

UCH-FC
MAG-B
P 657
C-1

**Regulación de receptores sinápticos
glutamatérgicos por CaMKIIN, inhibidor
endógeno de CaMKII**

Tesis

Entregada a la
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial de los Requisitos
Para Optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Gabriela Patricia Pino Naranjo

Enero, 2015

**Directora de Tesis:
Dra. Magdalena Sanhueza Tohá**

**Co-Directora:
Dra. Cecilia Vergara Montecinos**



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

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

Gabriela Patricia Pino Naranjo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 04 de Junio de 2015.

Directora de Tesis:
Dra. Magdalena Sanhueza Tohá



Co-directora de Tesis:
Dra. Cecilia Vergara Montecinos



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González Billaut

Dr. Julio Alcayaga Urbina



A ti que cuando sonrías me haces pensar

en el comienzo del mundo...



Aparecí un día de Abril frente al mar de San Antonio. Me trajeron a Santiago al poco tiempo, pero mis recuerdos de infancia y adolescencia están tapizados de imágenes de veranos completos en mi ciudad de origen, junto a mis primos.

Cursé mi educación básica en el Colegio de las Religiosas Adoratrices de Estación Central. Aquí por primera vez me hice consciente de realidades muy distintas a la mía en personas con las que convivía día a día, lo cual me entregó una de las primeras razones para estar agradecida de mi familia.

El ingreso a la carrera de Bioquímica en la PUCV, en Valparaíso, marca un antes y un después en mi vida. La necesidad de orden y control autoimpuesto, en una ciudad donde reina la jarana y el júbilo nocturno, fueron vitales en esta etapa. El momento en que casi todas mis cosas materiales se hicieron humo (literalmente), me ayudó a generar un desprendimiento de lo material, y a valorar muchísimo más las relaciones humanas y las experiencias y momentos vividos.

La llegada al Laboratorio de Fisiología Celular estaba enfocada en la búsqueda de respuestas a preguntas como la maravillosa relación existente entre los canales iónicos, los potenciales de acción y las moléculas que permiten que tú leas y comprendas esto. Sin embargo, ahora cerrando una nueva etapa académica, quedo con aún más preguntas que respuestas, y con la sensación de que las personas que he conocido y las experiencias que he vivido acá hacen que todo lo descrito en este escrito parezca ínfimo.

Quiero agradecer a los profesores de este laboratorio que han contribuido a mi formación académica a lo largo en todos estos años en el Laboratorio de Fisiología Celular. En especial, a Julio Alcayaga por contribuir académica e intelectualmente a mi crecimiento. A mis tutoras de tesis y vida, Cecilia Vergara y Magdalena Sanhueza por todas las conversaciones, paciencia y oídos entregados en estos años. A Magdalena agradezco ~~todo~~ todo la ironía y el apoyo entregado, ayudándome a lidiar con afrontar los problemas como persona más que como científica. Y a sus ~~correcciones~~ sugerencias.

A Don Danny y Jannette, y a todos los compañeros del lab que han dejado una huella en mi corazón: Camilo, Daniel E., Katana-Kris, Ale Rivers, Yerkus. Al compadre/vecino Pab-love, por llevar parte del puerto al lab de Bqa. A la Comandante Aburto, y a la subdivisión "Falcon Ball", Teniente Ortiz y Teniente Bello, quienes con su valentía y coraje han mostrado al mundo todas las capacidades estratégicas del ejército Fisiolab.

A mis padres por sus conocimientos y experiencias que me han moldeado y me han permitido estar donde estoy. A mis hermanas por todas las risas y ánimo que me han dado, quizás sin darse cuenta, durante toda mi vida. A mis amigas hermosas y al bello hermoso, que me devuelven día a día la fe en el mundo.

Índice

Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina (CaMKII)	2
Receptores glutamatérgicos NMDAR y AMPAR.....	3
CaMKII y receptores glutamatérgicos en la DPS.....	5
CaMKIIN, inhibidor natural de CaMKII	6
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Animales	13
Preparación de rebanadas agudas de hipocampo	14
Incubación de rebanadas agudas de hipocampo con péptidos	14
Obtención de sinaptoneurosomas	15
Inmunodetecciones en rebanadas incubadas con péptidos.....	15

Preparación de homogenizado, y fracciones subcelulares de distintas regiones cerebrales de rata y ratón.....	16
Preparación de densidades postsinápticas aisladas de hipocampo de rata.....	17
Preparación de células HEK con plásmidos.....	18
Inmunodetección de CaMKIIN2	18
Preparación de rebanadas organotípicas de hipocampo	19
Inducción farmacológica de LTP-química (cLTP) en rebanadas organotípicas	20
RESULTADOS.....	21
Parte I: Inmunodetecciones en rebanadas agudas de hipocampo incubadas con tat-CN21 ..	21
Efecto de tat-CN21 sobre los AMPARs	21
Efecto de tat-CN21 sobre PSD95	23
Efecto de tat-CN21 sobre los NMDARs.....	24
Efecto de tat-CN21 sobre α -CaMKII sináptica	26
Parte II: Detecciones de CaMKIIN luego de LTP química.....	29
Inmunodetecciones de CaMKIIN2 endógena.....	29
Inducción farmacológica de LTP (cLTP) en rebanadas hipocampales organotípicas.	36
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA	49

Índice de Figuras

Figura 1. Secuencias aminoacídicas y alineamientos de CaMKIIN.....	8
Figura 2. Tat-CN21 disminuye la transmisión sináptica basal y la cantidad de CaMKII unida al NMDAR.....	10
Figura 3. El tratamiento con Tat-CN21 permite inducir una LTP mayor.	10
Figura 4. Tat-CN21 produce una disminución en la cantidad de GluA1 en las sinapsis.	22
Figura 5. La cantidad de GluA2 no varía con el tratamiento con tat-CN21.....	23
Figura 6. Tat-CN21 no afecta la cantidad total de PSD-95 en las sinapsis.....	24
Figura 7. La cantidad de GluN1 y por tanto de los NMDARs, disminuye con el tratamiento con tat-CN21.	25
Figura 8. La proporción de GluN2B en los NMDARs sinápticos aumenta luego del tratamiento con tat-CN21.....	25
Figura 9. Tat-CN21 no altera la proporción de GluN2A en los NMDARs sinápticos.....	26
Figura 10. El tratamiento con tat-CN21 no afecta la cantidad total de α -CaMKII.	27
Figura 11. El tratamiento con tat-CN21 disminuye la fracción fosforilada en el sitio T286 de α -CaMKII.	27
Figura 12. Detecciones con anticuerpo Ab1 contra CaMKIIN2 en hipocampo de ratón.....	30
Figura 13. Detección con anticuerpo Ab2 contra CaMKIIN2 en muestras de homogenizado de diversas regiones de cerebro de rata.....	31

Figura 14. Test de especificidad de Ab2 en muestras de células HEK transfectadas con vector de sobreexpresión de CaMKIIN2.	32
Figura 15. Detección con Ab2 de CaMKIIN2 en fracciones citosólica y de membranas en muestras de hipocampo y corteza.	33
Figura 16. Detección de CaMKIIN2 con Ab2 en muestras de preparación de DPSs de hipocampo.	34
Figura 17. Detección de CaMKIIN2 con Ab2 en muestras de hipocampo de ratas de distintas edades.	35
Figura 18. Inducción de cLTP en rebanadas organotípicas de hipocampo.....	37
Figura 19. La inducción de cLTP produce un aumento de CaMKIIN2-35 en las membranas de rebanadas organotípicas de hipocampo.	38

Lista de Abreviaturas

AMPAR: Receptor de AMPA

cDNA: ADN complementario

CaMKII: Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calomdulina

CaMKIIN: Proteína inhibidora de CaMKII

DPS: Densidad Postsináptica

kDa: Kilo daltons

LTP: Potenciación a largo plazo

cLTP: LTP química

mRNA: ARN mensajero

NMDAR: Receptor de NMDA

PP1: Proteína fosfatasa 1

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida denaturantes

RESUMEN

En las sinapsis glutamatérgicas entre CA3 y CA1 del hipocampo, la transmisión sináptica basal depende principalmente de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (AMPA_Rs). Para la inducción de plasticidad sináptica, particularmente la potenciación de larga duración (LTP), es necesaria la activación de los receptores de tipo NMDA (NMDA_Rs) y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII). Cambios en la abundancia, composición o niveles de fosforilación de algunos de estos elementos o incluso alteraciones en la interacción CaMKII-NMDA_R pueden afectar desde la transmisión sináptica y sus propiedades plásticas, hasta procesos cognitivos como el aprendizaje o formación de memorias. CaMKIIN es un inhibidor específico de CaMKII que está presente en las mismas células cerebrales que dicha quinasa y cuya expresión es regulada durante ciertos protocolos de aprendizaje. En esta tesis quisimos investigar los efectos de CaMKIIN sobre los receptores glutamatérgicos y la CaMKII presentes en las sinapsis hipocámpales, y además, intentar establecer si existe una relación entre la inducción de LTP y la expresión de esta proteína. La aplicación transitoria de un péptido derivado de CaMKIIN sobre rebanadas agudas de hipocampo produjo una disminución específica de la subunidad GluA1 de los AMPA_Rs, de la subunidad GluN1 de los NMDA_Rs y de la fosforilación del sitio T286 de CaMKII, además de un aumento relativo de la subunidad GluN2B del NMDA_R en los sinaptoneurosomas de estas rebanadas. Por otra parte, la inducción de LTP por medios químicos en rebanadas organotípicas hipocámpales produjo un aumento en la cantidad de CaMKIIN presente en la fracción de membranas sinápticas. Nuestros resultados además indican que CaMKIIN sería una proteína de mayor peso molecular al originalmente descrito, y que estaría presente en las sinapsis en condiciones basales de actividad sináptica.

ABSTRACT

At glutamatergic synapses between hippocampal CA3 and CA1, basal synaptic transmission depends mainly on glutamatergic AMPA receptors (AMPA receptors). For the induction of synaptic plasticity, particularly long-term potentiation (LTP), activation of NMDA receptors (NMDARs) and Ca^{2+} /calmodulin-dependent (CaMKII) protein kinase is required. Changes in the abundance, composition or phosphorylation levels of these elements or alterations in the CaMKII-NMDAR binding may affect synaptic transmission and its plastic properties, as well as cognitive processes as learning and memory. CaMKIIN is a specific CaMKII inhibitor which is present in the same brain cells as the kinase and its expression is regulated during certain learning protocols. In this thesis we aimed to investigate the effects of CaMKIIN on glutamatergic receptors and CaMKII present at hippocampal synapses. Additionally, we evaluated a possible link between LTP induction and the expression of this protein. The transient application of a peptide derived of CaMKIIN on acute hippocampal slices produced a specific decrease of the GluA1 subunit of the AMPARs, of the GluN1 subunit of the NMDARs and of the phosphorylation of the T286 site of synaptic CaMKII, as well as an increase of the proportion of GluN2B subunit of the NMDARs in the synaptoneuroosomes of these slices. These results are consistent with the reported electrophysiological effects of this peptide. Remarkably, LTP induction by a chemical protocol in organotypic hippocampal slices produced an increase in the amount of CaMKIIN present in the membrane fraction. As an additional observation, our results indicate that CaMKIIN could be a larger protein than it was originally described and that it is present in the synapse under basal conditions of synaptic activity.

INTRODUCCIÓN

En las sinapsis glutamatérgicas de la región CA1 del hipocampo, situadas mayormente en las espinas dendríticas, los principales mediadores de la transmisión sináptica son los *receptores de AMPA y NMDA (AMPA*s y *NMDA*s, respectivamente). Éstos receptores, junto a otra gran cantidad de proteínas, se ubican en una especialización citoesquelética de la espina denominada *densidad postsináptica (DPS)*. Los cambios ya sea en la composición (tipos de subunidades), cantidad, estado de fosforilación y/o conductancia de estos canales se han asociado a fenómenos plásticos observados en procesos cognitivos, como la formación de memorias o el aprendizaje (Lee y cols., 2003; Rumpel y cols., 2005; Withlock y cols. 2006; Derkach y cols., 2007 y Kessels y Malinow, 2009).

Uno de los fenómenos plásticos más estudiados es la *potenciación de largo plazo (LTP)* dependiente de *NMDAR*. La inducción de este fenómeno, a través de una estimulación presináptica de alta frecuencia (por ejemplo, 100Hz) produce el ingreso de Na^+ a través de *AMPA*s que causa una despolarización que remueve el bloqueo por Mg^{+2} de los *NMDA*s activados por el glutamato liberado desde el terminal presináptico, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} a la célula. El Ca^{2+} , unido a la proteína calmodulina, activa a la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (*CaMKII*). Tanto la activación de *CaMKII* como su autofosforilación en la *treonina 286* (sitio T286, ver más adelante) son esenciales para la LTP (Malinow y cols., 1989; Giese y cols., 1998). De esta forma, se produce un aumento en la transmisión sináptica que es estable y que perdura en el tiempo.

Interesantemente, los cambios en la actividad neuronal, ya sean aumentos o disminución de ésta, también se ven constantemente enfrentados a fenómenos de *plasticidad homeostática*, bajo los cuales el sistema es capaz de volver a sus niveles basales de actividad y mantenerse alejado de los rangos de saturación (Turrigiano y cols., 2004, 2012).

Es así como podemos ver que existen numerosos elementos y modificaciones moleculares esenciales para los procesos plásticos que gobiernan la actividad sináptica, y las modificaciones que se puedan presentar en ellos pueden tener efectos significativos en estos procesos.

Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII)

CaMKII es una serina/treonina quinasa, compuesta de 12 subunidades, cada subunidad posee un dominio catalítico y uno autoinhibitorio, que al haber bajos niveles de Ca^{2+} en la célula se encuentran asociados. La unión de Ca^{2+} /calmodulina a una subunidad permite la disociación de ambos dominios, exponiéndose el sitio activo y además, el sitio T286, ubicado en el dominio autoinhibitorio. La fosforilación de T286 por una subunidad vecina activa impide la reasociación de los dominios autoinhibitorio y catalítico, otorgando a la quinasa una actividad catalítica autónoma independiente de los niveles de calcio de la célula. Interesantemente, en la región sináptica existen fosfatasa capaces de desfosforilar este sitio, como la proteína fosfatasa 1 (PP1), pero la interacción de CaMKII activa con la subunidad GluN2B del receptor de NMDA en la sinapsis (ver más adelante) impiden el acceso de la fosfatasa al sitio T286, prolongándose de esta forma su actividad autónoma (Lisman y Zhabotinsky, 2001; Mullasseril y cols., 2007; Cheriyan y cols., 2011).

