

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



“Expresión de un inhibidor endógeno de CaMKII luego de la inducción de potenciación a largo plazo en el hipocampo de rata”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Por

DANIELA ANDREA ASTUDILLO MAYA

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Directora Seminario de título

Dra. Verónica Palma Alvarado
Co-Directora Seminario de Título

Octubre, 2016. Santiago de Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

DANIELA ANDREA ASTUDILLO MAYA

“Expresión de un inhibidor endógeno de CaMKII luego de la inducción de potenciación a largo plazo en el hipocampo de rata.”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Directora Seminario de Título

Dra. Verónica Palma Alvarado
Co-Directora Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Julio Alcayaga Urbina
Presidente Comisión

Dr. Marco Tulio Núñez González
Evaluador

Santiago de Chile, octubre de 2017.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar este trabajo a mis queridos padres, que han hecho un enorme sacrificio económico y emocional para que yo pudiera estudiar lo que me apasiona.

Papá y mamá, de ustedes estaré eternamente agradecida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi directora de seminario, Dra. Magdalena Sanhueza, y a mi co-directora, Dra. Verónica Palma por guiarme en el transcurso de este seminario, y otorgarme todas las facilidades y recursos que se necesitaron para terminarlo de la mejor manera posible.

Agradecer a los miembros del Laboratorio de Fisiología Celular por ayudarme a resolver dudas y por entregarme críticas constructivas que robustecieron mi trabajo. Agradecer especialmente a Daniel Karmelic, que me apoyó en el análisis estadístico y discusión de resultados, y a Pablo Vergara que me ayudo en el análisis que requería programación.

Agradecer a mis amigos por todo el apoyo emocional que me han dado, por las risas para aliviar el estrés y, en definitiva, por la sincera amistad que me han entregado todos estos años.

Finalmente, agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han dado durante mis años de estudio. Gracias a su sacrificio, pude estudiar lo que más quería, y pude terminar con éxito uno de los tantos desafíos que me depara la vida.

1. ÍNDICE:

1.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS:

1. ÍNDICE	iv
1.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
1.2 ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
1.3 ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
1.4 LISTA DE ABREVIATURAS	viii
2. RESUMEN.....	1
3. ABSTRACT	3
4. INTRODUCCIÓN.....	5
4.1 CaMKII, plasticidad sináptica y memoria	5
4.2 CaMK2N, proteína reguladora de CaMKII en el cerebro.....	7
4.3 Hipótesis de trabajo	9
4.4 Objetivo General.....	9
4.5 Objetivos específicos.....	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
5.1 Animales.....	10
5.2 Preparación de rebanadas hipocampales.....	10
5.3 Registros electrofisiológicos	11
5.4 Análisis de registros electrofisiológicos.....	12
5.5 Transcripción reversa y PCR cuantitativo (qPCR)	13

5.6	Análisis de la expresión génica.....	14
5.7	Análisis de correlación.....	15
6.	RESULTADOS	16
6.1	Inducción de potenciación a largo plazo en rebanadas agudas de hipocampo..	16
6.2	Expresión de <i>Camk2n1</i> y <i>Camk2n2</i> luego de inducir LTP en el hipocampo ..	18
6.3	Correlación entre la magnitud de la LTP y el aumento en la expresión de <i>Camk2n1</i>	21
7.	DISCUSIÓN.....	23
8.	CONCLUSIONES.....	29
9.	REFERENCIAS	30
10.	ANEXO	35

1.2 ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla I. Partidores utilizados para PCR cuantitativo.	13
Tabla II. Parámetros obtenidos de las curvas de estandarización para cada gen.....	14
Tabla III. Valores de potenciación y expresión de <i>Camk2n1</i> en cada rebanada.	21

1.3 ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo por estimulación a alta frecuencia.....	17
Figura 2. <i>Camk2n1</i> es regulado positivamente luego de inducir LTP en la región CA1 del hipocampo.	18
Figura 3. La expresión de <i>Camk2n2</i> no es alterada luego de inducir LTP en la región CA1 del hipocampo.	19
Figura 4. Expresión relativa promedio de <i>Camk2n1</i> , <i>Camk2n2</i> y <i>Camk2a</i> en rebanadas potenciadas.	20
Figura 5. Existe una fuerte correlación entre el aumento en la expresión de <i>Camk2n1</i> y la magnitud de la potenciación.....	22
Figura S1. Medición de la pendiente del fEPSP.....	35
Figura S2. Partidores utilizados amplifican específicamente un producto PCR.....	36

1.4 LISTA DE ABREVIATURAS:

AMPAR: Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

CaMK2N1 (o CaMKIIN α): Inhibidor 1 (o alfa) de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II.

CaMK2N2 (o CaMKIIN β): Inhibidor 2 (o beta) de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II.

CaMKII: proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II.

fEPSP: Potencial postsináptico excitatorio de campo.

HFS: Estimulación a alta frecuencia.

LCRA: Líquido céfalo raquídeo artificial.

LTD: Depresión a largo plazo.

LTP: Potenciación a largo plazo.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

NMDAR: Receptor de ácido N-metil-D-aspartico.

PSD: Densidad postsináptica.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa.

2. RESUMEN:

La proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CaMKII) es una molécula de señalización sináptica que se expresa abundantemente en el cerebro y que juega un rol crítico en la formación de memorias y la inducción de eventos de plasticidad sináptica. La activación y autofosforilación en el sitio T286 de CaMKII son requeridas para inducir potenciación a largo plazo (LTP), fenómeno de plasticidad sináptica considerado modelo celular que subyace el aprendizaje. Las sinapsis glutamatérgicas de la región CA1 del hipocampo expresan un tipo de LTP que es dependiente del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR). Luego de inducir LTP, CaMKII autofosforilada es enriquecida en la densidad postsináptica (PSD), en donde (i) gatilla una cascada de señalización que finaliza con el aumento a largo plazo de la corriente mediada por los receptores de tipo AMPA (AMPA) y (ii) forma un complejo con la subunidad GluN2B del NMDAR. Mutaciones que previenen la autofosforilación de CaMKII o que interrumpen la asociación del complejo GluN2B-CaMKII causan un déficit en la inducción de la LTP y severos defectos en el aprendizaje. Debido a que CaMKII adquiere una actividad independiente de Ca^{2+} mediante su autofosforilación o su unión a la subunidad GluN2B, es esperable que su actividad quinasa sea adecuadamente regulada. Esta regulación podría llevarse a cabo a través de cambios en la expresión de dos inhibidores endógenos y específicos de CaMKII: CaMK2N1 y CaMK2N2 (también denominados CaMKIIN α y CaMKIIN β , respectivamente). Estudios han revelado que CaMK2N1 aumenta transitoriamente su expresión en el hipocampo y en la amígdala luego del condicionamiento al miedo en ratones, sugiriendo un rol en controlar la actividad de CaMKII desde estadios tempranos de la consolidación de la memoria. Adicionalmente, estudios recientes han mostrado que la aplicación transitoria de péptidos inhibitorios

derivados de CaMK2N a rebanadas agudas de hipocampo interrumpe la interacción basal entre CaMKII y GluN2B y causa una depresión sináptica tanto en sinapsis naïve como en sinapsis previamente potenciadas, lo cual revierte la saturación de la LTP. Sin embargo, hasta el momento no existe evidencia que la expresión de CaMK2N sea regulada luego de inducir LTP en el hipocampo, así como ocurre luego del aprendizaje. En este estudio, se investigó si la expresión a nivel de mRNA de CaMK2N1 y CaMK2N2 es regulada luego de la inducción de LTP por estimulación a alta frecuencia (HFS) en la región CA1 de rebanadas agudas de hipocampo de rata. Experimentos de PCR cuantitativo (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) revelaron que *Camk2n1* aumenta su expresión 60 minutos después de inducir LTP. En contraste, la expresión de *Camk2n2* no cambió. Además, se encontró una correlación positiva entre la magnitud de la potenciación y el cambio en la expresión de *Camk2n1*. Estos resultados, en conjunto con los hallazgos anteriores, sugieren que el aumento en la expresión de *Camk2n1* luego de la inducción de LTP podría ser parte de un mecanismo de regulación que facilite la subsecuente inducción de eventos de plasticidad sináptica, una vez que los niveles basales de expresión del inhibidor se reestablecen.

