado de dos muestras por condición. (c) Se presenta la cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ de la amplificación del inmunoprecipitado del promotor de *Ryr3* considerando la amplificación del inmunoprecipitado obtenida para el locus H19 como normalizador. Se presentan los resultados obtenidos para 3 animales por condición, valor promedio \pm SEM. Significancia se evaluó por t de Student, * $p < 0,05$. (d) Se presenta la estimación del % del input obtenido como inmunoprecipitado para los diferentes locus y condiciones. Se presenta el IgG obtenido para cada locus en SC como control de la especificidad. Se presentan los resultados obtenidos para 3 animales por condición, valor promedio \pm SEM. La significancia se evaluó por ANOVA de dos vías, ** $p < 0,01$.

animales silvestres mantenidos en SC y 3 animales mutantes nulos mantenidos en EE. Los resultados se presentan como el producto de PCR de punto final (Figura 3.4.3a y 3.4.3b). En adición el inmunoprecipitado obtenido fue evaluado mediante PCR en tiempo real, estos resultados se presentan utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$ considerando al locus H19 como normalizador de la inmuno precipitación de Mecp2 (Figura 3.4.3c), el método $\Delta\Delta Ct$ se describe con mayor detalle en la sección metodos. Así mismo, se presenta la cuantificación del inmunoprecipitado obtenido como % del input para los locus en estudio según descrito previamente (Lin et al., 2012) (Figura 3.4.3d). Para el PCR de punto final se puede observar un incremento en el producto del PCR dirigido al promotor de Ryr3 para el inmunoprecipitado obtenido cuando la cromatina provino de los animales mantenidos en enriquecimiento en comparación a la condición estándar (Figura 3.4.3b). En contraste, el producto de PCR obtenido para el locus H19 no muestra una diferencia notoria cuando la cromatina inmunoprecipitada proviene de animales en EE ó SC (Figura 3.4.3a). Para la cuantificación relativa de la amplificación en el promotor de Ryr3 se utilizó como normalizador el inmunoprecipitado obtenido para el locus H19, observándose un incremento significativo de 2 veces en la abundancia del inmunoprecipitado cuando la cromatina proviene de animales mantenidos en EE en comparación a la abundancia obtenida para la cromatina que proviene de animales mantenidos en SC (Figura 3.4.3c). Finalmente, el análisis de los resultados como % del input muestran un incremento significativo del % de inmunoprecipitado obtenido en el promotor de Ryr3 cuando la cromatina proviene de animales mantenidos en EE ($1,46\% \pm 0,32$ para SC y $4,023\% \pm 0,5$ para EE), sin observarse diferencias para los inmunoprecipitados evaluados en el locus H19. Se tiene entonces que las diferentes metodologías utilizadas para evaluar los resultados del CHIP muestran un incremento de la interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3 producto de la exposición al ambiente enriquecido.

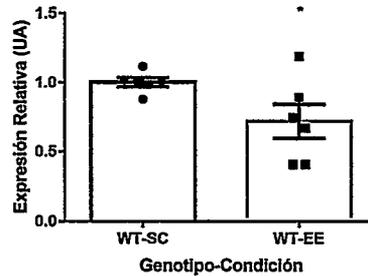
3.5. Plasticidad dependiente de la experiencia

3.5.1. Regulación de la Vía Rac1-PAK de Remodelación de Actina

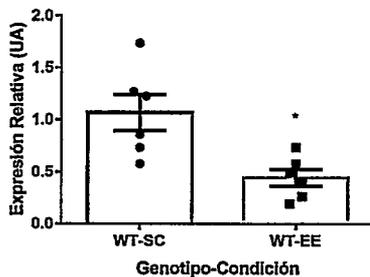
Trabajos *in vitro* han mostrado la participación de los canales RyR en la regulación de la vía Rac1-PAK de remodelación de actina, contribuyendo a la formación de espinas dendríticas. Como se destacó en la introducción, los canales RyR son determinantes en la sobre-expresión del microRNA132, el cual tiene entre sus blancos al mensajero de p250GAP, una proteína activadora



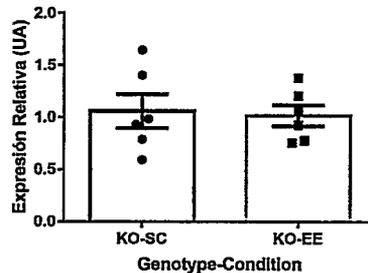
(a) Expresión relativa de miR132



(b) Expresión relativa de Mecp2



(c) Expresión relativa de p250GAP



(d) Expresión relativa de p250GAP

Figura 3.5.1: Expresión relativa de genes asociados a la modulación de la vía Rac1-PAK. (a) Cuantificación de miR132 en ratones silvestres mantenidos en enriquecimiento (EE) en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (SC). (b) Cuantificación del mRNA de Mecp2 para animales silvestres mantenidos en enriquecimiento (EE) en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (SC). (c) Cuantificación del mRNA de p250GAP para animales silvestres mantenidos en enriquecimiento (EE) en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (SC). (d) Cuantificación del mRNA de p250GAP para animales nulos para Mecp2 mantenidos en enriquecimiento (EE) en relación a sus hermanos nulos para Mecp2 mantenidos en condiciones estándar (SC). Se muestran resultados de 4 animales por condición para el análisis del miR132 y 6 animales por condición para expresión génica, valor promedio \pm SEM.

de la función GTPasa de Rac1 y que actúa como regulador negativo de la sinaptogénesis. Se ha observado que los canales RyR son necesarios para el incremento de espinas dendríticas determinados por la activación de esta vía, llegando a sugerirse que los canales RyR pueden contribuir a la formación de espinas dendríticas inducida por actividad. Considerando esto, se tiene una condición dada por el animal silvestre, el que muestra una regulación transcripcional robusta en respuesta al EE y una condición alterada en el ratón nulo para Mecp2, el que no muestra cambio transcripcional al ser mantenido en el enriquecimiento. Esto podría determinar

diferencias en la regulación de la vía Rac1-PAK, lo que determinaría alteraciones en la plasticidad estructural asociada a este paradigma. Para poner a prueba esta idea, se buscó determinar si el incremento transcripcional observado para *Ryr3* en hipocampos de ratones mantenidos en enriquecimiento ambiental está asociado a la regulación de la vía Rac1-PAK de remodelación de actina.

Con este fin, se evaluaron los niveles de miR132 en ratones silvestres mantenidos en enriquecimiento ambiental en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar. Se observó que los animales mantenidos en EE muestran un incremento de 3 veces en los niveles de miR132 en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar (Figura 3.5.1a). Cabe destacar que se utilizó un ARN pequeño, *sno234*, como normalizador endógeno, considerándose posibles variaciones cuyo origen sea relacionado a la extracción de RNAs pequeños y no a las manipulaciones ambientales. Para evaluar la funcionalidad de este incremento en los niveles de miR132, se evaluó el nivel de mRNA de sus blancos, *Mecp2* y *p250GAP*. Se observó una disminución significativa de *Mecp2* (Figura 3.5.1b) y una reducción de un 60% en los niveles de mRNA de *p250GAP* (Figura 3.5.1c) en las muestras provenientes de hipocampos de animales mantenidos en EE en relación a sus hermanos mantenidos en SC. Estos datos sugieren que el incremento en miR132 es funcional. Así, en ausencia de *Mecp2* no se observa la disminución de los niveles

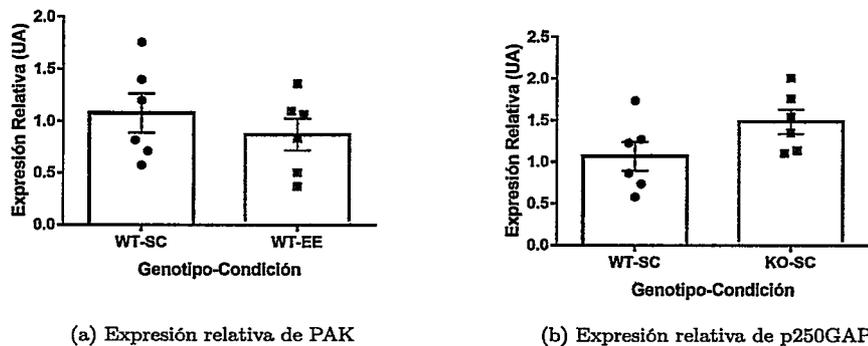


Figura 3.5.2: Evaluación de la expresión relativa de PAK y p250GAP. (a) Cuantificación del mRNA de p250GAP para animales silvestres mantenidos en enriquecimiento (EE) en relación a sus hermanos nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar (SC). (b) Cuantificación del mRNA de p250GAP para animales nulos para *Mecp2* en relación a sus hermanos silvestres mantenidos en condiciones estándar (SC). Se presentan resultados obtenidos para 6 animales por condición, valor promedio \pm SEM.

de mRNA de p250GAP (Figura 3.5.1d), sugiriendo que no hay activación de la vía Rac1-PAK en los animales nulos para Mecn2. PAK se encuentra río abajo de Rac1 en la vía de remodelación de actina. No se observaron cambios en los niveles de PAK al contrastar las condiciones ambientales (Figura 3.5.2a), sugiriendo que la disminución del mRNA de Mecn2 y p250GAP es específica para blancos del miR132.

Para determinar el rol de Mecn2 en la regulación de p250GAP, se evaluaron los niveles de mRNA de p250GAP en ratones nulos para Mecn2 en relación a sus hermanos silvestres, sin observarse diferencias (Figura 3.5.2b). Sugiriendo que p250GAP no es un blanco transcripcional directo de Mecn2. Debido a que p250GAP es un regulador negativo de la formación de espinas dendríticas, cabe preguntarse si la ausencia de regulación observada en los animales nulos para Mecn2 determina consecuencias estructurales en sus hipocampos.

3.5.2. Cuantificación de Espinas Dendríticas

Como se describe en la introducción, una de las principales características del EE es la plasticidad sináptica estructural inducida por la experiencia. Sin embargo, las alteraciones presentadas por los animales nulos para Mecn2 en cuanto a regulación transcripcional de Ryr3 y p250GAP podrían traducirse en una alteración de la plasticidad estructural inducida por este paradigma.

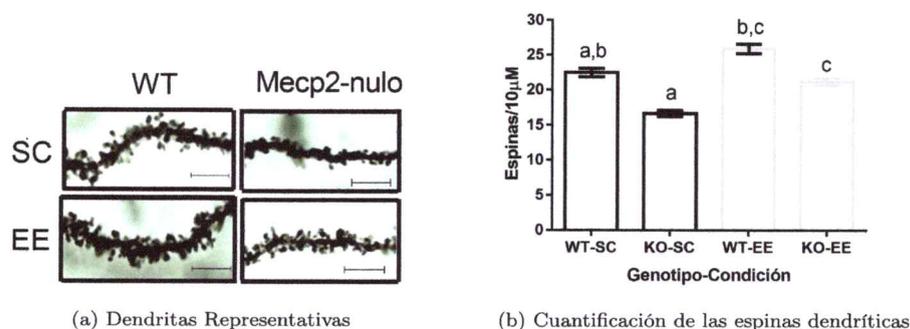


Figura 3.5.3: **Densidad de Espinas Dendríticas:** (a) Se muestran dendritas representativas de los diferentes grupos de trabajo. Barra en esquina inferior derecha es de 5 µm. (b) Se muestra la cuantificación de las espinas dendríticas por cada 10 µm de dendrita para ratones silvestres (WT), animales nulos para Mecn2 (KO) mantenidos en condiciones estándar (SC) y en enriquecimiento ambiental (EE). La significancia se obtuvo por ANOVA revelándose diferencias significativas al comparar a, b y c con $p < 0,05$. Se consideraron 3 animales por condición y al menos 20-30 dendritas por animal. Los gráficos presentan el promedio \pm SEM.

Para determinar si este era el caso, se realizó tinción de Golgi y se procedió a cuantificar el número de espinas dendríticas en el área CA1 de hipocampos de ratones mantenidos en las diferentes condiciones (Figura 3.5.3).

Como se espera para el paradigma de EE, se observa un incremento en la densidad de espinas dendríticas en animales silvestres mantenidos en EE en relación a sus hermanos mantenidos en SC. Así mismo, una característica fenotípica de los animales nulos para *Mecp2* es la disminución de la densidad de espinas dendríticas. Estos resultados validan una vez más nuestro paradigma y modelo de estudio. Es interesante que el EE determina un incremento en la densidad de espinas dendríticas en los ratones nulos para *Mecp2* sugiriendo que existen mecanismos independientes de *Mecp2* que permiten la formación de nuevas espinas dendríticas. Sin embargo, la diferencia observada al comparar la densidad de espinas dendríticas de los animales silvestres y nulos para *Mecp2* mantenidos en EE sugiere que la plasticidad estructural inducida por el EE en los animales silvestres, está ausente en los animales nulos para *Mecp2*.

3.5.3. Laberinto acuático de Morris

La memoria espacial es una tarea dependiente de la función hipocampal y el laberinto acuático de Morris (MWM) ha sido ampliamente utilizado para evaluar esta función. Según se señaló en la introducción, el entrenamiento en esta prueba determina un aumento en la actividad transcripcional de *Ryr2* y *Ryr3* en rata. Esto sugiere que ambos isotipos juegan un rol en procesos cognitivos complejos como la memoria y aprendizaje. Para determinar si la incapacidad de regular la actividad transcripcional de *Ryr3* y la alteración en la formación de espinas dendríticas dependiente de actividad observada en los animales nulos para *Mecp2* determina una alteración en la función hipocampal, se evaluó la capacidad de aprendizaje espacial de los diferentes grupos experimentales. En esta prueba se debió excluir al grupo de animales nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar, ya que su condición física a las 8 semanas de edad imposibilita su capacidad de nado.