En condiciones basales de Ca^{2+} en la célula postsináptica, CaMKII se encuentra mayormente ligada al citoesqueleto de F-Actina, por lo tanto, distribuida en el cuerpo de la espina (Okamoto y cols., 2007). La activación de la enzima por aumento de Ca^{2+} , permite la disociación del citoesqueleto y la migración de CaMKII a la DPS; así, su traslado hacia sitios sinápticos es dependiente de actividad sináptica (Bayer y cols., 2006). Cabe mencionar que en condiciones basales de actividad también existe una fracción de CaMKII presente en la DPS, unida al receptor de NMDA.

Receptores glutamatérgicos NMDAR y AMPAR

Los AMPARs y NMDARs son tetrámeros permeables a Na^+ , K^+ y, en el caso de los NMDARs, Ca^{2+} . Las subunidades de los AMPARs se denominan GluA1-4 (antes llamadas GluR1-4), siendo predominantes las conformaciones GluA2/GluA1 y GluA2/GluA3 en el hipocampo. En el caso de los NMDARs, las subunidades se denominan GluN1-4 (antes llamadas NR1-4), y en el hipocampo todas sus conformaciones contienen 2 subunidades GluN1, asociadas a 2 subunidades GluN2B, ó 2 subunidades GluN2A, o una de cada tipo.

La incorporación de AMPARs a la sinapsis consta de varios pasos (revisado en Malinow y Malenka, 2002; Opazo y Choquet 2011). Primero se fusionan vesículas citosólicas que contienen los receptores en la región extrasináptica de la espina dendrítica, desde allí difunden pudiendo atravesar la sinapsis, sin quedar necesariamente anclados en ésta (Derkach y cols., 2007; Ehlers y cols., 2007; Heine y cols., 2008). En una segunda etapa, dependiente de actividad sináptica, la activación de los NMDARs y el consiguiente aumento de Ca^{2+} inducen el confinamiento de AMPARs en la sinapsis (Malenka y Bear, 2004; Makino y Malinow, 2009). Este

confinamiento requiere la activación de CaMKII y depende de la fosforilación de stargazina, subunidad auxiliar de los AMPARs, perteneciente a la familia de *proteínas de transmembrana reguladoras de AMPARs* (TARPs; Opazo y cols., 2010). La inducción de LTP inicialmente promueve la rápida incorporación de AMPARs que no contienen GluA2 (posiblemente homómeros de GluA1) a la sinapsis, siendo intercambiados posteriormente (alrededor de 25 minutos) por AMPARs que contienen GluA2 (Plant y cols., 2006). La ausencia de la subunidad GluA2 permite que los AMPARs sean permeables a Ca^{2+} , por lo que este aumento transitorio de AMPARs sin GluA2 podría ser esencial para la inducción de LTP (Man, 2011).

El dominio intracelular de GluA1 contiene sitios de fosforilación que regulan la fracción de tiempo abierto, conductancia, tráfico y localización de los AMPARs (Derkach y cols., 2007), y que incluso están implicados en el aprendizaje y la plasticidad sináptica (Whitlock y cols., 2006; Lee y cols., 2003). Uno de ellos es la *serina 831* (S831), sustrato de CaMKII (Barria y cols. 1997), cuya fosforilación aumenta la conductancia promedio tanto de los homómeros de GluA1 (Derkach y cols., 1999) como de los heterómeros GluA1/GluA2 unidos a TARPs, como stargazina o $\gamma 8$ (Kristensen y cols., 2011).

En cuanto a los NMDARs, se ha observado que la relación entre las subunidades GluN2A y GluN2B en la sinapsis varía a lo largo del desarrollo, siendo alta la expresión de GluN2B en etapas prenatales para luego ir disminuyendo, mientras que GluN2A se expresa desde los primeros días del período postnatal, con un aumento gradual posterior (Monyer y cols., 1994, Petralia y cols., 2005). La razón entre la cantidad de las subunidades GluN2A y GluN2B sinápticas se ha relacionado con la capacidad de inducir LTP, lo cual podría estar

asociado a las distintas permeabilidades a Ca^{2+} que ambas subunidades presentan (Yashiro y Philpot, 2008; Shipton y Paulsen, 2013).

CaMKII y receptores glutamatérgicos en la DPS.

En la DPS, CaMKII activa se puede asociar a la subunidad GluN2B del NMDAR, interacción muy importante para procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje (Sanhueza y cols., 2011; Zhou y cols., 2007). Además, esta interacción también impide la reasociación de los dominios autoinhibitorio y catalítico, lo que mantiene a la quinasa en un estado activo autónomo (Leonard y cols., 1999). Si bien la fosforilación en el sitio T286 de CaMKII no es necesaria para la unión de la quinasa a GluN2B, sí estabiliza dicha interacción (Shen y Meyer, 1999; Shen y cols., 2000).

La interacción CaMKII-GluN2B se observa en condiciones basales de actividad en la sinapsis, y su cantidad aumenta al inducir LTP (Leonard y cols., 1999). Además, en ratones transgénicos en los que se ha logrado modular o impedir la interacción entre GluN2B y CaMKII, se ha visto una alteración tanto de la inducción de la LTP como de la memoria (Barria y Malinow, 2005; Zhou y cols., 2007; Halt y cols., 2012).

CaMKII posee otros sitios de interacción con diversas proteínas de la DPS (Merrill y cols., 2005) por lo que además de la función quinasa, podría estar cumpliendo un rol estructural en la DPS que sería esencial para la LTP (revisado en Lisman y cols., 2012; Sanhueza y Lisman, 2013). En esta región CaMKII formaría un complejo proteico, con asociaciones directas con NMDARs e indirectas con AMPARs, estas últimas a través de la interacción entre

TARPs y proteínas de andamiaje como PSD-95 (Schnell y cols., 2002; Bats y cols., 2007; Lisman, y Zhabotinsky, 2001). Esto favorecería su acción catalítica localizada, por ejemplo sobre el sitio S831 de las subunidades GluA1 cercanas, promoviendo los aumentos de conductancia del canal, o bien mediante la fosforilación de stargazina, que favorece el anclaje de los receptores (Opazo y cols., 2010; Tomita y cols., 2005).

CaMKIIN, inhibidor natural de CaMKII

En células cerebrales que expresan CaMKII se ha encontrado un inhibidor endógeno de esta quinasa, denominado CaMKIIN. Este inhibidor actúa sobre CaMKII pero no sobre CaMKI, CaMKIV, PKA o PKC (Chang y cols., 1998; Chang y cols., 2001), uniéndose a subunidades activas de la quinasa en la misma región de interacción con GluN2B. CaMKIIN inhibe tanto la actividad dependiente de Ca^{2+} como la actividad autónoma de CaMKII (Chang y cols., 2001). Además, inhibe la formación del complejo CaMKII-NMDAR inducida por actividad a través de una interacción con CaMKII en la misma región en que la quinasa interactúa con GluN2B (Vest y cols., 2007).

En los primeros trabajos descriptivos de la proteína del grupo de Chang y cols. (1998, 2001) se reportan dos isoformas de CaMKIIN derivadas a partir de la secuencia de cDNA encontrada: CaMKIIN1 (también llamada CaMKIIN- β) y CaMKIIN2 (CaMKIIN- α), de 79 y 78 aminoácidos respectivamente (*Figura 1*). A partir de la secuencia inhibitoria de 27 aminoácidos descrita en estos trabajos se desarrolló un anticuerpo con el que se pudo obtener una banda de 8kDa que se atribuyó al peso molecular de la proteína. Con este anticuerpo también se pudo determinar que CaMKIIN se expresa en la mayoría de las regiones cerebrales y testículos.

En cultivos hipocampales de rata, bajo condiciones basales de actividad sináptica se reportó la presencia de CaMKIIN en regiones dendríticas, pero no en espinas (Chang y cols., 2001). Sin embargo, en trabajos posteriores desarrollados por el grupo de Saha y cols., (2006, 2007), mediante el uso de un anticuerpo cuyo inmunógeno es la secuencia completa de CaMKIIN- α (*Figura 1*) se reportó el hallazgo de una proteína de alrededor de 30kDa en preparaciones de sinaptoneurosomas (que contiene las regiones pre y postsinápticas de las sinapsis) y en densidades postsinápticas de ratón. Esto sugiere la existencia de isoformas de la proteína todavía no descritas.

Las diferencias mencionadas en cuanto a las características de CaMKIIN podrían tener relación con el hecho de que todos los grupos que han realizado trabajos sobre esta proteína (Radwańska y cols., 2010; Chang y cols., 1998; Saha y cols., 2006) han utilizado anticuerpos distintos, basados en diferentes epítopes. Adicionalmente, de los anticuerpos que existen actualmente en el mercado, hay uno que ha sido probado y utilizado exitosamente en una publicación (Radwańska y cols., 2010) mientras que en otra publicación más reciente se utiliza otro anticuerpo en donde se muestra una banda, pero sorprendentemente no se especifica un peso molecular (Convertini y cols., 2014).

CaMKIIN se expresa fuertemente en el hipocampo, y se ha visto que los niveles de mRNA (para la isoforma α) y de proteína (para la isoforma β) aumentan en los primeros 30 minutos luego del aprendizaje por novedad o condicionamiento del miedo, tanto en el hipocampo como en otras regiones del cerebro involucradas en estos tipos de aprendizaje (Lepicard y cols., 2006; Radwańska y cols., 2010). Sin embargo, este aumento sería temporal,

puesto que se ha visto que luego de 6 horas la cantidad de la proteína CaMKIIN2 retorna a sus niveles basales (Radwańska y cols., 2010).

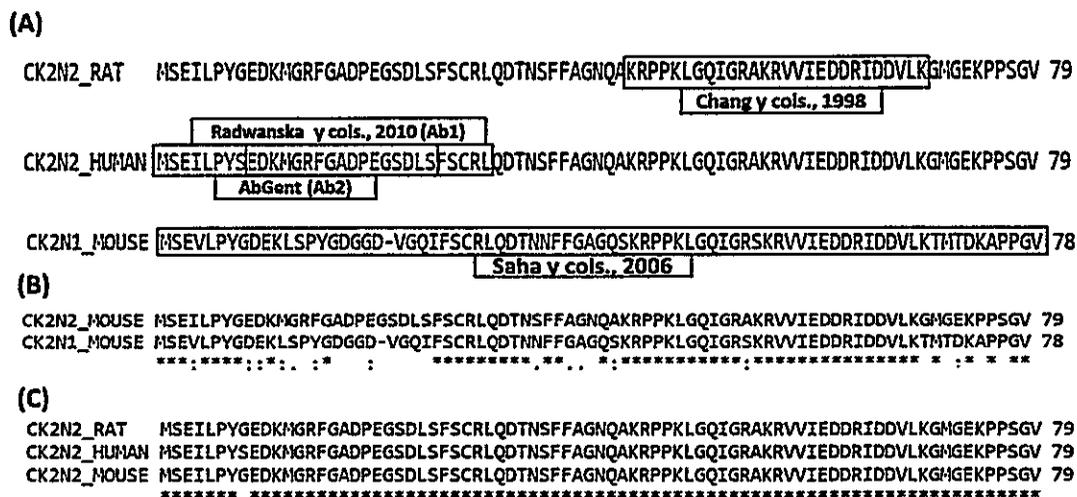


Figura 1. Secuencias aminoacídicas y alineamientos de CaMKIIN.

A) Secuencias aminoacídicas de CaMKIIN1 (Identificador UniProt: CK2N1) y CaMKIIN2 (Identificador UniProt: CK2N2) en distintas especies. El número a la derecha de cada secuencia representa la cantidad total de aminoácidos de la proteína. Se destaca en un recuadro la secuencia aminoacídica utilizada para diseñar el anticuerpo de la publicación y/o compañía mencionada bajo el recuadro. B) Alineamiento de las isoformas α y β de CaMKIIN de ratón. Los símbolos bajo los aminoácidos de cada alineamiento representan un residuo único completamente conservado (*), un residuo conservado con gran similitud entre sus propiedades (:), o un residuo conservado con baja similitud entre sus propiedades (.). C) Alineamiento de CaMKIIN- β de distintas especies. Se observa un alto grado de identidad aminoacídica para las isoformas de las especies mencionadas.

A partir de la región inhibitoria de CaMKIIN se han generado péptidos sintéticos ("péptidos CN") que mantienen la máxima potencia inhibitoria (Chang y cols., 1998). A estos péptidos se han adicionado secuencias aminoacídicas (Ej., Antennapedia, Tat) que permiten su internalización a las células (Vest y cols. 2007).

La aplicación transitoria de péptidos CN (*Ant-CN27* o *Tat-CN21*) produce una disminución persistente de la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo (**Figura 2(A)**; Sanhueza y cols., 2007; 2011). Más aún, este tratamiento facilita la posterior inducción de LTP, incluso en una vía previamente potenciada hasta la saturación (**Figura 3**; Sanhueza y cols., 2011). Una interpretación de estos resultados es que los péptidos estén revirtiendo procesos de LTP pre-existentes en la rebanada y también los inducidos experimentalmente. Una interpretación alternativa es que se esté produciendo un proceso de plasticidad homeostática global que tienda a compensar los cambios inducidos por actividad (Turrigiano y cols., 2004, 2012). En cualquiera de estos casos la expresión de CaMKIIN mantendría el rango dinámico de la transmisión y la LTP fuera de la saturación, permitiendo una recuperación del sistema.

Por otro lado, se ha mostrado que tanto CaMKIIN como los péptidos CN interfieren con la formación del complejo CaMKII/GluN2B *in vitro* (Vest y cols., 2007), y notablemente producen una disminución de la cantidad basal del complejo en las mismas rebanadas en las que se observó la depresión sináptica. (**Figura 2 (B)**, Sanhueza y cols., 2011).

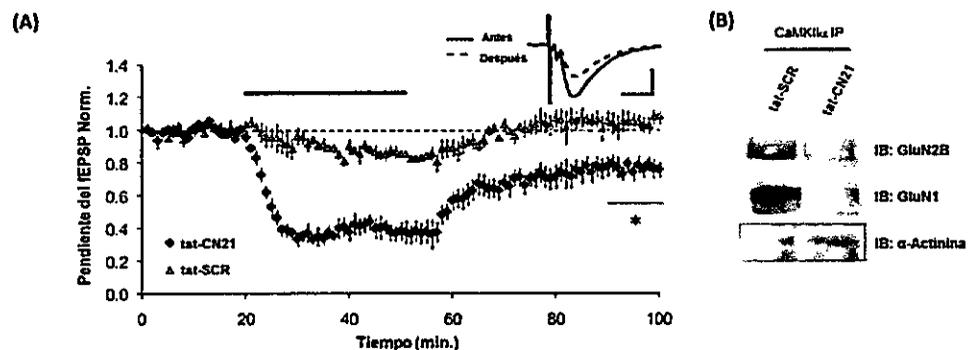


Figura 2. Tat-CN21 disminuye la transmisión sináptica basal y la cantidad de CaMKII unida al NMDAR.