3. **ABSTRACT:**

Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is an abundant synaptic signaling molecule that plays a critical role in memory formation and induction of synaptic potentiation. CaMKII activation and autophosphorylation at T286 are required to induce long-term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity considered a cellular model underlying learning. CA1 hippocampal synapses expresses a type of LTP dependent on the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR). After LTP induction, autophosphorylated CaMKII becomes enriched at postsynaptic densities, where it (i) triggers a biochemical cascade that produces a long-lasting increase of AMPA receptor (AMPA) mediated currents and (ii) binds to the NMDAR GluN2B subunits. Mutations that prevent CaMKII autophosphorylation or disrupt the CaMKII-GluN2B complex cause a deficit in LTP induction and severe learning defects. Since CaMKII can be autonomously active by autophosphorylation or NMDAR binding, and considering its role in LTP induction and memory formation, it is expected that the kinase activity should be tightly regulated. This regulation may involve changes in the expression of two endogenous CaMKII-specific inhibitors: CaMK2N1 and CaMK2N2 (also named CaMKIIN α and CaMKIIN β , respectively). Studies have revealed that CaMK2N1 transiently increases its expression in the rodent hippocampus and amygdala after fear conditioning, suggesting a role in controlling CaMKII activity in early stages of memory consolidation. Additionally, previous studies showed that transient application of CaMK2N-derived peptides to acute hippocampal slices disrupts the basal interaction between CaMKII-GluN2B and causes long-lasting synaptic depression in both naïve synapses and in previously potentiated synapses in which it reverses LTP saturation. However, it is not clear if CaMK2N expression is regulated after induction of LTP, as same as after fear conditioning. Here,

we investigated whether CaMK2N1 and CaMK2N2 gene expression is regulated after the induction of LTP in CA1 region of acute rat hippocampal slices. Real-time PCR experiments revealed that CaMK2N1 mRNA expression was up-regulated 60 min after LTP induction. In contrast, CaMK2N2 mRNA expression did not change. Additionally, correlation analysis showed a positive correlation between the LTP magnitude and *Camk2n1* expression increase. These results, overall with the previous findings, suggest that the up-regulation of CaMK2N1 after LTP induction could be part of a regulation mechanism that facilitates the induction of subsequent synaptic plasticity events once basal expression levels are re-established.

4. INTRODUCCIÓN:

El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen la formación de memorias es esencial para entender cómo éstas son adquiridas y consolidadas, y para desarrollar posibles estrategias para tratar enfermedades ligadas a defectos en la memoria. Un elemento molecular clave en la formación de memorias es la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) (Irvine y cols., 2006), la cual se expresa abundantemente en el cerebro, en donde constituye el 1-2% del total de proteínas (revisado en Lisman y cols., 2002). La unión de Ca^{2+} /calmodulina a la región regulatoria de CaMKII induce un cambio conformacional que expone el dominio catalítico de la enzima, permitiendo así la fosforilación de sustratos y la trans-fosforilación de sus subunidades en el sitio T286 (autofosforilación), lo que le otorga una actividad parcialmente independiente de calcio (Hanson y cols., 1989). Esta actividad puede ser mantenida incluso cuando la señal inicial decae a niveles basales (hasta ser desfosforilada por fosfatasas), lo que posiciona a CaMKII como una enzima con propiedades de “molécula de memoria”.

4.1 CaMKII, plasticidad sináptica y memoria:

CaMKII es una serina/treonina quinasa compuesta por 12 subunidades, cada una de las cuales presenta un dominio catalítico, regulatorio y de asociación (Kolodziej y cols., 2000) . En el cerebro de mamíferos se conocen cuatro isoformas de CaMKII: α -, β -, γ - y δ -CaMKII, siendo las isoformas α y β expresadas mayormente en el cerebro, y las isoformas γ y δ expresadas de forma ubicua. En el cerebro de roedores, la holoenzima se constituye principalmente de homómeros de α CaMKII y heterómeros α CaMKII- β CaMKII (para una revisión ver Lisman y cols., 2012). El rol de α CaMKII en eventos de plasticidad sináptica ha sido extensamente estudiado en sinapsis glutamatérgicas entre

la región CA3 y CA1 del hipocampo (para una revisión ver Lucchesi y cols., 2011). La autofosforilación en el sitio T286 de α CaMKII es esencial para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *Long Term Potentiation*) dependiente del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Giese y cols., 1998). Ratones *knock-out* para α CaMKII presentan un déficit en la inducción de la LTP y en tareas relacionadas con la memoria espacial (Silva y cols., 1992). Coherente con dichos resultados, ratones con una mutación en el sitio T286, además de carecer de LTP, presentan severos defectos en algunas formas de aprendizaje (Giese y cols., 1998). La LTP es un fenómeno de plasticidad sináptica que se puede definir como el aumento a largo plazo de la eficiencia de la transmisión sináptica entre un elemento presináptico y uno postsináptico, producto de la actividad coordinada y repetitiva entre ambos (revisado en Cooke & Bliss, 2006). La LTP es gatillada por la entrada de calcio a la célula postsináptica a través de los NMDARs. Este aumento de calcio en la espina dendrítica gatilla la activación de CaMKII a través de la unión de Ca^{2+} /Calmodulina, lo cual puede conducir a la autofosforilación de la enzima y la relocalización hacia las densidades postsinápticas (PSD) (Strack y cols., 1997), en donde induce el aumento a largo plazo de la corriente mediada por los AMPARs (Derkach y cols., 1999; revisado en Soderling & Derkach, 2000) y en donde se une a las subunidades GluN2B del NMDAR (Strack & Colbran, 1998; Bayer y cols., 2001). La interrupción del complejo CaMKII-GluN2B también inhibe la inducción de la LTP y altera el aprendizaje (Barria & Malinow, 2005; Zhou y cols., 2007). Las tres características descritas de la LTP: i) cooperatividad, ii) asociatividad y especificidad de aferencias y iii) duración han sido identificadas como argumentos sólidos que respaldan la hipótesis de que este fenómeno de plasticidad sináptica puede constituir el sustrato biológico de ciertos tipos de memoria (Lynch y cols., 2004). Whitlock y cols., (2006) demostraron que tras el aprendizaje dependiente de hipocampo se inducía LTP en las

sinapsis entre las regiones CA3 y CA1, la cual era ocluida por la LTP inducida por estimulación a alta frecuencia. Además, recientemente se demostró que una memoria de miedo puede ser activada o desactivada con la inducción de LTP y LTD (depresión a largo plazo, del inglés *Long Term Depression*), respectivamente (Nabavi y cols., 2014). En conjunto estos estudios evidencian la importancia de CaMKII en eventos de plasticidad sináptica, que a su vez se han propuesto como modelos celulares que subyacen el aprendizaje y la formación de memorias. Como CaMKII puede autofosforilarse y desplegar así una actividad parcialmente independiente de calcio, y porque es requerida para la inducción de LTP y la formación de ciertos tipos de memoria, es de esperar que la actividad quinasa y su localización en la PSD sea adecuadamente regulada. Esta actividad y su consecuente término para una posterior activación de la enzima, podría estar regulada por cambios en la expresión de dos proteínas endógenas que inhiben específicamente a CaMKII: CaMK2N1 y CaMK2N2 (Lucchesi y cols., 2011).