Con este fin se llevó a cabo el entrenamiento de ratones en el laberinto acuático de Morris por 4 días. Cada día se realizaron cuatro repeticiones de la prueba. La validez del protocolo de entrenamiento se pone en evidencia al observar la disminución de las latencias de escape de los animales silvestres a medida que transcurren los días de entrenamiento (Figura 3.5.4), dejando en evidencia el aprendizaje de la ubicación de la plataforma oculta. Cabe señalar que

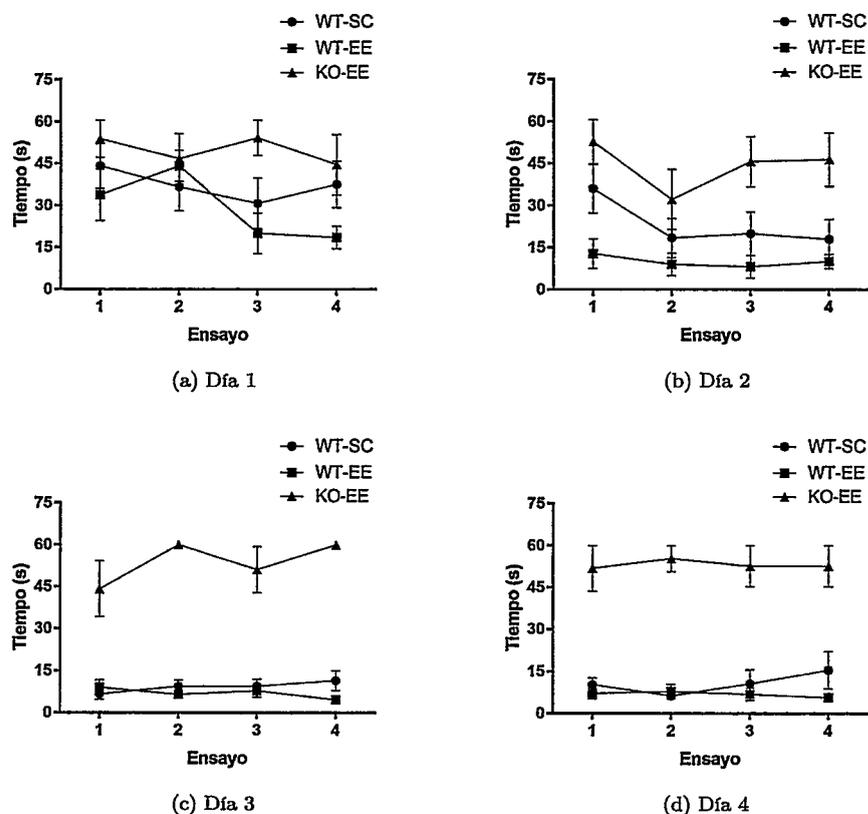
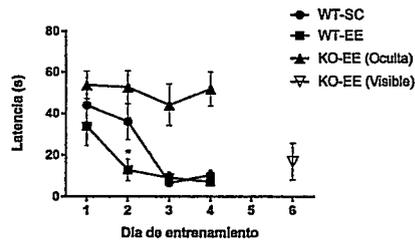


Figura 3.5.4: Curso del entrenamiento en el laberinto acuatico de Morris. Se muestran los tiempos de latencia para los diferentes ensayos llevados a cabo durante el (a) Día 1, (b) Día 2, (c) Día 3 y (d) Día 4 para los diferentes grupos experimentales evaluados. Animales silvestres mantenidos en condiciones estándar se representan por un círculo cerrado ($n = 8$), los animales silvestres mantenidos en enriquecimiento se representan con un cuadrado cerrado ($n = 6$) y los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE se representan por un triángulo cerrado ($n = 6$). Los datos se presentan como valor promedio \pm SEM.

cada repetición de la prueba comienza desde una ubicación diferente de la piscina para evitar el aprendizaje basado en claves propiocéntricas, fortaleciéndose el aprendizaje de la ubicación de la plataforma en función de las claves ambientales.

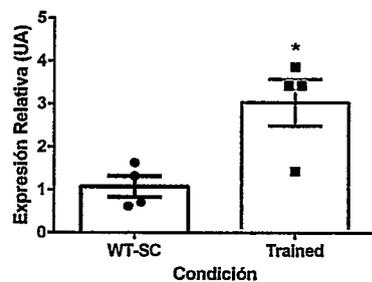
Las latencias de escape de la primera repetición de la prueba en los diferentes días representan los resultados del entrenamiento de manera más clara y permite descartar variables como el cansancio producido por el nado en las repeticiones consecutivas. Primero se puede corroborar que el aprendizaje de la ubicación de la plataforma es sostenido desde el tercer día de entrenamiento (Figura 3.5.5). Observar que aquellos animales silvestres mantenidos en el en-



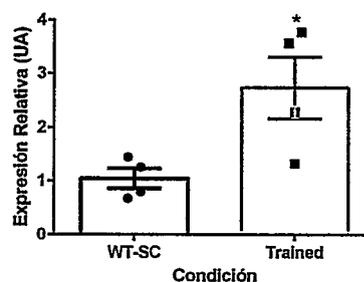
(a) Latencias para el curso del entrenamiento

Figura 3.5.5: **Resultados del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris:** Se presentan las latencias de escape de la primera repetición de la prueba en los diferentes días de entrenamiento. Se presenta el valor promedio \pm SEM, el número de animales por grupo es el mismo presentado en la figura anterior. ANOVA $p < 0,01$, diferencia en relación a WT-SC.

riquecimiento ambiental muestran una disminución de la latencia de escape el primer intento del segundo día, sugiere que el enriquecimiento ambiental facilita el aprendizaje espacial en esta prueba. Para nuestra sorpresa, se observó que las latencias de escape de los animales nulos para *Mecp2* no muestran una disminución en ninguno de los días de entrenamiento (Figuras 3.5.4 y 3.5.5). Sin embargo, al ser evaluados con una plataforma visible, dos días después del entrenamiento, ellos son capaces de nadar y alcanzar la plataforma en un tiempo comparable al de los animales entrenados (triangulo abiertos en Figura 3.5.5), dejando en evidencia que



(a) Cuantificación del mRNA de RyR2



(b) Cuantificación del mRNA de RyR3

Figura 3.5.6: **Cuantificación relativa de los mRNA de RyR2 y RyR3 de animales entrenados:** (a) Cuantificación del mRNA de RyR2 para los animales entrenados en el laberinto acuático de Morris en relación a animales que no fueron entrenados. (t-test, $* = 0,0116$) (b) Cuantificación del mRNA de RyR3 para los animales entrenados en el laberinto acuático de Morris en relación a animales que no fueron entrenados. (t-test, $* = 0,0310$).

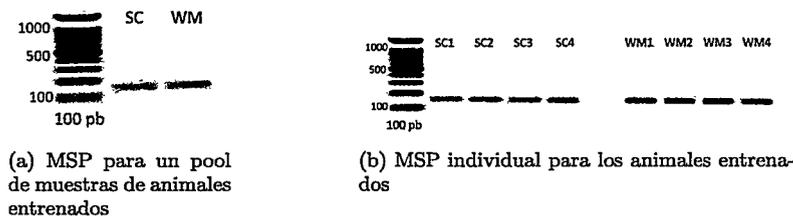


Figura 3.5.7: Evaluación de la Metilación del promotor de *Ryr3* de animales entrenados: (a) Se aprecia el producto de MSP obtenido al utilizar como sustrato un pool de ADN modificado obtenido de hipocampos de animales que no fueron entrenados (SC) y para aquellos que fueron sometidos al protocolo de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (WM). (b) Se observa el producto de MSP obtenido para cada animal considerado en el pool utilizado en (a). El estándar corresponde a un 100 pb, se muestran tamaños de referencia en pares de bases (pb).

la ausencia de aprendizaje de la ubicación de la plataforma no tiene su fundamento en alguna incapacidad motora remanente del fenotipo de los ratones nulos para *Mecp2*. La incapacidad de adquisición de memoria espacial mostrada por los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE contrasta diametralmente con lo observado para los animales silvestres mantenidos en esta condición, destacando el rol de *Mecp2* para llevar a cabo tareas de memoria y aprendizaje.

El entrenamiento en el laberinto acuático de Morris determina un incremento en la actividad transcripcional de *Ryr2* y *Ryr3* en rata (Adasme et al., 2011). Para determinar si esto ocurre en ratón, se realizó PCR en tiempo real utilizando como sustrato cADN obtenido desde el hipocampo de ratones entrenados en el laberinto acuático y fue cuantificado en relación a un grupo de animales silvestres mantenidos en condiciones estándar y que no fueron expuestos al entrenamiento. La cuantificación relativa muestra un incremento en los mensajeros de *Ryr2* y *Ryr3* en relación a los animales controles (Figura 3.5.6). Esto fue corroborado con diferentes normalizadores para evitar un sesgo producto de variaciones en el mismo.

Una vez determinado que existe un incremento en el mensajero de *Ryr3* inducido por el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, se hizo uso del MSP previamente estandarizado para evaluar la metilación del promotor del gen *Ryr3*. Con este fin, se extrajo ADN de hipocampo de animales entrenados y de sus hermanos que no fueron sometidos al entrenamiento. El ADN fue modificado por bisulfito previo al ensayo de PCR específico para metilación. Primero se trabajó con un pool de ADN agrupando aquellos animales entrenados y sus hermanos que no fueron sometidos al entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. Se puede observar un

incremento en el producto del MSP para los animales que fueron entrenados en el laberinto acuático en comparación a sus hermanos que no fueron sometidos al protocolo de entrenamiento (Figura 3.5.7). Luego se procedió al estudio del ADN individual para cada ratón considerado en el pool, corroborándose las observaciones realizadas anteriormente. Estos datos sugieren que el incremento transcripcional observado en animales entrenados en el laberinto acuático de Morris en relación sus hermanos no entrenados está asociado a un cambio en la metilación del promotor de *Ryr3*, de manera similar a lo observado en enriquecimiento.

Capítulo 4

Discusión

4.1. Aspectos Generales

4.1.1. Complejidad

¿Cómo pueden eventos temporalmente puntuales originar cambios perdurables en el tiempo? Esta interrogante es compartida por la biología del desarrollo y la neurociencia. La biología del desarrollo busca comprender los mecanismos que dan origen a la diversidad de fenotipos celulares que conforman un organismo adulto a partir de una fuente compartida de información genética, así como las claves ambientales discretas que determinan el surgimiento de esta plasticidad fenotípica. Así mismo, comprender los procesos cognitivos complejos como la memoria y el aprendizaje, desde una perspectiva biológica, requiere comprender cómo es posible preservar información a pesar del perpetuo recambio de las proteínas que conforman cada neurona y de qué manera puede esto conducir a cambios funcionales en la conectividad de los circuitos neuronales. Este proceso requiere que moléculas individuales puedan auto-perpetuar estados adquiridos en una reacción independiente del recambio de las proteínas participando en el proceso, incluso en ausencia del estímulo que gatilló la reacción en un comienzo. Es interesante que las modificaciones neuroepigenéticas, y de particular interés para esta tesis, la metilación de citosinas, cuenten con la capacidad de auto-perpetuarse. Brindando sustento a la posibilidad de que en la neuroepigenética se encuentre un fundamento biológico de la memoria, así como la epigenética ha mostrado ser de la biología del desarrollo, participando activamente de la diferenciación y compromiso celular (Burton and Torres-Padilla, 2014).

El código de la metilación del ADN permanece aún oculto para el conocimiento, resultando imposible asignar una función *a priori* a una modificación determinada. A pesar de esto, su complejidad queda expuesta en cada trabajo publicado. La metilación de citosinas ocurre principalmente en citosinas ubicadas en un dinucleótido CpG. Estos dinucleótidos se encuentran presentes a una tasa menor a la esperada a lo largo del genoma, concentrándose en regiones conocidas como islas CpG, las cuales generalmente coinciden con las regiones promotoras de los genes. Cada residuo CpG puede encontrarse en su forma metilada, hemi-metilada o libre de metilación, y en cada promotor, región codificante, intrón y región intergénica, existe un sinnúmero de residuos CpG susceptibles de tomar uno de estos tres estados, alterando así la afinidad de factores de transcripción, proteínas MBD y complejos remodeladores de la cromatina asociados (Bird, 2002), modificándose en consecuencia la actividad transcripcional de los genes. A esta complejidad debemos sumar la reciente evidencia mostrando que la metilación no se limita sólo a los residuos CpG, alcanzando a los dinucleótidos CpA, CpC y CpT (CpH en conjunto) (Guo et al., 2014). En adición, modificaciones que surgen de la metilación de citosinas, tales como la hidroximetilcitosina, han mostrado contener información funcional con impacto relevante en conductas (Feng et al., 2015). Esta modificación forma parte de la vía de demetilación de una citosina, haciendo que el paisaje de este tipo de modificaciones esté lejos de ser comprendido. A continuación buscaremos profundizar en lo que se conoce respecto al rol de la generación y mantención de una marca neuroepigenética en la formación de memorias.

4.1.2. Estado Basal, Modificado y Auto-Perpetuación.

Las DNMT, enzimas encargadas de llevar a cabo la metilación del ADN, pueden dividirse en un grupo conocido como DNMTs de mantención y otro conocido como DNMTs de novo. El primer grupo es capaz de metilar citosinas ubicadas en el contexto de dinucleótidos CpG hemimetilados. Mientras que el segundo grupo es capaz de dar origen a una marca de metilación previamente inexistente. Entre ambos grupos, se advierte la capacidad de dar origen a nuevas marcas epigenéticas en el ADN, marcas que podrán perpetuarse en el tiempo (Figura 4.1.1). Se tiene así, un estado basal y un estado modificado, con la capacidad de replicar el estado modificado en el tiempo. Un ejemplo similar y fundamental para los procesos de memoria y aprendizaje es el caso de la Calcio-Calmodulina Quinasa, enzima capaz de adquirir un estado funcionalmente activo y autopropetuarlo de manera independiente del estímulo que causó la

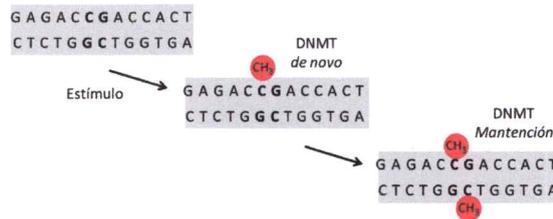


Figura 4.1.1: Esquema para formación y mantención de una nueva marca epigenética: Una nueva marca epigenética surge en el contexto CpG gatillada por un estímulo y la actividad de las DNMT *de novo*. Esta nueva marca puede ser perpetuada por la actividad de las DNMT de mantención. Este ciclo permite la creación de un estado epigenético nuevo y su perpetuación independiente del estímulo que da origen al proceso.

activación original (Day and Sweatt, 2011). Este paralelo, sumado a la complejidad del código de la metilación de las citosinas, brindan un paisaje único que permite plantear un rol para la metilación del ADN como almacén de la memoria.