(A) Registro de campo que muestra los efectos de la aplicación transitoria de tat-CN21 (20 μ M; \blacklozenge) sobre la transmisión basal en rebanadas de hipocampo (conexiones CA3-CA1), comparado con la aplicación de un péptido control tat-SCR (Δ). (B) En las mismas rebanadas de (A), la co-inmunoprecipitación de CaMKII muestra una menor cantidad de ésta enzima unida a GluN2B y a GluN1. (Sanhueza y cols., 2011).

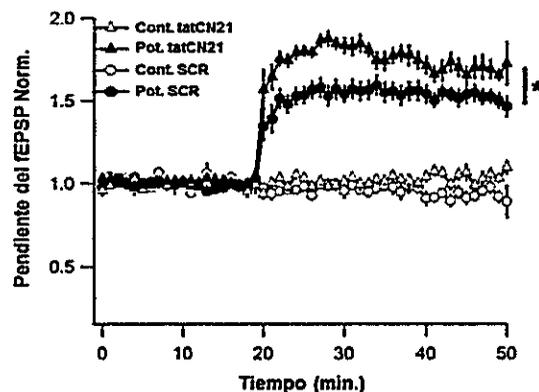


Figura 3. El tratamiento con Tat-CN21 permite inducir una LTP mayor.

Luego del tratamiento con tat-CN21, es posible inducir una LTP mayor que la observada luego del tratamiento con el péptido control tat-SCR. (Sanhueza y cols., 2011).

De esta forma, resulta necesario estudiar los efectos del tratamiento con estos péptidos sobre los elementos moleculares esenciales en la transmisión sináptica. Una posibilidad es que los efectos fisiológicos de los péptidos CN se deban a un bloqueo de la

acción enzimática de CaMKII sobre sus diferentes sustratos sinápticos (sitio T286 de la enzima, sitio S831 de GluA1, sitio de fosforilación de stargazina, etc.). Por otra parte, la componente persistente del efecto podría deberse a la desestabilización de complejos estructurales en la DPS que incluyan sitios de anclaje de los AMPAR, mediante la disrupción no reversible de la interacción de la quinasa con el NMDAR.

En el cerebro intacto, los aumentos transitorios (30 a 60 mins.) de CaMKIIN después del aprendizaje (Radwańska y cols., 2010) podrían mediar un reajuste (global o local) de la eficiencia sináptica y una recuperación de las propiedades plásticas de las sinapsis. Considerando la temporalidad de este fenómeno, resulta factible considerar que la expresión de CaMKIIN produzca modificaciones rápidas y transitorias en cantidades y/o fosforilaciones de proteínas directamente implicadas en la transmisión y plasticidad. Dentro de esto, los receptores glutamatérgicos y CaMKII son los principales candidatos para manifestar estos efectos. Así mismo, resulta natural considerar que una proteína expresada luego del aprendizaje pueda tener relación directa con procesos de LTP en el hipocampo.

HIPÓTESIS

El aumento transitorio de CaMKIIN provoca cambios en los niveles de CaMKII en la sinapsis, modificando la cantidad y composición de los receptores glutamatérgicos, en concordancia con la depresión sináptica y la facilitación de la LTP descritas. Este aumento de CaMKIIN se produce después de inducir LTP.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los efectos del aumento transitorio de la proteína CaMKIIN sobre el enriquecimiento sináptico de distintas subunidades de AMPARs y NMDARs, y sobre la abundancia y estado de fosforilación de CaMKII sináptica. Determinar si se producen cambios en los niveles de CaMKIIN luego de la inducción de LTP en el hipocampo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. *Determinar si el péptido Tat-CN21 derivado de CaMKIIN modifica, en la sinapsis:*
 - a.- *La cantidad total de CaMKII y su fosforilación en T286.*
 - b.- *Los niveles totales de GluA1 total y GluA2 de los AMPAR.*
 - c.- *La cantidad total de NMDAR, a través de cuantificaciones de la subunidad GluN1.*
 - d.- *La relación GluN2A/GluN2B de los NMDARs.*

2. *Determinar si hay cambios en los niveles de expresión de CaMKIIN luego de la inducción química de LTP (cLTP) dependiente de NMDAR en cultivo de rebanadas de hipocampo.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el primer objetivo se realizaron cuantificaciones de las subunidades de los receptores y de CaMKII en sinaptoneurosomas obtenidos de rebanadas de hipocampo incubadas con Tat-CN21. Se utilizó como control un péptido llamado tat-SCR, el cual posee la misma secuencia aminoacídica de CN21 pero desordenada, por lo que no mantiene ninguno de los efectos de tat-CN21.

Para el segundo objetivo se realizaron cuantificaciones del inhibidor CaMKIIN en distintas fracciones subcelulares, obtenidas a partir de rebanadas de hipocampo en cultivo, en los cuales se indujo una *LTP química* (cLTP). Para esto se utilizó el anticuerpo utilizado en el trabajo de Radwańska y cols. (2010), disponible comercialmente y cuyos resultados están publicados. Puesto que este anticuerpo para CaMKIIN no se ha utilizado en ratas, previamente se realizó una validación de éste utilizando diversas fracciones subcelulares de diferentes regiones cerebrales de rata.

Animales

Las preparaciones de ratas mencionadas a continuación se realizaron con animales de la cepa Sprague Dawley, provenientes del Vivero Central, Universidad Católica. En la preparación de ratón mencionada se utilizó la cepa de ratones C57/BL6, provenientes del mismo vivero.



Preparación de rebanadas agudas de hipocampo

Para esta preparación se utilizaron ratas de 18 a 22 días. Estas ratas fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron rápidamente removidos y mantenidos en *solución de disección fría* (en mM: 212.7 sacarosa, 2.6 KCl, 1.23 Na₂H₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 3 MgCl₂ y 1 CaCl₂), a 4° C y saturada con 95% O₂ y 5% CO₂. Utilizando un vibrátomo se obtuvieron entre 6 y 10 rebanadas de hipocampo (400µm de espesor) por rata.

Incubación de rebanadas agudas de hipocampo con péptidos

El protocolo de incubación de rebanadas hipocampales está basado en Gouet y cols. (2012), con algunas modificaciones. Las rebanadas agudas obtenidas fueron traspasadas a cámaras de interfaz (Falcon™ *cell culture inserts*), e inmersas en 100 µL de *líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA)*, en mM: 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 Na₂H₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 1.5 MgCl₂ y 2.5 CaCl₂), en un ambiente saturado con 95% O₂ y 5% CO₂, a 37°C, manteniéndose en esta condición por 1 hora para su recuperación. Las rebanadas provenientes del mismo animal se dividieron en un grupo experimental, en que fueron tratadas con el péptido *Tat-CN21* (20 µM), y en un grupo control, con rebanadas tratadas con el péptido control *Tat-SCR* (20 µM), que posee la misma composición aminoacídica que CN21, pero desordenada y por lo tanto no tiene acción inhibitoria ni afecta la interacción de CaMKII con NMDAR. Luego de 2 horas con este tratamiento, las rebanadas fueron lavadas con LCRA por 2 horas y congeladas en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

Obtención de sinaptoneurosomas

El protocolo de obtención de sinaptoneurosomas está basado en Johnson y cols. (1997) con modificaciones de Vyazovskiy y cols. (2008). Las rebanadas controles y experimentales fueron sonicadas en frío por 2 minutos en 1 mL de *buffer de resuspensión* (BR; en mM: 100 NaCl, 10 fosfato de sodio, pH 7.0, 10 Na₄PO₇, 50 NaF, 1 Na₃VO₄, 5 EDTA, 5 EGTA, cóctel inhibidor de proteasas, 1 μM caliculina, 40 nM cipermetrina). Este homogenizado se filtró 2 veces a través de 3 capas de nylon de 100 μm previamente humedecidos en BR, y luego fue filtrado nuevamente a través de un filtro hidrofílico de 5 μm, pre-humedecido en el mismo buffer. La muestra obtenida fue centrifugada a 1200 g por 10 minutos a 4°C. El pellet de sinaptoneurosomas se resuspendió en BR con 1% de SDS, y fue hervido durante 5 minutos, para luego ser congelado en nitrógeno líquido.

Inmunodetecciones en rebanadas incubadas con péptidos

Las inmunodetecciones se basan en el protocolo usado por Lee y cols. (2003). Se cargaron entre 10 a 20 μg de proteína en geles SDS-PAGE (8 %). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF, bloqueada con *buffer de bloqueo* (PBS con 1% BSA y 0.1% de Tween-20) a temperatura ambiente por 2 horas, e incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo primario (α-CaMKII, 1:2000; p-T286-α-CaMKII, 1:1000; GluA1, 1:1000; GluA2, 1:500; GluN1, 1: 4000; GluN2B, 1:4000; GluN2A, 1:2000; anticuerpos de Abcam, Cambridge, UK). Se utilizó β-actina (1:4000, Abcam) como control de carga. Se incubó con anticuerpo secundario (IgG Anti-Conejo, 1:1000 μg/mL; Abcam) por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Los blots fueron revelados usando un reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Pico Substrate

(Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) y expuestos a film BioMax (Kodak). El análisis de las bandas se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health).

Preparación de homogenizado, y fracciones subcelulares de distintas regiones cerebrales de rata y ratón.

La obtención de las muestras está basada en el protocolo desarrollado por Lee y cols. (2000). Todos los pasos que se mencionan a continuación se realizaron en frío. 2 ratas de 18 días fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por decapitación. Rápidamente se removieron sus cerebros en solución de disección fría y se extrajeron muestras de hipocampo, corteza, bulbo olfatorio y cerebelo. Cada uno de los tejidos mencionados fue homogenizado con un homogenizador vidrio-teflón en un volumen de BR 3 veces mayor a su peso húmedo, y posteriormente sonicado durante 2 minutos con pulsos cada 10 segundos (Vibra Cell, modelo VCX-400). Se extrajo una muestra de este homogenizado para los análisis posteriores. El homogenizado fue centrifugado a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. La muestra de sobrenadante (enriquecida en la fracción citosólica) fue separada del pellet (enriquecida en fracción de membranas) para analizarlas por separado. Las muestras de homogenizado y fracción citosólica fueron diluidas en BR con SDS 10%, mientras que el pellet obtenido fue resuspendido en BR con SDS 1%. Todas las muestras fueron hervidas por 5 minutos. Estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido para el posterior análisis. Para la preparación homogenizado y fracciones citosólica y de membrana de hipocampo de ratón se siguió el mismo protocolo. Para las rebanadas en las que se indujo cLTP se realizó el mismo protocolo desde la homogenización en adelante.

Preparación de densidades postsinápticas aisladas de hipocampo de rata

La preparación de densidades postsinápticas (DPS) que se utilizó para la validación del anticuerpo, se basa en la preparación descrita en Villasana y cols. (2006). Ellos describen dos protocolos diferentes, de las cuales usamos el protocolo para el rotor de tipo "swinging bucket". Todas las etapas de la preparación se realizaron en frío. Se extrajeron los hipocampos de 5 ratas Sprague Dawley de 30 días y se homogenizaron en 16 mL de *buffer de homogenización* (10mM HEPES, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 0.5mM DTT, cocktail inhibidor de proteasas (Sigma), pH 7.0) con un homogenizador de vidrio-teflón. Posteriormente, el homogenizado fue sonicado con 1 pulso cada 10 segundos durante 2 minutos (Vibra Cell, modelo VCX-400) y se tomó una muestra para posterior análisis. Este homogenizado fue filtrado, primero por 3 capas de filtro de nylon de 100 μm pre-humedecido con el buffer de homogenización, y luego por un filtro de 5 μm también pre-humedecido con la misma solución. La solución obtenida fue centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 4°C y se extrajo una muestra tanto del sobrenadante como del pellet (sinaptoneurosomas) obtenido para posterior análisis. El pellet fue resuspendido en 5mL de *solución buffer* (0.32 M sacarosa, 1 mM NaHCO₃, pH 7.0) y posteriormente diluido nuevamente en 5mL de *buffer de DPSs* (32 mM sacarosa, 12 mM Tris-HCl, 1% tritón X-100, pH 8.1). Esta solución se agitó en frío durante 15 minutos y luego se centrifugó a 33.000 g durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 50 μL de solución buffer. Se generó un gradiente 1 M/1.5 M de sacarosa cargando 500 μL de una solución conformada por 1,5 M sacarosa, 1 mM NaHCO₃ y encima de ésta 500 μL de otra solución conformada por 1.0 M sacarosa, 1 mM NaHCO₃, en tubos de rotor AH-650 swinging bucket, y sobre este gradiente se cargó el pellet resuspendido que se obtuvo en la centrifugación anterior. Esta muestra fue centrifugada durante 2 horas a 167.000 g a 4°C, y el

pellet obtenido (que se aprecia con dificultad) se resuspendió en 70 μ L de solución buffer. Luego de esto, esta muestra fue mezclada con 70 μ L de una solución 150 mM de KCl y 1% tritón X-100 y nuevamente centrifugada a 167.000 g por 30 minutos. Este pellet de DPSs fue resuspendido en 50 μ L de solución buffer y congelado para su posterior análisis.

Preparación de células HEK con plásmidos

El plásmido consiste en la secuencia de la proteína CaMKIIN2 descrita en Chang y cols. (1998) acoplada a una proteína fluorescente verde (eGFP) para poder monitorear la transfección, y fue donado generosamente por la Dra. Katherine Kalil. Previo al día de transfección se plaqueó $0,5-2 \times 10^5$ células HEK 293 en 500 μ L de medio de crecimiento sin antibióticos, para que las placas tuviesen 90-95% de confluencia. Para cada muestra de transfección se diluyó 4 μ g de DNA plasmidial en 50 μ L de "OPTI-MEM I Reduced Serum Medium" (u otro medio sin suero) y se mezcló suavemente. Se diluyó lipofectamina 2000 en 50 μ L de OPTI-MEM. Esto se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se combinó el DNA diluido con la lipofectamina diluida, y se incubó 20 minutos a TA. Se agregó 100 μ L de complejo a cada pocillo que contiene las células y se mezcló suavemente. Se incubaron las células a 37°C entre 18 y 48 horas para probar la expresión del transgen.