4.2 CaMK2N, proteína reguladora de CaMKII en el cerebro:

CaMK2N es una proteína que se expresa endógenamente en el cerebro y que inhibe específicamente la actividad de CaMKII, uniéndose a su sitio T (el mismo al cual se une la subunidad GluN2B del NMDAR). Hasta la fecha se han identificado dos isoformas del inhibidor, CaMK2N1 (Chang y cols., 2001) y CaMK2N2 (Chang y cols., 1998) (también denominadas CaMKIIN α y CaMKIIN β , respectivamente), las cuales presentan una distribución amplia, pero no idéntica en el cerebro (Chang y cols., 2001). Lopicard y cols. (2006) reportaron que el mRNA de CaMK2N1 aumenta de forma transitoria a los 30 min y a los 60 min luego del aprendizaje, asemejándose a lo que ocurre con la regulación de los genes inmediatamente tempranos (que se activan rápida y transitoriamente en respuesta a un estímulo), como *c-Fos*, *zif268* y *Arc/Arg3.1* (Guzowski, 2002). Este

aumento en la expresión del mRNA se observó en el área hipocampal CA1, giro dentado y la amígdala lateral, regiones implicadas en la formación de memorias de miedo. Posteriormente, Radwanska y cols. (2010) evidenciaron a través de análisis por *western blot* que CaMK2N2 aumenta rápida y transitoriamente su expresión en el hipocampo luego de exponer animales a condicionamiento del miedo por claves espaciales y a un contexto nuevo, mientras que en la amígdala sólo tras el condicionamiento. En conjunto, estas evidencias sugieren que CaMK2N podría tener un rol fisiológico controlando la actividad de CaMKII desde estadios tempranos de la consolidación de la memoria. Sanhueza y cols. (2011) realizaron estudios en que aplicaron transitoriamente péptidos CN (derivados de CaMK2N) a rebanadas agudas de hipocampo de rata y observaron que CaMK2N interrumpe la interacción basal entre CaMKII-GluN2B y causa una depresión sináptica de larga duración tanto en sinapsis previamente potenciadas como en sinapsis naïve. Además, esta aplicación revierte la saturación de la LTP, es decir, permite su posterior reinducción en sinapsis en que se había inducido una LTP saturante. Estos resultados sugieren que CaMKIIN puede estar regulando la actividad sináptica a través de la inhibición de la actividad independiente de Ca^{2+} de CaMKII y/o la interrupción de la asociación CaMKII-NMDAR. El efecto de esta regulación sobre los eventos de plasticidad dependería de si el aumento en la expresión de CaMK2N es crónico o transitorio. Los resultados obtenidos por Sanhueza y cols. (2007; 2011) sugieren que el aumento transitorio de CaMK2N, similar a lo que ocurre luego del aprendizaje (Lepicard y cols., 2006; Radwanska y cols. 2010), facilitaría la inducción de LTP luego de que el inhibidor retorne a sus niveles basales de expresión. Hasta ahora, sin embargo, no hay estudios que evidencien si CaMK2N aumenta su expresión luego de la inducción de LTP.

4.3 Hipótesis de trabajo:

La expresión de *Camk2n1* y/o de *Camk2n2* es regulada positivamente luego de inducir LTP en la región CA1 del hipocampo de rata.

4.4 Objetivo General:

Determinar si existe una regulación de la expresión de *Camk2n1* y/o de *Camk2n2* luego de inducir LTP en la región CA1 de rebanadas agudas de hipocampo.

4.5 Objetivos específicos:

1. Inducir LTP en las sinapsis entre CA3 y CA1 mediante estimulación a alta frecuencia (HFS), empleando técnicas de registro extracelular.
2. Cuantificar la expresión de *Camk2n1* y *Camk2n2*, mediante PCR cuantitativo, 60 minutos luego de la inducción de LTP

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 Animales:

Seis ratas Sprague-Dawley de entre 18-22 días de edad fueron anestesiadas con isofluorano (Forene®) y posteriormente decapitadas para extraerles el cerebro, todo realizado acorde a las normas establecidas por la comisión de bioética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

5.2 Preparación de rebanadas hipocampales:

Las rebanadas agudas de hipocampo se prepararon acorde a lo anteriormente publicado por Sanhueza y cols. (2011). El cerebro extraído se disecó en presencia de una solución de disección fría (parcialmente hielo) de la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 10 MgCl₂, 2.6 KCl, 1.23 NaH₂PO₄*H₂O, 0.5 CaCl₂. Utilizando un vibrátomo (1000 plus Vibratome Sectioning System), se cortaron rebanadas transversales de hipocampo dorsal de 400 µm de grosor y se transfirieron inmediatamente a una cámara de inmersión que contenía una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) de la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 2.6 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 NaH₂PO₄*H₂O, burbujeada constantemente con carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂). Un total de 10 rebanadas se obtuvieron (5 de cada hemisferio) por cada animal. Las rebanadas se dejaron recuperar en la cámara de inmersión durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente (22-25°C) antes de realizar los registros extracelulares. Las rebanadas se iban registrando en orden, desde la primera rebanada cortada hasta la última, hasta encontrar una cuyo registro basal fuera estable.

5.3 Registros electrofisiológicos:

Las rebanadas de hipocampo (una por cada experimento) fueron puestas en una cámara de registro montada en una lupa Leitz Wetzlar y por donde recirculaba LCRA (2-3 mL/min) burbujeado constantemente con carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂). Un total de 250 mL de LCRA fue recirculado en cada experimento utilizando una bomba de dos vías. La temperatura durante todo el registro se mantuvo a 31±1°C, utilizando un dispositivo ThermoClamp™-1 (AutoMate Scientific) para controlar la temperatura. Una vez puestas en la cámara de registro, las rebanadas se mantuvieron durante 10-15 minutos sin estimulación para aclimatarlas a la temperatura de registro. Los registros de potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP, del inglés *field excitatory postsynaptic potential*) fueron obtenidos utilizando un electrodo de registro con pipeta de vidrio borosilicato (0.5-1.0 MΩ) llena de LCRA, posicionado en *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo. Los colaterales de Schaffer fueron estimulados con un electrodo de estimulación monopolar con pipeta de vidrio borosilicato (0.5-1.0 MΩ) llena de LCRA posicionado a 150-200 μm del electrodo de registro. Como control de la potenciación, se estimuló un segundo haz de colaterales de Schaffer usando un electrodo de estimulación de las mismas características anteriores. Para comprobar que ambas vías de estimulación eran independientes, se utilizó un protocolo de pulsos pareados de tal manera que un primer pulso se aplicó en una vía y 50 ms después se aplicó un segundo pulso en la otra vía. Si no se observaba facilitación de la respuesta al aplicar el segundo pulso, se determinaba que ambas vías eran independientes. Los estímulos eléctricos (pulsos cuadrados de 0.15 ms de duración) fueron aplicados cada 20 s y la respuesta a dichos estímulos fue registrada a una frecuencia de 10 kHz usando el programa Igor Pro 6.37 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Para fijar la intensidad de estimulación, se registró una curva de entrada y salida aplicando estímulos de intensidad creciente (entre

los 20 μ A y 200 μ A, aumentando en pasos de 5 ó 10 μ A) hasta que la señal se saturaba o hasta que se generaban *pop spikes* (disparo sincronizado de una población de neuronas). La intensidad de estimulación fijada durante todo el experimento era aquella que generaba una amplitud del fEPSP correspondiente a un 50% de la amplitud máxima. Antes de inducir LTP, se registró una respuesta basal estable estimulando alternadamente vía control y vía experimental durante 15 minutos. La LTP se indujo en una de las vías aplicando un protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS, del inglés *high frequency stimulation*): consistente en cuatro trenes de estimulación, separados por 20 s (un tren: 100 estímulos a 100 Hz durante 1 s). Finalmente, se registró la respuesta post-inducción de LTP estimulando alternadamente ambas vías durante 60 minutos. Como control de la expresión génica, se utilizaron rebanadas control de cada animal utilizado. Las rebanadas control se sometieron al mismo tratamiento electrofisiológico, pero en lugar de aplicar el protocolo de inducción de LTP, las respuestas basales se registraron durante 60 minutos estimulando solo una vía sináptica. Al terminar los registros, cada rebanada fue inmediatamente homogeneizada en 800 μ L de TRIsure (Bioline) (mezcla tiocianato-fenol) y guardada a -80°C para posterior extracción de RNA.

5.4 Análisis de registros electrofisiológicos:

La estimulación, la adquisición de datos y su posterior análisis se realizaron con el programa Igor Pro 6.37 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) junto con la extensión NeuroMatic (v2.001). La pendiente del fEPSP se midió como se muestra en la Figura S1 del ANEXO, considerando un rango de 0.5-1.0 ms desde el inicio de la pendiente hasta su punto más negativo. Para cada vía de estimulación, se consideró el mismo rango de medición antes y después de inducir LTP. Las pendientes calculadas a lo largo de todo el registro fueron normalizadas respecto a la pendiente promedio obtenida a partir de los

15 minutos de registro basal (antes de inducir LTP). Para este estudio, solo se consideraron aquellas rebanadas con un registro basal estable (coeficiente de variación < 0.1) y una potenciación sobre el 30%. Los resultados fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 7 (n=6).