Así, se ha logrado establecer una estrecha relación entre la metilación del ADN y las diversas subregiones cerebrales, evidenciándose que los cambios en la metilación están relacionados con la funcionalidad de la subregión cerebral en estudio. Así, el hipocampo, cuyo rol predominante recae sobre la consolidación de la memoria, ha mostrado presentar cambios en la metilación que son altamente dinámicos, alcanzando una duración del orden de días. Por su parte, la corteza, cuyo rol en almacenamiento de largo plazo es conocido, ha permitido identificar modificaciones de la metilación que alcanzan el mes de duración (Miller et al., 2010). Así mismo, inhibidores de las DNMTs han mostrado mermar memorias remotas de manera temporal y subregión específica, sugiriendo que la capacidad autopertuante de la metilación es requerida para la mantención de memorias remotas e implicando que la formación de la memoria dio origen a cambios perdurables en la metilación (Miller et al., 2010). Se tiene así un paisaje complejo capaz de dar origen a nuevas metilaciones de citosinas con la capacidad de auto-perpetuarse en el tiempo, constituyendo un proceso que ha demostrado ser necesario para el establecimiento y mantención de memorias. Esto, sin embargo, no da luz a los mecanismos que permitan establecer una relación directa entre la memoria y la metilación de citosinas. Al finalizar debemos recordar que la metilación de citosinas ha demostrado ser un fenómeno sumamente plástico e incluso reversible, lo que se puede considerar un factor contraproducente e incluso limitante para reconocer en la metilación una función como almacén de memorias. Notaremos que la plasticidad de la metilación no imposibilita su rol en la formación de memorias, sin embargo, exige el establecimiento de nuevos

mecanismos funcionales.

4.1.3. Metilación del ADN y Plasticidad Sináptica

Las memorias son almacenadas a diferentes niveles, desde células a circuitos específicos. Conocer de qué manera puede la neuroepigenética alterar la funcionalidad neuronal y la organización de circuitos neuronales es una pregunta sumamente relevante para comprender su rol en procesos cognitivos complejos. Los circuitos pueden abarcar diferentes subregiones del cerebro y diferentes tipos celulares, consecuentemente es posible plantear que el establecimiento de memorias requiera de diferentes mecanismos de plasticidad actuando en diferentes células que actúan como un conjunto funcional. La plasticidad sináptica comparte características fundamentales con la memoria, incluyendo sus características básicas: la asociatividad, especificidad y el requerimiento de un estímulo lo suficientemente fuerte para gatillar el evento plástico. Es más, la memoria de largo plazo y la potenciación de largo término requieren de la síntesis de nuevas proteínas, evento que puede ser epigenéticamente regulado a través de la modulación de la actividad transcripcional. Así mismo, la modulación de la fuerza sináptica ha demostrado ser capaz de participar activamente en la formación y expresión de memorias (Nabavi et al., 2014). De aquí nace la importancia de comprender la relación que existe entre la metilación de citosinas y la plasticidad sináptica, presentándose como un medio capaz de proyectar este código epigenético a los circuitos que subyacen la formación de memorias. Se ha puesto en evidencia que inhibidores de las DNMTs son capaces de impedir la potenciación de largo término inducida por estimulación en ráfagas theta aplicada en las colaterales de Schaeffer. Este protocolo determinó una demetilación de los genes BDNF y Reelin (Sui et al., 2012; Levenson et al., 2006). Datos similares fueron obtenidos utilizando ratones nulos para DNMT1 y DNMT3a, sugiriendo la estrecha relación entre la plasticidad sináptica y los cambios en la metilación de las citosinas (Morris and Monteggia, 2014). Así, para comprender la metilación como un substrato de almacenamiento de la memoria, es necesario estrechar la relación entre los cambios en la metilación y los cambios en la plasticidad sináptica. Sin embargo, relacionar plasticidad sináptica y metilación de citosinas conlleva un problema teórico al comprender que los cambios en la metilación afectan a la célula como un todo, mientras la plasticidad sináptica presenta propiedades y cambios sumamente específicos para cada sinapsis.

Los cambios globales inducidos por cambios en la metilación pueden relacionarse a cambios

en la funcionalidad sináptica considerando tres escenarios posibles descritos por David Sweatt (Guzman-Karlsson et al., 2014) y representados en la figura 4.1.2: i) Los cambios en la metilación pueden alterar la capacidad de respuesta de una neurona frente a los estímulos que recibe, favoreciendo la ocurrencia de cambios en la fuerza sináptica que serán los responsables de originar los cambios permanentes en la célula ii) Los cambios en la metilación pueden alterar la expresión de genes involucrados directamente en procesos de plasticidad, favoreciendo los cambios de la fuerza sináptica iii) Los cambios en la metilación pueden determinar una estabilización de las fuerzas sinápticas una vez que ya han ocurrido los eventos de plasticidad sináptica, permitiendo perpetuar la funcionalidad adquirida en las sinapsis. Los escenarios descritos pueden actuar a nivel sinapsis-específico y a nivel de célula como un todo, en lo que se conoce como plasticidad intrínseca y escalamiento sináptico. Estos tres mecanismos descritos probablemente actúen al unísono, en diferentes poblaciones celulares, subregiones anatómicas e incluso actúen de manera conjunta en una célula única, determinando que el camino para develar un rol directo para la metilación del ADN en la memoria sea sumamente complejo. Debido a esta complejidad, se hace relevante estrechar la relación entre los cambios en la metilación y los cambios transcripcionales de genes blanco que pueden involucrarse directa o indirectamente con cambios en la plasticidad neuronal.

Esta tesis surge como un esfuerzo por relacionar los cambios neuroepigenéticos con modificaciones conductuales. En una primera etapa se hace necesario establecer el vínculo estímulo ambiental - epigenética - actividad transcripcional. Luego abordar el rol de los cambios en la actividad transcripcional en las propiedades plásticas inducidas por el estímulo ambiental de interés y finalmente la relación entre las modificaciones plásticas y las conductas que surgen debido al estímulo. El gen blanco de estudio en esta tesis, *Ryr3*, cuenta con diversos trabajos documentando su rol en procesos de plasticidad sináptica, trabajos que condujeron el estudio de su función en procesos cognitivos complejos. Debo destacar también su rol en la formación de espinas dendríticas, dado a que estas modificaciones estructurales resultan determinantes en el funcionamiento del sistema nervioso, brindando la oportunidad de asentar experiencias en nuevos circuitos neuronales cuya formación es dependiente de la experiencia (Poo et al., 2016). Por otra parte, *Mecp2*, la proteína reguladora dependiente de la metilación del ADN, ha demostrado ser indispensable para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central, con un rol preponderante en plasticidad dependiente de la experiencia. Sin embargo, aún se desconocen los

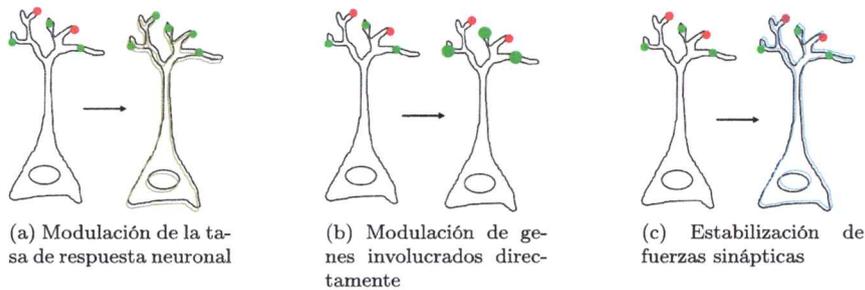


Figura 4.1.2: Efectos putativos de un cambio global de metilación sobre la función neuronal: Se representan diferentes escenarios antes y después de un evento de aprendizaje o experiencia que determina un cambio en las marcas epigenéticas, alterando la expresión de genes funcionalmente relevantes. a) Se representa la modificación de la capacidad de respuesta de una neurona. La modificación puede disminuir o aumentar la tasa de respuesta neuronal, reduciendo o facilitando los fenómenos que determinan la modulación de la fuerza sináptica. En la figura se ejemplifica un aumento en la tasa de respuesta neuronal, favoreciendo el establecimiento de fenómenos de potenciación de largo plazo. b) Se representa el efecto de los cambios en la expresión de genes que participan directamente de la potenciación de largo plazo, permitiendo aumentar la fuerza sináptica de aquellos procesos en donde las condiciones lo permiten. De manera similar los cambios en la expresión génica pueden involucrar genes que contribuyen a la disminución de la fuerza sináptica, con el efecto opuesto al ejemplificado en la figura. c) Se representa una estabilización de las fuerzas sinápticas, tornándose la célula aplástica se permite conservar los estímulos y sus valencias sinápticas.

mecanismos que hacen que esta proteína sea tan determinante en los procesos de plasticidad sináptica. En conjunto, estos candidatos de estudio guardan aún secretos por revelar, secretos que pueden contribuir para comprender el funcionamiento del sistema nervioso cuando se requiere de la experiencia como motor de cambio neuronal. El paradigma de estudio de esta tesis, el enriquecimiento ambiental, permite poner a prueba los mecanismos claves que subyacen los procesos cognitivos complejos, como la formación de espinas dendríticas, la modulación de la fuerza sináptica y los cambios transcripcionales que subyacen dichos cambios. A continuación, bajo la luz de los conceptos aquí descritos, se presenta una discusión enfocada a los diferentes temas centrales de esta tesis, destacándose la importancia del paradigma y modelo de estudio escogido para el desarrollo de la misma.

4.2. Metilación

4.2.1. PCR Metilación Específico (MSP)

La metilación del ADN es una de las principales marcas epigenéticas, sin embargo llevar a cabo un estudio acabado de sus modificaciones no es sencillo y se transforma en una apuesta riesgosa cuando se busca comprender el control de la actividad transcripcional de un gen particular. Es por esto que se decidió dar comienzo a la evaluación de la metilación del promotor de *Ryr3* con una técnica laboriosa, el MSP. Estandarizar esta técnica no fue sencillo y requirió de un esfuerzo considerable. Sin embargo, los resultados obtenidos permitieron delimitar una región de interés para proceder al análisis de secuenciación. El MSP permitió evaluar de una manera cualitativa la metilación de citosinas ubicadas en la región promotora de *Ryr3* en hipocampo de animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, observándose un incremento en el producto de MSP en comparación al producto de la amplificación observada para muestras de ADN obtenidas desde hipocampos de animales mantenidos en condición estándar. Este primer resultado sugirió que la manipulación ambiental determina un cambio significativo de la metilación del promotor de *Ryr3*, dando empuje al desarrollo del trabajo presentado. Así mismo, no se observaron diferencias en el producto de MSP al comparar muestras de ADN obtenidas desde los cerebelos de los mismos animales, sugiriendo la especificidad del cambio epigenético, una característica previamente mencionada y que permite estrechar la relación memoria-neuroepigenética. También debe considerarse que, una vez estandarizado, el MSP corresponde a una técnica de bajo costo y rápida de realizar, lo que permitió la evaluación cualitativa de la metilación en diferentes condiciones que no pudieron ser incluidas en el estudio por secuenciación. Así, el MSP permitió no sólo dar pie al estudio de la metilación por secuenciación, sino también ahondar en los alcances de la regulación transcripcional de *Ryr3*, utilizándose esta técnica para evaluar cambios en la metilación producto del entrenamiento conductual en el laberinto acuático de Morris. Con los resultados finales de esta tesis, se debe destacar la correspondencia de resultados obtenidos para el MSP con los resultados obtenidos por secuenciación, permitiendo validar el uso del MSP como una primera aproximación en la búsqueda de regiones de interés para fines de control transcripcional por modificaciones de la metilación del ADN. Teniendo esto como base, se procede a una discusión acabada de los resultados obtenidos para la secuenciación del promotor de *Ryr3*.

4.2.2. Secuenciación del Promotor de Ryr3

Para el análisis de la metilación por medio de la secuenciación se hizo necesario delimitar una región de interés (ROI) susceptible de dirigir la actividad transcripcional del gen. Considerando los resultados obtenidos por MSP y debido a que el reconocimiento de las citosinas metiladas es independiente de la secuencia contexto, se decidió considerar el promotor proximal del gen que codifica para Ryr3 como región de interés para el estudio de la metilación y como agente mediador de la actividad transcripcional. Haciendo uso de la secuencia de referencia (RefSeq) para Ryr3, se identificó el sitio de inicio de transcripción y a partir de este sitio se consideraron 1000 pb río arriba y 800 pb río abajo. Los 1000 pb río arriba contienen el promotor mínimo de Ryr3 y los 800 pb río abajo del inicio de transcripción incluyen el primer exón y parte del primer intrón. La región de 1800 pb contiene 9 dinucleótidos CpG, de los cuales 5 se localizan entre los 700 y los 400 pares de bases río arriba del sitio de inicio de transcripción; estos sitios fueron el blanco de la secuenciación.

Para tener un marco de referencia, se hace necesario considerar que la región de interés no contiene islas CpG identificables por medio de los principales parámetros utilizados por los algoritmos bioinformáticos. Puede entonces señalarse que el promotor proximal de Ryr3 es una región con baja frecuencia de dinucleótidos CpG. Esto es importante de considerar al momento de comparar los resultados de este trabajo con otros similares, ya que la mayoría de los promotores contienen éstas islas ricas en dinucleótidos CpG río arriba del sitio de inicio de transcripción y es para este tipo de promotores para los que se cuenta con la mayor cantidad de información bibliográfica. Para aquellos promotores libres de islas CpG es aceptado que la metilación de los residuos CpG conduce al silenciamiento del gen, brindado la capacidad de regular la expresión en una forma tejido específica (Han et al., 2011). En el caso presentado en esta tesis, se evaluó la metilación de dinucleótidos CpG en dos condiciones en que el gen blanco se encontró siempre transcripcionalmente activo, marcando una diferencia significativa con el estudio de comparación entre tejidos. En esta tesis se pudo observar que la metilación de citosinas ubicadas en una región libre de islas CpG es capaz de activar transcripcionalmente a un gen blanco, marcando un cambio en la forma en que se concibe la metilación de CpGs para este tipo de promotores. Estas pequeñas diferencias en los mecanismos de regulación transcripcional mediadas por modificaciones epigenéticas han llevado a la formación de la neuroepigenética como campo de estudio, en donde cambios en la metilación de dinucleótidos CpG determinan

cambios en la magnitud de la actividad transcripcional de un gen, a diferencia de los cambios binarios del tipo expresión/no expresión observados para tejidos periféricos (Han et al., 2011).

Como se señaló en la introducción, aquellos dinucleótidos CpG presentes en regiones libres de islas CpG presentan una alta probabilidad de estar metilados, lo que nos hizo esperar un alto porcentaje de metilación en la ROI. Efectivamente, el porcentaje de metilación observado para los CpGs incluidos en esta tesis fue alta, superando el 80 % en algunos de los residuos. A pesar de esto, el EE fue capaz de inducir un aumento significativo en la metilación de citosinas discretas (-446 y +77). El aumento de metilación alcanzó un 10 % por sobre lo observado para aquellos residuos en muestras de ADN obtenido desde animales mantenidos en condiciones estándar. Es importante señalar que los trabajos de genómica global utilizan un umbral de un 5 % de cambio en la metilación para detectar regiones de interés. Estos resultados guardan relación con las observaciones realizadas a nivel genómico, en donde se identificó a las CpGs aisladas como aquellos residuos cuya metilación es susceptible de ser modificada de manera estímulo dependiente (Guo et al., 2011). Estos resultados resaltan la importancia de los CpG aislados ubicados en promotores libres de islas CpG, no sólo como silenciadores tejido específicos, sino como blancos capaces de dirigir la actividad transcripcional en respuesta a estímulos ambientales.