Inmunodetección de CaMKIIN2

Las inmunodetecciones se basan en el protocolo usado por Lee y cols. (2003). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry. Se cargó 20 μ g de proteína en geles SDS-PAGE (12%). Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a membranas de PVDF y éstas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente o durante

toda la noche a 4°C con *buffer de bloqueo* y posteriormente incubadas durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario, ya sea anti-CaMKIIN2-myc de humano (1:1000-1:500; AbDSerotec, también denominado *Ab1*, ver más adelante), o anti-CaMKIIN2 de conejo (1:1000; Abgent, también denominado *Ab2*, ver más adelante). Se utilizó β -actina (1:4000, Abcam) como control de carga. Se incubó con anticuerpo secundario Anti-myc-HRP (1:3000, Abcam) toda la noche a 4°C, o Anti-IgG-Conejo (1:4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Abcam) por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Los blots fueron revelados usando un reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Pico Substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) y expuestos a film BioMax (Kodak). El análisis de las bandas se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health). Para las detecciones de rebanadas en las que se indujo cLTP se realizó el mismo protocolo mencionado, con el anticuerpo de la empresa Abgent.

Preparación de rebanadas organotípicas de hipocampo

Esta preparación está basada en el protocolo descrito por De Simoni y cols. (2006). Para esta preparación se utilizaron ratas de 7 días de edad. Estas ratas fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron rápidamente removidos y mantenidos en *solución de disección para cultivo fría* (en mM: 200 sacarosa, 4 KCl, 26 NaHCO₃, 30 D-glucosa, 8 HEPES, 8 MgCl₂ y 1 CaCl₂) y saturada con 95% O₂ y 5% CO₂. Utilizando un vibrátomo se obtuvieron entre 6 y 12 rebanadas de hipocampo (350 μm de espesor) por rata. Las rebanadas se depositaron sobre la membrana (0.4 μm de diámetro de poro) de un inserto de cultivo de interfaz (Falcon™ cell culture inserts). Este inserto estaba suspendido sobre medio de cultivo MEM (Gibco) suplementado con: 25% suero equino, 1 mM glutamina, mezcla de antibióticos (0.1 mg/mL de estreptomicina, 0.1 KU/mL de penicilina, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina), 117 mM

NaCl, 5.3 mM KCl, 26.2 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM D-glucosa, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄. Las rebanadas se mantuvieron a 36°C en un incubador de CO₂ (5%), y el medio fue cambiado cada 2 días (Stoppini y cols., 1991; Sanhueza y cols., 2011).

Inducción farmacológica de LTP-química (cLTP) en rebanadas organotípicas

Los experimentos de cLTP se basan en el protocolo descrito en Otmakhov y cols. (2004). Luego de 10 a 12 días *in vitro* (DIV) las rebanadas organotípicas fueron trasladadas a un setup de registro en donde se mantuvieron en *LCRA para cultivo* (LCRA-cultivo, en mM: 124 NaCl, 2.5 KCl, 4 CaCl₂, 4 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, pH 7.4) saturado con una mezcla de 95%O₂ y 5%CO₂. Con el fin de corroborar la efectividad de la inducción de LTP se realizaron registros de campo en la región dendrítica del CA1 del hipocampo, estimulando cada 5 minutos antes, durante y luego de la inducción de LTP. Las rebanadas se mantuvieron en LCRA-cultivo por 30 minutos y durante este tiempo se registró la señal basal. Luego de esto se cambió esta solución por la de inducción de LTP (cLTP-LCRA, idéntica a LCRA-cultivo, pero sin MgSO₄ y con 50 µM de forskolina y 0.1 µM de rolipram) durante 20 minutos. Luego de la inducción, las rebanadas fueron mantenidas en LCRA-cultivo durante 1 hora y posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido, para a las inmunodetecciones.

RESULTADOS

Parte I: Inmunodetecciones en rebanadas agudas de hipocampo incubadas con tat-CN21

El uso de péptidos derivados de la secuencia inhibitoria de CaMKIIN2 nos ha permitido imitar los aumentos transitorios de esta proteína, que se producen con el aprendizaje (Radwańska y cols., 2010). Así mismo, es posible estudiar los efectos sobre proteínas clave de la sinapsis y entender de mejor forma las bases moleculares de los cambios en la transmisión y plasticidad sináptica observados luego de la aplicación temporal de estos péptidos (Sanhueza y cols., 2007).

Por medio de Western Blots se logró medir los cambios en diversas proteínas relevantes para la transmisión sináptica producto de la aplicación transitoria (2 horas de tratamiento y luego 2 horas de lavado) de tat-CN21 (péptido test), o tat-SCR (péptido control) en rebanadas de hipocampo.

Efecto de tat-CN21 sobre los AMPARs

Los AMPARs son los principales mediadores de la transmisión basal, uno de los procesos directamente afectados por la aplicación de tat-CN21. Por esta razón se midió el efecto de la incubación de las rebanadas con este péptido sobre las principales subunidades de los AMPARs presentes en la región CA1 hipocampal.

Se observó una disminución significativa de la subunidad de GluA1 sináptica (*test de Student* pareado: GluA1, $p < 0.01$, $N = 12$; *Figura 4*), pero no de la cantidad de GluA2, subunidad predominante de los AMPARs (*test de Student* pareado: GluA2, $p > 0.05$, $N = 10$; *Figura 5*).

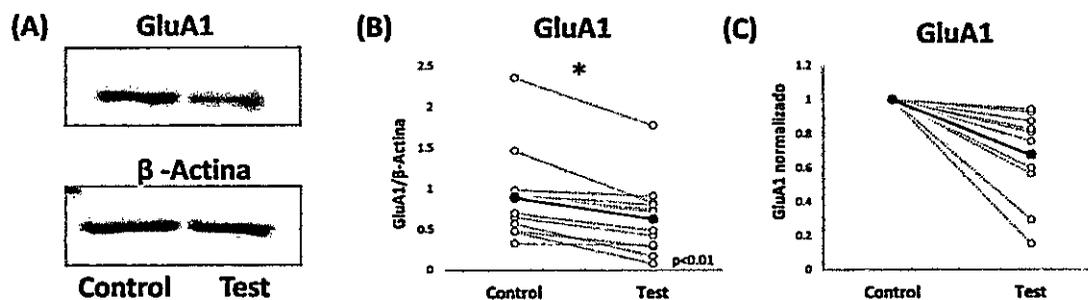


Figura 4. Tat-CN21 produce una disminución en la cantidad de GluA1 en las sinapsis.

(A) Detección de GluA1 en sinaptoneurosomas de rebanadas agudas de hipocampo preincubadas con tat-CN21 (Test) o tat-SCR (Control). (B) Cuantificación de las detecciones de GluA1, normalizadas respecto a la cantidad de β-actina presente en la misma muestra. Se observa una disminución significativa de la cantidad de GluA1 en las rebanadas tratadas con tat-CN21 (*test de Student* pareado: GluA1, $p < 0.01$, $N = 12$). (C) Normalización de los datos en (B) con respecto al control de cada réplica. En ambos gráficos las líneas punteadas representan cada par control-test de rebanadas pertenecientes al mismo animal y la línea continua representa el valor promedio para cada condición. Todas las Figuras que vienen a continuación en esta sección seguirán el mismo formato.

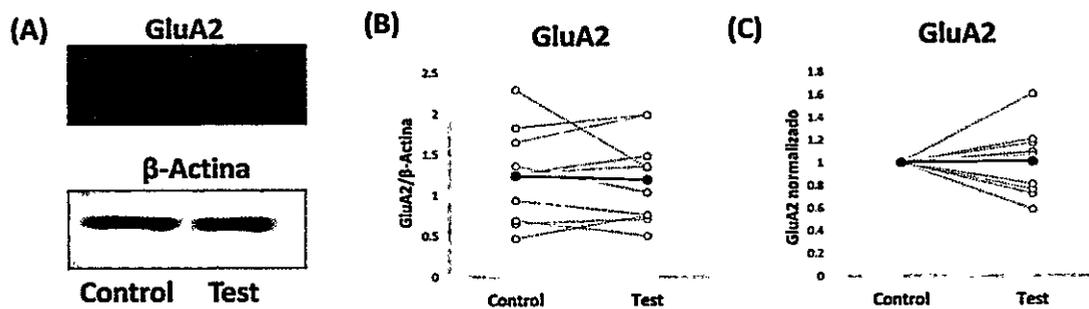


Figura 5. La cantidad de GluA2 no varía con el tratamiento con tat-CN21.

(A) Detección de GluA2. **(B)** Cuantificación de las detecciones de GluA2. **(C)** Normalización de los datos en (B). No se observa una diferencia significativa en la cantidad de GluA2 en las rebanadas tratadas con tat-CN21 comparada con el Control (*test de Student* pareado: GluA2, $p > 0.05$, $N = 10$).

Efecto de tat-CN21 sobre PSD95

PSD-95 es la proteína de andamiaje más abundante de las DPSs (Cheng y cols., 2006; Sheng y Hoogenraad, 2007). En este sitio, interactúa con una gran cantidad de proteínas, entre ellas con los NMDARs de forma directa, y con los AMPARs a través de TARPs (Bats y cols., 2007) y se considera un regulador de la eficiencia sináptica a través del control del número de AMPARs en la sinapsis (Chen y cols., 2000; Bats y cols., 2007). Para observar si la depresión permanente de la transmisión observada en experimentos previos (Sanhueza y cols., 2011) estaba asociada a una disminución de PSD-95 en sinapsis, se midieron los niveles de esta proteína en rebanadas tratadas con el péptido test o el control. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de la proteína PSD-95 en los sinaptoneurosomas de estos dos grupos de rebanadas (*test de Student* pareado: PSD-95, $p > 0.05$, $N = 10$; **Figura 6**), lo cual sugiere que los cambios en la cantidad de GluA1 en sinapsis no estarían relacionados con una disminución de esta proteína de andamio.

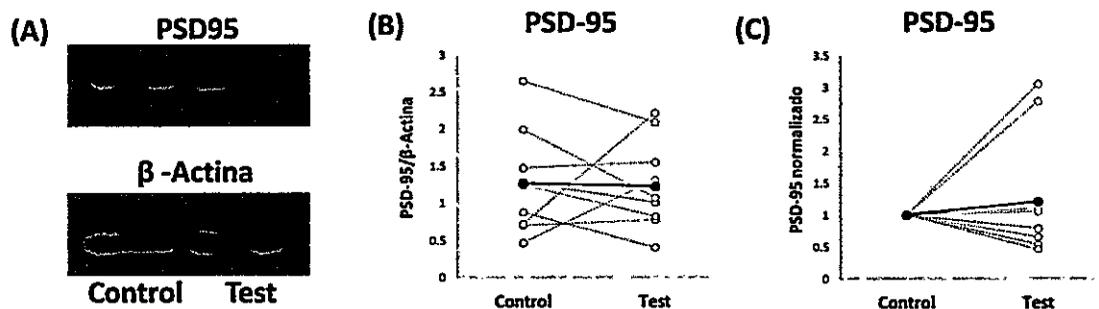


Figura 6. Tat-CN21 no afecta la cantidad total de PSD-95 en las sinapsis.

(A) Detección de PSD-95. **(B)** Cuantificación de las detecciones de PSD-95. **(C)** Normalización de los datos en (B). No se observa una diferencia significativa en la cantidad de PSD-95 en las rebanadas tratadas (*test de Student* pareado: PSD-95, $p > 0.05$, $N = 10$).

Efecto de tat-CN21 sobre los NMDARs

Dado que cambios tanto en la abundancia como en la composición de los NMDARs tienen importantes efectos sobre la LTP, se midieron los niveles de las subunidades GluN1, GluN2B y GluN2A en las membranas sinápticas de rebanadas de hipocampo luego del tratamiento con tat-CN21. Se observó que el péptido activo producía una disminución significativa en la cantidad de la subunidad GluN1 (*test de Student* pareado: GluN1, $p < 0.05$, $N = 10$; **Figura 7**), la que está presente en todos los receptores NMDAR, de modo que este resultado implica una disminución de la cantidad total de los NMDARs. La detección de las subunidades GluN2A y GluN2B con respecto a las cantidades de GluN1 en cada muestra revela un aumento significativo de la proporción de GluN2B en los receptores, sin observarse una diferencia significativa en la proporción de subunidades GluN2A (*test de Student* pareado: GluN2B/GluN1, $p < 0.05$, $N = 13$; **Figura 8**; GluN2A/GluN1, $p > 0.05$, $N = 13$; **Figura 9**).

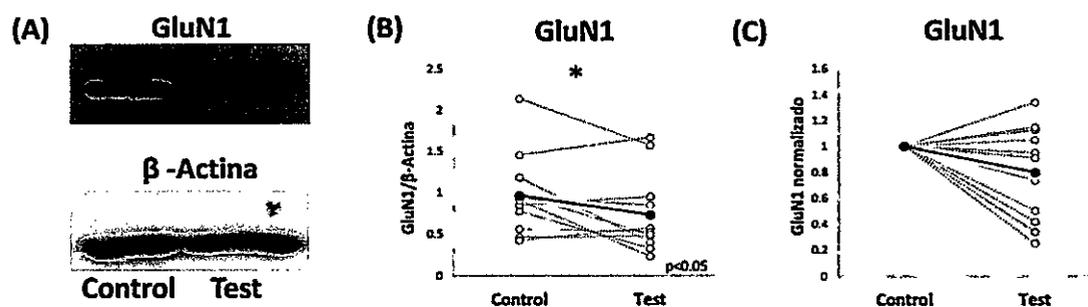


Figura 7. La cantidad de GluN1 y por tanto de los NMDARs, disminuye con el tratamiento con tat-CN21.

(A) Detección de GluN1. (B) Cuantificación de las detecciones de GluN1. (C) Normalización de los datos en (B). Se observa una disminución significativa de la cantidad de GluN1 en las rebanadas tratadas con tat-CN21 respecto a la tratadas con tat-SCR (*test de Student* pareado: GluN1, $p<0.05$, $N=10$).

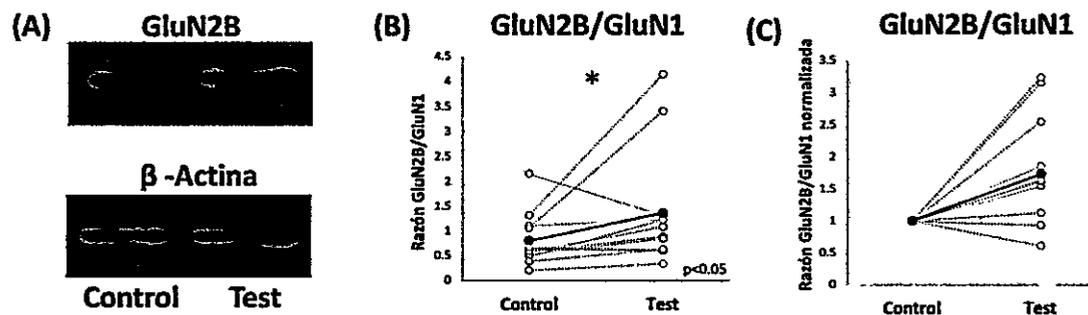


Figura 8. La proporción de GluN2B en los NMDARs sinápticos aumenta luego del tratamiento con tat-CN21.