5.5 Transcripción reversa y PCR cuantitativo (qPCR):

El RNA total fue extraído de las rebanadas homogeneizadas previamente con TRIsure (Bioline) de acuerdo con el protocolo detallado por el fabricante. El RNA obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro (Maestro NANO) y su integridad fue determinada en un gel de agarosa 1% corrido en solución tampón TAE 1X durante 30 minutos a 100 V. Para cada muestra, 1 µg de RNA fue tratado con DNAsa I (Promega) para eliminar el DNA genómico. El RNA tratado con DNAsa fue transcrito reversamente a cDNA utilizando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) de acuerdo con el protocolo detallado por el fabricante. El cDNA obtenido (20 µL) fue diluido 1:2 y almacenado a -20°C. Para determinar los niveles de expresión de *Gapdh* (gen de referencia), *Camk2n1*, *Camk2n2* y *Camk2a* por medio de qPCR, se construyeron partidores específicos que abarcaran al menos una unión exón-exón utilizando la herramienta Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Tabla I).

Tabla I. Partidores utilizados para PCR cuantitativo.

Gen	Código de acceso	Partidor forward 5'-3'	Partidor reverse 5'-3'	Tamaño producto bp
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	CGATACGGCCAAATCCGTTC	108
<i>Camk2n1</i>	NM_173337.1	GCAAGCGCGTTGTTATTGAAG	TTCCAAAGTGCTTTCTCCTCCT	178
<i>Camk2n2</i>	NM_021678.1	CGCCATGTCCGAGATCCTAC	TCGATCACCCTCTCTTGGC	183
<i>Camk2a</i>	NM_012920.1	CTAAAGCCTCGCCTGCCTG	AAGGCTCCCTTTCCCAGTTC	102

Para determinar la especificidad de los partidores, se analizaron las curvas de disociación de los productos PCR y luego se resolvió cada amplicón en un gel de agarosa 2% corrido en buffer TAE 1X (Figura S2 del ANEXO). Se utilizaron siete diluciones en serie (1:10) de cada producto PCR para generar una curva de estandarización y determinar la concentración final de los partidores a utilizar (Tabla II). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el sistema Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) usando SYBR® Green como marcador fluorescente. Cada muestra se preparó en duplicados de 20 µL: 4 µL de cDNA, 0.5 ó 1 µL de 10 µM de cada partidor, 10 µL de 2X Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix y 5 ó 4 µL de agua DEPC. La amplificación se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60 °C por 15 s y 72°C por 15 s. Los valores de C_t fueron adquiridos usando el programa MxPro QPCR.

Tabla II. Parámetros obtenidos de las curvas de estandarización para cada gen.

Gen	R ²	Pendiente	Eficiencia (%)	Concentración final (nM)
<i>Gapdh</i>	0.999	-3.530	92.0	500
<i>Camk2n1</i>	0.997	-3.375	97.8	250
<i>Camk2n2</i>	0.997	-3.439	95.3	500
<i>Camk2a</i>	0.997	-3.271	102.2	250

5.6 Análisis de la expresión génica:

Los datos de C_t obtenidos fueron exportados a una plantilla de Microsoft Excel® y fueron analizados con el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) (ecuación 1), el cual considera la eficiencia específica de cada par de partidores (Tabla II).

$$Expresión\ relativa = \left(\frac{E_{ref}^{Ct_{muestra}}}{E_{blanco}^{Ct_{muestra}}} \right) \div \left(\frac{E_{ref}^{Ct_{calibrador}}}{E_{blanco}^{Ct_{calibrador}}} \right) \quad (1)$$

La ecuación 1 muestra el modelo matemático utilizado para calcular la expresión de los genes estudiados (blanco) relativa a la expresión de *Gapdh* (ref) en rebanadas potenciadas (muestra) y en rebanadas control (calibrador). La eficiencia (E) para cada gen se calculó de acuerdo a $E = 10^{-1/pendiente}$ (Pfaffl, 2001). Los gráficos y el análisis estadístico fueron hechos en el programa GraphPad Prism 7.00. Se utilizó un test estadístico para datos pareados aplicando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon sobre los valores de expresión relativa.

5.7 Análisis de correlación:

Se realizó un test de correlación de Spearman para estudiar la magnitud, dirección y significancia estadística de la relación monotónica entre el aumento de la expresión de *Camk2n1* y la magnitud de la LTP en cada rebanada.

6. RESULTADOS:

6.1 Inducción de potenciación a largo plazo en rebanadas agudas de hipocampo:

Con el objetivo de inducir LTP en una población de sinapsis de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, se estimularon haces de colaterales de Schaffer provenientes de la región CA3 utilizando un protocolo de estimulación a alta frecuencia (4 trenes de estimulación separados por 20 s; 1 tren: 100 pulsos eléctricos a 100 Hz). La Figura 1A muestra un esquema de un corte de hipocampo con los electrodos de estimulación (E1, E2) y registro (R), y en Figura 1B se pueden observar ejemplos de los potenciales excitatorios postsinápticos de campo (fEPSP) evocados en dos vías sinápticas diferentes (ver Materiales y métodos) antes y después de inducir LTP. La Figura 1C muestra el curso temporal del cambio en la pendiente de las respuestas evocadas antes y después de la aplicación de cuatro trenes de estimulación (flecha) en una de las dos vías sinápticas estimuladas (E1). El aumento promedio en la pendiente del fEPSP fue de un $58\% \pm 5.06\%$ ($n=6$). Este aumento en la pendiente fue exclusivo para la vía sináptica estimulada a alta frecuencia, ya que como se puede observar en la Figura 1C, la vía sináptica control (E2) no presentó un cambio considerable en la pendiente del fEPSP a lo largo del registro. Lo anterior confirma que, en este tipo de preparación, se cumple una de las propiedades descritas de la LTP: la especificidad de aferencias (*input specificity*), que indica que la potenciación solo ocurre en las sinapsis que se activan por la estimulación a alta frecuencia, y no en las sinapsis estimuladas a la frecuencia basal que contactan a la misma neurona o al mismo grupo de neuronas. En este caso, E1 y E2 son vías aferentes independientes que contactan a la misma población de neuronas, pero la LTP solo se expresa en E1.