Se observó que el aumento en la metilación inducido por el EE permitió alcanzar niveles comparables a los observados para los animales jóvenes (p21), sugiriendo que el avance en edad disminuye la metilación de los residuos -446 y +77. Esta similitud resultó de particular importancia, ya que sugiere que los niveles de metilación alcanzados por los residuos -446 y +77 corresponden a un nivel fisiológicamente relevante. Se puede sugerir entonces que la estimulación ambiental brindada por el enriquecimiento no determina una metilación anómala de dichos residuos, sino más bien recupera o mantiene su metilación en un nivel fisiológicamente relevante, pero mayor al esperado para el animal adulto de 8 semanas de edad (Figura 4.2.1b). Estos resultados pueden extrapolarse a observaciones realizadas recientemente en un trabajo que abordó el efecto de la restricción calórica sobre los cambios en la expresión génica del área CA1 del hipocampo inducidos por el envejecimiento (Schafer et al., 2015). Este trabajo encontró que el envejecimiento (15 meses) reduce significativamente los niveles del mensajero de Ryr3 y que la restricción calórica es capaz de revertir esta disminución. Así, podría sugerirse que la disminución de la metilación observada para los residuos -446 y +77 entre el P21 y las 8 semanas de edad puede eventualmente proyectarse en el tiempo y subyacer la disminución de los niveles

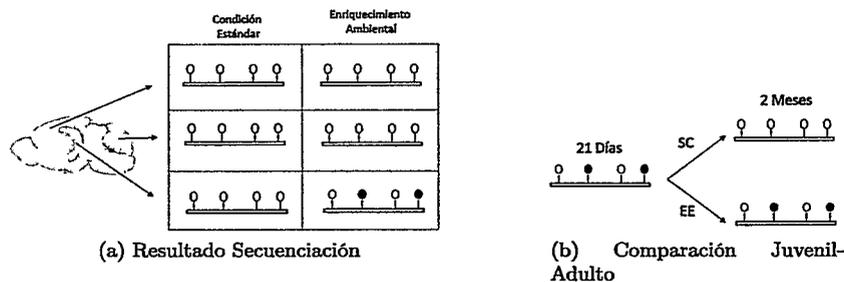


Figura 4.2.1: Esquematación del resultado de la secuenciación del promotor de *ryr3*. (a) Se destaca la especificidad del aumento en la metilación de las citosinas -446 y +77 observado en hipocampo de animales silvestres mantenidos en EE (b) En forma esquemática se destaca el estado de la metilación de las citosinas -446 y +77 en los animales P21 y el efecto de las manipulaciones ambientales sobre la metilación en adultos de 8 semanas. Las citosinas metiladas se representan como círculos negros mientras que su contraparte no metilada se representa como un círculo vacío.

de mensajero de Ryr3 observados en animales envejecidos de 15 meses. Esto permite sugerir una posible relación entre los cambios en la expresión génica que acompañan al envejecimiento con cambios en la metilación del promotor de Ryr3. Siendo más osados, cabe interrogarse si la recuperación de los niveles de mensajero de Ryr3 observados como producto de la restricción calórica, pueden estar acompañados por una recuperación del nivel de metilación del promotor actuando como mecanismo de regulación transcripcional. La restricción calórica y el envejecimiento son un área de intensa investigación y resultaría prometedor considerar las observaciones presentadas en futuros trabajos.

De los resultados obtenidos para la secuenciación del promotor de Ryr3, se destaca la observación de que el aumento en la metilación inducida por enriquecimiento fue observado exclusivamente en el hipocampo, no así en la corteza ni el cerebelo (Figura 4.2.1a) e interesantemente, ambas regiones no mostraron el incremento de la actividad transcripcional observado en el hipocampo. Estas observaciones destacan la importancia de la relación entre la metilación y la actividad transcripcional de Ryr3. Sin embargo, este fenómeno no da cuenta de causalidad, es decir, puede considerarse que un aumento en la metilación dirige un aumento en la actividad transcripcional o que un aumento en la actividad transcripcional dirige un aumento en la metilación (Figura 4.2.2). Para un análisis más detallado debe considerarse la información obtenida de otros experimentos, punto que será analizado posteriormente. Para comprender la especificidad



Figura 4.2.2: **Relación causal entre cambios en la metilación y la actividad transcripcional.** Se representa un gen teórico, con su promotor proximal e inicio de transcripción. Los círculos representan las citosinas metiladas a) Se representa el caso en que el cambio en la metilación ocurre en primer lugar, dando paso a la modificación de la actividad transcripcional. b) Se representa el caso en que el cambio en la actividad transcripcional tiene lugar primero, dando paso a la modificación de la metilación en segundo lugar.

de los cambios en la metilación, debemos tener en cuenta que en esta tesis se consideró el total de la corteza, sin una disección en subregiones específicas. Cabe plantearse la posibilidad que una disección de la corteza en regiones específicas hiciese factible encontrar regiones en las cuales la expresión y la metilación de *Ryr3* se vean afectadas por el protocolo de enriquecimiento ambiental. Así, es posible que otras regiones del cerebro presenten un comportamiento similar, resultando llamativo evaluar regiones involucradas en interocepción, como la corteza insular, y conductas motivadas, como el área tegmental ventral. La corteza motora representa una región de particular interés, ya que datos no publicados del laboratorio del Dr. Kerr sugieren que el enriquecimiento ambiental es capaz de inducir plasticidad estructural en esta región de la corteza, sugiriendo que un análisis detallado de esta región puede eventualmente mostrar resultados similares a lo observado en el hipocampo. El «efecto dilución» es un problema reconocido dentro de la investigación buscando establecer la función de *Mecp2* (Sugino et al., 2014). El efecto dilución sostiene que la diversidad de poblaciones celulares consideradas dentro de una muestra podría ocultar los efectos de la regulación transcripcional de una población neuronal específica (Sugino et al., 2014). Considerando el problema del efecto dilución, es posible que la magnitud de los cambios en la metilación del promotor de *Ryr3* sean mayores a lo observado y que producto de la heterogeneidad de la muestra de hipocampo completo la magnitud se vea opacada. Se hace necesario que en futuros trabajos se considere una selección tipo celular-específica, permitiendo conocer el efecto del enriquecimiento sobre la metilación del promotor de *Ryr3* en una población neuronal específica.

Los resultados obtenidos para el análisis de metilación, tanto por MSP como por secuenciamen-

ción, deben contrastarse con trabajos similares, en particular con el trabajo realizado por Guo y colaboradores (2011). En este trabajo se utilizó el shock electro convulsivo (ECS) como medio para incrementar la actividad neuronal y se evaluaron los cambios en la metilación a nivel genómico. El paradigma de enriquecimiento utilizado en esta tesis representa una forma natural para incrementar la actividad neuronal y desde este punto de vista ambos trabajos son relativamente comparables. Así, podemos destacar la importancia que en ambos trabajos se haya observado un aumento en la metilación del promotor de *Ryr3*, sugiriendo que existe una estrecha relación entre la actividad neuronal y el nivel de metilación del promotor de *Ryr3*. Sin embargo, ambos trabajos discrepan en cuanto al efecto del aumento en la metilación sobre la expresión de *Ryr3*, ya que en el trabajo de Guo y colaboradores se observó una disminución de los niveles de mensajero de *Ryr3* como producto del ECS. Esto puede recaer sobre las diferencias que ambos trabajos presentan, más allá de la diferencia obvia del protocolo de estimulación utilizado. Se destacan el tiempo al cual las muestras fueron trabajadas (4 horas post ECS versus 5 semanas en enriquecimiento) y la región del cerebro contemplada para análisis (giro dentado versus hipocampo completo). Es posible que exista un efecto de dilución de cierto grado que permite observar el efecto global de diferentes poblaciones neuronales al considerarse los diferentes orígenes de las muestras. Estas diferencias nos recuerdan la complejidad oculta tras el código de la metilación del ADN, y que a pesar del nivel de conocimiento que se tiene hoy, no es posible aún asignar una función determinada a la metilación, sin un estudio acabado. A pesar de esto, es llamativo considerar la modificación epigenética como causa de los cambios transcripcionales alcanzados en ambos trabajos y que guardan estrecha relación con el incremento de la actividad neuronal alcanzado mediante dos paradigmas diferentes.

4.3. Mecp2

4.3.1. Rol de Mecp2 en la Regulación de Ryr3

Ya los primeros trabajos buscando comprender el rol de *Mecp2* en la regulación transcripcional habían dado cuenta de su capacidad de actuar de manera bidireccional, es decir, puede aumentar la actividad transcripcional de un grupo de genes blanco mientras que disminuye la actividad de otros (Ben-Shachar et al., 2009b). Así, es posible considerar a *Mecp2* tanto como un activador o represor transcripcional. De aquí la necesidad de llevar a cabo trabajos como

el presente, que permitan comprender el rol de esta proteína en la regulación transcripcional de un candidato específico. La alteración de los niveles de Ryr3 en el modelo nulo para Mecp2 ha sido puesta en evidencia en al menos dos trabajos (Zhao et al., 2013; Ben-Shachar et al., 2009a). Ambos trabajos dan cuenta de una disminución de la expresión del mensajero de Ryr3 en cerebelos de animales nulos para Mecp2. Los resultados de esta tesis corroboran y extienden esta observación al hipocampo, región donde Ryr3 es expresado en mayor abundancia en comparación a otras estructuras del cerebro (Mori et al., 2000). Así, puede sugerirse un rol para Mecp2 como regulador transcripcional de Ryr3, y siendo osados, se puede proponer que Mecp2 actúa como un activador transcripcional de Ryr3, ya que su ausencia determina una disminución de los niveles de mensajero para este canal. Sin embargo, debido al gran número de factores que se ven afectados en un modelo nulo como el utilizado en esta tesis, se hace necesario poner en evidencia la interacción directa de esta proteína con el promotor de Ryr3. Así, el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina permitió corroborar la interacción directa de esta proteína de unión a citosinas metiladas con el promotor de Ryr3. Esta interacción se observó en los animales mantenidos en condiciones estándar, sugiriendo que Mecp2 es necesario para alcanzar los niveles de basales de Ryr3 y que su regulación no es del tipo todo/nada. Así, esta tesis muestra que Mecp2 juega un rol directo en la actividad transcripcional basal de Ryr3, permitiendo comprender la disminución de los niveles de mensajero para Ryr3 observados en los animales nulos para Mecp2, quedando expuesta la necesidad de contar con este lector de metilación de ADN para la correcta actividad transcripcional de Ryr3.

Se observó que el enriquecimiento ambiental determina un incremento de la interacción de Mecp2 con el promotor de Ryr3, probablemente sustentado en el aumento en la metilación del promotor de Ryr3. Esto se correlaciona con la mayor actividad transcripcional observada para los animales mantenidos en enriquecimiento. Así, esta tesis corrobora la hipótesis presentada en que se postula que Mecp2 actúa como un activador transcripcional en el promotor de Ryr3, siendo esta interacción necesaria tanto para alcanzar niveles basales de expresión como para determinar el incremento en la actividad transcripcional observado en los animales mantenidos en EE. El rol de activador transcripcional es relevante para el modelo nulo para Mecp2 ya que estos animales fueron incapaces de mostrar un incremento de los niveles de mensajero de Ryr3 al ser expuestos al EE, dando aún mayor fuerza al rol de activador transcripcional de Mecp2. Se puede así señalar que Mecp2 es necesario para lograr el aumento transcripcional observado como consecuencia

de la exposición al ambiente enriquecido. Con estos datos podemos retomar el concepto de causalidad de los cambios en la metilación y actividad transcripcional presentado al comienzo de la discusión (Figura 4.2.2), sugiriéndose que el cambio en la metilación precede al cambio en la actividad transcripcional observado para los animales mantenidos en enriquecimiento, ya que la interacción de *Mecp2* es necesaria para el incremento transcripcional. En el supuesto que la activación transcripcional dirigiese los cambios en la metilación, el modelo nulo para *Mecp2* mostraría el incremento transcripcional y las diferencias se presentarían solo a nivel de metilación del promotor de *Ryr3*. Esta idea puede y debe ser puesta a prueba en detalle, por medio del uso de diversas estrategias moleculares, siendo a mi juicio, una de las interrogantes abiertas de mayor interés. Entre las herramientas disponibles destaca la posibilidad de modificar artificialmente el nivel de metilación en regiones genómicas, herramienta que podría usarse en el promotor de *Ryr3*, evaluándose si incrementar la metilación es suficiente para dirigir el incremento en la actividad transcripcional.

En cuanto a la relación entre plasticidad estructural observada en el EE y *Mecp2*, se destacan trabajos que han mostrado que *Mecp2* y, en particular su dominio de unión a citosinas metiladas, son necesarios para el desarrollo normal del árbol dendrítico (Zhao et al., 2015). Esto sugiere que cambios en la metilación subyacen los cambios transcripcionales que dan origen a las modificaciones asociadas con la plasticidad estructural y que *Mecp2* juega un rol preponderante en esta relación. La regulación descrita en esta tesis plantea a *Ryr3* como un candidato interesante para relacionar ambos fenómenos, sin embargo existe un sinnúmero de genes capaces de participar en este proceso y que deberán ser estudiados sistemáticamente para comprender cómo el ambiente logra impactar sobre los mecanismos que sustentan la plasticidad sináptica.