(A) Detección de GluN2B. (B) Cuantificación de las detecciones de GluN2B sobre GluN1 de cada muestra respectiva. (C) Normalización de los datos en (B). Se observa un aumento significativo de la fracción de GluN2B respecto a GluN1 en las rebanadas tratadas (*test de Student* pareado: GluN2B/GluN1, $p<0.05$, $N=13$).

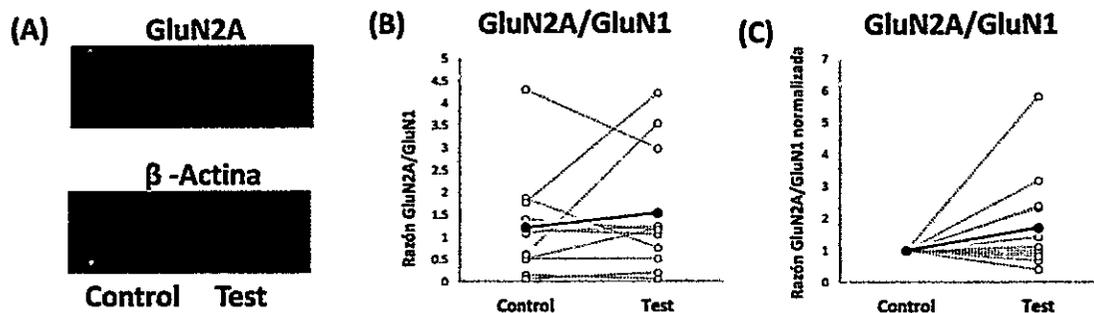


Figura 9. Tat-CN21 no altera la proporción de GluN2A en los NMDARs sinápticos.

(A) Detección de GluN2A. (B) Cuantificación de las detecciones de GluN2A sobre GluN1 de cada muestra respectiva. (C) Normalización de los datos en (B). No se observan cambios significativos en la fracción de GluN2A respecto a la GluN1 en las rebanadas tratadas presentes en estas muestras (*test de Student* pareado: GluN2A/GluN1, $p > 0.05$; $N = 13$).

Efecto de tat-CN21 sobre α -CaMKII sináptica

Puesto que CaMKIIN es una proteína inhibidora específicamente de la actividad catalítica de CaMKII y a su vez interferente de su interacción con GluN2B, se evaluó el efecto de tat-CN21 sobre la cantidad total de esta quinasa en sinapsis y además, sobre la fracción fosforilada de α -CaMKII en el sitio T286. Observamos que el tratamiento con el péptido tat-CN21 produjo una disminución sobre la fracción fosforilada, sin afectar la cantidad total de la enzima presente en los sinaptoneurosomas (*test de Student* pareado: α -CaMKII total, $p > 0.05$, $N = 11$; *Figura 10*; pT286- α -CaMKII/ α -CaMKII total, $p < 0.05$; $N = 7$; *Figura 11*).



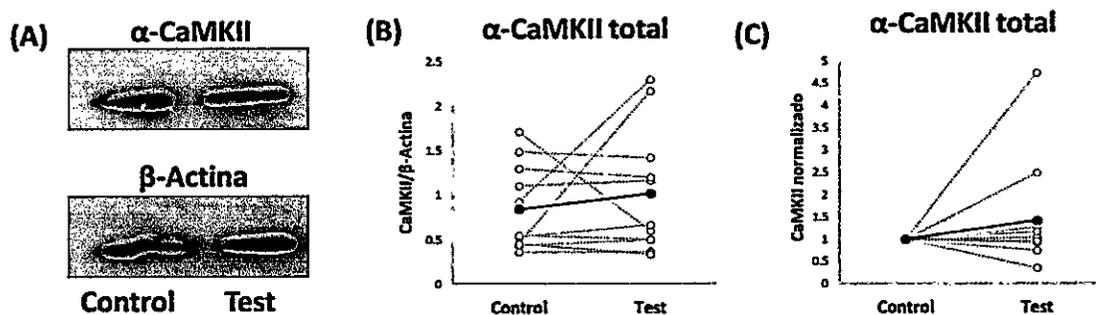


Figura 10. El tratamiento con tat-CN21 no afecta la cantidad total de α -CaMKII. (A) Detección de α -CaMKII total. (B) Cuantificación de las detecciones de α -CaMKII total. (C): Normalización de los datos en (B). No se observan cambios significativos de la cantidad de α -CaMKII en las rebanadas tratadas con tat-CN21 con respecto a su control (test de Student pareado: α -CaMKII total, $p > 0.05$, $N = 11$).

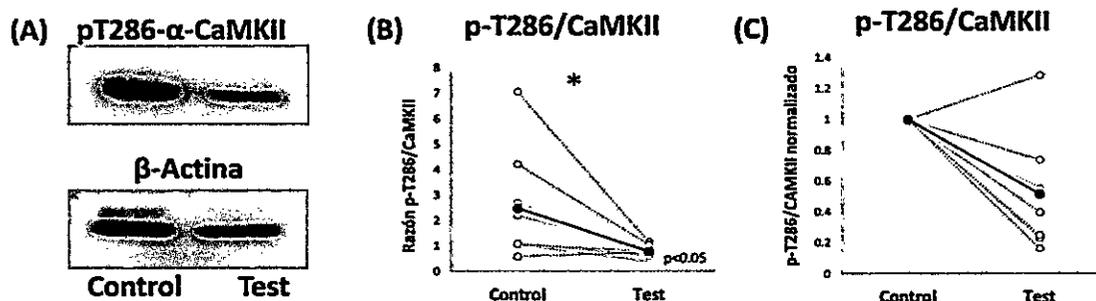


Figura 11. El tratamiento con tat-CN21 disminuye la fracción fosforilada en el sitio T286 de α -CaMKII. (A) Detección de la fracción fosforilada en el sitio T286 de α -CaMKII. (B) Cuantificación de las detecciones de pT286- α -CaMKII. (C) Normalización de los datos en (B). Se observa una disminución significativa de la fosforilación en el sitio T286 de α -CaMKII en las rebanadas tratadas con el péptido tat-CN21, con respecto a su control (test de Student pareado: pT286- α -CaMKII/ α -CaMKII total, $p < 0.05$; $N = 7$).

En resumen, se observó una disminución de la subunidad GluA1 de los AMPARs y de la cantidad total de los NMDARs en forma consistente con la depresión sináptica. Por otro lado, la mantención de PSD-95 y la desfosforilación del sitio T286 de CaMKII sugieren que la depresión no se debe a la remoción de PSD-95, sino posiblemente a otros cambios como la desfosforilación de blancos de la enzima, como por ejemplo stargazina. Por último, tanto la desfosforilación de CaMKII como el aumento relativo de la subunidad GluN2B podrían explicar la facilitación en la inducción de LTP. Estas observaciones reflejan un efecto potente y específico de tat-CN21 sobre elementos esenciales asociados tanto a la transmisión sináptica basal como a la inducción de LTP.

Parte II: Detecciones de CaMKIIN luego de LTP química

Inmunodetecciones de CaMKIIN2 endógena

Con el fin de determinar si hay cambios en la cantidad de CaMKIIN luego de la inducción de cLTP en rebanadas organotípicas de hipocampo de rata, se adquirió un anticuerpo comercial contra CaMKIIN2. Este anticuerpo, fabricado por la empresa AbDSerotec (que denominaremos **Ab1**), es el único anticuerpo comercial que ha sido utilizado en una publicación hasta la fecha (Radwańska y cols., 2010). La secuencia inmunogénica utilizada en la fabricación de este anticuerpo comprende desde el aminoácido 9 al 25 de la secuencia de CaMKIIN2 de humano. Dado que esta secuencia es idéntica en humano y rata (*ver Figura 1*) probamos este anticuerpo en muestras de homogenizados de hipocampo, corteza, cerebelo y bulbo olfatorio de rata, regiones en donde se observó la presencia de esta proteína en ratón en condiciones basales (Radwańska y cols., 2010). Sin embargo, no se observó ninguna banda en estas detecciones (datos no mostrados).

Se consideró la posibilidad de que la cantidad de CaMKIIN2 fuese muy baja para ser observada en una preparación de homogenizado, pero que esta proteína podría estar enriquecida en alguna fracción subcelular, razón por la cual se analizaron las fracciones de membranas (pellet) y citosólica (sobrenadante) tanto de hipocampo y corteza de rata, nuevamente sin observar banda alguna (datos no mostrados).

Considerando la posibilidad de que por alguna razón la reacción de este anticuerpo fuese especie-específica, se realizó una detección de CaMKIIN2 sobre una preparación de

homogenizado, pellet de membranas y sobrenadante de hipocampo de ratón. En este caso sí se observaron bandas, pero no cercanas al peso teórico descrito para este inhibidor (8kDa), sino que entre los 50 y 100kDa (*Figura 12*).

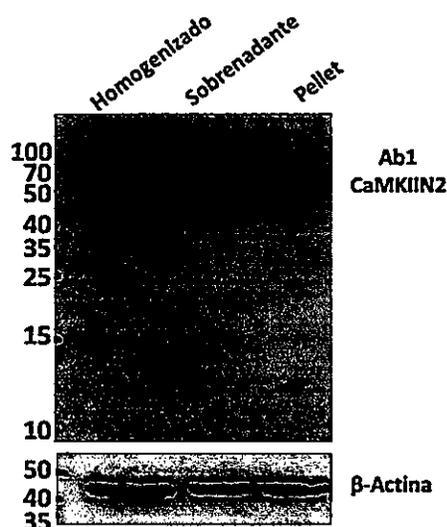


Figura 12. Detecciones con anticuerpo Ab1 contra CaMKIIN2 en hipocampo de ratón. La detección realizada con el anticuerpo Ab1 (Radwańska y cols. 2010) entregó varias bandas entre los 50 y 100kDa en las preparaciones de homogenizado, sobrenadante y pellet de membranas de hipocampo de ratón.

Por tanto, considerando la ausencia de bandas en preparaciones de rata (modelo a utilizar en esta tesis) con este anticuerpo, y además, la ausencia de bandas en ratón correspondientes al peso teórico de la proteína, se adquirió un nuevo anticuerpo contra CaMKIIN2 (que denominaremos *Ab2*). Este anticuerpo pertenece a la empresa ABGent, y utiliza como inmunógeno la secuencia entre los aminoácidos 1 y 30 de la CaMKIIN2 de humano, la cual difiere solamente en 1 aminoácido tanto con la secuencia de ratón y rata de CaMKIIN2 (*ver Figura 1*). La desventaja que presentaba el uso de este anticuerpo es que no

había sido utilizado en ninguna publicación, por lo cual tendría que ser validado. Adicionalmente, en la hoja de información del anticuerpo entregada por la empresa se aprecian 2 bandas, una alrededor de los 11kDa (señalada como CaMKIIN2) y una prominente banda cerca de los 35kDa, la que por no corresponder a lo reportado fue interpretada por la empresa como una banda inespecífica (comunicación personal).

Utilizando este último anticuerpo, se realizaron nuevamente inmunodetecciones sobre muestras de homogenizados de diferentes regiones cerebrales de rata. Estas detecciones mostraron una única banda alrededor de los 35kDa y no se observó ninguna banda alrededor de los 8kDa (*Figura 13*). Ya que aún no existe claridad sobre la identidad de la proteína la proteína de 35kDa detectada por el anticuerpo Ab2, en adelante ésta será denominada CaMKIIN2-35.

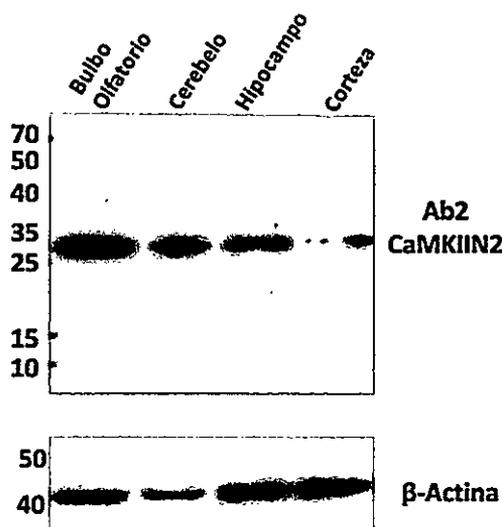


Figura 13. Detección con anticuerpo Ab2 contra CaMKIIN2 en muestras de homogenizado de diversas regiones de cerebro de rata.

Detección con anticuerpo Ab2 para CaMKIIN2 en muestras de homogenizado de bulbo olfatorio (Bulbo Olf.), cerebelo, hipocampo y corteza de rata. Se observa sólo una banda alrededor de los 35kDa, la cual se denominará CaMKIIN2-35.

Con el fin de investigar si Ab2 estaba realmente detectando a la proteína CaMKIIN2, en colaboración con el laboratorio de la Dra. V. Palma se desarrollaron muestras de células HEK en las que se transfeció un plásmido que permite la sobre-expresión de la secuencia de 79 aminoácidos (8kDa) deducida por Chang y cols. (1998). Esta proteína está fusionada a una proteína eGFP que permite corroborar la incorporación y expresión del inhibidor en dichas células. Como control de esta muestra se usó un grupo de células en las que sólo se introdujo un vector de sobreexpresión de eGFP, sin el inhibidor. La detección con Ab2 muestra sólo una banda sobre la muestra con CaMKIIN2 sobre-expresada, lo cual apoya fuertemente la especificidad del anticuerpo (*Figura 14*) y sugiere que la proteína detectada por Ab2 estaría relacionada con CaMKIIN2. Cabe mencionar que las detecciones en estas mismas muestras pero utilizando el Ab1 no mostraron ninguna banda (datos no mostrados).

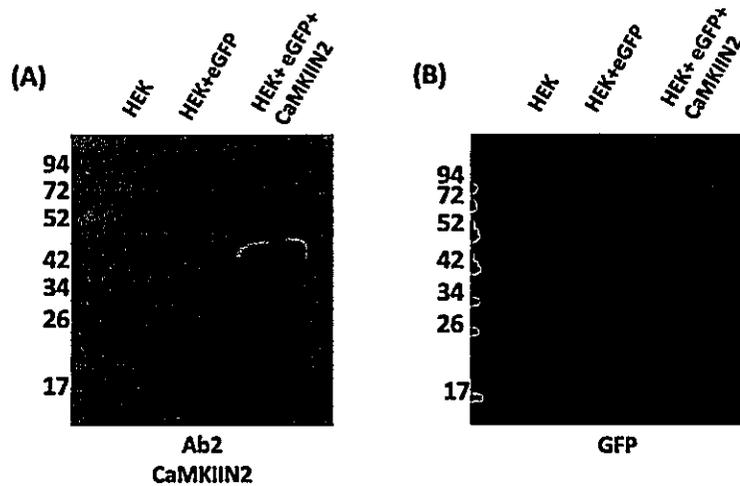


Figura 14. Test de especificidad de Ab2 en muestras de células HEK transfectadas con vector de sobreexpresión de CaMKIIN2.