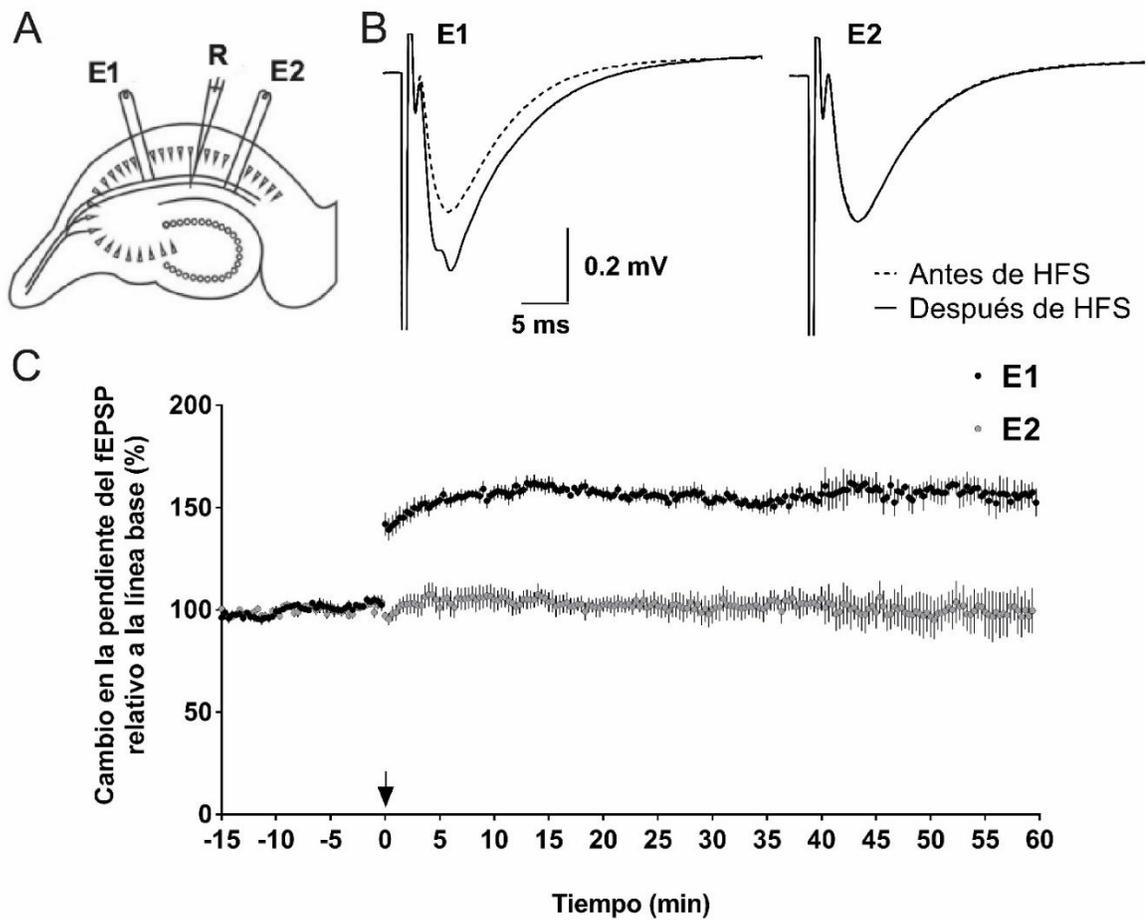


Figura 1. Inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo por estimulación a alta frecuencia. (A) Esquema de una rebanada hipocampal que representa dos vías aferentes independientes (E1 y E2) en contacto con una misma población de neuronas. En cada rebanada, dos electrodos fueron posicionados para estimular alternadamente las dos vías. Las respuestas evocadas fueron registradas con un único electrodo de registro (R). La LTP fue inducida en una de las vías (E1), mientras que la otra (E2) fue utilizada como control. (B) fEPSP representativo registrado antes y después de la inducción de LTP en una de las rebanadas analizadas. (C) Curso temporal del cambio en la pendiente del fEPSP desde 15 minutos antes hasta 60 minutos después de la inducción de LTP por estimulación a alta frecuencia (flecha) (n=6).

6.2 Expresión de *Camk2n1* y *Camk2n2* luego de inducir LTP en el hipocampo:

Con el objetivo de determinar si existe un cambio en la expresión de *Camk2n1* y *Camk2n2* luego de inducir LTP en el hipocampo, se cuantificó la expresión génica de rebanadas potenciadas y rebanadas estimuladas sólo basalmente (control) mediante PCR cuantitativo. Los experimentos revelaron que luego de 60 minutos inducida la LTP en rebanadas, hay un aumento significativo de la expresión de *Camk2n1* (prueba de Wilcoxon; $P = 0.031$; Figura 2) en comparación con la condición control. El aumento de la expresión fue observado en todas las rebanadas analizadas comparadas individualmente con su rebanada control, y el cambio promedio de la expresión fue de aproximadamente el doble en comparación con la condición control (Fig. 4). Por otra parte, no se observó un cambio significativo en la expresión de *Camk2n2* (prueba de Wilcoxon; $P = 0.438$; Figura 3).

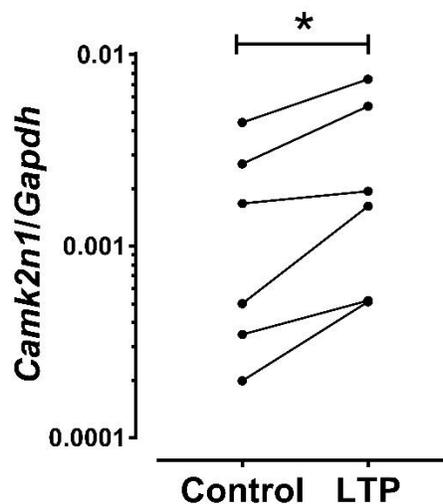


Figura 2. *Camk2n1* es regulado positivamente luego de inducir LTP en la región CA1 del hipocampo. Experimentos de qPCR revelaron un aumento en la expresión del mRNA de CaMK2N1 60 minutos después de inducir LTP en la región CA1 de rebanadas agudas de hipocampo ($n=6$) en comparación a la expresión en rebanadas control. Prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon fue aplicado para el análisis estadístico. $*P=0.031$.

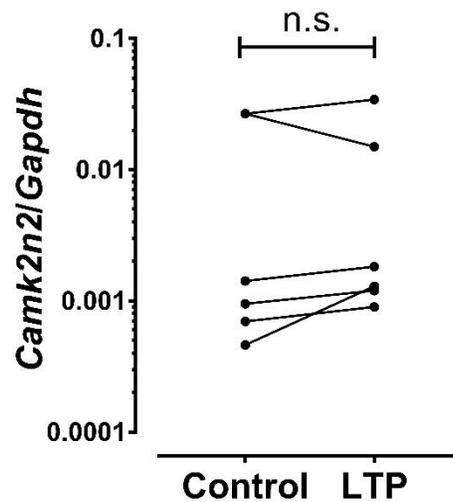


Figura 3. La expresión de *Camk2n2* no es alterada luego de inducir LTP en la región CA1 del hipocampo. Experimentos de qPCR indicaron que la expresión del mRNA de CaMK2N2 no cambió 60 minutos después de inducir LTP en la región CA1 de rebanadas agudas de hipocampo. El cDNA utilizado fue el mismo que el de los experimentos de *Camk2n1* (Figura 1). Prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon fue aplicado para el análisis estadístico, n.s. > 0.05.

Anteriormente, se había determinado por medio de experimentos de hibridación *in situ* en rebanadas agudas de hipocampo (Roberts y cols, 1996) que la expresión del mRNA de α CaMKII aumentaba 120 minutos luego de la inducción de LTP en la región CA1. Con el objetivo de estudiar si existe una regulación más temprana de la quinasa, en concomitancia con el aumento de la expresión de *Camk2n1*, se cuantificaron los niveles de expresión de *Camk2a* (gen que codifica a α CaMKII) 60 minutos luego de inducir LTP. Los resultados indicaron que la expresión de *Camk2a* no cambia luego de inducir LTP. (Figura 4).

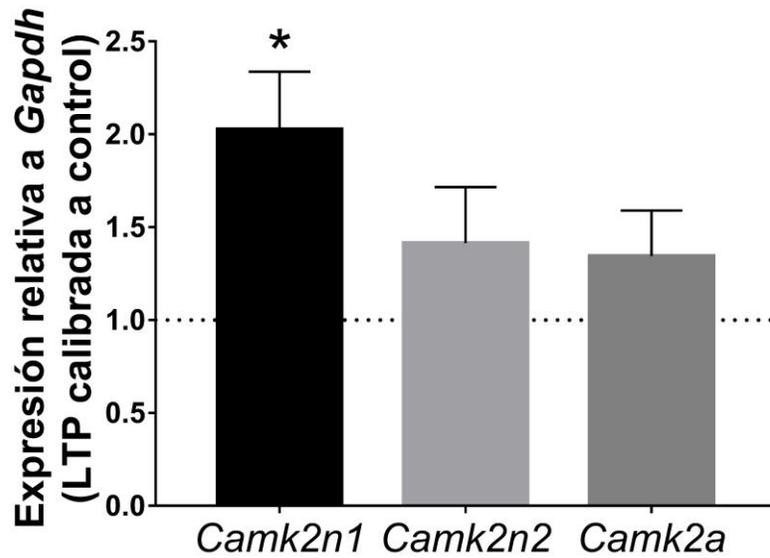


Figura 4. Expresión relativa promedio de *Camk2n1*, *Camk2n2* y *Camk2a* en rebanadas potenciadas. Calculo de la expresión relativa (LTP calibrada a control, ver Métodos) indica que luego de inducir LTP el aumento promedio de *Camk2n1* es del doble en comparación a la condición control. Por el contrario, *Camk2n2* y *Camk2a* no cambian su expresión luego de inducir LTP. Barras indican promedio + SEM. Prueba pareada de los rangos con signo de Wilcoxon fue aplicado para el análisis estadístico. * $P=0.031$. Línea discontinua indica expresión normalizada de la condición control, que por definición es 1 (Ver Métodos).