4.3.2. Implicancia Para el Síndrome de Rett

No se puede pasar por alto la relación de *Mecp2* con el Síndrome de Rett, patología originada principalmente por mutaciones en el gen que codifica esta proteína. Se debe destacar que existe una dificultad al comprender el rol de las mutaciones de esta proteína en la patogénesis de este síndrome. Se ha postulado que el origen de la patología recae sobre la funcionalidad alterada de esta proteína durante el desarrollo del individuo, por lo que el fenotipo exhibido por las pacientes surge exclusivamente como una consecuencia de las alteraciones neurofisiológicas adquiridas durante el desarrollo temprano. En contraparte se tiene el planteamiento de que MeCP2 es



necesario para la funcionalidad normal del sistema nervioso central aún en la etapa adulta y que por ende el fenotipo asociado al síndrome emerge como consecuencia de la funcionalidad alterada de las neuronas carentes de esta proteína en la vida adulta y no como consecuencia de alteraciones del desarrollo. El síndrome de Rett es considerado una alteración del neurodesarrollo ya que la carencia de MeCP2 determina un fenotipo que se expresa durante el desarrollo temprano del individuo e imposibilita la maduración completa del sistema nervioso. Sin embargo, diversos trabajos han logrado consolidar la idea de que *Mecp2* es necesario para el correcto funcionamiento neuronal en la vida adulta y que su carencia contribuye a las características exhibidas por las pacientes de este síndrome (Kerr et al., 2012). Así, la principal hipótesis para un rol de *Mecp2* en la vida adulta guarda relación con su capacidad de modificar la actividad transcripcional de genes en respuesta a estímulos, sugiriéndose así que la carencia de *Mecp2* determina la imposibilidad de almacenar nuevas memorias debido a la incapacidad neuronal de responder a los estímulos con los cambios transcripcionales requeridos para permitir cambios plásticos (Zoghbi, 2003). Esta hipótesis es sostenida con la base de observaciones realizadas en genes como BDNF, sin embargo, existe un gran vacío por completar para sostener esta idea. La presente tesis, aporta a la comprensión del rol de *Mecp2* en la vida adulta, dejando en evidencia su rol directo en la regulación transcripcional de *Ryr3*. Así mismo, comprobar que los animales nulos para *Mecp2* son incapaces de mostrar la respuesta transcripcional de *Ryr3* frente a la estimulación ambiental sugiere que existen aspectos de la funcionalidad neuronal que la ausencia de *Mecp2* imposibilita recuperar. Las consecuencias de esto escapan al trabajo de esta tesis, pero son sumamente relevantes y resultan sumamente atractivas para desarrollar en un futuro trabajo.

4.4. Plasticidad Dependiente de la Experiencia

4.4.1. Enriquecimiento Ambiental

El EE es un paradigma que, a pesar de su sencillez, continúa brindando resultados interesantes para comprender el funcionamiento del sistema nervioso en condiciones normales y patológicas. Este paradigma busca incrementar la calidad y cantidad de estimulación que reciben los animales; para este fin se utilizan diversos juguetes, laberintos, ruedas de ejercicio y un número incrementado de compañeros de jaula, permitiendo establecer interacciones sociales más complejas. Diversos trabajos han buscado comprender el aporte de cada estímulo a la funciona-

lidad neuronal obtenida como consecuencia de este paradigma, observándose que, por ejemplo, la rueda de ejercicio es determinante en cuanto al efecto neurogénico del EE (Kobilo et al., 2011; Kempermann et al., 1997). Sin embargo, la rueda de ejercicio no es necesaria para observar los efectos conductuales de este paradigma (Meshi et al., 2006). Así, descomponer los elementos del EE en un esfuerzo por establecer las relaciones causa-efecto de este paradigma resulta ineficiente, confuso y alejado del foco de esta tesis. Personalmente considero que la estimulación brindada por el conjunto de elementos utilizados en el EE es mayor que la suma de sus partes. Por este motivo considero conveniente utilizar el EE como un todo, obteniendo tanto los efectos celulares y moleculares como de los efectos conductuales. El uso de este paradigma como modelo central en esta tesis deriva de su capacidad de incrementar la plasticidad neuronal, tanto a nivel sináptico como estructural. Ambos procesos son claves para la búsqueda de una relación entre la memoria y los cambios en la metilación del ADN. El EE es un paradigma reconocido tanto por incrementar la fuerza sináptica como por inducir plasticidad dependiente de la experiencia (van Praag et al., 2000; Baroncelli et al., 2010; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Recientemente se ha logrado evidenciar *in-vivo* que el EE determina no solo un incremento de la densidad de espinas dendríticas sino que incrementa la tasa de recambio de las mismas, sugiriendo que el enriquecimiento favorece la dinámica de formación de las espinas (Jung and Herms, 2014). En adición, el EE ha mostrado atenuar el fenotipo asociado a diversas enfermedades neurológicas, se comprende así su importancia como paradigma de estudio, tanto para comprender los cambios que subyacen la plasticidad sináptica en condiciones fisiológicas, como para comprender las bases moleculares de enfermedades. Debido al gran número de cambios en la expresión génica que acompañan a este paradigma, se hace necesario considerar los cambios neuroepigenéticos como una posible fuente de los mismos. Es relevante señalar que una breve exposición a este paradigma por 3 ó 6 horas determina un incremento en la expresión de DNMT (Rampon et al., 2000), brindando un marco para los cambios en la metilación observados para el promotor de *Ryr3*. Así mismo, se han observado cambios en la metilación y acetilación de histonas (Fischer et al., 2007), sugiriendo que cambios en la estructura de la cromatina acompañan los cambios de la expresión génica dirigidos por la estimulación ambiental. Esto permite proponer a este paradigma como una herramienta para comprender los cambios epigenéticos que sustentan los fenómenos de plasticidad relevantes para los procesos cognitivos.

En esta tesis, uno de los resultados que avala la efectividad del paradigma usado, corresponde

a la estimación de la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo en los animales expuestos a un ambiente enriquecido. Se observó un incremento de la densidad de espinas dendríticas para los animales silvestres mantenidos en EE en relación a sus hermanos mantenidos en condiciones estándar. Llama la atención que los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE también presentaron un incremento en la densidad de espinas dendríticas al ser contrastados con los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en condiciones estándar, sugiriendo que ciertas características fundamentales de este modelo murino del síndrome de Rett pueden ser prevenidas o revertidas por medio de la estimulación ambiental. Esto concuerda con observaciones previas que sugieren que el EE es capaz de atenuar el fenotipo neurológico de este modelo de síndrome de Rett (Kerr et al., 2010b; Lonetti et al., 2010). Debe señalarse que el aumento en la densidad de espinas dendríticas observado en los animales nulos para *Mecp2* sólo alcanzó el nivel observado para los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar. Esto sugiere que el incremento en la densidad de espinas dendríticas observado para los animales silvestres mantenidos en enriquecimiento requiere necesariamente de *Mecp2* (Figura 3.5.3). El papel de *Mecp2* en este incremento representa un tema de investigación clave para comprender la patogénesis del síndrome de Rett y puede ser abarcada en un futuro trabajo.

Acompañando las observaciones realizadas en cuanto a remodelación estructural, se encuentra la facilitación del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris mostrado por el grupo de ratones silvestres mantenidos en EE. Tal facilitación era conocida previamente para tareas dependientes de hipocampo (Duffy et al., 2001) y permite, una vez más, dar validez a nuestro protocolo de EE. Destaca la correlación entre las modificaciones estructurales inducidas por el EE y la facilitación del aprendizaje espacial en los animales silvestres. Sin embargo, sorprende que los animales nulos para *Mecp2*, a pesar de mostrar una densidad de espinas dendríticas comparable a la de los animales silvestres, no tengan la capacidad de aprendizaje de la ubicación de la plataforma oculta. Se esperaba que estos grupos mostrasen un nivel de aprendizaje similar, perdiéndose exclusivamente la facilitación del aprendizaje inducido por el EE. Sin embargo, se observó la total incapacidad de aprender esta tarea, destacando la importancia de *Mecp2* para la expresión de plasticidad dependiente de la experiencia y la necesidad de este fenómeno para el desarrollo de una capacidad cognitiva compleja como la memoria y aprendizaje.

En relación a la actividad transcripcional, en esta tesis se observó un incremento de los

mensajeros de Ryr2 y Ryr3 como consecuencia de la exposición al paradigma de EE. La regulación transcripcional de Ryr2 ha sido demostrada como dependiente de CREB (Ziviani et al., 2011), por lo que era esperable observar un incremento en Ryr2 en un protocolo conocido por aumentar la expresión de CREB (Williams et al., 2001) y por incrementar la activación neuronal. Sin embargo, se logró observar un incremento de 100 veces para el mRNA de Ryr3 en los animales mantenidos en enriquecimiento. Este aumento robusto puede componerse tanto por un incremento de la actividad transcripcional como por la estabilización de los correspondientes mensajeros. Esta última variable debe ser considerada en futuros trabajos. También debe considerarse que, en el hipocampo, el nivel de mensajero para Ryr3 es significativamente menor al nivel de mensajero para Ryr2, por lo que el incremento diferencial observado para estas isoformas tiene un efecto equiparador de los niveles de mensajero de ambas isoformas; esto puede tener consecuencias neurofisiológicas relevantes y considerando que, como se mencionó anteriormente, el enriquecimiento ha mostrado atenuar el fenotipo asociado a diferentes enfermedades neurológicas, resultaría relevante evaluar el rol de los canales RyR en este proceso así como en otros modelos de enfermedades del neurodesarrollo y de neurodegeneración. Así mismo, se ha puesto en evidencia que el EE facilita e incrementa la magnitud de la potenciación de largo término (Cimadevilla et al., 2007), la cual puede ser consecuencia de un incremento del número de espinas dendríticas involucradas en el proceso o de un cambio en la funcionalidad de cada espina dendrítica, los canales RyR han mostrado participar de ambos procesos. A través de la CICR, los canales RyR han mostrado que participan en la potenciación de largo término en el hipocampo (Grigoryan et al., 2012). Mientras que por medio de la regulación del miR132, se ha mostrado su participación en la regulación de la formación de espinas dendríticas (Lesiak et al., 2014; Adasme et al., 2011). Ambos procesos son fisiológicamente relevantes y permiten sugerir un rol para los canales RyR en las propiedades del EE sobre la potenciación de largo término.

En conjunto, los resultados de esta tesis corroboran la utilidad de este paradigma para comprender la regulación transcripcional de genes relevantes para los fenómenos de plasticidad sináptica y estructural. Así mismo, se puede plantear el uso de este paradigma para comprender los mecanismos que subyacen patologías neurológicas relevantes para el ser humano. Finalmente destaco la utilidad del enriquecimiento ambiental como paradigma para comprender los mecanismos por los cuales el ambiente determina cambios en la actividad transcripcional de genes, surgiendo la neuroepigenética como un eje central.

4.4.2. Rol del Micro ARN 132 y Supresión de P250GAP

La participación de los canales RyR en la formación de espinas dendríticas dependiente de actividad ha sido previamente sugerida (Adasme et al., 2011; Lesiak et al., 2014), sin embargo, su contribución a la plasticidad dependiente de la experiencia no ha sido evaluada en un modelo *in vivo*. Esta contribución es importante de evaluar dado que permite establecer un vínculo entre la epigenética y la remodelación de circuitos neuronales. Las observaciones realizadas para la densidad de espinas dendríticas guardan relación con lo observado para el supresor de la sinaptogénesis, P250GAP. En animales silvestres mantenidos en EE, el aumento de la actividad transcripcional de Ryr3 es acompañado por un incremento en los niveles de miR132 y la consecuente supresión del regulador negativo de la sinaptogénesis, p250GAP. Ambos eventos están relacionados con la formación de espinas dendríticas dependiente de actividad (Lesiak et al., 2014; Wayman et al., 2008; Impey et al., 2010). De manera contrastante, los animales nulos para Mecp2 mantenidos en un ambiente enriquecido, no muestran la supresión de p250GAP, sugiriendo que la modulación de la vía Rac1-PAK no ocurre, imposibilitando la formación de espinas dendríticas que caracteriza a la plasticidad dependiente de la experiencia. Llama la atención que los niveles de p250GAP no se encuentran alterados en los animales nulos para Mecp2 en relación a sus hermanos silvestres, sugiriendo que p250GAP no es un blanco transcripcional directo de Mecp2. Recientemente se ha puesto en evidencia que la activación farmacológica de las Rho GTPasas permite recuperar el fenotipo de un modelo de síndrome de Rett, el ratón Mecp2-308 (De Filippis et al., 2015, 2012), sin embargo el mecanismo por el cuál Mecp2 contribuye a la activación de estas GTPasas es desconocido. En este contexto destacamos nuestras observaciones que sugieren una contribución indirecta de Mecp2 en la regulación de p250GAP y que muestran la incapacidad de los animales nulos para Mecp2 de suprimir p250GAP. Resulta prometedor determinar si la sobreexpresión del miR132 o la supresión artificial de p250GAP permiten recuperar la plasticidad dependiente de la experiencia en este modelo murino.

El microRNA132 participa en la formación de espinas dendríticas en diferentes contextos (Hansen et al., 2010; Tognini and Pizzorusso, 2012; Dhar et al., 2014), sin embargo, resulta de sumo interés para esta tesis que uno de los ARN mensajeros blanco de este micro ARN sea Mecp2 (Klein et al., 2007) y como tal, también fue evaluado en los animales silvestres mantenidos en EE. Es interesante constatar que en aquellos ratones silvestres mantenidos en EE los niveles de mARN de Mecp2 se encuentran disminuidos en relación a sus hermanos mantenidos

en condiciones estándar, sugiriendo que la activación del miR132 es funcional. La quinasa PAK es un efector río abajo de Rac1 y sus niveles no se vieron alterados por la manipulación ambiental, sugiriendo que las disminuciones de p250GAP y Mecp2 son específicas para estos blancos del miR132. La disminución de los niveles de mRNA de Mecp2 sugiere una retroalimentación negativa de la vía de activación transcripcional de Ryr3 y representa un área de estudio utilizando otros paradigmas de estimulación o entrenamientos conductuales conducentes a memoria y aprendizaje. Un trabajo reciente encontró resultados similares en cultivo de neuronas, reportando que el incremento de la actividad neuronal inducida por KCl determina una disminución de la expresión de Mecp2 (Tropea et al., 2016), dando solidez a nuestras observaciones.

En conjunto se tiene que la estimulación brindada por el EE determina un incremento en la actividad transcripcional de Ryr3. Esto es acompañado por un incremento en los niveles de miR132 y la consecuente disminución de sus mRNA blancos, Mecp2 y p250GAP. p250GAP actúa como un regulador negativo de la sinaptogénesis y su supresión determina un incremento en la formación de espinas dendríticas. Así se encuentra un fundamento celular a la plasticidad dependiente de la experiencia evidenciada en el incremento de espinas dendríticas observado en los animales silvestres mantenidos en EE. Sin embargo, en ausencia de Mecp2 el enriquecimiento ambiental no dirige el aumento transcripcional de Ryr3 ni la supresión de p250GAP, siendo Ryr3 un blanco directo y p250GAP un blanco indirecto de Mecp2. Consecuentemente, estos ratones muestran un incremento en la densidad de espinas dendríticas, pero no muestran plasticidad dependiente de la experiencia inducida por el EE, sugiriendo que el incremento de espinas dendríticas que requiere necesariamente Mecp2 puede ser mediado por la vía RyR-miR132-p250GAP y su modulación de la actividad de la vía Rac1-PAK de remodelación de actina.