(A) Ab2 fue utilizado en muestras de células HEK transfectadas con plásmidos que sobre-expresan la secuencia de CaMKIIN2 de 79 aminoácidos y/o eGFP. La detección fue positiva sólo en las muestras de células que expresaban CaMKIIN2 (B) Detección de eGFP en las mismas muestras mencionadas en (A).

Con este antecedente, se intentó determinar si la proteína de 8kDa pudiese observarse con Ab2 en alguna fracción subcelular. Para esto se realizó un fraccionamiento a partir de homogenizados de hipocampo y corteza de una rata P18. Esta separación permite obtener un pellet de membranas y un sobrenadante que correspondería a la fracción citosólica. Esta detección nuevamente mostró una sola banda alrededor de los 35kDa. Se observó además que la banda se veía más enriquecida para la fracción sobrenadante (citosólica) que para la de membranas (pellet), tanto en corteza como en hipocampo en condiciones basales (*Figura 15*).

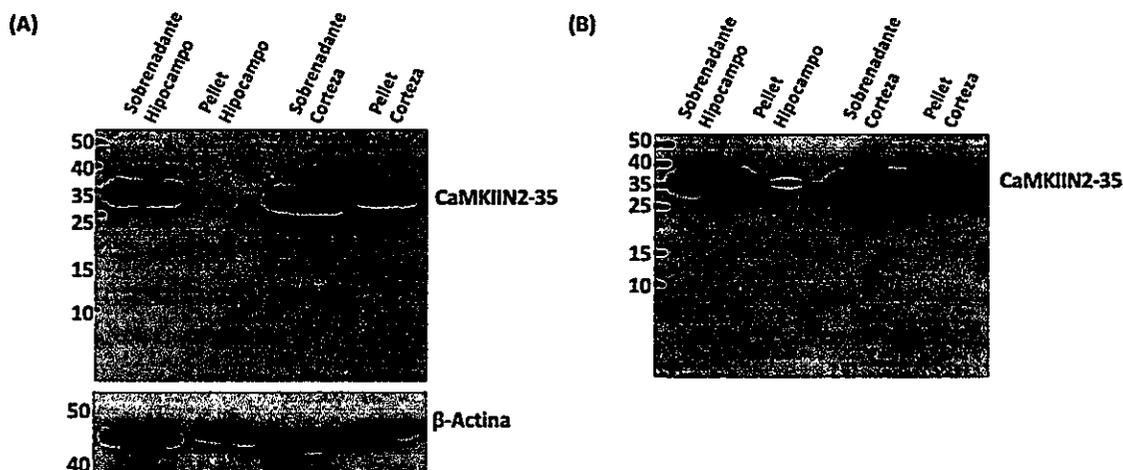


Figura 15. Detección con Ab2 de CaMKIIN2 en fracciones citosólica y de membranas en muestras de hipocampo y corteza.

Ab2 fue utilizado en muestras de sobrenadante y pellet de corteza e hipocampo de rata. Se observa una mayor marca para CaMKIIN2-35 en sobrenadantes que en los pellets tanto de corteza como hipocampo, a los 2 minutos (A) y a los 10 minutos (B) de exposición del film.

Luego de esto se consideró la posibilidad de que la proteína de 8kDa pudiese estar presente y/o enriquecida en las DPSs. Para investigar esta posibilidad se realizó una

preparación de DPSs de hipocampo de ratas basada en el protocolo de Villasana y cols., (2006). Nuevamente, se observó sólo la banda de 35kDa (**Figura 16**), la cual estaba presente a lo largo de todas las etapas de la purificación.

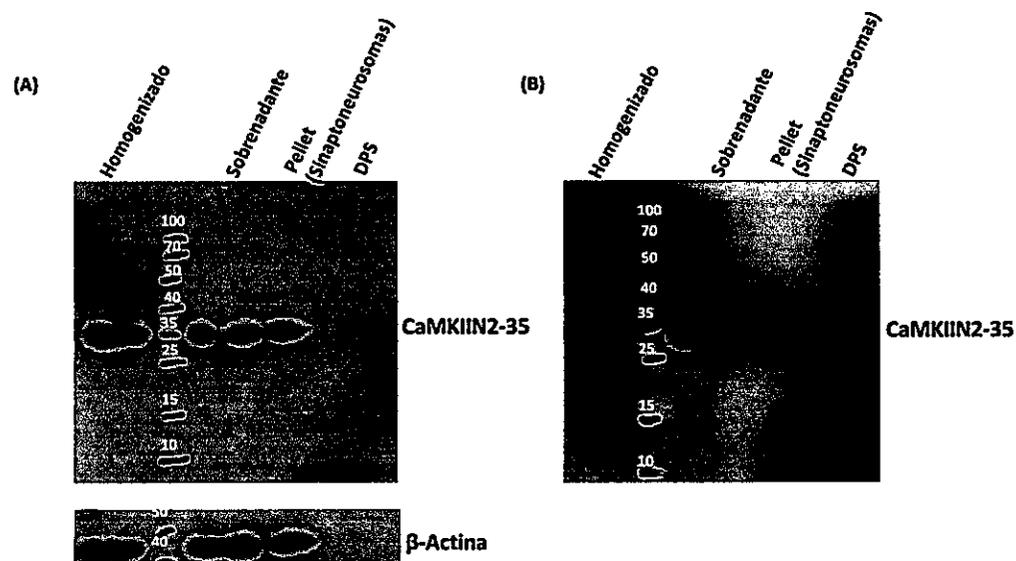


Figura 16. Detección de CaMKIIIN2 con Ab2 en muestras de preparación de DPSs de hipocampo.

Detección de CaMKIIIN2-35 en muestras de distintas etapas de la purificación de DPSs de hipocampo de ratas (homogenizado, sobrenadante, pellet de sinaptoneurosomas y DPSs purificadas) con 25 minutos (A) y 1 hora (B) de exposición del film. Se puede observar la presencia de la banda de CaMKIIIN2-35 en la fracción de DPSs.

Dado que en ninguna de las detecciones anteriores se observó la banda de 8kDa esperada para CaMKIIIN2, se consideró la posibilidad de que esta proteína pudiese tener mayores niveles de expresión a edades menores que P18, y que en edades como P18 o más, la cantidad de la proteína fuese casi nula. Por lo tanto, se realizaron detecciones en

homogenizados de hipocampo de ratas de 2, 7 y 12 días. En estas preparaciones tampoco se encontró la banda de 8kDa, sino sólo la de 35kDa (*Figura 17*).

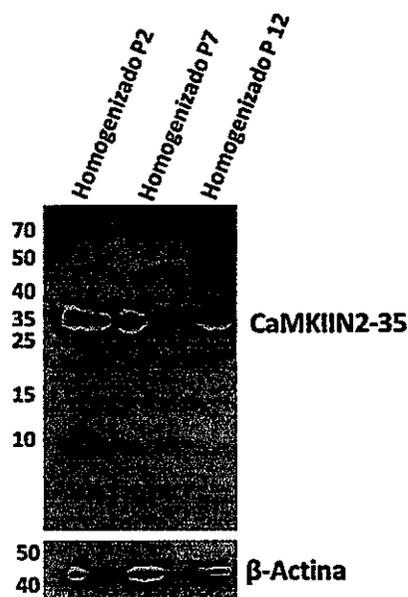


Figura 17. Detección de CaMKIIN2 con Ab2 en muestras de hipocampo de ratas de distintas edades.

Detección de CaMKIIN2-35 en muestras de homogenizado de hipocampo de ratas de P2, P7 y P12.

Todo esto indica que el anticuerpo Ab2 sólo reconoce una proteína de un peso mucho mayor al que fue descrito para esta proteína inhibitoria en los trabajos de Chang y cols. (1998, 2001) y Radwańska y cols. (2010). Estos resultados parecieran estar relacionados con los de Saha y cols. (2006) en donde se observa la presencia de una proteína de aproximadamente 35kDa en distintas fracciones subcelulares (incluyendo DPSs) de ratón. Finalmente, detecciones realizadas recientemente en muestras de hipocampo con este mismo anticuerpo usando geles

de tricina y en gradientes de 8-12% (Germán Fernández, en desarrollo) han mostrado el mismo resultado, sin evidenciar la banda de 8kDa.

Todo lo anterior sugiere que la secuencia de 79 aminoácidos, deducida por Chang y cols. (1998, 2001) a partir del cDNA de CaMKIIN2, podría ser más bien una parte de una proteína de mayor peso molecular o que podría formar oligómeros, o incluso que este anticuerpo pudiese estar detectando una isoforma no descrita de CaMKIIN2, de un peso molecular distinto de 8kDa.

Inducción farmacológica de LTP (cLTP) en rebanadas hipocampales organotípicas.

Con el objetivo de evaluar posibles cambios en la abundancia de CaMKIIN, se realizó la inducción de cLTP en rebanadas organotípicas de hipocampo, usando el protocolo de Otmakhov y cols. (2004). Las ventajas del uso de este protocolo en esta preparación son que se induce una LTP dependiente de NMDAR en forma masiva en la rebanada, y a su vez que es aplicable a varias rebanadas simultáneamente debido a que no requiere de estimulación eléctrica. Esta metodología de cLTP ha sido ampliamente usada para inducir LTP en una gran cantidad de sinapsis para realizar, por ejemplo, experimentos de imágenes (Kopec y cols., 2006; Kim y cols., 2008; Szepesi y cols., 2013). Esto permite tener un grupo de rebanadas estimuladas (cLTP) y otro grupo de rebanadas control, provenientes del mismo animal.

Se consideró un mínimo de 7 días *in vitro* (DIV) de mantención del cultivo hasta la inducción de cLTP puesto que en el trabajo de Stoppini y cols. (1991), en donde se describe el desarrollo de cultivos de rebanadas de hipocampo, no se logró inducir LTP por métodos

electrofisiológicos, por lo que se piensa que antes de esta fecha no se habrían recuperado las conexiones necesarias para lograr este fenómeno. Las rebanadas en las que se indujo cLTP tenían entre 10 y 12 días *in vitro*.

Para poder corroborar la efectividad del protocolo, durante las primeras 3 sesiones de inducción de cLTP se realizaron registros de los potenciales de campo en una de las rebanadas ubicadas en la cámara de registro. En la Figura 18 se muestra un ejemplo de la inducción de cLTP. Se observa un aumento del potencial de campo evocado luego de la aplicación del protocolo farmacológico (mezcla rolipram/forskollina durante 20 minutos, Figura 18). Este aumento en la transmisión se mantuvo por más de 40 min después del cambio de solución.

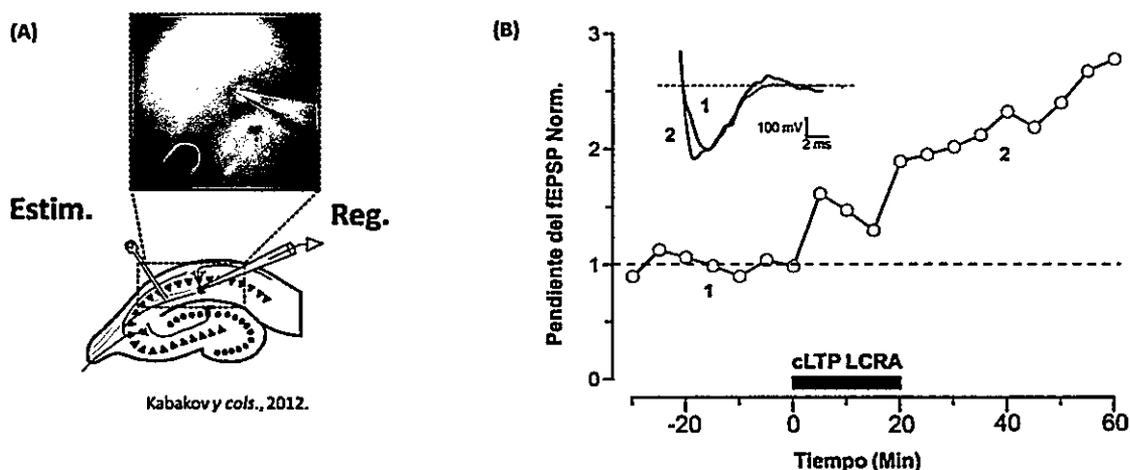


Figura 18. Inducción de cLTP en rebanadas organotípicas de hipocampo.

(A) Esquema del sistema de registro en rebanadas organotípicas (abajo) y fotografía de rebanada con los electrodos de estimulación y registro (*Stim.* y *Reg.* respectivamente). (B) Aumento en la transmisión sináptica luego de la inducción de cLTP, cuantificable por la medición de la pendiente del evocado antes, durante y después de la inducción. La pendiente post-LTP fue normalizada a la pendiente antes de la inducción.



A continuación, se realizaron las detecciones de CaMKIIN2-35 en las rebanadas organotípicas de hipocampo que fueron sometidas al protocolo de inducción de cLTP (test) y se comparó con la cantidad de CaMKIIN2-35 de las rebanadas control, las que sólo se mantuvieron en una solución LCRA (LCRA-cultivo, ver *Materiales y Métodos*) durante el mismo tiempo. Estas detecciones se realizaron sobre el homogenizado, y además las fracciones de sobrenadante y precipitado, por si se observase un aumento de la proteína específicamente en alguna de las fracciones mencionadas (*Figura 19*). Se observó un aumento significativo de la cantidad de CaMKIIN2-35 presente en los pellets de membranas de las rebanadas tratadas mientras que no se observaron cambios significativos en las muestras de homogenizado ni en las muestras de sobrenadante citosólico.