6.3 Correlación entre la magnitud de la LTP y el aumento en la expresión de *Camk2n1*:

El diseño experimental considera una rebanada por condición (LTP y control), lo cual permite la posibilidad de analizar cada rebanada en relación con el nivel de potenciación alcanzado luego de la inducción de LTP y el cambio en la expresión de *Camk2n1* con respecto a su propio control. En la Tabla III se detallan los valores de potenciación y cambio en la expresión de *Camk2n1* para cada rebanada potenciada analizada en este estudio (n=6). Se aplicó un test de Spearman sobre los datos de la Tabla III con el objetivo de determinar la magnitud y la dirección de la relación monótonica entre ambos cambios observados. Los resultados indicaron que existe una fuerte correlación positiva entre la magnitud de la potenciación y el cambio en la expresión de *Camk2n1* en rebanadas potenciadas ($r_s = 0.9429$; $P = 0.0167$).

Tabla III. Valores de potenciación y expresión de *Camk2n1* en cada rebanada.

Rebanada	Magnitud de la potenciación (%)	Cambio en la expresión de <i>Camk2n1</i> (%)
1	41.73	15.92
2	49.35	68.09
3	54.95	50.41
4	55.96	100.1
5	68.52	158.6
6	75.43	222.6

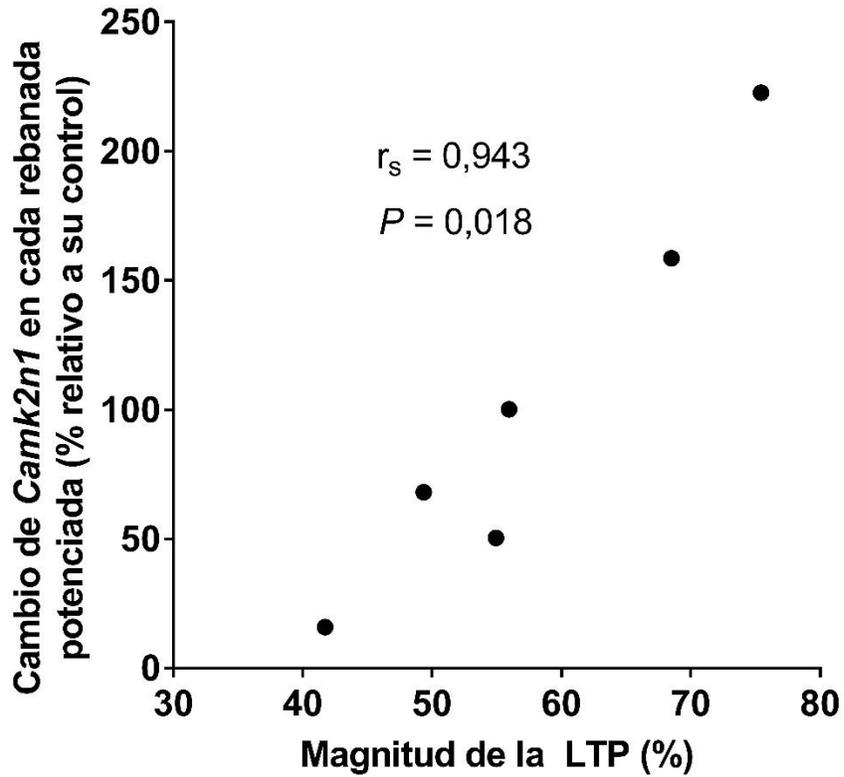


Figura 5. Existe una fuerte correlación entre el aumento en la expresión de *Camk2n1* y la magnitud de la potenciación. Test de Spearman indicó una correlación positiva entre la magnitud de la potenciación y el cambio en la expresión de *Camk2n1* determinado en cada rebanada potenciada mediante qPCR (n=6). La magnitud de la LTP se calculó como el porcentaje de cambio relativo a la línea base de la pendiente promedio del fEPSP de los últimos 20 min de cada registro.

7. DISCUSIÓN:

Con el objetivo de comenzar a dilucidar el rol funcional de los inhibidores endógenos CaMK2N1 y CaMK2N2, como reguladores de CaMKII en eventos de plasticidad sináptica, se investigó la expresión de estos genes luego de la inducción de LTP en la región CA1 de rebanadas de hipocampo de rata. Se encontró que existe un aumento significativo de la expresión de *Camk2n1* 60 minutos luego de inducir LTP mediante un protocolo de estimulación a alta frecuencia, en comparación con rebanadas en que solo se estimuló basalmente y no se indujo LTP (Figura 2). Como las rebanadas control se sometieron a un tratamiento electrofisiológico similar al de las rebanadas potenciadas, exceptuando la inducción de LTP, se puede afirmar que el aumento en la expresión de *Camk2n1* ocurre luego de inducir LTP y no como consecuencia de una alteración provocada por las condiciones basales de experimentación. Estos resultados pueden compararse con los descritos por Lopicard y cols. (2006), en los cuales se observó un aumento de la expresión hipocámpal de *Camk2n1*, y no de *Camk2n2*, 30 y 60 min luego del condicionamiento al miedo en ratones. El aumento de la expresión de *Camk2n1* en el hipocampo descrita por Lopicard y cols. es de aproximadamente 90% respecto al control (animales naïve), lo cual es similar a lo descrito en este trabajo (77%). Congruente con los resultados de Lopicard y cols., en el presente estudio se encontró que *Camk2n2* no cambia su expresión 60 minutos luego de la inducción de LTP (Figura 3). Estos resultados indican que, a pesar de que ambos inhibidores actúan específicamente sobre CaMKII (Chang y cols., 2001), la regulación de su expresión podría ser diferencial. De hecho, el patrón de expresión del mRNA de CaMK2N1 y CaMK2N2 en el cerebro de roedores es similar a la distribución de α CaMKII y β CaMKII, respectivamente (Chang y cols., 2001), sugiriendo que cada isoforma del inhibidor podría

interactuar preferencialmente con una isoforma de CaMKII particular. Adicionalmente, ensayos *in vitro* han revelado que la unión entre α CaMKII y CaMK2N1, a diferencia de la unión entre α CaMKII y CaMK2N2, puede permanecer incluso luego de la remoción del calcio que gatilla la activación de CaMKII (Chang y cols., 2001), lo cual sugiere que CaMK2N1 podría ser un regulador más eficiente de CaMKII autofosforilada.

Trabajos anteriores han demostrado que CaMK2N y péptidos derivados de su secuencia inhibitoria (CNs) bloquean completamente la fosforilación de sustratos por CaMKII activada (Ca^{2+} -dependiente y autofosforilada) (Chang y cols., 1998; Chang y cols., 2001; Vest y cols., 2007), interrumpen la unión entre CaMKII y GluN2B (Vest y cols., 2007; Sanhueza y cols., 2011) y bloquean la fosforilación intra-subunidad en el sitio T305/306 (Vest y cols., 2007), que ocurre luego de la autofosforilación en T286 y que ha sido relacionada a una forma de autoinhibición de la enzima. Sin embargo, la autofosforilación en el sitio T286 no es considerablemente afectada por CNs (Vest y cols., 2007), sugiriendo que CaMK2N no bloquea la generación del estado “autónomo” de actividad producto de la autofosforilación en T286.

La inducción de LTP en el área CA1 del hipocampo está asociada a un incremento de la autofosforilación de α CaMKII en el sitio T286 que se mantiene desde minutos (30 min) hasta varias horas post-inducción (Ouyang y cols., 1997; Lengyel y cols., 2004; Ahmed & Frey, 2005). La actividad enzimática, por otro lado, se ha observado que aumenta en un rango de segundos desde el inicio de la estimulación y retorna a sus niveles basales en unos pocos minutos (Lengyel y cols., 2004; Lee y cols., 2009). Lo anterior sugiere que en la expresión de la fase temprana de la LTP se requiere de la persistente autofosforilación de CaMKII más que de la mantención de su actividad enzimática elevada. Consistente con dicha hipótesis, la inhibición de la actividad de

CaMKII afecta la inducción de LTP, pero no su mantención una vez inducida (Malinow y cols., 1989; Otmakhov y cols., 1997). Considerando lo anterior y las evidencias en cuanto al mecanismo de inhibición de CaMK2N, el aumento en la expresión de *Camk2n1* luego de inducir LTP, si se traduce en un aumento de la proteína, sugiere que durante la mantención de la LTP se gatilla un mecanismo regulatorio sobre CaMKII activada (o por activar), ya sea inhibiendo su capacidad de fosforilar sustratos o regulando su asociación a la subunidad GluN2B, la cual es necesaria no solo para inducir LTP (Barria & Malinow, 2005; Zhou y cols., 2007) , sino también para mantenerla (Barcomb y cols., 2016).