4.5. Memoria Espacial

4.5.1. Activación Transcripcional y Aprendizaje en el Laberinto Acuático de Morris

Datos previos del laboratorio de la Dra. Hidalgo mostraron que el entrenamiento en laberinto acuático de Morris incrementa los niveles de mRNA de Ryr2 y Ryr3 en el hipocampo de rata. En esta tesis se buscó validar estas observaciones en ratón y evaluar la posibilidad de que exista un cambio en la metilación del promotor de Ryr3 asociado a este cambio transcripcional. Para

esto se evaluaron los niveles de mRNA de Ryr2 y Ryr3 en ratones entrenados en el laberinto acuático y posteriormente se utilizó el MSP para evaluar posibles cambios en la metilación que pudiesen asociarse al entrenamiento. Esto es posible solo al tener en cuenta la correspondencia de los resultados observados para el MSP y la secuenciación, según se señaló previamente. Se tiene así, una técnica de bajo costo y bajo tiempo de realización que permite la evaluación de la metilación del promotor de Ryr3 en animales entrenados. Conductualmente se pudo observar un aprendizaje robusto y sostenido desde el tercer día de entrenamiento, puesto en evidencia por la disminución de la latencia de escape a través de los días y por los cambios en las trayectorias desde exploración circular a líneas directas a la plataforma. En conjunto, estas observaciones permiten corroborar la efectividad del protocolo de entrenamiento en el aprendizaje de la ubicación de la plataforma. En adición, en el trabajo de Adasme y colaboradores (2011) se utilizó un grupo experimental que fue sometido al entrenamiento pero cuya plataforma oculta fue cambiada de ubicación durante el transcurso del mismo, dejándose en evidencia la necesidad del aprendizaje espacial para incrementar la actividad transcripcional de Ryr2 y Ryr3, descartándose así el efecto del nado y estrés como posibles agentes activadores. Tomando esto como base se decidió utilizar animales silvestres en condiciones estándar como controles.

Los mensajeros de Ryr2 y Ryr3 fueron evaluados considerando los mismos normalizadores utilizados para el EE y a pesar de que las magnitudes del incremento no alcanzan los valores observados para enriquecimiento ambiental, se pudo observar un incremento significativo en los mensajeros de ambos isotipos. La diferencia entre las magnitudes alcanzadas en cuanto a niveles de mensajeros en enriquecimiento ambiental y en los animales entrenados puede recaer en el nivel de activación neuronal que estos protocolos conllevan. El enriquecimiento mantiene una activación robusta y sostenida durante las 5 semanas de exposición, mientras que el entrenamiento es temporalmente puntual y asociado a un aprendizaje concreto. Los resultados obtenidos permiten corroborar y extender las observaciones realizadas en rata a un nuevo modelo murino y permiten sugerir que la activación transcripcional de Ryr2 y Ryr3 como parte del proceso de memoria y aprendizaje es conservado entre estas especies. Posteriormente se buscó determinar si cambios en la metilación del promotor de Ryr3 pueden asociarse al incremento transcripcional observado en los animales entrenados en el laberinto acuático de manera similar a lo observado para EE. Se observó una marcada tendencia a incrementar el producto del MSP cuando el ADN provino de los hipocampos de animales entrenados en comparación a los hermanos silvestres

que no fueron entrenados. Esto fue corroborado para los diferentes animales entrenados y como comparación grupal de cada condición en estudio, sugiriendo que el aprendizaje espacial puede dar origen a un incremento en la metilación del promotor de *Ryr3*. Estos resultados permiten proyectar el mecanismo transcripcional planteado para el EE a un proceso cognitivo complejo como el aprendizaje de la ubicación de la plataforma oculta.

Los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar mostraron una disminución de las latencias de escape registradas durante el transcurso del entrenamiento, sugiriendo el aprendizaje de la ubicación de la plataforma oculta. Así mismo, se logró observar el efecto facilitador del EE sobre el aprendizaje espacial, representado por una disminución en la latencia de escape del segundo día de entrenamiento en comparación a los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar. Distinguir esta diferencia resultaba de importancia, dado que los resultados mostrados por la densidad de espinas dendríticas sugería que los animales nulos para *Mecp2* mantenidos en EE mostrarían una curva de aprendizaje similar a la de los animales silvestres mantenidos en condiciones estándar, perdiendo exclusivamente la facilitación inducida por el EE. Sin embargo, se observó su incapacidad total de mostrar aprendizaje de la ubicación de la plataforma oculta. Para descartar el efecto de las alteraciones motoras característica de los animales nulos para *Mecp2*, se realizó una prueba con una plataforma visible una vez finalizado el entrenamiento, observándose que los ratones nulos para *Mecp2* mantenidos en enriquecimiento ambiental cuentan con la capacidad motora suficiente para alcanzar la plataforma en un tiempo similar a los animales silvestres. Esta prueba descarta factores motores como causa de la falta de aprendizaje. En conjunto estos resultados sugieren un rol fundamental para *Mecp2* en la función hipocampal y memoria espacial, en particular en relación a la plasticidad dependiente de la experiencia, tanto a nivel estructural, como funcional.

En conjunto, se destaca la relación entre los cambios transcripcionales de *Ryr3* y los procesos de plasticidad estructural inducida por el EE. Estas observaciones cobran relevancia al evaluar la memoria espacial como una medida de funcionalidad hipocampal. Así se tiene que la modulación transcripcional de *Ryr3*, dirigida por el cambio en la metilación, puede asociarse a la supresión de un regulador negativo de la sinaptogénesis, *p250GAP*, favoreciendo la formación de espinas dendríticas en los animales silvestres mantenidos en enriquecimiento ambiental y facilitando el aprendizaje de una tarea de aprendizaje espacial. En ausencia de *Mecp2*, existe una carencia de regulación transcripcional de *Ryr3* y de *p250GAP*, imposibilitándose la plasticidad estructural

dependiente de la experiencia e impactando negativamente en la función hipocampal evaluada en esta prueba de memoria espacial.

4.6. Integración de Resultados

Esta tesis tuvo por objetivo fundamental comprender la regulación transcripcional de *Ryr3*, en particular en cuanto a la respuesta transcripcional inducida por claves ambientales. Los datos bibliográficos existentes sustentaron la propuesta de una regulación transcripcional dependiente de cambios en la metilación del promotor del gen que codifica para *Ryr3* y de la consecuente interacción de la proteína de unión a citosinas metiladas, *Mecp2*. Sin embargo, es imposible conocer *a priori* el efecto neto de la metilación de una citosina sobre la actividad transcripcional de un gen particular. Los efectos del cambio de la metilación pueden ser múltiples y *Mecp2* es reconocido por presentar actividad dual sobre sus genes blanco, siendo capaz de activar o reprimir la actividad transcripcional (Chahrouh et al., 2008). Es por esto que es necesario un estudio acabado de cada gen blanco de manera independiente y para las condiciones que resulten de interés para el investigador. El paradigma de estudio escogido presenta características particulares, las cuales han sido descritas a lo largo de esta tesis. Sin embargo, el EE se utilizó en esta tesis como centro de la búsqueda de genes blanco de modificaciones epigenéticas a través de las cuales el ambiente puede alcanzar un impacto en la funcionalidad sináptica. Esto representa un área de constante búsqueda en el campo de la neuroepigenética y hacen que este trabajo sea sumamente interesante en el contexto amplio de la neurociencia.

El conjunto de resultados obtenidos permiten asociar una condición ambiental conocida por dar origen a plasticidad sináptica dependiente de la experiencia con un incremento en la actividad transcripcional de *Ryr3*. Este incremento fue observado exclusivamente en hipocampo, mientras que las cortezas y cerebelos de los mismos animales no mostraron cambios en la actividad transcripcional. Así mismo, utilizando dos técnicas complementarias, se pudo determinar la existencia de un incremento en la metilación del promotor de *Ryr3* en el hipocampo, sugiriendo que la estimulación ambiental permite conservar el nivel de metilación observado para animales juveniles (p21) en animales adultos de 8 semanas. Tal como se observó para la actividad transcripcional, el cambio en la metilación no fue observado ni en corteza ni en cerebelo, por lo que tanto el cambio en la actividad transcripcional como el incremento en la metilación se observaron específicamente en el hipocampo, destacando la relación entre la metilación del promotor y

la actividad transcripcional de RyR3.

Debido a la actividad dual de Mecp2, el conocer que existe un incremento de la actividad transcripcional de RyR3 que es acompañado con un incremento en la metilación del promotor de RyR3 no permite asumir *a priori* cuál es el rol de Mecp2 como regulador transcripcional de RyR3. Así, se procedió a utilizar el modelo nulo para Mecp2, lo que permitió una primera aproximación a la regulación transcripcional de RyR3. Se observó una disminución del mensajero de RyR3 en los animales nulos para Mecp2, sugiriendo que Mecp2 se requiere necesariamente para alcanzar los niveles basales de actividad transcripcional de RyR3. En cuanto a RyR2, cuya actividad transcripcional esta dirigida por CREB, no se observó una disminución en comparación a los animales silvestres, validando el uso de este modelo para el estudio de la regulación de RyR3. El rol de Mecp2 como activador transcripcional de RyR3 ganó relevancia al observar que en ausencia de Mecp2 el EE no determina la activación transcripcional de RyR3.

Con esto en mente, validar la función de Mecp2 como activador transcripcional requiere demostrar la interacción directa de Mecp2 con el promotor de RyR3 y determinar de qué manera se ve ésta interacción modificada por el EE. Con éste fin se procedió a evaluar la interacción directa de Mecp2 con el promotor de RyR3 haciendo uso de la inmunoprecipitación de cromatina. Se pudo observar, que existe interacción en condición basal y que esta interacción incrementa en los animales que son expuestos a EE, lo cual respalda la idea que Mecp2 actúa como activador transcripcional de RyR3.

Para contribuir a comprender como una regulación epigenética puede contribuir a la remodelación de circuitos y finalmente a la conducta, se evaluó un mecanismo previamente caracterizado *in vitro* por el cual los canales RyR han mostrado contribuir a la formación de espinas dendríticas. Así se determinó que la regulación transcripcional observada para RyR3 en animales silvestres mantenidos en EE está asociada con el incremento del miR132 y la consecuente supresión del regulador negativo de la sinaptogénesis, p250GAP. Estos resultados guardan relación con lo observado en la cuantificación de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo, donde se observó un incremento en la densidad de espinas dendríticas, dando cuenta de la plasticidad estructural dependiente de la experiencia inducida por el EE. En contraste, en ausencia de Mecp2, la regulación transcripcional de RyR3 se ve mermada, al igual que la supresión de p250GAP, determinando la pérdida de la plasticidad dependiente de la experiencia. Esta pérdida queda expuesta en la diferencia de densidad de espinas dendríticas al comparar los ratones silvestres y



Figura 4.6.1: **Esquema de resumen de resultados:** Se representan las diferentes observaciones realizadas a lo largo de esta tesis para los ratones silvestres mantenidos en enriquecimiento (WT-EE). Se destacan las alteraciones observadas en los ratones nulos para *Mecp2* en relación a los ratones silvestres.

nulos para *Mecp2* mantenidos en EE, dando cuenta de un mecanismo de formación de espinas dendríticas de manera experiencia-dependiente que requiere necesariamente de *Mecp2*.

La pérdida de la plasticidad dependiente de la experiencia podría ser funcionalmente irrelevante, por esto se decidió evaluar la memoria espacial como una medida de la funcionalidad hipocampal. Se observó que el enriquecimiento ambiental facilita el aprendizaje espacial en ratones silvestres, mientras que los animales nulos para *Mecp2* fueron incapaces de mostrar aprendizaje. Estos resultados destacan la relevancia funcional de la plasticidad dependiente de la experiencia y, en particular, la importancia de *Mecp2* para traducir la estimulación ambiental en un fenómeno cognitivamente relevante.

Una vez establecido el mecanismo de regulación transcripcional de *Ryr3* dirigido por cambios en la metilación de su promotor, se procedió a evaluar si puede este mecanismo estar asociado a una tarea de aprendizaje espacial. El entrenamiento en el laberinto acuático de Morris determinó un incremento en la actividad transcripcional de *Ryr2* y *Ryr3*, permitiendo extender observaciones previas realizadas en rata a este modelo murino. Es interesante, que tal como se observó en el EE, el entrenamiento determinó un incremento en la metilación del promotor de *Ryr3*, lo que sugiere que el mecanismo planteado como activador transcripcional de *Ryr3* en EE, puede formar parte de las modificaciones necesarias para sostener procesos cognitivos complejos como la memoria y el aprendizaje.

En conjunto, los resultados sugieren que *Mecp2* es necesario para alcanzar los niveles basales de mRNA de *Ryr3* y para lograr incrementar su actividad transcripcional por medio de un paradigma inductor de plasticidad dependiente de la experiencia. Esta regulación es específica

para hipocampo y los cambios en la metilación que sustentan la interacción de *Mecp2* fueron exclusivos de esta región. El incremento transcripcional de *Ryr3* fue acompañado de un incremento en el *miR132* y la supresión de sus *mARN* blancos, *Mecp2* y *p250GAP*. Los efectos de estas supresiones guardan relación con una posible retroalimentación negativa de la activación de *Ryr3* y con la formación de espinas dendríticas. Consecuentemente se determinó que la supresión de *p250GAP* es acompañada por un incremento en la densidad de espinas dendríticas en hipocampo, facilitándose el aprendizaje en una prueba de memoria espacial. En adición se pudo observar un incremento en la metilación como producto del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, que es a su vez acompañado por un incremento en los niveles de *mARN* de *Ryr3*. Estos resultados permiten progresar en entender los mecanismos que permiten la plasticidad dependiente de la experiencia y la posible contribución de este mecanismo en procesos cognitivos complejos (Figura 4.6.1).

Revelar como cambios de la actividad neuronal conducen a cambios plásticos, corresponde a la base para comprender los procesos cognitivos complejos. El creciente número de trabajos de escala genómica, han mostrado el grado de complejidad que escoden los patrones de modificaciones epigenéticas y los alcances funcionales que estos pueden tener. Sin embargo, trabajos de pequeña escala son necesarios para desentrañar los mecanismos específicos de genes de interés y sus modificaciones en diferentes condiciones. Así, los resultados de esta tesis son un aporte a este campo de la investigación situando a la epigenética como un punto de intersección, permitiendo comprender como modificaciones del ambiente originan cambios neuronales con el potencial de determinar modificaciones a nivel estructural y sináptico.