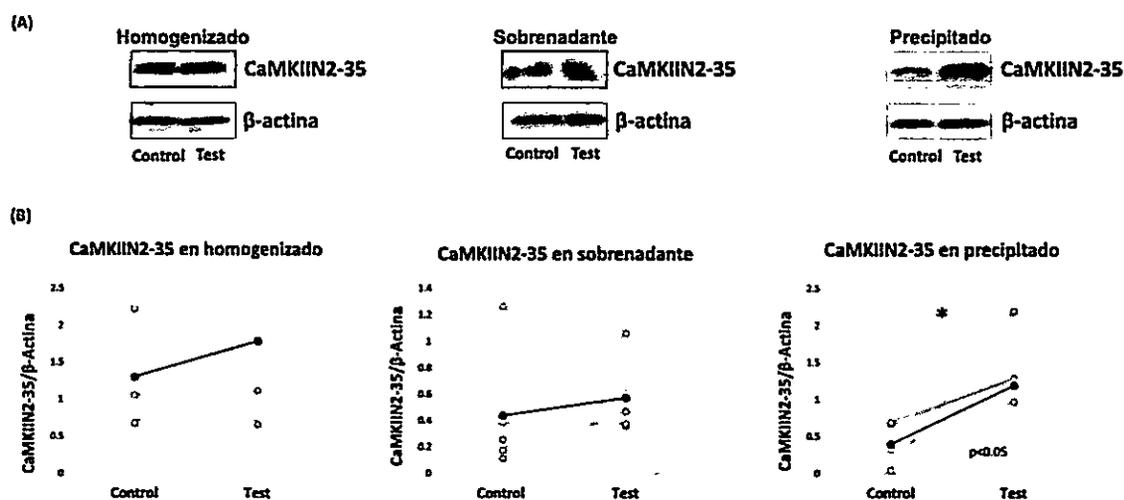


Figura 19. La inducción de cLTP produce un aumento de CaMKIIN2-35 en las membranas de rebanadas organotípicas de hipocampo.

(A) Detecciones de CaMKIIN2-35 en homogenizado, sobrenadante (fracción citosólica) y pellet (fracción de membranas) de rebanadas organotípicas sometidas al protocolo de cLTP (Test), y comparadas con rebanadas tratadas con LCRA (Control). (B) Cuantificación de CaMKIIN2-35 en homogenizado, sobrenadante (fracción citosólica) y pellet (fracción de membranas) de rebanadas organotípicas. Cada par corresponde a rebanadas del mismo animal. Se observa un aumento significativo en la cantidad de CaMKIIN2-35 presente en los pellets de membranas de las rebanadas en las que se indujo cLTP (*test de Student* pareado, Homogenizado: $p > 0.05$, $N = 3$; Sobrenadante: $p > 0.05$, $N = 5$; Pellet: $p < 0.05$, $N = 4$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten profundizar en los mecanismos moleculares asociados a los efectos del péptido CN21 sobre la transmisión sináptica y también a fortalecer la propuesta de un rol regulatorio de la transmisión y plasticidad sináptica por parte de la proteína CaMKIIN. Adicionalmente, permiten aportar información relevante y no menos controversial respecto a ciertos aspectos de esta proteína.

Los péptidos desarrollados a partir de la secuencia inhibitoria de CaMKIIN han sido esenciales para poder realizar las indagaciones a nivel sináptico sobre el papel de esta proteína inhibitoria endógena de CaMKII. Resultaba necesario encontrar un correlato molecular que ayudase a entender de mejor forma los efectos de tat-CN21 sobre la transmisión sináptica basal y la inducción de potenciación. En cuanto a los efectos de este péptido sobre los receptores glutamatérgicos, la disminución de la cantidad de la subunidad GluA1 en sinaptoneurosomas de rebanadas hipocampales tratadas con tat-CN21 es un hallazgo de alta relevancia y a su vez concordante con los efectos del péptido sobre la transmisión sináptica basal (Sanhueza y cols., 2011). Más aún, si consideramos que este péptido no tuvo efecto sobre la subunidad GluA2, subunidad presente en la gran mayoría de los AMPARs en el hipocampo, resulta incluso más relevante este hallazgo, puesto que implica un efecto específico del péptido sobre la subunidad GluA1. La transmisión sináptica basal está mediada principalmente por los receptores de tipo AMPA, por lo que una disminución en ésta podría ser atribuida a una disminución en la cantidad de estos receptores en las sinapsis. Sin embargo, los resultados

respecto a este receptor indican que no habría un efecto sobre todos los receptores, sino más bien un efecto específico sobre aquellos que contienen GluA1, subunidad asociada a fenómenos de LTP (Plant y cols. 2006; Hayashi y cols., 2000). Es posible que tat-CN21 afecte sólo a los homómeros de GluA1 que estén presentes basalmente en la sinapsis, favoreciendo su salida de esa región, sin alterar la cantidad de AMPARs que contengan la subunidad GluA2. A su vez, es posible que este efecto esté asociado, por ejemplo, a un recambio de receptores GluA1-GluA2 por GluA3-GluA2. Sería necesario medir el efecto del péptido sobre la subunidad GluA3 para confirmar o descartar esta posibilidad.

La disminución de la subunidad GluN1, presente en todos los NMDARs, implica una disminución de la cantidad total de estos receptores. Interesantemente, los efectos sobre la composición de los NMDARs podrían estar asociados más bien con los efectos de la aplicación de tat-CN21 sobre la potenciación de la transmisión. Se observó un aumento significativo de la cantidad de la subunidad GluN2B respecto a la cantidad total de GluN1 presente en estas muestras. Este efecto podría estar dando cuenta de algún tipo de mecanismo compensatorio de la plasticidad, en donde las nuevas subunidades GluN2B incorporadas a la sinapsis permitan que, en una posterior inducción de LTP, sea posible tener una mayor cantidad de CaMKII unida a la sinapsis, lo cual es concordante con la observación de la inducción de una mayor LTP luego del tratamiento con tat-CN21 (*Figura 3*).

De acuerdo a los resultados observados, sería posible considerar la interacción CaMKII-GluN2B como algún tipo de señal molecular cuya disociación o formación tenga efectos dramáticos sobre otros blancos moleculares, lo cual no resulta extraño de considerar, puesto

que se ha visto que esta interacción es esencial para la inducción de LTP (Barria y Malinow, 2005; Zhou y cols., 2007) y también es relevante para la mantención de la transmisión basal (Sanhueza y cols., 2011). En neuronas en cultivo se ha visto que la sobreexpresión de GluN2B-NMDARs inhibe la expresión en superficie de la subunidad GluA1 de los AMPARs (Kim y cols., 2005). De esta forma, es posible también que el efecto específico sobre la subunidad GluA1 de los AMPARs no tenga relación directa con la aplicación del péptido, sino más bien sea un efecto posterior derivado del aumento de la subunidad GluN2B.

Los efectos sobre CaMKII observados en los sinaptoneurosomas hipocampales luego del tratamiento con tat-CN21 apoyan aún más la idea de un rol regulatorio de CaMKIIN en la sinapsis. Nuestros resultados muestran que tat-CN21 produce una disminución específicamente en la fosforilación del sitio T286 de CaMKII, sin verse alterada la cantidad total de CaMKII luego del tratamiento. En los experimentos enzimáticos *in vitro* realizados por Vest y cols., (2007) tanto con la proteína completa CaMKIIN como con sus péptidos derivados (péptidos CN) se observó sólo un efecto débil sobre la autofosforilación del sitio T286, por lo que la disminución de la fosforilación que observamos en nuestros experimentos no tendría relación con un impedimento en dicha capacidad de la quinasa. Es posible que la disrupción del complejo CaMKII-GluN2B, producto de la presencia de tat-CN21, facilite la acción de algún elemento presente en la sinapsis capaz de desfosforilar este sitio. Un posible candidato sería la fosfatasa PP1, que está presente en la sinapsis y es capaz de desfosforilar el sitio en cuestión, pero su acción se ve disminuida cuando CaMKII y GluN2B están interactuando (Mullaseril y cols., 2007; Cheriyan y cols., 2011) . Interesantemente, la cantidad de CaMKII presente en los sinaptoneurosomas no disminuye, por lo que la disrupción de su interacción con GluN2B por

tat-CN21 podría no estar removiéndola de la sinapsis por completo, lo cual es consistente con reportes de la interacción de CaMKII con otras proteínas de la sinapsis (Hell, 2014). Esta quinasa “remanente” también podría explicar la posibilidad de inducir una mayor LTP luego del tratamiento con tat-CN21, puesto que la inducción podría permitir la unión tanto de CaMKIIs remanentes como de nuevas holoenzimas a subunidades GluN2B sinápticas que, como lo indican nuestros resultados, también aumentan su cantidad luego de este tratamiento.

La disminución de la fosforilación del sitio T286 de CaMKII por la presencia de tat-CN21 también podría estar afectando otros blancos de esta quinasa. Se ha visto que la actividad sináptica promueve el atrapamiento sináptico de los AMPARs (Ehlers y cols., 2007) y que esta inmovilización depende de la actividad de CaMKII (Opazo y cols., 2010). De esta forma, una disminución en la cantidad de CaMKII activa afectaría la fosforilación de stargazina, y disminuiría la inmovilización de los AMPARs en la sinapsis.

Puesto que el aumento de PSD-95 induce un reclutamiento de AMPARs en las sinapsis (Schnell y cols., 2002), quisimos evaluar si en nuestros experimentos la disminución en GluA1 se correlacionaba con una reducción de esta proteína de andamio. La ausencia de cambios en la cantidad de PSD-95, en conjunto con los demás resultados observados, reafirma la idea de que los efectos del péptido sobre la transmisión (o bien de CaMKIIN sobre las sinapsis) podrían estar asociados a un desensamblaje y/o reorganización de la maquinaria molecular sináptica que no involucre la pérdida de PSD-95.

Respecto a las detecciones de CaMKIIN en rebanadas hipocampales organotípicas en las que se indujo cLTP, la etapa de validación del anticuerpo resultó más compleja y extensa que lo esperado. En una primera instancia se adquirió el único anticuerpo comercial contra CaMKIIN2 (AbDSerotec) que ha sido utilizado en una publicación (Radwańska y cols., 2010). En dicha publicación este anticuerpo fue validado por medio de Western Blots usando una muestra de homogenizado de hipocampo de ratón, en donde se observó una banda de aproximadamente 11kDa (la que se asoció con CaMKIIN2), y en varias otras regiones cerebrales de la misma especie por medio de inmunohistoquímica. La ausencia de bandas en nuestras detecciones en diferentes regiones cerebrales de rata resulta bastante extraña puesto que las secuencias aminoacídicas de reconocimiento del anticuerpo son idénticas para ambas especies (*ver Figura 1*). Más aún, la detección de una banda de mayor peso molecular que la descrita por Radwańska y cols. (2010), con este mismo anticuerpo sobre homogenizado de hipocampo de ratón, permite considerar la posibilidad de que CaMKIIN2 sea una proteína más grande de lo que fue originalmente descrito o que pueda oligomerizar. Sin embargo, la ausencia de la banda de 8kDa en nuestra detección pero no en el trabajo de Radwańska y cols. (2010), es un asunto no resuelto.

Posteriormente, se adquirió el anticuerpo de la marca AbGent que contaba con el precedente de que en la misma hoja de información del anticuerpo se podía observar la presencia de una banda de 8kDa y otra alrededor de 35kDa. En nuestras preparaciones de distintas regiones cerebrales de rata y en distintas fracciones subcelulares, este anticuerpo mostró una única banda cercana a los 35kDa. Por tratarse de algo desconocido, la compañía informaba que esta banda correspondía a un reconocimiento inespecífico del anticuerpo. La

posterior detección de una banda a partir de la muestra de células HEK con la proteína de 8kDa sobre-expresada resulta clave para considerar que la banda de 35kDa no es simplemente un reconocimiento inespecífico, sino que se trata efectivamente de la proteína CaMKIIN2. Esto sugiere que esta proteína sería de mayor tamaño al que originalmente fue deducido desde el cDNA de CaMKIIN2 por Chang y cols., (1998). Lo anterior podría tener relación a su vez con lo observado por el grupo de Saha y cols. (2006, 2007) respecto a que sus detecciones sobre CaMKIIN1 también muestran una única banda de alrededor de 35kDa. Esta diferencia de tamaño molecular podría deberse a fenómenos de *splicing* alternativo o incluso a la formación de oligómeros de la proteína.

La presencia de CaMKIIN2-35 sería a su vez ubicua, estando presente tanto en la fracción de sobrenadante citosólico como en pellets de membranas en condiciones basales de actividad. Sin embargo, nuestros resultados muestran que estaría presente en mayor cantidad en la fracción sobrenadante. De esta forma, en condiciones basales de actividad CaMKIIN podría estar mayoritariamente alejada de las sinapsis. Nuestros resultados también coinciden con los del grupo de Saha y cols. (2006, 2007), en cuanto a la presencia de CaMKIIN en preparaciones de densidades postsinápticas (DPS) aisladas. Este último hallazgo resulta muy interesante puesto que se diferencia de lo reportado por Chang y cols. (2001), quienes no observaron presencia de CaMKIIN en espinas de neuronas hipocámpales de cultivo. Las implicancias de este hallazgo son importantes, ya que CaMKIIN podría interactuar con otras u otras proteínas en la sinapsis. Podría ser el caso que incluso interactúe en esta región con la misma CaMKII. En nuestros experimentos de incubación con tat-CN21, la cantidad de α -CaMKII presente en los sinaptoneurosomas no se veía alterada por el tratamiento, incluso después de

la remoción del péptido. Dentro de este sistema, no es posible determinar si luego del lavado aún existe un remanente de péptido dentro de la célula que se mantiene unido a CaMKII y que, si bien es capaz de deshacer la interacción con GluN2B, no necesariamente impida que CaMKII permanezca unida a otros elementos de la DPS.

En cuanto a las detecciones de la cantidad de CaMKIIN2-35 de las rebanadas organotípicas de hipocampo, en primer lugar resulta valioso haber logrado detectar a la proteína en esta preparación, puesto que la cantidad de tejido de que se dispone es baja. En este contexto, resulta más valioso aún observar un aumento significativo en la cantidad de CaMKIIN2-35 presente en los pellets de membranas de las rebanadas organotípicas en las que se indujo cLTP, respecto a las rebanadas en las que no se indujo LTP. Dado que nuestros resultados muestran que sin inducir LTP ya existe una cantidad basal de CaMKIIN2-35 tanto a nivel citosólico como a nivel de membranas, el aumento observado sugiere una relocalización o incluso una síntesis de la proteína y su destinación a las sinapsis producto de un aumento de actividad sináptica, posiblemente favoreciendo de esta forma los efectos que ya observamos sobre los receptores glutamatérgicos y CaMKII.

Si bien nuestros resultados muestran que el protocolo de LTP utilizado produce cambios de la cantidad de CaMKIIN por lo menos en una de las fracciones celulares cuantificadas, se debe hacer notar que no en todas las rebanadas que inicialmente fueron registradas observamos una potenciación de la transmisión. De acuerdo a esto, existe la posibilidad de que el protocolo que estamos utilizando no produzca un efecto homogéneo en todas las rebanadas en las que se aplica, pero de esta misma forma, el hecho de no observar potenciación

precisamente en la rebanada registrada no implica necesariamente que en las demás rebanadas presentes en la cámara no haya habido efecto.