Ahora bien, las implicancias de un aumento de CaMK2N1 y su acción sobre CaMKII en la mantención de la LTP o de subsecuentes eventos de plasticidad son difíciles de predecir debido a que CaMKII fosforila una gran variedad de sustratos y está involucrada en otras funciones celulares como, por ejemplo, liberación de neurotransmisores, transcripción génica, metaplasticidad (plasticidad de la plasticidad sináptica), entre otras (Hudmon & Schulman, 2002; Lisman y cols., 2002; Lisman y cols., 2012; Lucchesi, y cols., 2011). Adicionalmente, si el aumento en la expresión de *Camk2n1* ocurre efectivamente en las neuronas cuyas sinapsis fueron potenciadas, su efecto dependería de la localización subcelular en la cual se produzca finalmente el aumento de CaMK2N1. Los primeros estudios de caracterización de CaMK2N sugirieron que, en condiciones basales, estos inhibidores se localizan en el soma y dendritas de neuronas hipocampales principales, pero no en las densidades postsinápticas (PSDs) ni en extracto de sinaptosomas (Chang y cols., 2001). No obstante, estudios posteriores usando anticuerpos recombinantes específicos han reportado la detección de CaMK2N1 en las PSDs (Saha y cols., 2007) y en extracto de sinaptosomas hipocampales (datos no publicados, revisado en Lucchesi y cols., 2011), y CaMK2N2 en soma, dendritas

(Radwańska y cols., 2010) y extracto de sinaptosomas hipocampales (datos no publicados, revisado en Lucchesi y cols., 2011). Además de estos resultados contradictorios, todavía no se ha reportado si luego de la inducción de la LTP se genera una redistribución de CaMK2N1 o CaMK2N2 dentro de la célula.

En la ventana de tiempo estudiada (60 min) no se observó un aumento de la expresión de *Camk2a* (Figura 4). Sin embargo, no hay que perder de vista que la región estimulada y en que se indujo LTP es acotada, y que el análisis de la expresión génica se realizó considerando la rebanada completa, que contiene hipocampo, corteza y parte del tálamo. Entonces, es posible que un aumento discreto en la expresión de alguno de los genes analizados haya sido “diluido” al analizar la rebanada completa. Por otra parte, lo anterior también sugiere que el aumento en la expresión de *Camk2n1* es robusto, ya que fue posible detectarlo analizando la rebanada completa. Una segunda estrategia metodológica sería disecar la rebanada luego de registrar con el fin de cuantificar la expresión génica únicamente en la zona de CA1 delimitada por los electrodos de estimulación, lo cual podría implicar el juntar mayor cantidad de material para extraer RNA con el método utilizado en este trabajo, es decir, se debería procesar más de una rebanada por condición. Si bien esta aproximación experimental permitiría la cuantificación de los genes de interés en la región acotada en que se indujo LTP, se pierde la información que se puede obtener estudiando la correlación entre la magnitud de la LTP inducida (que puede variar entre rebanadas de un mismo animal) y los cambios de expresión génica en cada rebanada.

La fuerte correlación encontrada entre la expresión de *Camk2n1* y la magnitud de la LTP (Figura 5) sugiere que cambios en la expresión de *Camk2n1* serían inducidos de manera graduada de acuerdo con el cambio en la transmisión generado en las

sinapsis estimuladas a alta frecuencia, probablemente reflejando una relación entre la cantidad de CaMKII activada por la inducción de LTP y la cantidad de CaMK2N1 que se está expresando para regular la función de la quinasa. La aplicación transitoria de péptidos CN (derivados de CaMK2N, y que mantienen su potencial inhibitorio) a rebanadas agudas de hipocampo de rata interrumpe la interacción basal entre CaMKII y GluN2B y causa una depresión sináptica de larga duración tanto en sinapsis naïve como en sinapsis previamente potenciadas (Sanhueza y cols., 2011). Esto último genera una reversión de la saturación de la LTP mientras CN esté presente, y una recuperación parcial de la potenciación que permite re-inducir LTP una vez que CN es removido. Considerando los resultados de Sanhueza y cols. (2011) y suponiendo que el aumento en la expresión de *Camk2n1* observado en este estudio durante la mantención de la LTP es parte de un mecanismo que regula la actividad de CaMKII y/o su unión a GluN2B en futuros eventos de plasticidad, se podría hipotetizar que la magnitud de la potenciación generada en un principio facilita o modula los subsecuentes eventos de plasticidad sináptica mediante la expresión graduada de CaMK2N1.

CaMKII ha sido estudiada extensamente debido al rol crítico que cumple en la inducción de la LTP y la formación de memorias en roedores. No obstante, el efecto de la inhibición de CaMK2N1 y CaMK2N2 sobre CaMKII en contexto de plasticidad sináptica y aprendizaje recién comienzan a dilucidarse. Estudios adicionales de expresión génica en tiempos mayores a los 60 minutos post-inducción de LTP son necesarios para evaluar si la regulación de *Camk2n1* es transitoria, o si permanece elevada durante la fase tardía de la LTP (> 3 h). Adicionalmente, continúa abierta la pregunta de si el aumento en la expresión de *Camk2n1* luego de la inducción de LTP se correlaciona con un aumento en la expresión de la proteína. Esto último puede ser abordado realizando experimentos de

western blot para determinar de forma semi-cuantitativa si existe un aumento de CaMK2N1 luego de inducir LTP. Además, si existe un aumento de CaMK2N1, experimentos de inmunofluorescencia podrían revelar en qué regiones, células y estructuras subcelulares específicas estaría ocurriendo.

Hasta la fecha, este estudio sería el primero en reportar que existe un cambio en la expresión de *Camk2n1* luego de la inducción de LTP, la cual es considerada el modelo celular que subyace la formación de memorias y el aprendizaje.

8. CONCLUSIONES:

- *Camk2n1*, y no *Camk2n2*, aumenta su expresión luego de la inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo de rata.
- El cambio en la expresión de *Camk2n1* es inducido de manera graduada con relación a la magnitud de la LTP.

9. REFERENCIAS:

- Ahmed, T., & Frey, J. U.** (2005). Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII , MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro. *Neuropharmacology*, 49(4), 477–92.
- Barcomb, K., Hell, J. W., Benke, T. A., & Bayer, K. U.** (2016). The CaMKII / GluN2B interaction maintains synaptic strength. *J Biol Chem.*, 291(31), 16082–9.
- Barria, A., & Malinow, R.** (2005). NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII. *Neuron*, 48(2), 289–301.
- Bayer, K., Koninck, P. De, Leonard, A. S., Hell, J. W., & Schulman, H.** (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*, 411(6839), 801–805.
- Chang, B. H., Mukherji, S., & Soderling, T. R.** (1998). Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10890–10895.
- Chang, B. H., Mukherji, S., & Soderling, T. R.** (2001). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: Localization of isoforms in rat brain. *Neuroscience*, 102(4), 767–777.
- Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P.** (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129(7), 1659–1673.
- Derkach, V., Barria, A., Soderling, T. R.** (1999). Calcium/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3269–3274.

- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K., & Silva, A. J.** (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, 279(5352), 870–873.
- Guzowski, J. F.** (2002). Insights Into Immediate-Early Gene Function in Hippocampal Memory Consolidation Using Antisense Oligonucleotide and Fluorescent Imaging Approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104.
- Hanson, P. I., Kapiloff, M. S., Lou, L., Rosenfeld, M. C., & Schulman, H.** (1989). Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron*, 3(1), 59–70.
- Hudmon, A., & Schulman, H.** (2002). Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem.*, 71, 473–510.
- Irvine, E. E., Herten, L. S. J. Von, Plattner, F., & Giese, K. P.** (2006). a CaMKII autophosphorylation : a fast track to memory. *Trends in Neurosciences*, 29(8), 459–65.
- Kolodziej, S. J., Hudmon, A., Waxham, M. N., & Stoops, J. K.** (2000). Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14354–14359.
- Lee, S. R., Escobedo-Iozoya, Y., Szatmari, E. M., & Yasuda, R.** (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*, 458(7236), 299–304.

- Lengyel, I., Voss, K., Cammarota, M., Bradshaw, K., Brent, V., Murphy, K. P. S. J., ... Bliss, T. V. P.** (2004). Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.*, 20(11), 3063–3072.
- Lepicard, E. M., Mizuno, K., Antunes-Martins, A., Von Herten, L. S. J., & Giese, K. P.** (2006). An endogenous inhibitor of calcium/calmodulin-dependent kinase II is up-regulated during consolidation of fear memory. *European Journal of Neuroscience*, 23(11), 3063–3070.
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H.** (2002). The molecular basis of camkii function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(3), 175–190.
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S.** (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(3), 169–82.
- Lucchesi, W., Mizuno, K., & Giese, K. P.** (2011). Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Research Bulletin*, 85(1–2), 2–8.
- Lynch, M. A.** (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev*, 84, 87–136.
- Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R. W.** (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245(4920), 862–866.
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R.** (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348–352.
- Otmakhov, N., Griffith, L. C., & Lisman, J. E.** (1997). Postsynaptic Inhibitors of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Type II Block Induction But Not Maintenance of Pairing- Induced Long-Term Potentiation. *The Journal of*

Neuroscience, 17(14), 5357–5365.

Ouyang, Y., Kantor, D., Harris, K. M., Schuman, E. M., & Kennedy, M. B. (1997).

Visualization of the Distribution of Autophosphorylated Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II after Tetanic Stimulation in the CA1 Area of the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 17(14), 5416–5427.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 16–21.

Radwańska, K., Tudor-Jones, a. a., Mizuno, K., Pereira, G. S., Lucchesi, W., Alfano,

I., ... Peter Giese, K. (2010). Differential regulation of CaMKII inhibitor β protein expression after exposure to a novel context and during contextual fear memory formation. *Genes, Brain and Behavior*, 9(6), 648–657.

Roberts L A., Higgins Michael J., O’Shaughnessy Celestine T., Stone Trevor W., M.

B. J. (1996). Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation. *Molecular Brain Research*, 42(1), 123–127.

Saha, S., Datta, K., & Rangarajan, P. (2007). Characterization of mouse neuronal

Ca²⁺/calmodulin kinase II inhibitor alpha. *Brain Research*, 1148(1), 38–42.

Sanhueza, M., Fernandez-villalobos, G., Stein, I. S., Kasumova, G., Zhang, P.,

Bayer, K. U., ... Lisman, J. (2011). Role of the CaMKII / NMDA Receptor Complex in the Maintenance of Synaptic Strength. *The Journal of Neuroscience*, 31(25), 9170–9178.

Sanhueza, M., McIntyre, C. C., & Lisman, J. E. (2007). Reversal of synaptic memory

by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor. *The Journal of*

Neuroscience, 27(19), 5190–9.

Silva, A. J., Paylor, R., & Wehner, J. M. (1992). Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257(5067), 206–11.

Soderling, T. R., & Derkach, V. A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends in Neurosciences*, 23, 75–80.

Strack, S., Choi, S., Lovinger, D. M., & Colbran, R. J. (1997). Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J Biol Chem.*, 272(21), 13467–13471.

Strack, S., & Colbran, R. J. (1998). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *J Biol Chem.*, 273(33), 20689–20693.

Vest, R. S., Davies, K. D., Leary, H. O., Port, J. D., & Bayer, K. U. (2007). Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor. *Mol Biol Cell.*, 18(12), 5024–5033.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., Bear, M. F. (2006). Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093–1097.
<https://doi.org/10.1126/science.1128134>

Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., ... Silva, A. J. (2007). Interactions between the NR2B Receptor and CaMKII Modulate Synaptic Plasticity and Spatial Learning. *The Journal of Neuroscience*, 27(50), 13843–13853.

10. ANEXO:

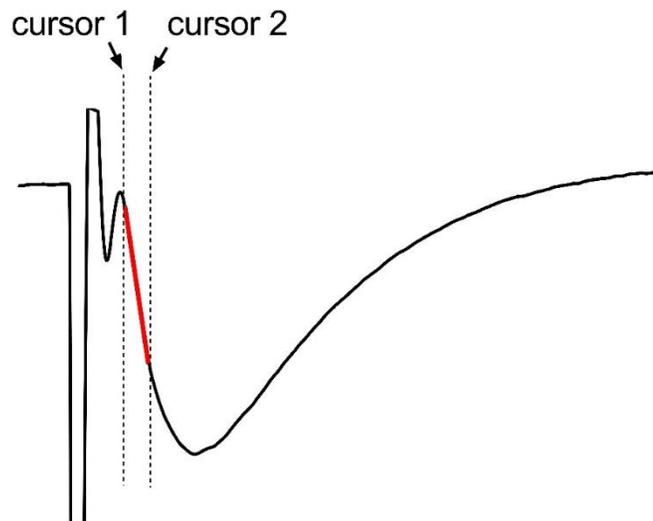


Figura S1. Medición de la pendiente del fEPSP. Esquema ilustra el criterio utilizado para medir la pendiente inicial del fEPSP (en rojo), en el que se determinan dos puntos (cursor 1 y cursor 2) que abarcan un rango de entre 0.5-1 ms desde el inicio de la pendiente hasta su punto más negativo. Las mediciones se realizaron utilizando el programa Igor Pro 6.37 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR).

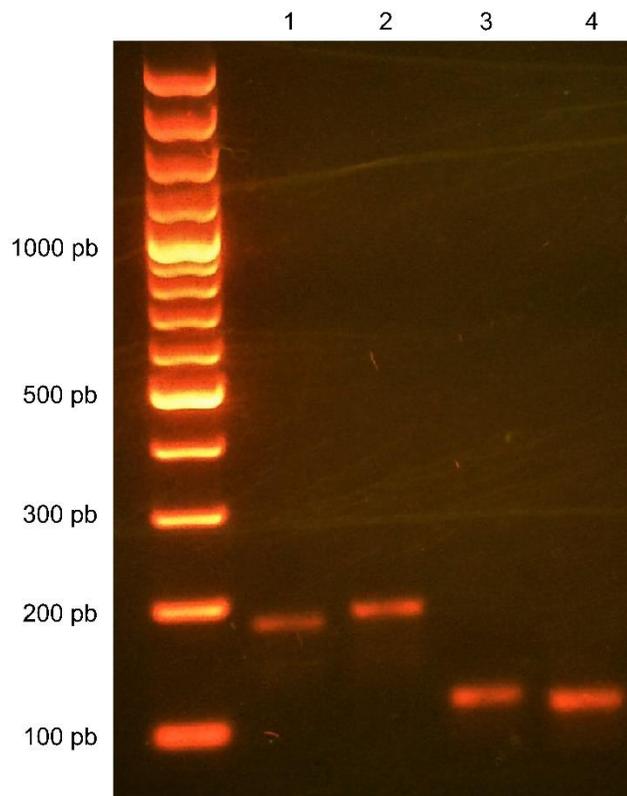


Figura S2. Partidores utilizados amplifican específicamente un producto PCR. El RNA obtenido a partir de una rebanada aguda de hipocampo se transcribió reversamente (1 μ g) a cDNA, el cual fue utilizado como templado para realizar curvas de disociación para cada par de partidores de la Tabla I. Los productos PCR (5 μ L de cada uno en un volumen final de 15 μ L) fueron resueltos en un gel de agarosa al 2% corrido en solución tampón TAE 1X durante 60 minutos a 100 V. Carriles 1: *Camk2n1* (178 pb), 2: *Camk2n2* (183 pb), 3: *Gapdh* (108 pb) y 4: *Camk2a* (102 pb).