Bibliografía

- Abraham, W. C. (2003, April). How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432), 735–744.
- Adasme, T., P. Haeger, A. C. Paula-Lima, I. Espinoza, M. M. Casas-Alarcón, M. A. Carrasco, and C. Hidalgo (2011). Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7), 3029–3034.
- Aerts, S., G. Thijs, M. Dabrowski, Y. Moreau, and B. De Moor (2004, June). Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. *BMC Genomics* 5, 34.
- Alford, S., B. G. Frenguelli, J. G. Schofield, and G. L. Collingridge (1993, January). Characterization of Ca²⁺ signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *J Physiol* 469(1), 693–716.
- Altun, G., J. F. Loring, and L. C. Laurent (2010, January). DNA methylation in embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 109(1), 1–6.
- Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, M. Wan, C. Q. Tran, U. Francke, and H. Y. Zoghbi (1999, October). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23(2), 185–188.
- Aoyagi, S., G. Narlikar, C. Zheng, S. Sif, R. E. Kingston, and J. J. Hayes (2002, June). Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions. *Mol. Cell. Biol.* 22(11), 3653–3662.
- Artola, A., J. C. von Frijtag, P. C. J. Fermont, W. H. Gispen, L. H. Schrama, A. Kamal, and B. M. Spruijt (2006, January). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 23(1), 261–272.
- Asaka, Y., D. G. M. Jugloff, L. Zhang, J. H. Eubanks, and R. M. Fitzsimonds (2006, January). Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiology of Disease* 21(1), 217–227.

- Balmer, D., J. Goldstine, Y. M. Rao, and J. M. LaSalle (2003, January). Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J. Mol. Med.* 81(1), 61–68.
- Balschun, D., D. P. Wolfer, F. Bertocchini, V. Barone, A. Conti, W. Zuschratter, L. Missiaen, H. P. Lipp, J. U. Frey, and V. Sorrentino (1999, October). Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. *EMBO J.* 18(19), 5264–5273.
- Bao, Y. and X. Shen (2007, May). SnapShot: Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* 129(3), 632.e1–632.e2.
- Barak, O., M. A. Lazzaro, W. S. Lane, D. W. Speicher, D. J. Picketts, and R. Shiekhattar (2003, November). Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *EMBO J* 22(22), 6089–6100.
- Baroncelli, L., C. Braschi, M. Spolidoro, T. Begenisic, A. Sale, and L. Maffei (2010, July). Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ.* 17(7), 1092–1103.
- Ben-Shachar, S., M. Chahrouh, C. Thaller, C. A. Shaw, and H. Y. Zoghbi (2009a, January). Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 18(13), 2431–2442.
- Ben-Shachar, S., M. Chahrouh, C. Thaller, C. A. Shaw, and H. Y. Zoghbi (2009b, January). Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 18(13), 2431–2442.
- Bestor, T. H. (2000, January). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9(16), 2395–2402.
- Bird, A. (2002, January). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16(1), 6–21.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993, January). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407), 31–39.
- Block, B. A., T. Imagawa, K. P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong (1988, December). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107(6 Pt 2), 2587–2600.
- Bowen, N. J., N. Fujita, M. Kajita, and P. A. Wade (2004, March). Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim. Biophys. Acta* 1677(1-3), 52–57.
- Bruno, A., J. Huang, D. A. Bennett, R. Marr, M. L. Hastings, and G. E. Stutzmann (2012, May). Altered Ryanodine Receptor Expression in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 33(5), 1001.e1–1001.e6.

- Burton, A. and M.-E. Torres-Padilla (2014, November). Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(11), 723–735.
- Chahrouh, M., S. Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S. T. C. Wong, J. Qin, and H. Y. Zoghbi (2008, May). MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science* 320(5880), 1224–1229.
- Chahrouh, M. and H. Y. Zoghbi (2007, November). The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron* 56(3), 422–437.
- Chandler, S. P., D. Guschin, N. Landsberger, and A. P. Wolffe (1999, June). The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* 38(22), 7008–7018.
- Chang, Q., G. Khare, V. Dani, S. Nelson, and R. Jaenisch (2006, February). The disease progression of MeCP2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49(3), 341–348.
- Chao, H.-T. and H. Y. Zoghbi (2009, March). The yin and yang of MeCP2 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(12), 4577–4578.
- Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, and K. J. Guegler (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20), e179.
- Chen, W. G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A. E. West, E. C. Griffith, R. Jaenisch, and M. E. Greenberg (2003, October). Derepression of BDNF Transcription Involves Calcium-Dependent Phosphorylation of MeCP2. *Science* 302(5646), 885–889.
- Cimadevilla, J., M. Mendez, M. Mendez-Lopez, and J. Arias (2007). Unilateral hippocampal blockade reveals that one hippocampus is sufficient for learning a passive avoidance task. *Journal of Neuroscience Research* 85(5), 1138–1142.
- Daury, L., C. Chailleux, J. Bonvallet, and D. Trouche (2006, January). Histone H3.3 deposition at E2f-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep.* 7(1), 66–71.
- Day, J. J. and J. D. Sweatt (2011, July). Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96(1), 2–12.
- De Filippis, B., A. Fabbri, D. Simone, R. Canese, L. Ricceri, F. Malchiodi-Albedi, G. Laviola, and C. Fiorentini (2012, April). Modulation of RhoGTPases improves the behavioral phenotype and reverses astrocytic deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Neuropsychopharmacology* 37(5), 1152–1163.
- De Filippis, B., D. Valenti, V. Chiodi, A. Ferrante, L. de Bari, C. Fiorentini, M. R. Domenici, L. Ricceri, R. A. Vacca, A. Fabbri, and G. Laviola (2015, June). Modulation of Rho GTPases

- rescues brain mitochondrial dysfunction, cognitive deficits and aberrant synaptic plasticity in female mice modeling Rett syndrome. *Eur Neuropsychopharmacol* 25(6), 889–901.
- Dhar, M., M. Zhu, S. Impey, T. J. Lambert, T. Bland, I. N. Karatsoreos, T. Nakazawa, S. M. Appleyard, and G. A. Wayman (2014, July). Leptin induces hippocampal synaptogenesis via CREB-regulated microRNA-132 suppression of p250gap. *Mol. Endocrinol.* 28(7), 1073–1087.
- Di Gennaro, E., F. Bruzzese, M. Caraglia, A. Abruzzese, and A. Budillon (2004, July). Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids* 26(4), 435–441.
- Doenecke, D., W. Albig, C. Bode, B. Drabent, K. Franke, K. Gavenis, and O. Witt (1997, January). Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochemistry* 107(1), 1–10.
- Drewell, R. A., C. J. Goddard, J. O. Thomas, and M. A. Surani (2002, March). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 30(5), 1139–1144.
- Duffy, S. N., K. J. Craddock, T. Abel, and P. V. Nguyen (2001, January). Environmental Enrichment Modifies the PKA-Dependence of Hippocampal LTP and Improves Hippocampus-Dependent Memory. *Learn. Mem.* 8(1), 26–34.
- Emptage, N., T. V. Bliss, and A. Fine (1999, January). Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22(1), 115–124.
- Endo, M. (2009, January). Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle. *Physiol Rev* 89(4), 1153–1176.
- Fabiato, A. (1983, July). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245(1), C1–14.
- Fatemi, M., A. Hermann, H. Gowher, and A. Jeltsch (2002). Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry* 269(20), 4981–4984.
- Feng, J., N. Shao, K. E. Szulwach, V. Vialou, J. Huynh, C. Zhong, T. Le, D. Ferguson, M. E. Cahill, Y. Li, J. W. Koo, E. Ribeiro, B. Labonte, B. M. Laitman, D. Estey, V. Stockman, P. Kennedy, T. Couroussé, I. Mensah, G. Turecki, K. F. Faull, G.-i. Ming, H. Song, G. Fan, P. Casaccia, L. Shen, P. Jin, and E. J. Nestler (2015, April). Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat. Neurosci.* 18(4), 536–544.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, X. Wang, M. Dobbin, and L.-H. Tsai (2007, May). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447(7141), 178–182.

- Free, A., R. I. D. Wakefield, B. O. Smith, D. T. F. Dryden, P. N. Barlow, and A. P. Bird (2001, February). DNA Recognition by the Methyl-CpG Binding Domain of MeCP2. *J. Biol. Chem.* 276(5), 3353–3360.
- Frey, U., M. Krug, K. G. Reymann, and H. Matthies (1988, June). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452(1-2), 57–65.
- Galeotti, N., A. Quattrone, E. Vivoli, M. Norcini, A. Bartolini, and C. Ghelardini (2008, May). Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes. *Learn. Mem.* 15(5), 315–323.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987, July). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196(2), 261–282.
- Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 74(1), 481–514.
- Grigoryan, G., E. Korkotian, and M. Segal (2012). Selective facilitation of LTP in the ventral hippocampus by calcium stores. *Hippocampus* 22(7), 1635–1644.
- Guillemette, B. and L. Gaudreau (2006, November). [H2a.Z: a histone variant that decorates gene promoters]. *Med Sci (Paris)* 22(11), 941–946.
- Guo, J. U., D. K. Ma, H. Mo, M. P. Ball, M.-H. Jang, M. A. Bonaguidi, J. A. Balazer, H. L. Eaves, B. Xie, E. Ford, K. Zhang, G.-l. Ming, Y. Gao, and H. Song (2011, October). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 14(10), 1345–1351.
- Guo, J. U., Y. Su, J. H. Shin, J. Shin, H. Li, B. Xie, C. Zhong, S. Hu, T. Le, G. Fan, H. Zhu, Q. Chang, Y. Gao, G.-l. Ming, and H. Song (2014, February). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 17(2), 215–222.
- Guy, J., J. Gan, J. Selfridge, S. Cobb, and A. Bird (2007, February). Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315(5815), 1143–1147.
- Guzman-Karlsson, M. C., J. P. Meadows, C. F. Gavin, J. J. Hablitz, and J. D. Sweatt (2014, May). Transcriptional and epigenetic regulation of Hebbian and non-Hebbian plasticity. *Neuropharmacology* 80, 3–17.
- Hakamata, Y., J. Nakai, H. Takeshima, and K. Imoto (1992, November). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 312(2-3), 229–235.
- Han, H., C. C. Cortez, X. Yang, P. W. Nichols, P. A. Jones, and G. Liang (2011, November). DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet* 20(22), 4299–4310.

- Hansen, J. C., J. K. Nyborg, K. Luger, and L. A. Stargell (2010, August). Histone Chaperones, Histone Acetylation, and the Fluidity of the Chromogenome. *J Cell Physiol* 224(2), 289–299.
- Hansen, K. F., K. Sakamoto, G. A. Wayman, S. Impey, and K. Obrietan (2010). Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS ONE* 5(11), e15497.
- Huang, Y. Y., P. V. Nguyen, T. Abel, and E. R. Kandel (1996, January). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn. Mem.* 3(2-3), 74–85.
- Huddleston, A. T., W. Tang, H. Takeshima, S. L. Hamilton, and E. Klann (2008, January). Superoxide-Induced Potentiation in the Hippocampus Requires Activation of Ryanodine Receptor Type 3 and ERK. *J Neurophysiol* 99(3), 1565–1571.
- Ickes, B. R., T. M. Pham, L. A. Sanders, D. S. Albeck, A. H. Mohammed, and A. C. Granholm (2000, July). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 164(1), 45–52.
- Impey, S., M. Davare, A. Lesiak, A. Lasiek, D. Fortin, H. Ando, O. Varlamova, K. Obrietan, T. R. Soderling, R. H. Goodman, and G. A. Wayman (2010, January). An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 43(1), 146–156.
- Jiang, Y., B. Langley, F. D. Lubin, W. Renthal, M. A. Wood, D. H. Yasui, A. Kumar, E. J. Nestler, S. Akbarian, and A. C. Beckel-Mitchener (2008, December). Epigenetics in the Nervous System. *J. Neurosci.* 28(46), 11753–11759.
- Jones, P. A. and D. Takai (2001, October). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science* 293(5532), 1068–1070.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A. P. Wolffe (1998, June). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19(2), 187–191.
- Jung, C. K. E. and J. Herms (2014, February). Structural Dynamics of Dendritic Spines are Influenced by an Environmental Enrichment: An In Vivo Imaging Study. *Cerebral Cortex* 24(2), 377–384.
- Kaludov, N. K. and A. P. Wolffe (2000, May). MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res.* 28(9), 1921–1928.
- Kangaspeska, S., B. Stride, R. Métivier, M. Polycarpou-Schwarz, D. Ibberson, R. P. Carmouche, V. Benes, F. Gannon, and G. Reid (2008, March). Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452(7183), 112–115.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, and F. H. Gage (1997, April). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624), 493–495.

- Kerr, B., P. A. Silva, K. Walz, and J. I. Young (2010a). Unconventional transcriptional response to environmental enrichment in a mouse model of Rett syndrome. *PLoS ONE* 5(7), e11534.
- Kerr, B., P. A. Silva, K. Walz, and J. I. Young (2010b, July). Unconventional Transcriptional Response to Environmental Enrichment in a Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 5(7), e11534.
- Kerr, B., J. Soto C, M. Saez, A. Abrams, K. Walz, and J. I. Young (2012, January). Transgenic complementation of MeCP2 deficiency: phenotypic rescue of *Mecp2*-null mice by isoform-specific transgenes. *Eur. J. Hum. Genet.* 20(1), 69–76.
- Klein, M. E., D. T. Lioy, L. Ma, S. Impey, G. Mandel, and R. H. Goodman (2007, December). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat. Neurosci.* 10(12), 1513–1514.
- Kobilo, T., Q.-R. Liu, K. Gandhi, M. Mughal, Y. Shaham, and H. van Praag (2011). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn. Mem.* 18(9), 605–609.
- Kouzu, Y., T. Moriya, H. Takeshima, T. Yoshioka, and S. Shibata (2000, March). Mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76(1), 142–150.
- Kron, M. and M. Müller (2010, November). Impaired hippocampal Ca²⁺ homeostasis and concomitant K⁺ channel dysfunction in a mouse model of Rett syndrome during anoxia. *Neuroscience* 171(1), 300–315.
- Kurokawa, K., K. Mizuno, M. Shibasaki, and S. Ohkuma (2011). Dopamine D(1) receptors participate in cocaine-induced place preference via regulation of ryanodine receptor expression. *J. Pharmacol. Sci.* 117(2), 87–97.
- Lai, F. A., H. P. Erickson, E. Rousseau, Q. Y. Liu, and G. Meissner (1988, January). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331(6154), 315–319.
- Leonhardt, H., A. W. Page, H.-U. Weier, and T. H. Bestor (1992, November). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71(5), 865–873.
- Lesiak, A., M. Zhu, H. Chen, S. M. Appleyard, S. Impey, P. J. Lein, and G. A. Wayman (2014, January). The Environmental Neurotoxicant PCB 95 Promotes Synaptogenesis via Ryanodine Receptor-Dependent miR132 Upregulation. *Journal of Neuroscience* 34(3), 717–725.
- Levenson, J. M., T. L. Roth, F. D. Lubin, C. A. Miller, I.-C. Huang, P. Desai, L. M. Malone, and J. D. Sweatt (2006, September). Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *J. Biol. Chem.* 281(23), 15763–15773.