Nuestro protocolo de generación de rebanadas organotípicas de hipocampo, basado en el protocolo desarrollado por De Simoni y cols., (2006), carece de 2 elementos que sí están presentes en el protocolo descrito por Otmakhov y cols. (2004), en donde se desarrolla la técnica de cultivo organotípico y cLTP, y cuya ausencia podría estar afectando a la homogeneidad de la expresión de la LTP. Por una parte, el protocolo de Otmakhov y cols. (2004) incluye insulina en el medio de cultivo, la cual tendría como función disminuir la actividad de la rebanada durante su crecimiento *in vitro* por medio de la inducción de una depresión a largo plazo (Huang y cols., 2003). Por otra parte, los registros de actividad realizados en Otmakhov y cols. (2004), previa y posteriormente a la inducción de cLTP, se realizan con un LCRA-cultivo que contiene 2-cloroadenosina, un agonista selectivo de los receptores A1 de adenosina utilizado para disminuir tanto la respuesta espontánea en ráfaga (burst) así como las respuestas polisinápticas (Hayashi y cols., 2000). Si bien existen trabajos en los que se ha logrado inducir cLTP de forma exitosa sin estos compuestos (Kopec y cols., 2006; Kim y cols., 2008), existe la posibilidad de que la ausencia de estos efectos depresores de la actividad sináptica basal, durante el desarrollo del cultivo y/o durante el registro de campo, impidan observar en nuestro sistema un efecto mucho más dramático en la actividad sináptica de la rebanada al inducir la cLTP, tal como el observado en el trabajo de Otmakhov y cols. (2004). Finalmente, uno de los factores más importantes respecto al protocolo de Otmakhov y cols. (2004) que podría ser muy relevante para nuestros resultados, nos fue revelado recientemente en una comunicación personal con el autor de éste trabajo: la ausencia de

glucosa en las soluciones de LCRA descritas en aquel trabajo (y que nosotros hemos replicado) es simplemente un error de escritura, puesto que los experimentos sí se llevaron a cabo con soluciones que contenían este componente. De esta forma, si bien era posible observar una respuesta evocada en las rebanadas organotípicas en estas condiciones de registro, es altamente probable que la salud de las rebanadas se haya visto afectada desde el momento en que eran colocadas en la cámara de registro en adelante.

Este trabajo logra responder varias preguntas importantes en cuanto a CaMKIIIN y algunos de sus efectos en la sinapsis, pero también quedan muchas preguntas por responder. Como continuación de éste trabajo utilizaremos un nuevo anticuerpo para CaMKIIIN2 que reconoce una secuencia aminoacídica distinta a la de los 2 anticuerpos utilizados en esta tesis. Haremos su validación y luego lo utilizaremos en las fracciones celulares y detecciones en rebanadas organotípicas en las que se induzca cLTP, usando esta vez las condiciones óptimas que emulan las condiciones de Otmakhov y cols. (2004).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten reafirmar la posibilidad de que CaMKIIN sea efectivamente una proteína de mayor tamaño al originalmente descrito en el trabajo fundacional en donde se describe a este inhibidor y que además, en condiciones basales de actividad, no sólo estaría presente en la fracción citosólica, sino también en la fracción de membranas e incluso en las densidades postsinápticas del hipocampo.

La inducción de LTP produciría un aumento de la cantidad de CaMKIIN en las membranas sinápticas del hipocampo, lo cual proporcionaría al inhibidor una ubicación privilegiada a través de la cual se facilitaría su acción interferente con la interacción entre CaMKII y GluN2B (Sanhueza y cols., 2011), favoreciendo fenómenos de recambio de subunidades de los actores esenciales para la transmisión y plasticidad sináptica, como lo son los AMPARs y los NMDARs. Proponemos que la disrupción del complejo CaMKII-GluN2B permite la desfosforilación persistente de T286, un sitio fundamental para la inducción de LTP de la quinasa más abundante de la sinapsis, lo que evitaría la saturación de la plasticidad y la mantención de la transmisión en un rango dinámico.

La presente investigación entrega información nueva y altamente relevante en cuanto a las características moleculares de una proteína muy poco estudiada, y cuyos efectos sobre los elementos moleculares de la sinapsis, dan cuenta de un rol fundamental en la regulación de la transmisión sináptica glutamatérgica y la plasticidad en el hipocampo.

BIBLIOGRAFÍA

- Barria, A., Derkach, V., Soderling, T. R., (1997). *Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate type glutamate receptor*. The Journal of Biological Chemistry, 272: 32727–32730.
- Barria, A., Malinow, R., (2005). *NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII*. Neuron, 48: 289-301.
- Bats., C., Groc, L., Choquet, D., (2007). *The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking*. Neuron, 53: 719–734.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O'Leary, H., Schulman, H., De Koninck, P., (2006). *Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B*. The Journal of Neuroscience, 26: 1164–1174.
- 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: 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: 767–777.
- Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., (2000). *Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms*. Nature, 408: 936 –943.
- Cheng, D., Hoogenraad, C.C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M.A., Duong, D.M., Xu, P., Wijayawardana, S.R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., Sheng, M., Peng, J., (2006). *Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum*. Molecular Cell Proteomics, 5: 1158 –1170.
- Cheriyian, J., Kumar, P., Mayadevi, M., Surolia, A., Omkumar, R. V., (2011). *Calcium/calmodulin dependent protein kinase II bound to NMDA receptor 2B subunit exhibits increased ATP affinity and attenuated dephosphorylation*. PLoS ONE, 6(3): e16495.
- Convertini, P., Zhang, J., de la Grange, P., Hayward, L., Zhu, H., & Stamm, S. (2013). *Genome wide array analysis indicates that an amyotrophic lateral sclerosis mutation of FUS causes an early increase of CAMK2N2 in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta, 1832: 1129–1135.

- De Simoni, A., Yu, L.M., (2006). *Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method*. Nature Protocols, 1: 1439-1445.
- Derkach, V., Barria, A., Soderling, T. R., (1999). *Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 3269–3274.
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., Soderling, T.R., (2007). *Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity*. Nature Reviews in Neuroscience, 8: 101–113.
- Ehlers, M.D., Heine, M., Groc, L., Lee, M.C., Choquet, D., (2007). *Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity*. Neuron, 54: 447–460.
- Giese, K.P., Federov N.B., Filipkowski, R. K., Silva, A. J., (1998). *Autophosphorylation at Thr286 of the alfa calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning*. Science, 279: 870-873.
- Gouet, C., Aburto, B., Vergara, C., Sanhueza, M., (2012). *On the mechanism of synaptic depression induced by CaMKIIN, an endogenous inhibitor of CaMKII*. Plos One 7 (11): 1-11.
- Halt, A., Dallapiazza, R., Zhou, Y., Stein, I., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A., Hell, J., (2012). *CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation*. EMBO Journal, 31:1203-1216.
- Hayashi, Y., Shi, S., Esteban, J., Piccini, A., Poncer, J., Malinow, R., (2000). *Driving AMPARs into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction*. Science, 287: 2262–2267.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huganir, R.L., Cognet, L., and Choquet, D., (2008). *Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission*. Science, 320: 201–205.
- Hell, J.W., (2014). *CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization*. Neuron, 81: 249–65.
- Huang, C., Lee, C., Hsu, K., (2004). *An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus*. Journal of Neurochemistry, 89: 217–231.
- Johnson, M.W., Chotiner, J.K., Watson, J.B., (1997). *Isolation and characterization of synaptoneurosome from single rat hippocampal slices*. Journal of Neuroscience Methods, 77: 151–156.

- Kessels, H., Malinow, R., (2009). ***Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior***. *Neuron*, 61: 340–350.
- Kim, M., Dunah, A., Wang, Y., Sheng, M., (2005). ***Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking***. *Neuron*, 46: 745–760
- Kim M., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., Sheng, M., (2008). ***Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95***. *Neuron*, 57: 326-327.
- Kopec, C., Li, B., Wei, W., Boehm, J., Malinow, R., (2006). ***Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation***. *The Journal of Neuroscience*, 26: 2000–2009.
- Kristensen, A.S., Jenkins, M.A., Banke, T.G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R.C., Huganir, R., Traynelis, S.F., (2011). ***Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating***. *Nature Neuroscience*, 14: 727–735.
- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., Huganir, R., (2000). ***Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity***. *Nature*, 405: 955–959.
- Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Gallagher, M., Huganir, R.L., (2003). ***Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory***. *Cell*, 112: 631–643.
- Leonard, A. S., Lim, I. A., Hemsworth, D. E., Horne, M. C., Hell, J. W., (1999). ***Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor***. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 3239–3244.
- 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: 3063–3070.
- Lisman, J.E., Yasuda, R., Raghavachari, S., (2012). ***Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation***, *Nature Reviews Neuroscience*, 31: 169- 182.
- Lisman, J. E., Zhabotinsky, A. M., (2001). ***A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly***. *Neuron*, 31: 191–201.

- Makino, H., Malinow, R., (2009). ***AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis.*** *Neuron*, 64:381–390.
- Malenka, R. C., Bear, M. F., (2004). ***LTP and LTD: an embarrassment of riches.*** *Neuron*, 44: 5–21.
- Malinow, R., Schulman, H., Tsien, R.W., (1989). ***Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP.*** *Science*, 245:862-866.
- Malinow, R., Malenka, R.C., (2002). ***AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity.*** *Annual Reviews in Neuroscience*, 25: 103–126.
- Man, H.Y., (2011). ***GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors—inducers of plasticity?*** *Current Opinion in Neurobiology*, 21: 291–298.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., Hell, J.W., (2005). ***Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII.*** *Trends in Pharmacological Sciences*, 26: 645-53.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., (1994). ***Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors.*** *Neuron*, 12: 529–540.
- Mullasseril, P., Dosemeci, A., Lisman, J.E., Griffith, L.C., (2007). ***A structural mechanism for maintaining the 'on-state' of the CaMKII memory switch in the post-synaptic density.*** *Journal of neurochemistry*, 103: 357–64.
- Okamoto, K., Narayanan, R., Lee, S.H., Murata, K., and Hayashi, Y., (2007). ***The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure.*** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 6418–6423.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P., Choquet, D., (2010). ***CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of Stargazin.*** *Neuron*, 67: 239–252.
- Opazo, P., Choquet, D., (2011). ***A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors.*** *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46: 1-8.
- Otmakhov, N., Khibnik, L., Otmakhova, N., Carpenter, S., Riahi, S., Asrican, B., Lisman, J., (2004). ***Forskolin-Induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent.*** *Journal of Neurophysiology*, 91: 1955–1962.
- Petralia, R.S., Sans, N., Wang, Y.X., Wenthold, R. J., (2005). ***Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses.*** *Molecular Cell Neuroscience*, 29: 436-452.

- Plant, K., Pelkey, K.A., Bortolotto, Z. A., Motita, D., Terashima, A., Mc Bain, C. J., Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R., (2006). ***Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation.*** *Nature Neuroscience*, 9: 602-604.
- Radwańska, K., Tudor-Jones, aa, Mizuno, K., Pereira, G.S., Lucchesi, W., Alfano, I., Łach, a, Kaczmarek, L., Knapp, S., and Giese, K.P., (2010). ***Differential regulation of CaMKII inhibitor beta protein expression after exposure to a novel context and during contextual fear memory formation.*** *Genes, Brain, and Behavior*, 9: 648-657.
- Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., Malinow, R., (2005). ***Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning.*** *Science*, 308: 83-88.
- Saha, S., Ramanathan, A., Rangarajan, P.N., (2006). ***Regulation of Ca²⁺/calmodulin kinase II inhibitor α (CaMKII α) in virus-infected mouse brain.*** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350: 444-449.
- Saha, S., Datta, K., and Rangarajan, P., (2007). ***Characterization of mouse neuronal Ca²⁺/calmodulin kinase II inhibitor α .*** *Brain Research*, 1148: 38-42.
- Sanhueza, M., McIntyre, C.C., Lisman, J.E., (2007). ***Reversal of synaptic memory by CaMKII inhibitor.*** *The Journal of Neuroscience*, 27: 5190-5199.
- Sanhueza, M., Fernandez-Villalobos G., Stein I.S., Kasumova G., Zhang P., Bayer, K.U., Otmakhov, N., Hell, J. W., Lisman, J., (2011). ***Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength.*** *The Journal of Neuroscience*, 31: 9170-9178.
- Sanhueza, M., Lisman, J., (2013). ***The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory.*** *Molecular Brain* 6:10.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D., Nicoll, R., (2002). ***Direct interactions between PSD-95 and stargazing control synaptic AMPA receptor number.*** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 13902-13907.
- Shen, K., Meyer, T., (1999). ***Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation.*** *Science*, 284:162-166.
- Shen, K., Teruel, M.N., Connor, J.H., Shenolikar, S., Meyer, T., (2000). ***Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.*** *Nature Neuroscience*, 3: 881-886.
- Sheng, M., Hoogenraad, C.C., (2007). ***The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view.*** *Annual Reviews in Biochemistry*, 76: 823-847.

- Shipton, O.A., Paulsen, O., (2013). *GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity*. Philosophical Transactions R Society Of London. B. Biol. Sci., 369: 20130163.
- Stoppini, L., Buchs, P., Muller, D., (1991). *A simple method for organotypic cultures of nervous tissue*. Journal of neuroscience methods, 37: 173–182.
- Szepesi, Z., Bijata, M., Ruszczycki, B., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J., (2013). *Matrix Metalloproteinases Regulate the Formation of Dendritic Spine Head Protrusions during Chemically Induced Long-Term Potentiation*. PLoS ONE, 8: e63314.
- Tomita, S., Stein, V., Stocker, T.J., Nicoll, R.A., Bredt, D.S., (2005). *Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs*. Neuron, 45: 269–277.
- Turrigiano, G., Nelson, S., (2004). *Homeostatic plasticity in the developing nervous system*. Nature Reviews in Neuroscience, 5: 97–107.
- Turrigiano, G., (2012). *Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4: p. a005736.
- Vest, R. S., Davies, K. D., O'Leary, H., Port, J. D., Bayer, K. U., (2007). *Dual Mechanism of a Natural CaMKII Inhibitor*. Molecular Biology of the Cell, 18: 5024-5033.
- Villasana, L.E., Klann, E., Tejada-Simon, M.V., (2006). *Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus*. Journal of Neuroscience Methods, 158: 30–36.
- Vyazovskiy, V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., Tononi, G., (2008). *Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep*. Nature Neuroscience, 11: 200-208.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., (2006). *Learning induces long-term potentiation in the hippocampus*. Science, 313: 1093–1097.
- Yashiro, K., Philpot, B.D., (2008). *Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity*. Neuropharmacology, 55: 1081–1094.
- Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G. D., Hell, J. W., Kennedy, M. B., Silva, A. J., (2007). *Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning*. The Journal of Neuroscience, 27: 13843–13853.