- Li, C., S. Dong, H. Wang, and Y. Hu (2011, December). Microarray analysis of gene expression changes in the brains of NR2b-induced memory-enhanced mice. *Neuroscience* 197, 121–131.
- Li, H., X. Zhong, K. F. Chau, E. C. Williams, and Q. Chang (2011, August). Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory. *Nat. Neurosci.* 14(8), 1001–1008.
- Lin, X., L. Tirichine, and C. Bowler (2012, December). Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant Methods* 8, 48.
- Lisman, J., R. Yasuda, and S. Raghavachari (2012, March). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13(3), 169–182.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001, December). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402–408.
- Lonetti, G., A. Angelucci, L. Morando, E. M. Boggio, M. Giustetto, and T. Pizzorusso (2010, April). Early Environmental Enrichment Moderates the Behavioral and Synaptic Phenotype of MeCP2 Null Mice. *Biological Psychiatry* 67(7), 657–665.
- Luger, K., T. J. Rechsteiner, A. J. Flaus, M. M. Wayne, and T. J. Richmond (1997, September). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* 272(3), 301–311.
- Luikenhuis, S., E. Giacometti, C. F. Beard, and R. Jaenisch (2004, April). Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(16), 6033–6038.
- Lusser, A. and J. T. Kadonaga (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays* 25(12), 1192–1200.
- Mattei, M. G., G. Giannini, F. Moscatelli, and V. Sorrentino (1994, July). Chromosomal localization of murine ryanodine receptor genes RYR1, RYR2, and RYR3 by in situ hybridization. *Genomics* 22(1), 202–204.
- McAllister, A. K. (2000, October). Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb. Cortex* 10(10), 963–973.
- McPherson, P. S., Y. K. Kim, H. Valdivia, C. M. Knudson, H. Takekura, C. Franzini-Armstrong, R. Coronado, and K. P. Campbell (1991, July). The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7(1), 17–25.
- Meshi, D., M. R. Drew, M. Saxe, M. S. Ansorge, D. David, L. Santarelli, C. Malapani, H. Moore, and R. Hen (2006, June). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 9(6), 729–731.

- Métivier, R., R. Gallais, C. Tiffoche, C. Le Péron, R. Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibber-son, P. Barath, F. Demay, G. Reid, V. Benes, A. Jeltsch, F. Gannon, and G. Salbert (2008, March). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452(7183), 45–50.
- Miller, C. A., C. F. Gavin, J. A. White, R. R. Parrish, A. Honasoge, C. R. Yancey, I. M. Rivera, M. D. Rubio, G. Rumbaugh, and J. D. Sweatt (2010, June). Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* 13(6), 664–666.
- Mironov, S. L., E. Skorova, N. Hartelt, L. A. Mironova, M. T. Hasan, and S. Kügler (2009, January). Remodelling of the respiratory network in a mouse model of Rett syndrome depends on brain-derived neurotrophic factor regulated slow calcium buffering. *J Physiol* 587(11), 2473–2485.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin, and D. T. Brown (2000, December). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408(6814), 877–881.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W.-H. Wu, S. Sen, and C. Wu (2004, January). ATP-driven exchange of histone H2az variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303(5656), 343–348.
- Moretti, P., J. M. Levenson, F. Battaglia, R. Atkinson, R. Teague, B. Antalffy, D. Armstrong, O. Arancio, J. D. Sweatt, and H. Y. Zoghbi (2006, January). Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci.* 26(1), 319–327.
- Mori, F., M. Fukaya, H. Abe, K. Wakabayashi, and M. Watanabe (2000, May). Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* 285(1), 57–60.
- Morris, M. J. and L. M. Monteggia (2014, September). Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues Clin Neurosci* 16(3), 359–371.
- Myklebust, M. P., O. Bruland, Ø. Fluge, A. Skarstein, L. Balteskard, and O. Dahl (2011, November). MicroRNA-15b is induced with E2f-controlled genes in HPV-related cancer. *Br J Cancer* 105(11), 1719–1725.
- N, H. K., M. Z. Chow, E. K. Baker, S. Pal, S. Bassal, D. Brasacchio, L. Wang, J. M. Craig, P. L. Jones, S. Sif, and A. El-Osta (2005, March). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 37(3), 254–264.
- Nabavi, S., R. Fox, C. D. Proulx, J. Y. Lin, R. Y. Tsien, and R. Malinow (2014, July). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511(7509), 348–352.
- Naka, F., N. Narita, N. Okado, and M. Narita (2005, June). Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain and Development* 27(4), 275–278.

- Nan, X., R. R. Meehan, and A. Bird (1993, October). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* *21*(21), 4886–4892.
- Nan, X., H.-H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird (1998, May). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*(6683), 386–389.
- Nicoll, R. A. and K. W. Roche (2013, February). Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology*.
- Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006, September). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*(9), 697–709.
- Nithianantharajah, J., H. Levis, and M. Murphy (2004, May). Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* *81*(3), 200–210.
- Noutel, J., Y. K. Hong, B. Leu, E. Kang, and C. Chen (2011, April). Experience-dependent retinogeniculate synapse remodeling is abnormal in MeCP2-deficient mice. *Neuron* *70*(1), 35–42.
- Ohnuki, T. and Y. Nomura (1996, August). 1-[[[5-(4-Nitrophenyl)-2-furanyl]methylene]imino]-2,4-imidazolidinedione (dantrolene), an inhibitor of intracellular Ca²⁺ mobilization, impairs avoidance performance and spatial memory in mice. *Biol. Pharm. Bull.* *19*(8), 1038–1040.
- Ooi, S. K. and T. H. Bestor (2008, June). The Colorful History of Active DNA Demethylation. *Cell* *133*(7), 1145–1148.
- Orlowski, D. and C. R. Bjarkam (2012, July). A simple reproducible and time saving method of semi-automatic dendrite spine density estimation compared to manual spine counting. *Journal of Neuroscience Methods* *208*(2), 128–133.
- Otsu, K., H. F. Willard, V. K. Khanna, F. Zorzato, N. M. Green, and D. H. MacLennan (1990, August). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *265*(23), 13472–13483.
- Paul-Pletzer, K., T. Yamamoto, N. Ikemoto, L. S. Jimenez, H. Morimoto, P. G. Williams, J. Ma, and J. Parness (2005, May). Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem J* *387*(Pt 3), 905–909.
- Poo, M.-M., M. Pignatelli, T. J. Ryan, S. Tonegawa, T. Bonhoeffer, K. C. Martin, A. Rudenko, L.-H. Tsai, R. W. Tsien, G. Fishell, C. Mullins, J. T. Gonçalves, M. Shtrahman, S. T. Johnston, F. H. Gage, Y. Dan, J. Long, G. Buzsáki, and C. Stevens (2016, May). What is memory? The present state of the engram. *BMC Biol.* *14*, 40.
- Rampon, C., C. H. Jiang, H. Dong, Y. P. Tang, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, J. Z. Tsien, and Y. Hu (2000, November). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*(23), 12880–12884.

- Rasin, M. R., S. Darmopil, Z. Petanjek, T. Tomić-Mahečić, A. H. Mohammed, and N. Bogdanović (2011, January). Effect of environmental enrichment on morphology of deep layer III and layer V pyramidal cells of occipital cortex in oldest-old rat - A quantitative golgi cox study. *Coll Antropol 35 Suppl 1*, 253–258.
- Raymond, C. R. and S. J. Redman (2006, January). Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J Physiol 570*(1), 97–111.
- Rios, E. and G. Brum (1987, February). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature 325*(6106), 717–720.
- Rollins, R. A., F. Haghighi, J. R. Edwards, R. Das, M. Q. Zhang, J. Ju, and T. H. Bestor (2006, January). Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res. 16*(2), 157–163.
- Sacktor, T. C., P. Osten, H. Valsamis, X. Jiang, M. U. Naik, and E. Sublette (1993, September). Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90*(18), 8342–8346.
- Schafer, M. J., I. Dolgalev, M. J. Alldred, A. Heguy, and S. D. Ginsberg (2015). Calorie Restriction Suppresses Age-Dependent Hippocampal Transcriptional Signatures. *PLoS ONE 10*(7), e0133923.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc 3*(6), 1101–1108.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, and Y. Shi (2004, December). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell 119*(7), 941–953.
- Sugino, K., C. M. Hempel, B. W. Okaty, H. A. Arnson, S. Kato, V. S. Dani, and S. B. Nelson (2014, September). Cell-Type-Specific Repression by Methyl-CpG-Binding Protein 2 Is Biased toward Long Genes. *J Neurosci 34*(38), 12877–12883.
- Sui, L., Y. Wang, L.-H. Ju, and M. Chen (2012, May). Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory 97*(4), 425–440.
- Sun, Y. E. and H. Wu (2006, February). The ups and downs of BDNF in Rett syndrome. *Neuron 49*(3), 321–323.
- Takeshima, H., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, and T. Hirose (1989, June). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature 339*(6224), 439–445.
- Tang, Y. P., H. Wang, R. Feng, M. Kyin, and J. Z. Tsien (2001, November). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2b transgenic mice. *Neuropharmacology 41*(6), 779–790.

- Tao, J., K. Hu, Q. Chang, H. Wu, N. E. Sherman, K. Martinowich, R. J. Klose, C. Schanen, R. Jaenisch, W. Wang, and Y. E. Sun (2009, March). Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12), 4882–4887.
- Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg (1998, April). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20(4), 709–726.
- Thoma, F., T. Koller, and A. Klug (1979, November). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83(2 Pt 1), 403–427.
- Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, and H. Persson (1993, March). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10(3), 475–489.
- Tognini, P. and T. Pizzorusso (2012, January). MicroRNA212/132 family: molecular transducer of neuronal function and plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44(1), 6–10.
- Torres-Andrade, R., R. Moldenhauer, N. Gutierrez-Bertin, J. Soto-Covasich, C. Mancilla-Medina, C. Ehrenfeld, and B. Kerr (2014, September). The increase in body weight induced by lack of methyl CpG binding protein-2 is associated with altered leptin signalling in the hypothalamus. *Exp. Physiol.* 99(9), 1229–1240.
- Tropea, D., N. Mortimer, S. Bellini, I. Molinos, A. Sanfeliu, S. Shovlin, D. McAllister, M. Gill, K. Mitchell, and A. Corvin (2016, May). Expression of nuclear Methyl-CpG binding protein 2 (Mecp2) is dependent on neuronal stimulation and application of Insulin-like growth factor 1. *Neurosci. Lett.* 621, 111–116.
- Turner, B. M. (2005, February). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(2), 110–112.
- Turner, C. A., M. H. Lewis, and M. A. King (2003, July). Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and dendritic morphology. *Dev Psychobiol* 43(1), 20–27.
- Tycko, B. (2010, October). Allele-specific DNA methylation: beyond imprinting. *Hum Mol Genet* 19(R2), R210–R220.
- Urduingio, R. G., L. Lopez-Serra, P. Lopez-Nieva, M. Alaminos, R. Diaz-Uriarte, A. F. Fernandez, and M. Esteller (2008, November). Mecp2-Null Mice Provide New Neuronal Targets for Rett Syndrome. *PLoS ONE* 3(11), e3669.
- van Praag, H., G. Kempermann, and F. H. Gage (2000, December). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1(3), 191–198.

- Wang, Y., J. Wu, M. J. Rowan, and R. Anwyl (1996, September). Ryanodine produces a low frequency stimulation-induced NMDA receptor-independent long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *J Physiol* 495(Pt 3), 755–767.
- Wayman, G. A., M. Davare, H. Ando, D. Fortin, O. Varlamova, H.-Y. M. Cheng, D. Marks, K. Obrietan, T. R. Soderling, R. H. Goodman, and S. Impey (2008, July). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250gap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(26), 9093–9098.
- Weng, S. M., F. McLeod, M. E. S. Bailey, and S. R. Cobb (2011, April). Synaptic plasticity deficits in an experimental model of rett syndrome: long-term potentiation saturation and its pharmacological reversal. *Neuroscience* 180, 314–321.
- Whitlock, J. R., A. J. Heynen, M. G. Shuler, and M. F. Bear (2006, August). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790), 1093–1097.
- Williams, B. M., Y. Luo, C. Ward, K. Redd, R. Gibson, S. A. Kuczaj, and J. G. McCoy (2001, July). Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol. Behav.* 73(4), 649–658.
- Xu, G. L., T. H. Bestor, D. Bourc'his, C. L. Hsieh, N. Tommerup, M. Bugge, M. Hulten, X. Qu, J. J. Russo, and E. Viegas-Péquignot (1999, November). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402(6758), 187–191.
- Yu, F., J. Thiesen, and W. H. Strätling (2000, May). Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res.* 28(10), 2201–2206.
- Zhang, Y., H.-H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg (1999, January). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13(15), 1924–1935.
- Zhao, N., D. Ma, W. Y. Leong, J. Han, A. VanDongen, T. Chen, and E. L. K. Goh (2015). The methyl-CpG-binding domain (MBD) is crucial for MeCP2's dysfunction-induced defects in adult newborn neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 158.
- Zhao, Y.-T., D. Goffin, B. S. Johnson, and Z. Zhou (2013, November). Loss of MeCP2 function is associated with distinct gene expression changes in the striatum. *Neurobiol. Dis.* 59, 257–266.
- Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, W.-n. Zhao, H.-y. H. Ho, L. Schmidt, W. G. Chen, Y. Lin, E. Savner, E. C. Griffith, L. Hu, J. A. Steen, C. J. Weitz, and M. E. Greenberg (2006, October). Brain-Specific Phosphorylation of MeCP2 Regulates Activity-Dependent Bdnf Transcription, Dendritic Growth, and Spine Maturation. *Neuron* 52(2), 255–269.
- Ziviani, E., G. Lippi, D. Bano, E. Munarriz, S. Guiducci, M. Zoli, K. W. Young, and P. Nicotera (2011, January). Ryanodine receptor-2 upregulation and nicotine-mediated plasticity. *EMBO J* 30(1), 194–204.

Zoghbi, H. Y. (2003, October). Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse?
Science 302(5646), 826-830.